

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais

**Isabel Neto Hastenreiter**

**NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A OCORRÊNCIA DO  
COMPORTAMENTO DE CARONEIRA**

JUIZ DE FORA

2016

**Isabel Neto Hastenreiter**

**NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A OCORRÊNCIA DO  
COMPORTAMENTO DE CARONEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Juliane Floriano Lopes Santos**

Juiz de Fora - MG

Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Hastenreiter, Isabel Neto.

Novas perspectivas sobre a ocorrência do comportamento de caroneira / Isabel Neto Hastenreiter. -- 2016.  
63 f.

Orientadora: Juliane Floriano Santos Lopes

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, 2016.

1. Formigas cortadeiras. 2. *Acromyrmex subterraneus*. 3. Estratégia comportamental. 4. Tráfego de forrageamento. I. Lopes, Juliane Floriano Santos, orient. II. Título.

**NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A OCORRÊNCIA DO  
COMPORTAMENTO DE CARONEIRA**

**Isabel Neto Hastenreiter**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliane Floriano Lopes Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Aprovada em 31 de março de 2016

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliane Floriano Lopes Santos**

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF (Orientadora)

---

**Prof. Dra. Sônia Sin Singer Brugiolo**

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

---

**Dra. Mariana Brugger Silva**

Universidade Estadual Paulista - UNESP

---

**Prof. Dr. Alexander Machado Auad**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de leite

---

**Prof. Dr. Fabio Prezoto**

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

*Para minha família, a base de tudo.*

*Sempre que me bate o desânimo, a  
desesperança e o temor, procuro me  
desvencilhar destes sentimentos,  
lembrando que, lá no final, está um  
sonho muito maior que o meu.  
Está o sonho de Deus.*

*Ivna Sá*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o princípio e o fim de todas as coisas. Por me permitir concluir esta etapa, por me permitir conviver com pessoas que são sólido pilar na minha vida e na minha formação. Por ter estudado na UFJF, e dela ter feito minha casa, e nela construir uma família com laços que vão além do sangue. Toda honra, glória e louvor.

Um agradecimento especial para os que marcaram minha trajetória:

À Universidade Federal de Juiz de Fora pelo apoio concedido durante a execução deste trabalho e por ter me formado como profissional.

À minha orientadora Professora Doutora Juliane Lopes, que me fez acreditar que era possível, por ir muito além da orientação, pela amizade e companheirismo.

À professora Doutora Rosângela Abreu Monteiro Barros e à enfermeira Ana Carolina Gonçalves pelo auxílio no manejo e cultura do fungo utilizado na experimentação.

Ao colega Marcial Cárcamo por ceder amostras do fungo utilizado na experimentação.

Aos meus pais, Reinaldo e Maria da Graça, por sonharem junto comigo e antes de mim, os meus próprios sonhos. Por tornarem tudo isso possível e real.

À Thaisa, pelos momentos de companheirismo e incentivo durante todas as etapas concluídas.

À minha Mãe, por todo o amparo, carinho, atenção e porque me permitiu saber a delícia de ter duas mães. À tia Rita por ser alegria, amparo e carinho em todos os momentos.

Aos meus colegas de laboratório Tatiane, Nilhian, Kelly e Maguinho pela convivência e por tantos momentos de crescimento profissional e pessoal.

À Escola Estadual Melo Viana, que me concedeu um novo olhar sobre o ensino e a educação e me desafia a ser uma profissional melhor.

Ao Ministério Universidades Renovadas, por apresentar pessoas que são irmãos que irão comigo, sempre.

Aos membros da banca examinadora pela contribuição no trabalho.

A todos que me apoiaram e torceram por mim, mas a memória falhou em lembrar.

## **RESUMO**

**(Novas perspectivas sobre a ocorrência do comportamento de caroneira).** Durante o forrageamento de formigas cortadeiras pode-se observar operárias mínimas sobre os fragmentos de folha transportados até o ninho, comportamento denominado de caroneira. São citadas várias funções relacionadas a este comportamento, como defesa contra forídeos parasitoides, limpeza dos fragmentos de folhas, economia de energia de retorno ao ninho, além de ingestão de seiva que exsuda do corte. Sendo assim, o presente estudo se apresenta como uma forma de elucidar questões ecológico-comportamentais de caroneira em *Acromyrmex subterraneus*, tendo por objetivos avaliar i) se as caroneiras ocorrem de forma aleatória ou dependente do fragmento vegetal transportado, ii) se a carga microbiana influencia a frequência de caroneiras e iii) como as caroneiras respondem a variações no tráfego de forrageamento. Para tanto, foram feitas manipulações nos fragmentos vegetais oferecidos e nas trilhas de forrageamento. No primeiro experimento verificou-se que caroneiras podem ocorrer em qualquer tamanho de fragmento ou espécie vegetal, mas há variação do tamanho da caroneira em função do fragmento. Tal fato demonstra alta plasticidade deste comportamento, de forma a ocorrer sobre os mais diversos substratos. No segundo experimento a presença de fungo entomopatogênico e antibióticos diminuiu a ocorrência de caroneiras, não sendo possível relacionar a frequência de caroneiras com a remoção de carga microbiana. Sugere-se que as caroneiras tenham evitado contato com os conídios fúngicos e com as soluções antimicrobianas porque eram substâncias desconhecidas pelas operárias. Já no terceiro experimento observou-se incremento da frequência de caroneiras em trilha estreita, com alta densidade de operárias. De fato, a frequência de caroneiras se correlacionou positivamente com o fluxo de operárias que deixavam o ninho nos três experimentos. Devido à alta frequência de encontros promovida pelo aumento do fluxo de operárias que saem do ninho e da densidade de operárias na trilha estreita sugere-se que o comportamento de caroneira é estimulado por esta taxa de encontros, que é agente regulatório de alocação de tarefas. O comportamento de caroneira pode ser considerado uma estratégia comportamental para redução do tráfego de operárias nas trilhas.

**Palavras-chave:** formigas cortadeiras, *Acromyrmex subterraneus*, estratégia comportamental, tráfego de forrageamento

## **ABSTRACT**

**(New perspectives of hitchhiking behavior occurrence).** During foraging of leaf-cutting ants, it can be observed minimal workers over leaf fragments, called hitchhikers. Many functions are cited as related with hitchhiking behavior, as defense against parasitoids, leaf cleaning, energy saving and sap feeding. Here, the objectives were to evaluate i) if hitchhiker occurrence is plant-size-species-dependent, ii) if microbial load influences hitchhiker frequency and iii) how hitchhiker frequency is influenced by high density of foraging traffic. It has been manipulated leaf fragments and foraging trails. In first experiment, it has been verified that hitchhikers could occur over any fragment size or plant species, but hitchhiker masses varied among plant species. In the second experiment, the entomopathogenic fungus and antibiotics reduced hitchhiker occurrence. Thus, it was not possible to relate hitchhiker frequency with microbial load removal. It has been suggested that hitchhikers avoid the conidia fungal and the antibiotic solutions due to these materials are unknown by workers. In the third experiment, hitchhiker frequency has been higher at narrow trails, which has greater worker density. Actually, hitchhiker frequency has been positively correlated with the outbound worker flow in the three experiments. Due to high head-on encounters promoted by the increased outbound worker flow and by the greater worker density in narrow trails, it has been suggested that hitchhiker behavior is stimulated by these encounters, which are regulatory agents of task allocation. The hitchhiker behavior could be considered a behavioral strategy to reduce worker traffic along foraging trails.

**Key- words:** leaf-cutting ants, foraging traffic, *Acromyrmex subterraneus*, behavioral strategy.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
Referências Bibliográficas .....	4
<b>CAPÍTULO I - Variando o meio de transporte: influência do tipo e tamanho do substrato na frequência de caroneiras.....</b>	<b>8</b>
Resumo .....	8
Abstract .....	9
Introdução .....	10
Material e Métodos .....	11
Resultados .....	13
Discussão .....	17
Referências Bibliográficas .....	19
<b>CAPÍTULO II - Identificando riscos: redução da frequência de caroneiras frente a um patógeno .....</b>	<b>24</b>
Resumo .....	24
Abstract .....	25
Introdução .....	26
Material e Métodos .....	27
Resultados .....	29
Discussão .....	31
Referências Bibliográficas .....	34
<b>CAPÍTULO III - Evitando engarrafamentos: comportamento de caroneira como estratégia de redução do tráfego de operárias na trilha .....</b>	<b>40</b>
Resumo .....	40
Abstract .....	41
Introdução .....	42
Material e Métodos .....	44
Resultados .....	45
Discussão .....	47
Referências Bibliográficas .....	49
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>53</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

As formigas são insetos sociais, e como tal, possuem características inerentes que permitem identificá-los, tais como sobreposição de gerações, divisão reprodutiva do trabalho e cuidado cooperativo com a prole (Hölldobler e Wilson 1990). Também, possuem como característica marcante seu forrageamento e a habilidade de explorar, manejar e defender uma fonte de recurso. Dentre os insetos sociais, as formigas são os mais abundantes e diversos (15.983 espécies descritas) (AntWeb 2016), ocupando diferentes hábitats.

Dentre os insetos sociais o grupo das formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) é o que exhibe maior polimorfismo. Tal característica reflete em uma série de atividades específicas realizadas em função do tamanho do corpo das operárias (Wilson 1980), sugerindo uma relação entre especialização das operárias e eficiência da colônia (Beshers e Fewell 2001). Assim, durante o forrageamento, processamento vegetal para incorporação no fungo simbionte e demais atividades da colônia, as operárias se dividem na execução das diversas tarefas de acordo com a casta a que pertencem. Este polimorfismo pode ser extensamente observado nas trilhas de forrageamento, onde as operárias desempenham diferentes tarefas e comportamentos.

Por possuírem grandes colônias com milhões de operárias, e visto que durante o forrageamento ocorre o recrutamento em massa (Jaffé e Howse 1979), as trilhas constituem-se em verdadeiras vias de tráfego que aumentam consideravelmente a taxa de entrega de recursos no ninho pelas operárias (Sales et al. 2015). Entretanto, alguns problemas podem ocorrer. Quando o fluxo de operárias está aumentado, por exemplo, um incremento nas taxas de encontro entre as operárias acontece (Dussutour et al. 2007), causando atrasos no deslocamento dos indivíduos, que têm até 20% de sua velocidade reduzida (Burd e Aranwela 2003). A redução da velocidade causa um congestionamento no tráfego de operárias (Burd et al. 2002), levando a uma diminuição nas taxas de entrega de recurso.

A entrega do recurso no ninho é um importante fator mantenedor da *performance* no forrageamento. Além disso, a seleção de material vegetal para o corte e transporte também constitui importante quesito do forrageamento. Apesar de as formigas cortadeiras serem polífagas, sabe-se que a seleção do material é criteriosamente baseada em características químicas e/ou físicas das plantas. Isto porque

o material coletado serve como substrato para cultivo do fungo simbiote da colônia (Weber 1972, Wilson 1980, Andrade et al. 2002, Hastenreiter et al. 2015). Além disso, o cuidado com a nutrição e a saúde do jardim de fungo passa também pela limpeza do material vegetal, visto que tal comportamento diminui a entrada de microrganismos patogênicos no ninho, que podem causar grandes perturbações no fungo simbiote (Currie 2001, Currie e Stuart 2001) e nos indivíduos da colônia (Jaccoud et al. 1999).

A limpeza do material vegetal pode ser realizada fora do ninho por pequenas operárias localizadas sobre os fragmentos transportados (Griffiths e Hughes 2010). Comumente estas pequenas operárias podem ser observadas ao longo da trilha de forrageamento executando o comportamento de caroneira (Wetterer 1991).

Muitos pesquisadores sugerem que as operárias caroneiras tem a função de proteger as forrageiras do ataque de forídeos parasitoides (Diptera, Phoridae) (Eibl-Eibesfeldt e Eibl-Eibesfeldt 1967, Feener e Moss 1990, Vieira-Neto et al. 2006, Elizalde e Folgarait 2012). De fato, Bragança et al. (1998) registraram um aumento relativo de caroneiras na presença de forídeos. Outros autores também verificaram que as caroneiras mantinham uma postura de alarme quando sobre as folhas (Elizalde e Folgarait 2012, Hastenreiter et al. 2015b), como à espera de um parasitoide. Entretanto, Vieira-Neto et al. (2006) verificaram que a presença de parasitoides não aumentou a frequência com que o comportamento de caroneira ocorre, apesar de Linksvayer et al. (2002) considerarem que a defesa contra forídeos parasitoides é a única função deste comportamento.

Operárias mínimas –possíveis caroneiras- atuam juntamente com as forrageiras na seleção de material vegetal para o corte (North et al. 1999). Nesse caso, a fim de economizar a energia de deslocamento no retorno ao ninho, as mínimas executariam o comportamento de caroneira nos fragmentos de folhas que as forrageiras estivessem transportando. A economia de energia só é possível porque a energia despendida para o deslocamento de duas operárias no retorno ao ninho, uma transportando folha e outra não (mínima), é maior que a energia gasta no retorno da forrageira transportando o fragmento de folha e sobre ele a caroneira (Feener e Moss 1990).

Uma vez fora do ninho, operárias também poderiam assumir a condição de caroneiras e ingerir a seiva que exsuda do material recém-cortado (Linksvayer et al. 2002). Isto porque a maior parte da energia metabólica das operárias provém da seiva dos fragmentos transportados (Bass e Cherret 1995, Silva et al. 2003). Além disso, foi verificado que a frequência de caroneiras sofre um incremento quando o fragmento de

folhas possui seiva extravasada (Vieira-Neto et al. 2006). Entretanto, a saída do ninho somente para obtenção de seiva é improvável, haja vista que as operárias mínimas manipulam os fragmentos vegetais no interior do ninho para processamento e incorporação no jardim de fungo (Andrade et al. 2002; Camargo et al. 2003; Lopes et al. 2003, Hastenreiter et al. 2015a). Assim, sugere-se que a ingestão de seiva durante a execução do comportamento de carona é oportunista, sendo secundária à real função da caroneira (Vieira-Neto et al. 2006).

Também no interior do ninho, durante o processamento e incorporação do material vegetal no jardim de fungo simbiote as operárias mínimas executam a tarefa de lambr os fragmentos (Camargo et al. 2003, Hastenreiter et al. 2015a). A tarefa de limpeza das folhas transportadas seria, então, uma precedência do processamento que ocorre no interior do ninho. Dessa forma, as caroneiras lambr os fragmentos durante o transporte para limpeza e/ou adição de enzimas (Weber 1972). Como observado por Griffiths e Hughes (2010) as caroneiras removem tricomas das folhas, diminuindo a entrada de contaminantes no ninho, podendo esta ser a função primária das caroneiras (Vieira-Neto et al. 2006).

Ainda outra hipótese é a impossibilidade de descida do fragmento de folha. Nesse caso, as operárias mínimas estariam no fragmento de folha no momento do corte, visto que essa casta de operárias ajuda na seleção de folhas (North et al.1999). Após o término do corte as mínimas acidentalmente seriam transportadas em conjunto com o fragmento e ficariam impossibilitadas de descer no momento do deslocamento (Stradling 1978). Em contraposição a esta hipótese, há o relato de que caroneiras sobem e descem dos fragmentos vegetais no momento de seu transporte (Kitayama et al. 2012, Hastenreiter et al. 2015b).

Pelo exposto, é evidente que as caroneiras exercem importante função na manutenção do fluxo de forrageamento, pois atuam na defesa contra forídeos parasitoides (Feener e Moss 1990, Elizalde e Folgarait 2012), removem impurezas e microrganismos do fragmento vegetal (Griffiths e Hughes 2010) e economizam energia para a colônia (Feener e Moss 1990). Além disso, a presença das caroneiras não influencia na taxa de transporte de folhas individual (Yackulic e Lewis 2007, Hastenreiter et al 2015b), uma vez que as operárias que transportam caroneiras transportam também a maior carga.

Muitos são os estudos e especulações sobre a função das caroneiras. Entretanto, estudos buscando fatores promotores deste comportamento são escassos. Acredita-se

que as diversas questões levantadas sobre a execução do comportamento de caroneira não sejam excludentes entre si, mas ao contrário, se complementem. Quando na presença de alguns estímulos, como a estridulação (Roces e Hölldobler 1995) e a perturbação (Feener e Moss 1990), um incremento da frequência deste comportamento é observado. Entretanto, é pouco provável que apenas estes dois fatores disparem o comportamento de caroneira. Em um sistema auto-organizável, como é o caso de colônias de formigas cortadeiras, em que as ações individual e coletiva asseguram um ajuste no forrageamento frente a modificações ocorridas no ambiente (Bonabeau et al. 1997, Gordon 1996, Dussutour et al. 2007), a tomada de decisão sobre qual tarefa desempenhar reflete as condições imediatas da trilha. Visto que operárias mínimas desempenham diferentes funções, como limpeza e manutenção (Kost et al. 2005, Evison et al. 2008), identificar os fatores promotores do comportamento de caroneira é, então, crucial na elucidação da ocorrência deste comportamento nas trilhas de forrageamento em *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893).

Investigou-se no presente estudo se o tipo ou tamanho do fragmento vegetal forrageado, a presença de fungo entomopatogênico sobre os fragmentos e a densidade de operárias na trilha de forrageamento são fatores promotores do comportamento de caroneira.

## Referências Bibliográficas

- Andrade APP, Forti LC, Boaretto MAC, Ramos VM, Matos CAO. 2002. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology** 40: 293-306.
- AntWeb. Disponível em <https://www.antweb.org>. Acessado em 05/04/2016.
- Bass M, Cherrett JM. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology** 20:1-6.
- Beckers R, Goss S, Deneubourg JL, Pasteels JM. 1989. Colony size, communication, and ant foraging strategy. **Psyché** 96: 239-256.
- Beshers SN, Fewell JH. 2001. Models of division of labor in social insects. **Annual Review of Entomology** 46: 413-40.
- Bolton B. 1994. **Identification guide to the ant genera of the world**. Cambridge, Harvard University Press, 222p.

- Bonabeau E, Theraulaz G, Deneubourg JL, Aron S, Camazine S. 1997. Self-organization in social insects. **Trends Ecology Evolution** 12:188-193.
- Bragança MAL, Tonhasca JRA, Della-Lucia TMC. 1998. Reduction in the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohniphora* sp. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 89: 305-311.
- Burd M, Aranwela N. 2003. Head-on encounter rates and walking speed of foragers in leaf-cutting ant traffic. **Insectes Sociaux** 50: 3-8. doi: 10.1007/s000400300001
- Burd M, Archer D, Aranwela N, Tradling D. 2002. Traffic dynamics of the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **American Naturalist** 159, 283-293.
- Camargo RS, Forti LC, Matos CAO, Lopes JFS, Andrade APP, Ramos VM. 2003. Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** 42: 93-102.
- Currie CR. 2001. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia** 128: 99-106.
- Currie CR, Stuart AE. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. Proceedings of the Royal Society of London, Series B: **Biological Sciences** 268: 1033-1039.
- Dussutour A, Beshers S, Deneubourg J, Fourcassié V. 2007. Crowding increases foraging efficiency in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Insectes Sociaux** 54: 158-165.
- Eibl-Eibesfeldt I, Eibl-Eibesfeldt E. 1967. Das Parasitenabwehrender Minima-Arbeiterinnen der Blattschneider-Ameise (*Atta cephalotes*). **Zeitschrift für Tierpsychologie** 24: 278-281.
- Elizalde L, Folgarait PJ. 2012. Behavioral strategies of phorid parasitoids and responses of their hosts, the leaf-cutting ants. **Journal of Insect Science** 12: 1-26 doi <http://dx.doi.org/10.1673/031.012.13501>
- Evison S, Hart A, Jackson D. 2008. Minor workers have a major role in the maintenance of leafcutter ant pheromone trails. **Animal Behaviour** 75: 963-969.
- Feener DHJr, Moss KAG. 1990. Defense against parasites by hitchhikers in leaf-cutting ants: a quantitative assessment. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 26: 17-29.
- Gordon DM. 1996. The organization of work in social insect colonies. **Nature** 380:121-124.

- Griffiths HM, Hughes WO. 2010. Hitchhiking and the removal of microbial contaminants by leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Ecological Entomology** 35: 529 - 537.
- Hastenreiter IN, Sales TA, Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS. 2015a. Use of seeds as fungus garden substrate changes the organization of labor among leaf-cutting ant workers. **Neotropical Entomology** doi 10.1007/s13744-015-0299-0
- Hastenreiter IN, Sales TA, Ribeiro LF, Santos JFL. 2015b. A convenient trip: an analysis of the impact of hitchhiker ants on forager transport rates. **Journal of Insect Behavior** doi 10.1007/s10905-015-9540-2
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. **The Ants**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 743p.
- Howard JJ. 2001. Costs of trail construction and maintenance in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Behavior Ecology and Sociobiology** 49: 348-356.
- Jaccoud DB, Hughes WOH, Jackson CW. 1999. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 93: 51-61.
- Jaffé K, Howse PE. 1979. The mass recruitment system of the leaf cutting ant, *Atta cephalotes* (L.). **Animal Behaviour** 27: 930-939.
- Kitayama K, Sousa-Souto L, Aquino PPU, Tenório LX. 2012. Trichome removal by hitchhikers in two leaf-cutting ant species (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** 59: 935-943.
- Kost C, Oliveira EG, Knoch TA, Wirth R. 2005. Spatio-temporal permanence and plasticity of foraging trails in young and mature leaf-cutting ant colonies (*Atta* spp.). **Journal of Tropical Ecology** 21:677-88.
- Linksvayer TA, McCall AC, Jensen RM, Marshall CM, Miner JW, McKone MJ. 2002. The function of hitchhiking behavior in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Biotropica** 34: 93-100.
- Lopes JFL, Camargo RS, Forti LC. 2003. Foraging behaviour and subtask hierarchical structure in *Acromyrmex* spp. (Formicidae: Attini). **Sociobiology** 42: 781-793.
- North RD, Jackson CW, Howse PE. 1999. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. **Physiological Entomology** 24:127-133.

- Roces F, Hölldobler B. 1995. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** 37: 297-302.
- Sales TA, Hastenreiter IN, Almeida NG, Lopes JFS. 2015. Fast food delivery: is there a way for foraging success in leaf-cutting ants? **Sociobiology** 62: 513-518 doi 10.13102/sociobiology.v62i4.807
- Silva A, Bacci Jr M, Siqueira CG, Bueno OC, Pagnocca FF, Hebling MJA. 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Physiology** 49: 307-313.
- Stradling DJ. 1978. The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plant defence mechanisms. **Journal of Animal Ecology** 47: 173-188.
- Vieira-Neto EHM, Mundim FM, Vasconcelos HL. 2006. Hitchhiking behaviour in leaf-cutter ants: An experimental evaluation of three hypotheses. **Insectes Sociaux** 53: 326-332.
- Weber NA. 1972. **Gardening ants: the Attines**. American Philosophical Society, Philadelphia. 146p.
- Wetterer JK. 1991. Foraging ecology of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* in a Costa Rican rain forest. **Psyché** 98: 361-368.
- Wilson EO. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 7: 143-156.
- Yackulic CB, Lewis OT. 2007. Temporal variation in foraging activity and efficiency and role of hitchhiking behaviour in leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 125:125-134. doi: 10.1111/j.1570-458.2007.00606.x

## **CAPÍTULO I - Variando o meio de transporte: influência do tipo e tamanho do substrato e o fluxo de operárias na frequência de caroneiras em *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893)**

---

### **Resumo**

O comportamento de caroneiras é caracterizado pela presença de operárias mínimas sobre os fragmentos de folhas transportados até o ninho. Apesar de estarem relacionadas à defesa de forrageiras do ataque de parasitoides, as caroneiras não estão presentes sobre todos os fragmentos forrageados, indicando que pode haver limitações quanto à sua ocorrência. Assim, o presente estudo verificou se as caroneiras ocorrem de forma aleatória ou dependente do fragmento vegetal transportado e do fluxo de operárias que saem do ninho em *Acromyrmex subterraneus*. Para tanto, foram oferecidos discos de folhas e pétalas de três diferentes tamanhos e quatro espécies de plantas (*Acalypha wilkesiana*, *Rosa* sp., *Morus nigra* e *Spathodea campanulata*) a três colônias de laboratório, ligadas por um ponte de vidro (1.5m) à arena de forrageamento. Foram oferecidos 200 discos de mesmo tamanho e espécie vegetal para cada uma das colônias e registrados a frequência de caroneiras e suas massas, o fluxo de operárias que saíam do ninho e as massas dos discos para cada tamanho e espécie vegetal. A frequência de caroneiras não variou em função da espécie vegetal tampouco com o tamanho dos discos, mas foi maior quanto maior foi o fluxo de operárias que saíam do ninho. Ressalta-se que não há interação entre o fluxo de operárias e espécie ou tamanho dos discos vegetais. A massa das caroneiras foi menor em *S. campanulata*, mas não variou em função dos tamanhos, apesar da massa dos discos ser diferente entre as espécies e tamanhos. Considerando a relação verificada entre a frequência de caroneiras, o fluxo de operárias e a taxa de encontros sugere-se que este comportamento seja estimulado pelo aumento da taxa de encontros, a qual regula a alocação de tarefas. Menores caroneiras sobre discos de *S. campanulata* e em baixa frequência sobre *Rosa* sp. pode ser explicado pela estrutura das flores, com único feixe vascular, o que pode diminuir a sua rigidez. O presente estudo adiciona o fluxo de operárias que saem do ninho como um novo fator promotor do comportamento de caroneiras aos já conhecidos na literatura.

**Palavras-chave:** forrageamento, formigas cortadeiras, *Acromyrmex subterraneus*.

## Abstract

The hitchhiking behavior is characterized by minimal workers over the leaves fragments which are transported into the nest. Although the occurrence of hitchhikers is not rare they are not observed over all leaves fragments along the foraging trail. Here, we analyzed if hitchhikers occurrence is random or fragment- e traffic-dependent. We tested disks of three different areas of *Acalypha wilkesiana* (Euphorbiaceae), *Rosa* sp. (Rosaceae), *M. nigra* (Rosaceae) and *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae). For each size and plant species we offered 200 disks to three laboratory colonies with 2L of fungus garden volume. We registered the frequency of hitchhiker and its mass, the flow of outbound workers and the disk masses. We found that frequency of hitchhikers was not related to plant species neither to disks size, although the disks mass was different among the plant species. The frequency of hitchhikers is related with outbound workers flow. There was no interaction between worker flow and size or plant species. The mass of hitchhikers varied among plant species but do not among disk sizes. *S. campanulata* had smaller hitchhikers in comparison with *A. wilkesiana*. Our results demonstrate that hitchhikers could occur in any fragment sizes or plant species. Hitchhiker role could be triggered by a higher number of head-on encounters along the foraging trail promoted by the outbound workers. Thus, when a stimulus happens, minimal workers adopt the condition of hitchhikers and develop the function related. The fact that over *S. campanulata* disks were the smallest hitchhiker plus the low hitchhiker occurrence over *Rosa* sp. disks could be explained by the flower veins structure, which decrease the substrate toughness. Our work is important to delineate the ecological and behavioral hitchhikers' mechanisms on foraging trails, adding a new fact that could promote the hitchhiking behavior.

**Keywords:** foraging, leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus*.

## Introdução

Em formigas cortadeiras o forrageamento é um complexo processo no qual aspectos sociais e individuais interagem para determinar a entrada de fragmentos de folhas no ninho e explorar o ambiente de forma a maximizar a coleta de material (Roces e Hölldobler 1994). Fazem parte desse processo a exploração do ambiente, a seleção da espécie vegetal, seu corte e transporte além do recrutamento de operárias forrageadoras pelas operárias escoteiras (Roces 2002).

Apesar de diversas plantas serem utilizadas como fonte de recurso para formigas cortadeiras (Hölldobler e Wilson 1990), a seleção do material a ser forrageado é um importante quesito do forrageamento. Isto porque o material coletado serve de substrato para crescimento do fungo simbiote (Weber 1972, Wilson 1980, 1983, Andrade et al. 2002), o *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer), que é a principal fonte alimentar dos imaturos da colônia (Weber 1972, Quinlan e Cherrett 1979, Bass e Cherrett 1995). Muitos fatores influenciam diretamente na seleção do substrato a ser forrageado, como a anatomia, a bioquímica e a fisiologia das espécies (Cherrett 1972, Rockwood 1975, Littleddyke e Cherrett 1976, Bowers e Porter 1981). Sabe-se, por exemplo, que a quantidade de água contida em um fragmento de folha determina a maior ou menor taxa de transporte pelas operárias (Bowers e Porter 1981). Também sementes de gergelim impedem o crescimento do jardim de fungo (Pagnocca et al. 1990, Ribeiro et al. 1998) e operárias evitam forrageá-las após exposição prévia (Hastenreiter et al. 2015a). Dado que o mutualismo entre formigas cortadeiras e seu fungo simbiote é muito intrincado, as operárias são hábeis na detecção de substâncias que inibem o crescimento fúngico (Ridley et al. 1996).

Outro importante fator componente do forrageamento das formigas cortadeiras é o transporte do material coletado e cujo sucesso está diretamente relacionado com o comportamento de corte do vegetal. O tamanho do fragmento vegetal cortado geralmente tem uma relação direta com o tamanho da operária, porque estas fazem o corte utilizando as pernas metatorácicas como pivô (Wilson 1980a). O transporte e corte em conjunto refletem na eficiência do forrageamento, visto que o tamanho do fragmento influencia na velocidade do deslocamento das operárias (Moll et al. 2010), podendo deslocar o centro de gravidade da transportadora (Zollikofer 1994). Porém no início do forrageamento esta relação entre tamanho da operária e tamanho do fragmento se altera.

Isto porque as operárias cortam fragmentos menores a fim de acelerar o processo de recrutamento (Roces e Hölldobler 1994).

Um importante comportamento que pode ser comumente observado ao longo da trilha de forrageamento é o comportamento de caroneira. Sabe-se que as caroneiras tem importante função na manutenção do fluxo de forrageamento, visto que atuam na defesa contra forídeos parasitoides (Feener e Moss 1990, Elizalde e Folgarait 2012), removem impurezas e microrganismos do fragmento vegetal (Griffiths e Hughes 2010) além de economizarem energia para a colônia (Feener e Moss 1990) sem influenciar na taxa de transporte de folhas individual (Yackulic e Lewis 2007, Hastenreiter et al. 2015b).

A importância da caroneira como mecanismo de defesa das forrageiras se faz mais acentuada dado que os parasitoides geram a redução do fluxo de forrageamento (Tonhasca et al. 2001, Bragança e Medeiros 2006) e aumentam a frequência de operárias pequenas nas trilhas, as quais transportam fragmentos menores (Bragança et al. 1998) assim influenciando no desempenho da colônia (Feener 2000). Visto que os forídeos afetam tanto o fluxo quanto a eficiência do forrageamento, as caroneiras deveriam estar presentes em todos ou na maioria dos fragmentos vegetais, o que não é observado. De fato, tem-se caroneiras presentes em apenas 2.1% dos fragmentos de folhas, ao passo que operárias mínimas, isto é, caroneiras em potencial, representam aproximadamente 10% dos indivíduos nas trilhas (Hughes e Goulson 2001).

Se as caroneiras atuam na defesa contra forídeos e não ocorrem sobre todas as folhas, supõem-se então que o tamanho ou a espécie de planta forrageada seja limitante ao comportamento de caroneira e que as caroneiras selecionem em qual fragmento de folha estão hábeis a subir. A partir deste pressuposto, o objetivo deste estudo foi verificar se a ocorrência de caroneiras é aleatória ou dependente do fragmento vegetal transportado e do fluxo de forrageiras de *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893).

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Mirmecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, utilizando três colônias de *A. subterraneus* com aproximadamente 2,5 L de fungo simbionte. As colônias foram mantidas sob temperatura controlada (22 a 25°C) e umidade relativa do ar em torno de 80%. Um teste piloto foi realizado com o intuito de selecionar diferentes espécies de plantas para realização do experimento. Assim, foram oferecidas folhas de azaleia (*Rhododendron*

*simsii*), amora (*Morus nigra*), ameixa (*Eriobothrya japonica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), quaresmeira (*Tibouchina granulosa*), crista-de-galo (*Acalypha wilkesiana*), ipê-de-jardim (*Tecoma stans*), casca de laranja (*Citrus sinensis*) seca e úmida além de flores de rosa (*Rosa* sp.) e bisnagueira (*Spathodea campanulata*). O teste foi realizado oferecendo-se 200 discos de 0.5 cm<sup>2</sup> das espécies listadas. Destas, apenas folhas de amora (*Morus nigra*) e crista-de-galo (*Acalypha wilkesiana*) e flores de rosa (*Rosa* sp.) e bisnagueira (*Spathodea campanulata*) tiveram 100% do carregamento num tempo máximo de 2 h, sendo, portanto, utilizados para experimentação.

Para realização dos experimentos as colônias foram conectadas a uma arena de forrageamento por uma ponte de vidro de 1.5 m de comprimento, onde foi estabelecido na porção mediana um ponto para observação e registro da frequência de caroneiras. Também se realizou a filmagem da trilha durante todo o processo, visando a quantificação do fluxo de operárias que saíam do ninho (fluxo OUT). Foi também mensurada a massa das caroneiras e determinado o valor médio da massa de cada tamanho de disco e espécie de planta utilizada no experimento.

Para investigar a relação entre tamanho dos fragmentos transportados e frequência de caroneiras foram confeccionados discos de três tamanhos diferentes (P, M, G) a partir das quatro espécies vegetais selecionadas. Os discos foram obtidos com um furador manual e tinham tamanhos padronizados. Os substratos grandes (G) tinham uma área de 0.50 cm<sup>2</sup>; discos médios (M) possuíam 0.38 cm<sup>2</sup>; e discos pequenos (P) tinham 0.20 cm<sup>2</sup>. Foram oferecidos 200 discos de cada espécie vegetal e tamanho de disco uma única vez em cada uma das três colônias, totalizando 36 eventos experimentais.

Para verificar a homocedasticidade e a normalidade dos dados de fluxo, frequência de caroneiras e massa das caroneiras e dos fragmentos foram utilizados os testes de Bartlett e de Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando os testes demonstravam que os dados não eram homocedásticos e/ou normais, realizou-se a transformação dos dados em logaritmo na base 10. Após este procedimento a homocedasticidade e normalidade dos dados foram novamente verificadas. Em seguida, visto não haver interação entre as variáveis explicativas, os dados foram submetidos a ANCOVA para avaliar: i) se a frequência das caroneiras variou em função, da espécie vegetal, do tamanho do disco e do fluxo OUT; ii) se a massa dos discos variou em função da espécie vegetal e do tamanho do disco; e iii) se a massa das caroneiras variou em

função da espécie vegetal e do tamanho do disco. Quando a ANCOVA revelou diferenças significativas, procedeu-se o teste de Tukey HSD. Todas as análises foram realizadas ao nível de 5% de significância no software R (R Development Core Team 2009).

## Resultados

A frequência de caroneiras não variou em função da espécie vegetal ( $df=3$ ,  $F=0.26$ ,  $p=0.86$ ) tampouco do tamanho dos discos oferecidos na arena de forrageamento ( $df=2$ ,  $F=0.004$ ,  $p=0.99$ ) (Fig.1). Apesar da variação da frequência de caroneiras não ser explicada pela sua ocorrência nas diferentes espécies vegetais, observam-se valores mais altos de ocorrência em *A. wilkesiana* seguidos de *M. nigra*, *S. campanulata* e *Rosa* sp. (Fig 1).

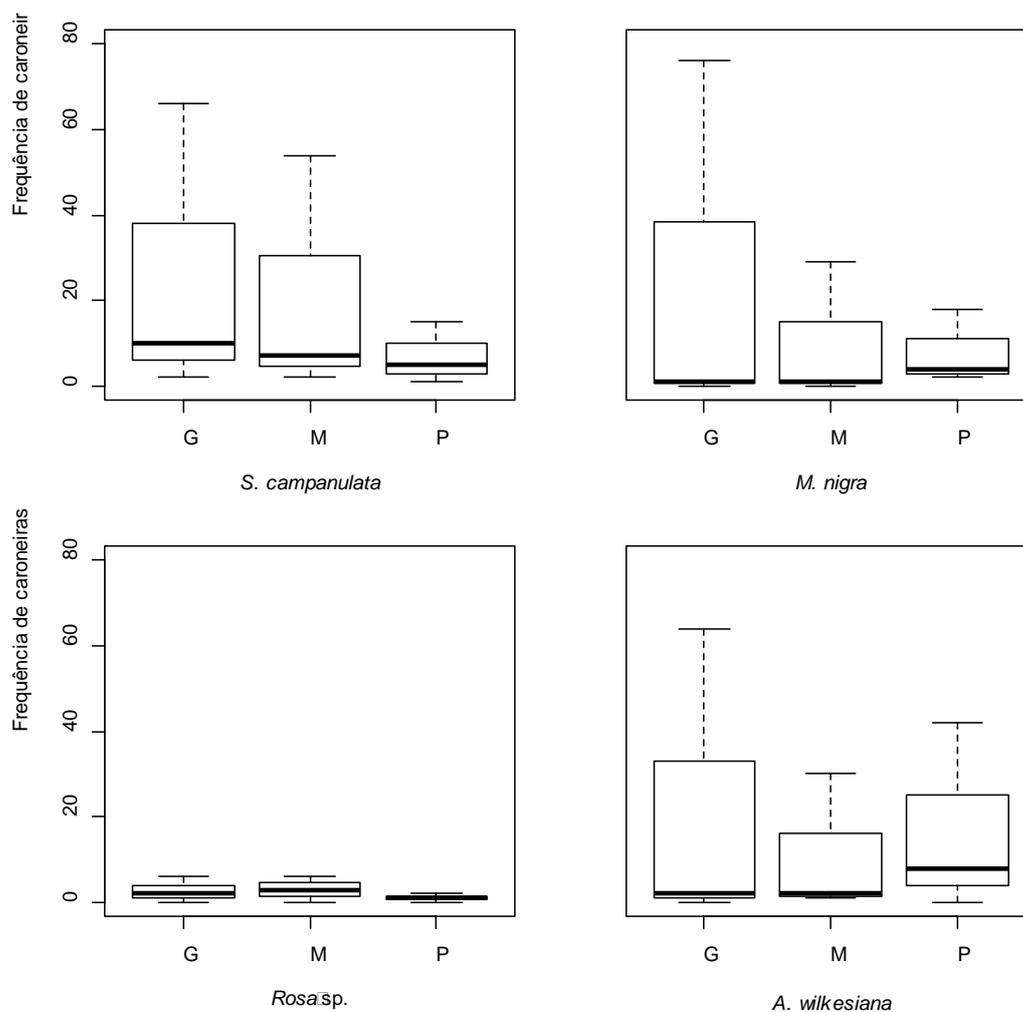


Figura 1. Frequência de caroneiras nos três tamanhos de discos (G, M e P) sobre *S. campanulata*, *M. nigra*, *Rosa* sp. e *A. wilkesiana*.

Apesar deste resultado, verificou-se diferença significativa da massa dos discos entre as espécies vegetais ( $df=3$ ,  $F=123.36$ ,  $p<0.01$ ), com exceção de *A. wilkesiana* e *S. campanulata* (Tukey HSD:  $p=0.81$ ), e entre os tamanhos ( $df=3$ ,  $F=189.63$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 2). Considerando as espécies vegetais, em ordem decrescente, tem-se maior massa para os discos de *S. campanulata* e *A. wilkesiana* seguidos de *Rosa* sp. e *M. nigra*. Já em relação ao tamanho tem-se maior massa nos discos G, M e P, também em ordem decrescente. Estes resultados demonstram que a ocorrência de caroneiras não é dependente da espécie, nem do tamanho tampouco da massa do fragmento vegetal.

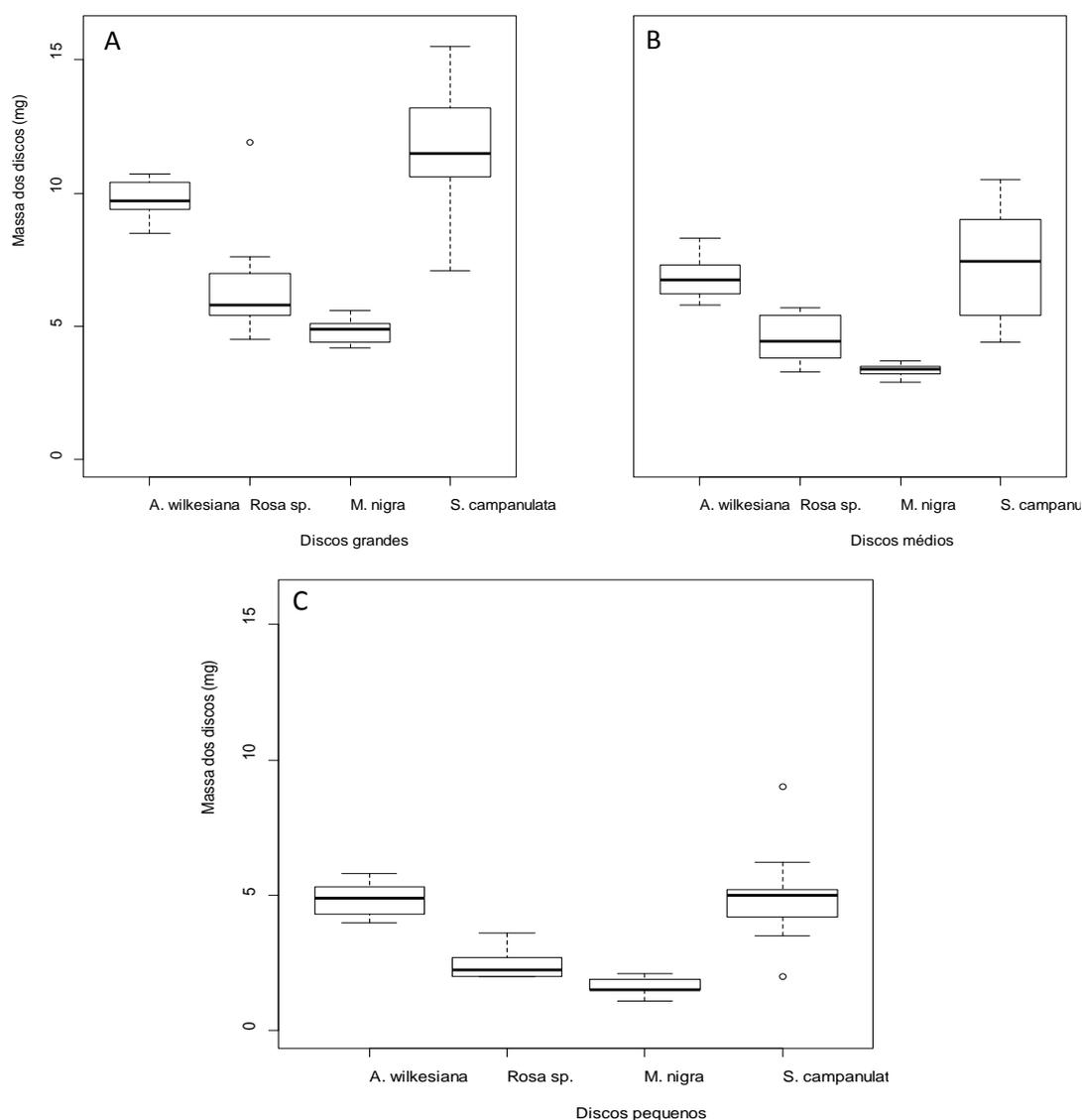


Figura 2. Massas dos discos (mg) grandes, médios e pequenos de *A. wilkesiana*, *Rosa* sp., *M. nigra* e *S. campanulata*. A – Discos grandes; B – Discos médios; C – Discos pequenos.

A partir da massa das caroneiras verifica-se que estas pertenciam à classe de tamanho pequena e apesar de inseridas na mesma classe de tamanho, houve variação

significativa da massa das caroneiras entre as espécies vegetais ( $df=3$ ,  $F=4.26$ ,  $p<0.01$ ). Caroneiras com menores massas ocorreram nos discos de *S. campanulata* em comparação com os discos de *A. wilkesiana* (Tukey HSD:  $p<0.05$ ) (Fig. 3). Não foi verificada diferença significativa entre a massa das caroneiras considerando o tamanho dos discos ( $df=2$ ,  $F=2.16$ ,  $p=0.12$ ).

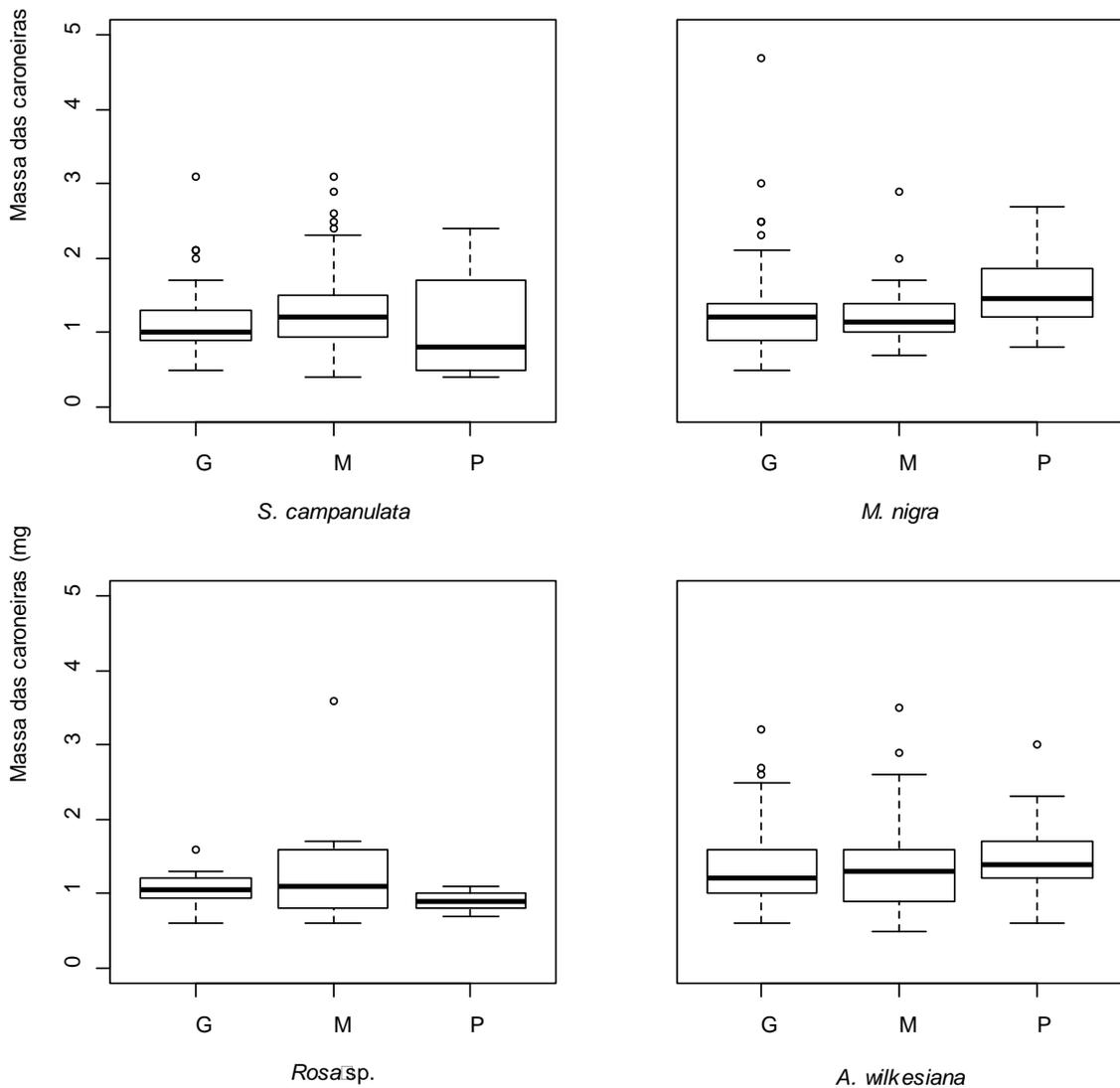


Figura 3. Massa das caroneiras (mg) presentes nos discos grandes, médios e pequenos sobre *S. campanulata*, *M. nigra*, *Rosa sp.* e *A. wilkesiana*.

Por outro lado, a frequência de caroneiras aumentou significativamente com o aumento do fluxo OUT ( $df=1$ ,  $F=4.87$ ,  $p=0.03$ ), indicando que quanto maior o número de indivíduos na trilha maior a frequência de caroneiras (Fig. 4). Ressalta-se que anterior à realização da ANCOVA, verificou-se que não havia interação significativa entre o fluxo de operárias que saíam do ninho com a espécie ou tamanho do disco vegetal, indicando que o aumento da frequência de caroneiras em relação ao maior fluxo ocorreu da mesma forma em todas as espécies e tamanhos de disco testados.

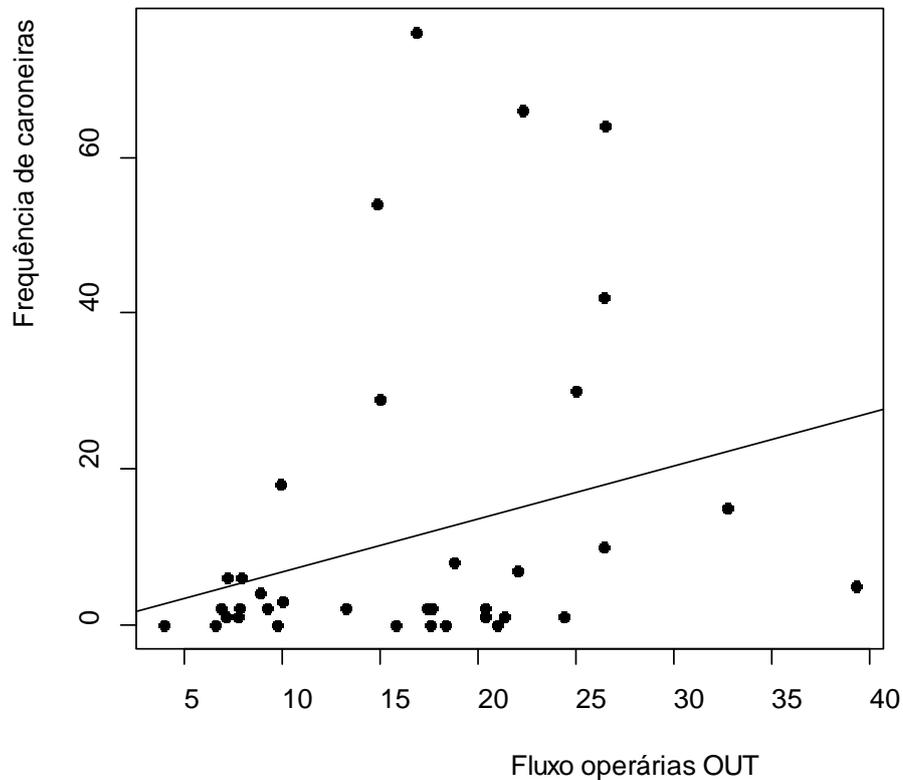


Figura 4. Relação entre frequência de caroneiras e fluxo de operárias que saem do ninho em direção à arena de forrageamento em todos os tratamentos realizados.

## Discussão

O tamanho ou o tipo de espécie forrageada não foi limitante para a ocorrência de caroneiras, podendo ocorrer caroneiras em todas as espécies vegetais testadas, independente dos tamanhos de disco. Também, sobre pétalas de *S. campanulata* ocorreram as menores caroneiras dentre todos os tratamentos, a despeito dos discos desta espécie serem os com maior valor de massa. Destaca-se que o aumento da frequência de caroneiras foi relacionado ao maior fluxo de operárias saindo do ninho.

A seleção de vegetais para forrageamento é uma tarefa minuciosa que exige das operárias a percepção das necessidades do fungo simbiote da colônia, visto que o material coletado serve de substrato para o seu crescimento. Esta seleção é principalmente baseada nas características das plantas, tanto químicas quanto físicas, sendo a preferência por determinadas características vegetais já bastante documentada (Hubbell e Wiemer 1983; Howard 1987, 1990; Nichols-Orians e Schultz 1990; Meyer et al. 2006). Entretanto, operárias forrageiras não se utilizam de informações referentes à totalidade da colônia, mas sim de informações locais para execução de qualquer tarefa (Bonabeau et al. 1997). Em consonância, as caroneiras não foram hábeis em selecionar o fragmento vegetal no qual subiram em função da espécie, tamanho ou massa. Isto porque as caroneiras se utilizaram das informações presentes na trilha, ou seja, o fragmento vegetal transportado naquele momento. Dessa forma, executaram o comportamento de caroneira igualmente em todos os fragmentos, independentemente do tamanho, espécies ou massa do fragmento.

A frequência de caroneiras não variou em função dos diferentes tamanhos de discos testados, em contraposição ao estudo realizado por Kitayama et al. (2012) com *Atta sexdens* (Lineus, 1758) e *Atta laevigata* (Smith, 1858), no qual esta variação é verificada. Entretanto, os dois tamanhos de disco testados pelos autores eram maiores que os oferecidos no presente estudo. Tais tamanhos não foram passíveis de serem utilizados aqui, visto que operárias forrageiras de *Atta* sp. são maiores (2.2 a 2.4 mm de largura de cabeça) (Wilson 1980b) que de *Acromyrmex* (1.2 a 1.6 mm de largura de cabeça) (Forti et al. 2004). Os autores indicam que o aumento da frequência de caroneiras nos discos maiores está relacionado com a maior facilidade das caroneiras em subir e descer destes discos em relação aos discos pequenos.

Também foi observado que as caroneiras pertenciam a menor classe de tamanho e que em discos de pétalas de *S. campanulata* ocorreram as menores caroneiras dentro desta classe. Aliado a este resultado, registrou-se baixa ocorrência de caroneiras sobre os discos de *Rosa* sp. e *S. campanulata*, o que pode estar relacionado ao fato de que estes foram confeccionados com pétalas de flores em vez de folhas. As pétalas, apesar de essencialmente semelhantes às folhas em termos de estrutura, apresentam um único feixe vascular, enquanto as folhas são supridas por três ou mais feixes vasculares, tendo o mesófilo completamente permeado por nervuras (Raven et al. 2001). Tal configuração pode conferir menor dureza às pétalas em relação aos discos de folhas. Nas folhas, esta dureza é determinada por propriedades da epiderme e de algumas células que formam uma parede espessa imediatamente abaixo (Juniper e Jeffree 1983, Grubb 1986).

O aumento do número de operárias saindo do ninho significa maior disponibilidade de indivíduos na trilha, atingindo um contingente tal de operárias que permitirá que mais operárias pequenas assumam o comportamento de caroneira. Operárias pequenas nas trilhas se distribuem entre as tarefas de marcação química (Evison et al. 2008), remoção de detritos (Farji-Brener et al. 2010) e caroneiras (Hastenreiter et al. 2015b). Supõe-se aqui que uma vez que a trilha já estava estabelecida, dado o incremento do fluxo no forrageamento, estas operárias foram alocadas para a tarefa de caroneira, o que explica a relação verificada.

A alocação de tarefas em uma trilha de forrageamento proporciona o ajuste de operárias envolvidas em uma atividade de acordo com a situação corrente da colônia (Gordon e Mehdiabadi 1999). As atividades não são independentes: o número de operárias desempenhando uma atividade dependerá da quantidade de operárias desempenhando outras (Gordon 1989) e a decisão de executar determinada tarefa dependerá de sinais fornecidos pelo ambiente bem como de sinais sociais resultantes das interações com outros indivíduos (Gordon 2002). Assim sendo, uma operária deve executar uma tarefa caso exista uma tendência de outros indivíduos a executarem outra tarefa relacionada. O estímulo para execução de tarefa pode ser disparado por um contato com um indivíduo co-colonial (Greene e Gordon 2003) e em consonância, a execução do comportamento de caroneira pode ser disparada pela maior taxa de contatos entre indivíduos na trilha ou na arena de forrageamento, promovida pelo aumento do fluxo de indivíduos. Sugere-se que o comportamento de caroneira foi disparado pelos estímulos que as operárias pequenas receberam das companheiras de

ninho que saíam do ninho, em função do demonstrado aumento da frequência deste comportamento com o aumento do fluxo de operárias que saíram do ninho.

Por outro lado, o aumento da taxa de encontros entre as operárias também implica em um atraso na entrega de recursos, pois a cada encontro há redução na velocidade de deslocamento das forrageiras, causando um congestionamento e conseqüente redução do fluxo (Burd e Aranwela 2003; Dussutour et al. 2007). Com o fluxo mais lento, a probabilidade de uma operária forrageira ser atacada por um forídeo parasitoide deve aumentar consideravelmente, o que seria, *per si*, um estímulo à execução do comportamento de caroneira. Isto porque as caroneiras defendem efetivamente as forrageiras contra o ataque e ovipostura dos forídeos parasitoides (Feener e Moss 1990, Elizalde e Folgarait 2012).

Na literatura são conhecidos alguns fatores promotores da ocorrência de caroneiras, sendo eles a estridulação das operárias forrageiras no momento do corte do fragmento vegetal (Roces e Hölldobler 1995) e distúrbio causado pela presença de forídeos ao longo da trilha (Feener e Moss 1990). No presente estudo não foi possível correlacionar a ocorrência de caroneiras com o tipo ou tamanho do fragmento forrageado, embora tenha sido demonstrada uma alta capacidade de adaptação das caroneiras às condições correntes na trilha, visto adequação do tamanho do corpo de acordo com o tipo de fragmento vegetal forrageado. Assim, as caroneiras podem ter evoluído independente da espécie vegetal e do tamanho do fragmento forrageado, conferindo maior amplitude para ocorrência deste comportamento. Além disso, o presente trabalho vem adicionar o aumento do fluxo de operárias que saem do ninho como fator promotor da ocorrência de caroneiras.

## Referências Bibliográficas

Andrade APP, Forti LC, Moreira AA, Boaretto MAC, Ramos VM, Matos CAO. 2002.

Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology** 40: 293-306.

Bass M, Cherrett JM. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomological** 20:1-6.

Bragança MAL, Medeiros ZCS. 2006. Ocorrência e características biológicas de forídeos parasitoides (Diptera, Phoridae) da saúva *Atta leavigata* (Smith)

- (Hymenoptera, Formicidae) em Porto Nacional, TO. **Neotropical Entomology** 35:408-411.
- Bragança MAL, Tonhasca AJr, Della-Lucia TMC. 1998. Reduction in the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora* sp. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 89: 305-311.
- Bonabeau E, Theraulaz G, Deneubourg JL, Aron S, Camazine S. 1997. Self-organization in social insects. **Trends Ecology Evolution** 12:188-193.
- Bowers MA, Porter SD. 1981. Effect of foraging distance on water content of substrates harvested by *Atta columbica* (Guerin). **Ecology** 62: 273- 275.
- Burd, M, Aranwela N. 2003. Head-on encounter rates and walking speed of foragers in leaf-cutting ant traffic. **Insectes Sociaux** 50: 3-8. doi: 10.1007/s000400300001
- Cherrett JM. 1972. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology** 41: 647-660.
- Dussutour A, Beshers S, Deneubourg JL, Fourcassié V. 2007. Crowding increases foraging efficiency in the leaf cutting ant *Atta colombica*. **Insectes Sociuax** 54: 158-165. doi:10.1007/s00040-007-0926-9.
- Elizalde L, Folgarait PJ. 2012. Behavioral strategies of phorid parasitoids and responses of their hosts, the leaf-cutting ants. *Journal of Insect Science* 12: 1-26. doi <http://dx.doi.org/10.1673/031.012.13501>
- Evison SEF, Hart AG, Jackson DE. 2008. Minor workers have a major role in the maintenance of leafcutter ant pheromone trails. **Animal Behaviour** 75: 963-969. doi:10.1016/j.anbehav.2007.07.013
- Farji-Brener, AG, Barrantes G, Laverde O, Fierro Calderon K, Bascope F, Lopez A. 2007. Fallen branches as part of leaf-cutting ant trails: their role in resource discovery and leaf transport rates in *Atta cephalotes*. **Biotropica** 39: 211-215 2007. doi: 10.1111/j.1744-7429.2006.00256.x
- Feener DH Jr. 2000. Is the assembly of ant communities mediated by parasitoids? **Oikos** 90: 80-84.
- Feener DHJ, Moss KAG. 1990. Defense against parasites by hitchhikers in leaf-cutting ants: a quantitative assessment. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 26:17-29.
- Forti LC, Camargo RS, Matos CAO, Andrade APP, Lopes JFS. 2004. Aloetismo em *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel (Hymenoptera, Formicidae), durante o

- forrageamento, cultivo do jardim de fungo e devolução dos materiais forrageados. **Revista Brasileira de Entomologia** 48:59-63.
- Gordon DM . 1989. Dynamics of task switching in harvester ants. **Animal Behaviour** 38: 194-204.
- Gordon DM. 2002. The organization of work in social insect colonies. **Wiley Periodicals** 8: 43-46.
- Gordon DM, Mehdiabadi N. 1999. Encounter rate and task allocation in harvester ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 45: 370-377.
- Greene MJ, Gordon DM. 2003. Cuticular hydrocarbons inform task decisions. **Nature** 423: 32.
- Griffiths HM, Hughes WO. 2010. Hitchhiking and the removal of microbial contaminants by leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Ecological Entomology** 35:529-537.
- Grubb PJ. 1986. *Sclerophylls, pachyphylls* and *pyncophylls*: the nature and significance of hard leaf surfaces. In Juniper, B.E. e Southwood, T.R.E., *Insects and the plant surface*. **Edward Arnold**, London: 137-150.
- Hastenreiter IN, Sales TA, Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS. 2015a. Use of seeds as fungus garden substrate changes the organization of labor among leaf-cutting ant workers. **Neotropical Entomology** doi 10.1007/s13744-015-0299-0.
- Hastenreiter IN, Sales TA, Ribeiro LF, Santos JFL. 2015b. A convenient trip: an analysis of the impact of hitchhiker ants on forager transport rates. **Journal of Insect Behavior** doi 10.1007/s10905-015-9540-2.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. The ants. Harvard: Harvard University Press, 732 pp
- Howard JJ. 1987. Leaf cutting ant diet selection: The role of nutrients, water, and secondary chemistry. **Ecology** 68:503-15.
- Howard JJ. 1990. Infidelity of leaf cutting ants to host plants: Resource heterogeneity or defense induction? **Oecologia** 82:394-401.
- Hubbell SP, Wiemer DF. 1983. Host plant selection by an Attine ant. In Jaisson P (ed.), *Social Insects in the Tropics*. Paris: **Université Paris-Nord**, pp. 133-54.
- Hughes WHO, Goulson D. 2001. Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant, *Atta capiguara*. **Sociobiology** 49: 503-508.
- Juniper BE, Jeffree CE. 1983. Plant surfaces. **Cambridge**, UK: CUP, 93p.

- Kitayama K, Sousa-Souto L, Aquino PPU, Tenório LX. 2012. Trichome removal by hitchhikers in two leaf-cutting ant species (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** 59: 935-943.
- Littledyke M, Cherret JM. 1976. Variability in the selection of substrate by the leaf cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research** 65:33-47.
- Meyer ST, Roces F, Wirth R. 2006. Selecting the drought stressed: Effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Functional Ecology** 20:973-81.
- Moll K, Roces F, Federle B. 2010. Foraging grass-cutting ants (*Atta vollenweideri*) maintain stability by balancing their loads with controlled head movements. **Journal of Comparative Physiology** 196:471-480.
- Nichols-Orians CM, Schultz JC. 1990. Interactions among leaf toughness, chemistry, and harvesting by attine ants. **Ecological Entomology** 15:311-20.
- Pagnocca FC, Silva OA, Hebling-Beraldo MJ, Bueno OC, Fernandes JB, Vieira PC. 1990. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research** 80:349-352
- Quinlan RJ, Cherrett JM. 1979. The role of fungus in the diet of the leaf cutting ants *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology** 4: 151-160.
- Ridley P, Howse PE, Jackson CW. 1996. Control of the behaviour of leaf cutting ants by their symbiotic fungus. **Experientia** 52: 631-635.
- Ribeiro SB, Pagnocca FC, Victor SR, Bueno OC, Hebling M Jr, Bacci M Jr, Silva OA, Fernandes JB, Vieira PC, Silva MFGF. 1998. Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 27:421-426.
- R Development Core Team. 2013. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>. Accessed in 12 September 2013.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2001. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 906p.
- Roces F. 2002. Individual complexity and self-organization in foraging by leaf-cutting ants. **Biological Bulletin** 202: 306-313.
- Roces F, Hölldobler B. 1994. Leaf density and a trade-off between load-size selection and recruitment behavior in the ant *Atta cephalotes*. **Oecologia** 97: 1-8.

- Roces F, Hölldobler B. 1995. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** 37: 297-302.
- Rockwood LL. 1975. The effects of seasonality on foraging in two species of leaf-cutting ants (*Atta*) in Guanacaste Province Costa Rica. **Biotropica** 7: 176-193.
- Tonhasca Jr A, Bragança MAL, Erthal Jr M. 2001. Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux** 48: 154-158.
- Yackulic CB, Lewis OT. 2007. Temporal variation in foraging activity and efficiency and role of hitchhiking behaviour in leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 125:125-134. DOI: 10.1111/j.1570-458.2007.00606.x
- Weber NA. 1972. Gardening ants: the Attines. Philadelphia: **Memoirs of the American Philosophical Society**, 146pp.
- Wilson EO. 1980a. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). I: The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 7:143-156.
- Wilson, E.O. 1980b. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). II: The ergonomic optimization of leaf cutting. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 7: 157-165.
- Wilson, E.O. 1983. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). IV: Colony ontogeny of *A. cephalotes*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 14: 55-60.
- Zollikofer CPE. 1994. Stepping patterns in ants. 2. Influence of body morphology. **Journal of Experimental Biology** 192:107-118.

## **CAPÍTULO II - Identificando riscos: variação da frequência de caroneiras frente a um patógeno em *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893)**

---

### **Resumo**

O comportamento de caroneira é caracterizado por operárias mínimas sobre as folhas que são transportadas até o ninho. Dentre as hipóteses para a ocorrência deste comportamento, tem-se que as caroneiras reduzem a carga microbiana das folhas, fazendo a limpeza dos fragmentos. Assim, foi investigado se a carga microbiana influencia a frequência de caroneiras em *Acromyrmex subterraneus*. Para tanto, foram oferecidos 200 discos de *Acalypha wilkesiana* por duas vezes para três colônias de laboratório. Foi feito o registro da frequência de caroneiras e também do fluxo de operárias que saíam do ninho. Foram feitos quatro tratamentos, a saber: i) discos *in natura*, sem manipulação; ii) discos polvilhados com talco inerte; iii) discos com antibióticos; iv) discos com conídios de *Metarhizium anisopliae*. A frequência de caroneiras variou nos diferentes tratamentos, com a probabilidade de ocorrência de caroneiras diminuindo quando *M. anisopliae* e antibióticos estavam presentes sobre os discos. Também a frequência de caroneiras foi relacionada com a maior saída de operárias do ninho. No presente estudo, não foi possível relacionar a ocorrência de caroneiras com a função de remoção de carga microbiana, visto a redução deste comportamento ter ocorrido na presença do *M. anisopliae* e também na presença de antibióticos. Sugere-se que a falta de contato prévio dos membros da colônia com os conídios fúngicos e com as soluções antimicrobianas tenha causado a baixa frequência deste comportamento sobre as folhas. As operárias teriam evitado contato com substâncias desconhecidas. Também o aumento da frequência de caroneiras relacionado com o aumento do número de operárias deixando o ninho pode ser entendido como uma estratégia de redução do número de operárias ao longo da trilha de forrageamento. Nesse caso, as operárias mínimas seriam estimuladas pelas companheiras de ninho a assumirem a condição de caroneira. A diminuição de operárias reduziria o distúrbio causado pela presença de muitas forrageiras na trilha e acarretaria em menor probabilidade de engarrafamento, evitando um atraso na entrega do recurso no ninho.

**Palavras-chave:** *Metarhizium anisopliae*, formigas cortadeiras, *Acromyrmex subterraneus*.

## Abstract

The hitchhiking behavior is characterized by minimal workers over the leaves fragments which are transported into the nest. A hypothesis for hitchhiker occurrence is that hitchhiking minimally reduces the microbial load of leaf fragments. Here, we investigated if a microbial load influences the frequency of hitchhikers for *Acromyrmex subterraneus*. We offered twice 200 *Acalypha wilkesiana* disks (52 mm<sup>2</sup>) for three mature laboratory colonies, registering hitchhikers frequency and the outbound foragers flow until all the fragments had been transported. Four treatments were tested: *in natura* disks (T1), disks with inert talcum powder (T2), disks brushed with antibiotic Amoxicillin 500mg and Ciprofloxacin Hydrochloride 500mg (T3) and disks with *Metarhizium anisopliae* conidia [ $10^{-6}$  conidia/mL] (T4). We found that treatments influenced the frequency of hitchhikers, reducing the probability of having a hitchhiker when *M. anisopliae* and antibiotics are present over the leaves. Also, more workers leaving the nest more workers assuming the condition of hitchhikers. Hitchhikers could not be related with the microbial removal of leaves specially because when there were antibiotics over the leaves the frequency of hitchhikers was also low. We suggest the absence of previous contact between the entire colony and the conidia fungal or antibiotics have caused this low frequency of hitchhikers. Yet, we could relate the increase of hitchhiker frequency with a higher flow of outbound workers and by this way, reducing the workers over-crowding along the foraging trail. Minimal ant assumes the hitchhiker role preventing unnecessary bottlenecks and head collisions. Too many minimal workers along the trail could disturb the flow and avoid a delay on return to the nest.

**Key words:** *Metarhizium anisopliae*, leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus*.

## Introdução

Formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) (Hymenoptera, Formicidae, Attini) são descritas como herbívoros dominantes do Neotrópico (Hölldobler e Wilson 1990), pois durante o forrageamento cortam várias partes de vegetais para cultivo do fungo simbiote da colônia (Della-Lúcia e Oliveira 1993). As colônias de formigas cortadeiras possuem milhões de indivíduos organizados em um complexo sistema de divisão de trabalho (Wilson 1980), no qual está embutido o forrageamento. Assume-se que 10% dos indivíduos de uma colônia estão engajados em atividades relacionadas ao forrageamento, enquanto os demais desempenham outras tarefas (Dornhaus 2008). Assim ao longo da trilha, diferentes castas de operárias executam o corte, transporte e limpeza do material forrageado (Lopes et al. 2003, Griffiths e Hughes 2010) e a manutenção de trilha química (Evison et al. 2008) e física (Kost et al. 2005). Além disso, durante todo o processo ocorre a troca de informações entre as operárias (Roces e Núñez 1993, Le Breton e Fourcassié 2004).

Outra atividade registrada durante o forrageamento é o ato de operárias da casta mínima se posicionarem sobre fragmentos vegetais que companheiras de ninho transportam até a colônia (Belt 1874, Stradling 1978, Feener e Moss 1990, Linksvayer et al. 2002, Vieira-Neto et al. 2006). As caroneiras, como são chamadas as operárias que executam este comportamento, são alvo de frequentes especulações e várias questões são levantadas para explicar a ocorrência deste intrigante comportamento. As hipóteses mais aceitas para a ocorrência das caroneiras são: i) as caroneiras protegem as forrageadoras do ataque de forídeos parasitoides (Eibl-Eibesfeldt e Eibl-Eibesfeldt 1967, Feener e Moss 1990, Elizalde e Folgarait 2012; Hastenreiter et al. 2015b); ii) para economizar energia de deslocamento no retorno ao ninho (Feener e Moss 1990); iii) para ingerir a seiva exsudada do material recém cortado (Linksvayer et al. 2002); e iv) para realizar a limpeza e/ou adição de enzimas nas folhas previamente à entrada no ninho (Weber 1972, Griffiths e Hughes 2010).

A limpeza do material vegetal forrageado diminui a entrada de microrganismos patogênicos no ninho, que podem causar grandes perturbações no fungo simbiote (Currie et al. 1999a, Currie 2001, Currie e Stuart 2001) e nos indivíduos da colônia (Jaccoud et al. 1999) conferindo grande importância às caroneiras. Dada a habilidade em reconhecer substâncias contaminantes sobre as folhas (Kermarrec e Decharme 1982, Kermarrec et al. 1986), operárias mínimas executam a limpeza das folhas durante

a incorporação destas no jardim de fungo (Camargo et al. 2003, Lopes et al. 2003) sendo a principal linha de defesa da colônia contra parasitos (Weber 1972, Wilson 1980, Jaccoud et al. 1999, Hughes et al. 2002, Poulsen et al. 2002, 2006). Assim quando operárias mínimas realizam o comportamento de caroneira é possível supor que a limpeza de folhas seja executada também fora do ninho, durante o forrageamento. De fato, caroneiras são eficientes na limpeza da folha, através da retirada de tricomas os quais acumulam microrganismos patogênicos (Griffiths e Hughes 2010), havendo aumento do número de caroneiras na presença de *M. anisopliae* sobre flocos de milho (Vieira-Neto et al. 2006).

Um importante fungo entomopatogênico que acomete colônias de formigas cortadeiras é *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) (Deuteromycotina: Hyphomycetes), espécie de fungo encontrada em grande abundância próxima aos ninhos destes insetos (Hughes et al. 2004b). Por ser um fungo entomopatogênico obrigatório (Schmid-Hempel 1998), acredita-se que seja mais facilmente percebido pelas operárias e assim mais facilmente controlado do que espécies de fungos facultativos, visto que possui uma história evolutiva em comum com formigas cortadeiras. De fato, a presença de *M. anisopliae* implica em um aumento na frequência do comportamento de limpeza em operárias (Morelos-Juarez et al. 2010). Dessa forma, supõe-se que a presença de *M. anisopliae* dispare o comportamento de caroneira.

Através de manipulações nos fragmentos de folhas, testou-se o efeito da alteração da carga microbiana sobre a frequência de caroneiras em *Acromyrmex subterraneus* ao longo da trilha de forrageamento em laboratório.

## **Material e Métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Mirmecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, utilizando três colônias de *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893) com 2L de volume de fungo simbiote. As colônias foram mantidas sob temperatura e umidade relativa do ar controladas (T=22 a 25°C; UR= aproximadamente 80%) e condições naturais de luminosidade.

A arena de forrageamento (bandeja plástica) foi conectada à colônia por uma ponte de vidro de 0.75m de comprimento, onde foi estabelecido um ponto no meio da trilha para observação e registro da frequência de caroneiras e do fluxo de operárias saindo do ninho. A frequência de caroneiras foi registrada durante todo o evento

experimental, que foi finalizado após o transporte de todos os discos. A contagem do fluxo foi realizado em intervalos de 5 minutos, com contagem contínua por 1 minuto.

Foram realizadas duas exposições a cada tratamento por colônia a fim de evitar uma contaminação significativa da colônia e formação de memória imune nas operárias (Walker e Hughes 2009). Cada exposição contava com o oferecimento de 200 discos de *Acalypha wilkesiana* (área de 0.50cm<sup>2</sup>) confeccionados com furador manual de metal. Era feito um intervalo entre 2 e 5 dias entre as exposições do mesmo tratamento na mesma colônia.

No primeiro tratamento, os discos foram oferecidos *in natura*, ou seja, as folhas de *A. wilkesiana* eram coletadas e, sem passar por manipulação, os discos eram confeccionados e oferecidos à colônia.

Para o segundo tratamento as folhas de *A. wilkesiana* foram polvilhadas com talco neutro esterilizado. Para esterilização do talco utilizou-se uma estufa de ciclagem de calor a 180°C por 12 horas. Após a esterilização, o talco foi polvilhado sobre as folhas através de uma peneira de plástico limpa com álcool 98%. Posteriormente, os discos foram confeccionados. Este tratamento visou verificar se a presença de caroneiras sobre as folhas estava relacionada a alguma substância sobre a folha, mesmo esta sendo inerte.

Para o terceiro tratamento as folhas de *A. wilkesiana* foram esterilizadas com soluções antibacterianas de dois antibióticos comerciais antes do preparo dos discos. Um comprimido de Amoxicilina 500mg e um de Cloridrato de Ciprofloxacino 500mg foram macerados e transferidos para Beckers individualizados. Posteriormente foi acrescentado 100 mL de água destilada e a suspensão levada ao banho-maria em placa aquecedora a 37°C por 30 minutos (Pita et al. 2004). Após o término da solubilização, as soluções antibacterianas foram aplicadas sobre as superfícies abaxial e adaxial das folhas com pincel previamente limpo com álcool 98%, escovando-se as folhas (adaptado de Poulsen et al. 2003) com as duas soluções em sequência. A seleção dos antibióticos foi devida ao seu amplo espectro de ação em diferentes microrganismos.

No quarto tratamento as folhas de *A. wilkesiana* foram mergulhadas em suspensão de *Metarhizium anisopliae* (concentração: 1x10<sup>6</sup> conídios/mL), agitadas manualmente durante 10 segundos (adaptado de Rohde et al, 2006) e colocadas sobre folhas de papel-toalha para secagem natural. Após a secagem das folhas, os discos foram confeccionados. A utilização do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* se deve à sua patogenicidade em formigas cortadeiras (Hughes et al. 2004a,b). A suspensão de

conídios de *M. anisopliae* foi confeccionada a partir de esporulações recentes de cultura com água destilada estéril e espalhante adesivo (Tween 80) na concentração de 0,01%.

A homocedasticidade e a normalidade dos dados de fluxo e frequência de caroneiras foram verificadas através dos testes de Bartlett e de Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando os testes demonstravam que os dados não eram homocedásticos e/ou normais, seguiu-se a transformação dos dados em logaritmo na base 10. Em seguida, os dados foram submetidos a i) ANOVA com delineamento em blocos ao acaso (colônia) para avaliar se a frequência das caroneiras variou em função dos tratamentos e da exposição, seguido do teste *post-hoc* Scott-Knott; e ii) regressão linear para verificar se a frequência de caroneiras variou em função do fluxo das operárias que saíam do ninho. Todas as análises foram realizadas ao nível de 5% de significância no software R (R Development Core Team 2009).

## Resultados

A frequência de caroneiras variou em função dos tratamentos (GL=3, F= 5.38, p=0.01), havendo uma redução significativa da frequência de caroneiras em *A. subterraneus* quando as folhas foram manipuladas com *M. anisopliae* e com antibióticos (Fig.1). Considerando as repetições, a frequência das caroneiras não variou significativamente (GL=1, F=0.50, p=0.48), indicando a alta probabilidade de não formação de memória imune das operárias em relação ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* e aos antibióticos, conferindo confiabilidade nos dados obtidos a partir da metodologia utilizada.

A frequência de caroneiras foi influenciada pelo fluxo de operárias que saíam do ninho (GL=1 e 22, F=4.40, p=0.04) (Fig2), resultado também verificado no capítulo anterior, no qual o aumento do fluxo de operárias saindo do ninho implicou no aumento de caroneiras.

Não foi observado nenhum ato comportamental diferente dos já descritos na literatura para as caroneiras (Hastenreiter et al. 2015b) independente do tratamento realizado.

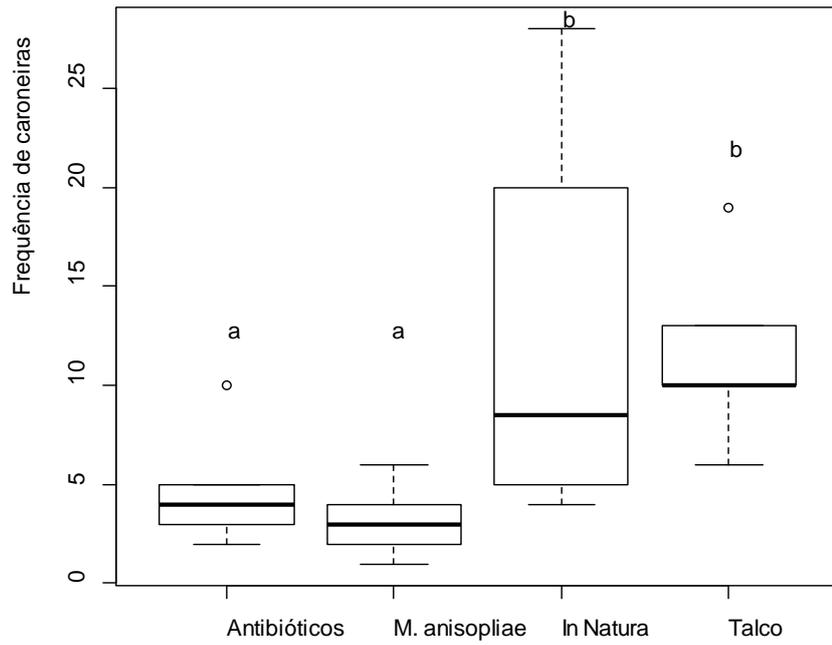


Figura 1. Frequência de caroneiras sobre os discos tratados com antibióticos, *M. anisopliae*, folhas *in natura* e talco esterilizado em *Acromyrmex subterraneus*. Letras iguais significam frequência de caroneiras estatisticamente iguais.

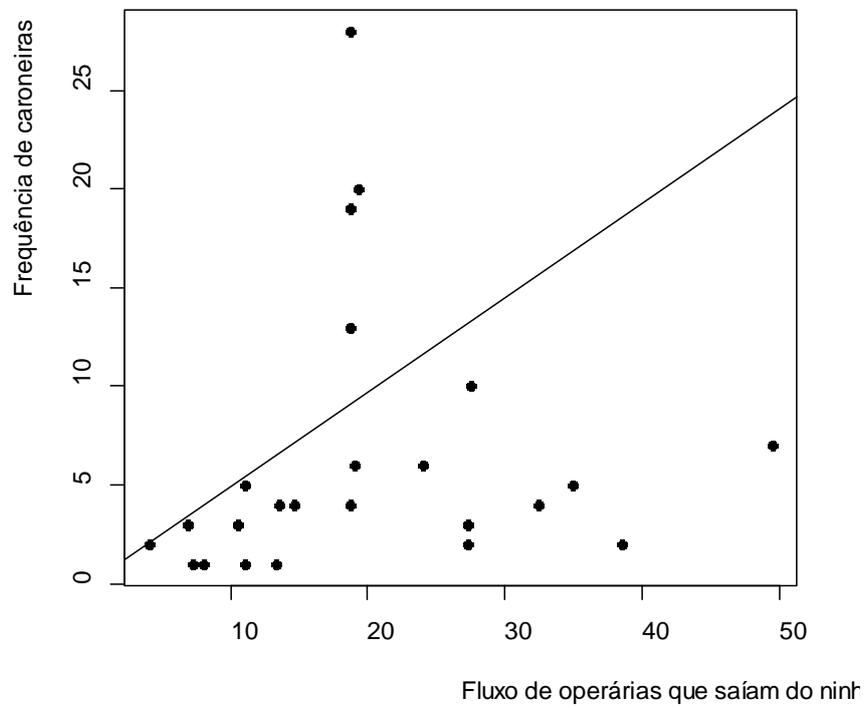


Figura 2. Frequência de caroneiras relacionada com o fluxo de operárias que saíam do ninho em *Acromyrmex subterraneus*.

## Discussão

A frequência de caroneiras em *A. subterraneus* foi influenciada pela presença de *M. anisopliae*, mas ao contrário do que se esperava, a presença do fungo entomopatogênico sobre a superfície foliar acarretou em uma baixa frequência de caroneiras. Dessa forma, os dados obtidos não permitem relacionar a ocorrência de caroneiras com a remoção da carga microbiana das folhas, especialmente porque esta redução também foi registrada quando os discos foliares foram tratados previamente com antibióticos. Por outro lado, considerando que a frequência de caroneiras teve uma relação positiva com o aumento do fluxo de operárias que saíam do ninho, sugere-se que este comportamento pode estar associado a uma estratégia de redução da perturbação causada pelo grande número de indivíduos na trilha de forrageamento. Operárias mínimas ao assumir a função de caroneira previnem, então, engarrafamentos e colisões frontais na trilha, evitando atrasos no retorno ao ninho pelas operárias transportadoras de folhas.

Dentro do grupo dos insetos, as respostas imunes frente a um patógeno variam em função da experiência prévia individual, no qual um único indivíduo aumenta sua resposta em uma exposição secundária a este mesmo patógeno (Pham et al. 2007, Rodrigues et al. 2010). No caso de formigas cortadeiras, a resposta imune deve ser analisada dentro de um contexto social, no qual o somatório das experiências prévias de cada indivíduo resulta na intensificação dos comportamentos de defesa por todos os membros do grupo, sem que o contato prévio com o patógeno tenha sido vivenciado individualmente, fenômeno denominado como imunidade social (Walker e Hughes, 2009). Esses comportamentos de defesa que compõem a imunidade social são importantes, pois controlam satisfatoriamente o estabelecimento de diversas infecções na colônia (Machado et al. 1988). Também a limpeza realizada por operárias mínimas nos fragmentos transportados para o interior do ninho é incluída como comportamento de defesa, pois promove a redução da carga microbiana presente nas folhas e conseqüentemente a probabilidade de disseminação da infecção na colônia (Griffiths e Hughes 2010).

Pensando em resposta imune como uma resposta coletiva das operárias frente ao patógeno (Walker e Hughes 2009), pode-se dizer que a baixa resposta à presença do

fungo *M. anisopliae* encontrada neste estudo pode ser atribuída ao fato de ser a primeira exposição ao contaminante experimentada pelas operárias da colônia, visto que estas colônias são criadas em laboratório desde sua fundação. Dessa forma também a resposta das caroneiras frente ao fungo entomopatogênico pode não ter sido disparada pela presença da suspensão fúngica em si justamente pela falta de exposição prévia. Isto porque a casta das operárias mínimas - caroneiras- manipula os substratos no interior do ninho, realizando o processamento vegetal e a incorporação do mesmo no fungo simbionte (Andrade et al. 2002, Camargo et al. 2003, Lopes et al. 2003, Hastenreiter et al. 2015a)

De fato, o tratamento com *M. anisopliae* acarretou em uma redução de 70.77% da frequência de caroneiras quando comparado com a frequência em folhas *in natura*. Tal resultado pode estar relacionado com a ausência de memória imune das operárias que assim não assumiram a função de limpeza das folhas atribuída ao comportamento de caroneira. A memória imune é demonstrada em *Lasius neglectus* (Van Loon, Boomsma e Andrasfalvy 1990), cujas operárias que tiveram contato prévio com *M. anisopliae* tem menor probabilidade de morrer quando submetidas a uma nova exposição ao fungo (Konrad et al. 2012). A redução do risco de morte está relacionada com a maior rapidez da defesa ao nível de grupo, que inclui aumento da frequência de *autogrooming* (revisado em Wilson-Rich et al. 2009) e *allogrooming* tanto dos indivíduos expostos quanto os não expostos previamente (Yanagawa e Shimizu 2007, Walker e Hughes 2009). Neste estudo, todas as operárias de *A. subterraneus* não tiveram qualquer contato prévio ao experimento com *M. anisopliae*, e por isso, provavelmente não exibiram uma resposta forte - alocação para o comportamento de caroneira - frente ao patógeno.

O tratamento com a solução antibacteriana também provocou redução da frequência de caroneiras sobre as folhas, com um decréscimo de 56.92% quando comparado a folhas *in natura*. As soluções antibacterianas aplicadas permitiram um amplo espectro de ação sobre possíveis microrganismos presentes nas folhas. Em consequência, pode-se inferir que as folhas estavam livres de contaminantes, não consistindo, por um lado, em um estímulo disparador do comportamento de caroneira. Mas por outro lado não era esperado que consistisse um estímulo inibidor. Semelhante ao acontecido com *M. anisopliae*, as operárias nunca haviam sido expostas anteriormente às soluções antimicrobianas, o que poderia explicar a baixa frequência de caroneiras.

Outra possível explicação é que a presença dos antibióticos nas folhas pode ter inibido o comportamento de caroneira devido ao fato do exoesqueleto das operárias ser recoberto por bactérias simbiotes (Currie et al. 1999b) que as protegem de infecções por fungos entomopatogênicos (Mattoso et al. 2012). Assim, as operárias podem ter evitado o contato com as soluções antibióticas a fim de preservar sua proteção e manter em equilíbrio a homeostase do indivíduo.

A frequência de caroneiras na presença de talco neutro esterilizado e sobre discos *in natura* foi semelhante, com um decréscimo de apenas 35.38% quando as folhas tinham talco inerte. Ao contrário, em um estudo em laboratório com *Atta laevigata* (Smith, 1858), a frequência de caroneiras em substratos *in natura* ou que continham talco inerte foi menor quando comparadas aos que continham fungo entomopatogênico (Vieira-Neto et al. 2006). Em laboratório, talco neutro é utilizado para manipulação das colônias, e, portanto material ao qual as operárias são expostas constantemente e, portanto, reconhecem.

Um fato ainda mais interessante neste estudo é a relação positiva entre frequência de caroneiras e número de forrageiras que saíam do ninho. Grande quantidade de operárias nas trilhas aumenta a eficiência do forrageamento da colônia (Dussutour et al. 2007). Entretanto, há também o aumento das taxas de encontro entre as operárias que promovem o atraso na entrega de recurso (Burd e Aranwela 2003, Dussutour et al. 2007) visto a redução de até 20% velocidade das forrageiras (Burd e Aranwela 2003). Maior tempo de exposição das forrageiras nas trilhas de forrageamento as deixa mais vulneráveis ao ataque de parasitoides e à dessecação. Assim, o número de operárias na trilha deve aumentar até atingir um limite no qual promove a eficiência, mas acima deste limite deve reduzir para que não haja decréscimo da eficiência do forrageamento (Burd e Aranwela 2003, Burd et al. 2002). Operárias mínimas sobre as folhas obviamente são uma estratégia de redução do tráfego de operárias ao longo das trilhas, diminuindo as taxas de encontro e os atrasos decorrentes delas.

Outro fato importante e recorrente em trilhas de forrageamento é a obstrução temporária das mesmas por detritos caídos (Evison et al. 2008, Farji-Brener et al. 2007). Nesse caso, operárias mínimas rapidamente cortam e removem-nos das trilhas (Howard 2001, Burd e Aranwela 2003). Tanto os detritos caídos quanto a agregação de formigas para retirá-los provocam também um atraso no processo de forrageamento (Farji-Brener et al. 2010). Apesar do tamanho reduzido das operárias mínimas não impedir que as médias e grandes caminhem sobre a trilha (Burd e Aranwela 2003), a agregação de

mínimas pode causar atraso na entrega de recurso (Fraji-Brener et al. 2010). Dessa forma, após terem cumprido a tarefa de limpeza e manutenção da trilha, as operárias podem assumir a posição de caroneiras, diminuindo o tráfego nas trilhas e o atraso da entrega de recurso no ninho decorrente dela.

Evolutivamente, o alto custo de vida em grandes colônias deve implicar em seleção de comportamentos menos custosos para os indivíduos (Farji-Brener et al. 2010). Em consonância, o custo de caroneiras sendo transportadas por outras operárias é menor comparado ao custo do retorno de ambas as operárias separadamente (Feener e Moss 1990), além de não implicar em perda na eficiência individual de forrageamento das operárias transportadoras (Yackulic e Lewis 2007, Hastenreiter et al. 2015b). Portanto, a relação entre maior número de operárias nas trilhas e frequência de caroneiras pode ser explicada pela adoção da função de caroneiras pelas mínimas e consequente redução do tráfego de operárias nas trilhas. Dessa forma, a ocorrência de caroneiras pode prevenir atrasos no forrageamento, evitar distúrbios no fluxo de forrageamento e trazer menor custo para a colônia.

Verificou-se que a presença de materiais orgânicos contaminantes e não contaminantes reduziram a frequência de caroneiras em *A. subterraneus* provavelmente em decorrência da ausência de contato prévio das operárias com as substâncias testadas. Além disso, houve um incremento de caroneiras quando o fluxo de operárias na trilha de forrageamento aumentava.

## Referências Bibliográficas

Andrade APP, Forti LC, Moreira AA, Boaretto MAC, Ramos VM, Matos CAO. 2002.

Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology** 40: 293-306.

Belt T. 1874 **The naturalist in Nicaragua**. JM Dent and Sons, London, UK.

Burd M, Aranwela N. 2003. Head-on encounter rates and walking speed of foragers in leaf-cutting ant traffic. **Insectes Sociaux** 50: 3-8. doi: 10.1007/s000400300001

Burd M, Archer D, Aranwela N, Tradling D. 2002. Traffic dynamics of the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **American Naturalist**, 159, 283–293.

- Camargo RS, Forti LC, Matos CAO, Lopes JFS, Andrade APP, Ramos VM. 2003. Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology** 42: 93-102.
- Currie CR. 2001. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia** 128: 99–106.
- Currie CR, Stuart AE. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences** 268: 1033–1039.
- Currie CR, Mueller UG, Malloch D. 1999a. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 96: 7998–8002.
- Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature** 398: 701–704. doi:10.1038/19519
- Della-Lúcia TMC, Oliveira MA. 1993. Forrageamento. In: Della-Lúcia, TMC (ed) **As saúvas**. Viçosa: UFV p. 84-105.
- Dornhaus A. Specialization Does Not Predict Individual Efficiency in an Ant. **Plos Biology** 6: e285.
- Dussutour A, Beshers S, Deneubourg JL, Fourcassié V. 2007. Crowding increases foraging efficiency in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Insectes Sociaux** 54: 158–165. doi 10.1007/s00040-007-0926-9
- Eibl-Eibesfeldt I, Eibl-Eibesfeldt E. 1967. Das Parasitenabwehrender Minima-Arbeiterinnen der Blattschneider-Ameise (*Atta cephalotes*). **Zeitschrift für Tierpsychologie** 24: 278–281.
- Evison S, Hart A, Jackson D. 2008. Minor workers have a major role in the maintenance of leafcutter ant pheromone trails. **Animal Behaviour** 75: 963–969.
- Elizalde L, Folgarait PJ. 2012. Behavioral strategies of phorid parasitoids and responses of their hosts, the leaf-cutting ants. **Journal of Insect Science** 12: 1-26. doi <http://dx.doi.org/10.1673/031.012.13501>
- Farji-Brener AG, Amador-Vargas S, Chinchilla F, Escobar S, Cabrera S, Herrera MI, Sandoval C. 2010. Information transfer in head-on encounters between leaf-cutting ant workers: food, trail condition or orientation cues? **Animal Behaviour** 79: 343–349.

- Farji-Brener AG, Barrantes G, Laverde O, Fierro-Caldero K, Bascope F, López A. 2007. Fallen branches as part of leaf-cutting ant trails: their role on resource discovery and on leaf transport rates in *Atta cephalotes*. **Biotropica** 39: 211-215.
- Feener DHJr, Moss KAG. 1990. Defense against parasites by hitchhikers in leaf-cutting ants: a quantitative assessment. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 26: 17-29.
- Griffiths HM, Hughes WO. 2010. Hitchhiking and removal of microbial contaminants by the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Ecological Entomology** 35: 529-537.
- Hastenreiter IN, Sales TA, Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS. 2015a. Use of seeds as fungus garden substrate changes the organization of labor among leaf-cutting ant workers. **Neotropical Entomology** doi 10.1007/s13744-015-0299-0.
- Hastenreiter IN, Sales TA, Ribeiro LF, Lopes JFS. 2015b. A convenient trip: an analysis of the impact of hitchhiker ants on forager transport rates. **Journal of Insect Behavior** doi 10.1007/s10905-015-9540-2
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. The Ants. Harvard University Press, **Cambridge, MA.** 743p.
- Howard J. 2001. Cost of trail construction and maintenance in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 49: 348–356.
- Hughes WOH, Eilenberg J, Boomsma JJ. 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences** 269: 1811–1819.
- Hughes WOH, Petersen K, Ugelvig L, Pedersen D, Thomsen L, Poulsen M, Boomsma J. 2004a. Density-dependence and within host competition in a semelparous parasite of leaf-cutting ants. **BMC Evolutionary Biology** 4 - 45. doi:10.1186/1471-2148-4-45
- Hughes WOH, Thomsen L, Eilenberg J, Boomsma JJ. 2004b. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 85: 46–53. doi:10.1016/j.jip.2003.12.005
- Jaccoud D B, Hughes WOH, Jackson CW. 1999. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 93: 51–61.
- Kermarrec A, Decharme M. 1982. Ecopathological aspects in the control of *Acromyrmex octospinosus* Reich (Form., Attini) by entomophagous fungi. In: Breed

- MD, Michener CD, Evans HE (eds), **Biology of Social Insects**. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 148.
- Kermarrec A, Febvay G, Decharme M. 1986. Protection of leaf cutting ants from biohazards: is there a future for microbiological control? In: C. S. Lofgren & R. K. Vander Meer (eds), **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management**. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 339–356.
- Konrad M, Vyleta ML, Theis FJ, Stock M, Tragust S, Klatt M, Drescher V, Marr C, Ugelvig LV, Cremer S. 2012. Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. **PLoS Biology** 104 :e1001300.
- Kost C, Oliveira EG, Knoch TA, Wirth R. 2005. Spatio-temporal permanence and plasticity of foraging trails in young and mature leaf-cutting ant colonies (*Atta* spp.). **Journal of Tropical Ecology** 21:677-88.
- Le Breton J, Fourcassié V. 2004. Information transfer during recruitment in the ant *Lasius niger* L. (Hymenoptera, Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology** 55: 242-250.
- Linksvayer TA, McCall AC, Jensen RM, Marshall CM, Miner JW, McKone MJ. 2002. The function of hitchhiking behavior in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Biotropica** 34: 93-100.
- Lopes JFL, Camargo RS, Forti LC. 2003. Foraging behaviour and subtask hierarchical structure in *Acromyrmex* spp. (Formicidae: Attini). **Sociobiology** 42: 781-793.
- Machado V, Diehl-Fleig E, Silva ME, Lucchese MEP. 1988. Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera-Formicidae) quando inoculadas com fungos entomopatogênicos. **Ciência e Cultura** 40: 1106-1108.
- Mattoso TC, Moreira DDO, Samuels RI. 2012. Symbiotic bacteria on the cuticle leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. **Biology Letters** 8: doi 10.1098/rsbl.2011.0963
- Morelos-Juárez C, Walker TN, Lopes JFS, Hughes WOH. 2010. Ant farmers practice proactive personal hygiene to protect their fungus crop. **Current Biology** 20: 553-554.
- Pita NOG, Prates EC, Ferraz HG. 2004. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de ciprofloxacino 250 mg comercializados como similares no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 40: 309 - 315.

- Poulsen M, Bot ANM, Currie CR, Boomsma JJ. 2002. Mutualistic bacteria and a possible trade-off between alternative defence mechanisms in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux** 49: 15–19.
- Poulsen M, Bot ANM, Currie CR, Nielsen MG, Boomsma JJ. 2003. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology** 17: 260–269.
- Poulsen M, Hughes WOH, Boomsma JJ. 2006. Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. **Insectes Sociaux** 53: 349–355.
- Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DR. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. **PLoS Pathogens** 3: e26.
- R Development Core Team. 2013. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>. Accessed in 12 September 2013.
- Roces F, Núñez JA. 1993. Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants. **Animal Behaviour** 45:135-143.
- Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science** 329: 1353-1355.
- Rohde C, Alves LFA, Neves PMOJ, Alves SB, Silva ERL, Almeida JEM. 2006. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology** 35: 231-240.
- Schmid-Hempel P. 1998. **Parasites in social insects**. Princeton University Press. 423p.
- Stradling DJ. 1978. The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plant defence mechanisms. **Journal of Animal Ecology** 47: 173-188.
- Vieira-Neto EHM, Mundim FM, Vasconcelos HL. 2006. Hitchhiking behaviour in leaf-cutter ants: An experimental evaluation of three hypotheses. **Insectes Sociaux** 53: 326–332.
- Walker T, Hughes WOH. 2009. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. **Biology Letters** 5: 446-448.
- Weber NA. 1972. **Gardening ants: the Attines**, American Philosophical Society,

Philadelphia.

- Wilson EO. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: *Atta*). II: The ergonomic optimization of leaf cutting. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 7: 157-165.
- Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT. 2009. Genetic, individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. **Annual Review of Entomology** 54:405–23.
- Yackulic CB, Lewis OT. 2007. Temporal variation I foraging activity and efficiency and role of hitchhiking behaviour in leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 125:125-134.
- Yanagawa A, Shimizu S. 2007. Resistance of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki to *Metarhizium anisopliae* due to grooming. **BioControl** 52:75–85. doi 10.1007/s10526-006-9020-x

### **CAPÍTULO III - Congestionamentos: comportamento de caroneira como estratégia de redução do tráfego de operárias na trilha em *Acromyrmex subterraneus* (Forel, 1893)**

---

#### **Resumo**

Durante o forrageamento de formigas cortadeiras milhares de indivíduos se deslocam ao longo de trilhas com alto fluxo de indivíduos. Em trilhas estreitas, o alto fluxo causa um congestionamento e, em consequência, reduz a taxa de entrega de material vegetal, visto a redução da velocidade das operárias. A alocação de tarefas nas trilhas, mediada pela taxa de encontro entre as operárias, constitui uma provável estratégia de redução do fluxo de indivíduos. Operárias mínimas, por exemplo, após a execução da marcação química da trilha, podem ser alocadas em outra função, como caroneira. Sabe-se que as operárias mínimas ao detectar ataques de parasitoides assumem a função de caroneira, mas tal comportamento também é observado na ausência destes. Assim, a ocorrência de caroneiras em condições de alta densidade, a qual promove aumento da taxa de encontros, pode traduzir uma estratégia para evitar o congestionamento do tráfego. O presente estudo teve como objetivo avaliar como a variação na densidade de indivíduos na trilha influencia a ocorrência de caroneiras. Para tanto, cinco colônias de *Acromyrmex subterraneus* foram ligadas à arena de forrageamento, contendo 100 discos de *Acalypha wilkesiana*, por trilhas de diferentes larguras (1.5 ou 3 cm). Realizou-se a contagem de caroneiras e do fluxo de operárias que saíam do ninho. Houve um incremento da frequência de caroneiras na trilha estreita e em função do fluxo de operárias que deixavam o ninho, embora o fluxo de operárias tenha sido o mesmo em ambas as larguras. Trilha mais estreita apresentava maior densidade de indivíduos, levando ao aumento da taxa de encontro entre as operárias. Taxas de encontro reduzem a velocidade de deslocamento e são agentes regulatórios de alocação de tarefas. Assim o aumento da taxa de encontros promovido pela alta densidade pode constituir um estímulo de alocação das operárias mínimas para a função de caroneira, a fim de evitar o congestionamento na trilha.

**Palavras-chave:** forrageamento, *Acromyrmex subterraneus*, congestionamento.

## **Abstract**

During foraging, millions of leaf-cutting ant workers travel along high traffic foraging trails. Along narrow trails, high traffic of workers causes traffic jam and reduces the leaf delivery rate due to the workers speed travel reduction. The worker allocation mediated by head-on encounters could constitute a strategy of traffic reduction. Minimal workers along trails, for example, could change the task after marking the trail chemically. In fact, these workers could be seen as hitchhikers. Minimal workers can detect parasitoids and thus assume hitchhiker function, but this behavior could occur even in absence of phorids. Hitchhiker occurrence could be a strategy to avoid the high density of workers mediated by head-on encounters. Here, the goal was to assess how the variation of workers density along the trail influences the hitchhiker frequency. Therefore, five *Acromyrmex subterraneus* colonies were linked to the foraging area by trails of different width (1.5 or 3cm). It has been counted the number of hitchhikers and the outbound workers flow. The frequency of hitchhikers increased along narrow trail, and also in function of outbound workers in both trail width. However, outbound foraging flow did not differ among trail width. Narrower trails had high density of workers leading an increase of head-on encounters. Head-on encounters rate promote the speed travel reduction and, furthermore, are regulatory agent of task allocation. Thus, the increase of head-on encounter rate promoted by high density could constitute a stimulus to task allocation of minimal workers to assume the function of hitchhiker to avoid traffic jam.

**Key-words:** foraging, *Acromyrmex subterraneus*, traffic jam.

## Introdução

O forrageamento em formigas é um complexo processo cujo sucesso é dependente tanto da atividade individual das operárias quanto da atividade integrada do grupo (Traniello 1989, Roces e Núñez 1993). Formigas cortadeiras possuem colônias com mais de  $10^6$  operárias (Fowler et al. 1986) e durante o forrageamento milhares de indivíduos se deslocam ao longo de um sistema de trilhas gerando um fluxo alto de indivíduos (Burd et al. 2002, Kost et al. 2005).

Tidas como característica marcante das formigas cortadeiras, as trilhas são notáveis não apenas pelo fluxo de operárias, mas também por serem conspícuas na superfície do solo, sendo construídas ativamente pelas operárias (Bruce e Burd 2012) e podendo variar em largura e comprimento (Sales et al 2015, Lopes et al. 2016). Além disso, podem ser estabelecidas em locais com diferentes características físicas que influenciam o deslocamento das forrageiras. Sabe-se, por exemplo, que há um incremento na velocidade de deslocamento das operárias em trilhas livres de folhas (Sales et al. 2015) as quais possuem delimitação física. A delimitação física das trilhas propicia maior concentração de forrageiras e conseqüente incremento da taxa de entrega de folhas à colônia, seja pelo aumento do fluxo de operárias (Sales et al. 2015) ou pela concentração do feromônio (Jaffé e Howse 1979, Sumpter 2006).

Dado que formigas cortadeiras apresentam recrutamento em massa, a largura da trilha é um importante quesito do forrageamento. Ao mesmo tempo em que menores larguras podem levar ao aumento da concentração de feromônio, que nesse caso ocorre através de um mecanismo de retroalimentação positiva (Sumpter 2006), menores larguras promovem o aumento da densidade de operárias que transitam na trilha. Quando o fluxo de operárias está aumentado, principalmente em caminhos delimitados, há um incremento nas taxas de encontro entre as operárias, que estimulam o corte de folhas (Dussutour et al. 2007), mas causam pequenos atrasos no deslocamento dos indivíduos, que representam uma redução de até 20% da velocidade de deslocamento (Burd e Aranwela 2003). A redução da velocidade causada tanto pela alta taxa de encontros ou pelo transporte de grandes cargas causa um congestionamento no tráfego de operárias (Burd et al. 2002, Farji-Brener et al. 2011).

Nesse contexto, espera-se que as operárias ajustem seu comportamento de forma a minimizar o efeito da alta densidade de indivíduos na trilha, evitando assim a formação de congestionamentos e conseqüentes atrasos na entrega de recursos. De fato,

observa-se como estratégia para manutenção da *performance* da colônia que operárias de formigas cortadeiras reduzem o tamanho dos fragmentos cortados em situações de alto tráfego de indivíduos (Farji-Brener et al. 2011) e de manipulação da largura da trilha (Dussutour et al. 2009a,b).

A alocação e troca de tarefas na trilha é fundamental na manutenção do fluxo de forrageamento e está relacionada com as taxas de encontro. Tais taxas atuam como um mecanismo de facilitação social do comportamento, na medida em que um animal é mais propenso a executar um comportamento na presença de outros engajados no mesmo comportamento (Thorpe 1963). Em formigas, as taxas de encontro fornecem informações a respeito de quantas estão engajadas em determinada atividade e estas taxas são dependentes de características coletivas, como tamanho do grupo ou densidade (Gordon e Mehdiabadi 1999). Assim quando as taxas de encontro variam há o ajuste do número de indivíduos atuando nas diferentes tarefas, em um processo auto-organizável que opera sem controle central, com operárias respondendo a estes sinais localizados e simples (Gordon e Mehdiabadi 1999).

Ao longo da trilha de forrageamento operárias da casta mínima são principalmente responsáveis por executar a marcação de trilha com feromônio (Evison et al. 2008). Quando o alto fluxo de operárias supre o papel de marcação química, estas operárias já fora do ninho poderiam, então, ser alocadas em outra função. De fato, operárias mínimas podem ser observadas executando o comportamento de caroneira (Stradling 1978), no qual sobem nos fragmentos de folhas transportados por companheiras de ninho.

Sabe-se que a condição de caroneira é assumida pelas operárias mínimas quando estas detectam que forrageiras estão sob o ataque de parasitoides (Feener e Moss 1990, Bragança et al. 1998). Entretanto, este comportamento também é observado na ausência de forídeos, o que indica que outros estímulos estejam relacionados com sua ocorrência. Dado que o aumento da densidade promove aumento da taxa de encontros e esta se relaciona com a alocação de tarefas é cabível supor que operárias mínimas troquem para a tarefa de caroneira em função da alta densidade de operárias na trilha. Assim, o presente estudo avaliou se a variação da densidade de operárias na trilha influencia na frequência de caroneiras.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Mirmecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, utilizando cinco colônias de *Acromyrmex subterraneus* com volume de fungo similar (2.5 Litros). As colônias foram mantidas sob temperatura e umidade relativa do ar controladas (T=22 a 25°C; UR= aproximadamente 80%) e mantidas com folhas frescas de *Acalypha wilkesiana* e *Flamboyant* sp. diariamente. Para a experimentação, as colônias foram privadas das folhas pelas 24h anteriores à realização dos tratamentos.

Cada colônia foi ligada à arena de forrageamento por uma ponte de vidro de 70 cm de comprimento e de largura variável. Dois tratamentos foram estabelecidos tendo em vista a largura da ponte: i) trilha larga - 3 cm de largura; ii) trilha estreita - 1.5 cm de largura. Ao final da trilha foram oferecidos na arena de forrageamento 100 discos de *A. wilkesiana* (área de 52 mm<sup>2</sup>) confeccionados com furador manual de metal a partir de folhas frescas colhidas imediatamente antes da realização do experimento.

No meio da ponte de vidro foi estabelecido um ponto para o registro da frequência de caroneiras que estavam sobre as folhas além do fluxo de operárias que saíam do ninho em direção à arena de forrageamento. O fluxo foi contabilizado por intervalos de cinco minutos com contagem contínua por um minuto. Dessa forma foi possível calcular a média de fluxo para todo o processo de forrageamento.

Cada uma das cinco colônias foi submetida a cada um dos tratamentos por cinco vezes. Entretanto, quando a frequência de caroneiras era zero as repetições eram excluídas, totalizando 34 repetições.

Os dados foram submetidos aos testes de Bartlett e Shapiro-Wilk para verificação da homocedasticidade e normalidade, respectivamente. Caso a homocedasticidade e/ou normalidade não fossem verificadas, seguia-se a transformação dos dados em logaritmo na base 10. Após este procedimento, os dados foram submetidos a ANOVA para avaliar se a frequência das caroneiras e o fluxo das operárias que saíam do ninho variaram em função dos tratamentos; e Regressão Linear para verificar se a frequência de caroneiras variou em função do fluxo de operárias que saíam do ninho. Todas as análises foram realizadas ao nível de 5% de significância no software R (R Development Core Team 2009).

## Resultados

A frequência de caroneiras variou em função da largura das trilhas ( $df=1$ ,  $F=5.38$ ,  $p= 0.027$ ), sendo maior na trilha estreita (Fig. 1). Além disso, a média do fluxo de operárias que saíam do ninho não variou em função da largura da trilha ( $df=1$  e  $32$ ,  $F=0.44$ ,  $p= 0.51$ ) (Fig. 2). Um mesmo número de indivíduos em um espaço reduzido significa maior densidade. Dessa forma, pode-se dizer que na trilha estreita havia uma maior densidade de indivíduos quando comparada à trilha larga.

Também foi verificada uma relação positiva entre a frequência de caroneiras e o número de operárias que saíam do ninho ( $df=1$  e  $32$ ,  $F=12.17$ ,  $p= 0.001$ ) (Fig. 3), resultado também encontrado nos capítulos anteriores.

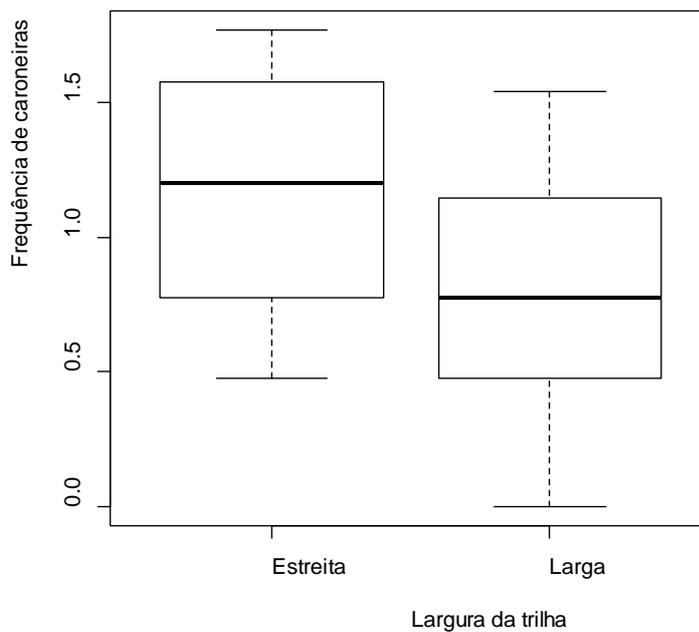


Figura 1. Frequência de caroneiras nas trilhas larga e estreita em *Acromyrmex subterraneus*.

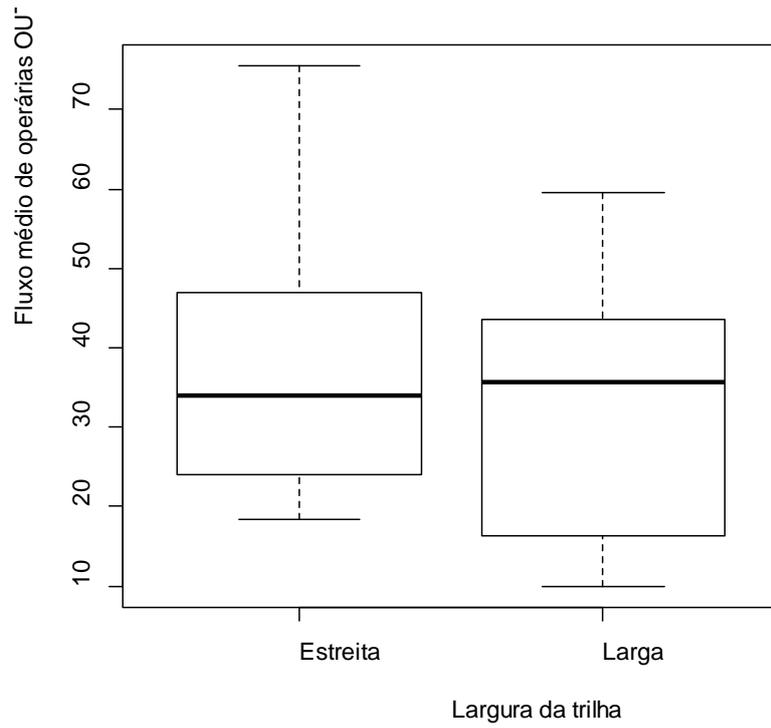


Figura 2. Fluxo médio de operárias que saíam do ninho nas trilhas larga e estreita em *Acromyrmex subterraneus*.

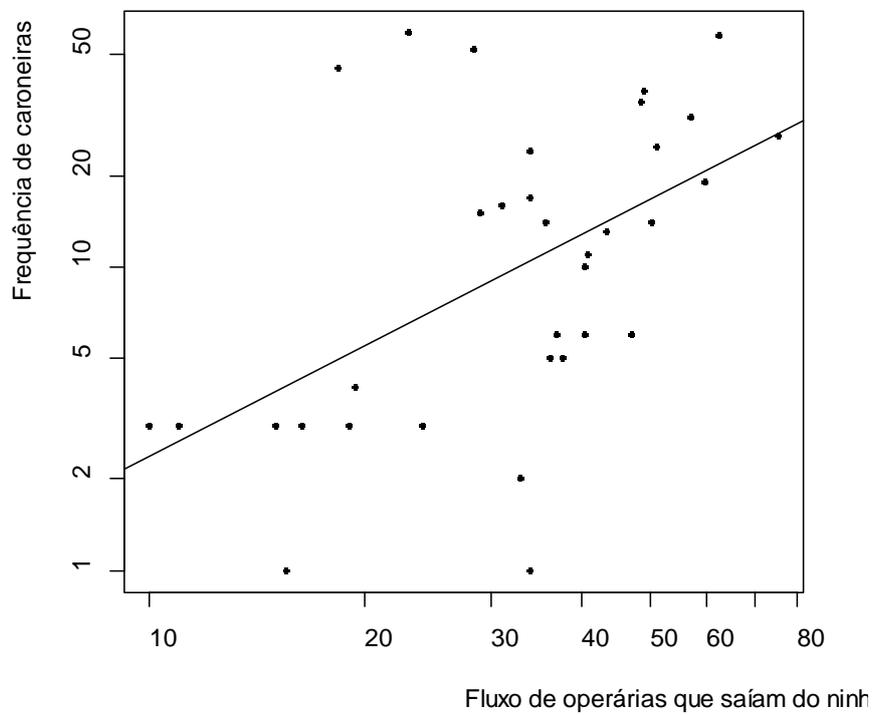


Figura 3. Frequência de caroneiras relacionada com o fluxo de operárias que saíam do ninho em *Acromyrmex subterraneus*. Eixo em logaritmo na base 10.

## Discussão

O incremento da frequência de caroneiras em trilhas estreitas indica que a função de caroneira pode configurar uma estratégia comportamental em condições de alta densidade de operárias na trilha. Por outro lado, a redução na largura da trilha não promoveu alteração do fluxo de operárias que saíam do ninho, ou seja, o número médio de operárias nas trilhas larga e estreita foi similar e em ambos os casos teve efeito positivo sobre a frequência de caroneiras. Dessa forma, dado que o fluxo não variou em função da largura da trilha, mas influenciou a frequência de caroneiras, tem-se que o aumento da densidade de operárias decorrente da redução da largura da trilha estimulou a execução do comportamento de caroneira.

As trilhas são verdadeiros corredores que ligam a colônia à arena de forrageamento e por onde passam milhões de operárias para forragear (Shepherd 1982). Nelas são aplicados montantes de feromônio pelas operárias escoteiras, forrageiras (Sumpter 2006) e mínimas (Evison et al. 2008) e em trilhas mais estreitas, espera-se que a aplicação do feromônio seja mais localizada. Neste estudo, esta afirmação torna-se mais evidente, visto que o fluxo de operárias foi similar nas trilhas estreita e larga (o número de operárias que saíam do ninho não diferiu entre as larguras). Assim, supõe-se que o mesmo número de indivíduos aplicando feromônio em uma menor área leve a um acúmulo do feromônio. Sabe-se que os forídeos são atraídos pelos mais diversos compostos voláteis, incluindo feromônio de trilha e alarme (revisado em Mathis e Phillpott 2012). Então, o acúmulo de feromônio na trilha estreita deve aumentar a probabilidade de ocorrência de forídeos sobrevoando a trilha em condições naturais. Como as caroneiras estão relacionadas com a defesa das forrageiras ao ataque de forídeos parasitoides, supõe-se que as mínimas tenham sido estimuladas pelo acúmulo de feromônio a assumir a condição de caroneira.

A redução da largura da trilha causou um aumento na densidade de indivíduos, e em consequência, houve o aumento da taxa de encontro entre as operárias (Burd e Aranwela 2003). Tais encontros entre companheiras de ninho são reconhecidos como importantes reguladores da alocação de tarefas (Gordon 2002, Gordon e Mehdiabadi 1999). Em trilhas estreitas, o comportamento de caroneira pode ter sido, então, estimulado com maior frequência pelas companheiras de ninho devido ao aumento da taxa de encontros causada pela redução da largura da trilha. De fato, durante o forrageamento, o nível de estímulo pode resultar numa modificação na alocação das

tarefas, em que operárias que não estão engajadas em determinada função passam a executá-la (Waddington e Hughes 2010). Operárias pequenas tem a função principal de marcação química da trilha (Evison et al. 2008). Entretanto, esta tarefa também é realizada pelas operárias médias e grandes (forrageiras) quando o fluxo já está estabelecido na trilha (Sumpter 2006). Nesse caso, as mínimas na trilha estariam disponíveis para a execução de outras funções relacionadas ao forrageamento. Assumindo a postura de caroneiras, operárias mínimas executariam as funções relacionadas a este comportamento e ainda economizariam energia de retorno ao ninho (Feener e Moss 1990).

Um dos modelos de explicação da dinâmica de alocação de tarefas diz que a decisão individual de uma operária engajar-se em uma tarefa é baseada em estímulos ambiental e social (Pacala et al. 1996). No presente estudo, sugere-se que ambos os estímulos possam ter causado o aumento da frequência de caroneiras, sendo o estímulo social - taxa de encontros e aplicação localizada de feromônio - amplificados pelo estímulo ambiental de estreitamento da trilha. De fato, em insetos sociais ambos os estímulos contribuem para a alocação de tarefas (Gordon 2003).

O aumento da taxa de encontros é decorrente do número de operárias que saíam do ninho o qual se relacionou positivamente com a frequência de caroneiras. Além disso, mais indivíduos saindo do ninho significam mais operárias disponíveis para o transporte de folhas, que é essencial para a execução do comportamento de caroneira, pois para a ocorrência de caroneiras é imprescindível o transporte de folhas. O mesmo resultado foi obtido nos outros experimentos que constam nessa tese, apresentados nos capítulos 1 e 2.

Sabe-se que em trilhas estreitas as operárias são hábeis em evitar congestionamentos por mecanismos comportamentais. Quando uma via alternativa de tráfego é disponibilizada, parte das operárias se dirige à trilha alternativa após encontro com uma companheira de ninho que trafegava na trilha principal em sentido oposto, dividindo o fluxo de forrageamento (Dussutour et al.2004). Além disso, o fluxo pode ser organizado temporalmente, em blocos alternados de operárias que saem e que retornam ao ninho (Dussutour et al. 2005). Estas estratégias comportamentais são sugeridas como alternativas para reduzir a taxa de encontros entre as operárias e evitar os atrasos decorrentes delas (Dussutour et al. 2005). Outras estratégias relacionadas ao congestionamento de tráfego é a redução do tamanho dos fragmentos foliares transportados evitando-se o *truck-driver effect* (Farji-Brener et al. 2011) e organização

espacial do fluxo, em que as mínimas transitam pela parte lateral da trilha, onde existe maior número de obstáculos (Brugger 2015).

O estímulo para o comportamento de caroneira por diferentes agentes já é conhecido na literatura (forídeos: Feener e Moss 1990, estridulação: Roces e Hölldobler 1995). No presente estudo, soma-se a estes agentes a alta densidade de indivíduos na trilha, que leva a um potencial congestionamento do tráfego de indivíduos. Tal congestionamento gera custos que vão desde a redução da taxa de entrega de recurso até a redução de 20% da velocidade de deslocamento das forrageiras (Burd e Aranwela 2003). Nesse contexto, operárias permanecem um período maior de tempo fora do ninho, tendo aumentados os riscos de dessecação, competição (de Biseau et al. 1997) e de ataque por parasitoides (Feener e Moss 1990). A fim de evitar congestionamentos e consequentes retardos no retorno ao ninho, há um aumento da frequência do comportamento de caroneiras em trilhas estreitas. Isto porque ao assumir a função de caroneira tem-se dois indivíduos ocupando um menor espaço se comparado a estes mesmos indivíduos caminhando ao longo da trilha. Neste estudo, indica-se que o comportamento de caroneira representa uma nova estratégia para evitar o congestionamento na trilha.

## Referências Bibliográficas

- Bragança MAL, Tonhasca JRA, Della Lucia TMC. 1998. Reduction in the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora* sp. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 89:305–311
- Bruce A, Burd MC. 2012. Allometric scaling of foraging rate with trail dimensions in leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 279: 2442-2447.
- Burd M, Howard JJ. 2005. Global optimization from suboptimal parts: foraging sensu lato by leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 59: 234–242. doi 10.1007/s00265-005-0029-4
- Burd M, Aranwela N. 2003. Head-on encounter rates and walking speed of foragers in leaf-cutting ant traffic. **Insectes Sociaux** 50: 3-8. doi: 10.1007/s000400300001
- Burd M, Archer D, Aranwela N, Tradling D. 2002. Traffic dynamics of the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. **American Naturalist** 159, 283–293.

- Brugger MS. 2015. Na trilha com as escoteiras: como as operárias sabem o caminho a seguir. Tese de Doutorado. Unesp, Botucatu, São Paulo, Brasil. 66p.
- de Biseau JC, Quinet Y, Deffernez L, Pasteels JM. 1997. Explosive food recruitment as a competitive strategy in the ant *Myrmica sabuleti* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux** 44:59–73. doi 10.1007/s000400050023
- Dussutour A, Fourcassié V, Helbing D, Deneubourg JL. 2004. Optimal traffic organization in ants under crowded conditions. **Nature** 428, 70–73.
- Dussutour A, Deneubourg JL, Fourcassié V. 2005. Temporal organization of bi-directional traffic in the ant *Lasius niger* (L.). **Journal of Experimental Biology** 208, 2903–2912.
- Dussutour A, Deneubourg JL, Beshers S, Fourcassié V. 2009a. Individual and collective problem-solving in a foraging context in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Animal Cognition** 12, 21–30.
- Dussutour A, Beshers S, Deneubourg JL, Fourcassié V. 2009b. Priority rules govern the organization of traffic on foraging trails under crowding conditions in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Journal of Experimental Biology** 212, 499–505.
- Dussutour A, Beshers S, Deneubourg JL, Fourcassié V. 2007. Crowding increases foraging efficiency in the leafcutting ant *Atta colombica*. **Insectes Sociux** 54: 158-165. doi:10.1007/s00040-007-0926-9.
- Evison SEF, Hart AG, Jackson DE. 2008. Minor workers have a major role in the maintenance of leafcutter ant pheromone trails. **Animal Behaviour** 75: 963-969.
- Farji-Brener AG, Chinchilla FA, Rifkin S, Cuervo AMS, Triana E, Quiroga V, Giraldo P. 2011. The ‘truck-driver’ effect in leaf-cutting ants: how individual load influences the walking speed of nest-mates. **Physiological Entomology** 36: 128–134 doi 10.1111/j.1365-3032.2010.00771.x
- Feener DH Jr, Moss KAG. 1990. Defense against parasites by hitchhikers in leaf-cutting ants: a quantitative assessment. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 26: 17–29.
- Fowler H, Pereira-da-Silva V, Forti LC, Saes N. 1986. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management** (Ed. by Logfren CS e R K Vander Meer), pp. 123–145. Boulder, Colorado: Westview Press.
- Gordon D. 2002. The regulation of foraging activity in red harvester colonies. **American Naturalist** 159: 509–518.

- Gordon DM. 2003. The Organization of Work in Social Insect Colonies. **Wiley Periodicals, Inc.**, Vol. 8, No. 1.
- Gordon DM, Mehdiabadi N. 1999. Encounter rate and task allocation in harvester ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 45: 370–377.
- Jaffé K, Howse PE. 1979. The mass recruitment system of the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes* (L). **Animal Behavior** 27: 930-939. doi 10.1016/0003-3472(79)90031-9.
- Lopes JFS, Brugger MS, Menezes RB, Camargo RS, Forti LC, Fourcassié V .2016. SpatioTemporal Dynamics of Foraging Networks in the Grass-Cutting Ant *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Formicidae, Attini). **PLoS ONE** 11: e0146613. doi:10.1371/journal.pone.0146613
- Kost C, Gama de Oliveira G, Knoch T, Wirth R. 2005. Spatio-temporal permanence and plasticity of foraging trails in young and mature leaf-cutting ant colonies (*Atta* spp.). **Journal of Tropical Ecology** 21: 677–688.
- Mathis KA, Phillpott SM. 2012. Current understanding of future prospects of host selection, acceptance, discrimination, and regulation of phorid fly parasitoids that attack ants. **Psyché** Article ID 895424, 9 p.
- Pacala SW, Gordon DM, Godfray HCJ. 1996. Effects of social group size on information transfer and task allocation. **Evolutionary Ecology** 10: 127–165.
- R Development Core Team. 2013. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>. Accessed in 12 September 2013.
- Roces F, Hölldobler B. 1995. Vibrational communication between hitchhikers and foragers in leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*). **Behavioral Ecology and Sociobiology** 37:297-302.
- Roces F, Núñez JA. 1993. Information about food quality influences load-size selection in recruited leaf-cutting ants. **Animal Behavior** 45: 135-143.
- Sales TA, Hastenreiter IN, Almeida NG, Lopes JFS. 2015. Fast Food Delivery: Is There a Way for Foraging Success in Leaf-Cutting Ants? **Sociobiology** 62: 513-518 doi 10.13102/sociobiology.v62i4.807.
- Shepherd JD. 1982. Trunk trails and the searching strategy of a leaf-cutter ant, *Atta colombica*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 11: 77-84. doi 10.1007/BF00300095
- Stradling DJ. 1978. The influence of size on foraging in the ant, *Atta cephalotes*, and the effect of some plant defence mechanisms. **Journal of Animal Ecology** 47: 173-188.

- Sumpter DJT. 2006. The principles of collective animal behavior. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 361: 5-22. doi: 10.1098/rstb.2005.1733./
- Thorpe WH. 1963. **Learning and instinct in animals**. Methuen, London
- Traniello JFA. 1989. Foraging strategies of ants. **Annual Review of Entomology** 34:191-210
- Waddington SJ, Hughes WOH. 2010. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*: the role of worker size, age and plasticity. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 64: 1219 – 1228.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As investigações ecológico-comportamentais propostas sobre o comportamento de caroneira em *Acromyrmex subterraneus* revelam que assumir o papel de caroneiras constitui uma estratégia comportamental de alta plasticidade relacionada com a redução de engarrafamento na trilha.

As caroneiras ocorreram aleatoriamente sobre os discos vegetais nas diferentes espécies e tamanhos testados, não sendo, portanto, estes fatores condicionantes à sua incidência durante o forrageamento. Dessa forma, as operárias mínimas estão aptas a assumir o papel de caroneira independente do tamanho ou tipo de vegetal selecionado pelo contingente de operárias forrageiras. Mostra-se que houve inclusive uma adequação do tamanho da caroneira em função do substrato transportado constituir-se de folha ou pétala, o que garante a ampla ocorrência do comportamento. Por outro lado, a presença de substâncias desconhecidas para as operárias sobre os fragmentos transportados implicou em uma redução da ocorrência deste comportamento. Assim, não foi possível relacioná-lo com a remoção de carga microbiana presente no substrato para cultivo do fungo anteriormente à sua entrada no ninho.

A ocorrência de caroneiras respondeu a variações no tráfego de forrageamento em todas as manipulações realizadas no presente estudo. Tal constatação é ainda mais evidente visto o incremento de caroneiras em função do aumento da densidade de operárias na trilha. O aumento do tráfego em trilhas de forrageamento promove o aumento da taxa de encontros, a qual é agente regulatório de alocação de tarefas. Sugere-se que o comportamento de caroneira é estimulado pela taxa de encontros, podendo ser considerado uma estratégia comportamental para redução do tráfego de operárias nas trilhas.

Em sistemas auto-organizáveis, como é o caso de colônias de formigas cortadeiras, a resposta das operárias frente a estímulos simples e localizados sem um comando central representados pelas manipulações impostas é essencial na manutenção da *performance* do forrageamento. Este estudo destaca o comportamento de caroneira realizado pelas operárias mínimas como parte essencial deste sistema, sendo imprescindível na organização do tráfego de operárias visto que reduz a probabilidade de ocorrência de engarrafamentos na trilha.