

DANIVAL JOSÉ DE SOUZA

DISCRIMINAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS EM
COLÔNIAS MONOGÍNICAS E POLIGÍNICAS DE *Acromyrmex*
subterraneus molestans (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Entomologia, para
obtenção do Título de “Magister
Scientiae”.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2003

DANIVAL JOSÉ DE SOUZA

**DISCRIMINAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS EM COLÔNIAS
MONOGÍNICAS E POLIGÍNICAS DE *Acromyrmex subterraneus molestans*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do Título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 15 de julho de 2003

Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Conselheiro)

Prof. Eraldo Rodrigues de Lima
(Conselheiro)

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos

Prof^a Mara Garcia Tavares

Prof^a Terezinha Maria Castro Della Lucia
(Orientadora)

Aos meus pais e irmãos

"O dia passa
E eu nessa vida
Longa é a arte
Tão breve a vida..."
(Tom Jobim-Querida)

Agradecimentos

Eu sou muito grato à Prof. Terezinha Della Lucia por providenciar facilidades e apoio nos meus estudos e por me permitir conhecer o maravilhoso mundo das formigas cortadeiras.

Esta tese não é produto exclusivo do meu trabalho. Eu necessitei de ajuda em várias áreas, diversas vezes, e para isto recorri a várias pessoas desta universidade.

Eu agradeço ao Dr. Luiz Cláudio e aos vários membros do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) que me ajudaram nas análises químicas. Os alunos Roqueline, Alberto e Fábio ensinaram-me com paciência o funcionamento do laboratório e o técnico Eduardo foi imprescindível durante as análises.

Ao professor Eraldo Lima pelas sugestões e críticas durante a feitura dos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da UFV, agradeço a acolhida. À secretária do Programa, Sr^a Paula, exemplo de competência e dedicação.

Discussões com os professores Lucio Campos, José Lino, Alexandre Peternelli e Paulo de Marco ajudaram a desenvolver minhas idéias. A Prof^a Mara deu valiosas contribuições a este e a outros trabalhos realizados anteriormente.

Devo ao CNPq o suporte financeiro para o êxito das pesquisas.

Não poderia esquecer de mencionar todos os companheiros do Insetário da UFV, sem exceção, pela boa convivência, amizade e pela ajuda imprescindível na manutenção das colônias de formigas. Márcio, Fabrícia, Ethel, Gabriela e Clayton, muito obrigado. Em especial, agradeço ao Sr. Manoel, funcionário do Insetário, que sempre ajudou com entusiasmo na coleta das colônias, além de ter me ensinado os aspectos básicos da criação de formigas cortadeiras.

BIOAGRAFIA

Danival José de Souza, filho de José Antônio de Souza e de Amélia Maria de Souza, nasceu em Florestal, Minas Gerais, em 25 de julho de 1977.

Concluiu o segundo grau na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF), habilitando-se em Técnico de Administração, em 1995.

Em março de 2001, graduou-se biólogo pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, tendo sido bolsista do Programa Especial de Treinamento (PET/CAPES) de março de 1998 a março de 2001. Durante esse período realizou projetos de iniciação científica com formigas cortadeiras.

Iniciou o Curso de Mestrado, em agosto de 2001, em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, completando as exigências do curso em julho de 2003.

Índice

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Introdução Geral.....	1
Considerações iniciais.....	1
Poliginia e parasitas.....	2
Reconhecimento Parental.....	4
Subespécie estudada.....	7
Capítulo 1.....	10
Resumo.....	10
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	13
Resultados e discussão.....	18
Capítulo 2.....	31
Resumo.....	31
Introdução.....	32
Material e métodos.....	35
Resultados e discussão.....	41
Capítulo 3.....	53
Resumo.....	53
Introdução.....	54
Material e métodos.....	58
Resultados e discussão.....	60
Conclusões gerais.....	68

Literatura citada.....	69
Apêndice I.....	82

Resumo

DE SOUZA, Danival José, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003.

Discriminação e sobrevivência de operárias em colônias monogínicas e poligínicas de *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae). Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Conselheiros: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Eraldo Rodrigues de Lima.

A poliginia dentro de uma colônia de inseto social pode ser primária ou secundária. A poliginia primária ocorre quando várias rainhas se juntam para iniciar uma nova colônia. Também, colônias monogínicas podem aceitar novas rainhas fecundadas, tornando-se assim poligínicas secundariamente. A poliginia diminui o grau de parentesco entre as operárias companheiras de ninho e, com isso, os benefícios de se ajudar indivíduos mais próximos geneticamente também se reduzem. Estudos acerca do reconhecimento entre companheiras de ninho e da adoção de rainhas são imprescindíveis para esclarecer como o número de rainhas é regulado, bem como as causas da variação nesse número. Neste trabalho, escolheu-se como objeto de estudo *Acromyrmex subterraneus molestans* Santschi, 1925, uma subespécie de formiga cortadeira bastante comum na região de Viçosa, MG. Numa mesma região são encontradas colônias monogínicas e poligínicas dessa subespécie, o que a torna ideal em estudos dos processos que regulam o número de rainhas em colônias de Formicidae. Estudos conduzidos em laboratório mostraram que colônias monogínicas de *Ac. subterraneus molestans* podem se tornar poligínicas pelo mecanismo de adoção de rainhas de outras colônias. Operárias da maioria das colônias estudadas não foram capazes de discriminar entre rainhas de outras colônias

da sua própria. A ausência de comportamento discriminatório também foi verificada quando se realizaram encontros de operárias de diferentes colônias. Análises químicas mostraram que não existem diferenças qualitativas no perfil químico cuticular das colônias, quer sejam elas monogínicas ou poligínicas. Finalmente, avaliou-se a possibilidade de haver sobrevivência diferencial entre operárias de colônias poligínicas e monogínicas, quando essas eram mantidas em contato com o lixo da própria colônia. Os testes de sobrevivência mostraram que operárias dos dois tipos de colônia morriam a taxas estatisticamente iguais. Vantagens da poliginia e da ausência de comportamento discriminatório são discutidas nesta dissertação.

Abstract

DE SOUZA, Danival José, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2003.

Discrimination and survival of workers in monoginic and poliginic colonies of *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae). Advisor: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Committee members: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Eraldo Rodrigues de Lima.

Polygyny within a colony of social insects can be primary or secondary. Primary polygyny may occur when several queens jointly initiate a new colony. Monogynous colonies can also accept newly mated queens and become secondarily polygynous. Polygyny reduces kinship among nestmate workers and, consequently, reduces the benefits of helping genetically close individuals. Studies on nestmate recognition and on queen adoption are essential to elucidate how the number of queens is regulated, as well as the causes of the variation in this number. In this research, *Acromyrmex subterraneus molestans* Santschi, 1925 was chosen because it is a very common leaf-cutting ant in the region of Viçosa, Minas Gerais State where the Federal University of Viçosa is located. Additionally in this region monogynous and polygynous colonies of this subspecies occur naturally, which makes them ideal for studying regulation in queen number in Formicidae. Laboratory studies demonstrated that monogynous colonies of *Ac. subterraneus molestans* may become polygynous by the mechanism of queen adoption from other colonies. Workers of most of the studied colonies were not able to discriminate among queens from other colonies and their own. The lack of discriminatory behavior was also observed when encounters from different colonies were induced. Chemical analyzes showed no

qualitative differences in the cuticular chemical profile of either polygynous or monogynous colonies. Finally, the possibility of differential survival among workers from these colonies when maintained in contact with colony refuse was evaluated. Survival tests revealed that workers from either monogynous or polygynous colonies died at equal rates in contact with refuse. Advantages of polygynous and of the lack of discriminatory behavior among workers are discussed in this thesis.

INTRODUÇÃO GERAL

Considerações iniciais

O número de rainhas altera profundamente várias características-chave da organização colonial das formigas, incluindo a relação entre companheiras de ninho, a taxa de crescimento da colônia, o número e a distribuição de ninhos (Hölldobler & Wilson 1990).

Colônias monogínicas são aquelas que possuem apenas uma rainha reprodutiva, ao contrário das poligínicas que possuem múltiplas rainhas. A oligoginia é um caso especial de poliginia, no qual várias rainhas coexistem no mesmo ninho mas permanecem separadas umas das outras (Hölldobler 1962, Buschinger 1974). Nas formigas, a oligoginia é caracterizada pela tolerância das operárias às várias rainhas combinada com uma intolerância entre as rainhas. A haplometrose é o nome que se dá ao fenômeno de fundação da colônia por uma única rainha. Quando a fundação é realizada por várias rainhas se dá o nome de pleometrose.

A monoginia pode ser primária, o que quer dizer que a única rainha presente na colônia é também a fundadora, ou secundária, quando múltiplas rainhas iniciam a colônia pleometroticamente, mas somente uma delas sobrevive. Do mesmo modo, a poliginia pode ser primária, isto é, múltiplas rainhas persistem após a associação pleométrica, ou secundária, a colônia é iniciada por uma rainha e as outras são adicionadas após por adoção ou fusão com outras colônias.

Poliginia e Parasitas

A evolução das sociedades animais, nas quais alguns indivíduos abdicam de sua própria oportunidade reprodutiva para ajudar outros a se reproduzirem, representa um paradoxo à teoria evolutiva de Darwin (Keller 1995a). Nos himenópteros sociais muitos membros individuais da colônia não produzem nenhuma prole mas, em vez disto, ajudam outros membros da colônia na tarefa reprodutiva. A produção de ovos viáveis é, normalmente, atributo de uma casta específica de indivíduos da colônia, chamada de rainhas. O comportamento altruísta das operárias pode evoluir através da seleção parental quando o doador e o receptor deste ato são relacionados (aparentados) um ao outro, como é o caso de pássaros sociais e mamíferos (Hamilton 1964a, Hamilton 1964b). Da mesma forma, operárias de insetos sociais são altamente relacionadas à prole que elas criam, isto quando a colônia possui apenas uma rainha fecundada por um único macho. Entretanto, vários estudos têm mostrado que colônias de alguns insetos possuem várias rainhas, principalmente entre os Formicidae (Ward 1983a, Ward 1983b, Della Lucia & Vilela 1986, Rissing *et al.* 1986, Delabie 1989, Kaufmann *et al.* 1992, Rosengren *et al.* 1993, Seppä 1994). Um desafio para os estudiosos do comportamento social é tentar explicar as causas da existência de colônias com múltiplas rainhas. Tem sido sugerido que pressões ecológicas durante a fundação da colônia, tais como a escassez de sítios de nidificação, favoreceriam a poliginia em algumas espécies de formigas (Pamilo & Rosengren 1984, Bourke & Heinze 1994, Rosengren *et al.* 1993, Craig & Crozier 1979, Heinze 1993), embora poucos estudos tenham testado esta hipótese. Um importante fator, segundo Nonacs (1988), que age selecionando o

comportamento de aceitação de rainhas é a alta probabilidade de que as colônias as percam, principalmente em habitats instáveis. As rainhas podem ser perdidas de diversas maneiras, além da sua morte simplesmente. Por exemplo, algumas espécies nidificam em sítios efêmeros ou se movem frequentemente e, nesta situação, a colônia pode acidentalmente sofrer fissão. Portanto, a poliginia aumenta as chances de que cada fragmento da colônia contenha pelo menos uma rainha. De acordo com Keller (1995b) uma outra vantagem conferida pela poliginia, ao nível da colônia, é que ela eleva a variabilidade genética e, por conseqüência, diminui a suscetibilidade a parasitas.

Embora vários patógenos tenham sido identificados nas formigas (como vírus, bactérias e fungos), muito pouco ainda é conhecido sobre a incidência destes patógenos, seus efeitos na produtividade da colônia e os mecanismos de defesa das formigas (Hölldobler & Wilson 1990). Em muitas espécies de formigas, a glândula metapleurale das operárias produz substâncias anti-sépticas que são antibióticos efetivos contra *Escherichia coli* (Maschwitz *et al.* 1970, Maschwitz 1974, Hölldobler & Wilson 1990). Ortius-Lechner *et al.* (2000) conseguiram detectar mais de vinte compostos presentes na secreção da glândula metapleurale de operárias de *Acromyrmex octospinosus*, compreendendo principalmente ácidos carboxílicos, que são potenciais anti-sépticos, além dos outros dois compostos registrados anteriormente, o ácido indol-acético e a mirmicacina (Schildknecht & Koob 1971, Schildknecht *et al.* 1973).

O lixo produzido pelas sociedades dos insetos pode atuar como reservatório de doenças e impor um custo significativo na vida social (Hart *et al.* 2002). Quando o grupo social é pequeno, o acúmulo de lixo é pequeno e não chega a representar uma

ameaça séria de doença. Entretanto, à medida que o grupo se torna maior, o lixo e as doenças associadas a ele se tornam uma ameaça à socialidade. As formigas cortadeiras cultivam um fungo basidiomiceto, do qual elas dependem nutricionalmente (Weber 1972), suprindo-o com folhas ou outros materiais, como fezes e carcaças de insetos, dependendo do gênero de *Attini*. Por isto, elas devem combater as doenças diretas, isto é, aquelas que as acometem, e também as doenças que atacam o fungo simbiote. O principal parasita do fungo simbiote das formigas cortadeiras é o *Escovopsis*, um fungo altamente virulento e potencialmente fatal (Currie *et al* 1999a, Currie *et al.* 1999b). O *Escovopsis* invade o jardim de fungo da colônia e, em casos extremos, pode dominar este jardim, levando a colônia a um estado de estagnação e morte (Currie 2001). Por outro lado, as formigas cortadeiras possuem uma outra associação simbiótica com um actinomiceto que vive na sua cutícula e produz substâncias antibióticas contra o *Escovopsis* (Currie *et al.* 1999a).

Reconhecimento Parental

De acordo com a teoria de seleção parental (Hamilton 1964a, Hamilton 1964b), o indivíduo altruísta, que convive com outros indivíduos de variados graus de parentesco, deveria ser capaz de distinguir entre aqueles mais (ou menos) relacionados geneticamente e agir favorecendo os mais próximos geneticamente de si, praticando desta forma a discriminação parental. Ao longo da história evolutiva das formigas, e em outros insetos sociais, tem havido uma intensa pressão de seleção para moldar a habilidade de reconhecimento, porque favores prestados a um indivíduo não aparentado são desperdiçados no jogo da seleção natural (Hölldobler

& Wilson 1990). A ocorrência comum de múltipla inseminação e de poliginia torna necessário um mecanismo que permita identificar todas as companheiras de ninho em oposição às intrusas.

O reconhecimento parental, definido como o tratamento diferencial aos parentes, ocorre em muitas espécies (Fletcher & Michener 1987, Hepper 1991). Quando uma operária de formiga reconhece e ajuda a rainha, ela aumenta o seu próprio sucesso reprodutivo, pois ela passa, indiretamente, para as próximas gerações, cópias de seus genes (Keller 1997). Tais benefícios existem quando a operária é muito próxima geneticamente da rainha que recebe a ajuda. Entretanto, em muitos casos onde o nepotismo - ajuda aos parentes mais próximos - é esperado, ele não tem ocorrido. Vários estudos falharam na tentativa de demonstrar a ocorrência de nepotismo entre as formigas (Balas & Adams 1996, Bernasconi & Keller 1996, Snyder 1993, Carlin *et al.* 1993). Em várias espécies de vespas e formigas mais de uma rainha coexistem em colônias maduras sem que as operárias exibam sinal de nepotismo (Keller 1993).

Um perfil químico comum entre companheiras de ninho é um importante fator que ajuda a manter a coesão da colônia. Esta assinatura química vem de uma combinação de fatores genéticos, intrínsecos, e ambientais, adquiridos, que são transferidos entre os membros da colônia. Pelo aprendizado da assinatura química específica da colônia as operárias podem, acuradamente, distinguir as companheiras das não companheiras de ninho (Fletcher & Michener 1987). Os hidrocarbonetos cuticulares exercem importante papel no reconhecimento de companheiras de ninho em formigas. A formiga escravagista *Pogonomyrmex barbatus* pode perceber diferenças na composição de hidrocarbonetos cuticulares e usar estas diferenças no

reconhecimento de companheiras de ninho (Wagner *et al.* 2000). Entre elas são encontradas diferenças na proporção de hidrocarbonetos cuticulares de acordo com as tarefas que elas executam (Wagner *et al.* 1998). Em formigas, a discriminação de companheiras de ninho pode variar com fatores colônia-específicos tais como tamanho e estágio de desenvolvimento da colônia, além de fatores ambientais como época do ano e proximidade entre os ninhos (Starks *et al.* 1998). Jutsum *et al.* (1979) mostraram que fatores endógenos (genéticos) e exógenos (ambientais) contribuem para a formação do odor de colônia em *Acromyrmex octospinosus*, sendo os últimos os mais importantes. Indivíduos de diferentes colônias supridas com o mesmo tipo de folha não apresentaram agressividade intraespecífica, ocorrendo o contrário quando as colônias foram mantidas com espécies vegetais distintas.

Starks *et al.* (1998) apresentaram evidências de que o nível de discriminação em *Pseudomyrmex pallidus*, uma formiga facultativamente poligínica, varia com o número de rainhas presentes na colônia. Nesta espécie, a agressão entre não-companheiras de ninho foi negativamente correlacionada com o número de rainhas na colônia. A presença ou ausência de rainha pode influenciar o comportamento de discriminação das operárias, sendo o comportamento destas, provavelmente, regulado por feromônios voláteis da rainha (Vienne *et al.* 1998). Em espécies que possuem ninhos subterrâneos, como *Atta* e *Acromyrmex*, os feromônios das rainhas devem apresentar baixa volatilidade, já que a circulação de ar internamente é muito baixa, e feromônios muito voláteis poderiam causar rápida habituação sensorial (Bento *et al.* 1993). A importância da rainha pode diferir entre espécies com estrutura social diferentes (Lenoir *et al.* 1999). Dos poucos estudos que têm se ocupado desta questão, dois modelos surgiram. O primeiro, baseado em ensaios comportamentais

com *Camponotus floridanus*, sugere que a rainha é a origem principal do odor de colônia (Carlin & Hölldobler 1987). O segundo, fundamentado em estudos bioquímicos em *Cataglyphis niger*, sugere que a rainha adquire uma porção média de todos os odores da colônia, via lambedura de operárias, e se torna o centro do odor de colônia, em vez de ser a origem dele (Lahav *et al.* 1999).

Subespécie estudada

A formiga *Ac. subterraneus molestans* Santschi 1925 está incluída na tribo Attini que se caracteriza pelo cultivo de um jardim de fungo simbiótico. Pode-se agrupar as formigas desta tribo em três categorias: formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) que usam partes frescas da planta para o cultivo do fungo – principalmente folhas e flores; um grupo de espécies de outros gêneros que sustentam seu jardim de fungo com grande quantidade de matéria orgânica em decomposição, embora algumas espécies neste grupo - *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* - utilizem também partes frescas de planta. Existe um terceiro grupo que compreende formigas parasitas: *Acromyrmex* sp., reconhecida anteriormente como *Pseudoatta*, encontrada em ninhos de *Ac. rugosus* (Delabie *et al.* 1993), e *Ac. insinuator* que parasita *Ac. echinator* (Schultz *et al.* 1998).

Os ninhos de *Ac. subterraneus molestans* são superficiais e apresentam-se cobertos de palha, comumente situados sob construções, em áreas antropizadas. O substrato para o seu fungo é extraído de plantas dicotiledôneas (Gonçalves 1961). Em Viçosa, MG, ela ocorre em simpatria com outra subespécie, *Ac. subterraneus subterraneus*. A validade das subespécies de *Ac. subterraneus* é questionável e

merece um estudo mais detalhado (Mayhé-Nunes 1991). As três formas com ocorrência constatada no Brasil (as duas citadas anteriormente mais *Ac. subterraneus brunneus*) têm distribuição semelhante e compartilham uma extensa área geográfica nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. O principal critério nas chaves de identificação para separar estas subespécies são os espinhos pronotais inferiores, um caráter muito variável segundo Fowler & Ketelhut (1993).

As operárias intermediárias e pequenas de *Ac. subterraneus molestans* têm a cabeça negra, contrastando com a cor castanha do resto do corpo, o que facilita a identificação e coleta de colônias no campo. É uma subespécie comum na área urbana de Viçosa, cujos ninhos são freqüentemente poligínicos, principalmente numa área contígua ao Insetário da Universidade Federal de Viçosa. Aí foram encontrados vários ninhos contendo número variável de rainhas, normalmente duas, mas tendo sido observado um ninho com quatorze rainhas. Numa mesma área são encontrados ninhos poligínicos e monogínicos. Espécies que apresentam num mesmo habitat colônias poligínicas e monogínicas são especialmente interessantes para contrastar estas duas estruturas de colônia (Pfennig 1995).

Esta dissertação está dividida em 3 capítulos. No capítulo 1 testou-se a hipótese de que a adoção de rainhas fertilizadas seja uma das causas da ocorrência de poliginia em *Ac. subterraneus molestans*. No capítulo 2 foi estudado o comportamento discriminatório de operárias de colônias poligínicas e monogínicas desta subespécie. Testou-se a hipótese de que operárias de colônias poligínicas exibem menor grau de agressividade do que as de colônias monogínicas, estudando-se também a constituição química cuticular dessas operárias. E finalmente, no

capítulo 3, testou-se a hipótese de que a poliginia representaria uma vantagem frente aos possíveis riscos representados pelo lixo, como infecção e morte de operárias.

CAPÍTULO 1

Colônias monogínicas de *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae) podem se tornar artificialmente poligínicas através da adoção de novas rainhas?

Resumo

Testes, que consistiram no oferecimento de rainhas fertilizadas, oriundas de outras colônias à colônias estabelecidas, foram conduzidos, em laboratório e no campo, a fim de se determinar se colônias monogínicas de *Acromyrmex subterraneus molestans* (Myrmicinae, Attini) adotam rainhas não companheiras de ninho. Os resultados sugerem que a adoção de rainhas fertilizadas é um mecanismo provável que explica a ocorrência de colônias com múltiplas rainhas nesta subespécie. Operárias menores desta subespécie foram capazes de discriminar as rainhas de outras colônias oferecidas e exibiram ato agressivo contra elas, mostrando que o grau de reconhecimento da rainha difere entre as diferentes subcastas. Sinais específicos, responsáveis pela atratividade das rainhas às operárias, parecem estar localizados, principalmente, na região da cabeça. Os dados dos experimentos realizados foram comparados com os de outros trabalhos nesta área e discutiu-se hipóteses sobre as vantagens da poliginia em *Ac. subterraneus molestans*.

1 – Introdução

A variação no número de rainhas nas colônias de insetos sociais tem se tornado assunto de crescente interesse entre os sociobiologistas. Esse interesse vem aumentando à medida que se descobre que a poliginia, isto é, a presença de múltiplas rainhas reprodutivas dentro de uma colônia, é mais comum do que antes se imaginava (Keller & Vargo 1993) e, nas formigas, pode ser a estrutura social predominante (Rissing & Pollock 1988, Frumhoff & Ward 1992). Nessas associações, as rainhas podem ser não-aparentadas. Assim, a poliginia representa um forte desafio para a teoria da seleção parental, desde que a tarefa reprodutiva é compartilhada e o grau de parentesco entre os membros da colônia é muito baixo (Nash & Bernasconi 1996).

A poliginia evoluiu repetidas vezes nas formigas e, normalmente, é do tipo secundária, ocorrendo graças à adoção de novas rainhas (Hölldobler & Wilson 1977, 1990). A pleometrose ocorre quando mais de uma rainha se juntam para fundar uma colônia, podendo dar origem à poliginia primária. O fenômeno da pleometrose tem sido bem documentado em formigas (Bartz & Hölldobler 1982, Tschinkel & Howard 1983, Pollock & Rissing 1985). No gênero *Acromyrmex*, ela foi observada em condições naturais em *Ac. versicolor* (Rissing *et al.* 1986) e demonstrada em laboratório em *Ac. striatus* (Diehl-Fleig & Araújo 1996). A fundação pleométrica envolve, usualmente, pequeno número de fundadoras (até cinco rainhas) (Roisin 1993), mas em algumas espécies este número pode ser muito maior. Numa supercolônia de *Formica yessensis* com milhares de ninhos, foi encontrado mais de um milhão de rainhas (Higashi 1983). Rissing *et al.* (1986) encontraram até 16 rainhas de *Ac. versicolor* ocupando o mesmo ninho logo após a fundação. Em

Viçosa, encontrou-se um ninho de *Ac. subterraneus molestans* com 14 rainhas (observação pessoal).

A adoção de novas rainhas dá origem à poliginia secundária. Isto seria vantajoso uma vez que a taxa de sucesso da fundação independente de uma colônia é muito baixa (Nonacs 1988, Pamilo 1991). A adoção de novas rainhas por uma colônia de *Acromyrmex* já estabelecida ainda não foi observada em condições naturais.

Estudos da dinâmica da aceitação de rainhas são ponto central para o entendimento: 1) dos mecanismos proximais envolvidos na regulação do número de rainhas – entender como surge a poliginia e como ela se mantém - e 2) das causas últimas, isto é, da evolução da poliginia (Sundström 1997). Muitos estudos têm se concentrado no reconhecimento entre operárias companheiras e não companheiras de ninho. Porém, tem se dado pouca atenção ao comportamento discriminatório de operárias frente a fêmeas reprodutivas, a despeito da importância deste comportamento para a regulação do número de rainhas na colônia. Para isto, as operárias deveriam ser capazes de discriminar entre fêmeas companheiras e não companheiras de ninho, além de discriminar também entre fêmeas virgens e acasaladas (Sundström 1997).

Neste capítulo, procurou-se responder às seguintes perguntas:

1) Colônias monogínicas da subespécie *Ac. subterraneus molestans*, mantidas em laboratório, adotam novas rainhas da mesma subespécie?

2) Operárias de uma colônia adulta no campo aceitam rainhas férteis oriundas de outra colônia?

3) Sinais específicos para o reconhecimento da rainha pelas operárias estão situados em uma parte específica do corpo (cabeça, tórax, gáster)?

2 - Material e Métodos

2.1. Coleta e manutenção das colônias

Foram utilizadas 8 colônias de *Ac. subterraneus molestans* de 1 ano de idade (C1 a C5, E1 a E3), com volume médio de fungo de 600 ml, mantidas no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, conforme descrito por Della Lucia *et al.* (1993). As colônias foram alimentadas diariamente com o mesmo tipo de folhas (*Acalypha* e *Ligustrum*) e pétalas (*Rosa* e *Tecoma*). Elas permaneceram em salas com temperatura de $25 \pm 2,5^\circ$, 70 a 80 % de U.R, fotoperíodo de 10 horas de luz seguido de 14 horas de escuro.

2.2. Oferecimento de rainhas férteis oriundas de outras colônias

Neste ensaio utilizou-se as colônias C1 a C5. Inicialmente, todas tiveram sua alimentação suprimida 6 horas antes dos bioensaios, evitando-se a interrupção na atividade de corte e carregamento de folhas na hora dos experimentos, dando iguais condições para todos os tratamentos. Além disso, a arena de forrageamento permanecia livre de folhas, o que facilitava a visualização do comportamento das operárias.

2.2.1. Tratamento 1 – Rainha da própria colônia (RPC)

A rainha era retirada da colônia e marcada no gáster com tinta não-tóxica (Testors ©) e permanecia num recipiente plástico coberto com algodão úmido durante 15 minutos. Esse tempo era suficiente para a colônia estabelecer seu ritmo normal de forrageamento. Em seguida, a rainha era colocada em um pequeno tubo de vidro com uma abertura (6 cm altura x 2,2 cm diâmetro) e oferecida à colônia na arena de forrageamento. O vidro era colocado horizontalmente na arena, de forma que as operárias acessavam livremente o seu interior e a rainha também podia sair. Observava-se o comportamento das operárias e da rainha, e media-se o tempo para sua aceitação ou não. A rainha da própria colônia foi oferecida três vezes, em cada uma das cinco colônias, para que se estabelecesse uma média do tempo de aceitação da rainha da própria colônia e se pudesse, assim, contrastar com o tempo de aceitação de uma rainha de outra colônia (ROC). O intervalo entre cada bioensaio foi de 5 dias, pois com este tempo era possível observar crescimento do jardim de fungo, indicando que a colônia recuperou-se da perturbação provocada pelo bioensaio anterior. Essa metodologia foi modificada de Bento (1993) que trabalhou com a dinâmica de aceitação de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*.

2.2.2. Tratamento 2 – Rainha de uma outra colônia da mesma espécie (ROC)

Realizou-se este bioensaio de maneira similar ao do tratamento 1, porém, a rainha utilizada neste tratamento pertencia a uma colônia monogínica coletada recentemente no campo. Normalmente, essas rainhas eram oriundas de colônias muito pequenas, talvez recém-fundadas, com volume de fungo médio de 150 ml.

Realizou-se um total de 15 repetições, isto é, ofereceu-se 3 rainhas para cada uma das 5 colônias, dando-se também um intervalo de 5 dias entre cada repetição.

Antes da realização deste bioensaio, efetuava-se a pesagem da rainha e avaliava-se a sua taxa de oviposição, conforme metodologia usada por Marinho & Della Lucia (1998). Ela era deixada em um pote plástico contendo um chumaço de algodão embebido em solução de mel e coberto com uma tampa perfurada, sobre a qual colocava-se um algodão úmido. Este procedimento visava manter a umidade interna do pote plástico, já que a rainha permaneceria nele por 72 horas, tempo de avaliação da taxa de postura. Após 3 meses de oferecimento da última rainha, foi observado se elas permaneceram em associação e avaliou-se novamente sua taxa de postura. Três meses foi o tempo máximo estipulado para final deste experimento, com base em diversos trabalhos da literatura, e realizados com outras espécies de formigas.

2.3 Oferecimento de cabeça, tórax e gáster de rainhas oriundas do campo

Este ensaio consistiu no oferecimento de partes de rainhas oriundas de colônias monogínicas recém-coletadas no campo às colônias E1, E2 e E3. Estas foram mantidas em jejum 6 horas antes da realização do bioensaio, da mesma maneira que o experimento anterior. As rainhas a serem oferecidas eram retiradas de sua colônia e congeladas em freezer por 30 minutos, após o que tinham seus corpos divididos em três partes e colocadas em lâminas de vidro. Após 5 minutos, essas lâminas eram dispostas a uma distância igual da entrada de cada ninho. A cada repetição, alterava-se a ordem das lâminas, a fim de se evitar uma resposta condicionada. Computou-se o tempo gasto para que cada parte fosse levada ao

interior do ninho. Após 30 minutos o bioensaio era encerrado e as partes não transportadas, juntamente com aquelas carregadas para o lixo, foram consideradas não aceitas. Neste experimento, foi dado um intervalo de 15 dias entre cada repetição, para evitar uma habituação das operárias ao longo dos bioensaios. As pinças, lâminas e os bisturis usados nestes bioensaios eram bastante limpos, tomando-se o máximo cuidado para evitar contaminação do material por qualquer substância odorífera estranha. Esta metodologia baseou-se nos trabalhos de Bento (1993).

2.4 Aceitação de rainhas de outras colônias por uma colônia do campo

Foram oferecidas 4 rainhas de colônias distintas, pequenas (150 ml de massa fúngica, aproximadamente), a uma colônia do campo. Esta colônia, localizada no campus da UFV, apresentava dois olheiros e era possível observar intensa atividade forrageadora das operárias. As rainhas eram retiradas de sua colônia, um dia antes do experimento, marcadas com tinta (Testors ©) no gáster e retornadas, após 15 minutos, para sua colônia. No outro dia, cada rainha era retirada novamente da sua colônia e oferecida à colônia do campo. Para tanto, ela era colocada na entrada de um dos olheiros e observava-se o seu comportamento. A cada dois dias uma rainha, num total de quatro, foi oferecida à mesma colônia do campo.

2.5. Medição da cápsula cefálica das operárias da arena de forrageamento

A fim de se estabelecer a distribuição das frequências das larguras das cápsulas cefálicas das operárias presentes na área de forrageamento, realizou-se o seguinte procedimento: uma placa de Petri de 4 cm de diâmetro foi colocada na área

de forrageamento da colônia e as operárias que entraram na placa, no período de 1 minuto, foram coletadas, conservadas em álcool e, posteriormente, mediu-se a largura da cápsula cefálica, em ocular micrométrica.

3 - Resultados e Discussão

3.1. Aceitação das Rainhas da Própria Colônia (RPC)

O tempo médio para que as rainhas de *Ac. subterraneus molestans* saíssem ou fossem retiradas do vidro, após o oferecimento, foi de $5,43 \pm 4,67$ minutos. Em apenas 3 das 15 repetições, as rainhas foram retiradas do vidro por uma operária (C2: 2 vezes; C5: 1 vez). Nas outras vezes, as rainhas saíram do vidro.

O padrão de resposta das operárias foi semelhante em todas as colônias estudadas. Várias operárias se aglomeravam em torno do vidro onde se encontrava a rainha. Outras entravam no seu interior e realizavam contato antenal com a mesma, sem nunca exibir qualquer comportamento agressivo. O tempo médio de aceitação foi de $13,85 \pm 6,83$ minutos. Considerou-se aceitação a entrada da rainha no ninho. Nenhuma rainha da própria colônia foi rejeitada nas três vezes em que cada uma delas foi oferecida, o que era esperado. Frequentemente, a própria rainha entrava na colônia (9 vezes). Outras vezes, ela era carregada para o interior do ninho (6 vezes). Antes de ser carregada, ela sempre dobrava as pernas e antenas, permanecendo imóvel. Segundo Wilson (1971), a forma de se transportar companheiras de ninho é característica de cada subfamília; tanto o comportamento da operária transportadora quanto o da transportada. A forma de transporte das rainhas de *Ac. subterraneus molestans* ao interior do ninho foi semelhante a caracterizada para operárias da subfamília Myrmicinae ao serem transportadas para o ninho (Figura 1).

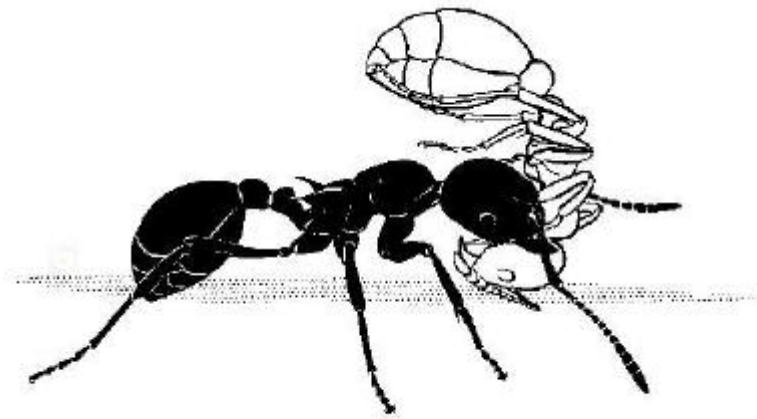


Figura 1 - Transporte de adultos de *Myrmica rubra* na postura mais frequentemente vista na subfamília Myrmicinae. Extraído de Wilson (1971) p 263.

3.2. Aceitação de Rainhas de Outras Colônias (ROC)

O tempo médio para que uma rainha de outra colônia saísse do vidro no qual ela era oferecida ($2,77 \pm 2,00$ min) foi menor do que o tempo gasto pela rainha da própria colônia ($5,43 \pm 4,67$ min), teste t, 5% de probabilidade. Das 13 rainhas de outras colônias que foram aceitas 7 entraram e 6 foram carregadas para o interior da colônia. Este padrão de comportamento não diferiu do padrão apresentado pelas rainhas da própria colônia, as quais entraram no ninho 9 vezes e foram carregadas 6 vezes ($\chi^2=0,771$; gl=1; p=0,05).

Quando transportada para o interior do ninho, a rainha assumia a mesma posição da rainha da própria colônia antes de ser carregada. Ela dobrava as antenas e pernas, como se fingisse de morta, nunca sendo transportada se não estivesse nesta posição. A tarefa de transporte era sempre executada por apenas uma operária de tamanho médio (~1,4 mm de largura de cápsula cefálica em média).

De 15 rainhas de outras colônias oferecidas, 13 foram aceitas, isto é, foram transportadas ou penetraram na colônia. Duas foram rejeitadas (C1, C4), tendo sido atacadas por várias operárias logo na saída do vidro. O tempo médio gasto para que uma rainha de outra colônia entrasse no ninho foi de $8,58 \pm 5,24$ min (Figura 2). Este tempo foi significativamente menor do que aquele gasto pela rainha da própria colônia ($t=2,21$; $p=0,036$). A retirada da rainha da própria colônia para oferecimento posterior pode ter provocado uma perturbação social que fez com que a rainha gastasse mais tempo para retornar ao ninho. Quando foram oferecidas rainhas de outras colônias, a colônia testada possuía pelo menos uma rainha em seu interior. Della Lucia *et al.* (2003) observaram uma forte tendência de disrupção de uma colônia de *A. sexdens rubropilosa* na ausência de sua rainha.

O Quadro 1 resume as observações referentes ao oferecimento de rainhas de outras colônias (ROC). Ocorreu rejeição após aceitação inicial em quatro situações e o tempo de rejeição foi de 5 minutos, 14 horas, 16 horas e até de 96 horas, respectivamente. A rejeição ocorreu tanto para a 1ª, 2ª ou 3ª rainha sucessivamente oferecida. O fato de uma colônia rejeitar uma rainha não implicou na rejeição de futuras rainhas oferecidas. A colônia C1 rejeitou ou expulsou todas as rainhas de outras colônias que foram oferecidas. Desta forma, ela permaneceu monogínica, com a sua rainha original. Estudos genéticos podem ajudar a elucidar a dinâmica de adoção rainhas. Pequenas mudanças genéticas podem resultar em grandes mudanças na organização social da colônia. Krieger & Ross (2002) foram os primeiros a demonstrarem que uma única diferença alélica no locus Gp-9 determina o número de rainhas em colônias de *Solenopsis invicta*. O Gp-9 está envolvido na produção de uma proteína relacionada à feromônios de reconhecimento dos membros da colônia.

A colônia C1 pode apresentar variações genéticas que implicaram na não-aceitação de nenhuma outra rainha.

Quadro 1- Comportamento das colônias de *Ac. subterraneus molestans* frente às rainhas de outras colônias (ROC) que foram oferecidas.

Colônia	1ª ROC oferecida	2ª ROC oferecida	3ª ROC oferecida
C1	Aceitou ¹	Aceitou ²	Não aceitou
C2	Aceitou	Aceitou ³	Aceitou
C3	Aceitou	Aceitou	Aceitou ⁴
C4	Aceitou	Aceitou	Não aceitou
C5	Aceitou	Aceitou	Aceitou

1 Expulsão da rainha após 16 horas da aceitação inicial. **2** Expulsão da rainha 5 minutos após. **3** Expulsão e mutilação 96 horas após. **4** Expulsão 14 horas após.

Quando se verificava rejeição inicial da rainha, ou se pôde notar a expulsão posterior à aceitação, constatou-se que eram operárias menores (0,98 mm de cápsula cefálica em média) quem, principalmente, executavam este ato. Tanto na rejeição, quanto na expulsão, esse grupo de operárias aglomerava-se em torno da rainha e várias delas mordiscavam-lhe as antenas e pernas. Analisando-se esse grupo de operárias constatou-se que elas possuíam cápsula cefálica significativamente menor (teste de Mann-Whitney U; 5% probabilidade) do que a média das operárias da arena de forrageamento (Quadro 2).

Quadro 2 –. Largura média da cápsula cefálica de operárias de *Ac. subterraneus molestans* que exibiram comportamento agressivo com as rainhas introduzidas, comparadas com as demais operárias da área de forrageamento. Entre parênteses está o número de operárias observadas.

Colônia	Operárias agressoras	Operárias da arena	p
C1	0,94 ± 0,182 mm (30)	1,50 ± 0,241 mm (16)	p<0,0001*
C3	0,99 ± 0,354 mm (64)	1,88 ± 0,366 mm (17)	p<0,0001*
C4	1,03 ± 0,038 mm (31)	1,32 ± 0,122 mm (28)	p< 0,001*

* Diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney U, a 5% de probabilidade.

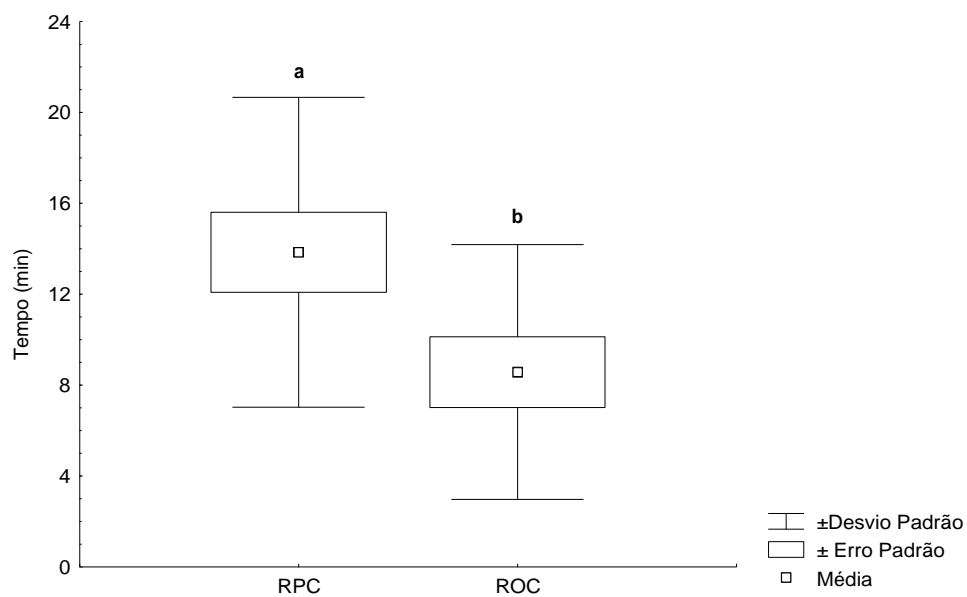


Figura 2 – Tempo médio em minutos para ocorrência de aceitação de rainhas da própria colônia (RPC) e rainhas de outras colônias (ROC). As médias são estatisticamente diferentes pelo teste t, a 5% de probabilidade.

Não houve diferença entre as médias das cápsulas cefálicas das operárias que agrediam a rainha, das três colônias analisadas (ANOVA; $F(2,122)=0,74$; $p=0,478$) (Figura 3).

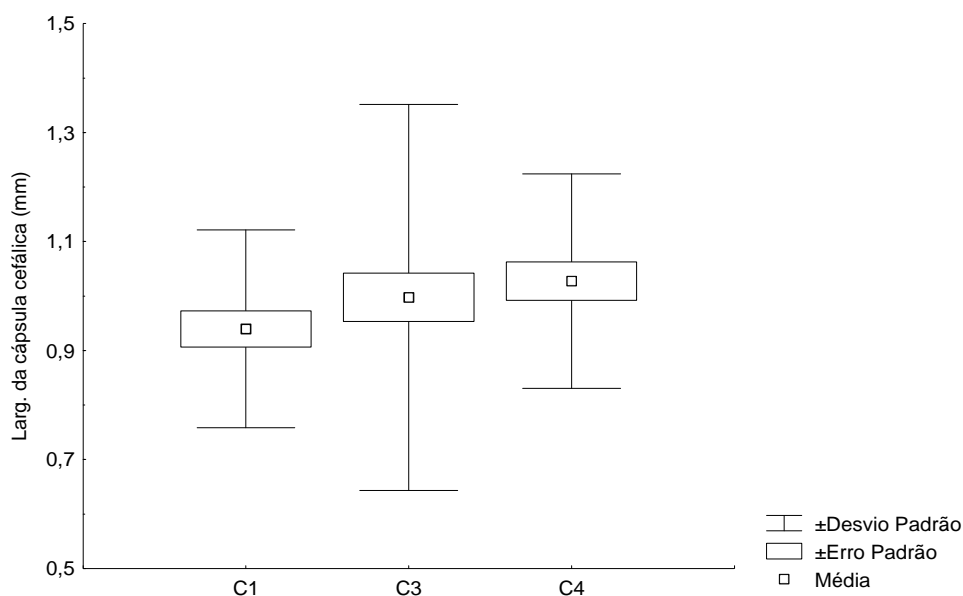


Figura 3 - Largura média em mm da cápsula cefálica de operárias de *Ac. subterraneus molestans* que agrediram rainhas de outras colônias. A média não difere entre as operárias das 3 colônias (ANOVA; $F(2,122)=0,74$; $p=0,478$).

Todas as rainhas de outras colônias realizaram oviposição num período de 72 horas de avaliação, mesmo aquelas que não foram aceitas. A manutenção do estado de poliginia artificial dessas colônias, avaliada após três meses da aceitação das rainhas, indicou que todas as rainhas de outras colônias estavam presentes e efetuaram a oviposição, superando a taxa de postura da rainha da própria colônia. Isto mostra que a poliginia artificial não foi uma condição temporária e as rainhas adotadas podem contribuir para a produção de operárias na colônia (Quadro 3).

Quadro 3 – Número de ovos colocados pelas rainhas da própria colônia (RPC) e por rainhas de outras colônias (ROC) de *Ac. subterraneus molestans* num intervalo de 72 horas. Entre parênteses está a soma das posturas de ROCs em cada colônia.

Colônias	Nº de ovos (RPC)	Nº de ovos (ROC) ¹
C2 (2 rainhas)	131	144 / 94 (238)
C3 (2 rainhas)	0	31 / 8 (39)
C4 (2 rainhas)	18	351 / 65 (416)
C5 (3 rainhas)	22	91 / 44 / 10 (145)

1 – As barras separam as posturas de cada rainha na associação, sendo que a soma das posturas encontra-se entre parênteses.

Houve uma correlação positiva entre a massa corporal das rainhas e o número de ovos colocados por elas nas colônias artificialmente poligínicas (Figura 4). Dominância e fertilidade são normalmente correlacionadas (Heinze 1993). Maior massa corporal pode, portanto, implicar em maior postura e, por conseqüência, a fêmea mais fértil garante um número maior de descendentes. No entanto, esta vantagem pode ser aparente. Estudos conduzidos com *Solenopsis invicta* mostraram que, em colônias fundadas em pleometrose, as rainhas que realizam maior investimento reprodutivo no estágio inicial da colônia perdem mais peso e são, por isto, mais prováveis de serem eliminadas posteriormente (Bernasconi & Keller 1998). A isto, acrescenta-se o fato de que, nesta espécie, as operárias não favorecem a sua própria mãe no momento da eliminação (Balas & Adams 1996, Bernasconi & Keller 1996).

Polimorfismo de operárias e especialização comportamental caracterizam sociedades complexas (Anderson & McShea 2001). Constatou-se, neste experimento, que um grupo de operárias menores conseguiu discriminar mais eficientemente a

rainha oferecida de outra colônia. As operárias menores se uniam em grande número, o suficiente para perturbar e provocar a saída da rainha da colônia, mas não conseguiam mutilá-la facilmente. Essas desempenham, principalmente, a tarefa de cuidar da rainha e dos ovos, além de manter a limpeza do jardim de fungo. Este contato maior com a rainha poderia conferir a esse grupo de operárias maior capacidade de discriminar rainhas intrusas. Viana (1996) constatou que as operárias mínimas (jardineiras, babás) de *Ac. subterraneus subterraneus* são mais eficientes do que as forrageadoras em discriminar a prole estranha.

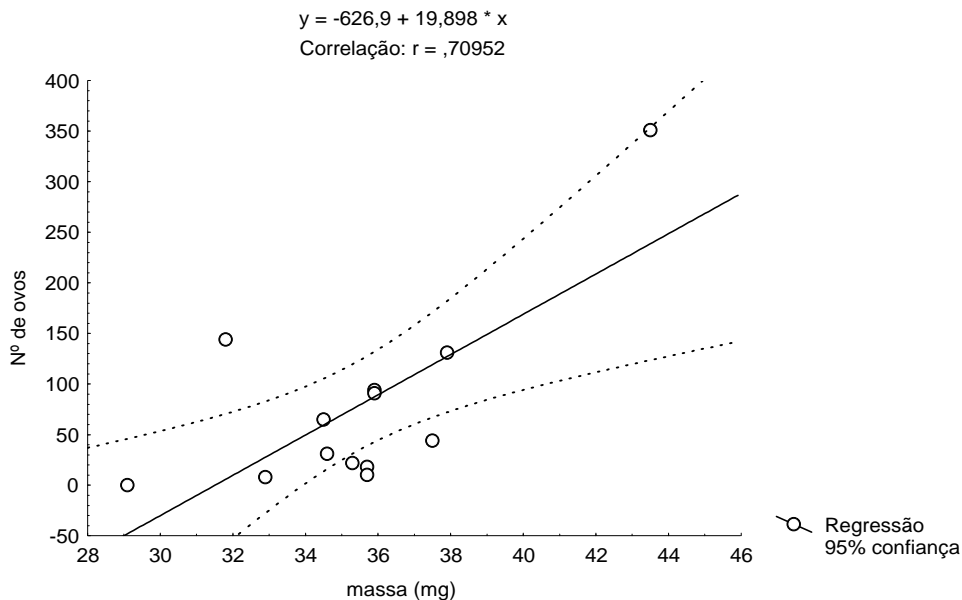


Figura 4 - Relação entre a postura (y) realizada num intervalo de 72 horas e a massa das rainhas (x) que permaneceram em associação 3 meses após a adoção (n = 13 rainhas).

3.3. Aceitação de cabeça, tórax e gáster de Rainhas de Outras Colônias

A cabeça foi mais freqüentemente levada para o interior do ninho (13 vezes) do que não-aceita (2 vezes). Já o tórax e gáster tiveram resultados semelhantes. Para estas partes, não se pode dizer que o comportamento de aceitação foi superior ao de não-aceitação (χ^2 ; 5% de probabilidade) (Figura 5). Os tempos de entrada das três partes no ninho não diferiram estatisticamente entre si (ANOVA; $F(2,28)=0,836$; $p=0,444$) (Figura 6). As cabeças foram mais facilmente reconhecidas e transportadas para o interior do ninho do que as outras partes. O fato das operárias de *Ac. subterraneus molestans* não discriminarem a sua própria rainha sugere que as substâncias responsáveis pelo reconhecimento podem não ser tão distintas entre as rainhas de diferentes colônias. Isto condiz com o trabalho de Hernández *et al.* (2002). Estes autores mostraram que, na formiga cortadeira *Atta laevigata*, a principal fonte de sinais de reconhecimento de companheiras de ninho está presente na cabeça. Secreções da glândula mandibular são responsáveis por este reconhecimento e são dispersas por toda a cutícula.

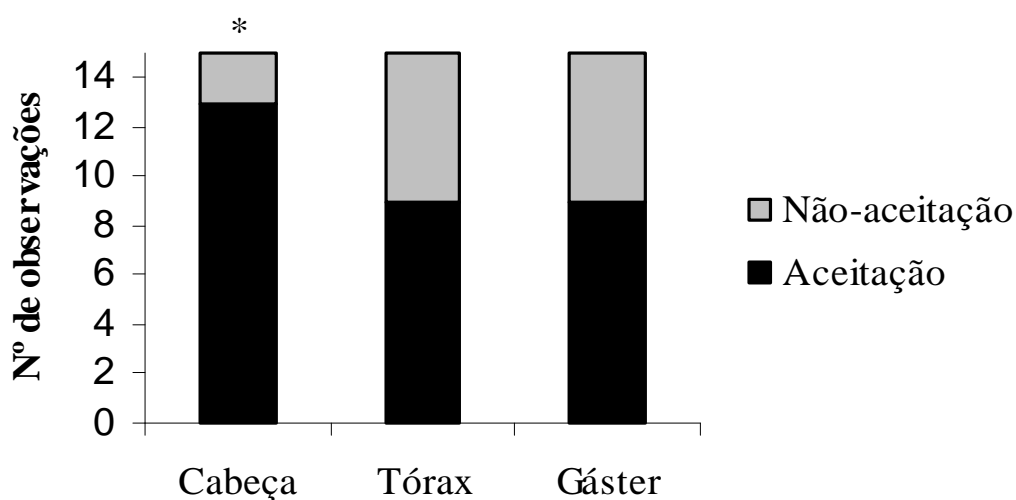


Figura 5 - Frequência de aceitação e não-aceitação de cabeça, tórax e gáster pelas colônias E1, E2 e E3. A frequência de aceitação e não-aceitação de cabeça difere estatisticamente pelo teste do χ^2 ; 5% de probabilidade.

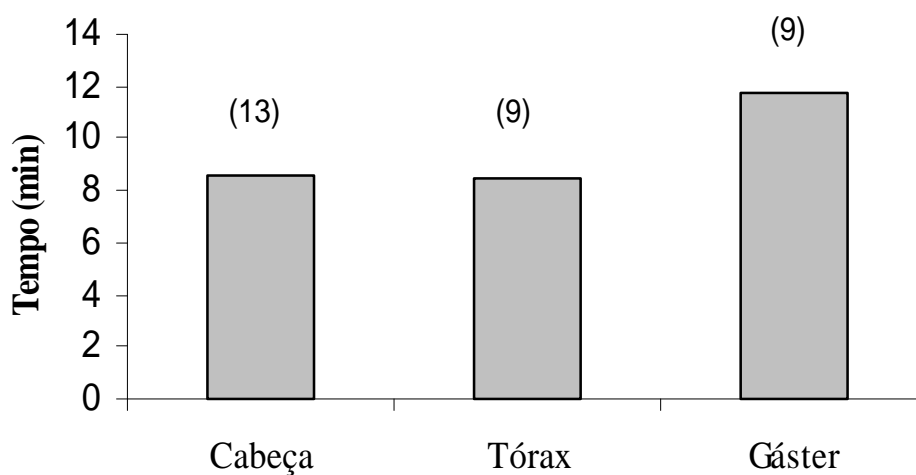


Figura 6 - Tempo médio de aceitação, em minutos, de cabeça, tórax e gáster pelas colônias E1, E2 e E3. Entre parênteses estão os números de observações. O tempo não diferiu significativamente entre as três partes (ANOVA; $F(2,28)=0,837$; $p=0,444$).

3.4. Aceitação de Rainhas de Outras Colônias por uma colônia do campo

As quatro rainhas oferecidas à colônia do campo entraram no olheiro em menos de 1 minuto. Dez dias após o oferecimento da última rainha, o formigueiro foi escavado e foram encontradas duas das 4 rainhas oferecidas, além de duas da própria colônia. Talvez as duas rainhas não encontradas não tenham sido aceitas, ou não foram encontradas devido às dificuldades de escavação da colônia, cujas painelas localizavam-se entre as rachaduras do terreno. As duas rainhas aceitas foram encontradas no meio do jardim de fungo e recebiam cuidado das operárias. Isto reforça a idéia de que a adoção de rainhas fertilizadas pode acontecer no campo. Nos 10 primeiros dias do mês de novembro de 2002 foi possível observar rainhas de *Ac. subterraneus molestans* à procura de local de nidificação. O número de indivíduos observados não era tão grande quanto o encontrado após o vôo nupcial de espécies do gênero *Atta*. Em Viçosa, foram escavados 30 ninhos recém-fundados pelas rainhas de *Acromyrmex*, num sítio onde tem sido bastante freqüente a ocorrência de ninhos poligínicos, e não se observou caso de ajuntamento de rainhas em nenhum deles. Rissing *et al.* (1986) encontraram 56% de freqüência de pleometrose em 64 ninhos de *Ac. versicolor*. Pressões ecológicas distintas podem atuar determinando o tipo principal de fundação, haplometrose ou pleometrose. A espécie *Ac. versicolor* ocorre em regiões do deserto do Arizona, Estados Unidos, onde a sombra dos poucos arbustos existentes representa um recurso bastante escasso: sítio de nidificação. Nesta situação, seria uma vantagem o ajuntamento de rainhas. O fato de não se ter encontrado caso de fundação pleométrica em *Ac. subterraneus molestans* não descarta a sua ocorrência, já que a amostragem de ninhos escavados foi pequena, mas dá indícios de que ela não é um fenômeno tão comum na área estudada. Com os

experimentos de laboratório e observações de campo, a adoção de rainhas por colônias estabelecidas de *Ac. subterraneus molestans* se torna um mecanismo provável que explica a existência de colônias com múltiplas rainhas nesta espécie. A utilização de técnicas que permitam estimar a idade das rainhas em colônias poligínicas poderá corroborar a hipótese de que o fenômeno de adoção de rainhas em *Ac. subterraneus molestans* ocorre na natureza.

Este trabalho mostrou que colônias de *Ac. subterraneus molestans* adotam rainhas de outras colônias e estas podem permanecer realizando atividade de oviposição e conseqüentemente contribuem para o maior crescimento da colônia.

CAPÍTULO 2

Habilidade discriminatória de operárias de colônias monogínicas e poligínicas de *Acromyrmex subterraneus molestans*

Resumo

Ensaio comportamentais, em que se procurou avaliar a capacidade discriminatória de operárias de *Acromyrmex subterraneus molestans* oriundas de colônias monogínicas e poligínicas, mostraram que essa subespécie não consegue discriminar entre não-companheiras e companheiras de ninho. Operárias dessas mesmas colônias foram, no entanto, capazes de discriminar operárias da subespécie *Ac. subterraneus subterraneus* e, nesse caso, não se verificou diferenças na resposta de colônias monogínicas e poligínicas. Semelhanças e diferenças no perfil químico das subespécies estudadas, explicam a ausência ou não de agressividade entre operárias. O perfil químico de colônias da mesma subespécie foram muito semelhantes, e distinto entre as subespécies. O número de rainhas não afetou a composição química cuticular das operárias e nem o comportamento das mesmas.

1 - Introdução

A capacidade de reconhecer companheiras de ninho e distingui-las de não-companheiras está baseada no fato de que cada colônia tem sua própria “assinatura química”, uma mistura de compostos químicos específica e característica de cada colônia (Hölldobler e Michener 1980). O reconhecimento de companheiras de ninho nas formigas é definido pela habilidade das operárias discriminarem membros da sua própria colônia de outros co-específicos (Vander Meer *et al.* 1989). Diferentes métodos de reconhecimento, baseados na origem da colônia (odores do ambiente e feromônios produzidos por cada indivíduo e pela rainha), são encontrados nas sociedades das formigas (Whitehouse & Jaffé 1995). Os hidrocarbonetos compreendem uma porção significativa dos lipídios cuticulares que previnem a dessecação do inseto e são importantes no processo de comunicação química (Howard e Blomquist 1982). É geralmente aceito que, entre os Formicidae, os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) desempenham um importante papel no reconhecimento de companheiras de ninho (Lahav *et al.* 1999) A formiga *Pogonomyrmex barbatus* pode perceber diferenças na composição de HCs no reconhecimento de companheiras de ninho (Wagner *et al.* 2000). Adicionalmente, Greene & Gordon (2003) mostraram que operárias desta espécie utilizam-se deles para informar uma companheira de ninho a tarefa a ser executada. A produção individual de HCs é dinâmica e polimórfica (Vander Meer *et al.* 1989), assim é essencial para as companheiras de ninho que elas homogeneízem seus HCs frequentemente a fim de se criar um perfil uniforme colônia-específico. Em *Camponotus fellah* o isolamento social de operárias induziu uma divergência no

perfil de hidrocarbonetos individuais (Boulay *et al.* 2000). Estes autores constataram que as operárias devem realizar, continuamente, uma troca entre si de seus hidrocarbonetos cuticulares, via trofalaxia, obtendo-se assim o odor Gestalt. Segundo o modelo Gestalt (Crozier & Dix 1979) o odor de colônia é formado pela mistura de odores individuais de rainhas e operárias mais aqueles odores provenientes do ambiente.

É razoável especular que é um foco para a seleção parental o favorecimento da evolução de sinais de orientação colônia-específicos que induzam os indivíduos a levarem os recursos que eles forragearam para o seu próprio ninho. Realmente, fidelidade ao ninho e exclusividade territorial são comportamentos reforçados, às vezes, por marcadores químicos (Hölldobler & Michener 1980). De outro lado, um comportamento menos agressivo e a ausência de comportamento territorial poderiam levar a uma alta densidade populacional. Isto porque a energia que seria alocada em competição por recursos e defesa podem ser investidos na reprodução, em maior produção de prole e na manutenção da colônia. A ausência de agressão intraespecífica é considerada um dos fatores-chave na expansão da distribuição da formiga exótica *Linepithema humile* nos Estados Unidos e Europa Meridional (Holway *et al.* 1998, Girauld *et al.* 2002).

Provost *et al.* (1994) conduziram estudos em laboratório com a formiga *Messor barbarus* e concluíram que operárias de colônias monogínicas foram mais eficientes na discriminação de operárias intrusas do que operárias de colônias poligínicas. Starks *et al.* (1998) também encontraram resultados semelhantes com a formiga *Pseudomyrmex pallidus*. A importância da rainha no processo de reconhecimento de operárias varia entre espécies de formigas com estruturas sociais

distintas (Lenoir *et al.* 1999). Dos poucos estudos que têm se ocupado desta questão, dois modelos surgiram. O primeiro, baseado em ensaios comportamentais com *Camponotus floridanus*, sugere que a rainha é a origem principal do odor de colônia (Carlin & Hölldobler 1987). O segundo, baseado em estudos bioquímicos em *Cataglyphis niger*, sugere que a rainha adquire uma porção média de todos os odores da colônia (via lambedura de operárias) e se torna o centro do odor de colônia, em vez de ser a origem dele (Lahav *et al.* 1999).

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas comportamentais de operárias de *Ac. subterraneus molestans* de colônias poligínicas e monogínicas a operárias adultas de outras colônias da mesma subespécie, inferindo daí a importância do número de rainhas no comportamento discriminatório das operárias desta subespécie. Foram efetuados também encontros de operárias de *Ac. subterraneus molestans* com operárias de *Ac. subterraneus subterraneus* para melhor avaliação dos graus de agressividade apresentados pela subespécie estudada. Avaliou-se, ainda, o perfil químico das colônias estudadas, relacionando este ao comportamento discriminatório apresentado. A hipótese testada foi: operárias oriundas de colônias poligínicas de *Ac. subterraneus molestans* são menos agressivas contra operárias de outras colônias (da mesma subespécie e de subespécie diferente) do que operárias oriundas de colônias monogínicas.

2 – Material e Métodos

2.1 Coleta das colônias e manutenção em laboratório

Os experimentos foram conduzidos com operárias de quatro colônias de *Ac. subterraneus molestans* e duas de *Ac. subterraneus subterraneus* que foram coletadas em Viçosa, Minas Gerais, 4 meses antes do experimento. Duas colônias de *Ac. subterraneus molestans* eram monogínicas (M7 e M8) e duas poligínicas – P1 e P3 – com 6 e 2 rainhas respectivamente. As outras duas colônias da subespécie *Ac. subterraneus subterraneus* eram monogínicas (SS1 e SS2). Estas colônias foram estabelecidas em laboratório e eram compostas de um número superior a 13000 indivíduos e de um jardim de fungo de 1,6 litros. Elas foram criadas em ninhos artificiais, colocadas em vidros de 1,7 litros, de acordo com metodologia descrita por Della Lucia *et al.* (1993). A umidade e a temperatura na sala de criação eram de $75 \pm 5\%$, 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 10 horas de luz seguido de 14 horas de escuro. Cada colônia era mantida dentro de uma bandeja plástica onde as formigas tinham acesso à área de forrageamento. Folhas (*Ligustrum* e *Acalypha*) e pétalas de flores (*Rosa* e *Tecoma*) foram supridas diariamente, igualmente para todas as colônias. O acondicionamento das colônias em laboratório permitiu aferir a importância da rainha no processo de discriminação das operárias, já que o efeito de variações ambientais foi isolado.

2.2 Ensaio comportamentais

*Habilidade discriminatória entre operárias adultas de **Ac. subterraneus molestans**, oriundas de colônias poligínicas e monogínicas mantidas em laboratório*

Com o propósito de estimar o grau de discriminação das operárias de *Ac. subterraneus molestans*, foram efetuados testes de agressividade. O bioensaio compreendeu encontros entre uma operária intrusa – aquela que era oferecida – e três operárias não-companheiras de ninho- as quais tinham seu grau de agressividade avaliado. A operária intrusa era marcada com um ponto de tinta colorida (Testors ©) no gáster e avaliava-se a resposta das operárias não companheiras frente a esta formiga. Nos encontros controles, as quatro formigas eram companheiras de ninho (uma marcada) e estes serviam para a certificação de que a marcação da operária com tinta não afetava o comportamento das outras formigas. Operárias de uma colônia pequena de *Ac. subterraneus molestans* (Pq), que possuía cerca de 500 ml de fungo, coletada 48 horas antes no campo, também foram oferecidas às operárias de mesma subespécie mantidas em laboratório a fim de avaliar se a manutenção em laboratório afetava o comportamento das operárias.

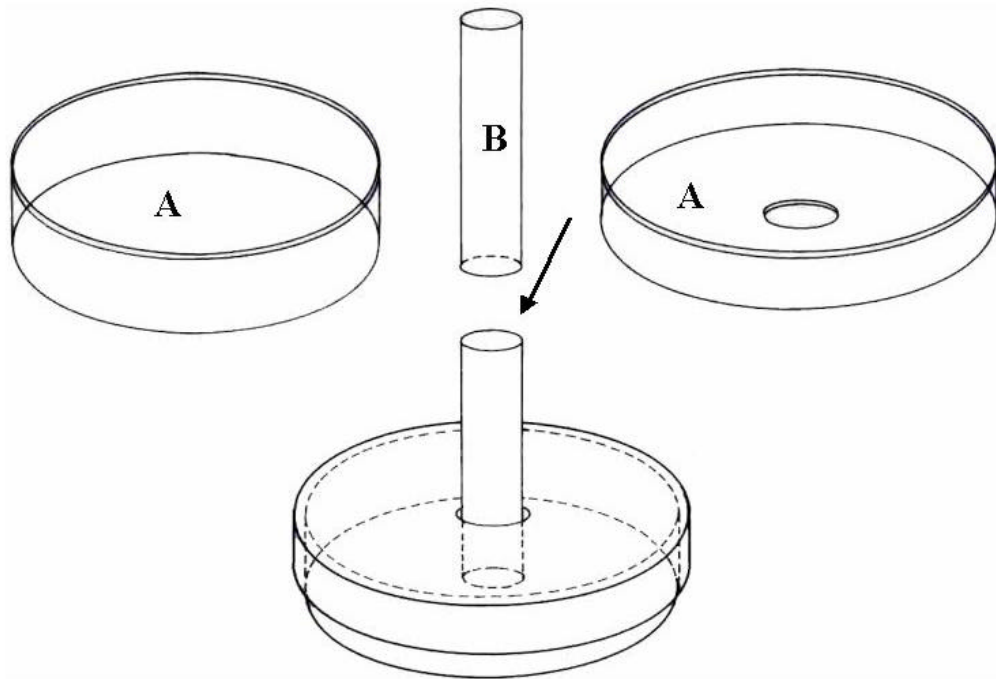


Figura 1 – Desenho esquemático da arena artificial montada a partir de uma placa de Petri de 90mm de diâmetro (A) e um tubo de vidro de 7 cm de altura (B). A seta indica onde as operárias eram introduzidas. O bioensaio tinha início com o levantamento do tubo de vidro e liberação da operária marcada, abaixando-o em seguida.

Os encontros foram conduzidos por 3 minutos em uma placa de Petri (90 mm de diâmetro). Antes de cada encontro, permitiu-se que a formiga marcada aclimatasse isoladamente em um tubo de vidro inserido no centro da placa de Petri. Cada encontro tinha início com a remoção do tubo de vidro (Figura 1), sendo em seguida registrada a reação das formigas contra a formiga marcada (companheira ou não-companheira de ninho), de acordo com o seguinte índice de agressão (Hefetz *et al.* 1996; Errard & Hefetz 1997):

$$AI = \frac{\sum_{i=1}^n AI_i * t_i}{T}$$

Em que AI_i representa o índice de agressão, t_i a duração de cada ato e T o tempo de interação total definido como a soma de todos os tempos nos quais as formigas interagiram. AI_i é um fator aplicado a cada ato de acordo com o grau de agressividade: nenhuma interação agressiva (contatos antenais e lambadura) marcava-se $AI_i = 0$; abertura das mandíbulas e flexão do abdômen marcou-se $AI_i = 1$; mordida marcou-se $AI_i = 2$; luta e mutilação recíproca receberam $AI_i = 3$. t_i era o tempo de duração de cada ato. O índice AI varia de 0 (nenhuma agressão) a 3 (todas as interações são luta e mutilação recíproca). A frequência e duração de cada componente comportamental foram registradas usando-se o programa de computador ODlog (Macropod Software). Foram avaliados neste experimento os graus de agressividade entre colônias poligínicas (P x P), entre colônias monogínicas (M x M) e entre colônias monogínicas e poligínicas (M x P) da subespécie *Ac. subterraneus molestans*. Avaliou-se, também, o grau de agressividade de operárias de colônias poligínicas e monogínicas dessa subespécie a operárias de uma colônia da mesma subespécie coletadas no campo (Pq) e a operárias de uma outra subespécie (SS). Os graus de agressividade apresentados por cada colônia foram testados com uma análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para amostras com diferentes números de repetição a 5% de probabilidade.

2.2 Análises químicas

A fim de determinar o perfil químico das colônias e, futuramente, identificar os compostos encontrados em cada uma delas, foi preparado um extrato dos componentes cuticulares de quarenta operárias médias. Estas operárias foram colocadas em 3 ml de hexano por 1 hora a 50 °C, com leve agitação a cada cinco minutos. Um mililitro de cada extrato foi seco com N₂. O resíduo foi re-dissolvido em 50 µl de clorofórmio. As amostras foram analisadas com um aparelho de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (Shimadzu GCMS-QP5050/GC17A). Alíquotas de 2 µl foram injetadas (modo split, taxa 5:1) em uma coluna de sílica DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura do filme), sendo o hélio o gás de arraste. A temperatura foi de 170°C durante a injeção e aumentada até 300°C a uma taxa de 3,25°C/min, seguido por uma temperatura constante de 300°C por 3 minutos. Uma mistura padrão contendo vários alcanos saturados lineares (C18, C19, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C34, C36), adquiridos da Sigma-Aldrich, foi analisada nas mesmas condições, com a exceção de que 1 µl dessa amostra (~10mg/ml em clorofórmio) foi injetada no modo split a uma taxa de 50:1. Este procedimento objetivou auxiliar na identificação dos compostos cuticulares. A metodologia de extração e análise dos componentes químicos cuticulares foi adaptada de Wagner *et al.* (1998).

2.3 Análise dos dados

A abundância relativa de cada composto foi estimada como a área proporcional a cada pico no cromatograma. Todos os compostos que constituíram pelo menos 1% da abundância total foram incluídos nas análises estatísticas. Foi usado então uma análise hierárquica de cluster para separação das colônias (Método de Ward, coeficiente r-Pearson, Statistica 5.5). O método de Ward, ou de Variância Mínima, distingue-se dos demais porque se utiliza da análise de variância para avaliar as distâncias entre grupos. Em síntese, este método minimiza a soma de quadrados de quaisquer dois grupos que venham a ser formados a cada iteração do algoritmo. O coeficiente de correlação de Pearson diz o quanto duas variáveis são proporcionais entre si. Ele é dado pela seguinte fórmula:

$$r_{nm} = \frac{\sum_{i=1}^I (x_{in} - \bar{x}_n) \times (x_{im} - \bar{x}_m)}{\sqrt{\sum_{i=1}^I (x_{in} - \bar{x}_n)^2 \sum_{i=1}^I (x_{im} - \bar{x}_m)^2}}$$

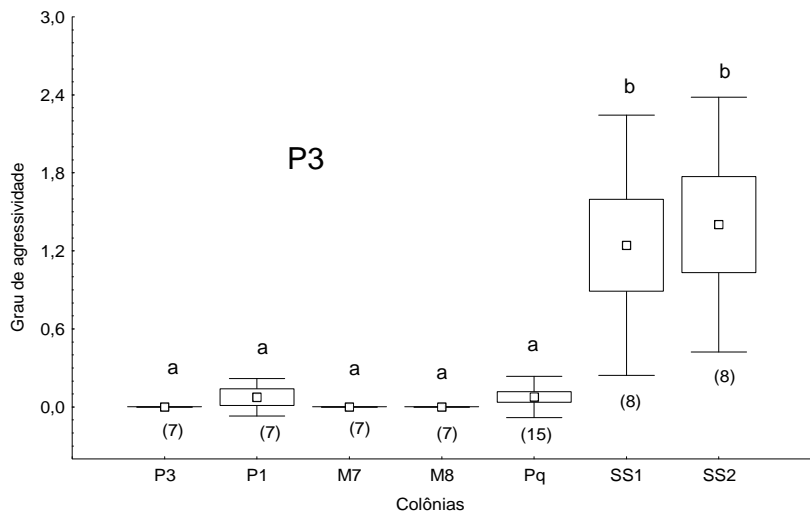
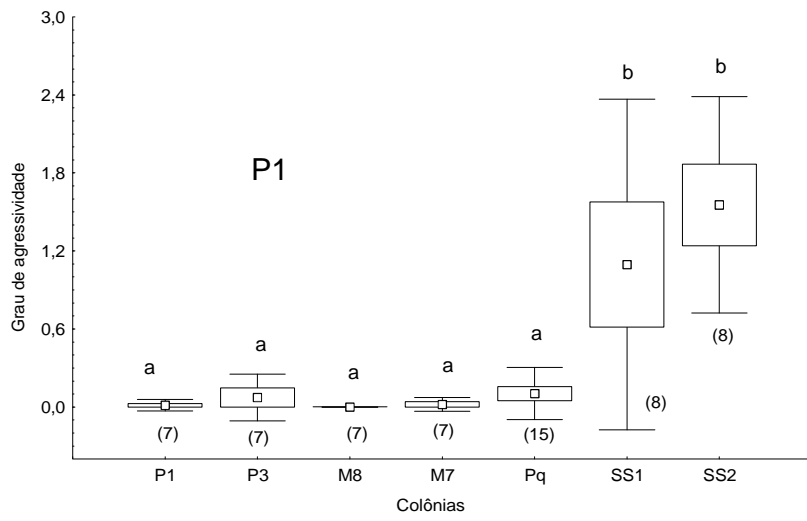
onde n e m são as duas variáveis. O grau de significância das correlações foi testado a 5% de probabilidade.

3 – Resultados e Discussão

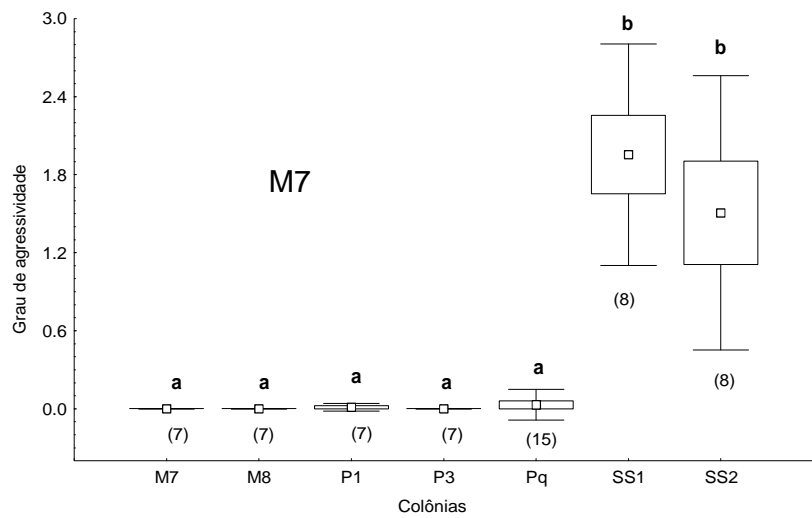
3.1 Habilidade discriminatória de operárias de *Ac. subterraneus molestans*

Nos encontros realizados em placa de Petri, não foi observada nenhuma reação agressiva por parte das operárias de *Ac. subterraneus molestans* contra a operária marcada de mesma subespécie, sendo companheira de ninho ou não. Como o valor do índice de agressividade foi nulo ($AI_i = 0$), não se pode relacionar o grau de agressividade das operárias ao número de rainhas presentes na colônia. Operárias das colônias monogínicas (M7 e M8) não foram agressivas contra co-específicas de outras colônias, o mesmo ocorrendo com as operárias de colônias poligínicas (P1 e P3). Nesses encontros, em toda situação, o único ato observado entre as operárias foi o toque de antenas, que durava menos de um segundo. As operárias moviam-se constantemente pela placa e os encontros e os toques de antenas pareciam casuais. Colônias mantidas em laboratório tendem a ser menos agressivas umas com as outras do que aquelas coletadas recentemente no campo (Obin 1986, Crosland 1989, Tissot *et al.* 2001). O comportamento destas colônias testado frente a operárias de uma colônia pequena, (500 ml de fungo, monogínica, coletada no campo 48 horas antes dos bioensaios) indicou grau de agressividade próximo de zero, não diferindo estatisticamente dos outros encontros entre co-específicos (Figuras 2a a 2d). No entanto, as operárias de colônias monogínicas e poligínicas de *Ac. subterraneus molestans*, mantidas em laboratório, apresentaram comportamento agressivo contra operárias de outra subespécie, *Ac. subterraneus subterraneus*. Na maioria dos encontros realizados houve luta e mutilação recíproca. A média do índice de

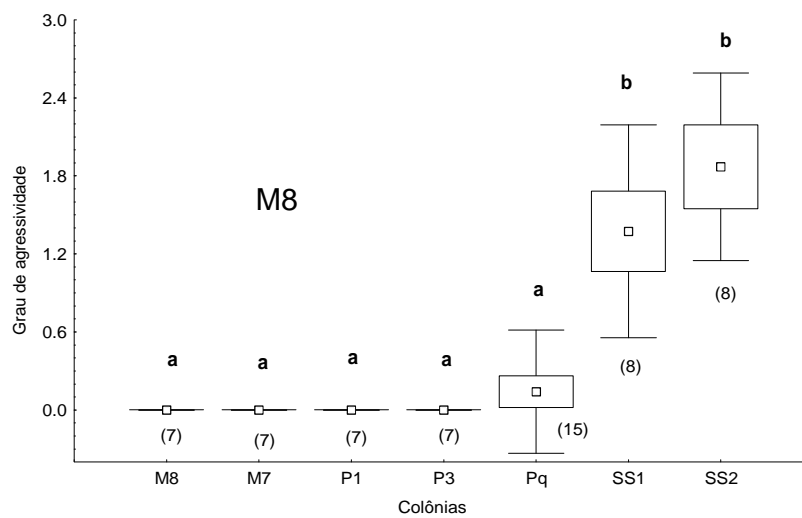
agressividade apresentado pelas colônias de *Ac. subterraneus molestans* foi entre 1 e 2. Nessa situação, em que ocorreu resposta agressiva, o comportamento das quatro colônias não diferiu estatisticamente entre si (ANOVA; $F_{3,60}=0,707$, $p=0,55$), isto é, a média do grau de agressividade contra as colônias SS1 e SS2 foi igual para todas elas (Figura 3).



(continua)



2c



2d

±Desvio Padrão
 ±Erro Padrão
 Média

Figuras 2a a 2d – Grau de agressividade médio das colônias poligínicas (P1/P3) e monogínicas (M7/M8) de *Ac. subterraneus molestans*. Pq se refere ao comportamento dessas colônias frente a operárias de uma colônia pequena coletada no campo 48 horas antes dos bioensaios. SS1 e SS2 se referem ao comportamento frente a operárias de duas colônias monogínicas de outra subespécie. Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey para diferentes valores de N, 5% de significância. Entre parêntese está o número de observações.

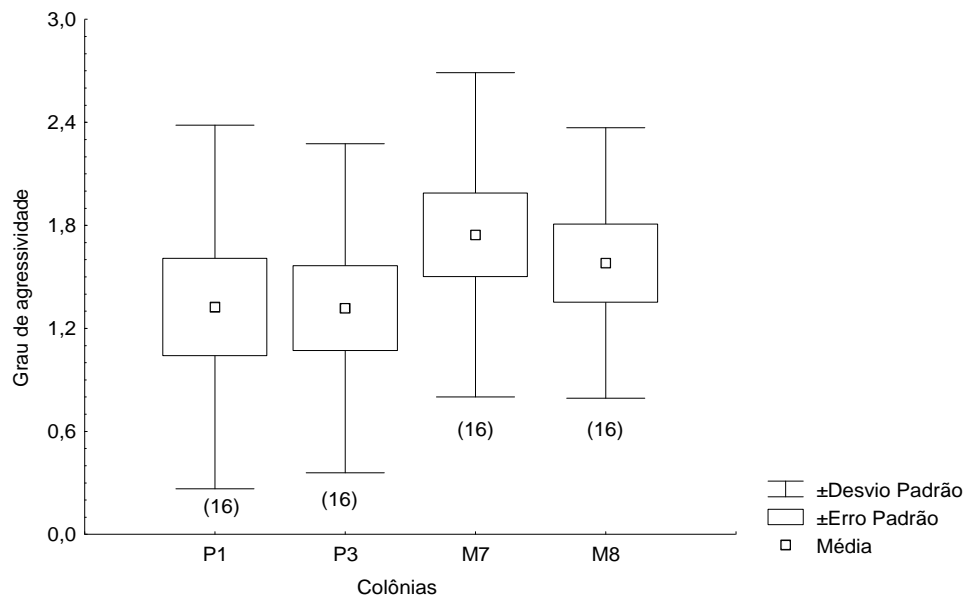


Figura 3 - Grau de agressividade médio das operárias de *Ac. subterraneus molestans* (P1, P3, M7 e M8) frente operárias da subespécie *Ac. subterraneus subterraneus* (SS1 e SS2). As médias não apresentaram diferenças a 5% de significância (ANOVA; $F_{3,60}=0,707$, $p=0,55$).

Durante as lutas ocorridas entre operárias das duas subespécies observou-se, na maioria das vezes, que a operária agredida e a operária agressora liberavam líquido fecal. O contato das operárias com este líquido interrompia a luta temporariamente. Bernasconi *et al.* (2000) investigaram o papel do lançamento de líquido fecal pelas rainhas virgens de *Apis mellifera* durante luta umas com as outras. Segundo estes autores, a função do líquido seria interromper temporariamente a luta, sendo que a rainha que liberava gotículas fecais tinha maiores chances de vencer sem ocorrência de maiores danos. Anteriormente, Bernasconi *et al.* (1999) caracterizaram cinco compostos químicos – orto-aminoacetofenona, ácido decanóico, ácido

dodecanóico, decanoato de octila e decanoato de decila - presentes apenas no líquido fecal de rainhas de *A. mellifera*. Tem sido proposto que o líquido fecal de formigas da tribo Attini contém principalmente enzimas (Martin *et al.* 1975) que podem ser originadas pelo fungo (Boyd & Martin 1975), mas até o que se conhece, nenhum trabalho investigou como os componentes do líquido fecal afetam o comportamento das formigas cortadeiras.

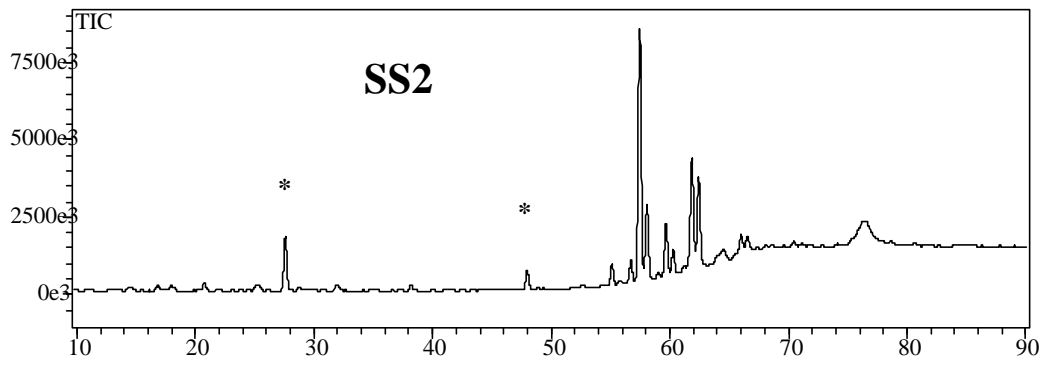
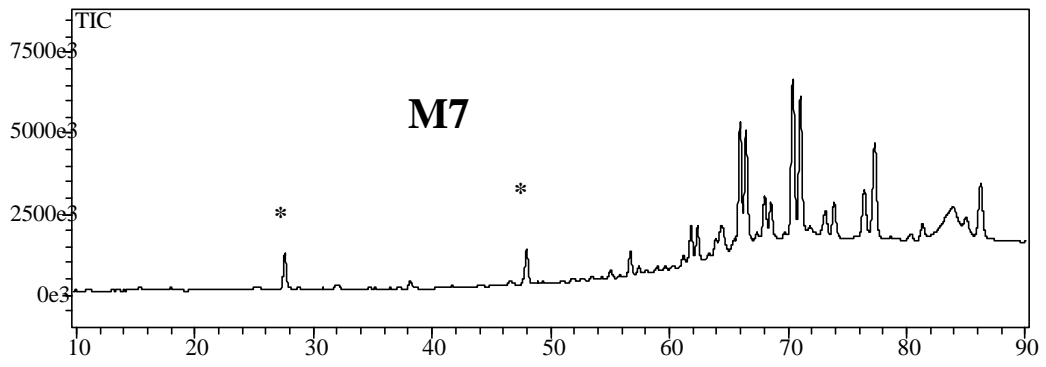
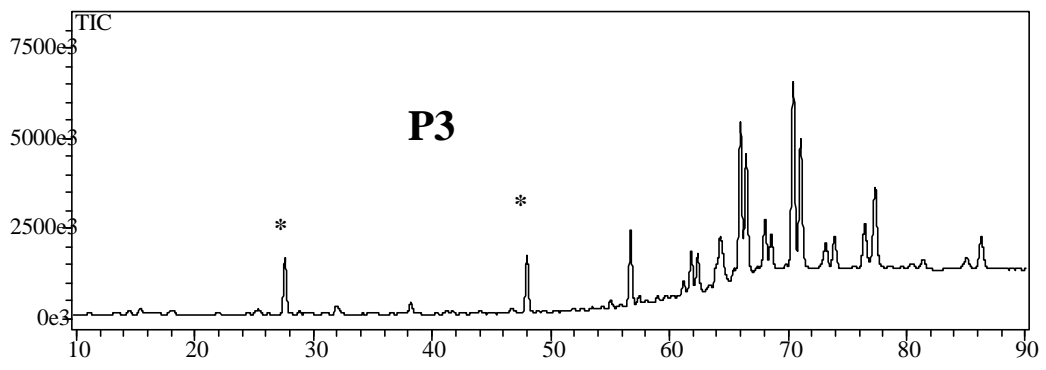
3.1 Análises químicas

Análise dos cromatogramas

Operárias de colônias monogínicas e poligínicas de *Ac. subterraneus molestans* possuem um perfil químico cuticular semelhante, não existindo diferenças qualitativas entre elas, conforme pode se observar nos cromatogramas das colônias monogínicas e poligínicas (Figura 4). Já as colônias da subespécie *Ac. subterraneus subterraneus* mostraram diferenças qualitativas no perfil químico quando comparadas com a primeira subespécie. Com a análise dos tempos de retenção dos padrões de alcanos lineares, pode-se afirmar que, em grande parte, os hidrocarbonetos cuticulares das subespécies aqui estudadas possuem entre 25 e 36 átomos de carbono em sua estrutura, estando estes dados de acordo com os obtidos por Wagner *et al.* (1998) para *Pogonomyrmex barbatus*. A identificação destes hidrocarbonetos ainda prossegue.

A representação esquemática dos agrupamentos obtidos com a Análise Hierárquica de “Cluster” feita com base em 65 picos, listados no Apêndice 1, das 6 colônias estudadas mostra a separação de dois grupos (Figura 5). O primeiro é

formado pelas colônias da subespécie *Ac. subterraneus subterraneus* (SS1 e SS2), sendo o coeficiente de correlação de Pearson significativo a 5% para essas duas colônias. O segundo grupo é formado pelas colônias da subespécie *Ac. subterraneus molestans*, agrupando tanto as colônias monogínicas (M7 e M8) quanto as poligínicas (P1 e P3), encontrando-se um coeficiente de correlação significativo a 5% entre estas colônias. Não houve correlação significativa entre as colônias de diferentes grupos. Esta análise de cluster reflete claramente a proximidade entre os mesmos elementos de diferentes colônias da mesma subespécie e a distância entre as colônias de subespécies distintas.



(continua)

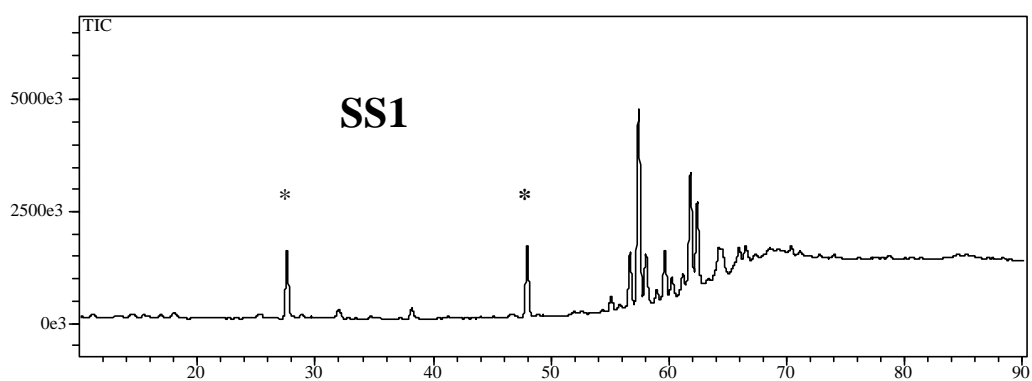
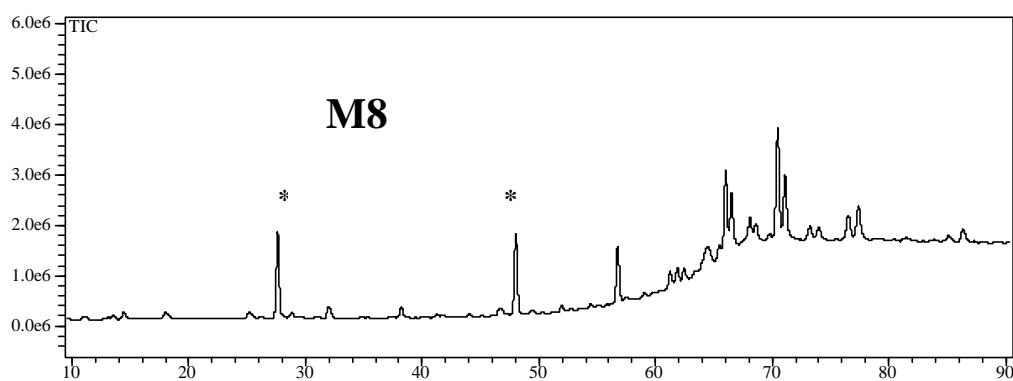
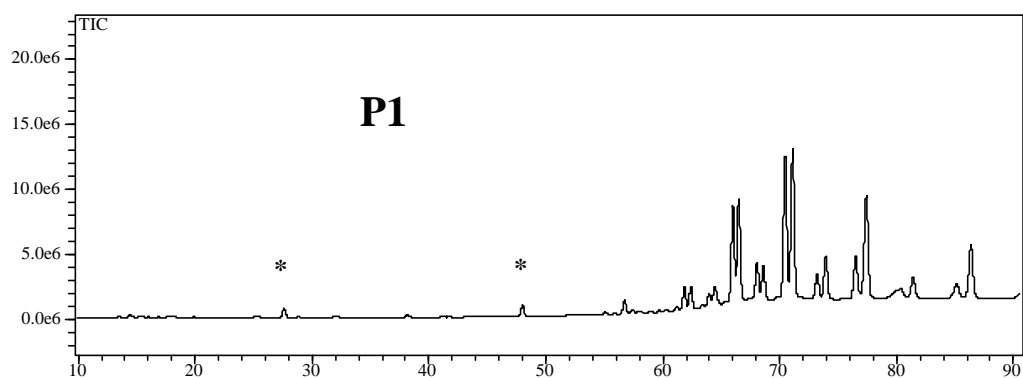


Figura 4 – Cromatogramas do perfil químico cuticular de operárias de *Ac. subterraneus molestans* de colônias poligínicas (P) e de colônias monogínicas (M). SS representam o cromatogramas de colônias da subespécie *Ac. subterraneus subterraneus*. Os asteriscos indicam contaminantes derivados do ácido ftálico.

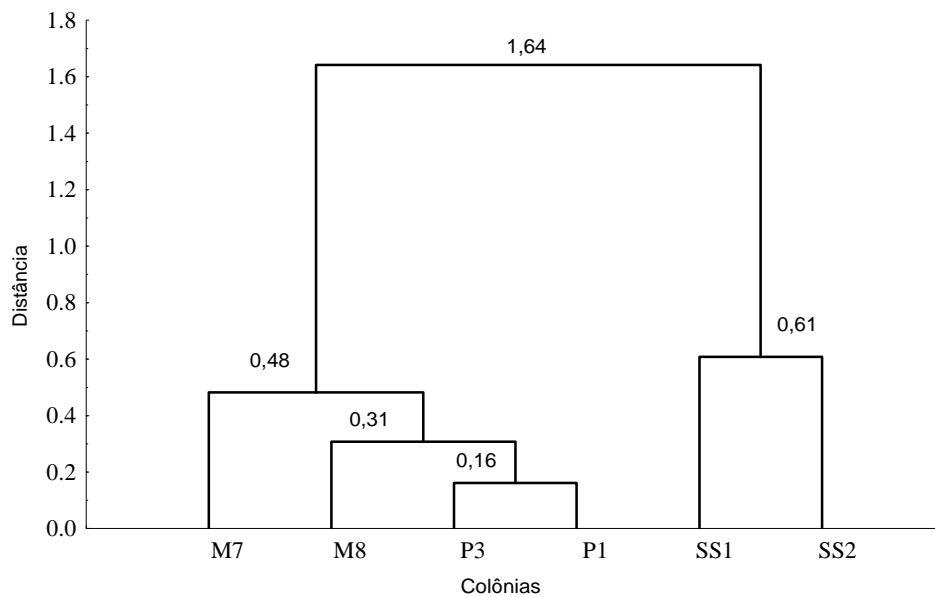


Figura 5 – Análise hierárquica de cluster (Método de Ward, distância de Pearson) conduzida na proporção relativa de 68 picos exibidos nos cromatogramas de extratos cuticulares de operárias de colônias monogínicas (M7 e M8) e poligínicas (P1 e P3) de *Ac. subterraneus molestans* e *Ac. subterraneus subterraneus* (SS1 e SS2). Utilizou-se nessa análise os picos cuja proporção relativa foi maior ou igual a 1%.

Alguns estudos mostraram que operárias de colônias poligínicas exibem menor capacidade discriminatória contra intrusos (Provost *et al.* 1994, Vienne *et al.* 1998, Starks *et al.* (1998). Por exemplo, em *Pseudomyrmex pallidus*, Starks *et al.* (1998) encontraram uma correlação negativa entre o número de rainhas presentes na colônia e o grau de agressividade apresentado pelas operárias. No estudo aqui apresentado, operárias de colônias poligínicas não foram menos agressivas do que aquelas de colônias monogínicas. Jutsum *et al.* (1979) mostraram que fatores ambientais, como a dieta fornecida às colônias, foram mais importantes que fatores endógenos no desencadeamento de resposta agressiva pelas operárias de *Ac. octospinosus*. O fato de se ter fornecido o mesmo tipo de folhas a todas as colônias de *Ac. subterraneus*

molestans explicaria a ausência de agressividade entre elas, mas por elas não exibirem agressividade contra operárias de uma colônia coletada no campo, pode-se dizer que esta subespécie apresenta baixo grau de discriminação contra co-específicos. Além disso, a análise dos hidrocarbonetos cuticulares, cuja produção é geneticamente controlada, mostrou que eles variam pouco entre as colônias. Quando se tomou uma subespécie diferente, verificou-se diferença na composição de hidrocarbonetos com conseqüente reação de agressividade. Colônias de uma mesma região podem apresentar menor variabilidade nos loci que determinam a produção destes hidrocarbonetos, por isso, é possível que colônias oriundas de regiões mais distantes possam apresentar maiores variações nestes hidrocarbonetos. Assim, sugere-se a realização de testes de agressividade com colônias de regiões e tamanhos distintos. Estes talvez forneçam melhor entendimento desse comportamento em *Ac. subterraneus molestans*.

O uso de uma outra subespécie serviu como parâmetro de avaliação do comportamento das operárias de *Ac. subterraneus molestans*. Ainda mostrou que a composição de hidrocarbonetos cuticulares é um caráter que distingue estas duas subespécies que ocorrem em simpatria na região de Viçosa. O principal caráter morfológico usado para separar as três subespécies de *Ac. subterraneus* (as duas aqui estudadas mais *Ac. subterraneus brunneus*) é o espinho mesonotal inferior que, segundo Fowler & Ketelhut (1993), é variável demais. Além da grande semelhança morfológica, as duas subespécies desse trabalho têm mesmo número cromossômico ($2n=38$) (Fadini & Pompolo 1996) e seus espermatozoides parecem não possuir diferenças morfológicas (observação pessoal). Na ausência de outra forma de isolamento, poder-se-ia aventar a hipótese da existência de uma barreira química

separando estas duas subespécies. Duas espécies muito próximas de mariposas, *Trichoplusia ni* e *Autographa californica*, utilizam o mesmo feromônio de atração sexual, mas a concentração deste varia entre as duas espécies, o que garante o isolamento reprodutivo entre elas (Kaae *et al.* 1973). O perfil diferenciado de hidrocarbonetos de *Drosophila mojavensis*, uma mosca que se alimenta de cactos, funciona como um dos mecanismos de isolamento pré-cópula de populações que usam diferentes substratos (Fogleman & Danielson 2001)

Este estudo mostrou que o número de rainhas em colônias de *Ac. subterraneus molestans* não afetou o comportamento discriminatório das operárias. O perfil semelhante de hidrocarbonetos cuticulares dessas colônias seria a causa da ausência de agressividade observada no encontro entre operárias da mesma subespécie, porém de colônias distintas. Quando diante de operárias de outra subespécie, com perfil de hidrocarbonetos cuticulares distinto, as operárias de *Ac. subterraneus molestans* exibiram comportamento agressivo, mas este também não diferiu entre colônias monogínicas e poligínicas.

CAPÍTULO 3

O lixo em colônias monogínicas e poligínicas de *Acromyrmex subterraneus molestans*: perigo para as operárias?

Resumo

Neste capítulo, avaliou-se o impacto do lixo sobre operárias médias de colônias monogínicas e poligínicas de *Ac. subterraneus molestans*, mantidas em placa de Petri com o lixo de sua própria colônia, em duas situações: sem manutenção e com manutenção da umidade interna do sistema. A manutenção da umidade interna das placas aumentou o período de sobrevivência das operárias, permitindo-se um maior número de dias recenseados. O lixo não afetou a sobrevivência de operárias em nenhuma das duas situações - com ou sem controle da umidade – não se observando também sobrevivência diferencial entre as operárias de colônias monogínicas e poligínicas desta subespécie.

1 - Introdução

As formigas da tribo Attini têm uma relação simbiótica obrigatória com fungos basidiomicetos (Weber 1972), muitos deles pertencentes à família Lepiotaceae (Chapela *et al.* 1994; Müller *et al.* 1998), que são a principal fonte de alimento para suas proles (Quinlan & Cherret 1979).

A organização social das formigas garante a elas maior eficiência na exploração dos recursos e proteção contra inimigos (Hölldobler & Wilson 1990). No entanto, a vida social não provê apenas benefícios, mas também implica em custos tais como o aumento na vulnerabilidade a patógenos e parasitas (Keller 1995a). Isto ocorre porque a proximidade física e a taxa de contato aumentam nos grupos, conseqüentemente aumentando as chances de um indivíduo sadio encontrar outro infectado. Como as formigas cortadeiras têm uma relação de mutualismo obrigatório com um fungo simbiote, espera-se que elas sejam afetadas por qualquer parasita que ataque este simbiote. O sucesso desta relação depende da habilidade das formigas em proteger seu fungo cultivado contra microrganismos competitivamente superiores que podem estar presentes no material vegetal que elas adicionam ao jardim e também no lixo da colônia (Currie & Stuart 2001). Assim como nas sociedades humanas, que utilizam medidas sanitárias para evitar a propagação de doenças infecciosas, medidas higiênicas também são utilizadas pelos insetos sociais. Os estudos deste comportamento têm se concentrado na atividade de lambedura e eliminação de membros da colônia mortos, principalmente em abelhas e formigas (Robinson & Page 1988, Hölldobler & Wilson 1990). Estas últimas desinfetam o jardim usando dois comportamentos principais: lambedura de esporos contaminantes e remoção de partes do substrato que estejam infectadas (Currie & Stuart 2001).

Fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), estudados mais recentemente em detalhes, são parasitas especialistas do jardim de fungo dos Attini (Currie *et al.* 1999a), mas não prejudicam as formigas diretamente. Eles causam a redução do crescimento do jardim e, ocasionalmente, a morte da colônia, após atingirem todo o fungo simbiote (Currie *et al.* 1999a). A frequência de *Escovopsis* em colônias do campo é alta (Currie *et al.* 1999a) mas, pelo menos em laboratório, verificou-se que as formigas cortadeiras podem controlar o parasita, desde que não haja sucessivas re-infecções (Currie & Stuart 2001). A presença de um actinomiceto também foi acrescentada à essa relação (Currie *et al.* 1999b). Segundo estes autores, o actinomiceto, presente no corpo das operárias, produz substâncias antibióticas que controlam o crescimento do fungo parasita.

Nas formigas cortadeiras, existe um fator adicional que prejudica o controle de doenças na sua colônia: o acúmulo de lixo, tais como restos de folhas, restos da esponja fúngica, fezes e operárias mortas. Segundo Bot *et al.* (2001), o lixo é perigoso para operárias de *Atta* e *Acromyrmex*, que morrem a uma taxa maior na presença dele, e também para o fungo simbiote, já que *Escovopsis* foi detectado no lixo de colônias do campo. A acumulação de lixo é um problema mais sério para as grandes sociedades, tanto para as humanas quanto para a dos insetos. Colônias adultas do gênero *Acromyrmex* podem conter aproximadamente 35.000 operárias e de um a vários jardins de fungos (Weber 1972, Lewis 1975, Wetterer 1999). Na subespécie *Ac. subterraneus subterraneus* este número pode chegar a 21000 indivíduos por colônia (Pereira & Della Lucia 1998). Este número é bastante pequeno quando se compara com aquele das colônias do gênero *Atta*, que podem conter milhões de operárias e centenas de jardins de fungo (Weber 1972, Hölldobler

& Wilson 1990). Autuori (1947) escavou uma colônia adulta de *Atta sexdens rubropilosa*, que possuía 296 câmaras de depósito de lixo, o qual pesava, no total, 475,2 Kg.

Além do lixo, outros fatores abióticos podem estar envolvidos na sobrevivência das operárias de formigas, como a umidade do ar. O pequeno tamanho das formigas permite-lhes explorar melhor os recursos, penetrar em fendas e em outros microambientes (Kaspari & Weiser 1999) mas, também, lhes tornam mais vulneráveis à dessecação. Animais de pequenos tamanhos se aquecem e ressecam-se mais rapidamente (Hood & Tschinkel 1990, Kaspari 1993). A baixa umidade do ar pode regular o período de forrageamento de algumas espécies de formigas em florestas tropicais (Kaspari & Weiser 2000). Apesar da importância da umidade na sobrevivência das formigas, estudos recentes, que avaliaram esse aspecto em formigas cortadeiras em placa de Petri, não discutiram os efeitos da umidade nos resultados encontrados (Bot *et al.* 2001, Silva *et al.* 2003).

Outra característica adicional dos insetos sociais, que os tornam particularmente suscetíveis a patógenos e parasitas, é o alto grau de parentesco genético entre os membros da colônia. Hospedeiros muito próximos geneticamente são similares em suas características de suscetibilidade, o que pode facilitar a disseminação de um patógeno por toda a colônia (Tooby 1982, Hamilton 1987, Seger & Hamilton 1988). Hamilton (1987) e Sherman *et al.* (1988) sugerem que a ocorrência de múltiplos acasalamentos nas rainhas de formigas evoluiu como estratégia de aumento da diversidade genética dentro da colônia, que aumentaria as chances da colônia contra a ação de patógenos. Além da poliandria (acasalamento com vários machos), um importante fator que afeta a variabilidade genética, dentro

da colônia, é o número de rainhas (Keller 1995b). Uma vantagem potencial da poliginia, presença de mais de uma rainha fértil por colônia, é que o aumento da variabilidade genética decorrente desta situação diminuiria a suscetibilidade a parasitas. Segundo Keller (1995a), é improvável que a poliginia tenha evoluído nos insetos sociais somente em resposta a patógenos e parasitas. Outros fatores ecológicos, como a taxa em que colônia perde sua(s) rainha(s) e o risco de dispersão das fêmeas sexuais, também contribuíram para a evolução da poliginia (Nonacs 1988, Rosengren *et al.* 1993).

A hipótese testada neste capítulo foi:

Colônias poligínicas apresentam menor taxa de mortalidade diária em relação a colônias monogínicas, por apresentarem maior resistência a parasitas.

Para isto, avaliou-se os efeitos do lixo, com ou sem controle da umidade, na sobrevivência de operárias de *Ac. subterraneus molestans*.

2 - Material e Métodos

2.1. Coleta e manutenção das colônias

Colônias monogínicas (M1, M3, M7) e poligínicas (P1, P3, P8) de *Ac. subterraneus molestans* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Viçosa, entre os meses de março e maio de 2001, para posterior utilização nos experimentos. A colônia poligínica P1 possuía seis rainhas e as demais duas. As seis colônias foram mantidas em laboratório, a $25 \pm 3\text{C}^\circ$, $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e alimentadas diariamente com folhas de *Acalypha wilkesiana*, *Ligustrum japonicum* e pétalas de *Rosa* spp. e *Tecoma stans*, que eram livres da presença de defensivos agrícolas. Tampas plásticas de 2 cm de diâmetro contendo água eram também fornecidas para cada colônia, além de se manter um algodão úmido sobre as tampas dos recipientes de vidros da colônia.

2.2. Sobrevivência de operárias mantidas em contato com o lixo da própria colônia

O objetivo deste experimento foi determinar o efeito direto do lixo, sem manutenção do teor de umidade, na mortalidade individual de operárias. Seis colônias de *Ac. subterraneus molestans*, monogínicas (M1, M7, M8) e poligínicas (P1, P3, P8) foram utilizadas neste experimento. Quarenta (40) operárias médias de cada colônia, que estavam no jardim de fungo, foram coletadas e colocadas em 4 placas de Petri de 9 cm de diâmetro, sendo 10 operárias em cada uma. Duas (2) placas tratamento continham 1,5 g de lixo da própria colônia e duas placas controles continham 1,5 g de substrato de papel filtro com umidade equivalente àquela do lixo, que era de 41%. Para estimar esta umidade, retirou-se 10g do lixo de cada colônia

utilizada neste bioensaio, o qual foi pesado previamente e seco em estufa por até 6 horas a 50°C. Durante o processo de secagem, o lixo foi pesado seguidas vezes até que se obtivesse um valor constante. Desta forma, chegou-se ao valor médio da umidade presente nos lixos das colônias de *Ac. subterraneus molestans*. Ao substrato preparado com papel filtro foi adicionada a mesma proporção de água encontrada no lixo das colônias. Um fragmento de papel filtro foi colocado sob a tampa da placa, permitindo-se assim que ocorresse ventilação. As operárias foram mantidas sem nenhum tipo de alimento e, diariamente, contou-se o número de sobreviventes em cada placa até o fim do experimento, o qual abrangeu um período de 15 dias, à semelhança de Bot *et al.* (2001).

2.3 Sobrevivência de operárias mantidas em contato com o lixo da própria colônia com suprimento constante de umidade

O procedimento utilizado neste experimento foi semelhante ao do item anterior, com a diferença de que a umidade interna da placa foi mantida. Para isto, utilizou-se um barbante de algodão de 7 cm de comprimento, o qual foi inserido sob a tampa da placa de Petri. Uma extremidade do barbante permanecia dentro da placa e a outra era conectada a um pequeno recipiente contendo água. Esta era conduzida por capilaridade para o ambiente interno da placa, mantendo-se uma atmosfera constantemente úmida durante o transcorrer do experimento. Foi mantida a umidade tanto para o tratamento (lixo) quanto para o controle (papel filtro umidificado). O período estipulado para avaliação da sobrevivência também foi de 15 dias.

2.4 Análises estatísticas

Para analisar-se os dados de sobrevivência, utilizou-se a curva de Kaplan-Meier. As curvas foram comparadas usando o teste não paramétrico Log Rank a 5% de significância, a exemplo de Sargento *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2003). As curvas de Kaplan-Meier e o teste de Log Rank foram obtidos por meio do programa Statistica 5.5.

3 - Resultados e discussão

3.1. Sobrevivência de operárias mantidas em contato com o lixo da própria colônia

O período máximo que as operárias sobreviveram, tanto em contato com lixo quanto no meio estéril, ambos sem suprimento de umidade, foi de apenas 6 dias. O Figura 1 mostra as curvas de Kaplan-Meier descritas para cada população. No Quadro 1 são apresentados os valores de p do teste Log Rank calculados.

Quadro 1 – Valores de p obtidos pelo teste Log Rank de comparação das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, duas a duas, dos quatro tratamentos, **sem** manutenção da umidade, em colônias de *Ac. subterraneus molestans*.

	SLM	SLP	SBM	SBP
SLM	-	0,732	0,168	0,00001
SLP	0,732	-	0,097	0,00001
SBM	0,168	0,097	-	0,00001
SBP	0,00001	0,00001	0,00001	-

SLM=Sobrevivência de operárias de colônias monogínicas no lixo;

SLP=sobrevivência de operárias de colônias poligínicas no lixo;

SBM=sobrevivência de operárias de colônias monogínicas em meio estéril (branco);

SBP=sobrevivência de operárias de colônias poligínicas em meio estéril (branco).

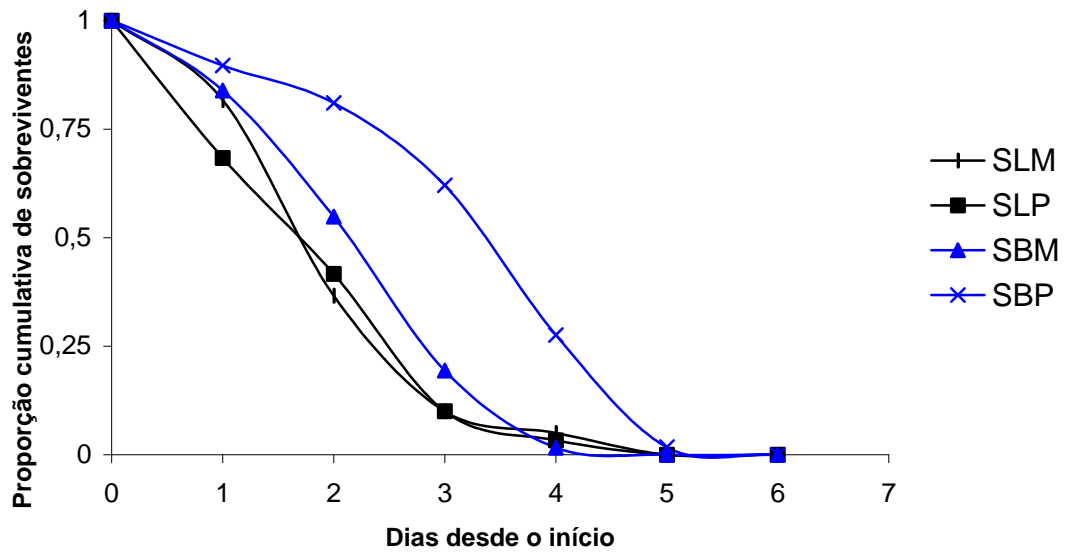


Figura 1- Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevivência de operárias de *Ac. subterraneus molestans* para os quatro tratamentos, **sem** manutenção da umidade: SLM= sobrevivência de operárias de colônias monogínicas em contato com o lixo; SLP= sobrevivência de operárias de colônias poligínicas em contato com o lixo; SBM= sobrevivência de operárias de colônias monogínicas em meio estéril; SBP= sobrevivência de operárias de colônias poligínicas em meio estéril. Cada curva representa a média de três colônias observadas, num total de 60 indivíduos.

De acordo com o teste de Log Rank, constatou-se que o único tratamento que diferiu dos demais a 5% de significância foi aquele onde se avaliou a sobrevivência de operárias de colônias poligínicas em meio estéril (SBP). O período máximo de sobrevivência das operárias foi de 6 dias a partir do início dos experimentos. Este tempo foi muito menor que o estipulado para avaliação da sobrevivência. Mesmo assim, pôde-se constatar que, no tratamento em que as operárias foram mantidas em

contato com lixo (SLM,SLP), não ocorreu sobrevivência diferencial entre operárias de colônias monogínicas e poligínicas, sendo que essa sobrevivência foi igual a obtida no tratamento de operárias de colônias monogínicas mantidas em meio estéril (SLM). O tratamento SBP diferenciou-se dos demais, tendo menor taxa de mortalidade de operárias. Entretanto, não se pode atribuir tal diferença a uma maior resistência das operárias deste grupo contra infecção, já que o lixo não mostrou ter efeito danoso sobre as mesmas. O fato das operárias terem morrido em um tempo menor que o estipulado prejudicou a avaliação dos efeitos dos tratamentos, pois menor número de dias foram recenseados. Os efeitos dos tratamentos foram mais bem avaliados no experimento seguinte, em que houve manutenção do teor de umidade nos tratamentos.

3.2. Sobrevivência de operárias mantidas em contato com o lixo da própria colônia com manutenção da umidade

Com o suprimento de umidade constante no interior da placa de Petri, aumentou-se o período de sobrevivência das operárias de *Ac. subterraneus molestans*, o que permitiu que se recenseasse as operárias sobreviventes até o 15º dia. Isto mostrou que, ao avaliar-se a mortalidade de operárias em placas de Petri, deve-se manter o teor de umidade interno, pois o sistema perde umidade para o meio externo e isto acelera a morte das operárias. Também, variações da umidade interna entre os tratamentos podem levar a conclusões imprecisas, já que lixo e papel filtro podem perder sua umidade a taxas diferentes. Ao se manter uma atmosfera saturada, através do barbante, evitou-se estas variações. Isto permitiu concluir que o lixo das colônias

de *Ac. subterraneus molestans* não teve efeito nocivo sobre suas operárias e que não existem diferenças na sobrevivência dessas, relacionadas ao número de rainhas da colônia. Operárias de colônias monogínicas morreram na mesma proporção que operárias de colônias poligínicas. O Quadro 2 mostra os valores de p do teste de Log Rank que comparou as curvas de Kaplan-Meier obtidas (Figura 2).

Quadro 2 – Valores de p obtidos pelo teste Log Rank de comparação das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, duas a duas, dos quatro tratamentos, **com** manutenção da umidade em colônias de *Ac. subterraneus molestans*.

	SLM	SLP	SBM	SBP
SLM	-	0,626	0,691	0,412
SLP	0,626	-	0,439	0,846
SBM	0,691	0,439	-	0,455
SBP	0,412	0,846	0,455	-

SLM=Sobrevivência de operárias de colônias monogínicas no lixo; SLP=sobrevivência de operárias de colônias poligínicas no lixo; SBM=sobrevivência de operárias de colônias monogínicas em meio estéril (branco); SBP=sobrevivência de operárias de colônias poligínicas em meio estéril (branco).

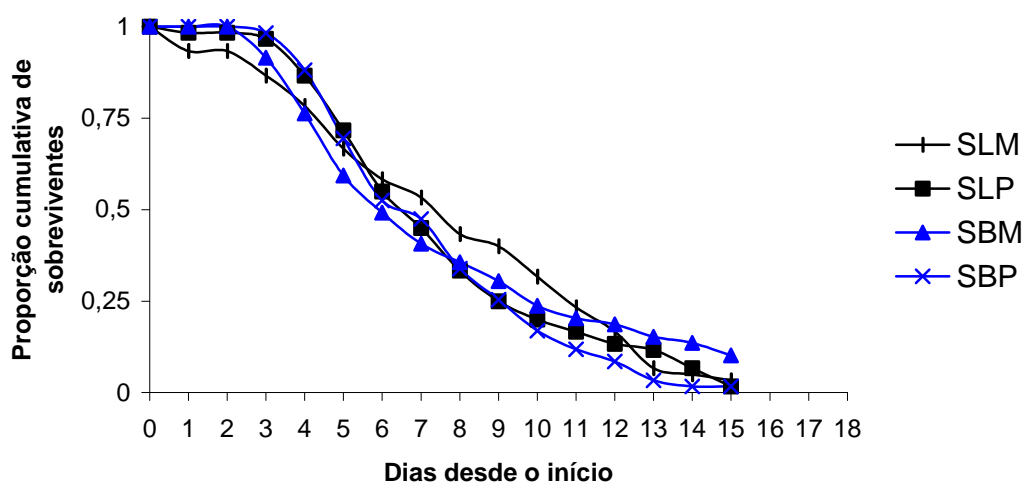


Figura 2- Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevivência de operárias de *Ac. subterraneus molestans* para os quatro tratamentos, **com** manutenção da umidade: SLM= sobrevivência de operárias de colônias monogínicas em contato com o lixo; SLP= sobrevivência de operárias de colônias poligínicas em contato com o lixo; SBM= sobrevivência de operárias de colônias monogínicas em meio estéril; SBP= sobrevivência de operárias de colônias poligínicas em meio estéril. Cada curva representa a média de três colônias observadas, num total de 60 indivíduos.

Os resultados aqui apresentados diferem dos obtidos por Bot *et al.* (2001) com *Ac. echinator*. Esses autores avaliaram a sobrevivência de operárias no tratamento com o lixo da própria colônia e no meio estéril com chumaço de algodão umedecido, e concluíram que operárias de *Ac. echinator* em contato com o lixo morrem mais rapidamente. No entanto, eles não mantiveram um suprimento constante de umidade, o que possivelmente explicaria os diferentes resultados. Mas deve ser ressaltado, também, que eles utilizaram uma outra espécie de *Acromyrmex* e talvez o lixo não represente um perigo para todas as espécies do gênero, as quais

possuem ecologia e comportamento distintos. Uma hipótese que, futuramente, deve ser testada é o efeito da dieta – tipo de folha – no grau de parasitismo da colônia, pois é sabido que alguns tipos de folhas utilizadas pelas formigas contêm substâncias com propriedades antimicrobianas. Bot *et al.* (2001) concluíram que o acúmulo de lixo nas colônias de *Ac. echinator* não tinha efeito nocivo sobre estas nos meses em que a qualidade das folhas era melhor. Esta qualidade melhor pode significar maior quantidade de substâncias com propriedades antimicrobianas. Diferentemente de Bot *et al.* (2001), que utilizaram operárias de diversos tamanhos, foram utilizadas neste trabalho apenas operárias médias. Isto contribuiu para que se obtivesse uma análise mais uniforme da sobrevivência, já que aqueles autores detectaram que as operárias mínimas da *Ac. echinator* morriam mais rapidamente, o que pode ter acontecido pela maior suscetibilidade destas operárias a dessecação, desde que a relação área de superfície e massa corporal é de 2/3 para organismos de uma dada forma (Calder 1984).

As operárias utilizadas na avaliação da sobrevivência foram coletadas no interior da esponja fúngica, pois estas teriam um contato prévio mínimo ou nulo com o lixo produzido pela colônia. Futuras análises de sobrevivência deverão também levar em conta a alimentação das operárias, providenciando alimentação durante a avaliação, de forma a excluir os efeitos de morte por inanição.

Conclui-se, com base no resultado destes experimentos que:

- 1 – É importante manter uma umidade constante no ambiente teste a fim de melhor avaliar os efeitos do lixo.
- 2 – O lixo não aumenta a mortalidade das operárias de *Ac. subterraneus molestans* que permanecem em contato com ele.
- 3 – Operárias de colônias monogínicas e poligínicas de *Ac. subterraneus molestans* apresentam taxas iguais de mortalidade.

CONCLUSÕES GERAIS

- 1 – Colônias monogínicas de *Acromyrmex subterraneus molestans* adotam novas rainhas.
- 2 – Operárias de colônias monogínicas e poligínicas desta subespécie não demonstram agressividade contra operárias co-específicas de outras colônias.
- 3 – Operárias de colônias monogínicas e poligínicas de *Ac. subterraneus molestans* são agressivas contra operárias de uma outra subespécie, *Ac. subterraneus molestans*.
- 4 – Semelhanças no perfil químico cuticular de operárias de *Ac. subterraneus molestans* explicam a ausência de agressividade intraespecífica observada nos testes de agressividade.
- 5 – Diferenças no perfil químico cuticular entre operárias de *Ac. subterraneus molestans* e *Ac. subterraneus subterraneus* permitem que haja discriminação entre elas.
- 6 – Operárias de colônias poligínicas de *Ac. subterraneus molestans* não apresentam sobrevivência diferencial em relação às de colônias monogínicas, quando em contato com o lixo da própria colônia.

LITERATURA CITADA

- Anderson, C., & D. W. Mcshea. 2001.** Individual *versus* social complexity, with particular reference to ant colonies. *Biol. Rev.* 76: 211-237.
- Autuori, M. 1947.** Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. IV) O sauveiro depois da primeira revoada (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). *Arq. Inst. Biol.* 18: 39-70.
- Balas, M.T., & E. S. Adams. 1996.** Nestmate discrimination and competition in incipient colonies of fire ants. *Anim. Behav.* 51:49-59.
- Bartz, S.H., & B. Hölldobler. 1982.** Colony founding in *Myrmecocystus mimicus* Wheeler and the evolution of foundress associations. *Behav. Ecol. Sociobol.* 10:137-147.
- Bento, J. M. S. 1993.** Condições climáticas para o vôo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Tese (Mestrado). Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 98 p.
- Bento, J.M.S., T. M. C. Della Lucia & E. F. Vilela. 1993.** Recognition of queen by workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Resumos do XI Encontro de Mirmecologia/IV International Symposium on Pest Ants, Belo Horizonte.
- Bernasconi, G., & L. Keller. 1996.** Reproductive conflicts in cooperative associations of fire ant queens (*Solenopsis invicta*). *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.* 263: 509-513.

- Bernasconi, G., & L. Keller L. 1998.** Phenotype and individual investment in cooperative foundress associations of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behav. Ecol.* 5: 478-485.
- Bernasconi, G., L. Bigler, M. Hesse & F. L. W. Ratnieks. 1999.** Characterization of queen-specific components of the fluid released by fighting honey bee queens. *Chemoecology* 9: 161-167.
- Bernasconi, G., F. L. W. Ratnieks & E. Rand. 2000.** Effect of “spraying” by fighting honey bee queens (*Apis mellifera* L.) on the temporal structure of flights. *Ins. Soc.* 47: 21-26.
- Boyd, N. D., & M. M. Martin. 1975.** Faecal proteinases of the fungus-growing ant *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. *J. Insect Phys.* 21: 1815-1820.
- Bot, A. N. M., C. R. Currie, A. G. Hart & J. J. Boomsma. 2001.** Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol. Ecol. Evol.* 13: 225-237.
- Boulay, R., A. Hefetz, V. Soroker & A. Lenoir. 2000.** *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. *Anim. Behav.* 59: 1127-1133.
- Bourke, A. F. G., & J. Heinze. 1994.** The ecology of communal breeding - the case of multiple-queen lepto thoracine ants. *Philos. T. Roy. Soc. b* 345: 359-372.
- Buschinger, A. 1974.** Monogynie und polygynie in insektensozietäten, p. 862-896. In Schmidt G. H. (ed), *Sozial-polymorphismus bei Insekten*, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlags.
- Calder, W. A. 1984.** *Size, function, and life history*. Cambridge, Harvard.
- Carlin, N. F., & B. Hölldobler. 1987.** The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus* spp.). II. Larger colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20: 209-217.

- Carlin, N. F., H. K. Reeve & S. P. Cover. 1993.** Kin discrimination and division of labour among matrillines in the polygynous carpenter ant *Camponotus planatus*, p. 362-401. In: L. Keller (ed.), Queen number and sociality in insects. Oxford, Oxford, 439p.
- Chapela, I.H., S.A. Rehner, T.R. Schultz & U.G. Mueller. 1994.** The evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* 266: 1691-1694.
- Craig, R., & R. H. Crozier. 1979.** Relatedness in the polygynous ant *Myrmecia pilosula*. *Evolution* 33: 335-341.
- Crosland, M. W. J. 1989.** Intraspecific aggression in the primitive ant genus *Myrmecia*. *Ins. Soc.* 36: 161-172.
- Crozier, R.H., & M. W. Dix. 1979.** Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 4: 217-224
- Currie, C. R., Müeller UG, Mallock D. 1999(a).** The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc. Natl. Acad.Sci USA* 96: 7998-8002.
- Currie, C.R., U. G. Mueller & D. Malloch. 1999(b).** Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701-704.
- Currie, C. R. 2001.** Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia* 128: 99-106.
- Currie, C.R., & A. Stuart. 2001.** Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 1033-1039.

- Delabie, J. H. C. 1989.** Observações sobre a ocorrência de poliginia em colônias de *Acromyrmex subterraneus brunneus* FOREL, 1893, em cacauais. An. Soc. Entomol. Bras. 18: 193-196.
- Delabie, J.H.C., H. G. Fowler & M. N. Schlindwein. 1993.** Ocorrência do parasita social *Pseudoatta* sp. nova em ninhos de *Acromyrmex rugosus* em Ilhéus, Bahia: primeiro registro para os trópicos. Resumos do XI Encontro de Mirmecologia/ IV International Symposium on Pest Ants. Belo Horizonte.
- Della Lucia, T. M. C., & E. F. Vilela. 1986.** Ocorrência de poliginia em *Acromyrmex subterraneus* FOREL, 1893. An. Soc. Entomol. Bras. 15: 379-380.
- Della Lucia, T.M.C., E. F.Vilela & N. Anjos.1993.** Criação de formigas cortadeiras em laboratório, p 1-3 In T. M.C. Della Lucia (ed), As formigas cortadeiras. Viçosa, Folha de Viçosa, 262p.
- Della Lucia, T.M.C., E.O. Peternelli, F.G. Lacerda, L.A. Peternelli & D.D.O. Moreira. 2003.** Colony behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in the absence of the queen under laboratory conditions. Behav. Proc. 64: 49-55.
- Diehl-Fleig, E., & A. M. Araújo. 1996.** Haplometrosis and pleometrosis in the ant *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae). Insect. Soc. 43: 47-51.
- Errard, C., & A. Hefetz. 1997.** Label familiarity and discriminatory ability of ants reared in mixed groups. Ins. Soc. 44: 189-198.
- Fadini, M.A.M., & S.D.G. Pompolo. 1996.** Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa. Bras. J. Gen. 19: 53-55.
- Fletcher, D. J. C., & C. D. Michener. 1987.** Kin recognition in animals. New York, Wiley, 416p.

- Fogleman, J.C., & P. B. Danielson. 2001.** Chemical interactions in the cactus microorganism –*Drosophila* model system of the Sonoran Desert. *Am. Zoo.* 41: 877-899.
- Fowler, H.G., & S. M. Ketelhut. 1993.** Confusão taxonômica: variação clinal, inter e intrapopulacional em *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Anais do XI Encontro de Mirmecologia/IV International Symposium on Pest Ants*, Belo Horizonte.
- Frumhoff, P.C., & P. S. Ward. 1992.** Individual-level selection, colony-level selection, and the association between polygyny and worker monomorphism in ants. *Am. Nat.* 139: 559-590.
- Giraud, T., J. S. Pedersen & L. Keller. 2002.** Evolution of supercolonies: the argentine ants of southern europe. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9): 6075-6079.
- Greene, M. J., & D. M. Gordon. 2003.** Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature* 423: 32.
- Gonçalves, C. R. 1961.** O gênero *Acromyrmex* no Brasil. *Studia Ent.* 4: 113-180.
- Hamilton, W. D. 1964(a).** The genetical evolution of social behaviour I. *J. Theor. Biol.* 7:1-16.
- Hamilton, W. D. 1964(b).** The genetical evolution of social behaviour II. *J. Theor. Biol.* 7: 17-52.
- Hamilton, W. D. 1987.** Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraints of social evolution, p. 81-102. In Itô, Y., J. L. Brown & J. Kikkawa (eds), *Animal societies: theories and facts*. Tokyo, Japan Science Society.
- Hart, A.G., A. N. M. Bot, M. J. F. Brown. 2002.** A colony-level response to disease control in a leaf-cutting ant. *Naturwissenschaften* 89: 275-277.
- Hefetz, A., C. Errard, A. Chambris & A. Le Negrate . 1996.** Postpharyngeal gland secretion as a modifier of aggressive behavior in the Myrmicinae ant *Manica rubida*. *J. Insect Behav.* 9: 719-717.

- Heinze, J. 1993.** Habitat structure, dispersal strategies and queen number in 2 boreal *Leptothorax* ants. *Oecologia* 96: 32-39.
- Hepper, P. G. 1991.** Kin Recognition. Cambridge, Cambridge, 469p.
- Hernández, J.V., H. López & K. Jaffé. 2002.** Nestmate recognition signals of the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *J. Insect Phys.* 48: 287-295
- Higashi, S. 1983.** Biological and ecological-studies of a supercolonial ant *Formica yessensis* Forel.11.Polygyny and nuptial flight of *Formica (Formica) yessensis* Forel at Ishikari Coast, Hokkaido, Japan. *Insect. Soc.* 30: 287-297.
- Hölldobler, B. 1962.** Frage der oligogynie bei *Camponotus ligniperda* Latr. und *Camponotus herculeanus* L. (Hym. Formicidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 49: 337-352.
- Hölldobler, B., & E. O. Wilson. 1977.** The number of queens: an important trait in ant evolution. *Naturwissenschaften* 64: 8-15.
- Hölldobler, B., & C. D. Michener. 1980.** Mechanisms of identification and discrimination in social Hymenoptera, p.35-38. In: H. Markl (ed.), *Evolution of social behavior: hypotheses and empirical tests*. Weinheim, Chemie Gmbh.
- Hölldobler, B., & E. O. Wilson. 1990.** *The ants*. Cambridge, Belknap, 732p.
- Holway, D.A., A.V. Suarez & T.J. Case. 1998.** Loss of intraspecific aggression in the success of a widespread invasive social insect. *Science* 282: 949-952.
- Hood, W. G., & W. R. Tschinkel. 1990.** Desiccation resistance in arboreal and terrestrial ants. *Phys. Entom.* 15: 23-35.
- Howard, R. W., & G. J. Blomquist. 1982.** Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 149-172.
- Jutsum, A.R., T. S. Saunders, & J. M. Cherrett. 1979.** Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Anim. Behav.* 27: 839-844.

- Kaae, R.S., H. H. Shorey & L. K. Gaston. 1973.** Pheromone concentration as a mechanism for a reproductive isolation between two lepidopterous species. *Science* 179: 487-488.
- Kaspari, M. 1993.** Body size and microclimate use in Neotropical granivorous ants. *Oecologia* 96: 500-507.
- Kaspari, M., & M. Weiser. 1999.** The size-grain hypothesis and interspecific scalling in ants. *Func. Ecol.*13: 530-538.
- Kaspari, M., M. Weiser. 2000.** Ant activity along moisture gradients in a Neotropical Forest. *Biotropica* 32: 703-711.
- Kaufmann, B., J. J. Boomsma & L. Passera. 1992.** Relatedness and inbreeding in a french population of the unicolonial ant *Iridomyrmex humilis* (Mayr). *Ins. Soc.* 39: 195-200.
- Keller, L. 1993.** Queen number and sociality in insects. Oxford, Oxford, 439p.
- Keller, L., & L. Vargo. 1993.** Reproductive structure and reproductive roles in colonies of eusocial insects, p. 16-44. In L. Keller (ed.), Queen number and sociality in insects. Oxford, Oxford, 439p.
- Keller, L. 1995(a).** Social life: the paradox of multiple-queens colonies. *Trends Ecol. Evol.* 10: 355-360.
- Keller, L. 1995(b).** Parasites, worker polymorphism, and queen number in social insects. *American Naturalist.* 145: 842-847.
- Keller, L. 1997.** Indiscriminate altruism: unduly nice parents and siblings. *Trends Ecol. Evol.* 12: 99-103
- Krieger, M.J.B., & K. G. Ross. 2002.** Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science* 295: 328-332.
- Lahav, S., V. Soroker, A. Hefetz & R. K. Vander Meer. 1999.** Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86: 246-249.

- Lewis, T. 1975.** Colony size, density and distribution of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octospinosus* (Reich) in cultivated fields. Phil. Trans. R. Soc. Lon. B 127: 51-64.
- Lenoir, A., D. Fresneau, C. Errard & A. Hefetz. 1999.** Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social concept, p. 219-237. In Detrain, C., J. L. Deneuborg & J. M. Pasteels (eds), Information processing in social insects, Boston, Birkhauser, 432p.
- Marinho, C. G. S., & T. M. C. Della Lucia. 1998.** Egg-laying in *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera, Formicidae) under laboratory conditions. Biociências 6:71-79.
- Martin, M. M., N. D. Boyd, M. J. Gieselmann & R. G. Silver. 1975.** Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. J. Insect Phys. 21: 1887-1892.
- Maschwitz, U., K. Koob & H. Schildnecht. 1970.** Ein Beitrag zur Funktion der Metathoracaldrüse der Ameisen. J. Insect Phys 16: 387-404.
- Maschwitz, U. 1974.** Vergleichende Untersuchungen zur Funktion der Ameisenmetathorakaldrüse. Oecologia 16: 303-310.
- Mayhé-Nunes, A. J. 1991.** Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética. Tese (Mestrado). Viçosa, UFV, 122 p.
- Mueller, U.G., S. A. Rehner & T. R. Schultz. 1998.** The evolution of agriculture in ants. Science 281: 2034-2038.
- Nash, D., & G. Bernasconi. 1996.** Ant colonies as an evolutionary paradigm. Quart. Rev. Biol. 71: 387-390.
- Nonacs, P. 1988.** Queen number in colonies of social Hymenoptera as a kin-selected adaptation. Evolution 42: 566-580.

- Obin, M. S. 1986.** Nestmate recognition cues in laboratory and field colonies of *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). J.Chem. Ecol. 12:1965-1975.
- Ortius-Lechner, D., R. Maile, E. D. Morgan & J. J. Boomsma. 2000.** Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance. J. Chem. Ecol. 26: 1667-1683.
- Pamilo, P., & R. Rosengren. 1984.** Evolution of nesting strategies of ants: Genetic evidence from different population types of *Formica ants*. Biol. J. Linn. Soc. 21: 331-348.
- Pamilo, P. (1991).** Evolution of colony characteristics in social insects: II. Number of reproductive individuals. Am. Nat. 138: 412-433.
- Pereira, R. C., & T. M. C. Della Lucia. 1998.** Estimativa populacional em ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). Ceres 45: 573-578.
- Pfennig, D. W. 1995.** Absence of joint nesting advantage in desert seed harvester ants: evidence from a field experiment. Anim. Behav. 49:567-575.
- Pollock, G.B., & S.W. Rissing .1985.** Mating season and colony foundation of the seed-harvester ant, *Veromessor pergandei*. Psyche 92: 125-134.
- Provost, E., G. Riviere, M. Roux, A. G. Bagneres & J. L. Clement. 1994.** Cuticular hydrocarbons whereby *Messor barbarus* ant workers putatively discriminate between monogynous and polygynous colonies. Are workers labeled by queens? J. Chem. Ecol. 20: 2895-3003.
- Quinlan, R. J., & J. M. Cherrett. 1979.** The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). Ecol. Entom. 4: 151-160.

- Rissing, S. W., R. A. Johnson & G. B. Pollock. 1986.** Natal nest distribution and pleometrosis in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* 93: 177-186.
- Rissing, S.W., & G. B. Pollock. 1988.** Pleometrosis and polygyny in ants, p.179-221. In R. L. Jeanne (ed), *Interindividual behavioural variability in social insects*. Boulder, Westview, 356p.
- Robinson, G.E., & R.E. Page Jr. 1988.** Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature* 333: 356-358.
- Roisin, Y. 1993.** Selective pressures on pleometrosis and secondary polygyny: a comparison of termites and ants, p. 402–421 In L. Keller (ed.) *Queen number and sociality in insects*. Oxford, Oxford, 439p.
- Rosengren, R., L. Sundström. & W. Fortelius. 1993.** Monogyny and polygyny in *Formica* ants: a result of alternative dispersal tactics?, p. 308-333. In: L. Keller (ed.), *Queen number and sociality in insects*. Oxford, Oxford, 439p.
- Sargento, L., H. S. Rosário, C. Perdigão, J. Monteiro, C. Saldanha & J. M. Silva. 2002.** Factores biohemorreológicos e a curva de eventos cardiovasculares em sobreviventes de enfarte agudo do miocárdio transmural-24 meses de seguimento Clínico. *Rev. Port. Cardiol.* 21: 165-171.
- Schildknecht, H., & K. Koob. 1971.** Myrmicacin, the first insect herbicide. *Angew. Chem.* 10: 124-125.
- Schildknecht, H., P. B. Reed, F. D. Reed & K. Koob. 1973.** Auxin activity in symbiosis of leaf-cutting ants and their fungus. *Ins. Bioch.* 3: 439-442.
- Schultz, T. R., D. Bekkevold & J. J. Boomsma. 1998.** *Acromyrmex insinuator* new species: an incipient social parasite of fungus-growing ants. *Ins. Soc.* 45: 457-471.

- Seger, J., & W. D. Hamilton. 1988.** Parasites and sex, p. 176-193. In Michod, R. E., & B. R. Levin (eds), *The evolution of sex*. Sunderland, Sinauer.
- Seppä, P. 1994.** Sociogenetic organization of the ants *Myrmica ruginodus* and *Myrmica lobicornis*: Number, relatedness and longevity of reproducing individuals. *J. Evol. Biol.* 7: 71-95.
- Silva, A., M. Bacci Jr., C. G. Siqueira, O. C. Bueno, F. C. Pagnocca & M. J. A. Hebling. 2003.** Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *J. Insect Phys.* 49: 307-313.
- Sherman, P. W., T. D. Seeley & H. K. Reeve. 1988.** Parasites, pathogens, and polyandry in social Hymenoptera. *Am. Nat.* 13: 602-610.
- Snyder, L. E. 1993.** Non-random behavioural interactions among genetic subgroups in a polygynous ant. *Anim. Behav.* 46: 431-439.
- Starks, P. T., R. E. Watson, J. D. Matthew. & C. Dipaola. 1998.** The effect of queen number on nestmate discrimination in the facultatively polygynous ant *Pseudomyrmex pallidus* (Hymenoptera: Formicidae). *Ethology* 104: 57-584.
- Sundström, L. 1997.** Queen acceptance and nestmate recognition in monogyne and polygyne colonies of the ant *Formica truncorum*. *Anim. Behav.* 53: 499-510.
- Tissot, M., D. R. Nelson & D. M. Gordon. 2001.** Qualitative and quantitative differences in cuticular hydrocarbons between laboratory and field colonies of *Pogonomyrmex barbatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 130B: 349-358.
- Tooby, J. 1982.** Pathogens, polymorphism, and the evolution of sex. *J. Theor. Biol.* 97: 557-576.
- Tschinkel, W.R., & D. F. Howard. 1983.** Colony founding by pleometrosis in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 12:103-113.

- Vander Meer, R.K., D. Saliwanchik & B. Lavine. 1989.** Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*: Implications for nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.* 15: 2115-2125.
- Viana, A.M.M. 1996.** La reconnaissance coloniale du couvain et du champignon chez la fourmi champignonniste *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Tese (Doutorado). Tours, Université Paris XIII, 136p.
- Vienne, C., C. Errard & A. Lenoir. 1998.** Influence of the queen on worker behaviour and queen recognition behaviour in ants. *Ethology* 104: 431-446.
- Wagner, D., M. J. F. Brown, P. Broun, W. Cuevas, L. E. Moses, D. L. Chao & D. M. Gordon. 1998.** Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *J. Chem. Ecol.* 12: 2021-2037.
- Wagner, D., M. Tissot, W. Cuevas & D. M. Gordon. 2000.** Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.* 26: 2245-2257.
- Ward, P. S. 1983(a).** Genetic relatedness and colony organization in a species complex of ponerine ants 1. phenotypic and genotypic composition of colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 12: 285-299.
- Ward, P. S. 1983(b).** Genetic relatedness and colony organization in a species complex of ponerine ants 2. patterns of sex-ratio investment *Behav. Ecol. Sociobiol.* 12: 301-307.
- Weber, N.A. 1972.** Fungus-culturing behavior of ants. *Am. Zool.* 12: 577-587.
- Wetterer J. K. 1999.** The ecology and evolution of worker size-distribution in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 34: 119-144.

Whitehouse, M.E.A., & K. Jaffé .1995. Nestmate recognition in the leaf-cutting ant
Atta laevigata. *Ins. Soc.* 42: 157-166.

Wilson, E.O. 1971. *Insect Societies*. Cambridge, Harvard University, 548 p.

Apêndice I

TR	SS2	SS1	P1	P3	M7	M8
56.752	0.99	1.89	0.83	2.53	0	1.77
57.471	10.51	6.69	0.31	0.39	0	0.26
58.091	3.2	1.97	0.19	0.28	0.24	0
59.703	2.56	2.01	0.18	0.42	0.34	0
60.302	1.5	1.16	0.21	0.41	0.4	0
61.225	0	1.44	0	1.09	0.88	0
61.292	0	0	0.46	0	0	1.73
61.877	6.88	5.05	1.58	2	1.36	1.16
62.424	0	4.32	1.6	2.12	1.99	1.26
62.463	5.01	0	0	0	0	0
63.416	0	1.17	0	0.78	0.86	0
63.979	0	0	1.86	0	1.32	0
64.327	0	5.46	0	5.25	0	0
64.497	4.63	0	2.31	0	2.97	5.85
65.482	0	0	0	1.44	0	0
66.036	3.67	4.33	7.72	6.75	6.94	7.02
66.529	0	0	7.27	6.25	5.7	0
66.566	3.34	3.35	0	0	0	4.81
67.423	1.67	2.53	0	0	1.76	0
67.476	0	0	0	1.44	0	0
68.097	0	0	4.78	3.83	3.28	5.79
68.154	2.19	0	0	0	0	0
68.633	2.2	5.38	3.51	3.45	3.71	4.83
69.349	3.21	5.12	0	0	0	0
69.769	0	0	0	2.13	2.1	0
70.498	2.4	2.89	11.79	8.86	7.34	9.32
71.139	2.07	2.93	12.23	7.18	7.04	9.01
71.815	3.1	2.52	0	0	0	0
71.88	3.1	0	0	1.03	3.15	0
72.888	1.74	3.77	0	0	0	0
73.233	0	0	3.65	4.13	3.45	3.49
73.968	0	0	4.5	3.22	4.09	4.54
74.075	2.85	2.25	0	0	0	0
74.59	0	1.49	0	0.6	0	0
75.342	0	0	1.34	0	1.34	0
75.485	0	2.28	0	0	0	0
75.602	0	0	0	1.47	0	3.1
76.222	0	2.24	0	0	0	0
76.533	13.47	0	5.9	3.58	4.57	3.85
77.211	0	1.11	0	0	0	0
77.327	0	0	0	0	6.48	0
77.436	0	0	9.98	5.73	0	5.21
77.775	0	1.39	0	0	0	0
78.612	0	0	0	1.83	0	0
78.704	2.95	1.8	0	0	1.13	0
78.783	0	0	0	0	0	1.77
79.269	0	0	0	0	1.02	0
79.383	0	0	0	0	0	1.47
79.638	0	0	0	1	0	0
79.7	0	1.22	0	0	0	0
80.375	0	0	3.62	1.48	1.55	0
80.473	0	0	0	0	0	2.23
80.734	2	1.14	0	0	0	0
81.439	0	0	2.89	1.57	1.71	0
81.461	0	1.33	0	0	0	0
81.539	0	0	0	0	0	2.89
82.7	1.09	0	0	0	0	0
83.962	0	0	0	0	8.12	1.62
84.476	1.36	0	0	0	0	0
84.563	0	1.6	0	0	0	0
85.063	1.19	0	0	1.59	2.22	1.64
85.172	0	0	2.3	0	0	0
85.397	0	1.55	0	0	0	0
86.28	0.34	0	0	2.19	4.18	0
86.386	0	0	4.94	0	0	1.48

TR se refere ao tempo de retenção (em minutos) de cada composto que apareceu no cromatograma. A respectiva concentração relativa deste composto em cada colônia analisada está mostrada nas colunas 2 a 7. Estes dados foram usados para fazer a Análise Hierárquica de Cluster.