

**FABRÍCIA GONÇALVES LACERDA**

**COMPORTAMENTO E MORFOLOGIA DAS OPERÁRIAS DE *Atta  
sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) ENVOLVIDAS NA  
MANIPULAÇÃO DE LIXO DAS COLÔNIAS**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
programa de Pós-Graduação em  
Entomologia, para a obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

FABRÍCIA GONÇALVES LACERDA

**INFLUÊNCIA DO LIXO DE COLÔNIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* EM  
ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E MORFOLÓGICOS DAS OPERÁRIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada em 31 de julho de 2008

---

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Co-orientador)

---

Profa. Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Co-orientadora)

---

Prof. Alcides Moino Junior

---

Prof. Márcio da Silva Araújo

---

Terezinha Maria Castro Della Lucia  
(Orientadora)

*Aos meus pais, Paulo e Adelina,  
dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa pela minha formação acadêmica e pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao CNPq e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos

À minha orientadora Terezinha Della Lucia pela orientação, pelo apoio e incentivo.

Ao professor Lucio Campos, por quem tenho grande consideração e admiração. Agradeço pelas sugestões sempre valiosas relacionadas à minha pesquisa, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Professora Catarina Kasuya por tornar possível a realização de parte desse trabalho, pela boa vontade e interesse em meu trabalho.

Ao Professor José Eduardo Serrão pelo importante auxílio durante a execução do trabalho sobre a glândula metapleural, pela boa vontade e pelos ensinamentos.

Ao Professor Olinto Pereira pela eficiência na identificação dos fungos, pela boa vontade e competência.

Aos Professores Og de Souza e Paulo Cecon pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Professora Sílvia Pompolo pela permissão dada para a utilização dos equipamentos em seu laboratório.

À Universidade Federal de Lavras pela permissão dada a mim para cursar as disciplinas de Patologia de Insetos e Fisiologia de Insetos, as quais foram de grande importância para minha formação e execução do projeto de Doutorado.

Ao Professor Alcides Moíno Júnior (UFLA) pelos ensinamentos e também pela permissão concedida a mim para cursar a disciplina Patologia de Insetos.

Ao Professor Geraldo Carvalho (UFLA) pelos ensinamentos e também por me permitir cursar a disciplina Fisiologia de Insetos.

Aos companheiros Terezetes do Insetário: Alice, Eltamara, Ethel, Gabriela, Ilka, Márcio, Marquinho, Mateus, Myriam, Seu Manoel e Wesley pelos momentos alegres, pela compreensão e pela ajuda e, especialmente, ao Lucas pelo grande auxílio durante a execução dos experimentos, pela boa vontade e eficiência.

Ao pessoal do Laboratório de Micorrizas pelo auxílio e pelas sugestões e, principalmente, ao Marcelo dos Reis pela grande ajuda durante o início do processo de isolamento dos fungos.

À Paula, secretária da Entomologia, pela boa vontade de sempre e pela competência.

Ao Hamilton pela amizade, pelo bom humor e por sua alegria de sempre.

Ao Danival pela amizade e pelas sugestões valiosas ao meu trabalho.

À Riviane pelas sugestões sempre bem vindas ao meu trabalho e pela amizade.

Ao Well pelo carinho, pela compreensão e amizade.

Às companheiras de república Fernanda, Gigi e Lily pela amizade e pelos momentos felizes pelos quais passamos juntas.

Às amigas de várias repúblicas onde morei e que tornaram a vida em Viçosa mais alegre: Ane, Carol Brighenti, Carol Montesano, Daniela, Joseane, Luana, Mirian, Nice e Rafaella.

Ao meu tio Ray pelo incentivo, pelos conselhos e pela amizade.

À minha família pelo apoio, pela dedicação e confiança.

## BIOGRAFIA

Fabírcia Gonçalves Lacerda, filha de Paulo Gonçalves Lacerda e Adelina Maria da Conceição Lacerda, nasceu em Manhuaçu, Minas Gerais, em 18 de abril de 1974.

Em 1997, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na qual graduou-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas em 2001.

Em março de 1998, iniciou estágio no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, sendo também bolsista de Iniciação Científica do CNPq em que desenvolveu projetos sobre comportamento de formigas cortadeiras.

Em abril de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, e defendeu tese em março de 2004.

Em agosto de 2004, deu início ao curso de Doutorado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 31 de julho de 2008.

## RESUMO

LACERDA, Fabrícia Gonçalves, D.S. Universidade Federal de Viçosa. Julho de 2008. **Comportamento e morfologia das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) envolvidas na manipulação de lixo das colônias.** Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-orientadores: Lucio Antonio de Oliveira Campos e Maria Catarina Megumi Kasuya.

O presente estudo é constituído por três partes, sendo os experimentos realizados no Insetário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no Laboratório de Associações Micorrízicas/Bioagro/DMB (UFV) e também no Laboratório de Biologia Celular e Biofísica (UFV). Em todos os trabalhos, a subespécie de formiga cortadeira utilizada foi *Atta sexdens rubropilosa* Forel. No primeiro trabalho, constatou-se que quando operárias lixeiras e forrageadoras são colocadas sobre o jardim de fungo, as primeiras recebem mais “grooming” (limpeza), além de serem mais inspecionadas e imobilizadas pelas companheiras de ninho do jardim; tais comportamentos não diferiram entre colônias que tiveram o lixo contaminado por esporos de *Escovopsis weberi* e as que não foram contaminadas. Os comportamentos de “grooming”, inspeção e imobilização podem representar estratégias comportamentais para evitar a contaminação da colônia a partir do lixo. O comportamento de “self-grooming” (auto-limpeza) foi semelhante em lixeiras e forrageadoras quando colocadas sobre o jardim e não diferiu em colônias contaminadas e sem contaminação. Não houve comportamento de agressividade das operárias do jardim em relação às lixeiras e forrageadoras; ocorreu apenas hostilidade, em raras ocasiões, a qual foi também mais intensa em relação às lixeiras e em colônias não-contaminadas. A análise microbiana realizada na superfície corpórea das operárias do lixo e jardim de fungo das colônias não-contaminadas por *E. weberi* revelou a presença de *Trichoderma*, um antagonista do jardim de fungo, dentre outros fungos saprófitas e fitopatógenos. Constatou-se, ainda, que 83,28% das operárias do lixo não ficam confinadas a esse compartimento, podendo transitar livremente pela colônia. No segundo trabalho, constatou-se que tarefas como o cuidado no interior do jardim são freqüentes no decorrer da vida das operárias, apesar de declinarem em termos de ocorrência nas últimas semanas de vida dessas. As atividades de forrageamento também ocorrem durante todo o período de vida das operárias, tornando-se mais freqüentes no final da vida dessas operárias. Portanto, as operárias apresentam polietismo etário em relação às tarefas no interior do jardim de fungo e ao forrageamento. Já o trabalho

no lixo pelas operárias ocorre durante toda a vida delas, sendo mais freqüente nas primeiras semanas de vida. Assim, o polietismo etário não se aplica às tarefas relacionadas ao lixo da colônia. Verificou-se, também, que a casta predominante, em número de operárias, no compartimento de lixo da colônia foi a das jardineiras seguida pelas generalistas, forrageadoras e soldados. Constatou-se, ainda, que operárias do lixo são capazes de cuidarem do jardim de fungo, entretanto, a freqüência de cuidados é menor que a das as operárias que trabalham normalmente nesse compartimento. Operárias lixeiras exibiram cuidado com a prole e forrageamento semelhantes ao das operárias não-lixadeiras. Entretanto, em relação às atividades do lixo, a freqüência de lixeiras trabalhando no compartimento de lixo foi maior do que a das não-lixadeiras. Portanto, operárias lixeiras são capazes de se engajar nas diversas tarefas da colônia. No terceiro trabalho, constatou-se que operárias lixeiras, transportadoras de lixo e forrageadoras apresentaram maior volume do reservatório da glândula metapleurar, produtora de antibióticos, do que operárias do jardim de mesmo tamanho; esse volume não diferiu entre essas três primeiras castas. A relação núcleo-citoplasma bem como a área de superfície da bula não diferiu entre as quatro classes de operárias avaliadas. Concluiu-se que as operárias, que trabalham no exterior da colônia, as quais se expõem mais intensamente aos riscos de parasitismo, encontram-se mais bem equipadas morfologicamente, uma vez que possuem glândula metapleurar mais desenvolvida.

## ABSTRACT

LACERDA, Fabrícia Gonçalves, D.S. Federal University of Viçosa. July 2008. **Behavior and morphology of the *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers involved in the manipulation of waste of the colonies.** Advisor: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-advisors: Lucio Antonio of Oliveira Campos and Maria Catarina Megumi Kasuya.

This was a three-parts research, conducted in Insectary of the Federal University of Viçosa (UFV), in the Laboratory of Mycorrhizal Associations (UFV) and also in the Laboratory of Cellular Biology and Biophysics (UFV). The species of leaf-cutting ant used was *Atta sexdens rubropilosa* Forel. In the first work, it was verified that when waste workers and foragers are put on the fungus garden, the first ones receive more grooming, they were more inspected and immobilized by the nestmates of the fungus garden. Such behaviors did not differ among colonies that had the waste artificially contaminated by spores of *Escovopsis weberi* Muchovej & Della Lucia and the ones that were not contaminated. The behaviors of grooming, inspection and immobilization can represent behavioral strategies to avoid the contamination of the colony by the garbage. The behavior of self-grooming was similar in waste workers and foragers when put on the fungus garden and it did not differ in contaminated colonies and no-contaminated colonies. There was not aggressiveness by workers of the fungus garden towards the waste workers and foragers. In rare occasions, hostility was observed. It was also more intense towards waste workers and in non-contaminated colonies. The microbial analysis of body surface in the waste workers and gardeners of the non-contaminated colonies by *E. weberi* revealed the presence of *Trichoderma*, an antagonist of the fungus garden, among other saprophytes and pathogens of plants. It was verified that 83,28% of the workers of the waste are not confined to that compartment; they could move freely through out the colony. In the second part of the research, it was verified that tasks as the care inside the garden are frequent throughout the workers' life, in spite of their decrease in occurrence in the last weeks of these ant's life. The foraging activities also occurred during the whole period of the workers' life, becoming more frequent at the end of their lifespan. Therefore, the workers present age polyethism in relation to the tasks inside the fungus garden and to the foraging. On the other hand, the work in the garbage occurs during the lifetime of the waste workers, being more frequent in their first weeks of life. Likewise, the age polyethism does not apply to the tasks related to the waste of the colony. It was verified also, that the

predominant caste, in number of workers, in the waste chamber of the colony was the gardeners followed by the generalists, foragers and soldiers. It was also verified that waste workers are capable of taking care of the fungus garden, however, the frequency of this care is lower than that by the workers that usually work in that site. Waste workers exhibited brood care and foraging similar to those of non-waste workers. However, with respect to the waste, the frequency of waste workers working in the garbage chamber was higher than that of the other workers. Therefore, waste workers are able to engage in the several tasks of the colony. In the third bioassay, it was verified that waste workers, waste transporters and foragers had larger volume of the reservoir of the metapleural gland, which produces antibiotics, than workers of the fungus garden of same size. The reservoir volume of the gland did not differ among the first three castes. The relationship nucleus-cytoplasm as well as the area of surface of the bulla of the metapleural gland did not differ among the four classes of workers. It was concluded that the workers, that perform tasks outside of the colony, which are exposed more intensely to the risks of parasitism, are morphologically better equipped, since they possess more developed metapleural gland.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	10
<b>Comportamento de operárias do jardim de fungo em relação às companheiras de ninho lixeiras de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera: Formicidae)</b> .....	15
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Metodologia.....	19
Resultados.....	24
Discussão.....	30
Referências Bibliográficas.....	35
<b>Polietismo etário e mudança de funções em operárias do lixo em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i></b> .....	38
Resumo.....	38
Abstract.....	39
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	43
Resultados.....	48
Discussão.....	55
Referências Bibliográficas.....	60
<b>Morfometria da glândula metapleural de diferentes subcastas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i></b>	63
Resumo.....	63
Abstract.....	64
Introdução.....	64
Material e Métodos.....	66
Resultados.....	68
Discussão.....	69
Referências Bibliográficas.....	73
<b>3.CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	78

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A tribo Attini (subfamília Myrmicinae) é constituída pelas formigas cultivadoras de fungo, sendo que essa associação originou-se entre 45 e 65 milhões de anos atrás (Mueller et al., 2001). Essa tribo é composta por 13 gêneros e aproximadamente 210 espécies descritas (Schultz e Meier, 1995, Brandão & Mayhé-Nunes, 2001). As Attini dos gêneros mais derivados, *Atta* e *Acromyrmex*, são mais comumente conhecidas como formigas cortadeiras e cultivam seu fungo a partir de partes de vegetais frescos (Hölldobler & Wilson, 1990). *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, que também são derivadas, utilizam vegetais mortos e eventualmente folhas frescas. As espécies basais dessa tribo geralmente usam restos de vegetais mortos e também fezes e cadáveres de insetos para cultivar o fungo simbiote (Pacheco & Berti Filho, 1987).

As formigas cultivadoras de fungo são obrigatoriamente dependentes deste. O fungo serve como fonte de alimento para as larvas e a rainha, enquanto as operárias suplementam sua alimentação com seiva de plantas (Littleddyke & Cherrett, 1976; Quinlan & Cherrett, 1979). O fungo cultivado por muitos membros das Attini derivadas produz uma estrutura especializada chamada gongilídia da qual as formigas se alimentam preferencialmente. Gongilídias são hifas dilatadas ricas em lipídios e carboidratos (Quinlan & Cherrett, 1979). Através de técnicas moleculares de filogenia, estabeleceu-se que a maioria dos fungos das Attini pertence à família Lepiotaceae (Basidiomycota: Agaricales), da tribo Leucocoprinae (Chapela et al., 1994). Esta tribo é composta por dois gêneros, *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus*.

A habilidade de cultivar fungo pelas formigas depende da proteção do jardim de fungo contra microrganismos agressivos que podem ser danosos à colônia como um todo. Dentre esses, está o parasita de jardim de fungo *Escovopsis*, descrito por Muchovej & Della Lucia (1990), que é responsável por alta virulência, sendo

transmitido horizontalmente entre as colônias (Currie et al., 1999a). Esse patógeno é adaptado especificamente ao parasitismo de jardins de fungo, provocando diminuição na taxa de crescimento dos ninhos, em termos de massa do jardim e também de número de operárias, larvas e pupas (Currie, 2001), podendo levar a colônia à morte, como constatado por Currie et al. (1999b) em experimentos com *Atta colombica* Santschi.

Entretanto, na luta pela supressão desse parasita, as formigas Attini associaram-se a um actinomiceto filamentososo do gênero *Pseudonocardia* que está presente no corpo das formigas e produz antibióticos capazes de suprimir a ação de *Escovopsis* (Currie et al., 1999a). Estudos recentes revelam, ainda, que as operárias do jardim comprimem esporos e hifas de fungos de *Escovopsis* em sua cavidade infrabucal e depositam o “pellet” resultante em pilhas perto do jardim. A cavidade infrabucal funciona como uma estratégia de esterilização matando esporos de fungos parasitas devido à produção de antibióticos por actinomicetos presentes nessa cavidade (Little et al., 2005).

Acredita-se que esse actinomiceto simbiote das Attini seja um terceiro mutualista em uma antiga simbiose entre as formigas, o fungo mutualista, o fungo parasita (*Escovopsis*) e *Pseudonocardia*. Primeiro, porque tal actinomiceto está bem representado entre os gêneros de Attini. Em segundo lugar, o actinomiceto é transmitido verticalmente de colônias-mães para colônias-filhas, assim como o fungo mutualista e, em terceiro lugar, ele promove o crescimento do fungo mutualista *in vitro*. Quarto e mais importante, *Pseudonocardia* produz antibióticos altamente potentes que inibem o crescimento de *Escovopsis*. As formigas beneficiam-se do actinomiceto pela produção de antibióticos inibidores de infecções microbianas do seu jardim de fungo e, em troca, elas o dispersam (Currie et al., 1999a), além de fornecerem nutrientes para o seu crescimento em criptas cuticulares que abrigam glândulas exócrinas (Currie et al., 2006).

A associação entre formigas cortadeiras e microrganismos pode ser considerada, portanto, uma estratégia para proteger os ninhos contra patógenos. Estudos recentes mostram a presença de uma bactéria do gênero *Burkholderia* no jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa* Forel que produz antibióticos inibidores do crescimento de patógenos de insetos e do jardim de fungo, mas que não afetam o fungo mutualista. Dentre os patógenos inibidos destacam-se os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams e também *Escovopsis weberi* Muchovej & Della Lucia (Santos et al., 2005). Além de ser encontrada no jardim de fungo, *Burkholderia* sp. foi também encontrada circundando a parede da câmara de fungo desses ninhos em campo. Segundo Bento et al. (1991), o solo onde as formigas cortadeiras estabelecem seu ninho apresenta cerca de dez vezes mais microrganismos que o solo que circunda colônias maduras dessas formigas. Conseqüentemente, uma alta incidência de microrganismos intrusos circunda colônias jovens. Portanto, a presença de *Burkholderia* sp. em ninhos jovens de *A. sexdens rubropilosa* pode ter uma função importante na sua defesa contra microrganismos patogênicos.

Formigas cortadeiras apresentam, ainda, outras estratégias para evitar a contaminação da colônia como um todo. Dentre elas, está o comportamento de higiene que é uma prática muito freqüente entre insetos sociais. Um exemplo desse comportamento é a lambedura/limpeza (do inglês: grooming) que corresponde à remoção de partículas da superfície do próprio corpo ou do corpo de um companheiro de ninho por meio de lambedura com a glossa. As partículas removidas podem incluir objetos estranhos tais como esporos de parasitas, hifas de fungos ou ovos e juvenis de nematóides. Portanto, o “grooming” pode prevenir infecções causadas por parasitas nesses insetos (Farish, 1972 *apud* Schmid-Hempel, 1998).

Comportamento de higiene entre formigas cortadeiras foi comprovadamente importante em estudos com *Acromyrmex echinator* Forel. Nesse estudo foi quantificada a relação custo-benefício entre aumento da transmissão de doenças, entre formigas vivendo em grupo, e o aumento das defesas contra doenças. Foi demonstrado que operárias expostas ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* tiveram aumento na sua sobrevivência quando eram mantidas junto com as companheiras de ninho, enquanto o custo de estar vivendo em um grupo, em termos do aumento da transmissão de doenças, foi baixo. Comportamento de “grooming”, “self-grooming” (auto-limpeza) e secreção de antibióticos, produzidos, provavelmente, pela glândula metapleurálica, sobre a cutícula foram aparentemente importantes na resistência das formigas contra esse parasita (Hughes et al., 2002).

Em formigas cultivadoras de fungo, a remoção física de contaminantes pelas operárias pode ocorrer quando esporos de outros fungos são trazidos para o ninho juntamente com o substrato vegetal (Quinlan & Cherrett, 1977). Mais de 30% das operárias que vivem na superfície do jardim de fungo ficam lambendo-o constantemente (Quinlan & Cherrett, 1979) e esse comportamento pode ser considerado um mecanismo de descontaminação pela remoção de esporos estranhos. Fato semelhante foi constatado por Bass & Cherrett (1994), em que as operárias de *A. sexdens* também controlaram o crescimento de contaminantes do jardim de fungo por meio do comportamento de “grooming”. Além disso, a retirada de patógenos pode se dar pela remoção de pedaços de jardim de fungo infectado, os quais são levados para o lixo da colônia (Currie & Stuart 2001).

A organização de insetos sociais de forma apropriada pode reduzir a possibilidade de transmissão de parasitas, diminuindo, assim, a habilidade de patógenos de se estabelecerem nas colônias. Por exemplo, se operárias podem infectar a rainha, o seu acesso a ela deve ser restrito, particularmente quando a colônia é monogâmica. Nesse contexto, pode-se notar que nas espécies de insetos sociais que apresentam divisão de trabalho baseada na idade (polietismo etário),

são os indivíduos mais jovens que assistem a rainha enquanto os mais velhos forrageiam (Wilson, 1971). A vantagem desse tipo de comportamento é que o alto risco de mortalidade imposto pelas adversidades no exterior da colônia recaem sobre a classe de operárias mais velhas e, portanto, “menos valiosas”, pois teoricamente deverão morrer mais rápido.

Em formigas, o polietismo etário pode ou não ser característico. Em *Pheidole hortensis* Forel operárias mais velhas continuam a realizar tarefas características de operárias jovens (Calabi et al., 1983). Já estudos recentes sobre esse comportamento em *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel demonstram que o polietismo etário está presente em colônias dessa subespécie de modo que operárias jovens permanecem dentro do ninho e as mais velhas realizam atividades no exterior da colônia (Camargo et al., 2007). Em *Ectatomma opaciventre* Roger, também já foi constatado que as atividades externas, como defesa e forrageamento, são realizadas por operárias mais velhas, sendo que as atividades de cuidado com a prole são realizadas pelas mais novas (Miguel & Del-Claro, 2005).

Outra estratégia exclusiva de formigas na proteção contra patógenos é a produção de antibióticos pela glândula metapleural, capazes de inibir fungos e bactérias. Essa glândula é constituída por estruturas pares localizadas no metatórax. Alguns compostos isolados dela com propriedades antibióticas são: ácido  $\beta$ -indolacético (IAA), ácido fenilacético (PAA) e  $\beta$ -hidroxidecanóico (mirmicacina) presentes nas espécies *A. sexdens* e *Myrmecia laevinodis* Clark, PAA e mirmicacina em *Messor barbarus* L. e IAA e mirmicacina em *A. subterraneus* (Schidknecht & Koob, 1970 *apud* Veal et al., 1992).

Poulsen et al. (2002) demonstraram que a habilidade de secretar antibióticos por essa estrutura é de significativa importância quando operárias de *Acromyrmex octospinosus* Reich são expostas ao entomopatógeno *M. anisopliae*. A infecção por esse fungo foi letal em poucos dias quando as formigas tiveram sua glândula

metapleural fechada experimentalmente, mas menos agressiva quando a glândula funcionava normalmente.

Estudos de alometria da glândula metapleural de *A. octospinosus*, realizados por Bot & Boomsma (1996), demonstraram que o tamanho relativo dessa glândula decresce relativamente com o aumento do tamanho do corpo da operária. Um aumento no tamanho da glândula implica na maior capacidade de produção de antibióticos. Assim sendo, há duas possíveis interpretações para o fato de operárias menores terem glândula metapleural maior: i) os antibióticos produzidos por operárias menores são utilizados na proteção do jardim de fungo diretamente contra microrganismos estranhos (Papa & Papa, 1982 *apud* Bot & Boomsma, 1996); ii) as próprias operárias menores necessitam de mais proteção que as maiores porque sua tarefa primária é limpar o jardim retirando os microrganismos estranhos, de forma que elas estão freqüentemente em contato mais próximo com patógenos (Bot & Boomsma, 1996). Além disso, foi demonstrado, recentemente, que operárias menores sobrevivem mais tempo que as maiores quando recebem determinada dose de *Aspergillus nomius* Kurtzman equivalente à sua massa corporal (Poulsen et al., 2006).

Uma possível fonte de contaminação da colônia de formigas cortadeiras é o compartimento de lixo dos ninhos. O refugio da colônia é constituído basicamente por jardim de fungo velho, o qual já teve seus nutrientes esgotados por parte das formigas e pode conter, ainda, cadáveres de operárias adultas, larvas e pupas também mortas, além de folhas secas. O compartimento de lixo pode abrigar patógenos prejudiciais tanto para o jardim de fungo quanto para as operárias. Dentre eles, destaca-se o parasita *Escovopsis* (Bot et al., 2001) já mencionado, o antagonista do jardim de fungo, *Trichoderma viride* Pers ex Gray, que causa inibição do crescimento do jardim (Ortiz & Orduz, 2000), além de *Aspergillus flavus* Link ex Gray e *Fusarium* sp., sendo, ambos, entomopatógenos oportunistas (Lacerda et al., 2006). No lixo de *A. colombica*, em campo, os entomopatógenos *M.*

*anisopliae* e *A. flavus* também já foram constatados (Hughes et al., 2004). O material de refugo de *A. sexdens rubropilosa* (Lacerda et al., submetido) e *A. echinator* (Bot et al., 2001) é extremamente prejudicial às operárias as quais têm alta taxa de mortalidade na presença dele.

As formigas cortadeiras, no entanto, já desenvolveram várias estratégias para lidar com o próprio lixo e evitar a contaminação da colônia. Assim, o lixo não é espalhado ao redor do ninho, mas é concentrado em um ou poucos locais. A maioria das espécies de *Atta* constrói câmaras subterrâneas onde deposita seu material de refugo (Autuori, 1947). Entretanto, algumas espécies de cortadeiras dispõem seu refugo em um único depósito sobre o solo a uma distância segura da colônia (Weber, 1972). Este é o caso de *A. colombica* em que o refugo é depositado em lagos, na base de árvores e ao longo de troncos caídos (Hart & Ratnieks, 2002).

O manuseio do lixo das colônias por formigas cortadeiras envolve uma forma de proteção do jardim contra contaminantes por meio do comportamento de partição de tarefas ao lidar com o material de refugo. Isso minimiza o contato das operárias do jardim de fungo com o monte de lixo. Esse comportamento é característico de *Atta cephalotes* L. (Hart & Ratnieks 2001) e *A. sexdens rubropilosa* (Lacerda et al., 2006), sendo que na maioria das vezes, o lixo é transferido indiretamente para o depósito principal. Isto significa que a carga trazida do jardim de fungo é depositada pela operária sobre um pequeno monte secundário de lixo e, posteriormente, coletada por outra operária e transferida para o monte principal.

Segundo Hart & Ratnieks (2001), há ainda uma divisão de trabalho entre operárias do depósito de lixo e as que trabalham no restante do ninho. Caso as "operárias do lixo" saiam deste local, sofrem fortes agressões pelas outras companheiras de ninho. Esse comportamento agressivo está relacionado à

contaminação das operárias que manuseiam o material de refugio, evitando, dessa forma, a propagação de doenças na colônia.

O lixo pode ter, também, implicações em atividades como o forrageamento. Em trabalhos sobre manuseio de lixo em *A. colombica*, Hart & Ratnieks (2002) constataram que as operárias conduzem o refugio de um olheiro localizado entre a entrada de forrageamento e o monte de lixo em uma trilha bem definida. Em ninhos incipientes, o mesmo orifício serve como entrada de forrageamento e saída de lixo. O benefício da separação do olheiro para saída do lixo e para entrada de substrato vegetal é reduzir a contaminação do material que está entrando na colônia. Em colônias pequenas, onde não há essa separação, provavelmente o lixo representa um pequeno custo ou há um alto custo no fato de se ter duas entradas. Segundo esses mesmos autores, o monte de lixo afeta consideravelmente a localização das trilhas de forrageamento, sendo que a maioria destas são direcionadas contrariamente ao monte. Desse modo, o monte cria uma zona de exclusão através da qual as trilhas de forrageamento não passam. Portanto, deposição externa do lixo reduz o custo associado à escavação de câmaras de lixo, mas impõe custos ao forrageamento.

O estudo do lixo das colônias de formigas cortadeiras tem sido pouco explorado até o momento. Recentemente, tem-se dado maior importância a esse assunto, com a descoberta de que *Escovopsis* pode estar presente nesse compartimento. Pouca atenção tem sido dada a outros contaminantes que podem ocorrer no material de refugio dessas formigas, bem como às implicações que o lixo traz para a colônia como um todo. Dessa forma, este trabalho procurou elucidar alguns aspectos ainda obscuros na literatura, utilizando-se como objeto de estudo o lixo de colônias de *A. sexdens rubropilosa*, vulgarmente conhecida como saúvalimão. Essa subespécie é endêmica do sudeste do Brasil, mas também ocorre no centro-oeste e na região sul do país, sendo economicamente importante, uma vez que pode ser considerada praga em áreas agrícolas e florestais.

Assim sendo, o primeiro trabalho desta tese é um estudo do comportamento das operárias do jardim quando em contato com as operárias do lixo da colônia. Foi testada a hipótese de que operárias do lixo seriam agredidas pelas companheiras de ninho do jardim de fungo quando colocadas sobre esse compartimento. Também foram avaliados outros tipos de comportamento das operárias do jardim de fungo em relação às lixeiras como “grooming” (limpeza), inspeção, imobilização e ainda o “self-grooming” (auto-limpeza) dessas últimas. O experimento foi realizado em colônias que tiveram o compartimento de lixo artificialmente contaminado por esporos de *E. weberi* e em colônias não-contaminadas. Procurou-se verificar, ainda, os tipos de fungos encontrados na superfície corpórea das operárias do jardim e das lixeiras e, também, a possível existência de divisão de trabalho entre operárias lixeiras e as do restante do jardim, ou seja, se as operárias lixeiras trabalham exclusivamente no compartimento de lixo.

O segundo estudo realizado no presente trabalho teve como objetivos quantificar as castas de operárias no compartimento de lixo de colônias de *A. sexdens rubropilosa* e verificar a possível ocorrência de polietismo etário em colônias dessa subespécie. Foi testada, ainda, a hipótese de que operárias do lixo seriam capazes de executar outras tarefas na colônia, como cuidado do jardim, da prole e forrageamento.

Foi realizado, ainda, um trabalho na terceira parte da tese, sobre a glândula metapleural, produtora de antibióticos, de operárias lixeiras, transportadoras de lixo, forrageadoras e operárias do jardim. Dessa forma, procurou-se comparar o volume do reservatório da glândula metapleural, a relação núcleo/citoplasma das células secretoras e ainda a área da bula que corresponde a parte externa da glândula. A hipótese testada foi a de que operárias lixeiras teriam uma glândula mais desenvolvida do que as demais, uma vez que o trabalho no lixo impõe riscos devido à presença de contaminantes nesse compartimento. Assim, glândulas mais

desenvolvidas, nessa casta, poderiam proporcionar maior proteção a essas operárias contra patógenos devido à produção de antibióticos por essa estrutura.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Autuori, M. 1947. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. IV). O saúveiro depois da primeira revoada (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo. 18:** 39-70 p.
- Bass, M. & Cherrett, J.M. 1994. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology. 19:** 215-220 p.
- Bento, J.M.S., Della Lucia, T.M.C., Muchovej, R.M.C. & Vilela, E.F. 1991. Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de saúveiros iniciais de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 20:** 307-317 p.
- Bot, A.N.M. & Boomsma, J.J. 1996. Variable metapleural gland size-allometries in *Acromyrmex* leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Kansas Entomological Society. 69:** 375-383 p.
- Bot, A.N.M., Currie, C.R., Hart, A.G. & Boomsma, J.J. 2001. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology & Evolution. 13:** 225-237 p.
- Brandão, C.R.F. & Mayhé-Nunes, A.J. 2001. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology. 38:** 639-665 p.
- Calabi, P., Traniello, J.F.A & Werner, M.H. 1983. Age polyethism: its occurrence in the ant *Pheidole hortensis*, and some general considerations. **Psyche. 90:** 395-412 p.

- Camargo, R.S., Forti, L.C., Lopes, J.F.S., Andrade, A.P.P. & Ottati, A.L.T. 2007. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). **Journal of Applied Entomology**. **131**: 139-145 p.
- Chapela, I.H., Rehner, S.A., Schultz, T.R. & Mueller, U.G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**. **266**: 1691-1694 p.
- Currie, C.R., Mueller, U.G. & Malloch, D. 1999a. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America**. **96**: 7998-8002 p.
- Currie, C.R., Scott, J.A., Summerbell, R.C. & Malloch, D. 1999b. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control gardens parasites. **Nature**. **398**: 701-704 p.
- Currie, C.R. 2001. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**. **128**: 99-106 p.
- Currie, C.R. & Stuart, A.E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London B**. **268**: 1033-1039 p.
- Currie, C.R., Poulsen, M., Mendenhall, J., Boomsma, J.J. & Billen, J. 2006. Coevolved crypts and exocrines glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**. **311**: 81-83 p.
- Hart, A.G. & Ratnieks, F.L.W. 2001. Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. **49**: 387-392 p.
- Hart, A.G. & Ratnieks, F.L.W. 2002. Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Behavioral Ecology**. **13**: 224-231 p.
- Holldöbler, B. & Wilson, E.O. 1990. **The Ants**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 732 p.

- Hughes, W.O.H & Eilenberg, J & Boomsma, J.J. 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society of London. 269:** 1811-1819 p.
- Hughes, W.O.H. & Boomsma, J.J. 2004. Let your enemy do the work: within-host interaction between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society of London. 271:** 104-106 p.
- Lacerda, F.G., Della Lucia, T.M.C., Lima, E.R., Campos, L.A. & Pereira, O.L. 2006. Waste management by workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in colonies supplied with different substrates. **Sociobiology. 48:** 165-173p.
- Little, A.E.F., Murakami, T., Mueller, U.G. & Currie, C.R. 2005. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. **Biology Letters. 2:** 12-16 p.
- Littledyke, M. & Cherrett, J. M. 1976. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research. 66:** 205-217 p.
- Miguel, T.B. & Del-Claro, K. 2005. Politeísmo etário e repertório comportamental de *Ectatomma opaciventre* Roger, 1861 (Formicidae, Ponerinae). **Revista Brasileira de Zoociências. 7:** 297-310 p.
- Muchovej, J.J. & Della Lucia, T.M.C. 1990. *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Philocladus nomen invalidum*. **Mycotaxon. 37:** 191-195 p.
- Mueller, U.G., Schultz, T.R., Currie, C.R., Adams, R.M.M. & Malloch, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **The Quarterly Review of Biology. 76:** 169-197 p.
- Ortiz, A. & Orduz, S. 2000. In vitro evaluation in *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of fungus-growing ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia. 150:** 53-60 p.

- Pacheco, P., Berti Filho, E. 1987. Formigas quenquéns. p. 3-17. In: Pacheco P, Berti Filho E. (Ed.). **Formigas cortadeiras e o seu controle**. Degaspari, Piracicaba – SP.
- Poulsen, M., Bot, A.N.M., Nielsen, M.G. & Boomsma, J.J. 2002. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Behaviour Ecology and Sociobiology**. **52**: 151-157 p.
- Poulsen, M., Hughes, W.O.H. & Boomsma, J.J. 2006.. Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. **Insectes Sociaux**. **53**: 349-355 p.
- Quinlan, R.J. & Cherrett, J.M. 1977. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**. **2**: 161-170 p.
- Quinlan, R.J. & Cherrett, J.M. 1979. The role of the fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Ecological Entomology**. **4**: 151-160 p.
- Santos, A.V., Dillon, R.J., Dillon, V.M., Reynolds, S.E. & Samuel, R.I. 2005. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colony of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**. **239**: 319-323 p.
- Schmid-Hempel, P. 1998. **Parasites in social insects**. Princeton University Press, Princeton, 409 p.
- Schultz, T.R. & Meier, R.A. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters on the larvae. **Systematic Entomology**. **20**: 337-70 p.

Veal, D.A., Trimble, J.E. & Beattie, A.J. 1992. Antimicrobial properties of secretions from the metapleural glands of *Myrmecia gulosa* (The Australian bull ant). **Journal of Applied Bacteriology**. **72**: 188-194 p.

Weber, N. 1972. **Gardening ants: the Attines**. American Philosophical Society, Philadelphia.

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

**COMPORTAMENTO DE OPERÁRIAS DO JARDIM DE FUNGO EM RELAÇÃO  
ÀS COMPANHEIRAS DE NINHO LIXEIRAS DE *Atta sexdens rubropilosa*  
FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

F.G. Lacerda<sup>\*1</sup>, T.M.C. Della Lucia<sup>1</sup>, O.F.F. DeSouza<sup>1</sup>, O.L. Pereira<sup>2</sup>, M.C.M.  
Kasuya<sup>3</sup>, L.M.Souza<sup>1</sup>

**RESUMO**

O presente trabalho objetivou estudar o comportamento, em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, de operárias do jardim em relação às lixeiras e forrageadoras quando elas foram colocadas sobre o jardim. Utilizaram-se quatro colônias que tiveram o lixo contaminado, artificialmente, por esporos de *Escovopsis weberi* Muchovej & Della Lucia, um parasita de jardim de fungo, e quatro colônias sem contaminação. Foram avaliados os comportamentos de “grooming”, “self-grooming”, inspeção, imobilização e agressão. Também foram isolados os fungos contaminantes presentes na superfície corpórea de formigas lixeiras e do jardim das colônias não-contaminadas e, ainda, procurou-se verificar, em outras onze colônias, se operárias do lixo permanecem sempre nesse compartimento ou se transitam pela colônia para desempenhar outras tarefas. Constatou-se que os comportamentos de “grooming”, inspeção e imobilização por parte das operárias do jardim são mais intensos em relação às lixeiras do que em forrageadoras, sendo que tais comportamentos não diferiram entre colônias contaminadas e não-contaminadas. O comportamento de “self-grooming” foi semelhante em lixeiras e forrageadoras quando colocadas sobre o jardim de fungo e não foi diferente em colônias contaminadas e sem contaminação. Não houve comportamento de

---

\* Correspondência para: F.G. Lacerda. Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 36570-000. E-mail: lacerdafg@gmail.com

agressividade das operárias do jardim em relação às lixeiras e forrageadoras, existindo apenas um comportamento de hostilidade, em raras ocasiões, o qual foi também mais intenso em relação às lixeiras e em colônias não-contaminadas. O fungo contaminante, isolado a partir das operárias, de maior interesse foi *Trichoderma* sp., uma vez que ele é antagonista do jardim de fungo. Constatou-se, ainda, que 83,28% das operárias do lixo não ficam confinadas a esse compartimento, podendo transitar pelas diversas regiões da colônia. Conclui-se que operárias de *A. sexdens rubropilosa* apresentam estratégias comportamentais, como o “grooming”, inspeção e imobilização, para evitar a contaminação da colônia a partir do lixo. Além disso, a hipótese proposta, em trabalhos anteriores, de que a contaminação do lixo induz a agressividade em formigas cortadeiras, não encontra respaldo no presente estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** contaminação; “grooming”; hostilidade; inspeção; “self-grooming”, lixo da colônia.

#### **ABSTRACT**

This work aimed at studying the behavior of gardeners towards waste workers and foragers of *Atta sexdens rubropilosa* Forel when they were placed on the fungus garden of the colony. Four colonies that received the waste artificially contaminated with *Escovopsis weberi* Muchovej & Della Lucia spores, a parasite of fungus gardens, and four colonies without contamination were used. The behaviors evaluated were grooming, self-grooming, inspection, immobilization and aggression. Fungus contaminants present were also isolated on the body surface of the waste ants and of the gardeners from non-contaminated colonies. We also aimed at verifying in 11 other colonies if the waste the workers always remain in the waste chamber or if they more throughout the colony to perform other tasks. It was

observed that grooming, inspection and immobilization by the gardeners are more intense towards waste workers than foragers, although those behaviors did not differ among contaminated and non-contaminated colonies. Self-grooming was similar between waste workers and foragers when they were placed on the fungus garden and did not differ among contaminated and non-contaminated colonies. There was no aggressiveness of gardeners towards waste workers and foragers. In rare occasions an agonistic behavior was observed and it was more intense towards waste workers and in non-contaminated colonies. The most important fungus contaminant isolated from workers was *Trichoderma sp.*, since it is an antagonist of the fungus garden. A total of 83.28% of the waste workers did not remain at the waste chamber; they can move freely throughout the colony. It was concluded that workers of *A. sexdens rubropilosa* have behavioral strategies as the grooming, inspection and immobilization to avoid colony contamination from their waste. In addition, the hypothesis proposed in previous research that waste contamination induces aggressiveness in leaf-cutting ants can not be support by our study.

**KEY WORDS:** contamination; grooming; hostility; inspection; self-grooming

As colônias de insetos sociais são estruturadas de tal forma a existir nelas uma divisão de trabalho, sendo esse um dos critérios para a ocorrência de eusocialidade. Dentre as tarefas desempenhadas nos ninhos de formigas cortadeiras, tais como forrageamento, defesa, cultivo do fungo e cuidado com a prole estão, ainda, as atividades relacionadas à higiene da colônia. Neste último aspecto, enquadra-se a questão do lixo da colônia que corresponde ao material constituído por jardim de fungo já exaurido, por cadáveres de operárias, de larvas e pupas, além de folhas secas. Tal refugio tem sua importância, devido ao fato de que pode abrigar fungos contaminantes importantes para a colônia, como *Escovopsis* (Bot et al. 2001) e *Trichoderma viride* Pers ex Gray (Lacerda et al. 2006) que são

parasita e antagonista do jardim de fungo, respectivamente, além de *Aspergillus flavus* Link ex Gray (Hughes et al. 2004; Lacerda et al. 2006) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hughes et al. 2004), que são entomopatógenos. Estudos também comprovam que operárias que permanecem no lixo das colônias morrem mais rapidamente do que aquelas que estão em ambiente limpo (Bot et al. 2001; Lacerda et al. (submetido)).

Segundo Hart & Ratnieks (2001), há uma divisão de trabalho entre operárias de *Atta cephalotes* L. que trabalham no lixo e as que trabalham no restante do ninho. Caso as operárias do lixo saiam desse local, sofrem fortes agressões pelas operárias do jardim. Esse comportamento agressivo está relacionado à contaminação das operárias que manuseiam o material de refugio, evitando, dessa forma, a propagação de doenças para a colônia.

*Atta sexdens rubropilosa* Forel, conhecida vulgarmente como saúva-limão, é endêmica do sudeste do Brasil, mas também ocorre no centro-oeste e na região sul do país. Tal subespécie é economicamente importante, uma vez que causa danos à agricultura e aos reflorestamentos. Operárias dessa subespécie, assim como as de *A. cephalotes*, dispõem seu material de refugio no interior de câmaras subterrâneas isoladas da câmara em que se encontra o jardim de fungo. Além disso, ambas as espécies possuem comportamento de partição de tarefas durante o transporte de lixo (Hart & Ratnieks 2001, Lacerda et al. 2006), de modo que o fragmento de lixo é, na maioria das vezes, colocado em um pequeno depósito pelas transportadoras, sendo levado para o monte principal de lixo pelas operárias lixeiras.

A ocorrência do comportamento similar dessas espécies, quanto às questões de higiene na colônia, levou ao questionamento sobre os tipos de comportamentos existentes, em *A. sexdens rubropilosa*, entre operárias do jardim em relação às lixeiras, pois essas últimas podem disseminar parasitas existentes no lixo para o restante da colônia. Portanto, o presente trabalho objetivou verificar a ocorrência de comportamentos como “grooming” (limpeza/lambadura), “self-

grooming” (autolimpeza/autolambertura), inspeção e imobilização de operárias lixeiras comparadas com forrageadoras, quando elas são colocadas sobre o jardim de fungo. E, ainda, procurou-se investigar a possibilidade de ocorrência do comportamento de agressividade de operárias do jardim em relação às do lixo, como ocorre em *A. cephalotes* (Hart & Ratnieks 2001) e *Acromyrmex lobicornis* Emery (Ballari et al. 2007). Também foram verificados os tipos de fungos contaminantes presentes na superfície corpórea de operárias lixeiras e do jardim, além de determinar se operárias lixeiras trabalham exclusivamente no compartimento de lixo das colônias.

## METODOLOGIA

### **Comportamento das operárias do jardim de fungo em relação às forrageadoras e lixeiras em colônias não-contaminadas e contaminadas**

Foram utilizadas quatro colônias de *A. sexdens rubropilosa*, pertencentes ao Insetário da Universidade Federal de Viçosa. Tais colônias possuíam cerca de seis litros de jardim de fungo cada, sendo mantidas em sistema de forrageamento aberto, acondicionadas a  $25 \pm 2$  °C,  $75 \pm 3$  % de umidade relativa e 12 horas de fotofase (Della Lucia et al. 1993).

Para cada teste foram utilizadas cinco formigas do lixo e cinco forrageadoras, alternadamente, as quais eram colocadas individualmente sobre o jardim de fungo. Assim, uma operária forrageadora era retirada da arena de forrageamento e colocada sobre o jardim e o seu comportamento e das companheiras de ninho em relação a ela foi observado. Em seguida, essa operária era retirada, sendo colocada sobre o jardim uma operária do lixo. Cada operária inserida no jardim foi observada por dois minutos. De cada colônia, foram

observadas 150 operárias lixeiras e 150 forrageadoras. Tal metodologia é modificada de Hart & Ratnieks (2001).

Procurou-se observar os seguintes comportamentos: inspeção pelas companheiras de ninho do jardim, o “grooming”, o “self-grooming”, a imobilização e a agressão direcionados à operária introduzida. A imobilização das operárias introduzidas no jardim de fungo foi caracterizada pelo impedimento da operária “intrusa” de transitar pelo jardim, já que ela possuía as pernas presas ou o corpo preso pela mandíbula de suas companheiras de ninho do jardim de fungo. A agressão foi caracterizada pelo fato de a operária introduzida ser subjugada e atacada violentamente com mordidas pelas companheiras do jardim.

Para os comportamentos de inspeção, “grooming” e agressão foi feito o somatório do número de operárias que realizou cada comportamento em relação às lixeiras e às forrageadoras, em cada colônia, e esse valor foi dividido pelo total de testes realizados. Para os comportamentos de “self-grooming” e imobilização, foi feito o somatório do número de vezes que cada comportamento ocorreu em relação às lixeiras e forrageadoras, em cada colônia, sendo esse valor dividido pelo total de testes.

Também foram realizados estudos semelhantes ao anterior sobre o comportamento das operárias do jardim em relação às do lixo e das forrageadoras; entretanto, o lixo das colônias foi contaminado, artificialmente, com esporos do micoparasita *Escovopsis weberi* Muchovej & Della Lucia. Neste experimento, foram utilizadas outras quatro colônias de *A. sexdens rubropilosa*, acondicionadas da mesma forma que as colônias anteriores e com volume de jardim de fungo também de seis litros em cada colônia.

O lixo de cada colônia foi pesado, sendo a massa do refugo de todas as colônias, posteriormente, igualada, obtendo-se a massa fresca média de 22,24 g. Foram também pesadas 10 formigas para a obtenção da média das massas de cada indivíduo. Como a concentração de  $10^7$  esporos/mL de água destilada do

fungo *M. anisopliae* é suficiente para causar a morte de uma formiga (Hughes et al. 2002), essa mesma concentração foi utilizada para contaminar o lixo de cada colônia. Para a obtenção do volume de suspensão de esporos a ser borrifado no lixo, tomou-se por base a massa média das 10 operárias citadas, de forma que cada operária receberia 0,5 µL, sendo esse valor extrapolado para a massa do lixo. Assim, o lixo de cada colônia foi, então, inoculado com 2,09 mL de suspensão, contendo  $10^7$  esporos/mL de água destilada do fungo *E. weberi*; o controle somente recebeu água destilada.

Os testes, bem como o tipo de comportamento avaliados, foram idênticos aos do primeiro experimento, sendo, entretanto, utilizadas 50 operárias lixeiras e 50 forrageadoras no total em cada colônia. O número menor de operárias observadas em colônias contaminadas foi devido ao fato de que nesse experimento também não estava ocorrendo o comportamento de agressividade das operárias do jardim em relação às operárias lixeiras ou forrageadoras. E como 50 operárias já era um número suficiente para se realizar a análise estatística, considerou-se desnecessário realizar uma amostragem de mesmo tamanho da utilizada nas colônias não-contaminadas.

Nas colônias que tiveram o lixo contaminado, artificialmente, por *E. weberi*, com o passar dos dias, é provável que a concentração desse patógeno tenha diminuído, uma vez que o compartimento de lixo teve seu conteúdo aumentado pela atividade diária das operárias transportadoras de lixo. Dessa forma, é possível que, ao final dos experimentos, as operárias lixeiras estivessem menos contaminadas, diminuindo a possibilidade de ocorrência de agressividade das operárias do jardim em relação às lixeiras. Entretanto, para que houvesse certeza de que o fato de uma formiga estar contaminada desencadeasse o comportamento de agressividade pelas operárias do jardim, cerca de quatro operárias lixeiras de cada colônia contaminada artificialmente foram “mergulhadas” em placa de Petri com meio de cultura contendo esporos de *E. weberi* e, em seguida, introduzidas no

jardim de fungo. Os comportamentos das operárias do jardim em relação às operárias contaminadas foram observados, entretanto, não foram quantificados.

O experimento com colônias contaminadas por *E. weberi* foi realizado um ano após aquele já citado para colônias não-contaminadas. Dessa forma, a variável “ano” foi inserida no modelo estatístico para verificar se ela influenciava no comportamento das operárias em questão. Assim, as colônias contaminadas e não-contaminadas foram analisadas estatisticamente em um mesmo modelo, utilizando-se uma análise de variância aninhada com fatores fixos, representados pelas variáveis “ano” (níveis: contaminação e não-contaminação) e “operárias” (níveis: forrageadora e lixeira), e fator randômico, sendo a variável “operárias” aninhada dentro da variável “colônia”, esta última com oito níveis, cada nível representando cada uma das colônias testadas. Os dados foram analisados por meio do programa R (R Development Core Team, 2006).

### **Isolamento de microrganismos presentes no corpo de operárias do lixo e do jardim de fungo**

Para determinar os fungos contaminantes presentes na superfície corpórea das operárias do lixo e do jardim de fungo das colônias 1 a 4, foi feito o isolamento dos mesmos. Dessa forma, os fungos que fossem encontrados no corpo das formigas forneceriam o indicativo de quais contaminantes estariam presentes no lixo. O isolamento de fungos foi realizado apenas nas colônias não-contaminadas por *E. weberi*, pois desejava-se saber se a ausência de agressividade das operárias do jardim em relação às lixeiras era devida a uma possível ausência de contaminação do lixo.

Assim, cerca de 0,1 g de formigas lixeiras e do jardim de cada colônia foram colocadas separadamente em tubos contendo 2,5 mL de solução salina a 0,85 % esterilizada. Após a agitação dessa suspensão em vórtex, uma alíquota de 0,1 mL

foi espalhada, com alça de Drigalsky, em placa de Petri contendo meio BDA acrescido de Rosa Bengala e Estreptomicina 10 µg/mL. Foram utilizadas quatro placas de Petri para cada grupo de formigas (lixeiros e operárias do jardim) de cada colônia. As placas foram, então, mantidas em BOD a 25 °C até o crescimento das colônias de fungo. Esse procedimento foi adaptado daquele proposto por Alexander (1972).

O processo de isolamento foi repetido três vezes, sendo um isolamento a cada 15 dias. A identificação dos fungos foi realizada com base em características morfológicas, utilizando-se chaves taxonômicas.

### **Verificação de tarefas desempenhadas por operárias lixeiras**

Neste estudo, foram observadas 11 colônias de *A. sexdens rubropilosa* também acondicionadas de acordo com Della Lucia et al. (1993). Todas possuíam sistema de forrageamento aberto em que o monte de lixo era depositado em um recipiente plástico pelas próprias operárias. O volume de jardim de fungo foi diferente para cada colônia conforme a Tabela 1.

Todas as operárias presentes no lixo, exceto as mínimas, foram retiradas desse compartimento e tiveram seu gáster pintado com caneta Testor®, sendo devolvidas à colônia após o período de uma hora que correspondeu ao tempo de secagem da tinta. Operárias mínimas (cápsula cefálica com 0,8 a 1,0 mm de largura) não foram marcadas, uma vez que são de difícil visualização no lixo, o que poderia aumentar as chances de erro no experimento. O número de operárias marcadas encontra-se na Tabela 1, sendo diferente em cada colônia, uma vez que essas não possuíam as mesmas quantidades de operárias no lixo do tamanho desejado. Após 24 horas da marcação, foi feita a contagem do número de operárias marcadas presentes no lixo.

Tabela 1. Número de operárias lixeiras marcadas e volume de jardim de fungo das respectivas colônias.

Colônia	Volume de jardim de fungo (L)	Número de operárias marcadas
A	1,0	78
B	1,5	40
C	2,0	116
D	1,5	110
E	1,8	40
F	1,0	22
G	1,5	48
H	1,0	19
I	1,2	23
J	1,5	34
L	2,0	32

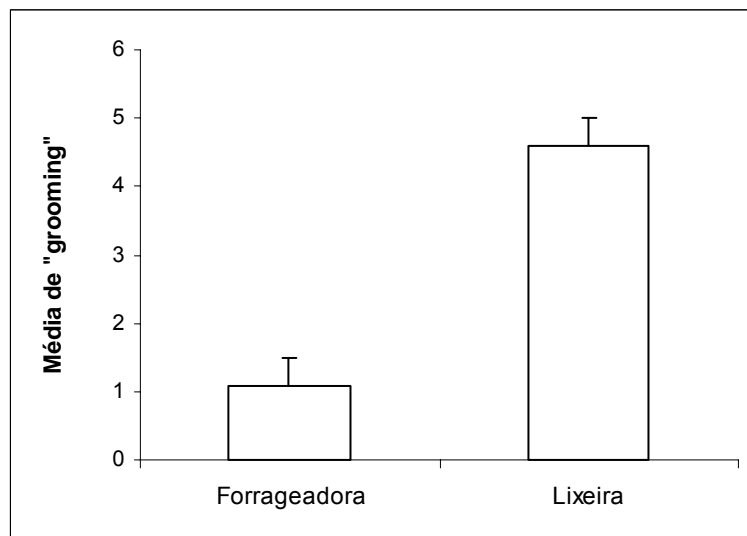
## RESULTADOS

### Comportamento de operárias do jardim de fungo em relação às operárias lixeiras e forrageadoras

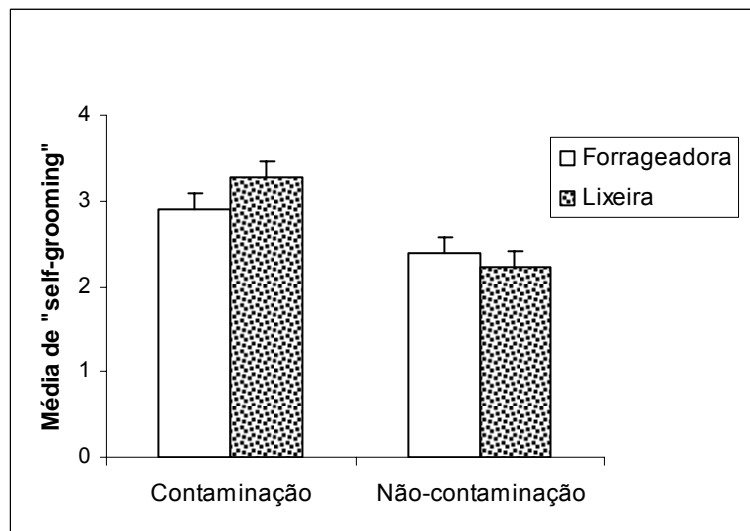
A contaminação por *E. weberi* não alterou o comportamento de “grooming” por operárias do jardim em relação às lixeiras e forrageadoras ( $F_{1,6} = 0,0155$ ;  $P = 0,9051$ ), ou seja, esse comportamento não diferiu tanto nas colônias contaminadas quanto nas não contaminadas. Entretanto, maior número de operárias do jardim de fungo efetuou mais “grooming” nas operárias lixeiras do que nas forrageadoras ( $F_{1,6} = 34,8279$ ,  $P = 0,001052$ ) como ilustrado na Figura 1.

Não houve diferença significativa quanto ao “self-grooming” entre operárias forrageadoras e lixeiras ( $F_{1,6} = 0,1593$ ;  $P = 0,7036$ ) quando colocadas sobre o jardim de fungo, ou seja, a média do número de vezes que esse comportamento ocorreu não diferiu entre operárias lixeiras e forrageadoras. Também não houve diferença significativa, quanto a esse comportamento, entre o ano em que houve

contaminação do lixo por *E. weberi* e o ano em que o lixo não foi contaminado ( $F_{1,6} = 2,9227$ ;  $P = 0,1382$ ) (Figura 2).



**Figura 1.** Número de operárias do jardim de fungo (média + erro-padrão) que efetuaram "grooming" em operárias forrageadoras e lixeiras. Lixeiras receberam mais "grooming" que forrageadoras ( $F_{1,6} = 34,8279$ ,  $P = 0,001052$ ).



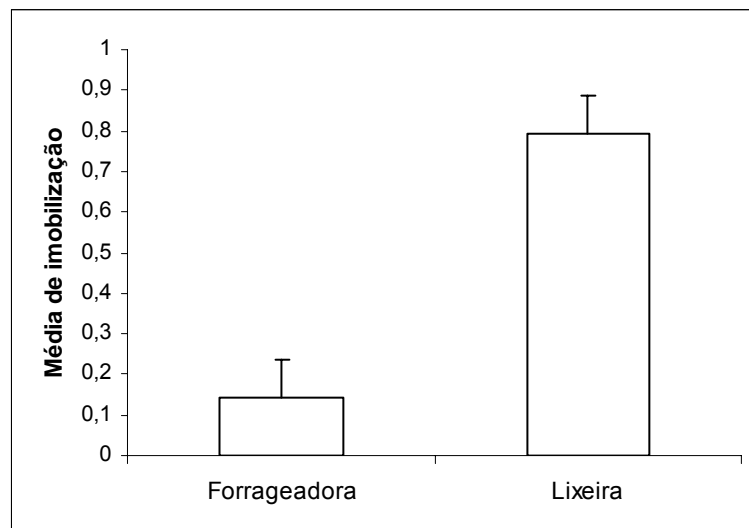
**Figura 2.** Número de vezes (média + erro-padrão) que ocorreu o comportamento de "self-grooming" por operárias forrageadoras e lixeiras em colônias com lixo contaminado e sem contaminação. Em ambas as situações (lixo contaminado e sem contaminação), não foi verificada diferença significativa desse comportamento entre operárias forrageadoras e lixeiras ( $F_{1,6} = 0,1593$ ;  $P = 0,7036$ ).

Quanto ao comportamento de imobilização, verificou-se que as operárias lixeiras foram significativamente mais imobilizadas do que as forrageadoras pelas operárias do jardim de fungo ( $F_{1,6} = 24,8190$ ;  $P = 0.002497$ ) (Figura 3). Esse

comportamento não diferiu em relação à presença e ausência de contaminação do lixo das colônias por *E. weberi* ( $F_{1,6} = 0,1819$ ,  $P = 0,6846$ ).

O comportamento de inspeção pelas operárias do jardim de fungo em relação às lixeiras foi significativamente mais intenso do que em forrageadoras ( $F_{1,6} = 66,5200$ ;  $P = 0,0001828$ ) (Figura 4). Entretanto, a intensidade da inspeção não diferiu entre colônias contaminadas e não-contaminadas por *E. weberi* ( $F_{1,6} = 0,0007$ ;  $P = 0,9792$ ).

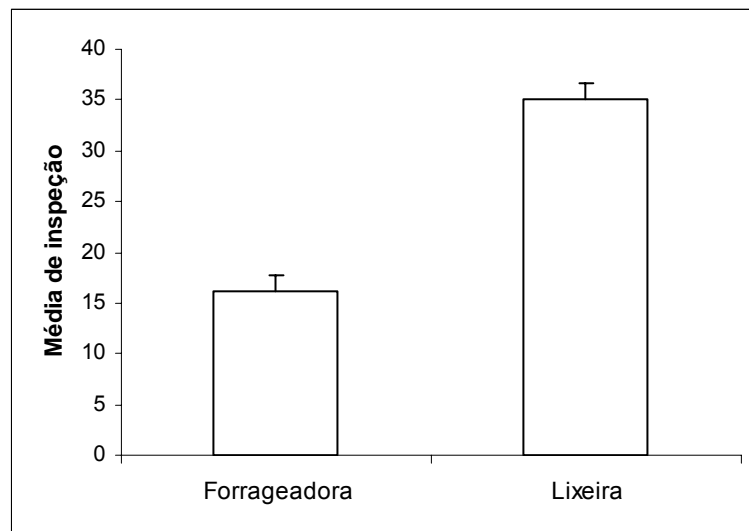
Operárias lixeiras de *A. sexdens rubropilosa* não foram agredidas pelas companheiras de ninho presentes no jardim de fungo. O termo agressividade foi, então, substituído por hostilidade, uma vez que a operária inserida no jardim, às vezes, recebia uma mordida, ou ainda tinha uma ou mais pernas presas por alguns segundos pela mandíbula de operárias do jardim. Após esses poucos segundos, a operária inserida era solta e podia caminhar livremente pelo jardim de fungo.



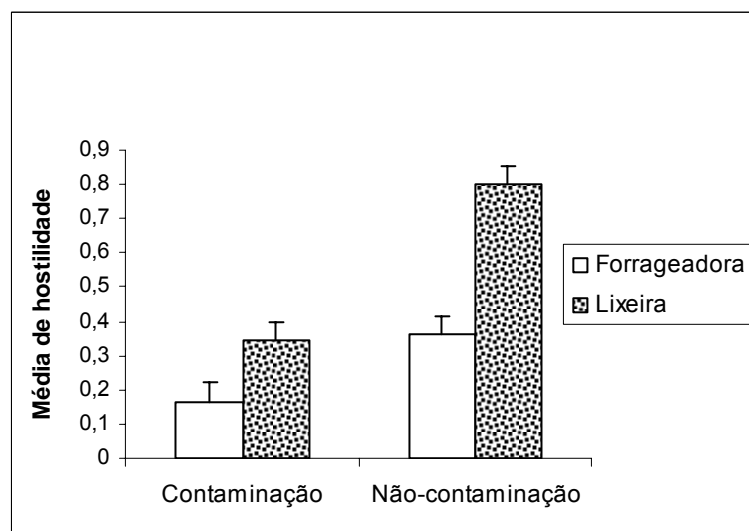
**Figura 3.** Número de vezes (média + erro-padrão) que operárias forrageadoras e lixeiras foram imobilizadas pelas operárias do jardim de fungo. Lixeiras foram mais imobilizadas que forrageadoras ( $F_{1,6} = 24,8190$ ;  $P = 0,002497$ ).

De qualquer forma, operárias lixeiras foram mais hostilizadas que as operárias forrageadoras pelas companheiras de ninho do jardim ( $F_{1,6} = 14,9067$ ;  $P =$

0,008353) como ilustrado na Figura 5. Essa hostilidade diferiu em relação à contaminação do lixo por *E. weberi*, sendo que, em colônias contaminadas, as lixeiras e forrageadoras foram menos hostilizadas do que em colônias não-contaminadas ( $F_{1,6} = 6,6527$ ;  $P = 0,04181$ ).



**Figura 4.** Número de operárias do jardim de fungo (média + erro-padrão) que inspecionaram operárias forrageadoras e lixeiras. Lixeiras foram mais inspecionadas que forrageadoras ( $F_{1,6} = 66,5200$ ;  $P = 0,0001828$ ).



**Figura 5.** Número de operárias do jardim de fungo (média + erro-padrão) que hostilizaram operárias forrageadoras e lixeiras. Em ambas as situações (lixo contaminado e sem contaminação), as lixeiras foram mais hostilizadas que as forrageadoras ( $F_{1,6} = 14,9067$ ;  $P = 0,008353$ ).

Também as operárias lixeiras das colônias contaminadas artificialmente por *E. weberi* que foram mergulhadas em meio de cultura contendo esporos desse patógeno não sofreram qualquer agressão pelas operárias do jardim. Os comportamentos observados, nesse caso, foram o de inspeção e “grooming” das operárias contaminadas pelas operárias do jardim. Tais comportamentos ocorreram em todas as operárias contaminadas nas quatro colônias observadas.

### **Isolamento de microrganismos presentes no corpo de operárias do lixo e do jardim de fungo**

Os fungos encontrados na superfície do corpo das operárias do lixo e do jardim de fungo das respectivas colônias estão listados na Tabela 2.

### **Tarefas desempenhadas por operárias lixeiras**

Das 562 operárias do lixo marcadas nas 11 colônias, 94 operárias (16,72 %) permaneceram nesse compartimento cerca de 24 horas após a marcação (Tabela 3). Após esse período, constatou-se que outras tarefas foram desempenhadas pelas operárias lixeiras marcadas, nas colônias, tais como forrageamento (22 operárias) e trabalho no jardim de fungo (5 operárias).

**Tabela 2.** Fungos encontrados na superfície corporal de operárias lixeiras e forrageadoras nas diferentes colônias.

Fungos	Colônia	Local do ninho	
		Lixo	Jardim de fungo
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
<i>Aspergillus melleus</i> Yakawa	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
<i>Fusarium solani</i> (Mart) Sacc.	1	+	+
	2	+	+
	3	-	+
	4	-	+
<i>Penicillium expansum</i> (Link.) Thom	1	-	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1	-	+
	2	+	-
	3	-	-
	4	-	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb ex. Fr.) Lind	1	-	-
	2	+	-
	3	-	-
	4	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	1	-	+
	2	-	-
	3	+	-
	4	+	+

**Tabela 3.** Frequência de operárias do lixo marcadas, por colônia, que foram encontradas desempenhando os respectivos comportamentos ou encontradas mortas no monte de lixo após 24 horas da marcação, sendo n o número de operárias pintadas em cada colônia.

Colônia	Frequência de operárias			
	Forrageando	Trabalhando no jardim	Trabalhando no lixo	Mortas
A (n=78)	0,05	0,00	0,13	0,03
B (n=40)	0,03	0,00	0,22	0,00
C (n=116)	0,009	0,03	0,19	0,00
D (n=110)	0,04	0,009	0,25	0,00
E (n=40)	0,05	0,00	0,05	0,05
F (n=22)	0,00	0,00	0,32	0,00
G (n=48)	0,08	0,00	0,15	0,06
H (n=19)	0,05	0,00	0,32	0,11
I (n=23)	0,09	0,04	0,13	0,13
J (n=34)	0,00	0,00	0,00	0,00
L (n=32)	0,09	0,00	0,03	0,13

## DISCUSSÃO

Operárias do lixo receberam significativamente mais “grooming” das operárias do jardim de fungo quando se compara com as operárias forrageadoras. Tal comportamento pode representar uma estratégia de defesa contra contaminantes, uma vez que a possibilidade de contaminação no local de lixo da colônia é maior dada à possível existência de patógenos. Entretanto, no presente trabalho, fungos entomopatogênicos que infectam formigas não foram encontrados na superfície do corpo das operárias das colônias não-contaminadas por *E. weberi*. Esporos de alguns fungos entomopatogênicos de importância para outros insetos foram encontrados sobre o corpo das formigas como *A. niger*, *A. melleus*, *F. solani* e *P. expansum*, sendo que os três primeiros já foram encontrados parasitando o

besouro *Melolontha melolontha* Linnaeus. *F. solani* já foi encontrado parasitando o besouro do pinho *Dendroctonus frontalis* Zimmermann, além de abelhas do gênero *Nomia*, e *P. expansum* pode parasitar larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Domsch et al. 1980). Quanto aos demais fungos encontrados, *C. cladosporioides* é saprófita o qual pode se associar a plantas vivas como o café (Pereira et al. 2005); *R. stolonifer* e *Pestalotiopsis* sp. são fitopatógenos.

*Trichoderma* sp., conhecido pela atividade antagônica ao jardim de fungo (Ortiz & Orduz 2000), foi encontrado na superfície corpórea das operárias lixeiras das colônias 1 e 4 e de operárias do jardim das colônias 3 e 4. Entretanto, a presença desse fungo nessas colônias não promoveu aumento do “grooming” das operárias nos ninhos contaminados, pois não houve diferença significativa quanto a essa atividade entre todas as colônias utilizadas (Figura 1). Da mesma forma, operárias de colônias infectadas artificialmente por *E. weberi* não tiveram comportamento de “grooming” mais intenso, visto que essa atividade em colônias contaminadas e não-contaminadas foi semelhante.

O comportamento de “self-grooming” das operárias ocorre de forma constante, uma vez que não houve diferença significativa quanto a auto-limpeza de forrageadoras e lixeiras introduzidas no jardim de fungo e nem entre o ano em que houve contaminação do lixo por *E. weberi* e o ano em que o lixo não foi contaminado (Figura 2). Além disso, desde que as operárias freqüentemente entram em contato umas com as outras e com materiais vindos do exterior da colônia, há, assim, necessidade dessas formigas de se limparem. Tanto o “self-grooming” quanto o “grooming” têm sua importância comprovada, uma vez que as operárias são capazes de comprimir esporos e hifas de fungos parasitas em sua cavidade infrabucal e depositam o “pellet” resultante em pilhas perto do jardim. (Little et al. 2005). Na cavidade infrabucal podem existir actinomicetos que produzem antibióticos e, dentre eles, pode estar presente um do gênero *Pseudonocardia*. Esse gênero também pode estar associado ao corpo das formigas

e é capaz de produzir antibióticos capazes de suprimir a ação de *Escovopsis* (Currie et al. 1999).

Comportamento de higiene entre formigas cortadeiras também foi comprovadamente importante em estudos com *Acromyrmex echinator* Forel em que operárias expostas ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* tiveram aumento na sua sobrevivência quando eram mantidas junto com as companheiras de ninho (Hughes et al. 2002).

A maior imobilização das lixeiras em comparação com as forrageadoras pode ser mais uma estratégia de defesa contra a contaminação do jardim de fungo, já que impede a operária de andar pelo jardim e propagar os contaminantes. A inspeção realizada por operárias do jardim em operárias lixeiras também foi mais intensa do que em forrageadoras. A inspeção é um comportamento importante na defesa da colônia contra patógenos, pois é o primeiro passo para a detecção desses parasitas. A partir dela, as operárias realizavam o “grooming” e a imobilização dos indivíduos inseridos no jardim durante os testes.

No presente estudo, as operárias do jardim de fungo não apresentaram comportamento de agressividade em relação às lixeiras como relatado em trabalhos com *A. cephalotes* (Hart & Ratnieks 2001) e *A. lobicornis* (Ballari et al. 2007). Nem mesmo as operárias do jardim de fungo de colônias em que o lixo foi contaminado artificialmente com *E. weberi* apresentaram comportamento de agressividade em relação às lixeiras. Nas colônias contaminadas ou não por *E. weberi*, em raras ocasiões, ocorreu apenas comportamento de hostilidade por parte das operárias do jardim. Assim, operárias lixeiras foram mais hostilizadas do que as forrageadoras pelas operárias do jardim e a hostilidade foi mais intensa nas colônias que não tiveram o lixo contaminado artificialmente por esporos de *E. weberi*.

Também não houve qualquer sinal de agressividade das operárias do jardim em relação às lixeiras que foram mergulhadas em meio de cultura contendo *E.*

*weberi*; apenas inspeção e “grooming”. Diante desses resultados, pode-se inferir que a contaminação do lixo, por esse micoparasita, não foi um fator determinante para desencadear um comportamento extremo de defesa, que é a agressividade, entre operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Portanto, a hipótese proposta por Hart & Ratnieks (2001) de que a contaminação do lixo induz a agressividade em *A. cephalotes* não encontrou respaldo no presente estudo. É possível também que linhagens diferentes de *Escovopsis* tenham virulência diferenciada e, assim, operárias de colônias contaminadas por uma linhagem mais virulenta possivelmente tenham comportamentos diferenciados. Deve-se considerar, também, que colônias quando submetidas a algum tipo de estresse podem apresentar alteração no comportamento das operárias. As colônias de *A. sexdens rubropilosa*, utilizadas no presente trabalho, estavam em perfeitas condições de desenvolvimento e funcionamento; por isso, acredita-se que as respostas obtidas não tenham qualquer distorção.

Operárias lixeiras de colônias de *A. sexdens rubropilosa* não ficam confinadas no compartimento de lixo ao contrário de *A. cephalotes* (Hart & Ratnieks 2001) e, ainda, podem desempenhar outras atividades como forrageamento e cuidado com o jardim de fungo, embora tais tarefas tenham sido observadas em pequeno número por essas lixeiras. É provável que a maioria das operárias do lixo marcadas tenham ido para o interior do jardim de fungo, a fim de realizar outras funções nesse local, já que a maioria não foi detectada na arena de forrageamento. Portanto, operárias lixeiras de *A. sexdens rubropilosa* pertencem a uma casta generalista conforme demonstrado por Wilson (1980), em que as diversas tarefas em uma colônia podem ser desempenhadas por elas. Assim sendo, não ocorre uma divisão de trabalho entre as lixeiras e as demais operárias da colônia ao contrário do que foi demonstrado por Hart & Ratnieks (2001) em estudos com *A. cephalotes*. Esse fato é reforçado pela ausência de agressividade das operárias do jardim de *A. sexdens rubropilosa* em relação às lixeiras,

permitindo a essas últimas transitar livremente por todos os compartimentos da colônia.

Estratégias comportamentais e fisiológicas contra patógenos são comuns dentre os insetos sociais em geral (Schmid-Hempel 1998). Tais mecanismos de defesa são necessários, já que as colônias de insetos sociais são caracterizadas por uma densa agregação de indivíduos geralmente aparentados, além de existir uma grande interação entre eles. Essas características facilitam a transmissão de doenças e fazem, dessas colônias, alvo particularmente vulnerável aos parasitas (Schmid-Hempel 1998).

Nas colônias de *A. sexdens rubropilosa*, utilizadas para o isolamento de fungos contaminantes presentes no corpo das formigas, não se constatou a presença de *Escovopsis* spp. dentre os fungos encontrados, havendo poucos registros desse parasita em ninhos escavados no Brasil. Entretanto, era de se esperar o contrário, uma vez que, nessa região, há abundância de espécies de cortadeiras e, se *Escovopsis*, é especialista em parasitar jardins de fungo, sua presença deveria também ser marcante na região. Portanto, a virulência de *Escovopsis*, nesse caso, poderia ser questionada. Um fato que corrobora essa última hipótese, no presente estudo, é o de que as operárias inseridas no jardim de fungo de colônias contaminadas ou não por esse parasita, apresentaram a mesma intensidade dos comportamentos de “self-grooming” e, ainda, o comportamento de “grooming”, inspeção e imobilização de operárias lixeiras e forrageadoras introduzidas no jardim não diferiu entre colônias contaminadas e sem contaminação.

Neste trabalho, constatou-se que operárias de *A. sexdens rubropilosa* apresentam uma série de comportamentos de proteção da colônia relacionados à contaminação pelo lixo. O investimento em determinado tipo de comportamento contra patógenos pode variar dentre as diferentes espécies de cortadeiras. Assim sendo, *A. sexdens rubropilosa*, ao contrário de *A. cephalotes* (Hart & Ratnieks

2001) e *A. lobicornis* (Ballari et al. 2007), não investe em agressividade para defender o compartimento do jardim de fungo, mas sim em comportamentos de inspeção, imobilização, “grooming” e “self-grooming”, sendo esses dois últimos comprovadamente eficazes na proteção contra o parasitismo (Hughes et al. 2002). De certa forma, a estratégia utilizada por *A. sexdens rubropilosa* seria um tanto vantajosa para a colônia, já que evita perdas de indivíduos causadas pela agressão. O conhecimento de tais mecanismos de defesa, bem como estudos de biologia básica e comportamento em geral são de grande importância, principalmente, em se tratando de insetos-praga, já que tais conhecimentos podem contribuir para o aumento das chances de sucesso do controle biológico por meio de microrganismos patogênicos no campo.

## REFERÊNCIAS

- Alexander, M.** 1972. *Introduction to soil microbiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Autuori, M.** 1947. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. IV) O saúveiro depois da primeira revoada (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). *Arquivos do Instituto Biológico*, **18**, 39-70.
- Ballari, S., Farji-Brener, A.G. & Tadey, M.** 2007. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: division of labour, aggressive behaviour, and location of external refuse dumps. *Journal of Insect Behavior*, **20**, 87-98.
- Bass, M. & Cherrett, J.M.** 1994. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecological Entomology*, **19**, 215-220.
- Bot, A.N.M., Currie, C.R., Hart, A.G. & Boomsma, J.J.** 2001. Waste management in leaf-cutting ants. *Ethology Ecology & Evolution*, **13**, 225-237.

- Currie, C.R., Scott, J.A., Summerbell, R.C & Malloch, D.** 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control gardens parasites. *Nature*, **398**, 701-704.
- Currie, C.R. & Stuart, A.E.** 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society of London*, **268**, 1033-1039.
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Anjos, N. & Moreira, D.D.O.** 1993. Criação de formigas cortadeiras em laboratório. In: As Formigas Cortadeiras (Ed. por T.M.C. Della Lucia), pp. 151-162. Viçosa: Folha de Viçosa.
- Domsch, K.H., Gams, W.P. & Anderson, T.** 1980. Compendium of soil fungi. New York: Academic Press.
- Hart, A.G. & Ratnieks, F.L.W.** 2001. Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **49**, 387-392.
- Hart, A. G., Bot, A. N. M. & Brown, M. J. F.** 2002. A colony-level response to disease control in a leaf-cutting ant. *Naturwissenschaften*, **89**, 275-277.
- Hart, A.G. & Ratnieks, F.L.W.** 2002. Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Behavioral Ecology*, **13**, 224-231.
- Hughes, W.O.H., Eilenberg, J. & Boomsma, J.J.** 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society of London*, **269**, 1811-1819
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J. & Boomsma J.J.** 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**, 46-53.
- Lacerda, F.G., Della Lucia, T.M.C., Lima, E.R., Campos, L.A. & Pereira, O.L.** 2006. Waste management by workers of *Atta sexdens rubropilosa*

- (Hymenoptera: Formicidae) in colonies supplied with different substrates. *Sociobiology*, **48**, 165-173.
- Little, A.E.F., Murakami, T., Mueller, U.G. & Currie, C.R.** 2005. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters*, **2**, 12-16.
- Ortiz, A. & Orduz, S.** 2000. In vitro evaluation in *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of fungus-growing ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia*, **150**, 53-60.
- Pereira, R.T.G, Pfenning, L.H. & Castro, H.A.** 2005. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, **29**, 1112-1116.
- Quinlan, R.J. & Cherrett, J.M.** 1977. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology*, **2**, 161-170.
- Quinlan, R.J. & Cherrett, J.M.** 1979. The role of the fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Ecological Entomology*, **4**, 151-160.
- R Development Core Team.** 2006. R: *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Schmid-Hempel, P.** 1998. Parasites in social insects. Princeton: Princeton University Press.
- Weber, N.** 1972. Gardening ants: the Attines. Philadelphia: American Philosophical Society.
- Wilson, E.O.** 1980. Caste and division of labor in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **7**, 143-156.

**Polietismo etário e mudança de funções em operárias do lixo em colônias de  
*Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)**

Fabírcia Gonçalves Lacerda<sup>†</sup>, Terezinha Maria Castro Della Lucia, Og Francisco  
Fonseca de Souza, Lucas Machado de Souza, Matheus Britto

Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas  
Gerais, Brasil

*Resumo*

O presente trabalho objetivou verificar a existência do polietismo etário em operárias de tamanho médio e pequeno em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, bem como quantificar as castas presentes no lixo das colônias, além de investigar se as operárias lixeiras são capazes de desempenhar outras tarefas em subcolônias desprovidas de operárias. Constatou-se que tarefas como o cuidado com o jardim são freqüentes no decorrer da vida das operárias, apesar de declinarem em termos de ocorrência por volta da nona semana para as operárias médias (largura da cápsula cefálica =  $2,3 \pm 0,21$  mm) e da décima semana para as operárias pequenas (largura da cápsula cefálica =  $1,4 \pm 0,10$  mm). As atividades de forrageamento também ocorrem durante todo o período de vida das operárias médias e pequenas, tornando-se mais freqüentes na décima primeira semana, ou seja, no final da vida dessas operárias. Já o trabalho no lixo pelas operárias ocorre durante toda a vida, sendo mais freqüente nas duas primeiras semanas de vida de operárias médias e pequenas. Portanto, o polietismo etário pode estar relacionado às atividades de cuidado no interior do jardim e ao forrageamento, porém ele não se aplica às tarefas relacionadas ao lixo da colônia. A casta predominante, em

---

<sup>†</sup> Correspondência para: lacerdafg@gmail.com

termos de número de operárias, no compartimento de lixo da colônia foi a das jardineiras (68%) seguida pelas generalistas (21%), forrageadoras (10%) e soldados (1%). Operárias do lixo foram capazes de cuidar do jardim de fungo; entretanto, a frequência de cuidados por parte delas é menor do que a das operárias que trabalham normalmente nesse compartimento. Operárias lixeiras exibiram cuidado da prole e comportamento de forrageamento semelhante ao das operárias não-lixadeiras. No entanto, em relação às atividades do lixo, a frequência de lixeiras trabalhando no compartimento de lixo foi maior do que a das não-lixadeiras. O fato de operárias lixeiras se engajarem nas diversas tarefas da colônia demonstra que elas são parte de uma casta generalista, não havendo uma divisão de trabalho entre essas formigas e as demais.

Palavras-chave: castas; formiga cortadeira; forrageamento; jardim de fungo; prole.

#### *Abstract*

This work aimed to verify the existence of the age polyethism in workers of medium and small size in colonies of *Atta sexdens rubropilosa* Forel, as well as to quantify the present castes in the garbage of the colonies. It also had the purpose of investigating if the waste workers are capable to carry out other tasks in subcolonies without workers. It was verified that tasks as the care with the fungus garden are frequent during the workers' lifespan, in spite of their decrease in occurrence around the ninth week in the media workers (head capsule width =  $2,3 + 0,21$  mm) and around the eighth week in the small workers (head capsule width =  $1,4 + 0,10$  mm). Foraging activities also occur during the whole life of the media and minor workers; they become more frequent in the eleventh week; in other words, at the end of those workers' life. The work in the garbage by waste workers lasts during their lifetime, being more frequent in the first two weeks of age of the media and of

minors. Therefore, the age polyethism can be related to the activities inside the garden and to the foraging, however it is not applied to the tasks related to the garbage of the colony. The predominant caste, in terms of number of workers, in the waste chamber of the colony was the gardeners (68%) followed by the generalists (21%), foragers (10%) and soldiers (1%). Waste workers were capable to taking care of the fungus garden; however, the frequency of their caring activities is smaller than that of the workers that usually work in this site. Waste workers exhibited brood care and foraging behavior similar to those of non-waste workers. However, with respect to the waste activities the frequency of waste workers working in the waste chamber was higher than that of the non-waste workers. The fact that waste workers engage in the several tasks of the colony demonstrates that they are part of a generalist caste, there is not a division of labor between these ants and the others.

Key-words: castes; leaf-cutting ant; foraging; fungus garden; brood.

### *Introdução*

A eusocialidade caracteriza-se pelo fato de que indivíduos de várias gerações vivem juntos e a prole recebe os cuidados de uma casta não-reprodutora de forma a se distinguir uma divisão de trabalho. As colônias de insetos sociais são estruturadas de tal forma a existir um sistema de divisão de trabalho baseado em castas morfológicas e no polietismo etário para *Atta sexdens* L. (Wilson 1971).

A organização de insetos sociais de forma apropriada pode reduzir a possibilidade de transmissão de patógenos, diminuindo, assim, o seu estabelecimento nas colônias. Por exemplo, se operárias podem infectar rainhas, o seu acesso a elas deve ser restrito, particularmente quando a colônia depende de uma só rainha. Nesse contexto, pode-se notar que em todas as espécies de insetos sociais que apresentam divisão de trabalho baseada na idade (polietismo etário),

são os indivíduos mais jovens que assistem a rainha enquanto os mais velhos forrageiam (Wilson 1971). O polietismo etário corresponde à mudança de tarefas de acordo com a idade do indivíduo e geralmente resulta em indivíduos mais jovens executando tarefas mais seguras no interior do ninho e operárias mais velhas, que por sua vez, executam tarefas mais arriscadas no exterior da colônia, já que esses indivíduos são “menos valiosos” para a colônia.

O polietismo etário pode estar relacionado a um mecanismo externo em que a distribuição de tarefas pode refletir as necessidades da colônia, de modo que os indivíduos mudam de tarefa quando há um excesso de força de trabalho na atividade que eles desempenhavam anteriormente (Franks e Tofts 1994). A decisão sobre uma dada tarefa é influenciada pelo encontro entre formigas companheiras de ninho, uma vez que os encontros identificam a tarefa que a operária está desempenhando através das pistas dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares. Dessa forma, encontros entre operárias fornecem informações usadas na distribuição de tarefas de modo a regular o comportamento da colônia (Greene e Gordon 2003).

Fatores fisiológicos também podem influenciar a ocorrência do polietismo etário como ocorre em abelhas. Nesses organismos, as respostas comportamentais estão relacionadas à concentração de hormônio juvenil que em baixas concentrações são associadas com comportamentos no interior da colônia durante as três primeiras semanas de vida do adulto. Já altas concentrações são obtidas na terceira semana de vida e são relacionadas com o forrageamento (Robinson 1992).

Em formigas, o polietismo etário pode ou não ser característico. Em *Pheidole hortensis* Forel, operárias mais velhas continuam a realizar tarefas características de operárias jovens (Calabi et al. 1983). Já estudos recentes sobre esse comportamento em *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel (Camargo et al. 2007) demonstram que o polietismo etário está presente em colônias dessa subespécie de modo que operárias jovens permanecem dentro do ninho e as mais

velhas realizam atividades no exterior da colônia. Em *Ectatomma opaciventre* Roger, também já foi constatado que as atividades externas à colônia, como defesa e forrageamento, são realizadas por operárias mais velhas, sendo que os cuidados com a prole são realizados pelas mais novas (Miguel e Del-Claro 2005).

Em colônias de formigas cortadeiras, várias são as tarefas desempenhadas pelas operárias, tais como o forrageamento, o cuidado com a prole e com o jardim de fungo e a guarda da colônia. Há ainda as tarefas relacionadas à higiene da colônia, que envolvem o transporte de fragmentos de lixo e cadáveres do jardim de fungo, além do rearranjo desse material de refugio nos montes de lixo, evitando que ele fique espalhado e propicie a propagação de doenças.

O lixo das colônias de formigas cortadeiras pode ser considerado uma fonte de contaminação para a colônia, já que alguns patógenos danosos ao jardim de fungo e às operárias já foram encontrados no material de refugio. Esse lixo é constituído basicamente de jardim de fungo já exaurido, cadáveres de operárias, larvas e pupas mortas e restos de folhas secas. Alguns fungos contaminantes de interesse para a colônia já foram encontrados no lixo, como por exemplo, o parasita de jardim de fungo, *Escovopsis* (Bot et al. 2001), o qual é capaz de levar a colônia à morte (Currie et al. 1999), *Trichoderma viride* Pers. ex Gray (Lacerda et al., 2006) que é antagonista do jardim de fungo (Ortiz e Orduz 2000), além dos entomopatógenos *Aspergillus flavus* Link ex Gray (Lacerda et al. 2006; Hughes et al. 2004) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hughes et al. 2004).

O presente trabalho teve como objetivo verificar questões comportamentais relacionadas ao lixo de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel que ainda não foram esclarecidas na literatura. A primeira delas foi a investigação sobre a ocorrência de polietismo etário em ninhos dessa subespécie a fim de verificar se as atividades no lixo estariam sendo exercidas no fim da vida das operárias. Procurou-se, ainda, quantificar as castas de operárias presentes no compartimento de lixo das colônias e avaliar a possibilidade de reversão de tarefas de operárias do lixo

em outras tarefas da colônia, ou seja, se operárias lixeiras executam tarefas como cuidado com o jardim, com a prole e o forrageamento quando não há operárias na colônia para realizar esse trabalho.

### *Material e Métodos*

#### Polietismo etário

A metodologia utilizada para a observação da ocorrência de polietismo etário nas colônias segue o exemplo de Camargo et al. (2007), com modificações. Foram utilizadas quatro colônias de *A. sexdens rubropilosa*, pertencentes ao Insetário da Universidade Federal de Viçosa, acondicionadas a  $25 \pm 2$  °C e  $75 \pm 3$  % de umidade relativa e 12 horas de fotofase. A população de cada colônia foi estimada em 16.040, 17.620, 20.020 e 14.020 indivíduos, sendo elas denominadas colônias 1, 2, 3 e 4, respectivamente. De cada colônia retirou-se o maior número possível de pupas médias (largura da cápsula cefálica =  $2,3 \pm 0,21$  mm) e pequenas (largura da cápsula cefálica =  $1,4 \pm 0,10$  mm) de acordo com a quantidade de prole disponível. Dessa forma, da colônia 1 foram retiradas 308 pupas médias e 250 pequenas; da colônia 2, 352 pupas médias e 200 pupas pequenas; da colônia 3, 401 pupas médias e 200 pupas pequenas; da colônia 4, 138 pupas médias e 80 pupas pequenas.

Essas pupas foram colocadas no interior de mini-formigueiros que consistiram de recipientes plásticos de 200 mL contendo na sua base um centímetro de gesso para a manutenção da umidade no seu interior. Cada pote possuía um orifício que permitia o forrageamento pelas operárias e a saída de refugio, além de uma tampa perfurada em cima da qual era colocado um chumaço de algodão umedecido com água destilada. No interior desse pote era colocada uma esponja de jardim de fungo da respectiva colônia, sendo o volume desse

jardim de 100 mL. Todo esse conjunto foi inserido em um pote de 4 L em cujas bordas foi passada uma camada de fluon para impedir o escape das operárias. No interior desses potes maiores, eram colocadas as folhas de *Acalypha wilkesiana* Müll. Arg. e de *Ligustrum japonicum* Thunb que seriam substrato para o crescimento do fungo simbiote. Assim, nos mini-formigueiros das colônias 1 a 4 foram colocadas 70 operárias forrageadoras e 200 operárias jardineiras em cada um para que a prole pudesse ser cuidada por elas.

Após a emergência dos adultos nos mini-formigueiros, eles foram devidamente marcados e colocados de volta em sua colônia de origem. Como os adultos não emergiram todos simultaneamente, procurou-se marcá-los com cores diferentes de acordo com a data de emergência para facilitar a identificação da idade das formigas.

Vinte e quatro horas após o retorno dos adultos recém-emergidos para as colônias de origem procedeu-se à observação dessas operárias para verificar as atividades desempenhadas pelas mesmas. Para facilitar a observação das operárias marcadas nas colônias, o jardim de fungo foi colocado em potes retangulares de 192 cm<sup>2</sup> de área, com altura de 4 cm. Na base de cada pote foi colocada também uma camada de gesso de 1 cm. Para cada colônia, foram utilizados tantos potes quanto necessários, de acordo com o volume e posterior crescimento do jardim de fungo. O volume de jardim de fungo das colônias foi aproximadamente 1,5 L para as colônias 1 e 4; 2,0 L para as colônias 2 e 3.

A observação do comportamento das operárias foi realizada diariamente por meia hora em cada colônia e ocorreu até que cada colônia não apresentasse mais nenhuma operária marcada, ou seja, quando todas já estivessem mortas ou as marcas já tivessem desaparecido. Os comportamentos observados foram: cuidado como o jardim de fungo, com a prole e com a rainha, trabalho no lixo e forrageamento. Os três primeiros comportamentos foram agrupados em “cuidados

no interior do jardim”, já que cuidado com a prole e com a rainha foram visualizados poucas vezes.

O número de vezes que cada comportamento ocorreu, no decorrer dos dias, foi agrupado em semanas para cada colônia, sendo que esse valor foi, posteriormente, transformado em porcentagem. Como as operárias emergiram em épocas diferenciadas, totalizando três idades diferentes para as formigas de cada tamanho, foi efetuada uma média das três idades em relação à ocorrência de determinado comportamento para cada semana em cada colônia. Para uma melhor visualização dos resultados, foi calculada, ainda, uma média das quatro colônias em relação à ocorrência de cada comportamento a cada semana. A análise dos dados foi realizada, utilizando-se estatística descritiva.

#### Quantificação de castas de operárias no lixo

Quatro colônias de *A. sexdens rubropilosa* acondicionadas da mesma forma que as anteriores foram utilizadas neste estudo. As colônias possuíam 7, 8, 8 e 9 L de volume de fungo. Vinte e quatro horas antes do início do experimento, o lixo de cada colônia foi retirado, pesado e devolvido para a colônia, sendo que a quantificação das castas foi realizada baseando-se numa amostragem de 20% da massa do lixo de cada colônia.

Dessas amostras, foram retiradas todas as operárias vivas presentes no lixo, procedendo-se então à medição da cápsula cefálica, que foi realizada com auxílio de ocular micrométrica acoplada a estereomicroscópio. As operárias foram organizadas em castas de acordo com a largura da cápsula cefálica conforme Wilson (1980) em que jardineiras estão incluídas na faixa de 0,6 a 1,2 mm; generalistas: 1,3 a 1,6 mm; forrageadoras e escavadoras: 1,7 a 2,4 mm; soldados: acima de 3,0 mm.

## Reversão de tarefas

Neste experimento, procurou-se verificar se as operárias lixeiras eram capazes de executar outras atividades da colônia, além das tarefas relacionadas ao lixo. Foram utilizadas três colônias de *A. sexdens rubropilosa* de laboratório, acondicionadas como no trabalho anterior. As colônias possuíam cerca de 9,0 9 e 10 L de jardim de fungo. De cada uma, foram retiradas porções de jardim para confeccionar as subcolônias (mini-formigueiros sem rainha). Cada subcolônia era composta de aproximadamente 50 mL de jardim de fungo do qual foram retiradas todas as operárias, de modo que ele ficasse completamente destituído de formigas. Esse jardim foi colocado em um recipiente de plástico com volume de aproximadamente 135 mL, o qual possuía um orifício para que as operárias pudessem sair da câmara do jardim e realizar o forrageamento ou transportar o lixo para o exterior. Cada recipiente continha uma camada de gesso de um centímetro na sua base e possuía uma tampa perfurada sobre a qual havia um chumaço de algodão umedecido. Todo esse conjunto foi colocado no interior de uma bandeja plástica de 35 x 29 x 8 cm. Uma fina camada de fluon foi passada nas bordas dessa bandeja para evitar o escape das operárias. No seu interior eram colocados as folhas de *A. wilkesiana* e *L. japonicum* e, ainda, o lixo, que foi inserido no interior de um recipiente plástico de 100 mL. Todas as subcolônias foram acondicionadas da mesma forma que a colônia de origem.

Foram confeccionadas seis subcolônias de cada colônia, sendo três constituídas apenas por operárias lixeiras e três constituídas por operárias não-lixadeiras. Em cada subcolônia de operárias lixeiras, foram colocadas 50 operárias médias, 100 operárias pequenas e 150 jardineiras, sendo todas provenientes do lixo da colônia original. Para as subcolônias de operárias não-lixadeiras, foram retiradas também 50 operárias forrageadoras, 100 operárias pequenas do jardim e 150 jardineiras também do jardim da colônia de origem. Nenhuma subcolônia

recebeu operárias mínimas e cada uma delas recebeu 40 pupas oriundas da colônia original. O número de operárias pequenas e jardineiras colocado em cada subcolônia foi proporcional àquele encontrado em amostras de 100 mL de jardim das colônias originais. O número de forrageadoras também foi proporcional ao existente na arena de forrageamento. Já o número de pupas foi colocado em quantidade superior àquela normalmente encontrada nas colônias, tendo em vista a fragilidade desse estágio, uma vez que o próprio manuseio delas durante o preparo do experimento poderia provocar a sua morte. Portanto, era necessário garantir que pelo menos parte delas estivesse viva e esse fato foi confirmado, pois em todas as subcolônias, após certo tempo, foi constatada a emergência de indivíduos adultos.

Uma vez por dia, eram realizadas as observações de 10 minutos em cada subcolônia para avaliar os comportamentos de cuidado com o jardim, com a prole, forrageamento e trabalho no lixo. O cuidado com o jardim foi caracterizado por qualquer um dos seguintes comportamentos visualizados: inspeção, lambertura, incorporação de substrato ou implantação de hifas no jardim. O cuidado com as pupas foi caracterizado pela inspeção dessas, o transporte e o "grooming". As observações foram realizadas até que cada subcolônia morresse, ou seja, quando todo o jardim de fungo fosse extinto.

Para cada tipo de comportamento, em cada subcolônia, calculou-se a proporção entre o número de vezes que as operárias foram vistas realizando uma dada atividade em relação ao total de observações. Assim, se numa determinada subcolônia, as operárias de tamanho pequeno cuidaram do jardim em 5 dias quaisquer em um total de 25 dias de observações, a proporção foi de  $5/25 = 0,20$ . Para os comportamentos de cuidado da prole e trabalho no lixo seguiu-se o mesmo raciocínio, bem como para o forrageamento. Nesse último caso, retirou-se a variável tamanho da operária, uma vez que o forrageamento foi caracterizado pela presença ou ausência de substrato vegetal recém-cortado sobre o jardim de fungo.

Foi realizada uma análise de sobrevivência com distribuição de Weibull (Crawley 2002) das subcolônias de operárias lixeiras e não-lixeriras, utilizando-se o pacote “survival” do programa R (R Development Core Team, 2006) cuja equação geral foi:  $S(t) = \exp(-(\mu^{-\alpha} t^\alpha))$  onde  $S(t)$  = Proporção de subcolônias vivas em função do tempo;  $\mu$  = tempo médio para a morte, ou seja, o tempo necessário para que 50 % das subcolônias morressem;  $\alpha$  = formato da curva, podendo haver as três situações:  $\alpha = 1$ , indicando uma mortalidade constante, ou seja, a cada unidade de tempo, morre a mesma quantidade de indivíduos;  $\alpha > 1$ , indicando uma taxa de mortalidade que acelera com o tempo, ou seja, cada unidade de tempo, morrem mais indivíduos que no tempo anterior;  $\alpha < 1$ , indicando uma desaceleração na taxa de mortalidade, ou seja, a cada unidade de tempo, morrem menos indivíduos que no tempo anterior.

Para todos os tipos de comportamento foi realizada uma análise de variância aninhada com fatores fixos representados pela variável tratamento (lixeriras e não-lixeriras) e fatores randômicos representados pela variável casta de operárias (jardineira, pequena e média) aninhadas dentro de colônia e subcolônia. Os dados também foram analisados, utilizando-se o programa R (R Development Core Team, 2006).

## *Resultados*

### Polietismo etário

O comportamento de cuidados no interior do jardim de fungo por operárias médias ocorreu durante todas as 13 semanas em que o experimento foi realizado. Entretanto, houve uma estabilidade na sua ocorrência até a oitava semana e, a partir de então, houve uma queda na proporção de ocorrência registrada desse

comportamento até o final das observações (Figura 1). A proporção desse mesmo comportamento, realizado por operárias pequenas variou até a quinta semana e depois decresceu até a última semana de avaliação. A proporção média de cuidados no interior do jardim a cada semana por operárias pequenas e médias foi muito próxima no decorrer do trabalho de modo que essa tarefa foi exercida de forma semelhante por operárias de ambos os tamanhos.

O forrageamento por operárias médias no início do experimento aumentou gradativamente, com poucas variações, e apresentou o seu máximo na décima primeira semana, a partir da qual declinou até o final (Figura 2). Padrão semelhante foi obtido para as operárias pequenas em relação a esse mesmo comportamento, entretanto, o forrageamento por essas operárias foi menor do que para as de tamanho médio exceto na primeira quinzena e na última semana do experimento.

Já a ocorrência de trabalho no lixo pelas operárias médias foi mais freqüente nas quatro primeiras semanas (Figura 3). Nas operárias pequenas, esse comportamento foi mais freqüente na segunda semana e variou durante o restante do tempo em que foi realizado o experimento. Em geral, as atividades do lixo foram executadas mais freqüentemente por operárias de tamanho pequeno.

#### Quantificação de castas no lixo

Constatou-se que a casta predominante no compartimento de lixo da colônia foi a das jardineiras (68%) seguida pelas generalistas (21%), forrageadoras (10%) e soldados (1%). Esses valores correspondem à média das quatro colônias.

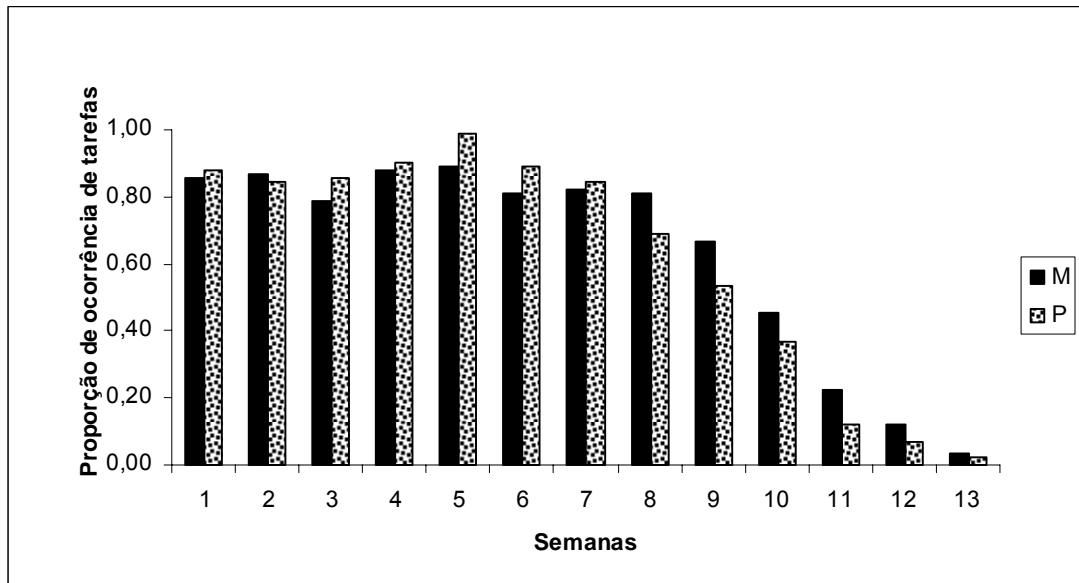


Figura 1. Proporção média de ocorrência de tarefas no interior do jardim de fungo (cuidado com o jardim, com a prole e rainha), em cada semana, executadas por operárias de tamanho médio (M) e pequeno (P) das quatro colônias observadas.

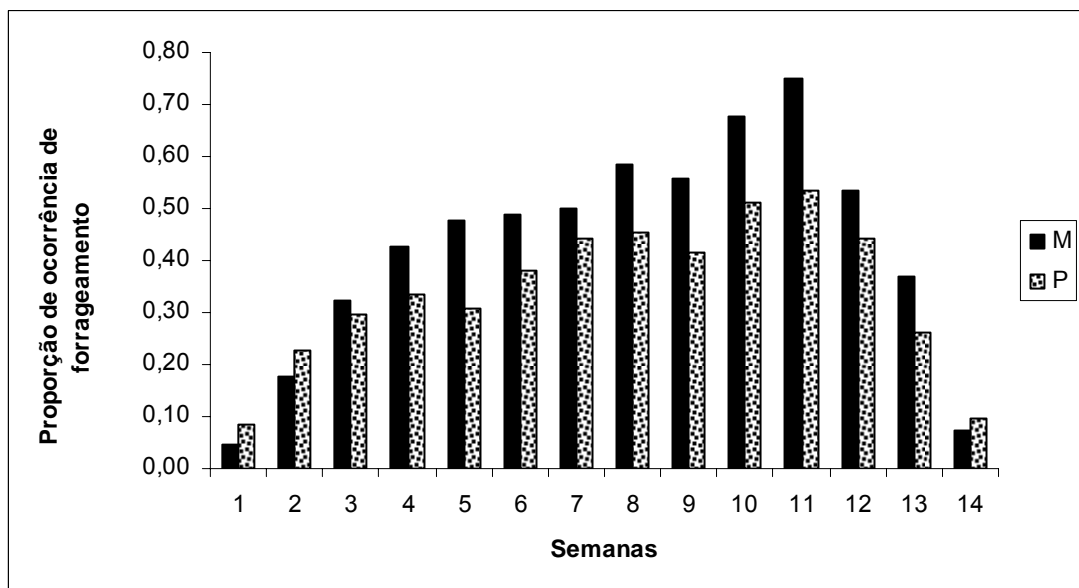


Figura 2. Proporção média de ocorrência de forrageamento, em cada semana, executado por operárias de tamanho médio (M) e pequeno (P) das quatro colônias observadas.

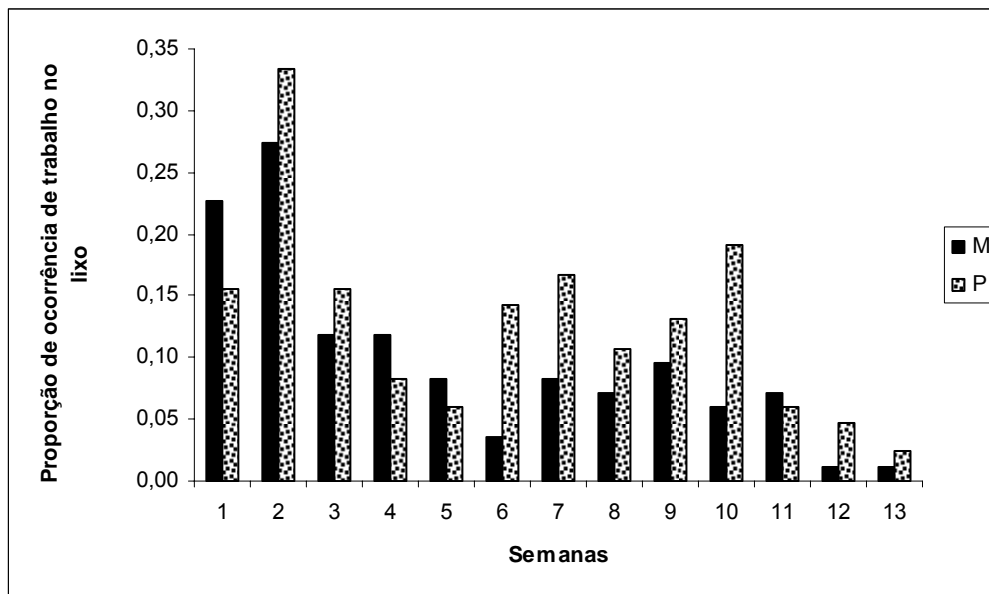


Figura 3. Proporção média de ocorrência de trabalho no lixo, em cada semana, executado por operárias de tamanho médio (M) e pequeno (P) das quatro colônias observadas.

#### Reversão de tarefas

A análise de sobrevivência das subcolônias em que foram mantidas as operárias do jardim e forrageadoras (não-lixadeiras) bem como das subcolônias que tiveram as operárias do jardim e forrageadoras substituídas pelas operárias do lixo (lixadeiras) revelou que essas últimas tiveram mortalidade mais acelerada (Figura 4). O tempo médio para a morte das subcolônias das operárias não-lixadeiras foi de 22,66 dias enquanto que para as subcolônias das lixeiras foi de 13,92 dias.

Constatou-se que a reversão de tarefas, ou seja, o fato de operárias do lixo cuidarem do jardim de fungo revela certa ineficiência das lixeiras, uma vez que a frequência de cuidados por parte delas é menor ( $F = 4,8739$ ,  $P = 0,04445$ ) do que a das operárias que trabalham normalmente nesse compartimento (Figura 5).

Operárias lixeiras foram capazes de cuidar da prole de forma semelhante às não-lixadeiras ( $F = 3,5218$ ,  $P = 0,08157$ ) (Figura 6). A atividade de forrageamento também foi efetuada de forma semelhante por operárias lixeiras e não-lixadeiras ( $F =$

0,0298,  $P = 0,8672$ ) (Figura 7). Já a frequência de operárias observadas trabalhando no lixo foi maior em subcolônias onde as operárias foram substituídas pelas lixeiras ( $F = 11,707$ ,  $P = 0,004132$ ), ou seja, o trabalho no lixo foi mais bem representado pelas próprias lixeiras quando comparado com as operárias do jardim de fungo e forrageadoras (Figura 8).

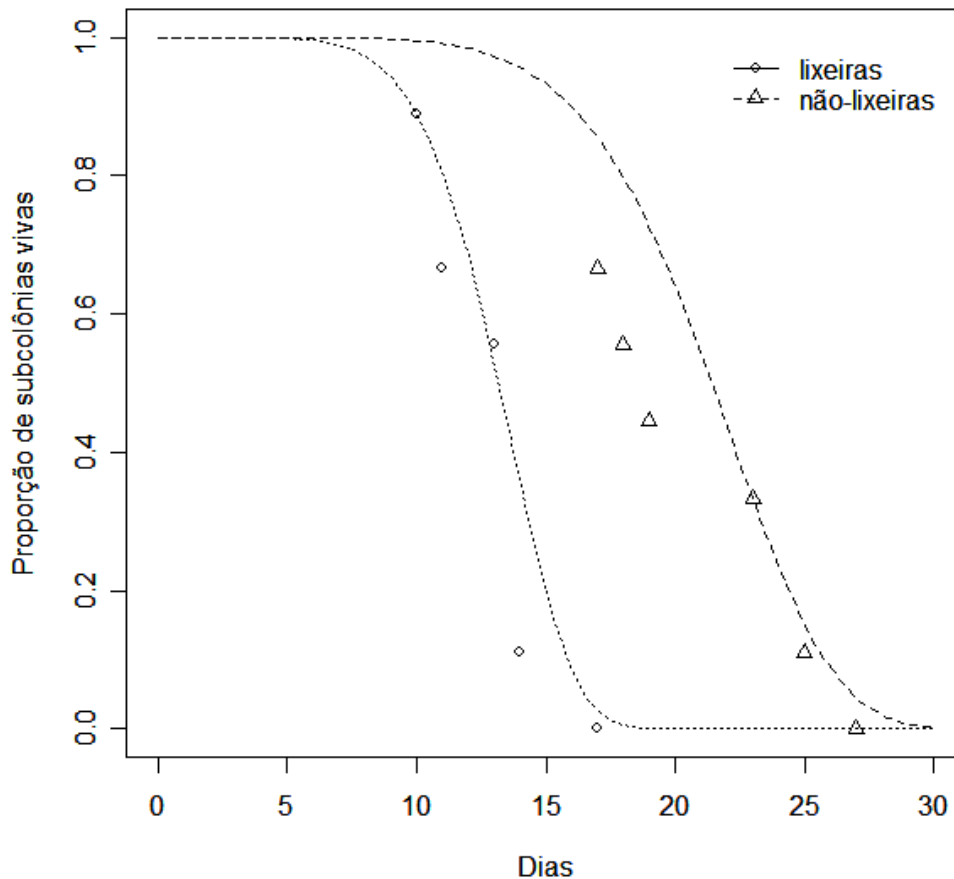


Figura 4. Curvas de sobrevivência das subcolônias mantidas por operárias lixeiras e não-lixeiiras representadas pela equação geral:  $S(t) = \exp(-((\mu^{-at})^\alpha))$ , onde  $S(t)$  = proporção de subcolônias vivas em função do tempo;  $\mu$  = tempo médio para a morte, ou seja, o tempo necessário para que 50 % das subcolônias morressem;  $\alpha$  = forma da curva. Nesse caso,  $\alpha > 1$ , ou seja, a taxa de mortalidade acelera com o tempo. O tempo médio para a morte ( $\mu$ ) das subcolônias mantidas pelas operárias lixeiras e não-lixeiiras foi de 13,92 e 22,66 dias, respectivamente. As equações das curvas das subcolônias de operárias lixeiras e não-lixeiiras foram:

$S(t) = \exp(-((13,92^{(-6,45t)^{6,45}}))$  e  $S(t) = \exp(-((22,66^{(-6,45t)^{6,45}}))$ ,  
respectivamente.

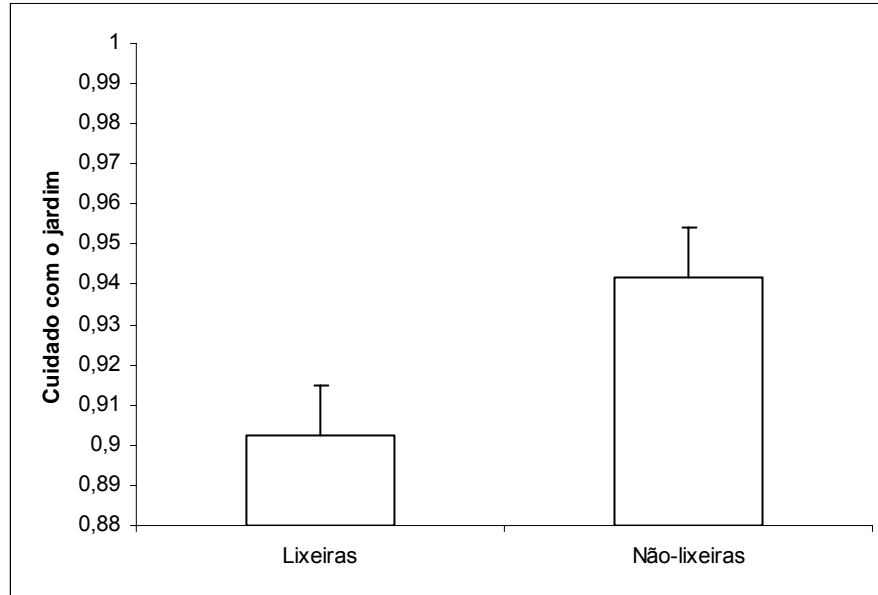


Figura 5. Cuidado dispensado ao jardim de fungo por operárias lixeiras e não-lixadeiras (operárias do jardim e forrageadoras). Operárias lixeiras cuidam menos do jardim que operárias não-lixadeiras ( $F = 4,8739$ ,  $P = 0,04445$ ).

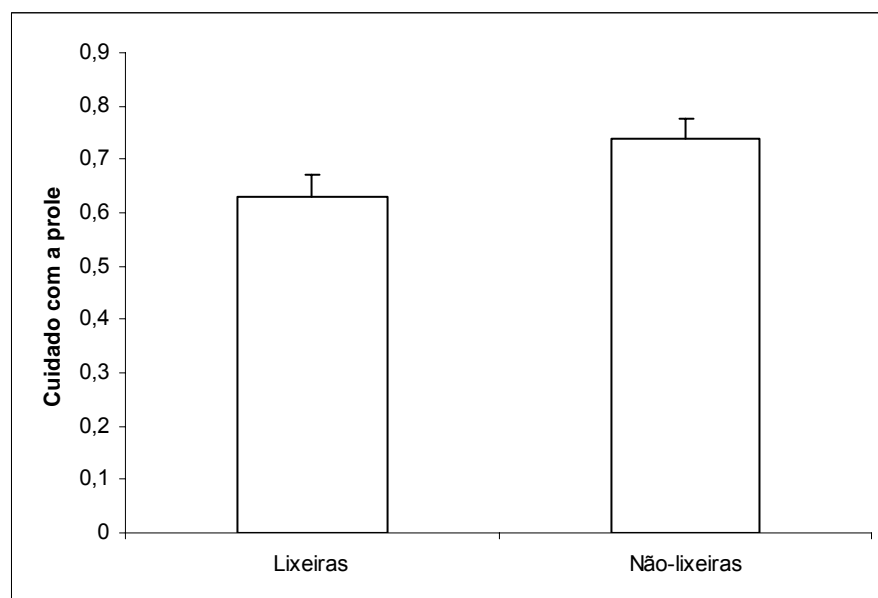


Figura 6. Cuidados dispensados à prole por operárias lixeiras e não-lixadeiras (operárias do jardim e forrageadoras). Operárias lixeiras são capazes de exercer essa função de forma semelhante às não-lixadeiras ( $F = 3,5218$ ,  $P = 0,08157$ ).

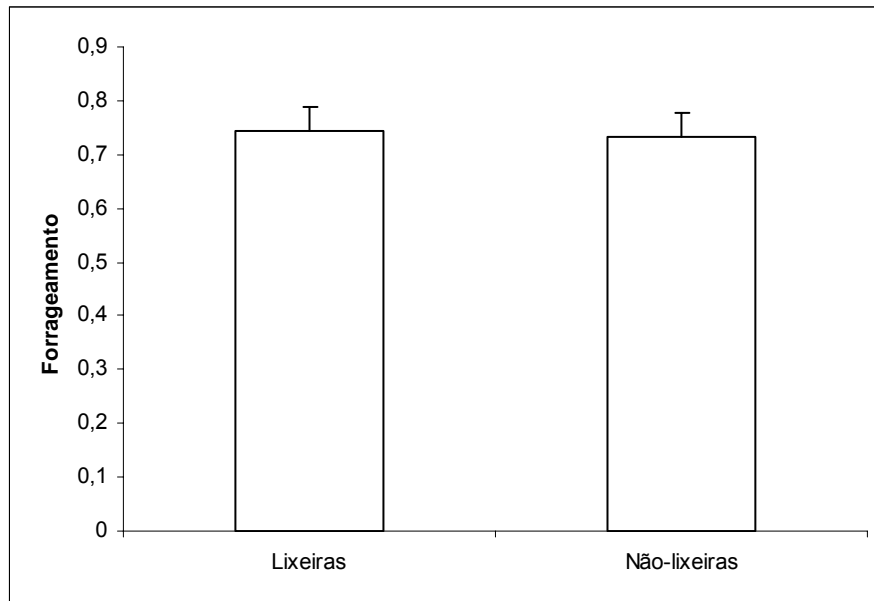


Figura 7. Atividade de forrageamento exercida por operárias lixeiras e não-lixieiras (operárias do jardim e forrageadoras). O forrageamento foi realizado de forma semelhante por operárias lixeiras e não-lixieiras ( $F = 0,0298$ ,  $P = 0,8672$ )

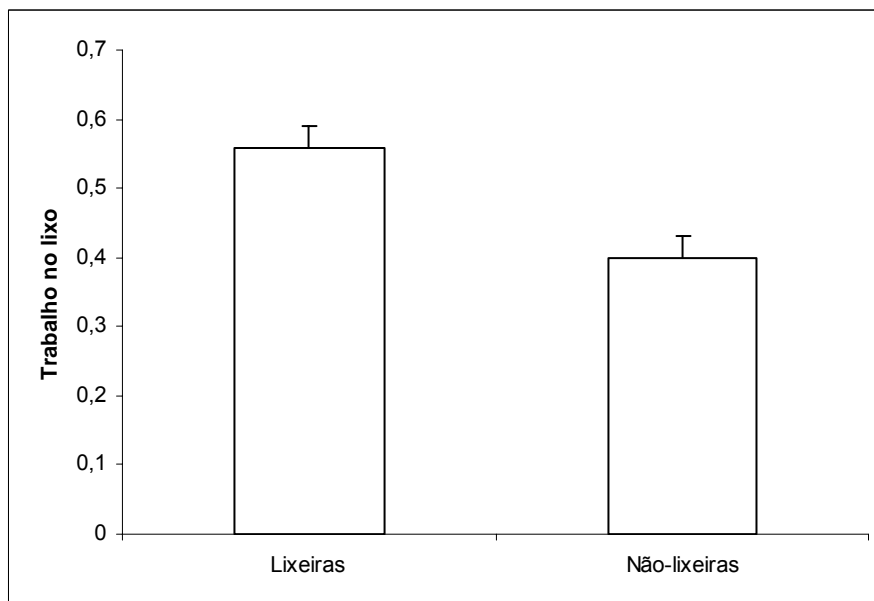


Figura 8. Trabalho no compartimento de lixo por operárias lixeiras e não-lixieiras (operárias do jardim e forrageadoras). A freqüência de operárias lixeiras trabalhando no lixo foi maior que a freqüência de não-lixieiras ( $F = 11,707$ ,  $P = 0,004132$ )

## Discussão

Em *A. sexdens rubropilosa*, pôde-se constatar que tanto os trabalhos internos à colônia como os externos são executados pelas operárias, em maior ou menor grau, durante toda a sua vida. Os trabalhos no interior da colônia como cuidado com o jardim de fungo, com a prole e com a rainha, são freqüentes no decorrer da vida das operárias, apesar de reduzirem sua ocorrência por volta da nona semana para as operárias médias e na décima semana para as operárias pequenas. Aparentemente, pode estar havendo uma especialização nessas tarefas por parte daquelas operárias que permaneceram cuidando do jardim até o fim de suas vidas. Como a rainha acasala múltiplas vezes, há certa diversidade genética entre as operárias. Assim, algumas delas podem se especializar em uma dada tarefa, sendo tal especialização comportamental influenciada geneticamente de modo que esses indivíduos podem permanecer até a morte em uma só função na colônia (Julian e Fewell 2004).

As atividades de forrageamento também ocorrem durante todo o período de vida das operárias médias e pequenas, tornando-se mais freqüentes na décima primeira semana, ou seja, já no fim da vida delas. O forrageamento também pode estar sujeito à especialização das operárias nessa tarefa, visto que ele ocorre, mesmo que em baixa freqüência, entre indivíduos mais jovens. De modo geral, o polietismo etário possui influência genética, uma vez que operárias de diferentes linhagens maternas variam no padrão de tarefas realizadas em relação aos cuidados do jardim de fungo e forrageamento (Julian e Fewell 2004). Assim sendo, certas operárias variam na sua preferência por tarefas internas ou externas à colônia e na taxa de mudança de uma tarefa para outra.

A freqüência do comportamento de cuidado do jardim foi muito próxima entre operárias médias e pequenas, sendo que somente nas três últimas semanas do experimento, a porcentagem de ocorrência de operárias médias exercendo essa

tarefa foi o dobro da ocorrência entre operárias pequenas. É provável que essas operárias de tamanho médio sejam parte de uma casta especialista em cuidados no interior do jardim, já que o esperado seria que esse comportamento ocorresse mais em operárias de tamanho pequeno. O forrageamento, na maior parte das semanas, foi principalmente executado pelas as operárias médias. De fato, esse tamanho é compatível com as atividades de corte e transporte do material vegetal carregado.

Da mesma forma, os trabalhos no compartimento de lixo foram executados durante toda a vida das operárias, sendo mais freqüente entre as de tamanho pequeno na maior parte das semanas em que o experimento transcorreu. Vale ressaltar que a ocorrência de trabalho no lixo foi maior nas duas primeiras semanas. Entretanto, o trabalho em tarefas arriscadas por operárias jovens não constitui algo vantajoso para a colônia. É possível que essas operárias estivessem já debilitadas por algum motivo e, apesar de jovens, estarem prestes a morrer, não representando dessa forma, maiores prejuízos à colônia ao executarem tarefas insalubres. Assim sendo, o polietismo etário, no presente trabalho, parece ser caracterizado por operárias trabalhando inicialmente no jardim e posteriormente em atividades de forrageamento, mas ele não se aplica às tarefas relacionadas ao lixo da colônia.

O trabalho no lixo em colônias de *Atta sexdens* é executado por operárias generalistas, conforme Wilson (1980) as quais não permanecem no compartimento de lixo da colônia (ver primeiro artigo) e, ainda, essas operárias podem trabalhar no lixo independentemente da idade, como constatado no presente estudo. Portanto, as tarefas referentes ao lixo da colônia não constituiriam uma tarefa especializada (ou especialização) de alguns indivíduos como o comportamento de descarte dos mortos em *Acromyrmex versicolor* Pergande (Julian e Cahan 1999); tal atividade também faz parte do repertório comportamental das operárias lixeiras.

Em se tratando das castas de operárias encontradas no lixo, constatou-se que as jardineiras (mínimas) são as mais freqüentes assim como no jardim de

fungo. Neste último compartimento, essa casta é responsável pelo cuidado com as hifas, tratamento final na implantação do substrato e também cuidado com a prole. No lixo, a função dessas jardineiras seria, possivelmente, o rearranjo de pequenos fragmentos. Entretanto, é possível que haja outras funções ainda desconhecidas dessas operárias mínimas no lixo. Já as operárias de tamanho médio são a segunda casta mais freqüente no lixo. A função dessas operárias é o rearranjo dos fragmentos de lixo, uma vez que não é interessante para a colônia que esse lixo fique espalhado o que pode facilitar a propagação de doenças. Operárias médias também podem estar envolvidas no transporte de lixo para o exterior do jardim de fungo (Lacerda et al. 2006). Já os soldados constituem a casta menos abundante na colônia e também no lixo, obviamente porque produzir operárias de grande tamanho envolve altos custos para a colônia. A baixa ocorrência dessa casta no lixo pode ser devido ao fato de que nesse local não haja grande necessidade da sua presença, uma vez que é pouco provável a entrada de organismos intrusos nesse compartimento.

Em colônias contaminadas por *Escovopsis*, uma estratégia contra a disseminação desse patógeno é o aumento do número de operárias do lixo (Hart et al. 2002) as quais, quando presentes em grandes quantidades, são mais eficientes na dispersão do lixo recém-depositado quando este é colocado longe do depósito. Seriam pertinentes outros estudos para verificar, em uma situação de contaminação na colônia por patógeno, qual casta teria o maior número de indivíduos engajados em tarefas relacionadas ao lixo.

Operárias do lixo realizaram tarefas de cuidado com o jardim de fungo quando foram retirados todos os indivíduos desse compartimento. Entretanto, os resultados demonstraram que o cuidado exercido por elas é menos eficiente do que aquele efetuado pelas próprias operárias do jardim. Isso também foi verificado na análise de sobrevivência das subcolônias, em que os mini-formigueiros mantidos pelas lixeiras foram os que tiveram mortalidade mais acelerada. Como a

mortalidade de cada subcolônia era determinada quando não havia mais nenhum resquício de jardim de fungo, pode-se concluir que o cuidado deste pelas lixeiras não foi mesmo tão eficaz. A troca de tarefas entre operárias também é característica de outras espécies como, por exemplo, *Pogonomyrmex barbatus* Smith (Gordon 1989). Esses estudos mostram que os indivíduos podem trocar suas tarefas por outras em resposta a uma perturbação da colônia. Operárias que cuidam da manutenção do ninho podem assumir as funções de patrulhadoras e forrageadoras. Operárias do lixo podem tornar-se forrageadoras também. Entretanto, algumas operárias se mantêm fiéis à sua tarefa original como é o caso das forrageadoras.

Operárias lixeiras de *A. sexdens rubropilosa* exibiram cuidado com a prole semelhante ao das operárias não-lixadeiras. Isso demonstra que operárias do lixo estão aptas a executar outras tarefas no interior da colônia. Pode-se dizer, ainda, que esse cuidado com a prole foi, aparentemente, eficiente, uma vez que tanto nas subcolônias com operárias lixeiras quanto nas subcolônias de operárias não-lixadeiras houve a emergência de adultos. Sabe-se que o cuidado com os indivíduos imaturos é algo conspícuo em uma colônia e, no caso de uma perturbação desta, um comportamento muito comum é o de transporte de larvas e pupas pelos adultos para outros locais, possivelmente mais seguros, como forma de proteção aos imaturos (Hölldobler e Wilson 1990). Portanto, é visível a “importância” que as operárias dão à prole, pois são esses indivíduos que darão continuidade ao funcionamento da colônia. Assim sendo, é interessante que todas as operárias da colônia estejam habilitadas a exercer esse cuidado, independente de ser uma lixeira ou uma operária de outra casta qualquer.

Operárias lixeiras e não-lixadeiras também se engajam de forma semelhante em atividades de forrageamento. Isso demonstra que operárias do lixo de *A. sexdens rubropilosa* são parte de uma casta generalista na colônia como constatado por Wilson (1980), uma vez que são capazes de exercer tarefas no

interior do ninho como o cuidado com a prole, além de tarefas externas à colônia como as atividades de forrageamento e ainda o trabalho no lixo propriamente dito. Esses resultados, no entanto, contrariam aqueles obtidos por Hart & Ratnieks (2002) em estudos com *Atta colombica* Santschi. Em colônias dessa espécie, operárias do lixo não se engajam em atividades de forrageamento e nem as forrageadoras exercem as funções das lixeiras, podendo haver, entretanto, troca de tarefas entre transportadoras de lixo e lixeiras, sendo que o inverso não ocorre. Isso demonstra as peculiaridades do comportamento de cada espécie e a sua habilidade em responder a uma perturbação, de forma que algumas espécies estão, aparentemente, mais adaptadas que outras no que diz respeito à recuperar a estabilidade da colônia.

A frequência de lixeiras trabalhando no compartimento de lixo foi maior do que a das não-lixadeiras. Esse resultado era esperado, pois as lixeiras já trabalhavam nesse local e, portanto, é possível que já tivessem aprendido as tarefas relacionadas ao manuseio do lixo.

A mudança de atividades das operárias em uma colônia pode ter implicações na morfologia cerebral de formigas. Em *Camponotus floridanus* Buckley, o volume total do cérebro na fase adulta aumenta cerca de 15 a 20 %, sendo que os lobos antenais e a “corpora pedunculata” quase dobram de volume (Gronenberg et al. 1996). O aumento do volume da “corpora pedunculata” está relacionado às atividades associadas ao cuidado com a prole e principalmente ao forrageamento. Estudos sobre morfologia cerebral em operárias de *A. sexdens rubropilosa* seriam interessantes a fim de avaliar o desenvolvimento dessas estruturas em forrageadoras, comparando-o com operárias lixeiras e operárias que trabalham no jardim.

Os fatores que levam uma operária a trabalhar no lixo de colônias de *A. sexdens rubropilosa* ainda permanecem obscuros já que a idade mais avançada dos indivíduos não determina o trabalho nesse compartimento. Aparentemente, as

atividades relacionadas ao lixo são apenas mais uma tarefa externa à colônia, não exigindo uma especialização por parte dos indivíduos os quais podem desempenhar outras atividades no interior do ninho. A especialização em determinada tarefa é interessante, pois os indivíduos têm sua eficiência aumentada, por exemplo, em termos da diminuição do tempo de execução de um trabalho (Julian e Cahan 1999). Entretanto, a existência de operárias generalistas, como as lixeiras, parece ser também vantajosa; em se tratando de uma adversidade qualquer, as operárias, na tentativa de recuperar a estabilidade da colônia, podem se engajar em diversas tarefas.

### *Referências*

- Autuori, M., 1947. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. IV) O saúveiro depois da primeira revoada (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). Arq. Inst. Biol., 18: 39--70.
- Bot, A.N.M., Currie, C.R., Hart, A.G. e Boomsma, J.J., 2001. Waste management in leaf-cutting ants. Ethol. Ecol. & Evol., 13: 225--237.
- Calabi, P., Traniello, J.F.A. e Werner, M.H., 1983. Age polyethism: its occurrence in the ant *Pheidole hortensis*, and some general considerations. Psyche, 90: 395--412.
- Camargo, R.S., Forti, L.C., Lopes, J.F.S., Andrade, A.P.P. e Ottati, L.T., 2007. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hymenoptera: Formicidae). J. Appl. Entomol., 13: 139--145.
- Crowley, M.J. 2002. Statistical computing. An introduction to data analysis using S-Plus. Baffins Lane, John Wiley & Sons, Chichester, 866 p.
- Currie, C.R., Mueller, U.G. e Malloch, D., 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. Proc. Natl. Acad. Sci USA., 96: 7998--8002.

- Franks, N.R. e Tofts, C., 1994. Foraging for work: how tasks allocate workers. *Anim. Behav.*, 48: 470--472.
- Greene, M.J. e Gordon, D.M., 2003. Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature*, 423: 32.
- Gordon, D.M. 1989. Dynamics of tasks switching in harvester ants. *Anim. Behav.*, 38: 194--204.
- Gronenberg, W., Heeren, S. e Hölldobler, B., 1996. Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus Floridanus*. *J. Exp. Biol.*, 199: 2011--2019.
- Julian, G.E. e Cahan, S., 1999. Undertaking specialization in the desert leaf-cutting ant *Acromyrmex versicolor*. *Anim. Behav.*, 58: 437--442.
- Julian G.E. e Fewell, J.H., 2004. Genetic variation and task specialization in the desert leaf-cutter ant, *Acromyrmex versicolor*. *Anim. Behav.*, 68: 1--8.
- Hart, A.G. e Ratnieks, F.L.W., 2002. Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Behav. Ecol.*, 13: 224--231.
- Hart, A. G., Bot, A. N. M. e Brown, M. J. F., 2002. A colony-level response to disease control in a leaf-cutting ant. *Naturwissenschaften*, 89, 275--277.
- Hölldobler, B. e Wilson, E.O. 1990. The ants. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 732 p.
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J. e Boomsma J.J., 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 85: 46--53.
- Lacerda, F.G., Della Lucia, T.M.C., Lima, E.R., Campos, L.A. e Pereira, O.L., 2006. Waste management by workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in colonies supplied with different substrates. *Sociobiology*, 48: 165-173.

- Miguel, T.B. e Del-Claro, K., 2005. Politeísmo etário e repertório comportamental de *Ectatomma opaciventre* Roger, 1861 (Formicidae, Ponerinae). Rev. Bras. Zool., 7: 297--310.
- Ortiz, A. e Orduz, S., 2000. In vitro evaluation in *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of fungus-growing ant *Atta cephalotes*. Mycopathologia, 150: 53--60.
- R Development Core Team. 2006. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Robinson, G.E., 1992. Regulation of division of labor in insect societies. Annu. Rev. Entomol., 37, 637--665.
- Weber, N., 1972. Gardening ants: the Attines. American Philosophical Society, Philadelphia.
- Wilson, E.O. 1971. The insect societies. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets, 548 p.
- Wilson, E.O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. Behav. Ecol. and Sociobiol., 7: 143-156.

**Morfometria da glândula metapleural de diferentes castas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)**

Fabírcia G. Lacerda<sup>1\*</sup>, Terezinha M.C. Della Lucia<sup>1</sup>, José E. Serrão<sup>2</sup>, Paulo R. Cecon<sup>3</sup> e Lucas M. de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Animal, <sup>2</sup>Departamento de Biologia Geral,

<sup>3</sup>Departamento de Informática – Universidade Federal de Viçosa, Brasil

Resumo

A glândula metapleural é exclusiva de formigas e se caracteriza pela produção de antibióticos. Esse estudo objetivou comparar o volume do reservatório dessa glândula em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, bem como a relação núcleo-citoplasma das células secretoras e a área de superfície da bula, que corresponde à parte externa da glândula. Para as medições, foram utilizadas operárias de tamanho médio das castas lixeira, transportadora de lixo, forrageadora e operárias do jardim de fungo. Tais operárias foram retiradas de quatro colônias de laboratório, sendo quatro indivíduos por casta por colônia. Constatou-se que operárias lixeiras, transportadoras de lixo e forrageadoras, as quais executam tarefas externas à colônia, apresentaram maior volume do reservatório da glândula, o qual não diferiu entre essas três castas. A relação núcleo-citoplasma bem como a área de superfície da bula não diferiram entre as castas avaliadas. Pode-se concluir que as operárias, que se expõem mais intensamente aos riscos de parasitismo no exterior da colônia, encontram-se mais bem equipadas morfologicamente, uma vez que possuem glândula metapleural mais desenvolvida.

Palavras-chave: antibióticos; formigas cortadeiras; lixo; patógenos.

---

\* Correspondência para: lacerdafg@gmail.com

## Abstract

The metapleural gland is exclusive of ants and it is characterized by the production of antibiotics. This study aimed to compare the volume of the reservoir of that gland in workers of *Atta sexdens rubropilosa* Forel, as well as the relationship nucleus-cytoplasm of the secretory cells and the area of surface of the bulla, which corresponds to the external part of the gland. For the measurements, workers of medium size of the following castes were used: waste workers, waste transporters, foragers and gardeners. These workers were removed from four laboratory colonies, being four individuals of each caste and colony used in the measurements. It was verified that waste workers, waste transporters and foragers, which perform tasks outside the colony, presented larger volume of the gland reservoir, which did not differ among the castes. The nucleus-cytoplasm relationship as well as the area of the bulla of the gland did not differ among the castes evaluated. It can be concluded that the workers, that are exposed more intensely to the risks of parasitism outside the colony are morphologically better equipped since they have better developed metapleural gland.

Key-words: antibiotics; leaf-cutting ants; waste; pathogens

## Introdução

As formigas cortadeiras, pertencentes à tribo Attini, caracterizam-se por cultivar um fungo simbiote que lhes serve de alimento. Essa é uma relação de mutualismo que se originou entre 45 e 65 milhões de anos atrás (Mueller et al. 2001). As colônias dessas formigas podem abrigar milhares de indivíduos

aparentados que interagem entre si, podendo facilitar a transmissão de doenças nesse meio (Schmid-Hempel 1998).

Uma estratégia de defesa das formigas contra patógenos são os antibióticos produzidos pela glândula metapleurale que é exclusiva de formigas e constituída de estruturas pares localizadas na margem póstero-lateral do metatórax. Em formigas do gênero *Atta*, a glândula metapleurale pode ser externamente reconhecida por uma bula que corresponde à cobertura visível do reservatório de estocagem da secreção, e uma abertura curvada em forma de fenda voltada para o exterior próxima às coxas posteriores em ambos os lados (Schoeters e Billen 1993). Dentre as Attini, as cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são as que possuem maior largura da bula em relação ao tamanho do corpo quando comparado aos outros gêneros da tribo (Hughes et al. 2008).

A secreção da glândula metapleurale é produzida por células secretoras, sendo que o produto passa através de um ducto e se acumula em uma câmara coletora onde permanece temporariamente até alcançar o interior do reservatório, passando deste para um orifício que se comunica com o exterior. Uma vez que a secreção esteja fora do reservatório, ela pode se espalhar pelo corpo devido aos movimentos das coxas (Schoeters e Billen 1993, Souza et al. 2006).

Dentre as substâncias com propriedades antibióticas que já foram extraídas da glândula metapleurale destacam-se o ácido  $\beta$ -indolacético (IAA), ácido fenilacético (PAA) e  $\beta$ -hidroxidecanóico (mirmicacina) em *Atta sexdens* e *Myrmecia laevinodis* Clark, PAA e mirmicacina em *Messor barbarus* L. e IAA e mirmicacina em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel. Tais compostos inibiram o crescimento das bactérias *Escherichia coli* T.Escherich, *Staphylococcus aureus* Rosenbach e espécies dos fungos *Penicillium*, *Botrytis* e *Alternaria* de acordo com Schidknecht e Koob (1970) *apud* Veal et al. (1992).

Além de ter efeito fungicida, tem-se sugerido que as secreções da glândula metapleurar de formigas cortadeiras, atuam no controle de patógenos e microrganismos competidores do jardim de fungo (North et al. 1997). Ademais, talvez elas possam ser importantes para os indivíduos da colônia que mantêm contato muito intenso com o refúgio das mesmas; diversos patógenos prejudiciais podem ser encontrados nesse lixo como os entomopatógenos *Aspergillus flavus* Link ex Gray (Hughes et al. 2004; Lacerda et al. 2006) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hughes et al. 2004), além do antagonista do jardim de fungo *Trichoderma viride* Pers. ex Gray (Lacerda et al. 2006) e de *Escovopsis* sp. que é parasita do jardim de fungo das formigas da tribo Attini (Bot et al. 2001a).

Os trabalhos sobre a glândula metapleurar são abundantes na literatura. Entretanto, não há relatos sobre aspectos morfológicos e fisiológicos dessa estrutura em operárias que trabalham no lixo de colônias de formigas cortadeiras. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi comparar o tamanho dessa glândula quanto ao volume do reservatório e relação núcleo-citoplasma das células, além da área de superfície da bula de operárias médias de diversas castas, ou seja, operárias que trabalham no monte de lixo ou lixeiras, operárias transportadoras de lixo, forrageadoras e operárias do jardim de fungo. Como as operárias lixeiras estão em constante contato com o lixo onde a concentração de patógenos pode ser alta, a hipótese a ser testada é a de que esta casta tenha a glândula metapleurar mais desenvolvida, já que deverá ocorrer maior produção de antibióticos por parte dessas formigas.

## Material e Métodos

As operárias foram obtidas de quatro colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel pertencentes ao Insetário da Universidade Federal de Viçosa, acondicionadas a  $75 \pm 2\%$  de umidade relativa,  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e 12 horas de fotofase. Delas foram retiradas

operárias que trabalhavam no lixo, operárias transportadoras de lixo, forrageadoras e operárias do jardim de fungo, sendo usadas quatro operárias de cada casta. As operárias coletadas apresentavam a largura da cápsula cefálica de  $2,04 \pm 0,03$  mm de largura. A utilização de operárias de tamanho semelhante foi devido ao fato de que ocorre uma variação de tamanho da glândula entre operárias de tamanhos diferentes, sendo que operárias menores possuem glândula proporcionalmente maior do que operárias maiores, levando-se em consideração o tamanho corporal dessas (Souza et al. 2006, Bot et al. 2001).

Essas operárias foram transferidas para o fixador formalina Millonig para posterior extração das glândulas e confecção dos cortes histológicos. Após a retirada da glândula, o material foi lavado em solução salina (NaCl 125 mM) e desidratado em séries alcoólicas crescentes (70 %, 80 %, 90 % e 95 %). A embebição do material foi realizada em historesina JB4 por 24 horas e a inclusão na mesma resina contendo endurecedor. As amostras foram cortadas com o auxílio de micrótomo em espessura de 7  $\mu$ m. Os cortes foram colocados sobre lâminas, corados com hematoxilina e eosina e a montagem entre lâmina e lamínula foi feita com a resina sintética Permout. Tais cortes foram observados, sendo as imagens capturadas pelo programa Q capture, procedendo-se então à medição das estruturas, utilizando-se o programa Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Ltd).

Para a medição do volume dos reservatórios, foi utilizado o método de Cavallieri, sendo utilizados 10 cortes para cada formiga, considerando-se a seqüência de cortes iniciais até os cortes finais dessa estrutura, usando-se a fórmula:  $V = a.n.\mu$ , onde V é o volume do órgão, a é a área média das medições, n o número total de secções do órgão e  $\mu$  a espessura das secções (Coggeshall, 1992).

Para a determinação da relação núcleo/citoplasma, a área do núcleo e do citoplasma foi medida em três cortes aleatórios de cada formiga, sendo

selecionadas 5 células seccionadas medianamente e que apresentavam os contornos bem definidos em cada corte.

Para verificar uma possível associação entre as dimensões das partes externa e interna da glândula metapleural, foram efetuadas medições da área de superfície da bula. Dessa forma, foram retiradas operárias médias (cápsula cefálica média igual a  $2,03 \pm 0,03$  mm) das castas lixeira, transportadora de lixo, forrageadora e operária do jardim de fungo de quatro colônias. De cada casta, quatro operárias foram utilizadas para as medições que foram realizadas com auxílio de ocular micrométrica acoplada a estereomicroscópio.

Os dados foram analisados por meio de ANOVA e, quando necessário, foi realizado o teste de Dunnet a 5 % de probabilidade para comparar as médias das estruturas das três castas de operárias com as da lixeira, sendo esta casta denominada padrão, uma vez que as comparações foram feitas com ela.

## Resultados

A glândula metapleural apresenta organização estrutural semelhante nas castas analisadas. As glândulas são formadas por células secretoras prismáticas, com núcleo na posição mediano basal, contendo um canal coletor que se abre na câmara coletora que, por sua vez, conecta-se ao reservatório da glândula metapleural (Figuras 1 e 2).

Operárias do lixo de colônias de *A. sexdens rubropilosa* apresentaram o volume do reservatório da glândula metapleural semelhante ao das operárias forrageadoras e transportadoras de lixo. Entretanto, as operárias do jardim de fungo apresentaram esse volume de reservatório significativamente menor (Teste de Dunnet a 5 % de probabilidade) (Tabela 1).

Quanto à relação núcleo/citoplasma das células da glândula metapleural, não houve diferença significativa entre as classes de operárias (Tabela 2). Também

as áreas médias de superfície da bula foram semelhantes nas quatro castas testadas (Tabela 3) (Teste F a 5 % de probabilidade).

## Discussão

A morfologia da glândula metapleurar em *A. sexdens rubropilosa* é semelhante àquela descrita para outras *Attini* por Bot et al. (2001) e Souza et al. (2006).

O reservatório da glândula metapleurar apresenta maior volume, em operárias de *A. sexdens rubropilosa* que desempenham funções externas à colônia. De fato, tais funções implicam em riscos de contaminação para as operárias durante a execução das tarefas fora do ninho, daí a importância de uma glândula metapleurar mais desenvolvida. Isso também é compatível com o desenvolvimento maior dos espinhos dessas operárias forrageadoras em relação àquelas que permanecem na colônia (Wilson 1971).

Entretanto, operárias do lixo que, teoricamente, estão freqüentemente expostas a patógenos não apresentaram diferença quanto ao volume do reservatório da glândula quando comparado às forrageadoras e às transportadoras de lixo. Operárias forrageadoras podem se contaminar com parasitas presentes no ambiente externo como o solo, ar e os vegetais que elas trazem para cultivar o fungo. Podem, ainda, transportar possíveis patógenos do jardim de fungo para o interior da colônia, já que eles podem estar presentes no solo. Entretanto, já foi constatado que as forrageadoras possuem o hábito de lamber e mastigar as folhas antes de incorporá-las ao jardim de modo a retirar delas os contaminantes (Quinlan e Cherret 1977), sendo essa mais uma estratégia contra a propagação de doenças na colônia. Já as operárias transportadoras de lixo têm contato com o refugio em menor grau que as lixeiras, uma vez que transportam o fragmento de lixo do interior do jardim para um pequeno monte, caracterizando uma partição de tarefas

(Lacerda et al. 2006; Hart e Ratnieks 2001). Os fragmentos desse pequeno monte são transportados para o monte principal por operárias lixeiras que trabalham no monte de lixo, mantendo-o organizado em um compartimento dentro ou fora da colônia. Dessa forma, essas operárias lixeiras têm mais contato com o monte principal, podendo se contaminar mais que as transportadoras de lixo, o que justificaria um reservatório mais desenvolvido. O fato do volume do reservatório da glândula ser semelhante em lixeiras, transportadoras e forrageadoras pode estar relacionado à possível não-contaminação do lixo dos ninhos estudados ou ainda à possibilidade de que todas as tarefas externas à colônia sejam igualmente insalubres às operárias. Estudos comparando operárias contaminadas com patógenos para a verificação de um possível aumento do reservatório da glândula metapleural seriam interessantes.

Quanto à relação núcleo-citoplasma, não houve diferença significativa entre as classes de operárias em questão. A presença de células mais desenvolvidas na glândula metapleural seria um indício de que as mesmas estariam em alta atividade metabólica relacionada à produção de antibióticos. Como todas as castas tiveram o mesmo padrão para o desenvolvimento celular, conclui-se que as células da glândula das diferentes castas devem ter a mesma atividade, entretanto, há um maior investimento na estocagem de secreção pelas operárias que executam tarefas externas à colônia, já que o reservatório apresentou-se mais desenvolvido nessas operárias.

Operárias lixeiras de *A. sexdens rubropilosa*, as quais executam atividades relacionadas ao lixo, são parte de uma classe de generalistas (ver primeiro e segundo artigos) diferente das operárias lixeiras de *Atta cephalotes* L. e *Acromyrmex lobicornis* Emery que trabalham exclusivamente no compartimento do lixo e são agredidas pelas companheiras do jardim de fungo caso saiam daquele local como constatado por Hart & Ratnieks (2001). Sendo assim, o fato de operárias forrageadoras, lixeiras e transportadoras de lixo de *A. sexdens rubropilosa*

apresentarem reservatório da glândula metapleurar com a mesma dimensão em termos de volume pode corroborar a hipótese de que estas operárias estejam participando das mesmas tarefas da colônia e, portanto, estão expostas aos mesmos riscos de contaminação por patógenos.

Estudos sobre a sensibilidade de diversos fungos em relação aos compostos antibióticos da glândula metapleurar, incluindo *M. anisopliae*, *Escovopsis* sp., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemine *T. viride* foram realizados por Bot et al. (2002). Esses autores concluíram que tais compostos têm maior importância na proteção contra esporos dos fungos que na supressão do crescimento de hifas. Dos fungos citados acima, *M. anisopliae*, *Escovopsis* e *T. viride* já foram encontrados no compartimento do lixo de formigas cortadeiras (Bot et al. 2001a; Hughes et al. 2004, Lacerda et al. 2006). Portanto, uma maior atividade da glândula em operárias do lixo e também em forrageadoras seria vantajosa para a colônia, uma vez que essas últimas, ao entrarem em contato com vegetais, podem se contaminar da mesma forma que operárias do lixo, pois tais fungos encontram-se presentes normalmente no solo e seus esporos poderiam alcançar partes das plantas utilizadas pelas formigas. Sendo assim, há que se considerar que, o mais vantajoso para a colônia seria mesmo que operárias que realizam trabalhos externos estejam mais bem protegidas contra a contaminação por patógenos.

Não se constatou uma associação entre as partes externa e interna da glândula quanto às suas dimensões. Não foi verificada diferença significativa da área da bula nas diferentes castas investigadas. Isso não era esperado, pois se operárias do jardim de fungo apresentam o volume do reservatório menos desenvolvido, então a área da bula dessas operárias também deveria ser menor em relação às das outras castas. Sendo assim, em *A. sexdens rubropilosa*, não há uma associação da parte externa da glândula metapleurar e o seu interior como constatado por Bot et al. (2001) em estudos com *Acromyrmex octospinosus* Reich.

Em se tratando de defesas contra patógenos, operárias lixeiras de *A. sexdens rubropilosa*, além de contarem com as propriedades anti-sépticas das secreções da glândula metapleural, apresentam um repertório comportamental adequado em relação à defesa contra patógenos. Quando tais operárias são colocadas em contato com o jardim de fungo, dois tipos de comportamento observados são os de “self-grooming” e “grooming” pelas operárias do jardim (ver primeiro capítulo). Tais comportamentos e, ainda, as secreções da glândula metapleural foram considerados importantes na resistência de operárias de *Acromyrmex echinatio* Forel infectadas experimentalmente com *M. anisopliae* como constatado por Hughes et al. (2002).

A produção de antibióticos em colônias de formigas cortadeiras não é realizada exclusivamente pelas operárias, mas também pela bactéria do gênero *Burkholderia* presente no jardim de fungo de colônias de *A. sexdens rubropilosa* (Santos et al. 2005). Essa bactéria produz antibióticos inibidores dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams e também *Escovopsis weberi* Muchovej & Della Lucia. As Attini podem estar, ainda, associadas a um actinomiceto filamentososo do gênero *Pseudonocardia* presente no corpo das formigas e que produz antibióticos capazes de suprimir a ação de *Escovopsis* sp. (Currie et al. 1999a; Currie et al. 1999b). Entretanto, esse actinomiceto não se encontra visível a olho nu no exterior do corpo de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, da mesma forma como é encontrado em outras Attini, e é provável que ele esteja ausente. Sendo assim, a presença de *Burkholderia* no jardim de fungo seria importante no caso de uma infecção por *Escovopsis* sp., além das outras defesas comportamentais já citadas.

A importância de se ter uma glândula metapleural funcional em formigas, além de outras estratégias de defesa comportamental contra patógenos reside no fato de que as colônias de formigas cortadeiras, como nos demais insetos sociais, são caracterizadas por todas as propriedades do comportamento social que podem

aumentar a transmissão de doenças: alta densidade de hospedeiros, acentuada frequência de interação entre os indivíduos e o parentesco entre indivíduos dentro do grupo (Schmid-Hempel 1998). Nesse contexto, o trabalho no compartimento de lixo das colônias de formigas cortadeiras, bem como o forrageamento, podem constituir uma ameaça a mais de contaminação para as operárias. Dessa forma, uma maior funcionalidade da glândula metapleurais nas operárias poderia amenizar problemas de propagação de doenças principalmente pelas operárias que trabalham no meio externo quando essas voltam ao jardim de fungo. Tendo em vista os resultados obtidos, em *A. sexdens rubropilosa*, as operárias encontram-se, aparentemente, bem providas, em termos morfológicos e comportamentais, para enfrentar as adversidades impostas pelo parasitismo à colônia.

#### Referências

- Ballari, S., Farji-Brener, A. G. & Tadey, M. (2007) Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: Division of labour, aggressive behaviour, and location of external refuse dumps. *J. Insect Behav.*, 20, 87-98.
- Bot, A.N.M., Currie, C.R., Hart, A.G. & Boomsma, J.J. (2001a) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol. Ecol. Evol.*, 13, 225-237.
- Bot, A.N.M., Obermayer, M.L. Hölldobler, B. & Boomsma, J.J. (2001b) Functional morphology of the metapleural gland in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Insect. Soc.*, 48, 63-66.
- Bot, A.N.M., Ortius-Lechner, D., Finster, K., Maile, R. & Boomsma, J.J. (2002) Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insect. Soc.*, 49, 363-370.
- Coggeshall, R.E. (1992) A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci.*, 15, 9-13.

- Currie, C.R., Mueller, U.G. & Malloch, D. (1999a) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 96, 7998-8002.
- Currie, C.R., Scott, J.A., Summerbell, R.C. & Malloch, D. (1999b) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398, 701-704.
- Hart, A.G. & Ratnieks, F.L.W. (2001) Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49, 387-392.
- Hughes, W.O.H., Eilenberg, J. & Boomsma, J.J. (2002) Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc.Lond.*, 269, 1811-1819.
- Hughes, W.O.H. & Boomsma J.J. (2004) Let your enemy do the work: within-host interaction between two fungal parasites of leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc.Lond.*, 271, S104-S106.
- Hughes, W.O.H, Pagliarini, R., Madsen, H.B., Dijkstra, M.B. & Boomsma, J.J. (2008) Antimicrobial defense shows an abrupt evolutionary transition in the fungus-growing ants. *Evolution*, 62, 1252–1257.
- Lacerda, F.G., Della Lucia, T.M.C., Lima, E.R., Campos, L.A., Pereira, O.L. (2006) Waste management by workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in colonies supplied with different substrates. *Sociobiology*, 48, 165-173.
- Mueller, U.G, Schultz, T.R., Currie, C.R., Adams, R.M.M. & Malloch, D. (2001) The origin of the attine ant-fungus mutualism. *Q. Rev. Biol.*, 76, 169-197.
- North, R.D., Jackson, C.W. & Howse, P.E. (1997) Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *TREE*, 12, 386-389.

- Quinlan, R.J. & Cherrett, J.M. (1977) The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecol. Entomol.*, 2, 161-170.
- Santos, A.V., Dillon, R.J., Dillon, V.M., Reynolds, S.E. & Samuel, R.I. (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colony of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 239, 319-323.
- Schmid-Hempel, P. (1998) *Parasites in social insects*. Princeton University Press, Princeton.
- Schoeters, E. & Billen, J. (1993) Anatomy and fine structure of the metapleural gland in *Atta* (Hymenoptera, Formicidae). *Belgian J. Zool.*, 123, 67-75.
- Souza, A.L.B., Soares, I.M.F., Cyrino, L.T. & Serrão, J.E. (2006) The metapleural gland in two subspecies of *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 47, 19-25.
- Veal, D.A., Trimble, J.E. & Beattie, A.J. (1992) Antimicrobial properties of secretions from the metapleural glands of *Myrmecia gulosa* (the Australian bull ant). *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 188-194.
- Wilson, E.O. 1971. *The insect societies*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

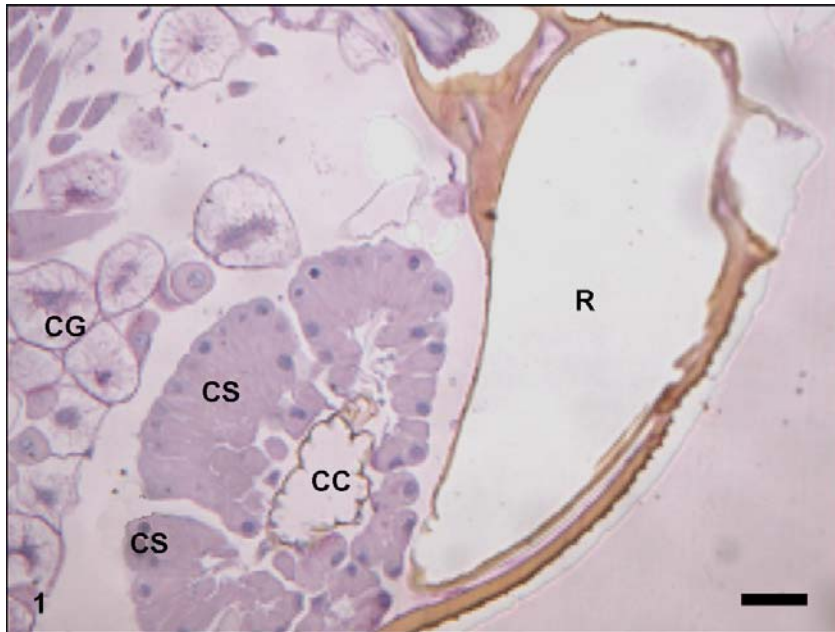


Figura 1. Glândula metapleural de operárias médias do jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa*. CC - câmara coletora, CG - corpo gorduroso, CS - células secretoras, R - reservatório. Barra = 30  $\mu$ m.

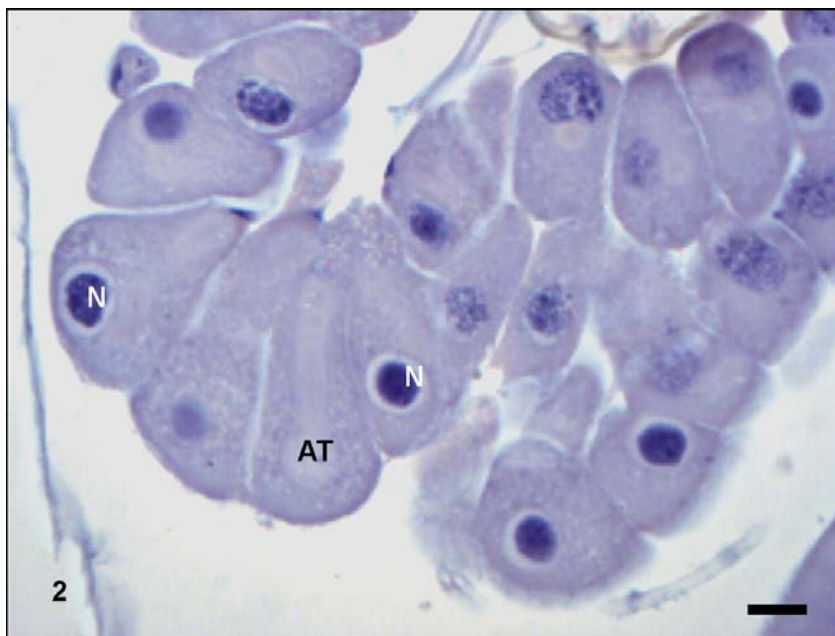


Figura 2. Células secretoras da glândula metapleural de operárias de *A. sexdens rubropilosa*. N - núcleo da célula secretora, AT - aparato terminal. Barra = 10  $\mu$ m.

Tabela 1. Valores médios de área e volume do reservatório da glândula metapleural das diferentes classes (castas) de operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Médias com asterisco diferem da padrão ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.

Classes de operárias	Área média ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ )	Volume médio ( $\times 10^3 \mu\text{m}^3$ )
Padrão-Lixeira	66,52	4420,64
Jardim de fungo	47,94*	2707,28*
Forrageadora	64,06	4073,67
Transportadora de lixo	51,60	3338,34
C.V (%)	31,36	39,41

Tabela 2. Valores médios em termos de área da relação núcleo-citoplasma (N/C) das células da glândula metapleural das diferentes classes (castas) de operárias. F não-significativo a 5 % de probabilidade.

Classes de operárias	N/C
Padrão-Lixeira	0,28
Jardim de fungo	0,28
Forrageadora	0,27
Transportadora de lixo	0,28
C.V (%)	44,30

Tabela 3. Valores médios da área de superfície da bula da glândula metapleural das diferentes classes (castas) de operárias. F não-significativo a 5% de probabilidade.

Classes de operárias	Área média ( $\text{mm}^2$ )
Padrão-Lixeira	0,25
Jardim de fungo	0,24
Forrageadora	0,26
Transportadora de lixo	0,25
C.V (%)	26,36

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

Constatou-se, no presente trabalho, que as operárias do jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa* apresentam uma série de comportamentos, em relação às lixeiras, como a inspeção, a imobilização e o “grooming” que podem minimizar uma possível contaminação da colônia pelas operárias do lixo. Aparentemente, esses comportamentos são eficientes, uma vez que as operárias lixeiras não precisam ficar confinadas ao compartimento de lixo como outras espécies de cortadeiras, podendo transitar livremente pela colônia. Operárias lixeiras podem executar outras funções na colônia como o cuidado da prole e o forrageamento. Elas também podem trabalhar no lixo desde as primeiras semanas de vida, de forma que o polietismo etário, aparentemente, não se aplica aos trabalhos relacionados ao lixo, mas sim aos cuidados no compartimento do jardim de fungo e ao forrageamento. Operárias que trabalham no exterior da colônia, como as próprias lixeiras, transportadoras de lixo e forrageadoras, aparentemente, estão mais bem preparadas para enfrentar as adversidades impostas pelo parasitismo, uma vez que possuem o reservatório da glândula metapleural mais desenvolvido capaz de armazenar maiores quantidades de antibióticos produzidos por essa glândula, os quais podem se fazer necessários em uma situação de contaminação por patógenos. Portanto, o estudo do lixo de colônias de *A. sexdens rubropilosa* revela a existência de alguns aspectos, até então desconhecidos, que se relacionam com a defesa da colônia em situações de risco de contaminação por patógenos. As formigas, aparentemente, já evoluíram algumas características comportamentais e morfológicas que auxiliam no sucesso desse superorganismo, que é a colônia, no ecossistema. Esse fato pode contribuir para o aumento da complexidade do controle desses insetos-praga por meio de microrganismos patogênicos, visto que algumas estratégias comportamentais de defesa como o grooming e o self-grooming e ainda as secreções antibióticas da glândula metapleural contribuem

para o aumento da sobrevivência de formigas cortadeiras em caso de infecção por entomopatógenos.