

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

**SOBREVIVÊNCIA EM UM PERÍODO CRÍTICO:
ANÁLISES DO EVENTO REPRODUTIVO E DA FASE DE FUNDAÇÃO DE
COLÔNIAS DE *Acromyrmex subterraneus***

JUIZ DE FORA

2017

Tatiane Archanjo de Sales

**SOBREVIVÊNCIA EM UM PERÍODO CRÍTICO:
ANÁLISES DO EVENTO REPRODUTIVO E DA FASE DE FUNDAÇÃO DE
COLÔNIAS DE *Acromyrmex subterraneus***

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^a.Dr^a. Juliane Floriano Lopes Santos

Juiz De Fora – MG

Março de 2017

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

Sales, Tatiane Archanjo de.

Sobrevivência em um período crítico: análises do evento reprodutivo e da fase de fundação de colônias de *Acromyrmex subterraneus* / Tatiane Archanjo de Sales. -- 2017.

80 f.

Orientadora: Juliane Floriano Lopes Santos

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, 2017.

1. Forrageamento. 2. Voo nupcial. 3. Período de fundação. 4. Genética. 5. *Acromyrmex subterraneus*. I. Santos, Juliane Floriano Lopes, orient. II. Título.

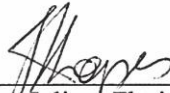
**“SOBREVIVÊNCIA EM UM PERÍODO CRÍTICO: ANÁLISES DO EVENTO
REPRODUTIVO E DA FASE DE FUNDAÇÃO DE COLÔNIAS DE
ACROMYRMEX SUBTERRANEUS”**

Tatiane Archanjo de Sales

Orientador: Profa. Dra. Juliane Floriano Lopes Santos

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Juiz de
Fora, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de
Doutor em Ecologia Aplicada ao
Manejo e Conservação de
Recursos Naturais.

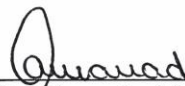
Aprovado em 09 de março de 2017.



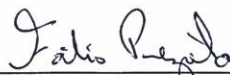
Profa. Dra. Juliane Floriano Lopes Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Prof. Dr. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Alexander Machado Auad
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA



Prof. Dr. Fábio Prezoto
Universidade Federal de Juiz de Fora- UFJF



Profa. Dra. Mariana Brugger silva
Universidade Estadual Paulista - UNESP

À todos que me apoiaram nessa longa etapa.

*... porque em se tratando de evolução,
não há destino nem retorno...*

John Maynard Smith

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas e por sempre atender minhas preces.

À minha mãe, meu pai, meu avô e minha prima Mayra que mesmo não entendendo bem o meu trabalho, me davam motivos pra nunca desistir. Amo vocês.

À Professora Doutora Juliane Lopes, orientadora, amiga, conselheira, que me acolheu com todo carinho e sempre acreditou em mim. Obrigada pela confiança e por todo o aprendizado.

Aos colegas de laboratório Bel, Nilhian e Kelly pelas conversas e apoio durante todo esse tempo.

Ao meu grande amigo Rodrigo Bastos, que esteve comigo nos momentos mais difíceis sempre me fazendo acreditar no quanto sou competente e posso ir além.

A todos os amigos do Teatro! Como vocês me engradeceram e ajudaram a me redescobrir e reinventar nos momentos mais adversos.

Ao Prof. Dr. William Hughes por ter me recebido na Inglaterra, por ter acreditado e incentivado meu projeto.

À querida Julia Jones, por ter me acolhido calorosamente em sua casa e também a Tobias Pamminger por tudo que me ensinaram, por todo o apoio nos meses em que vivi em Brighton.

Aos amigos Julia Jones e Cristina Botías, Andrea Penado, Tobias Pamminger e David Treanor pelos cafés, jantares, pubs e conversas que tornaram minha vida na Inglaterra bem mais agradável e divertida.

Ao grande amigo Will Garrett por todas as grandes descobertas em um novo país, pelos ensinamentos da língua Inglesa, pela grande amizade, incentivo e companheirismo, especialmente na reta final.

Agradeço ao Programa Ciência sem Fronteiras, pela oportunidade concedida de estudar em outra universidade renomada, viver em uma nova cultura, aprimorar meu inglês e expandir meus horizontes. Sem esse apoio eu jamais teria condições financeiras de concretizar esse sonho, muito obrigada.

À todos que participaram direta ou indiretamente na conclusão deste projeto.

Ninguém vence sozinho... MUITO OBRIGADA A TODOS!

RESUMO

(Sobrevivência em um período crítico: Análises do evento reprodutivo e da fase de fundação de colônias de *Acromyrmex subterraneus*). O voo nupcial e a fase de fundação são o período mais crítico no ciclo de vida das formigas, pois fatores como predação, dissecação, contaminação, e inúmeros outros podem interferir na dispersão e acasalamento dos indivíduos reprodutivos, na escavação e forrageamento das rainhas. A mortalidade durante este período é bastante alta e por isso as decisões tomadas devem favorecer a sobrevivência e o sucesso dos indivíduos. Sendo assim o presente estudo teve como objetivo investigar alguns aspectos do período inicial do ciclo de vida de *Acromyrmex subterraneus* a fim de i) esclarecer as vantagens do voo nupcial prematuro, bem como se sua ocorrência é menor porém comum a muitas colônias ou menor dada a participação de poucas colônias; ii) avaliar o efeito da massa das rainhas na sobrevivência e produtividade das colônias incipientes iii) por fim, avaliar o custo do forrageamento para rainhas em termos energéticos e em termos de fitness durante o período de fundação da colônia. Dados genéticos e morfológicos revelaram que o voo nupcial prematuro é um evento restrito a poucas colônias, e que o fator genético deve atuar no período de desenvolvimento dos indivíduos acelerando esse processo, resultando em indivíduos menores que atingem a maturidade mais rapidamente e logo então partem para o voo. A redução da competição por locais de nidificação e do potencial de conflitos através da maior relação de parentesco entre os indivíduos podem ser fatores que favoreçam a ocorrência desse evento. Avaliando a massa de jovens rainhas fundadoras foi possível constatar que rainhas mais leves têm menores chances de sobrevivência, e que a produção de prole é similar independente da massa apresentada, indicando que fatores intrínsecos, como a massa inicial das rainhas no momento da fundação, podem também ter significativa influência na sua taxa de mortalidade. Por fim, foi revelado que a busca por alimento por si não afeta a sobrevivência das rainhas, e que os custos do forrageamento durante o período de fundação não estão diretamente ligados ao gasto lipídico mas sim ao tempo de cuidado com a prole, onde rainhas que não precisam deixar a colônia para forragear supostamente têm mais tempo para investir na criação e manutenção da colônia tornando-a mais populosa rapidamente, aumentando as chances de sucesso.

Palavras-chave: formiga cortadeira, voo nupcial prematuro, massa, custos do forrageamento

ABSTRACT

(Survival in a critical period: Analysis of the reproductive event and the foundation period of colonies of *Acromyrmex subterraneus*). The nuptial flight and foundation period are the most critical periods in the life-cycle of ants, since factors such as predation, dissection, contamination and countless others can interfere with the dispersion and mating of the reproductive individuals, and in the digging and foraging of queens. The mortality rate is very high, so the decisions made should favor the survival and success of the individuals. Therefore, this study aims to investigate some aspects of the initial period of the life-cycle of *Acromyrmex subterraneus* in order to: i) clarify the advantages of the premature flight, as well as if its occurrence is smaller yet common to many colonies, or smaller due to the participation of less colonies; ii) evaluate the effect of the mass of queens on the survival and productivity of the incipient colonies; iii) evaluate the foraging cost to the queens in terms of energy and fitness during the colony foundation period. Genetic and morphological data revealed that the premature nuptial flight is an event restricted to a few colonies, and that the genetic factor must act in the development period of the individuals, accelerating this process and resulting in smaller individuals that reach maturity and depart for flight quicker. The reduction of competition for nesting sites and of potential conflict through greater kinship between the individuals could both be factors that favor the occurrence of this event. By evaluating the mass of young, founder queens, it was possible to verify that lighter queens have less chance of survival, and that the production of offspring is similar, regardless of presented initial mass. This indicates that intrinsic factors, such as the initial mass of queens at the moment of foundation, could also have significant influence on their mortality rate. Finally, it was revealed that the search for food does not affect the survival of the queens, and that the foraging cost during the foundation period is not directly linked to the lipid expenditure. Rather that at the time of caring for offspring, where queens that don't need to leave the colony to search for food, they supposedly have more time to invest in raising and maintaining the colony, making it more populous more quickly.

Key-words: leaf-cutting ant, premature nuptial flight, mass, foraging cost

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	7
CAPÍTULO I - O voo nupcial prematuro em <i>Acromyrmex subterraneus</i> (Forel 1893): um evento comum ou restrito a poucas colônias?	12
Resumo.....	12
Abstract	13
Introdução	14
Material e Métodos	15
Resultados	19
Discussão.....	25
Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO II - Rainhas peso pesado: Influência da massa inicial sobre a produtividade de colônias e sobrevivência em <i>Acromyrmex</i> (Formicidae).....	33
Resumo.....	33
Abstract	34
Introdução	35
Material e Métodos	36
Resultados	38
Discussão.....	43
Referências Bibliográficas	49
CAPÍTULO III – Custo do forrageamento: Influência da busca por alimento no fitness de colônias jovens de <i>Acromyrmex subterraneus</i> Forel, 1893 (Formicidae)	54
Resumo.....	54
Abstract	55
Introdução	56
Material e Métodos	57
Resultados	60
Discussão.....	62
Referências Bibliográficas	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
ANEXOS	71

INTRODUÇÃO GERAL

O aprofundamento em estudos de biologia, ecologia e genética dos organismos proporcionam cada vez mais informações cruciais sobre suas demandas e perspectivas evolutivas. Algumas sociedades são tão altamente desenvolvidas que estimulam a investigação de aspectos intrigantes apresentados durante todo seu ciclo de vida. Dentre estas sociedades encontram-se as formigas, com grande importância ecológica e representatividade em diversos habitats - pouco mais de 13 mil espécies descritas (Bolton 2016). Estes organismos apresentam um grau notável de cooperação e comunicação entre os membros da colônia, uma divisão sofisticada e discreta do trabalho e um nível surpreendentemente baixo de conflito. Todas essas características direcionam os indivíduos para um objetivo comum, o sucesso da colônia (Strassmann e Queller 2007, Boomsma 2013).

As fases de desenvolvimento das colônias também apresentam significativa influência neste sucesso. Exibindo pontos bem marcados, todo o ciclo de vida de uma colônia inicia-se com o voo nupcial, seguido das fases de fundação, ergonômica e reprodutiva, na qual são produzidos os descendentes sexuais que darão origem a novas colônias (Hölldobler e Wilson 1990). O voo nupcial e a fase de fundação são os períodos mais críticos desse ciclo, havendo inúmeras variáveis que podem interferir na dispersão, acasalamento, escavação e forrageamento das rainhas (Peeters e Ito 2001, Fernández-Marín et al. 2004, Peeters 2012). Ambas as fases são objetos de estudo neste trabalho. Focando na espécie *Acromyrmex subterraneus* (Forel 1893), investigou-se dois eventos de voo nupcial - um menor e outro maior - em um curto intervalo de tempo, avaliando a origem dos machos de ambos os eventos, número mínimo de acasalamentos por colônia e explicações de diferenças morfológicas entre os indivíduos. Durante a fase de fundação, examinou-se a influência do peso inicial das rainhas (logo após o voo) sobre sua sobrevivência e produtividade, bem como os custos da busca pelo alimento durante este período crítico.

Espécie de Estudo

Acromyrmex subterraneus (Forel 1893), popularmente conhecidas como quenquéns, é uma das 33 espécies de formigas cortadeiras pertencentes ao gênero *Acromyrmex* (tribo Attini) (Bolton 2016) encontradas exclusivamente no Novo Mundo, predominantemente nos neotrópicos. No Brasil são frequentemente encontradas nos estados do Amazonas, Amapá, Ceará, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná,

Santa Catarina, e Rio Grande do Sul (Gonçalves 1961, 1964; Cassanello 1998, Pereira e Della Lucia 1998, Quirán, 1998, Delabie et al. 2011). São consideradas herbívoros bem sucedidos sendo capazes de utilizar grande variedade de plantas tais como fragmentos vegetais, flores e sementes para o cultivo do fungo simbiote do qual se alimentam (Weber 1972, Hölldobler e Wilson 1990, Hastenreiter et al. 2015).

Durante boa parte do desenvolvimento, as colônias são compostas por uma (monoginia) ou mais rainhas (poliginia) e exclusivamente por operárias fêmeas, responsáveis pelo cuidado com a colônia e prole. O número de indivíduos intracolônia é bastante variável entre as espécies e, embora seja estimado que no geral alguns ninhos de *Acromyrmex* possam atingir cerca de 170 mil indivíduos (Della Lucia e Moreira 1993), as colônias de *Ac. subterraneus* são consideradas uma das mais populosas do gênero, podendo apresentar entre 10.000 e 20.000 indivíduos (Pereira e Della Lucia 1998, Andrade 2002). A produção de descendentes sexuais (alados) ocorre em um período limitado do ano (Oster and Wilson 1978) e somente quando a população colonial atinge um determinado tamanho. O número de alados também é variável indo de 33 machos e 8 fêmeas em *Ac. octospinosus* (Reich 1793) a 3577 machos e 1606 fêmeas em *Ac. coronatus* (Fabricius 1804), com maiores valores de razão sexual machos/fêmeas (Lewis 1975, Pereira-da-Silva et al. 1981).

Ciclo de vida das colônias

Voo nupcial

O voo nupcial é um evento em que machos e rainhas deixam o ninho quase que em um mesmo momento a fim de encontrarem parceiros da mesma espécie para se acasarem (Hölldobler & Wilson 1994). Durante este período, as colônias chegam a liberar centenas ou até milhares de indivíduos reprodutivos em menos de 1 hora (Hölldobler & Wilson 1990). Em *Ac. subterraneus*, assim como para outras espécies do gênero, o voo nupcial é precedido de fortes chuvas que encharcam o solo (Johnson e Rissing 1993, Reichardt e Wheeler 1996, Rissing et al. 1996b). Em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, a revoada ocorre entre os meses de outubro e dezembro em manhãs tipicamente abafadas com temperaturas em torno de 25°C e umidade 80% (observação pessoal de eventos ocorridos nos anos de 2011, 2012, 2013, 2016).

Os machos são os primeiros a deixarem as colônias, e voam pelo menos 100 metros (veja Johnson e Rissing 1993 para *Ac. versicolor* (Pergande 1984)) formando enxames conhecidos como sítios de agregação de acasalamento. Conduzidas por mecanismos

fisiológicos e comportamentais, jovens rainhas se juntam aos machos destes enxames formando pares, que caem no solo e iniciam a cópula (Johnson e Rissin 1993, Reichardt e Wheeler 1996). A distância inicialmente transposta pelos alados aumenta tanto a chance de acasalamento com indivíduos não aparentados quanto evita a competição local durante a fundação permitindo ainda a colonização de habitats distantes (Peeters 2012). Após o comportamento reprodutivo que culmina na cópula, com duração em torno de 1 a 5 minutos, machos e rainhas se separam, podendo alçar voo novamente (Reichardt e Wheeler 1996, De Souza et al. 2011).

Em muitas espécies, dentre as quais inclui-se *Ac. subterraneus*, as rainhas acasalam com mais de um macho, característica derivada dos insetos sociais conhecida como poliandria (Hölldobler e Wilson 1990, Constant et al. 2012). A poliandria é registrada frequentemente em colônias populosas (Cole 1983) e sua ocorrência atua, dentre várias hipóteses, aumentando a diversidade genética da futura colônia. O número de machos envolvidos na cópula é determinado pela rainha e o não re-acasalamento diretamente no solo é um indicativo de que elas são capazes de controlar o número de cópulas pela quantidade de vezes que retornam ao enxameamento (Reichardt e Wheeler 1996, De Souza et al. 2011). Os machos que são efêmeros e programados basicamente para produzir esperma e copular (Shik et al. 2013), morrem logo após acasalarem com algumas rainhas (Reichardt e Wheeler 1996, Baer e Boomsma 2004) e sua aptidão portanto, só é concretizada quando a colônia torna-se madura e começa a produzir novas fêmeas sexuais.

Acreditava-se que o voo nupcial fosse um único grande evento anual para as espécies (Baer 2003), uma vez que a falta de sincronia das colônias em relação ao dia e horário de liberação de alados claramente diminui as chances de acasalamento causando prejuízos às colônias. Isso porque indivíduos reprodutivos são produzidos apenas uma vez ao ano, os machos sobrevivem apenas algumas horas após deixarem a colônia e as rainhas sofrem grande pressão de seleção. No entanto, existem relatos de dois voos nupciais anuais, distanciados por alguns dias, para algumas espécies de *Acromyrmex* (Johnson e Rissing 1993, observação pessoal de eventos ocorridos nos anos de 2011, 2012 e 2013), sendo o primeiro geralmente menor com um baixo número alados e o segundo maior com muitos indivíduos, os quais daqui em diante serão chamados de voo nupcial prematuro e principal. Entretanto, a ocorrência de dois eventos anuais não é compreendida, e análises morfológicas juntamente com ferramentas genéticas podem fornecer pistas ou até mesmo esclarecer o propósito deste fenômeno, elucidando se o voo prematuro ocorreu acidentalmente, e portanto decorrente de uma falha na sincronia de algumas colônias ou se é um evento comum.

Período de fundação

Após o acasalamento as rainhas retiram as asas utilizando as pernas posteriores e iniciam a escavação do ninho (Hölldobler e Wilson 1990), tarefa essencialmente necessária porém arriscada, uma vez que a escavação expõe as rainhas à riscos por mais tempo e sua fonte de energia é ainda mais limitada que de outros gêneros de Attini (Peeters e Ito 2001). A escavação e fundação de uma nova colônia pode ser feita por apenas uma rainha, condição conhecida como haplometrose, com a colaboração de duas ou mais rainhas, pleometrose, ou ainda pela fissão de uma colônia adulta (Hölldobler e Wilson 1977, 1990, Adams e Tschinkel 1995). Apesar de muitas espécies de formigas terem a haplometrose como tipo definido de fundação (Diehl-Fleig e Araújo 1996), muitas outras podem apresentar as duas formas (Pamilo e Rosengren 1984 para *Formica*; Rissing et al. 1986a, 1989 para *Ac.versicolor* (Pergande 1984); Diehl-Fleig e Rocha 1998 para *Ac. striatus*; Mintzer 1987 para *Atta texana*).

Passados um a três dias do voo nupcial e após o término da escavação do túnel e da câmara inicial, as rainhas expõem o pellet de fungo coletado previamente na colônia-mãe (Augustin 2007 para *Atta sexdens*, observação pessoal para *Ac. subterraneus*). A relação das formigas da tribo Attini (*Atta* e *Acromyrmex*) com alguns fungos do filo Basidiomycota é de simbiose, sendo um é extremamente necessário à sobrevivência do outro (Cherrett et al. 1989, Schultz e Brady 2008). Espécies mais derivadas conseguem inicialmente cultivar esse fungo e criar a primeira geração de operárias utilizando apenas suas reservas corporais, condição conhecida como claustralidade. Já espécies semi-claustrais precisam sair em busca de alimento a fim de ter sucesso na primeira prole (Hölldobler e Wilson 1990). Esse tipo de fundação é apresentada por muitas espécies de *Acromyrmex* (*Ac. lundi* em Weber 1972, *Ac. striatus* em Diehl-Fleig e Lucchese 1992, *Ac. versicolor* (Pergande 1984) em Rissing et al. 1986b, *Ac. octospinosus* em Cordero 1963 e Fernández-Marín et al. 2003) e frequentemente é associada à baixas taxas de sucesso devido à riscos de parasitismo da prole e predação das rainhas durante o forrageamento (Peeters e Ito 2001).

Período ergonômico e reprodutivo

As rainhas forrageiam até o surgimento de um determinado número de operárias (Fernández-Marín et al. 2004). Cordero (1963) e Fernández-Marín et al. (2003) observaram que rainhas de *Ac. octospinosus* cessam o forrageamento quando a colônia tem aproximadamente nove operárias. A partir desse momento, a tarefa das fundadoras passa a ser basicamente

depositar ovos promovendo o crescimento populacional, e as operárias passam a ser responsáveis pelos cuidados com a colônias (Soares et al, 2006). Uma colônia recém fundada deve esforçar-se para maximizar o número de operárias e sua inicial taxa de sobrevivência a qualquer custo (Hölldobler e Wilson 1990), e na medida em que surgem mais operárias, começam a serem definidas as castas, em que grupos de diferentes idades e tipo morfológico desempenham variadas atividades na colônia (Hölldobler e Wilson 1990, Forti et al. 2004, Muscedere et al. 2011).

Quando atingem a maturidade e um nível máximo de indivíduos, as colônias passam a dedicar parte da sua produção na criação de machos e rainhas virgens. O tempo exato em que essa conversão ocorre desde o momento da fundação é variável de espécie para espécie, e a produção desses reprodutivos aumenta em função do tamanho da colônia (Hölldobler e Wilson 1990). O acasalamento durante o voo nupcial entre esses indivíduos com coespecíficos provenientes de outras colônias promove o surgimento de novas colônias, garantindo assim a perpetuação da espécie.

A produção anual de centenas ou milhares de rainhas representam um grande investimento para as colônias e somente uma pequena fração dessas obterão sucesso (Peeters e Ito 2001). Muitos fatores podem interromper esta jornada, mas uma vez que conseguem vencer as pressões de seleção e iniciar a fundação, o elemento que mais contribui para a continuidade da colônia é a reserva energética inicial das rainhas. A perda de peso e de conteúdo energético durante o período de fundação é grande. Della Lucia et al. (1995) constataram que rainhas de *Atta* perdem cerca de 40% de sua massa corporal e Tschinkel (1993) evidenciou que rainhas de *Solenopsis invicta* perdem cerca de 54% do seu peso fresco e até 73% de conteúdo de gordura durante essa fase. Apesar de a massa inicial das rainhas ter influência sobre sua fecundidade e sobrevivência (Roff 1992, Stearns 1992, Wiernasz e Cole 2003), não se sabe a interferência deste carácter intrínseco em condições que favorecem a economia de energia proveniente da escavação e busca por alimento. Além disso, os prejuízos do forrageamento para espécies semi-claustrais em termos de gasto energético e fitness de um modo geral não são contabilizados. Portanto, a economia de energia efetivada durante este período pode ser considerado um outro fator importante relacionado à sobrevivência e fecundidade das rainhas até o período ergonômico.

O uso da Biologia Molecular como ferramenta

Microsatélites são uma classe de DNA repetitivo composto de pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos adjacentes que se encontram dispersos no genoma. São também denominados de repetições de seqüências simples (simple sequence repeats; SSRs) e são utilizados como marcadores moleculares (Schlötterer e Pemberton 1998). Independente do elemento repetido (CA, TG, ATG etc.) essas pequenas sequências de DNA constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (Sunnucks 2000), que podem ser amplificados via PCR a partir de um par de primers específicos (Forward e Reverse).

Alelo diferente do mesmo locus é representado por cada segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de bases) (Ferreira e Grattapaglia 1998). Cada locus de microsatélite é analisado individualmente ao utilizar-se um par de primers construído especificamente para sua amplificação ou, ainda, pode-se analisar mais de um locus por vez desde e os alelos dos loci tenham tamanhos suficientemente diferentes para migrarem em direções distintas no gel. Neste método de genotipagem, denominado de multiplex, são utilizados simultaneamente mais de um par de primers específicos na mesma reação de PCR.

Os microsatélites são muito utilizados para a determinação de grau de relação entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie (Blouin et al. 1996), patrilinhagem (Isagi et al. 2004, Constant et al. 2012) determinação do tamanho efetivo de uma população (Hauser et al. 2002), dentre outros, sendo grandes aliados em estudos de ecologia uma vez que fornecem informações mais precisas sobre a espécie estudada.

Referências Bibliográficas

- Adams ES, Tschinkel WR. 1995. Effects of foundress number on brood raids and queen survival in the fire ant *Solenopsis invicta*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 37: 233-242. doi: 10.1007/BF00177402.
- Andrade APP. 2002. Biologia e Taxonomia Comparadas das subespécies de *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hym., Formicidae) e contaminação das operárias por iscas tóxicas. 168p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Augustin JO. Sociometria e comportamento de rainhas de saúva (*Atta sexdens* Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) mantidas em laboratório. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2007. 77p.
- Baer B. 2003. Bumblebees as model organisms to study male sexual selection in social insects. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 54:521–533. doi: 10.1007/s00265-003-0673-5.
- Baer B, Boomsma JJ. 2004. Male reproductive investment and queen mating-frequency in fungus-growing ants. **Behavioral Ecology** 15(3): 426-432. doi: 10.1093/beheco/arh025.
- Bolton B. 2016. Taxonomic History. Antweb. Disponível em: <<http://www.antweb.org/description.do?name=formicidae&rank=family&project=allantwebants>> [26/11/2016]
- Boomsma JJ. 2013. Beyond promiscuity: mate-choice commitments in social breeding. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**. 368(1613):20120050. doi: 10.1098/rstb.2012.0050.
- Cassanello AML. 1998. As formigas cortadeiras no Paraguai. In: Berti Filho E, Mariconi, FAM, Fontes LR (eds) **Anais do Simpósio sobre formigas cortadeiras do cone sul**. p. 77-83.
- Cherrett JM, Powell RJ, Stradling DJ. 1989. **The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus**. In **Insect-Fungus Interactions** (Wilding. N. et al. eds).pp: 93-120. Academic Press.
- Cole BJ. 1983. Multiple mating and the evolution of social behaviour in the Hymenoptera. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 12:191–201. doi:10.1007/BF00290771.
- Constant N, Santorelli LA, Lopes JFS, Hughes WOH. 2012. The effects of genotype, caste, and age on foraging performance in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology** 23(6):1284-1288. doi: 10.1093/beheco/ars116.
- Cordero AD. 1963. An unusual behavior of the leafcutting ant queen *Acromyrmex octospinosa* (Reich). **Revista de Biologia Tropical** 11: 221–222.

- Delabie JHC, Alves HSR, Reuss-Strenzel GM, Carmo AFR do, Nascimento IC do. 2011. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no novo mundo. In: Della Lucia TMC (ed). *Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa: UFV, p. 80-101.
- Della Lúcia TMC, Moreira DDO. 1993. Caracterização dos ninhos. In: Della Lúcia TMC. (Ed) **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, p.32-42.
- Della Lucia TMC, Moreira DDO, Oliveira M.A, Araújo MS. 1995. Perdas de peso de rainhas de *Atta* durante a fundação e o estabelecimento das colônias. **Revista Brasileira de Biologia** 55: 533–536.
- De Souza DJ, Marques Ramos Ribeiro M, Mello A, Lino-Neto J, Cotta Dângelo RA, Castro Della Lucia TM. 2011. A laboratory observation of nuptial flight and mating behaviour of the parasite ant *Acromyrmex ameliae* (Hymenoptera: Formicidae). **Italian Journal of Zoology** 78(3): 405–408. doi: 10.1080/11250003.2010.490567.
- Diehl-Fleig E, Araújo AM. 1996. Haplometrosis and pleometrosis in the ant *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux** 43: 47-51. doi: 10.1007/BF01253955.
- Diehl-Fleig E, de Lucchese ME, P. 1992. Nest foundation by *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, Formicidae). In: Billen EJ, ed. **Biology and evolution of social insects**. Leuven: Leuven University Press, pp. 51–54.
- Diehl-Fleig E, Rocha ES. 1998. Escolha de Solo por Fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para Construção do Ninho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 27(1): 41-45. doi: 10.1590/S0301-80591998000100005.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Wcislo WT. 2003. Nest-founding in *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera, Formicidae, Attini): demography and putative prophylactic behaviors. **Insectes Sociaux** 50: 304–308. doi: 10.1007/s00040-003-0687-z.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Wcislo WT. 2004. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). **Biological Journal of the Linnean Society** 81: 39-48. doi: 10.1111/j.1095-8312.2004.00268.x.

- 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(1): 59-63.
- Gonçalves CR. 1961. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomológica** 4: 113-180.
- Gonçalves CR. 1964. As formigas cortadeiras. **Boletim do Campo** 20: 17-23.
- Hastenreiter IN, Sales TA, Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS. 2015. Use of seeds as fungus garden substrate changes the organization of labor among leaf-cutting ant workers. **Neotropical Entomology** 44(4):351-356. doi: 10.1007/s13744-015-0299-0.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1977. The number of queens: and important trait in ant evolution. **Naturwissenschaften** 64: 8–15. doi: 10.1007/BF00439886.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. **The Ants**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1994. **Journey to the Ants: A Story of Scientific Exploration**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Johnson RA, Rissing SW. 1993. Breeding biology of the Desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Kansas Entomology Society** 66(1):127-128.
- Mintzer A. 1987. Primary polygyny in the ant *Atta texana*: number and weight of females and colony foundation success in the laboratory. **Insectes Sociaux** 34: 108-117. doi: 10.1007/BF02223829.
- Muscudere ML, Berglund JL, Traniello JFA. 2011. Polymorphism and division of labor during foraging cycles in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Formicidae; Attini). **Journal of Insect Behavior** 24:94–105. doi: 10.1007/s10905-010-9239-3.
- Oster GF, Wilson EO. 1978. Caste and ecology in the social insects (Monographs in Population Biology, no12). Princeton University Press, Princeton, N.J.xv + 352pp.
- Pamilo E, Rosengren R. 1984. Evolution of nesting strategies of ants: genetic evidence from different population types of *Formica ants*. **Biological Journal of the Linnean Society** 21:331-348. doi: 10.1111/j.1095-8312.1984.tb00370.x.
- Peeters C. 2012. Convergent evolution of wingless reproductives across all subfamilies of ants, and sporadic loss of winged queens (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News** 16:75-91.

- Peeters C, Ito F. 2001. Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social Hymenoptera. **Annual Review of Entomology** 46:601–30. doi: 10.1146/annurev.ento.46.1.601.
- Pereira-da-Silva V, Forti LC, Cardoso LG. 1981. Dinâmica populacional e caracterização dos ninhos de *Acromyrmex coronatus* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 25:87-93.
- Pereira RC, Della Lucia TMC. 1998. Estimativa populacional em ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Ceres** 45(262):573-578.
- Quirán EM. 1998. Hormigas cortadoras en Argentina. In: Berti Filho E, Mariconi FAM, Fontes LR. (eds) **Anais do Simpósio sobre formigas cortadeiras do cone sul**. p. 57-75.
- Reichardt A, Wheeler D. 1996. Multiple mating in the ant *Acromyrmex versicolor*: a case of female control. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 38:219–225. doi:10.1007/s002650050235.
- Rissing SW, Johnson RA, Martin JW. 1986a. Colony founding behavior of some desert ants: geographic variation in metrosis. **Psyche** 103:95-101. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2000/20135>.
- Rissing SW, Johnson RA, Pollock GB. 1986b. Natal nest distribution and pleometrosis in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). **Psyche** 93: 177-186. doi: 10.1155/1986/36205.
- Rissing SW, Pollock GB, Higgins MR, Hagen RH, Smith DR. 1989. Foraging specialization without relatedness or dominance among cofounding ant queens. **Nature** 338: 420-422.
- Roff DA. 1992. **The evolution of life histories**. Chapman and Hall, New York.
- Schultz TR, Brady SG. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 105(14):5435–5440. doi: 10.1073/pnas.0711024105.
- Shik JZ, Donoso DA, Kaspari M. 2013. The life history continuum hypothesis links traits of male ants with life outside the nest. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 149: 99–109. doi: 10.1111/eea.12117.
- Soares IMF, Della Lucia TMC, Santos AA, Nascimento IC, Delabie JHC. 2006. Caracterização de ninhos e tamanho de colônia de *Acromyrmex rugosus* (F. Smith) (Hymenoptera, Formicidae, Attini) em restingas de Ilhéus, BA, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia** 50(1): 128-130. doi: 10.1590/S0085-56262006000100020.

- Stearns SC. 1992. **The evolution of life histories**. Oxford Univ.Press, New York.
- Strassmann JE, Queller DC. 2007. Insect societies as divided organisms: The complexities of purpose and cross-purpose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 104:8619-8626. doi: 10.1073/pnas.0701285104.
- Tschinkel WR. 1993. Resource allocation, brood production and cannibalism during colony founding in the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 33:209-223. doi: 10.1007/BF02027118.
- Weber NA, 1972. **Gardening ants: the Attines**. Mem. Am. Philos. Soc., Philadelphia. pp 146.
- Wiernasz DC, Cole BJ. 2003. Queen size mediates queen survival and colony fitness in harvester ants. **Evolution** 57(9): 2179–2183. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00396.x.

CAPÍTULO I - O voo nupcial prematuro em *Acromyrmex subterraneus* (Forel 1893): um evento comum ou restrito a poucas colônias?

Resumo

O voo nupcial de uma espécie é um evento bem sincronizado, em que indivíduos sexuados deixam seus ninhos quase que ao mesmo tempo a fim de acasalar-se. A assincronia das colônias em relação a liberação de alados diminui as chances de acasalamento podendo causar prejuízos. Há relatos de eventos reprodutivos menores de *Ac. subterraneus*, com um número reduzido de alados, precedendo os eventos principais. Baseando-se na ontogenia e nas vantagens de ocorrência de um voo nupcial prematuro visou-se esclarecer se este evento é simplesmente menor mas comum a muitas colônias ou menor dada a participação de poucas colônias. Através de marcadores microssatélites, dados de genótipos foram obtidos de machos de ambos os eventos e de operárias de 30 colônias aos arredores do local de ocorrência dos voos. Também, para os indivíduos sexuados, dados morfológicos (medida da cabeça e mesossoma) foram obtidos. A baixa diversidade genética encontrada em machos do voo prematuro aliado à atribuição de grande parte desses indivíduos à apenas 3 colônias indica que este é um evento restrito realizado por poucas colônias, enquanto que aproximadamente 12 colônias contribuíram para o evento principal. Isso aliado à alta porcentagem de colônias poligínicas e poliândricas corrobora a grande diversidade genética encontrada nos indivíduos do voo principal, mantendo a diversidade dentro dos eventos maior que entre os eventos. Os resultados da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) refletem o baixo compartilhamento de alelos entre os indivíduos de ambos os voos e o maior número de alelos exclusivos de indivíduos do voo principal. A redução da competição por locais de nidificação e do potencial de conflitos através da maior relação de parentesco entre os indivíduos podem ser fatores que favoreçam a ocorrência do evento prematuro. Além disso, o fator genético deve atuar no período de desenvolvimento dos indivíduos acelerando esse processo, e resultando em indivíduos menores que atingem a maturidade mais rapidamente e partem para o voo. Os dados apresentados indicam que este é um evento restrito a algumas colônias e que não representa necessariamente uma desvantagem para as colônias que o realizam visto que diferentes pressões seletivas atuam em direções opostas, favorecendo tanto o aumento da diversidade genética quanto do grau de parentesco.

Palavras-chave: reprodução, parentesco, microssatélites, formigas cortadeiras

Abstract

(The premature nuptial flight of *Acromyrmex subterraneus* (Forel 1893): a common event or restricted to a few colonies?) The nuptial flight of the species is a well synchronized event in which males and virgin queens leave their nests at almost the same time to mate. The colony's asynchrony, related to the release of alates, decreases the chances of mating, thus causing harm. Over a period of a few years, smaller mating events of *Ac. subterraneus* were observed, with few alates, preceding the main nuptial flight. Based on ontogeny and the advantages of the premature nuptial flight occurrence, it was aimed to clarify if this event is simply smaller but common to many colonies or smaller given the participation of few colonies. Through microsatellite markers, genotype data was obtained from males of both events and workers from 30 colonies in the vicinity of the flight occurrence. Also, the morphological data (head and mesosome measurement) was obtained for the alates. The low genetic diversity found in males from the premature flight, along with the assignment of a large proportion of these individuals to only 3 colonies, indicates that this is a restricted event performed by only a few colonies, whereas approximately 12 colonies contributed to the main event. This, as well as the high percentage of polygynous and polyandric colonies, corroborates towards the great genetic diversity found in the individuals of the main flight, keeping diversity within events larger than between events. The PCoA results reflect the low allele sharing between individuals of both flights and the largest number of exclusive alleles of individuals of the main flight. Reducing both competition for nesting sites and potential conflict through increased kinship, relationships among individuals may be factors that favor the occurrence of the premature event. In addition, the genetic factor should act on the individual's development period, accelerating this process, resulting in smaller individuals that reach maturity faster and depart for flight. The data presented in this paper indicates that although this phenomenon is accidental, it is an event restricted to some colonies, since its annual occurrence is common. It does not necessarily represent a disadvantage for the colonies that perform it, since different selective pressures act in opposite directions, favoring both the increase of genetic diversity and the kinship degree.

Key-words: reproduction, kinship, microsatellites, leaf-cutting ants

Introdução

Em espécies de formigas com ninhos populosos, fêmeas e machos alados são produzidos em massa durante o período reprodutivo da colônia (Hölldobler e Wilson 1990). Devido às características do ciclo de vida atreladas a estes indivíduos, seu tamanho é maior que o das operárias, o que implica em maiores demandas de recurso para sua alimentação durante o período larval. Enquanto estão na colônia, as operárias são responsáveis pelo cuidado destas larvas e de todas as demais atividades da colônia, ao passo que os machos adultos não desempenham tarefas cotidianas (Shik et al. 2013), representando assim um grande dreno energético para a colônia.

A produção e liberação de centenas ou milhares de alados de uma colônia é um evento anual que representa custos, os quais podem ser ainda maiores quando os machos não obtêm sucesso na fecundação de fêmeas, nem as fêmeas na fundação de novas colônias ou ainda porque, devido a diferentes fatores, muitos indivíduos morrem horas após deixarem o ninho (Hölldobler e Wilson 1990). Apesar da alta mortalidade durante esse período, as rainhas que obtêm sucesso no acasalamento e fundação de suas colônias podem sobreviver por décadas (Hölldobler e Wilson 1990). Já os machos são efêmeros, programados basicamente para produzir esperma e acasalar-se (Shik et al. 2013).

O disparo para o voo nupcial está relacionado com as condições meteorológicas ideais e é uma atividade de alto custo energético para os machos, onde a depleção das reservas de carboidratos podem variar de 77% a 100% (Jutsum e Quinlan 1978, Passera et al. 1990). No momento do voo nupcial, os machos geralmente dispersam primeiro e se aglomeram formando os enxames. A formação do enxame para o acasalamento é conhecido como agregação, que é bem sincronizado dentro e entre as colônias da mesma espécie (Hölldobler e Wilson 1990). As fêmeas então voam a longas distâncias e juntam-se aos enxames, acasalando-se mais de uma vez com diferentes indivíduos. Algumas estimativas de acasalamento calculam que em *Acromyrmex versicolor* (Pergande 1984) e *Atta colombica* (Guérin-Méneville 1844), as fêmeas se acasalam com 2 a 3 machos, em média com 8 em *Acromyrmex subterraneus* (Forel 1893) e até com 10 machos em *Acromyrmex echinatio* (Forel, 1899), o que demonstra a importância da quantidade e da diversidade de esperma transferido para as rainhas (Reichardt e Wheeler 1996, Baer e Boomsma 2006, Constant et al. 2012, Sumner et al. 2004, respectivamente). De fato estes são atributos que mensuram seu sucesso reprodutivo (Baer e Boomsma 2004).

A observação de dois voos nupciais distante um do outro por dias já foi relatada para *Ac. versicolor* (Johnson e Rissing 1993), no entanto, a ocorrência do primeiro e menor evento não

foi investigada. Durante o período de acasalamento de *Ac. subterraneus* em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, foi possível observar voos nupciais “menores” em três anos consecutivos (2011, 2012 e 2013), onde o número de alados era notavelmente reduzido comparado ao voo principal. Estes eventos, que chamaremos de voos nupciais prematuros, precederam o voo nupcial principal por até um mês de intervalo (observações pessoais). Com base nestas observações e considerando o custo da produção e o propósito apenas reprodutivo dos machos, buscou-se explicações para a ocorrência deste evento baseando-se na ontogenia e nas vantagens de ocorrência de um voo nupcial prematuro.

Dessa maneira, este estudo visou esclarecer se o voo precedente ao voo principal em *Acromyrmex subterraneus* é um evento menor mas comum a muitas colônias ou menor por ser restrito a poucas colônias. Através de análises genéticas foram investigados os parâmetros de diversidade gênica de ambos os eventos e a distribuição dessa diversidade levando em conta o distanciamento genético dos indivíduos. Foi estimado ainda número de colônias que contribuiu com o enxame em ambos eventos. Atributos morfológicos e o peso também foram analisados.

Material e Métodos

Coleta de indivíduos

Machos e rainhas de *Ac. subterraneus* foram capturados durante dois voos nupciais ocorridos na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. A área é antropizada, com muitas construções e alguns locais com solo exposto ou coberto por gramíneas, o que possibilita a instalação dos ninhos dessa espécie (Anexo 1). No primeiro evento ocorrido em outubro de 2013, 25 rainhas e 94 machos foram coletados. No final de novembro do mesmo ano, ocorreu o segundo e maior voo nupcial, em que foram capturados 62 rainhas e 192 machos. O esforço de captura foi controlado, sendo feito por 3 pessoas em 1h e 30 minutos nas duas ocasiões. Nas proximidades de ocorrência dos voos nupciais foram selecionadas 30 colônias, e de cada uma foram coletadas 16 operárias, totalizando 480 indivíduos.

Fases do trabalho

A primeira fase do trabalho consistiu em analisar o tamanho dos indivíduos reprodutivos coletados em ambos os voos nupciais. Todos foram pesados imediatamente após a coleta, armazenados individualmente em álcool absoluto e estocados a -20°C, preservando assim o DNA para as análises. As amostras foram levadas ao laboratório de análises genética, na School of Life Science, University of Sussex, Inglaterra, onde inicialmente foi feita a mensura da cabeça e do tórax de rainhas e machos utilizando o software Image J (Stürup et al 2011). A largura da cabeça foi tomada como a maior distância entre os olhos, e a largura do tórax como a maior distância na região do mesossoma.

Na segunda fase, foi realizada a extração de DNA de todos os indivíduos (reprodutivos e operárias), amplificação do DNA através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando primers específicos, verificação do sucesso de amplificação por meio de eletroforese do produto da PCR em gel de agarose, genotipagem de DNA e marcação de alelos.

Extração de DNA e genotipagem

Primeiramente, os indivíduos retirados dos eppendofs foram repousados em papel toalha por alguns minutos para retirar o excesso de álcool. O DNA genômico foi extraído de uma das pernas de cada espécime (Constant et al. 2012) utilizando 100 µL de Chelex (Walsh et al. 1991). Quatorze loci microssatélites foram inicialmente testados para a amplificação do DNA (Atco 15, Ech 4225, Atta 5, Atco 13, Ech 1390, Ech 4126, Ech 3385, Myrt 4, Myrt 3, Ant 11893, Ant 3993, Ant 8424, Ant 1343, Ant2936), porém apenas 5 anelaram com o DNA de *Ac. subterraneus* (Tab.1). Os loci foram amplificados separadamente, uma vez que testes de PCR multiplex não apresentaram bons resultados.

Tabela 1: Detalhes dos 5 microssatélites usados para a análise genética em *Ac. subterraneus*.

Locus	Sequência dos Primers	T (°C) anelamento	Referência
Ech 4126	F: GTTCATTCACGAGACCTGTAA R: GAACGTCAGTTTTTCACGACA	54	Ortius-Lechner et al. 2000 (<i>Acromyrmex echinator</i>)
Ant 8424	F: TCATAATGCAGATGATGGAACTCCT R: GGCGAGTAACACAATGGCAC	60	Butler et al. 2014 (<i>Solenopsis invicta</i>)
Ant 1343	F: TCGGTCCCGTGCCTTCGATT R: GRGGGCGCGTCAAATTTGCT	60	Butler et al. 2014 (<i>Solenopsis invicta</i>)
Ant 2936	F: GGGGGATCCGGTAATCCTCT R: TCGCCCTGCAGTTAATGTGT	60	Butler et al. 2014 (<i>Solenopsis invicta</i>)
Atco 15	F: TTGCATGCATAGCTATAAATGC R: AATACACTCGCAAATTTTACGC	55	Helmkamp et al. 2008 (<i>Atta colombica</i>)

As reações de PCR foram realizadas em termociclador com um volume total de 10 µL contendo 2 µL de DNA, 5 µL de PCR master mix, 1 µL de primer (forward e reverse) e 2 µL de H₂O para o primer *Ant 2936*, alterando-se o volume de primers e H₂O – 0.5 µL de primers (forward e reverse) e 2.5 µL de H₂O - para os demais. Para cada microssatélite foi utilizada a seguinte programação: *Ech 4126*: 94°C por 2 min (1 ciclo), seguido por 94°C por 30 seg, temperatura de anelamento de 54°C por 45 seg e 72°C por 2 min (30 ciclos), 72°C por 2 min (1 ciclo) e, finalmente, 4°C ∞; *Atco 15*: 94°C por 2 min (1 ciclo), seguido por 94°C por 30 seg, temperatura de anelamento de 55°C por 45 seg e 72°C por 2 min (30 ciclos), 72°C por 2 min (1 ciclo) e, finalmente, 4°C ∞; *Ant 8424*, *Ant 1343* e *Ant 2936*: 95°C por 10 min (1 ciclo), seguido por 95°C por 15 seg, temperatura de anelamento de 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg (30 ciclos), 72°C por 10 min (1 ciclo) e, finalmente, 4°C ∞. Aleatoriamente, 10 amostras de cada placa de PCR (contendo 96 amostras) foram analisadas em gel de eletroforese a fim de ratificar o funcionamento da técnica. Terminado todo o processo, os produtos da PCR foram enviados para a Escócia, Reino Unido e analisados em um sequenciador ABI-PRISM 3130XL.

Métodos estatísticos e definição de variáveis

Os valores de largura cabeça, do mesossoma e o peso de machos e rainhas coletados nos voos prematuro e principal foram comparados através do teste de Mann-Whitney utilizando o programa R 3.1.3 (R Development Core Team 2013).

Os picos dos alelos foram marcados utilizando o programa GeneMapper 3.2 e uma matriz foi exportada para o programa Excel (Microsoft). Os dados de genótipo das rainhas de ambos os eventos foram excluídos das análises genéticas, uma vez que os primers não foram capazes de amplificar os loci da maioria desses indivíduos.

A diversidade genética dos machos em cada evento reprodutivo foi estimada pelos seguintes parâmetros: número de alelos observados (N_a), número de alelos efetivos (N_e), número de alelos exclusivos (N_{oAE}) e índice de diversidade gênica (h), com o uso do programa GenAlex 6.3 (Peakall e Smouse 2006). O índice de diversidade gênica é definido como a probabilidade de dois haplótipos casualmente escolhidos serem diferentes dentro da amostragem (Schneider et al. 1997). Os parâmetros de ambos os eventos foi comparado através do Teste t quando as variâncias foram homogêneas e Teste t com correção de Welch quando as variâncias não foram homogêneas, utilizando o programa R 3.1.3 (R Development Core Team 2013).

Uma matriz de distância genética entre os eventos foi elaborada e utilizada na análise de variância molecular (AMOVA) com o objetivo de revelar a distribuição da diversidade genética dentro e entre os eventos. A significância da diferenciação foi testada com 999 permutações, em que P denota a probabilidade de um valor ao acaso ser igual ou maior ao valor observado. A matriz de distância genética também foi utilizada para a realização de um PCoA (Análise de Coordenadas Principais) para explorar a proximidade genética dos indivíduos. A AMOVA e o PCoA foram realizados com o programa Genalex 6.3 (Peakall e Smouse 2006).

Cada colônia de onde foram coletadas as 16 operárias foi considerada uma população (30 populações) e sua diversidade genética também foi obtida através do programa GenAlex 6.3 (Peakall e Smouse 2006). Porém, apenas o parâmetro Número de Alelos será apresentado neste estudo, uma vez que a estrutura genética destas populações não é o foco deste trabalho. Com os dados de genótipo das operárias, objetivamos identificar a procedência dos machos de ambos voos, atribuindo-os ou não a alguma destas populações. O programa Structure (Pritchard et al. 2000), baseado em estatística Bayesiana foi utilizado para estimar o número de grupos genéticos K (inicialmente $K=30$) e assim definir a distribuição dos indivíduos entre os grupos. Foram realizadas 10 corridas para cada valor de K, 250.000 “burn-ins” e 500.000 simulações

de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável em relação aos 30 propostos foram calculadas médias e desvios padrão com valores de probabilidade média posterior (LnP(D)) de cada K. O valor de K = 8 foi o que apresentou maior valor de média e menor desvio padrão, e portanto utilizado para uma nova análise, com 250.000 “burn-ins” e 500.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC).

O número mínimo de acasalamentos (quantos machos contribuíram para a formação de cada colônia) e de rainhas por colônia foi estimado através do programa Colony 2.0.6.2 (Wang 2016), utilizando os dados de genótipos das operárias. Tais valores foram utilizados para testar a correlação entre o grau de poliginia e de poliandria com a frequência de alelos das operárias através de uma regressão linear, utilizando o programa R 3.1.3 (R Development Core Team 2013).

Resultados

Um total de 69 alelos foram amplificados a partir de 5 loci microssatélites. Todos os loci foram polimórficos com exceção do iniciado pelo marcador *Ant 1343* no voo prematuro, o qual apresentou um único alelo. Ressalta-se que este alelo não foi exclusivo para os indivíduos deste evento. O locus referente ao primer *Ech 4126* foi o mais informativo (21 alelos) e também o com maior número de alelos exclusivos (n=15) juntamente com o locus *Ant 8424*. Alelos raros foram encontrados apenas no voo principal (n=9), sendo a maior parte deles (n=5) identificados pelo marcador *Ech 4126* (Tab.2).

Tabela 2. Número e identificação de alelos (por tamanho dos picos) em cada um dos 5 loci para machos de *Ac. subterraneus* provenientes dos voos prematuro e principal. Com ” (aspas) o único locus monomórfico; em sublinhado os alelos raros e com * (asterisco) os alelos exclusivos.

Locus	Alelo	Principal	Prematuro	Locus	Alelo	Principal	Prematuro	Locus	Alelo	Principal	Prematuro	Locus	Alelo	Principal	Prematuro	Locus	Alelo	Principal	Prematuro
Ant 1343	265	0.443	1.000 [~]	Ant 8424	220	<u>0.005</u> *	0.000	Ant 2936	305	<u>0.006</u> *	0.000	Atco 15	209	0.039*	0.000	Ech 4126	143	0.085	0.319
	267	0.423*	0.000		258	<u>0.005</u> *	0.000		317	0.000	0.018*		211	0.118*	0.000		145	0.000	0.011*
	269	0.124*	0.000		262	0.342*	0.000		333	0.000	0.018*		213	0.067*	0.000		149	<u>0.005</u> *	0.000
	273	0.010*	0.000		266	0.136	0.563		339	0.218*	0.000		215	0.202*	0.000		153	0.053*	0.000
					270	0.033*	0.000		341	0.430*	0.000		217	0.281*	0.000		157	0.206*	0.000
					274	0.114*	0.000		343	0.158	0.182		219	0.011	0.091		159	0.116	0.154
					278	0.109*	0.000		345	0.042	0.273		221	0.157	0.091		161	0.011	0.429
					282	0.022*	0.000		347	0.000	0.509*		223	0.045*	0.000		163	0.037	0.066
					286	0.049	0.394		349	0.024*	0.000		225	<u>0.006</u> *	0.000		165	0.153*	0.000
					288	0.000	0.042*		351	0.042*	0.000		229	0.017*	0.000		167	0.026*	0.000
					290	0.038*	0.000		353	0.012*	0.000		231	0.022*	0.000		169	0.148*	0.000
					294	0.011*	0.000		355	0.018*	0.000		233	0.011*	0.000		171	0.037*	0.000
					296	0.043*	0.000		357	0.042*	0.000		235	0.022	0.818		173	0.053*	0.000
					300	0.043*	0.000		363	0.006*	0.000						179	0.011	0.011
			304	0.027*	0.000							181	0.016	0.011					
			312	0.011*	0.000							183	<u>0.005</u> *	0.000					
			314	0.011*	0.000							185	0.011*	0.000					
												187	<u>0.005</u> *	0.000					
												191	<u>0.005</u> *	0.000					
												193	0.011*	0.000					
												197	<u>0.005</u> *	0.000					
<i>Total de alelos</i>	4	4	1	17	16	3	14	11	5	13	13	3	21	20	6				

O número de alelos foi significativamente maior na revoada principal ($t = 3.15$, $GL = 8$, $P = 0.01$), assim como o número de alelos efetivos ($t = 2.97$, $GL = 8$, $P = 0.01$), exclusivos ($t = 4.29$, $GL = 4.582$, $P < 0.01$) e o índice de diversidade genética ($t = 2.57$, $GL = 8$, $P = 0.03$) (Fig.1). Dos 69 alelos observados, 20,28% ($n=14$) foram compartilhados entre machos de ambos voos. Foram encontrados 50 alelos exclusivos no voo principal e 5 no prematuro.

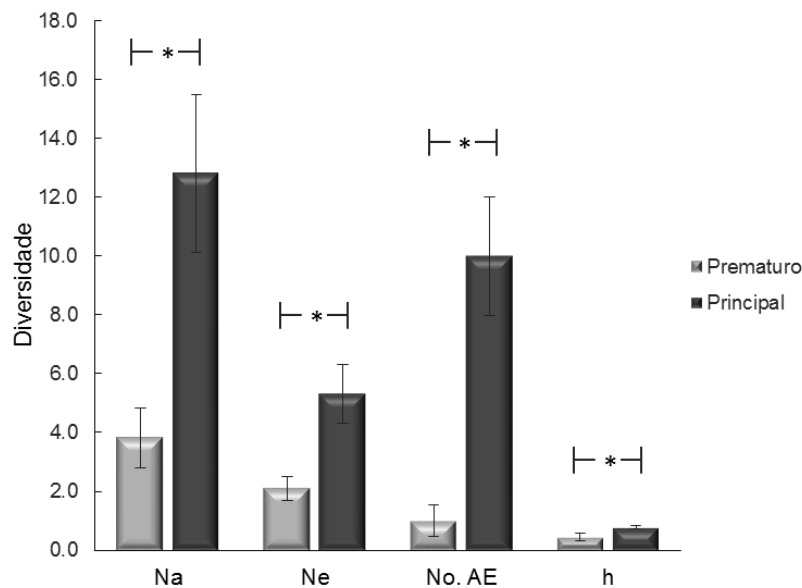


Figura 1. Médias e desvio padrão das estimativas de diversidade genética de machos de *Ac. subterraneus* provenientes dos voos nupcial principal e prematuro. Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; No.AE: número de alelos exclusivos; h: índice de diversidade genética.

A distância genética pareada PhiPT entre os indivíduos do voo prematuro e principal foi significativa ($\Phi_{iPT} = 0.26$, $P = 0.001$), indicando que a variação da distância genética observada é diferente da calculada com as permutações. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada no valor de PhiPT indicou que uma maior diversidade ocorreu dentro dos eventos 74%, enquanto que a variabilidade entre os eventos contribuíram com 26% da diversidade genética observada (Tab.3). A análise de coordenadas principais (PCoA) separou os indivíduos dos voos prematuro e principal ao longo da coordenada 1 (Fig.2).

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) mostrando a divisão da variação genética dos machos de *Ac. subterraneus* dentro e entre os eventos dos voos principal e prematuro.

Origem da variação	GL	SQ	MQ	Var. Est.	%	P
Entre eventos	1	80.170	80.170	0.621	26%	0.001
Dentro dos eventos	284	498.753	1.756	1.756	74%	0.001
Total	285	578.923		2.377	100%	

(GL = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, MQ = média dos quadrados, Var. Est. = estimativa da variância, % = porcentagem de variação total, valor de P baseado em 999 permutações.)

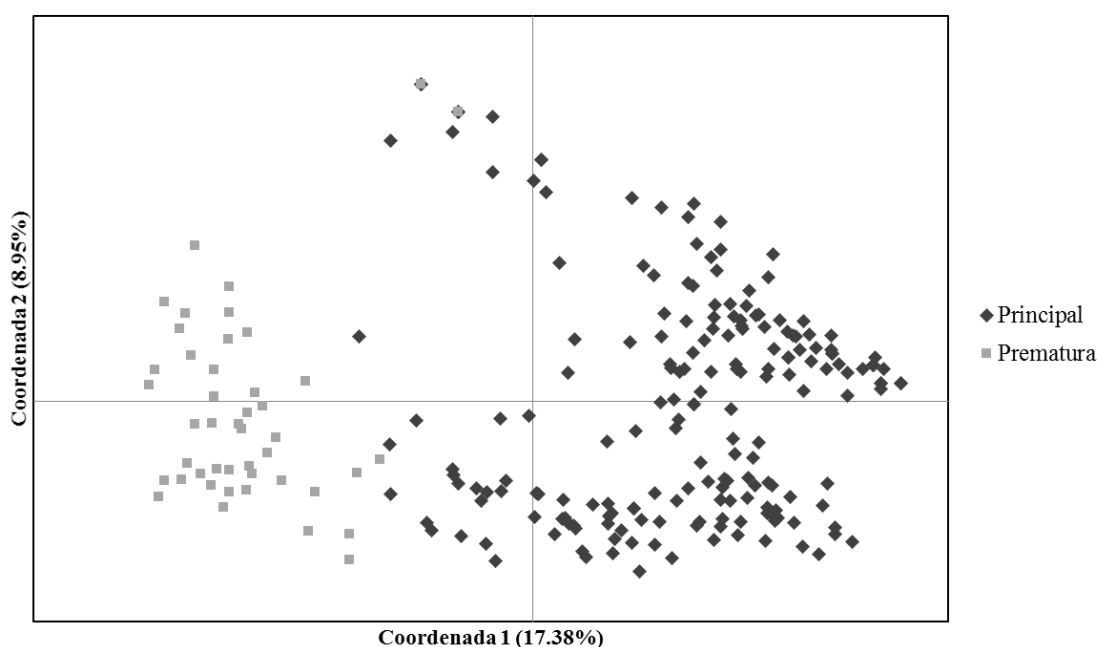


Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) de distância genética de 286 machos de *Ac. subterraneus* baseado no genótipo com 5 loci microsatélite. Os dois eixos combinados explicam 26.33% da variação

Em relação à morfologia dos indivíduos, houve diferenças significativas entre os tamanhos de machos e rainhas dos voos prematuro e principal com relação à largura da cabeça e do tórax e peso (Machos: $U=6783.5$, $P<0.001$; $U=2810.5$, $P<0.001$; $U=6450.0$, $P<0.001$; Rainhas: $U=53.0$, $P<0.001$; $U=37.0$, $P<0.001$; $U=29.5$, $P<0.001$, respectivamente). Indivíduos que participaram do voo prematuro foram significativamente menores do que os que participaram do voo principal (Fig.3).

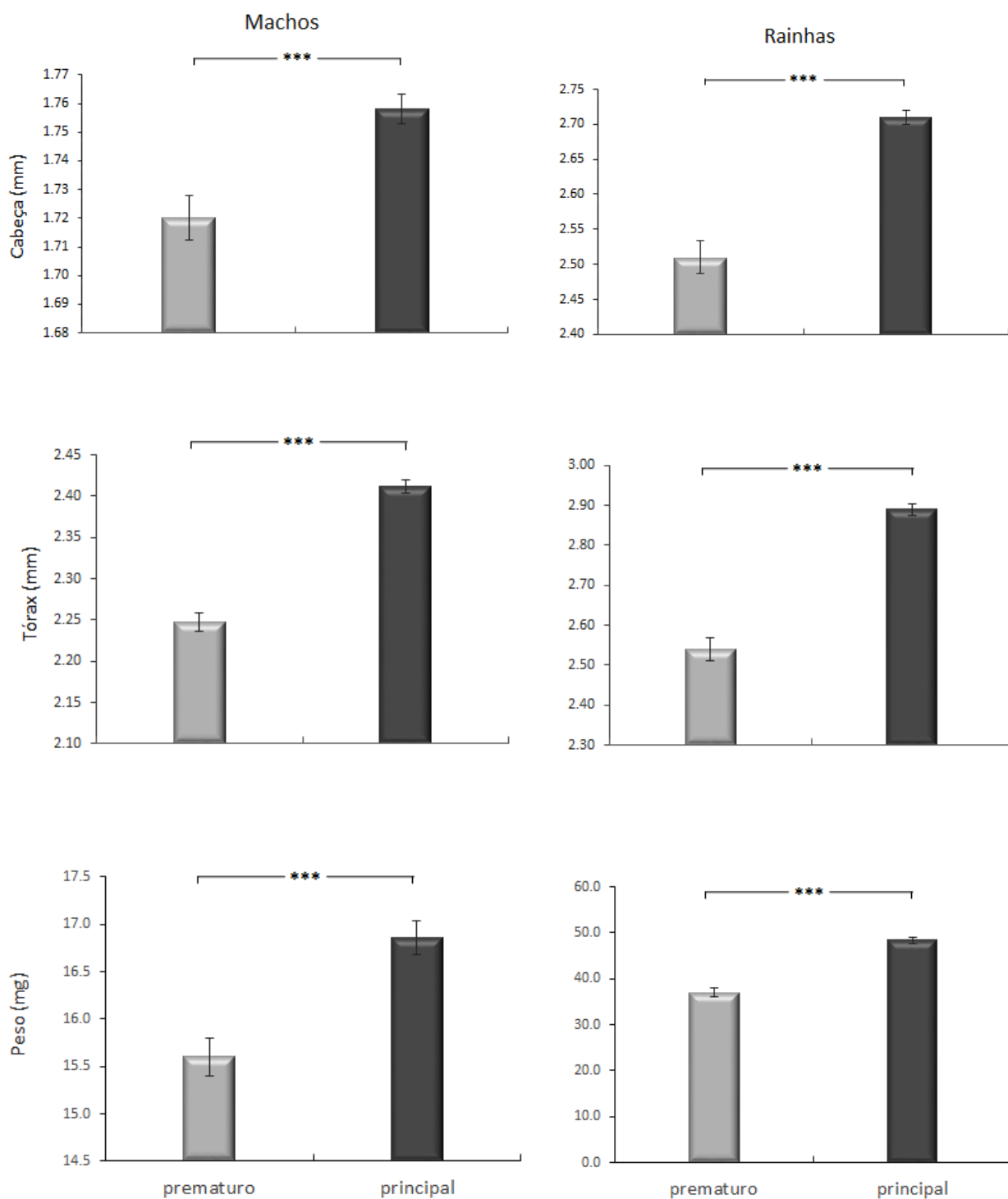


Figura 3. Largura da cabeça, tórax e peso de machos e rainhas de *Ac. subterraneus* coletados nos voos prematuro (Outubro/2013) e principal (Novembro/2013).

O número de grupos genéticos naturais foi estimado em $K=8$. A maior parte dos machos foi atribuída a 2 dos 8 clusters considerando valores de 80% ou mais de inferência. O sexto cluster não agrupou nenhum indivíduo ou população. Em relação aos machos provenientes do voo prematuro, 77.7% foram atribuídos à 3 das 30 colônias e 22.3% não foram atribuídos a nenhuma. Já os machos do voo principal, 81.3% foram atribuídos à 12 colônias e 18,7% a nenhuma.

Considerando as 30 colônias analisadas, verificou-se que o número de alelos variou de 14 a 39. As análises de matrilinearidade e patrilinearidade estimaram que as colônias continham de 1 a 9 rainhas, sendo 83.3% poligínicas, que foram acasaladas por 2 a 10 machos (Tab. 4). A correlação da frequência alélica das colônias foi positiva tanto para a poliginia ($t = 3.37$, $P = 0.002$) quanto para a poliandria ($t = 2.82$, $P = 0.008$), explicando 26% e 19% da variação de alelos, respectivamente (Fig. 4).

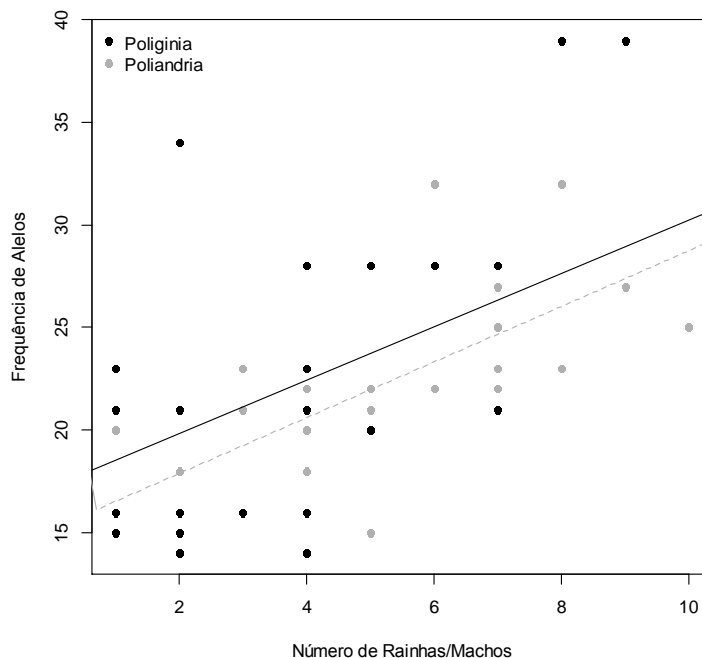


Figura 4. Correlação entre a frequência de alelos de 480 operárias e o número de rainhas e machos nas 30 colônias de *Ac. subterraneus*.

Tabela 4. Relação do número mínimo de rainhas e machos que compõem cada uma das 30 colônias (grau de poliginia e poliandria).

Colônias	Poliginia	Poliandria
1	2	2
2	5	5
3	4	5
4	3	4
5	2	4
6	6	8
7	1	4
8	2	4
9	1	2
10	5	7
11	4	7
12	7	10
13	9	8
14	7	6
15	4	7
16	3	5
17	2	4
18	7	9
19	5	5
20	8	7
21	4	7
22	5	4
23	6	5
24	2	4
25	1	4
26	8	8
27	2	4
28	1	4
29	1	3
30	4	5

Discussão

Os dados genéticos suportam a hipótese de que o voo nupcial prematuro foi um evento restrito à algumas colônias, visto que a maioria dos machos deste evento foi atribuída a apenas 3 colônias. Esse número reduzido de colônias explica a baixa diversidade genética de machos do voo prematuro comparada aos do voo principal. De fato verificou-se baixa porcentagem de alelos

compartilhados entre os eventos e de alelos exclusivos para indivíduos do voo prematuro, o que corrobora o distanciamento genético apresentado na PCoA. Por outro lado, o número maior de colônias participantes no evento principal contribuiu para a maior variabilidade genética dentro dos eventos do que entre os eventos, uma vez que esse valor apresentado pela AMOVA é a soma da variabilidade interna em cada um. Além do maior número de colônias participantes, o grande número de colônias poligínicas e poliândricas também são fonte de variação da frequência alélica. Também os dados morfológicos revelaram diferenças entre os indivíduos dos diferentes voos, sendo menores e mais leves aqueles do voo prematuro.

A poliginia, apresentada por quase todas as colônias, juntamente com a poliandria são fatores que aumentam a diversidade genética da prole, sendo ambas estratégias amplamente difundidas nas espécies de Hymenoptera eusociais (Hughes et al. 2008). No voo principal, muitas colônias com múltiplas rainhas que acasalam com diversos machos são os elementos chave que esclarecem a alta diversidade genética encontrada em machos deste voo. As vantagens da poliandria conferida pelo aumento da diversidade genética está relacionada com a redução de custos de acasalamentos geneticamente incompatíveis, com um aprimoramento na divisão de trabalho e um aumento na resistência contra parasitas (Boomsma e Ratnieks 1996, Crozier e Fjerdingstad 2001, Oldroyd e Fewell 2007). Já a alta densidade espacial de ninhos pré-existentes somados à necessidade de fundação de novas colônias pode determinar o engajamento de várias rainhas na fundação de uma única colônia (Rissing et al. 1986, 1989, Diehl-Fleig e Araújo 1996).

Por outro lado, o agrupamento em altas densidades de rainhas acasaladas após os voos nupciais gera grande competição por locais de nidificação (Hung e Vinson 1978). A liberação de indivíduos reprodutivos realizada apenas por algumas colônias dias antes do voo principal pode ser claramente uma estratégia que visa reduzir essa competição, vantagem que é ratificada considerando o número reduzido de indivíduos sexuais que participaram do evento. Outra vantagem que pode estar relacionada a este evento reprodutivo restrito é a redução potencial de conflitos através da maior relação de parentesco entre os indivíduos. A teoria da seleção de parentesco prediz que a socialidade deve surgir onde relação genética entre os membros do grupo é potencialmente alta (Hamilton 1964, Shykoff e Schmid-Hempel 1991). No sistema haplodiploide dos Hymenoptera, as fêmeas são mais relacionadas geneticamente às suas irmãs do que sua própria prole, e isso fornece condições favoráveis para evolução e manutenção do comportamento de ajuda através da seleção de parentesco (Hamilton 1964). Dessa maneira, a liberação de poucos indivíduos

apresentando baixa diversidade genética leva ao aumento do grau de parentesco entre os indivíduos das futuras colônias, reduzindo ainda mais o potencial para o conflito reprodutivo entre rainhas, no caso de colônias poligínicas e entre operárias, inibindo o nepotismo no cuidado com as formas imaturas.

Outro fator curioso a ser ressaltado a respeito do voo nupcial prematuro foi o menor tamanho dos indivíduos comparado aos do voo principal. As razões para a ocorrência de indivíduos de tamanho reduzido podem seguir duas vertentes: os machos podem ser filhos de operárias ou podem ter um período de desenvolvimento menor determinado geneticamente. Um estudo de genotipagem de machos utilizando microssatélites demonstrou que operárias de colônias sem rainhas são capazes de produzir machos (Villesen e Boomsma 2003) e que esses machos são menores que os produzidos por rainhas (Camargo et al. 2005). No entanto, os dados do presente estudo não suportam a hipótese de que os machos do voo prematuro sejam oriundos de operárias dada a baixa diversidade genética encontrada no grupo. Então por quê os indivíduos do voo prematuro são menores?

Estudos têm demonstrado a influência genética, por exemplo, na determinação de castas de operárias (Hughes et al. 2003, Fraser et al. 2000, Smith et al. 2008), com indivíduos de uma mesma colônia e de diferentes patrinhagens diferindo na propensão de se desenvolverem em operárias maiores ou menores (Hughes et al. 2003). Gotzek e Ross (2007) revelaram ainda que *Solenopsis invicta* produz dois tipos de rainhas: as mais pesadas, que formam colônias sozinhas, e as mais leves, que formam colônias com múltiplas rainhas. Desse modo, é possível concluir que o componente genético atua não só na variação morfológica dos indivíduos, mas também na variação fisiológica (Smith et al. 2008), e isso pode incluir o período de desenvolvimento. Sendo assim, parece plausível supor que por influência genética, o período de crescimento (estágios larvais) dos integrantes do voo prematuro foi reduzido, resultando em indivíduos menores, que uma vez prontos e sob condições ideais, partiram para o voo. É importante ressaltar que este fenômeno não aparenta ser acidental, mas sim restrito a algumas colônias, uma vez que é comum sua ocorrência anual.

Assim sendo, apesar de considerado um evento restrito a algumas colônias, o voo nupcial prematuro não representa necessariamente uma desvantagem para a espécie. Pesquisas que analisem o sucesso reprodutivo dos machos, avaliando a quantidade e qualidade de esperma transferido para as rainhas podem contribuir para o entendimento desse comportamento antecipado. Estudos de insetos sociais com foco em machos são de grande relevância, uma vez que são

componentes significativos na biologia de acasalamento, participando de um processo que irá afetar a vida inteira de uma colônia. Simultaneamente, a combinação dos ramos da Ecologia e Genética, pode melhorar a compreensão das bases estruturais genética e de como os organismos se relacionam com o ambiente e entre si, trazendo resultados mais precisos.

Referências Bibliográficas

- Baer B, Boomsma JJ. 2004. Male reproductive investment and queen mating frequency in fungus-growing ants. **Behavioral Ecology** 15: 426–432. doi: 10.1093/beheco/arh025.
- Baer B, Boomsma JJ. 2006. Mating biology of leaf-cutting ants *Atta colombica* and *A. cephalotes*. **Journal of Morphology** 267: 1165–1171. doi: 10.1002/jmor.10467View/save citation.
- Blouin MS, Parsons M, Lacaille V, Lotz S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. **Molecular Ecology** 5: 393-401.
- Boomsma JJ, Ratnieks FLW. 1996. Paternity in eusocial Hymenoptera. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 351: 947–975. doi: 10.1098/rstb.1996.0087.
- Butler IA, Siletti K, Oxley PR, Kronauer DJC. 2014. Conserved Microsatellites in Ants Enable Population Genetic and Colony Pedigree Studies across a Wide Range of Species. **PLoS ONE** 9(9): e107334. doi: 10.1371/journal.pone.0107334.
- Camargo RS, Forti LC, Andrade APP, Matos CAO, Lopes JFS. 2015. Morphometry of the sexual forms of *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae) in queenright and queenless laboratory colonies. **JEN** 129(6): 347-351. doi: 10.1111/j.1439-0418.2005.00971.347–351.
- Constant N, Santorelli LA, Lopes JFS, Hughes WOH. 2012. The effects of genotype, caste, and age on foraging performance in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology** 23(6):1284-1288. doi: 10.1093/beheco/ars116.
- Crozier RH, Fjerdingstad EJ. 2001. Polyandry in social Hymenoptera – disunity in diversity? **Annales Zoologici Fennici** 38: 267–285.
- Diehl-Fleig E, Araújo AM. 1996. Haplometrosis and pleometrosis in the ant *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux** 43: 47-51. doi: 10.1007/BF01253955.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética** 3a Ed. Embrapa/Cenargen. Brasília, Brasil.
- Fraser VS, Kaufmann B, Oldroyd BP, Crozier RH. 2000. Genetic influence on caste in the ant *Camponotus consobrinus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 47:188–194. doi:10.1007/s002650050010.
- Gotzek D, Ross KG. 2007. Genetic regulation of colony social organization in fire ants: an integrative overview. **Quarterly Review of Biology** 82: 201–226. doi:10.1086/519965.

- Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour I, II. **Journal of Theoretical Biology** 7: 1-16, 17-52. doi: 10.1016/0022-5193.
- Hauser L, Adcock GJ, Smith PJ, Ramírez JHB, Carvalho GR. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 99: 11742-11747. doi: 10.1073/pnas.
- Helmkamp M, Gadau J, Feldhaar H. 2008. Population- and sociogenetic structure of the leaf-cutter ant *Atta colombica* (Formicidae, Myrmicinae). **Insectes Sociaux** 55: 434-442. doi:10.1007/s00040-008-1024-3.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. **The Ants**. Belknap Press, Cambridge, MA, USA.
- Hughes WOH, Ratnieks FLW, Oldroyd BP. 2008. Multiple paternity or multiple queens: two routes to greater intracolony genetic diversity in the eusocial Hymenoptera. **Journal of Evolutionary Biology** 21: 1090-1095. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01532.x.
- Hughes WOH, Sumner S, Borm SV, Boomsma JJ. 2003. Worker caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100(16): 9394-9397. doi: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1633701100.
- Hung ACF, Vinson SB. 1978. Factors affecting the distribution of fire ants in Texas (Myrmicinae: Formicidae). **The Southwestern Naturalist** 23(2): 205-214.
- Isagi Y, Kanazashi T, Suzuki W, Tanaka H, Abe T. 2004. Highly variable pollination patterns in *Magnolia obovata* revealed by microsatellite paternity analysis. **International Journal of Plant Sciences** 165: 1047-1053. doi: 10.1086/423883.
- Johnson RA, Rissing SW. 1993. Breeding biology of the Desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Kansas Entomology Society** 66(1):127-128.
- Jutsum AR, Quinlan RJ. 1978. Flight and substrate utilization in laboratory-reared males of *Atta sexdens*. **Journal of Insect Physiology** 24: 821-825.
- Oldroyd BP, Fewell JH. 2007. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. **Trends Ecology Evolution** 22: 408-413. doi: 10.1016/j.tree.2007.06.001.

- Ortius-Lechner D, Gertsch PJ, Boomsma JJ. 2000. Variable microsatellite loci for the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* and their applicability to related species. **Molecular Ecology** 9: 114-115. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.00764-5.x.
- Passera L, Keller L, Grimal A, Chautems D, Cherix D, Fletcher DJC, Fortelius W, Rosengren R, Vargo EL. 1990. Carbohydrates as energy source during the flight of sexuals of the ant *Formica lugubris* (Hymenoptera: Formicidae). **Entomologia Generalis** 15: 25–32.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6: 288-295.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945 – 959.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Reichardt AK, Wheeler DE. 1996. Multiple mating in the ant *Acromyrmex versicolor*: a case of female control. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 38: 219–225. doi: 10.1007/s002650050235.
- Rissing SW, Johnson RA, Pollock GB. 1986. Natal nest distribution and pleometrosis in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). **Psyche** 93: 177-186. doi: 10.1155/1986/36205.
- Rissing SW, Pollock GB, Higgins MR, Hagen RH, Smith DR. 1989. Foraging specialization without relatedness or dominance among cofounding ant queens. **Nature** 338: 420-422.
- Schlötterer C, Pemberton J. 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. pp. 71-86. En: *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Eds. Desalle R, Schierwater B, Birkhäuser B.
- Schneider S, Kueffer JM, Rosseli D, Excoffier L. 1997. Arlequin ver. 1.1 : A Software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shik JZ, Donoso DA, Kaspari M. 2013. The life history continuum hypothesis links traits of male ants with life outside the nest. **Entomologia experimentalis et Applicata**. doi: 0.1111/eea.12117.

- Shykoff JA, Hempel PS. 1991. Genetic relatedness and eusociality: parasite-mediated selection on the genetic composition of groups. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 28: 371-376. doi: 10.1007/BF00164387.
- Smith CR, Toth AL, Suarez AV, Robinson GE. 2008. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nature Reviews genetics* 9: 735-748. doi:10.1038/nrg2429.
- Stürup M, den Boer SPA, Nash DR, Boomsma JJ, Baer B. 2011. Variation in male body size and reproductive allocation in the leafcutter ant *Atta colombica*: estimating variance components and possible trade-offs. **Insects Sociaux** 58:47–55. doi:10.1007/s00040-010-0115-0.
- Sumner S, Hughes WOH, Pedersen JS, Boomsma JJ. 2004. Social parasite queens abandon multiple mating. **Nature** 428: 35-36
- Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution** 15: 199-203. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01825-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01825-5).
- Villesen P; Boomsma JJ. 2003: Patterns of male parentage in the leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 53, 246–253. doi: 10.1007/s00265-002-0577-9.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques** 10: 506–513.
- Wang J. 2016. COLONY. Individual identification from genetic marker data: developments and accuracy comparisons of methods. **Molecular Ecology Resources** 16: 163-175. doi: 10.1111/1755-0998.12452.

CAPÍTULO II - Rainhas peso pesado: Influência da massa inicial sobre a produtividade de colônias e sobrevivência em *Acromyrmex* (Formicidae)

Resumo

Espécies com fundação semi-claustral alocam a energia restante após o voo e a escavação para realizar tarefas demandadas pela colônia em formação. Durante este período, a sobrevivência das rainhas é subsidiada pelo o acúmulo de reservas energéticas, que pode ser refletido em sua massa corporal. Indivíduos maiores têm maiores chances de sobrevivência e proles maiores e/ou mais numerosa. Mas se as atividades de escavação e busca pelo alimento fossem excluídas desse período, seria possível atenuar o efeito da massa das rainhas em sua sobrevivência e fecundidade? Semanalmente, a sobrevivência de 1128 colônias incipientes foi acompanhada até a emergência das primeiras operárias, sendo as rainhas classificadas de acordo com o peso nas categorias: muito leve (ML), leve (L), pesada (P) e muito pesada (MP). Em 476 destas, a produtividade e a proporção de rainhas que: (a) regurgitaram o fungo simbiote, (b) o transportaram para o substrato oferecido, (c) apresentaram algum tipo de fungo patogênico em sua superfície corporal após a morte pré-matura foram registradas. Nas primeiras duas semanas 45% das rainhas morreram, e analisando todo o período de fundação, a massa das rainhas teve influência na sobrevivência - ML apresentaram a menor chance de sobrevivência - mas não na produtividade. Em média, as rainhas perderam 35% da massa corporal. Aproximadamente 53% regurgitaram o fungo simbiote, e das cerca de 30% que sobreviveram ao período de fundação (n=143), 11% foi coletada com asas e 41% havia transportado o jardim de fungo para o substrato alimentar. Além disso, em 8.7 % das rainhas com morte pré-matura foi registrada a presença de fungo patogênico. Apesar de fatores repetidamente citados como promotores da alta taxa de mortalidade – competição, escavação, predação e dissecação durante o forrageamento - apresentarem sua parcela de contribuição no aumento desta taxa, outros elementos como a massa das rainhas, ausência do fungo simbiote e, em menor parte, a contaminação por fungo patogênico, devem ser, do mesmo modo, considerados como redutores da taxa de sucesso das fundadoras. Ainda, a massa inicial das rainhas não influenciou na produtividade.

Palavras-chave: massa, período de fundação, taxa de mortalidade

Abstract

(The Best of Heavy Queens: Influence of initial mass on the colony survival and productivity in *Acromyrmex* (Formicidae)). Semi-claustral foundation species allocate their remaining energy post nuptial flight and excavation to perform tasks demanded by the incipient colony. During this period, the queen's survival is subsidized by the accumulation of energy reserves, which is reflected by its mass. Larger individuals have higher chance of survival and producing larger and/or more numerous offspring. Therefore, if the activities of both searching for food and excavation were excluded from this period, would it be possible to mitigate the effect of the queen's mass on its survival and productivity? Weekly, the survival of 1128 incipient colonies was followed until the emergence of its first worker, and per their respective queen's weight, they were classified into 4 categories: very light (ML), light (L), heavy (P) and very heavy (MP). In 476 colonies, the productivity and the proportion of queens that: (a) regurgitated the symbiotic fungus, (b) transported it to the offered substrate, and (c) had some pathogenic fungus in their body surface after the premature death were all registered. After the initial 2 weeks 45% of the queens had died, and by analysing the whole foundation period, the queen's mass influenced the chance of survival – ML had the lowest chance of survival – but not the productivity. On average, the queens lost 35% of their body mass. Approximately 53% regurgitated the symbiotic fungus, and around 30% of the ones that had survived through the foundation period (n=143), 11% were collected with wings and 41% had transported the fungus garden to the offered substrate. Furthermore, the presence of the pathogenic fungus was registered in 8.7% of the queens that had died prematurely. Although elements repeatedly mentioned as responsible for the high mortality rate during this period – competition, excavation, predation and dehydration during the foraging – contribute to increasing this rate, other variables such as the queen's mass, absence of symbiotic fungus, and less significantly, the contamination by pathogenic fungus should likewise be considered as reducers of the success rate of founders. Also, the initial mass of the queens did not influenced their productivity

Key-words: mass, foundation period, mortality rate

Introdução

A divisão reprodutiva do trabalho resulta num dimorfismo completo entre as formas sexuais e a casta de operárias (Hölldobler e Wilson 1990). Machos e rainhas, maiores que as operárias, são responsáveis pela reprodução e estabelecimento de uma nova colônia (Wilson 1980). Para os machos, a energia acumulada em forma de carboidratos solúveis é utilizada essencialmente como combustível durante o voo nupcial (Jutsum e Quinlan 1978, Silva et al. 2015). Em rainhas, a energia armazenada em forma de lipídios e carboidratos é utilizada nas várias etapas subsequentes à sua saída da colônia mãe, fundamentalmente até o início da fase ergonômica da sua colônia (Della Lucia et al. 1995, Silva et al. 2015).

Um dos fatores primordiais que subsidia a sobrevivência das rainhas durante esse período está relacionado com o acúmulo de reservas energéticas, que pode ser calculado através de sua massa corporal (Seal 2009). Em muitas espécies de insetos, o tamanho das fêmeas e a fecundidade estão fortemente associados com seu *fitness* (Oberhauser 1997, Carvalho et al. 1998). Fêmeas maiores têm grandes chances de apresentarem maior probabilidade de sobrevivência durante o estabelecimento de novas colônias (Wiernasz e Cole, 2003) e proles maiores e/ou mais numerosa (Roff 1992, Stearns 1992).

O momento da revoada até a fase de fundação é um período crítico para as formigas cortadeiras. A taxa de mortalidade é alta devido a fatores externos tais como predação especialmente por pássaros (Autuori 1950, Mariconi 1970), esforço de escavação (Camargo et al. 2011), execução por coespecíficos (Fowler, 1984), dissecação (Peeters e Ito 2001) ou ainda contaminação por fungo patogênico (Hughes et al. 2009). Para o gênero *Acromyrmex*, que exhibe fundação do tipo semi-claustral e necessita deixar a colônia em busca de alimento durante a fase de fundação, a exposição ao risco durante os estágios iniciais da colônia é ainda maior (Peeters e Ito 2001), o que deve contribuir para uma taxa de mortalidade mais elevada que a de *Atta*, a qual possui fundação claustral e taxa de mortalidade em torno de 95 a 99.95% (Autuori 1950, Augustin e Lopes 2011). Em virtude do menor acúmulo de reservas nutricionais, espécies com fundação semi-claustral alocam a energia restante após o voo e a escavação para encontrar alimento, trazer para a colônia, processar e cultivar o jardim de fungo (Hölldobler e Wilson 1990, Seal e Tschinkel 2007).

Apesar de rainhas maiores apresentarem maior sucesso na fundação de colônias e maior fecundidade do que rainhas menores (Vander Meer et al. 1992, Wiernasz e Cole 2003), parece plausível supor que, após o voo nupcial, rainhas de *Acromyrmex* com diferentes massas e expostas a condições que não implicam na necessidade de escavar e buscar pelo alimento, tenham similares taxas de sobrevivência e produtividade. Isto considerando que a fonte de nutrição do fungo para este gênero não vem de suas reservas corporais, mas sim é produto de seu forrageamento. Privando esses indivíduos de realizarem tais tarefas de alto custo energético e risco (Camargo et al. 2011: escavação, Fewell et al. 1996: forrageamento) espera-se atenuar o efeito da massa das rainhas em sua sobrevivência e fecundidade.

Neste trabalho avaliou-se a influência da massa inicial de rainhas de *Acromyrmex subterraneus* (Forel 1893) em relação a sobrevivência e produtividade da colônia durante o período de fundação, quando expostas a condições que não implicam na necessidade de escavar e busca por alimento, após o voo nupcial. Além disso, foram descritos alguns aspectos comportamentais e ecológicos inerentes a fase de fundação.

Material e Métodos

Coleta de rainhas

Rainhas *Ac. subterraneus* foram coletadas após o voo nupcial em dois anos consecutivos - 2011 e 2012 – na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais (21°46'43.65"S, 43°21'16.84"W). A área é antropizada, com muitas construções e alguns locais com solo exposto ou coberto por gramíneas (Anexo 1, círculo azul). O voo nupcial ocorreu entre os meses de novembro e início de dezembro, sempre em manhã abafada, com céu nublado, umidade e temperatura elevada após a ocorrência de chuvas fortes no dia anterior. A coleta foi realizada entre 7:30 e 10h da manhã. No total, foram capturadas 1128 rainhas, sendo 476 em 2011 e 652 em 2012. Logo após a captura, cada fêmea foi pesada com balança de precisão analítica e mantida em potes plásticos (250ml), com 1cm de gesso no fundo, umidificado regularmente. O pote funcionou como a câmara inicial da colônia, e dessa maneira, as rainhas não necessitaram escavar. A cada dois dias, folhas frescas de *Acalipha* sp. foram fornecidas dentro dos potes, excluindo assim, o gasto energético na busca por alimento. A temperatura e umidade do laboratório foram mantidas em

aproximadamente 25°C e 80% e as colônias cobertas com papel celofane vermelho a fim de reduzir a exposição à luminosidade.

Sobrevivência

A sobrevivência das rainhas de 2011 e 2012 foi verificada semanalmente durante o período de fundação, ou seja, até a emergência da primeira geração de operárias. O peso de cada rainha também foi mensurado semanalmente.

Produtividade das rainhas

A produtividade foi investigada somente para rainhas coletadas em 2011. Semanalmente, após o registro do peso, a prole de cada rainha foi contada – número de ovos, larvas, pupas e operárias – até a 15ª semana da colônia, aproximadamente 4 meses. Os dados contabilizados foram apenas das colônias que sobreviveram até a 15ª semana de observação.

Outras informações relevantes

Apenas para a coleta de 2011, foram registradas algumas características e comportamentos exibidos pelas rainhas. No dia da coleta, foi registrado o número de rainhas coletadas com asas, e durante primeira semana de fundação, foi observada a proporção de rainhas capazes de regurgitar o fungo simbiote. Algumas rainhas transportaram o jardim de fungo para o substrato oferecido, e a proporção das que executaram esse comportamento também foi registrada. Além disso, após a morte, foram observadas a porcentagem de rainhas que apresentaram algum tipo de fungo patogênico em sua superfície corporal.

Métodos estatísticos e definição de variáveis

A sobrevivência das rainhas foi modelada através da distribuição de Weibull, onde os parâmetros possibilitam uma maior flexibilidade para modelar sistemas em que o número de falhas - morte das rainhas - aumenta ou diminui ou permanece constante ao longo do tempo. Neste caso, os dados são censurados (Crawley, 2007).

Neste experimento, o ponto inicial das observações foi determinado a partir do momento da coleta das rainhas e o ponto final quando as rainhas morreram (censor 1) ou quando surgiram as primeiras operárias (censor 0). A probabilidade de sobrevivência foi considerada como variável

resposta e o tempo de morte como variável explicativa. O peso inicial das rainhas, tomado no ponto inicial das observações, foi considerado covariável. No total foram utilizados 680 casos censurados (censor 1) e 448 casos não censurados (censor 0). O modelo explicativo diferiu significativamente do modelo nulo ($p = 0.002$). Os dados de peso inicial foram divididos em 4 classes categóricas baseadas nos quartis. No primeiro quartil encontram-se rainhas muito leves - ML (≤ 0.04720 g), no segundo rainhas leves - L (> 0.04720 e ≤ 0.04980), no terceiro as pesadas - P (> 0.04980 e ≤ 0.05230) e no quarto rainhas muito pesadas (MP > 0.05230). As curvas do gráfico foram comparadas através do teste Tukey a 5% significância.

A produtividade das rainhas durante o período de fundação foi correlacionada com as categorias de peso inicial das mesmas através de uma análise de regressão. A produtividade foi considerada variável resposta, enquanto que o peso inicial como variável explicativa. Todas as análises foram feitas utilizando o programa R 3.1.3 (R Development Core Team 2013).

As demais informações relevantes como a proporção de rainhas capazes de regurgitar o fungo simbiote, as que o transportaram para o substrato oferecido, as que apresentaram algum tipo de fungo patogênico em sua superfície corporal após a morte e dados do crescimento populacional das colônias durante as primeiras 15 semanas, foram analisadas descritivamente.

Resultados

Considerando as 1128 rainhas coletadas nos anos de 2011 e 2012, cerca de 45% morreram na primeira semana após o voo nupcial. Contudo, a probabilidade de sobrevivência aumentou ao longo do tempo ($\chi^2=20.69$, $df=3$, $n=1128$, $p<0.001$), caracterizando uma curva de sobrevivência do tipo III, na qual a mortalidade é elevada no início da vida e com elevada chance de sobrevivência posteriormente.

Com relação ao peso inicial, houve uma redução acentuada na probabilidade de sobrevivência nas 2 primeiras semanas, seguida por uma tênue queda entre as semanas 3 e 9, voltando a decair a partir da semana 10. Para rainhas Muito Leves, a chance de sobrevivência nas 2 primeiras semanas foi menor do que para as demais classes de peso, cerca de 40% contra 60%. Essa diferença de aproximadamente 20% se estende até a 13ª semana, quando todas apresentam chances de sobrevivência similares. Em outras palavras, o tempo médio de vida (50% dos indivíduos) de rainhas muito leves é baixo, cerca de 7.3 semanas, enquanto que para as demais esse

tempo gira em torno de 11.6 a 12 semanas (Fig. 1). De fato, a curva de sobrevivência de rainhas muito leves é significativamente diferente das demais (ML e L: $z=3.772$, $p < 0.001$; ML e P: $z=3.520$, $p < 0.001$; ML e MP: $z=3.759$, $p < 0.001$). Considerando todos os indivíduos amostrados a variação do peso foi entre 0.0229 e 0.0598g.

O modelo de regressão linear não foi significativo para produtividade e peso inicial das rainhas ($F_{3,137} = 0.38$, $p = 0.77$, $R^2 = -0.01$) (Fig. 2). Em outras palavras, o peso inicial das rainhas não explica a variação no número da prole.

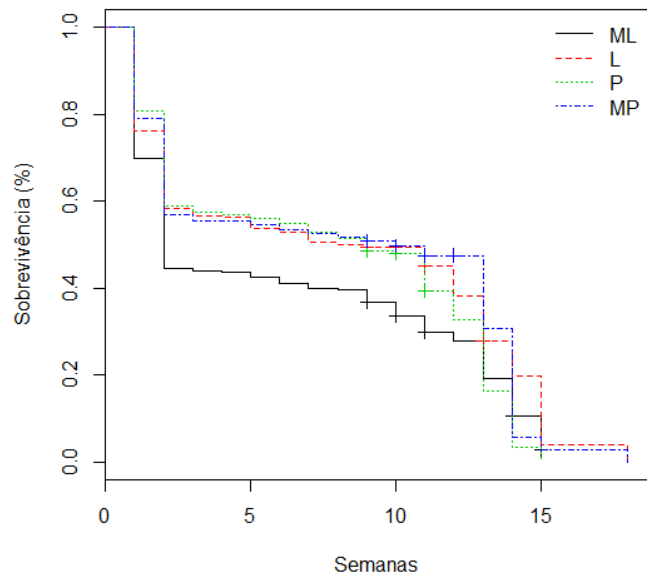


Figura 1. Sobrevivência de rainhas de *Ac. subterraneus* durante o período de fundação, considerando o peso inicial como covariável. Os dados de peso inicial foram separados em quatro categorias de acordo com a mediana e quartis. ML: rainhas muito leves; L: rainhas leves; P: rainhas pesadas e MP: rainhas muito pesadas. Dados de coletas de 2011 e 2012.

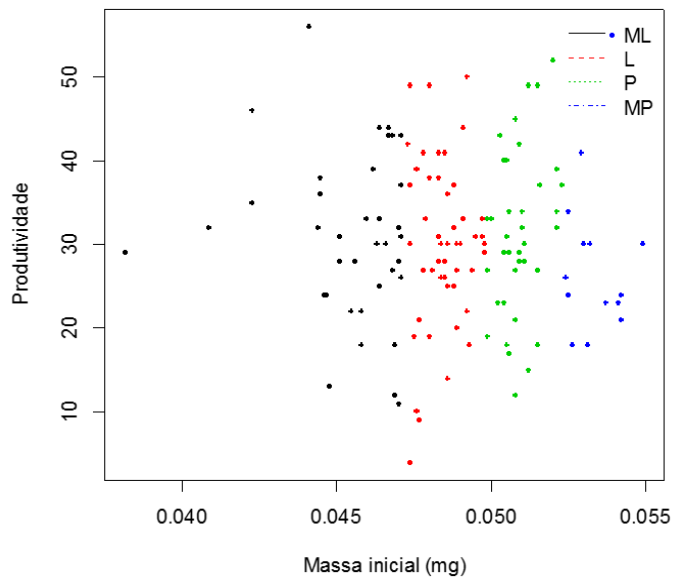


Figura 2. Relação entre a massa inicial das rainhas de *Ac. subterraneus* e sua produtividade (número de ovos, larvas, pupas e operárias) ao longo de 15 semanas após o voo nupcial. ML: rainhas muito leves; L: rainhas leves; P: rainhas pesadas e MP: rainhas muito pesadas. Dados de coleta de 2011.

Das 476 rainhas amostradas em 2011, pouco mais da metade (53.2%) regurgitaram o fungo simbiote, e para as demais, que morreram logo na primeira semana, o fungo não foi encontrado. A extrusão ocorreu em média no segundo dia após o voo nupcial e a deposição geralmente foi feita diretamente na camada de gesso ou na lateral do pote. Das cerca de 30% das rainhas que sobreviveram até a emergência das primeiras operárias (n=143), 11% foi coletada com asas e 41% havia transportado o jardim de fungo para o substrato alimentar oferecido (Fig. 3 e 4). É interessante ressaltar que as rainhas tendiam a cultivar o jardim de fungo no formato de uma panela, mantendo a prole no interior da mesma (Fig. 4b). Durante o período de fundação, as rainhas perderam em média aproximadamente 35% de sua massa corporal. Observando as rainhas que regurgitaram o fungo, mas que morreram durante a fase de fundação, foi possível constatar que cerca de 8,7 % havia sido infectada por algum tipo de fungo patogênico (Fig. 5).

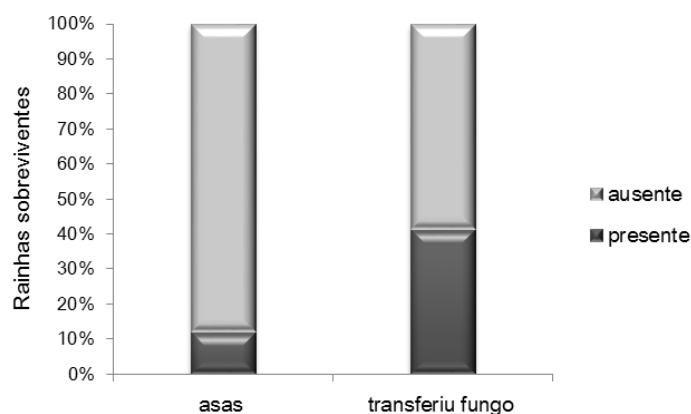


Figura 3. Proporção de rainhas sobreviventes até a primeira geração de operárias que apresentavam asas no momento da coleta e transferiram o fungo simbiote para o substrato alimentar fornecido (Amostragem de 2011).

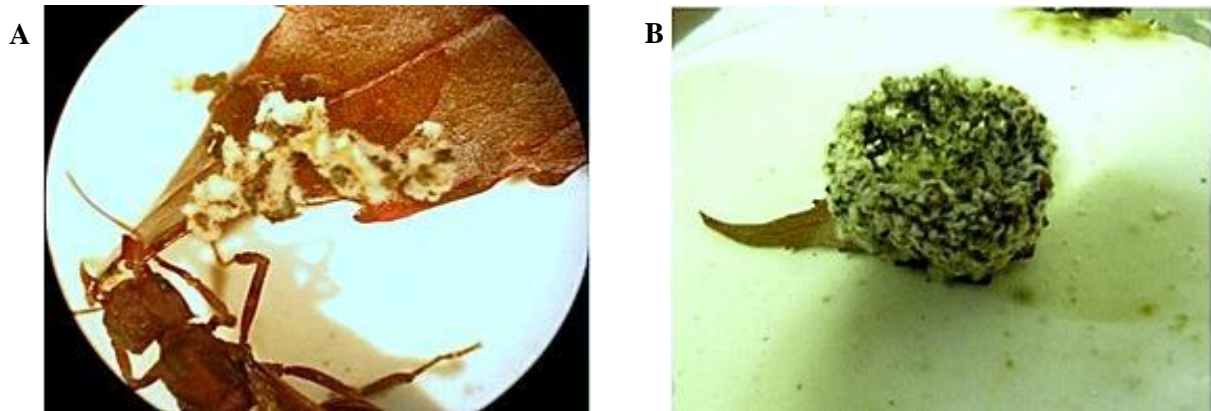


Figura 4. A) Rainha de *Ac. subterraneus* cuidando do jardim de fungo transferido para o substrato alimentar. B) Jardim de fungo no substrato alimentar e em formato de uma panela.

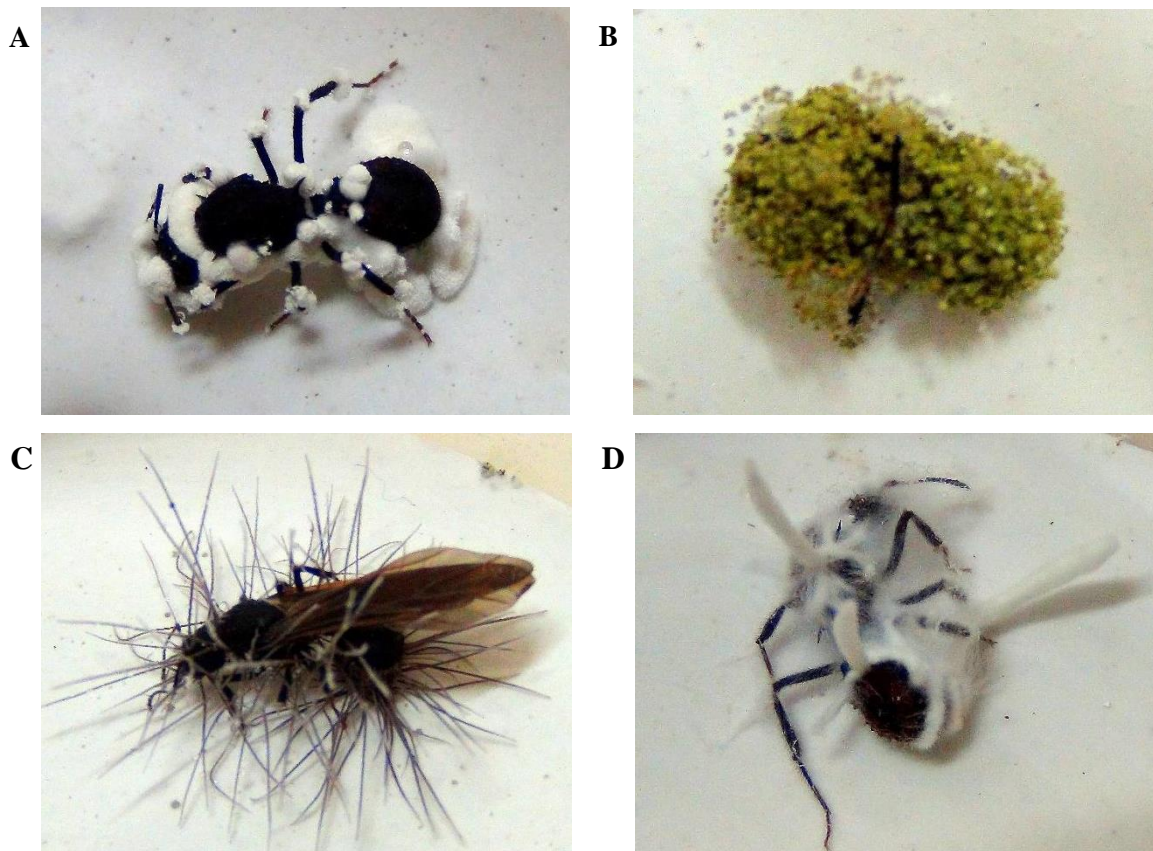


Figura 5. Rainhas de *Acromyrmex subterraneus* infectadas por fungos entomopatogênicos. A) *Metarhizium anisopliae*; B) *Aspergillus flavus*; (Hughes et al. 2004, Augustin 2011), C e D não identificados.

O crescimento das colônias ocorreu de forma gradual. Os ovos foram depositados logo na primeira semana após o voo nupcial e durante os três meses iniciais das colônias esse número não sofreu grande variação. As larvas surgiram em média na 3ª semana, as pupas entre a 5ª e a 6ª e as operárias entre a 7ª e 9ª semana (Fig. 6), sendo que em 48.5% das colônias a primeira geração de operárias surgiu na 9ª semana após o voo nupcial. A primeira geração foi composta em média por duas operárias e após 3 meses, as colônias com maior população possuíam 26 operárias.

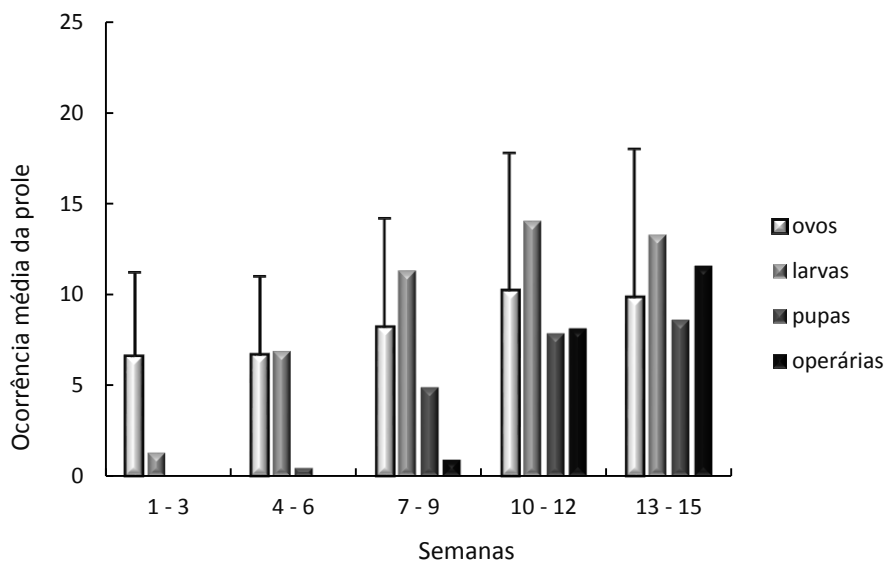


Figura 6. Ontogenia de colônias de *Ac. subterraneus* (rainhas coletadas em 2011).

Discussão

Para *Ac. subterraneus*, a sobrevivência das rainhas após o voo nupcial variou em função do seu peso inicial e em relação ao tempo. Entretanto, estas variáveis não influenciaram na produtividade das rainhas. Mesmo com a exclusão de alguns fatores como escavação e busca por alimento, considerados como fatores de alto risco e que favorecem a mortalidade, a probabilidade de sobrevivência ainda foi baixa durante o período de fundação das colônias, especialmente nas duas primeiras semanas. Quase metade das fêmeas não depositou o fungo simbiote e morreu sem êxito na fundação da colônia. Com relação à ontogenia das colônias, esta ocorreu de forma gradual, posto que novos estágios de desenvolvimento surgiam em média a cada duas semanas.

A taxa de mortalidade de *Ac. subterraneus*, que atingiu 45% durante o período de incubação (1ª e 2ª semanas), pode ter sido ainda maior, visto que não se sabe ao certo o número de indivíduos

produzidos e liberados para o voo nupcial. Sabe-se que em *Pogonomyrmex*, o percentual de mortes durante a dispersão de acasalamento atinge 99% (Gordon e Kulig 1996). Embora em condições diferentes das observadas para *Ac. subterraneus*, a taxa de mortalidade em colônias incipientes de *Ac. octospinosus* em campo também é alta, com 48% das mortes ocorridas no primeiro mês após o voo nupcial (Fernández-Marín et al. 2003). Para *Atta sexdens rubropilosa*, esse número pode alcançar 99.95% no decorrer a fase de fundação (Autuori, 1950). Em colônias de *Atta sexdens* criadas em laboratório sob condições semelhantes à deste estudo, a mortalidade de rainhas atingiu cerca de 58.3% em até uma semana após o voo nupcial (Augustin e Lopes 2007).

Interessante observar que os gêneros citados anteriormente possuem diferentes tipos de fundação (Enzmann e Nonacs 2010 - *Pogonomyrmex*: semi-claustral, facultativo ou claustral; Hölldobler & Wilson 1990 - *Acromyrmex*: semi-claustral; *Atta*: claustral) e, no entanto, todos apresentam uma taxa de mortalidade elevada. Uma estratégia também comum a todos é a fundação do tipo independente, em que uma única fêmea reprodutiva (ou algumas no caso de pleometrose) é capaz de cultivar o fungo e criar a primeira geração de prole sozinha (Fernández-Marín et al. 2004). Espécies que apresentam esta estratégia liberam milhares de indivíduos reprodutivos (Hölldobler & Wilson 1990) e, independentemente do quão especializados sejam para empregar um tipo de fundação pré-estabelecido, todos experimentarão uma alta mortalidade a partir do momento que saem da colônia-mãe até o início de fase ergonômica (Schmid-Hempel 1984, Hölldobler e Wilson 1990, Peeters e Ito 2001).

Comumente, a alta mortalidade de rainhas durante e logo após a dispersão é associada à predação por pássaros, lagartos e formigas (Autuori 1950, Fowler 1984, Robertson e Villet 1989, Hölldobler e Wilson 1990), afogamento ou dissecação durante o voo (Peeters e Ito 2001), ao esforço de escavação (Camargo et al 2011), ou ainda contaminação por fungo patogênico durante a escavação ou forrageamento (Augustin 2011, Hughes et al. 2009). Ao realizar este experimento em laboratório tem-se a exclusão de alguns destes fatores, no entanto, a chance de sobrevivência ao final de 15 semanas para *Ac. subterraneus* foi de menos de 0.1%, indicando que as causas desta alta mortalidade vão além dos fatores citados anteriormente. A menor probabilidade de sobrevivência de rainhas muito leves aliada à supressão das atividades de escavação e busca por alimento é um indicativo de que a massa das rainhas por si só pode ser um fator relevante atuando na taxa de mortalidade.

Frequentemente o tamanho do inseto se relaciona com sua taxa metabólica tanto intra quanto interespecificamente (Waters e Harrison 2012). Após o voo nupcial, machos de *A. sexdens rubropilosa* chegam a perder 2 vezes mais lipídios e até 54 vezes mais carboidratos do que as fêmeas (Silva et al 2015). Contrastando essas duas castas reprodutivas observamos que o maior tamanho das fêmeas e, conseqüentemente o maior acúmulo de reservas das fêmeas associado ao menor gasto energético no desempenho de uma mesma atividade confere-lhes uma taxa metabólica mais baixa. Castas maiores também parecem apresentar menores taxas metabólicas específicas em massa (*Atta laevigata*, Hebling-Beraldo e Mendes 1981; *Pogonomyrmex badius*, Porter 1986; *Solenopsis invicta*, Calabi e Porter 1989; e *Pheidole bicarinata*, *Pheidole dentata*, *Pheidole morrissi*, Shik 2010), o que pode permitir uma economia para a colônia usando relativamente menos energia do que as castas menores. Assim, extrapolando essas considerações para o peso das rainhas, rainhas muito leves podem possuir uma taxa metabólica mais alta que as demais, o que ocasiona um maior consumo de energia. Dessa maneira, a economia de energia advinda das atividades suprimidas pode não ter sido suficiente para aumentar suas chances de sobrevivência.

Ademais, o decréscimo contínuo de massa corporal durante a fundação também pode ter contribuído para a menor probabilidade de sobrevivência de rainhas muito leves. O impacto da perda de 35% da massa corporal é maior nestes indivíduos do que nos indivíduos das demais categorias de peso. Este valor é próximo ao encontrado para *Atta sexdens* e *Atta laevigata* (40% de perda) (Della Lucia et al. 1995), o que torna o evento comparativamente mais desfavorável para *Acromyrmex* independente do peso inicial das jovens rainhas, uma vez que rainhas de *Atta* são maiores e mais pesadas. Além disso, por serem menores, os músculos de voo destes indivíduos também são menores (Peeters e Ito 2001) e sua histólise pode não ter produzido uma fonte suficiente de energia para execução das atividades inerentes a esse período.

Por fim, a dispersão e as estratégias de fundação são outros fatores importantes que podem ser associados ao tamanho dos indivíduos. Geralmente rainhas maiores têm alta capacidade de dispersão e elevado teor de gordura e de reservas de glicogênio, um fenótipo adequado para fundação de colônia independente (Keller e Passera 1989). Em contrapartida, rainhas menores tendem a acasalar e ficar dentro da colônia natal, participar de uma colônia já estabelecida ou fundar uma colônia perto do local natal com o auxílio das operárias (Rüppell e Heinze 1999, Peeters e Ito, 2001). A fundação independente feita por uma única rainha (haplometrose) é a forma mais comum de estabelecimento em Attini, assim como para Formicidae em geral (Rissing e Pollack, 1988). No

entanto, rainhas de uma mesma espécie podem fundar o ninho tanto por haplometrose quanto por pleometrose, o que foi demonstrado para *Acromyrmex striatus* e *Acromyrmex octospinosus* (Diehl-Fleig e Rocha 1998, Fernández-Marín et al. 2003). Assim sendo, rainhas muito leves e, portanto, menores, de *Ac. subterraneus* poderiam ter apresentado melhores chances de sobrevivência se tivessem tido a oportunidade de fundar a colônia juntamente com outras fêmeas (pleometrose).

Por outro lado, apesar da massa inicial das rainhas ter sido determinante na chance de sobrevivência, esta não se correlacionou com a taxa de produtividade. Assim, a premissa de que fêmeas maiores possuem maiores chances de sobrevivência e prole maior e/ou mais numerosa (Roff 1992, Stearns 1992, Wiernasz e Cole, 2003) pode ser aceita em parte para *Ac. subterraneus* sob essas condições. O fato de a taxa de produtividade não ter diferido entre rainhas de diferentes massas pode estar associado à economia de energia promovida especialmente pela supressão das atividades de escavação e busca pelo alimento. Assim, comparativamente às rainhas com maior massa, as com menor massa teriam menos energia para fazer postura e cuidar da prole e, portanto, pela forma como o experimento foi conduzido podem ter sido privilegiadas alcançando a fase ergonômica com taxa de produtividade similar à das demais rainhas. Indiretamente a menor massa tem efeito sobre a produtividade visto que rainhas de menores massa não sobrevivem, mas uma vez que elas sobrevivem a massa inicial não teve efeito na produtividade. Também a semi-claustalidade pode explicar o fato da massa inicial não estar relacionado com a produtividade. Como forrageiam durante a fase de fundação (Hölldobler & Wilson 1990), todas as rainhas, independentemente de sua massa inicial, tiveram a oportunidade de obter a mesma quantidade de energia e convertê-la em prole. Embasando essas sugestões tem-se ainda a informação de que, a partir da 13ª semana aproximadamente, todas as rainhas (de diferentes categorias de peso) apresentaram similares chances de sobrevivência (Fig.1), o que condiz com o período onde a colônia tem um número razoável de operárias (Fig. 6).

Outros eventos observados podem ter relação com a baixa sobrevivência registrada. Sugere-se que alta taxa de mortalidade também esteja associada com a ausência do fungo simbiote, uma vez que em aproximadamente 50% das rainhas mortas na primeira semana (2011), o fungo simbiote não foi registrado (Autuori 1941). Tal suposição tem embasamento na relação simbiótica obrigatória das espécies da tribo Attini com fungos das famílias Lepiotaceae e Pterulaceae (Basidiomycota) (Schultz & Brady 2008, Augustin 2011), sendo estes a principal fonte alimentar da colônia. Tão sólida é esta dependência que, ao deixar a colônia mãe, as rainhas virgens

devem levar em sua cavidade infrabucal um pellet de fungo que será a cultura de partida para seu novo jardim (Ihering 1898, Huber 1905). A saída da colônia mãe sem o fungo simbiote ou a perda natural do mesmo é um evento comum para rainhas de Attini (Mueller et al. 1998, Fernández-Marín et al. 2004). Bot et al. (2001) sugerem que o fato de *Acromyrmex* aceitarem novos jardins de fungo e conseguirem sobreviver é um indicativo de que o fungo simbiote é facilmente perdido. Em ambos os casos, existem ações alternativas executadas pelas rainhas que podem reparar a fatalidade da ausência do fungo como: se juntar a uma colônia que tenha o jardim de fungo já estabelecido; recrutar outras fundadoras que possuam o pellet de fungo (co-fundação); roubar o fungo de outro ninho, ou ainda encontrar uma fonte externa de fungo compatível (Fernández-Marín et al. 2004). Neste estudo, entretanto, as rainhas não tiveram nenhuma dessas possibilidades, de modo que a ausência do fungo foi condizente com sua morte.

A deposição do fungo na lateral do pote e a transferência do mesmo para o substrato alimentar oferecido podem ser ações relacionadas ao comportamento de higiene. Depositar o fungo em plataformas ou não diretamente no assoalho é um comportamento já relatado para rainhas de Attini. Juntamente com o selfgrooming e a frequente limpeza das pernas antes da manipulação do substrato, estas ações podem permitir que o jardim de fungo cresça livre de patógenos, o que pode ser uma adaptação para aumentar a sobrevivência (Augustim et al. 2011, Fernández-Marín et al. 2003). Gêneros transicionais e o altamente derivado gênero *Acromyrmex* utilizam raízes como plataformas para anexar o fungo, e tendem a depositar a prole associado a ele (Fernández-Marín et al. 2004). Fundadoras de *Ac. octospinosus*, por exemplo, aparentemente não selecionam espécies de plantas para fixar o fungo. No entanto, na ausência de uma raiz na câmara primária, o pellet pode ser anexado em uma pedra ou no teto da câmara (Fernández-Marín et al. 2004), corroborando as informações de ocorrência frequente de ninhos adultos de *Acromyrmex* associados a raízes de plantas e edificações (Verza et al. 2007, Camargo et al. 2004, Lopes et al. 2010). Este comportamento de proteção ao fungo simbiote não é observado apenas nos estágios iniciais de fundação. Colônias laboratoriais já estabelecidas de *Ac. subterraneus* quando infectadas por fungo patogênico, evitaram o contato do fungo simbiote com a camada de gesso, transferindo-o para a parte superior do pote (observação pessoal). Apesar de o uso das asas como plataforma para o pellet de fungo ser um comportamento comum para rainhas de Attini mais basais e uma espécie de um gênero mais derivado (Fernández-Marín et al. 2004), a presença das asas em algumas fundadoras neste estudo não teve esse propósito, tampouco figurou rainhas virgens.

Fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus flavus*, são comumente encontrados em colônias de formigas cortadeiras (Hughes et al. 2004) e a contaminação da colônia é frequentemente associada à atividade de forrageamento (Currie et al. 1999, Hughes et al. 2009). Rainhas são vulneráveis a infecções por parasitos no período de fundação da colônia devido à múltiplas demandas energéticas que devem ser cumpridas simultaneamente (Baer et al. 2006). Dados para *Ac. octospinosus* revelaram que alguma contaminação do jardim de fungo foi condizente com a hipótese de que as fundadoras transportaram contaminantes acidentalmente durante o forrageamento (Fernández-Marín et al. 2004). Contudo, o fato das rainhas deste estudo não terem escavado ou fundado a colônia no solo (contendo contaminantes) nem forrageado fora da câmara, indica que a contaminação ocorreu em outra fase da vida, durante o voo nupcial (Hughes et al. 2009) ou ainda na colônia mãe (mas veja Currie et al. 1999). Outra hipótese igualmente plausível é a de que os contaminantes estivessem nas plantas oferecidas como alimento, e as rainhas que sucumbiram ao patógeno tivessem baixa imunidade.

Estes resultados demonstraram claramente que alta mortalidade inicialmente experienciada por *Ac. subterraneus* seguida por uma elevada taxa de sobrevivência, sendo um evento de ocorrência compartilhada por muitos invertebrados (Begon et al. 2007). Apesar de fatores repetidamente citados como promotores da alta mortalidade - competição por locais de nidificação, escavação, predação e dissecação durante o forrageamento - apresentarem sua parcela de contribuição no aumento da taxa, outros elementos devem ser igualmente considerados. A massa das rainhas, a ausência do fungo simbiote e, em menor parte, a contaminação por fungo patogênico são fatores que reduzem a taxa de sucesso das fundadoras. No entanto, a energia economizada por meio da supressão das atividades de escavação e busca por alimento parece ter sido suficiente para equiparar a taxa de produtividade entre rainhas de diferentes categorias de massa. Portanto, obter informações que dizem respeito aos períodos de vida em que os indivíduos são mais vulneráveis, bem como os fatores que contribuem para essa vulnerabilidade, permite compreender melhor a dinâmica destas populações.

Referências Bibliográficas

- Augustin JO, Lopes JFS. 2007. Sociometria e comportamento de rainhas de saúva (*Atta sexdens* Linnaeus, 1758) (Hymenoptera, Formicidae) mantidas em laboratório. **Zoociências** 8(2): 240.
- Augustin JO. 2011. Novas espécies de *Escovopsis*, sua dispersão e virulência na simbiose formigas Attine - *Leucoagaricus gongylophorus*. 131f. Tese (doutorado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Augustin JO, Lopes JFS. 2011. Brood production and mortality rate of young saúva queens (*Atta sexdens* Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) reared in artificial colonies with mixed substratum. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável** 1(1):39-42.
- Augustin JO, Santos JFL, Elliot SL. 2011. A behavioral repertoire of *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) queens during the claustral founding and ergonomic stages. **Insectes Sociaux** 58:197–206. doi: 10.1007/s00040-010-0137-7.
- Autuori M. 1941. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) I. Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Revista Arquivos do Instituto Biológico** 12:197-228.
- Autuori M. 1950. Contribuição para o conhecimento de saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera: Formicidae). V. Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. **Arquivos do Instituto Biológico** 19: 325-331.
- Baer BC, Armitage SAO, Boomsma JJ. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. **Nature** 441:872 – 875. doi:10.1038/nature04698.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2007. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Tradução: Adriano Sanches Melo et al. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed. 752p.
- Bot ANM, Rehner SA, Boomsma JJ. 2001. Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Evolution** 55(10):1980–1991. doi: 10.1111/j.0014-3820.2001.tb01315.x.
- Calabi P, Porter SD. 1989. Worker longevity in the fire ant *Solenopsis invicta* - ergonomic considerations of correlations between temperature, size and metabolic rates. **Journal of Insect Physiology** 35:643–649. doi: 10.1016/0022-1910(89)90127-3.

- Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS, Andrade APP. 2004. Characterization of *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae) young nests in a fragment of the neotropical forest. **Revista Árvore** 28(2): 309-312. doi: 10.1590/S0100-67622004000200017.
- Camargo RS, Forti LC, Fujihara RT, Roces F. 2011. Digging effort in leaf-cutting ant queens (*Atta sexdens rubropilosa*) and its effects on survival and colony growth during the claustral phase. **Insectes Sociaux** 58: 17-22.
- Carvalho MC, Queiroz PCD, Ruscycka A. 1998. Protandry and female size-fecundity variation in the tropical butterfly *Brassolis sophorae*. **Oecologia** 116: 98-109.
- Crawley MJ. 2007. **The R Book**. John Wiley & Sons Ltd, England. 942p.
- Currie CR, Mueller UG, Malloch D. 1999. The agricultural pathology of ant fungal gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 96: 7992–7995. doi: 10.1073/pnas.96.14.7998.
- Della Lucia TMC, Moreira DDO, Oliveira MA, Araújo MS. 1995. Perda de peso de rainhas de *Atta* durante a fundação e o estabelecimento das colônias. **Revista Brasileira Biologia**, 55(4): 533-536.
- Diehl-Fleig E, Rocha ES. 1998. Escolha de Solo por Fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para Construção do Ninho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 27(1):41-45.
- Enzmann BL, Nonacs P. 2010. Digging beneath the surface: incipient nest characteristics across three species of harvester ant that differ in colony founding strategy. **Insectes Sociaux** 57:115–123. doi: 10.1007/s00040-009-0056-7.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Wcislo WT. 2003. Nest-founding in *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera, Formicidae, Attini): demography and putative prophylactic behaviors. **Insectes Sociaux** 50: 304–308. doi: 10.1007/s00040-003-0687-z.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Wcislo WT. 2004. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). **Biological Journal of the Linnean Society** 81: 39-48.
- Fewell JH, Harrison JH, Lighton JRB, Breed RB. 1996. Foraging energetics of the ant, *Paraponera clavata*. **Oecologia** 105: 419–427. doi: 10.1007/BF00330003.

- Fowler HG, Robinson SW, Diehl J. 1984. Effect of mature colony density on colonization and initial colony survivorship in *Atta capigura*, a leaf-cutting ant. **Biotropica** 16(1):51 -54. doi: 10.2307/2387894.
- Gordon DM, Kulig AW. 1996. Founding, foraging, and fighting: colony size and the spatial distribution of harvester ant nests. **Ecology** 77(8): 2393-2409. doi: 10.2307/2265741.
- Hebling-Beraldo MJA, Mendes EG. 1981. The respiratory metabolism of the castes of two leaf cutting ants, *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) and *Atta sexdens rubropilosa* (Forel 1908). **Comparative Biochemistry and Physiology** 68(2):241–247. doi: 10.1016/0300-9629(81)90347-9
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. **The Ants**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Huber J. 1905. On colony founding in *Atta sexdens* (translated from German). *Biol Centralbl* 25:625–635.
- Hughes DP, Evans HC, Hyel-Jones N, Boosma JJ, Armitage SO. 2009. Novel fungal disease in complex leaf-cutting ant societies. **Ecological Entomology** 34: 214–220. doi: 10.1111/j.1365-2311.2008.01066.x.
- Ihering RV. 1898 The founding of new colonies and fungus gardens in *Atta sexdens* (translated from German). **Zoologischer Anzeiger** 21:238–245.
- Jutsum AR, Quinlan RJ. 1978. Flight and substrate utilisation in laboratory-reared males of *Atta sexdens*. **Journal of Insect Physiology**, 24:821-825. doi: 10.1016/0022-1910(78)90102-6.
- Keller L, Passera L. 1989. Size and fat content of gynes in relation to the mode of colony founding in ants (Hymenoptera; Formicidae). **Oecologia** 80:236–40. doi: 10.1007/BF00380157.
- Lopes JFS, Fieto LFR, Brugger MS, Camargo RS, Caldato N, Forti LC. 2010. Internal Architecture and Population Size of *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera, Formicidae) Nests: Comparison Between a Rural and an Urban Area. **Sociobiology** 58(2):593-695.
- Mariconi FAM. 1970. **As saúvas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres.
- Mueller UG, Rehner SA, Schultz TR. 1998. The evolution of agriculture in ants. **Science** 281: 2034–2038.
- Oberhauser K. 1997. Fecundity, life-span and egg mass in the butterflies: effects of male-donated nutrients and female size. **Functional Ecology** 11: 116-175.

- Peeters C, Ito F. 2001. Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social Hymenoptera. **Annual Review of Entomology** 46:601–30.
- Porter SD. 1986. Revised respiration rates for the southern harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. **Comparative Biochemistry and Physiology** 83A:197–198.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rissing SW, Pollack GB. 1988. **Pleometrosis in ants**. In: Jeanne JR, ed. Interindividual behavioural variability in social insects. Boulder, CO: Westview Press, 179–222.
- Robertson HG, Villet M. 1989. Mating behaviour in three species of myrmicine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Natural History** 23(4):767–73. doi:10.1080/00222938900770401.
- Roff DA. 1992. **The evolution of life histories**. Chapman and Hall, New York.
- Rüppell O, Heinze J. 1999. Alternative reproductive tactics in females: the case of size polymorphism in winged ant queens. **Insectes Sociaux** 46: 6–17. doi: 10.1007/s000400050106.
- Schmid-Hempel P. 1984. Individually different foraging methods in the desert ant *Cataglyphis bicolor* (Hymenoptera, Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology** 14: 263–271. doi: 10.1007/BF00299497.
- Schultz TR, Brady SG. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105(14): 5435–5440. doi:10.1073/pnas.0711024105.
- Seal J, Tschinkel W. 2007. Energetics of newly-mated queens and colony founding in the fungus-gardening ants *Cyphomyrmex rimosus* and *Trachymyrmex septentrionalis* (Hymenoptera: Formicidae). **Physiological Entomology** 32: 8–15. doi: 10.1111/j.1365-3032.2006.00534.x.
- Seal JN. 2009. Scaling of body weight and fat content in fungus-gardening ant queens: does this explain why leaf-cutting ants found claustrally? **Insectes Sociaux** 56(2):135-141. doi 10.1007/s00040-009-0002-8.
- Shik JZ. 2010. The metabolic costs of building ant colonies from variably sized subunits. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 64(12): 1981-1990. doi: 10.1007/s00265-010-1009-x.

- Silva EJ, Camargo RS, Forti LC. 2015. Flight and digging effort in leaf-cutting ant males and gynes. **Sociobiology** 62(3):334-339. doi: 10.13102/sociobiology.v62i3.427.
- Stearns SC. 1992. **The evolution of life histories**. Oxford Univ. Press, New York.
- Vander Meer RK, Morel L, Lofgren CS. 1992. A comparison of queen oviposition rates from monogyne and polygyne fire ant, *Solenopsis invicta*, colonies. **Physiological Entomology** 17: 384–390. doi: 10.1111/j.1365-3032.1992.tb01036.x.
- Verza SS, Forti LC, Lopes JFS, Hughes WO. 2007. Nest Architecture of the leaf-cutting ant *Acromyrmex rugosus rugosus*. **Insectes Sociaux** 54:303-309. doi: 10.1007/s00040-007-0943-8.
- Waters JS, Harrison JF. 2012. Metabolic Ecology: A Scaling Approach, Chapter: Insect Metabolic Rates, Editors: Sibly RM, Brown JH, Kodric-Brown A. Wiley-Blackwell, pp.198-211. DOI: 10.1002/97811119968535.ch16
- Wiernasz DC, Cole BJ. 2003. Queen size mediates Queen survival and colony fitness in harvester ants. **Evolution** 57(9): 2179-2183. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00396.x
- 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.

CAPÍTULO III – Custo do forrageamento: Influência da busca por alimento no fitness de colônias jovens de *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Formicidae)

Resumo

Forrageamento e fitness são intimamente interligados, uma vez que a energia maximizada com a obtenção de alimentos deve refletir diretamente na capacidade de sobrevivência e reprodução dos animais. Durante a fase de fundação da colônia, as rainhas dispõem de reservas corporais limitadas e a economia de energia na atividade de forrageamento pode influenciar positivamente tanto na produção de prole quanto na sobrevivência das mesmas. Partindo desta hipótese, foi analisado o custo do forrageamento em termos energéticos (lipídios e massa corporal) e em termos de fitness (sobrevivência, prole, peso do jardim de fungo e tamanho das operárias) em rainhas de *Acromyrmex subterraneus* durante o período de fundação da colônia. Três condições de forrageamento foram manipuladas: 30 rainhas não receberam folhas (NRA), 30 rainhas receberam folhas diretamente na câmara (RAC) e 30 rainhas receberam folhas a 3 metros de distância da câmara (RAT). A emergência das primeiras operárias indicou o término do experimento para a colônia em questão. Após 10 semanas, foi verificado que as diferentes condições de forrageamento não afetaram a sobrevivência das rainhas. No entanto, os grupos que receberam folhas (RAC e RAT) apresentaram menos lipídios e maior taxa de perda de peso. Rainhas do NRA não foram capazes de cultivar o fungo nem criar prole, o que indica que o alimento é importante não para sobrevivência, mas sim para o sucesso da colônia. A análise comparativa de prole, peso do jardim de fungo e tamanho das operárias foi realizada apenas entre RAC e RAT. Entre RAC e RAT não foi possível verificar diferenças entre o tamanho das operárias. No entanto, apesar do número de ovos não ter sido significativamente diferente, o número de larvas, pupas e o peso do fungo simbionte foram maiores no grupo RAC. Considerando a similaridade na taxa de sobrevivência entre os grupos, relaciona-se o não desenvolvimento das colônias em NRA com a falta de substrato para o cultivo do fungo, e não com a subnutrição e morte antecipada das rainhas. Já o forrageamento influenciou o fitness da colônia, não em relação ao custo energético para desempenhar esta atividade, mas em relação ao tempo gasto fora do ninho, tempo este que poderia ser investido na criação e manutenção da colônia tornando-a mais populosa rapidamente.

Palavras-chave: custo energético, forrageamento, prole, sobrevivência

Abstract

(Foraging cost: The influence of search for food on the fitness of young colonies of *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Formicidae). Foraging and fitness are deeply connected since the energy maximized by food attainment should directly reflect the survival capability as well as the reproduction of animals. During the foundation period, queens have limited body reserves and the energy saved during the foraging may positively influence both offspring production and survival. Following this hypothesis, the foraging cost by energetic (lipids and body mass) and fitness (survival, offspring, fungus garden weight and workers size) terms were analysed in *Acromyrmex subterraneus* queens during the foundation period. Three foraging conditions were manipulated: 30 queens did not receive leaves (NRA), 30 queens received leaves inside the chamber (RAC) and 30 queens received leaves 3 meters away from the chamber (RAT). The emergence of the first worker in each colony indicated the end of the experiment for that colony. After 10 weeks, it was verified that the different foraging conditions did not affect the queen's survival. However, the groups that received leaves (RAC and RAT) had less lipids and a greater weight loss rate. The comparative analysis of offspring, fungus garden weight and worker size were done only between RAC and RAT since the NRA queens were neither able to cultivate the fungus garden nor raise offspring. Between RAC and RAT it was not possible to verify differences in worker size. Nevertheless, despite the numbers of eggs not being significantly different, the number of larvae, pupae and fungus garden weight were greater in RAC. Considering the similarity of survival rate between the groups, the non-development of the colonies in NRA is related to the lack of substrate for fungus cultivation, and not directly to the undernourishment and premature death of the queen. Foraging influenced the colony fitness, not in relation to the energy cost to perform this activity, but in relation to the time spent outside the nest, which could be invested in the colony's creation and maintenance making them more populous quicker.

Key-words: energetic cost, foraging, brood, survival

Introdução

O fitness é um atributo que pode ser entendido como a capacidade de sobrevivência e de reprodução dos animais (Ehrlich e Roughgarden 1987, Cockburn 1991, Weirnasz e Cole 2003). Um fator importante para o fitness está ligado ao consumo de energia pelos animais, que supõe-se ser maximizado durante o forrageamento, e portanto, qualquer decisão tomada em prol desta atividade deve refletir em seu fitness (Breed e Moore 2012). Basicamente dois componentes principais estão relacionados ao comportamento de forrageamento: a procura pelo alimento e seu transporte até à colônia. (Hölldobler e Wilson 1990).

Em formigas que apresentam fundação do tipo semi-claustral, o forrageamento realizado pelas rainhas durante o período de fundação da colônia é essencial para sua sobrevivência e provisionamento da sua prole (Johnson 2002, Brown e Bonhoeffer 2003). Nessas rainhas, os músculos de voo são pequenos e sua histólise não garante uma fonte suficiente de aminoácidos para o desenvolvimento das larvas (Peeters e Ito 2001), e para desempenhar outras atividades a reserva corporal certamente é utilizada. Parte dessa reserva é armazenada no corpo gorduroso dos insetos e, apesar de variar de acordo com a espécie, os lipídios são sempre seu maior componente, representando mais do que 50% do peso seco do inseto (Gilby 1965, Ziegler 1991).

Os lipídios são considerados a principal fonte de combustível metabólico e podem ser mobilizados e utilizados em várias ocasiões como em voos de longa duração, em períodos de escassez de alimento, na síntese de trealose e prolina, na embriogênese e na resposta imune (Arrese e Soulages 2010). No entanto, em outras atividades como escavação (Camargo et al. 2013) e voos de curta duração (Jutsum e Quinlan 1978) os carboidratos foram atestados como principal recurso utilizado. Sabe-se que o forrageamento gera custos energéticos que podem variar inclusive com a disposição dos recursos no ambiente, onde recursos esparsos requerem longas distâncias de forrageamento, ocasionando em uma baixa taxa de sucesso para as colônias (Fewell et al. 1996). Apesar da importância do alimento na fase de fundação ser indiscutível para formigas semi-claustrais, ainda não é esclarecido como o forrageamento afeta o fitness da colônia e se ocorre a mobilização de lipídios durante esta atividade.

Tendo como base formigas do gênero *Acromyrmex*, que assim como as demais possuem reservas corporais limitadas durante a fase de fundação, a economia de energia com o forrageamento pode influenciar positivamente tanto na produção de prole quanto na sobrevivência

das rainhas durante as semanas em que ela se ocupa sozinha com a cria em desenvolvimento e com o jardim fungo inicial. Uma maneira de testar esta hipótese envolve a comparação do custo do forrageamento em termos energéticos (lipídios e massa) e em termos de fitness para rainhas de *Acromyrmex subterraneus* (Forel 1893) durante o período de fundação da colônia sob diferentes condições de forrageamento. O fitness foi quantificado como taxa de sobrevivência, produção de prole, peso do jardim de fungo até a emergência das primeiras operárias e tamanho das operárias.

Material e Métodos

Coleta de rainhas

Rainhas de *Ac. subterraneus* foram coletadas após o voo nupcial no dia 29 de novembro de 2013 na Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais (21°46'43.65"S, 43°21'16.84"W). A área é antropizada, com muitas construções e alguns locais com solo exposto ou coberto por gramíneas (Anexo 1, círculo azul). A captura ocorreu entre 7:30 e 10h da manhã e logo após, cada fêmea foi pesada em balança de precisão analítica e mantida em potes plásticos (250ml) individualizados, com 1cm de gesso no fundo, umidificado regularmente. O pote funcionou como a câmara inicial da colônia, e dessa maneira, as rainhas não necessitaram escavar. Todas as colônias foram mantidas em laboratório a temperatura e umidade de aproximadamente 25°C e 80% e as colônias cobertas com papel celofane vermelho a fim de reduzir a exposição à luminosidade.

Delineamento Experimental

Após 4 dias, foram selecionadas 90 rainhas que haviam regurgitado o fungo simbiote e depositado ovos, e por essa razão, consideradas com semelhantes condições de fundar o ninho. Sabendo-se que o custo/benefício do forrageamento pode variar de acordo com o tamanho do corpo das rainhas (Fewell et al. 1996, Johnson 2002), foi verificado que não havia diferença significativa entre os pesos das rainhas (Kruskal-Wallis: $H = 3.75$, $GL = 2$, $P = 0.15$), permitindo assim que fossem distribuídas aleatoriamente em três tratamentos (contendo 30 rainhas em cada):

NRA - rainhas não receberam alimento;

RAC - rainhas receberam alimento diretamente na câmara e

RAT - rainhas receberam alimento a 3 metros de distância da câmara.

No tratamento RAT, uma mangueira plástica transparente de 3 metros de comprimento foi interligada em linha reta entre a câmara de fungo e o pote onde foi oferecido o alimento. Tal distância foi determinada de acordo com o observado em campo por Fernandez-Marín et al. (2003). A cada dois dias, rainhas do RAC e RAT recebiam um disco de 3,7 cm de diâmetro de folhas frescas de *Acalypha* sp. O registro de mortes, assim como o de emergência da primeira geração de operárias, também foi tomado a cada dois dias e o peso das rainhas tomado quinzenalmente a fim de minimizar a perturbação na colônia.

Na medida em que surgiam as primeiras operárias, o experimento era interrompido para a colônia em questão. Procedia-se então a contagem de ovos, larvas, pupas e operárias, além da mensura do peso do jardim de fungo e do tamanho das operárias (largura da cabeça). As rainhas foram congeladas para posterior extração de lipídios. Uma vez que rainhas do NRA não foram capazes de cultivar o fungo nem criar prole, o término do experimento para este tratamento ocorreu quando estas rainhas morreram ou quando surgiram as primeiras operárias da última colônia sobrevivente de RAC ou RAT, sendo as mesmas mortas por congelamento.

Extração de lipídios

O método de extração foi o mesmo utilizado por Camargo et al. (2013). Rainhas provenientes dos três tratamentos e que estavam congeladas foram secadas individualmente em estufa a 50°C por 24h. Após a primeira medida de peso seco ter sido determinada, os lipídios foram extraídos com solvente (pentano) por 24h. As rainhas foram então secadas por mais 24h e depois pesadas. Os procedimentos de extração, secagem e pesagem foram repetidos mais três vezes até que o peso seco das rainhas estabilizasse.

Métodos estatísticos e definição de variáveis

As curvas de sobrevivência das rainhas nos três tratamentos foram geradas através da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, seguido pelo teste log-rank para dados censurados. O dia 1 do experimento foi determinado como momento inicial das observações e o ponto final quando as rainhas morreram (censor 1) ou quando surgiram as primeiras operárias (censor 0). A probabilidade de sobrevivência foi considerada como variável resposta e o tempo de morte como variável explicativa.

Os dados de conteúdo de lipídios com distribuição normal (Shapiro-Wilk: $W = 0.98$, $P = 0.77$) e variâncias homocedásticas (Bartlett: $K = 0.15$, $df = 2$, $P = 0.93$), foram comparados através de Anova, seguido do teste *post hoc* de Tukey a 0.05% de significância.

Com os dados de massa das rainhas tomados quinzenalmente desde o início do experimento até a emergência da primeira geração de operárias, foi calculada uma taxa de perda de peso através da fórmula:

$$\sum (P_{i+1} - P_i)/N,$$

onde P_i é o peso das rainhas e N o número de medidas tomadas. Como os dados dessa taxa também possuem distribuição normal (Shapiro-Wilk: $W = 0.99$, $P = 0.96$) e variâncias homocedásticas (Bartlett: $K = 0.29$, $df = 2$, $P = 0.86$), as comparações entre os três tratamentos foram analisadas através de Anova, seguido do teste *post hoc* de Holm a 0.05% de significância.

Para as análises pareadas em que se comparou o número de ovos, larvas e pupas, peso do fungo e tamanho da cabeça das operárias entre os tratamentos RAT e RAC, foi utilizado Teste t quando as variâncias foram homogêneas e Teste t com correção de Welch quando as variâncias não foram homogêneas. Todas as análises foram feitas utilizando o programa R 3.1.3 (R Development Core Team 2013).

Resultados

As chances de sobrevivência de rainhas de *Ac. subterraneus* não variaram de acordo com os três tratamentos (Kaplan-Meier log-rank test: LR = 1.81, GL = 2, $P = 0.40$). No entanto, registrou-se que o conteúdo de lipídios nos grupos que receberam alimento (RAC e RAT), os quais de fato fundaram a colônia, foi significativamente menor quando comparado ao grupo que não recebeu alimento (NRA) (Anova: $F = 4.71$, $P = 0.01$; Tukey: RAC - NRA: $P = 0.03$, RAT - NRA: $P = 0.01$). O conteúdo de lipídios de rainhas de RAT e RAC não foi significativamente diferente (Tukey: RAT - RAC: $P = 0.85$; Fig. 1).

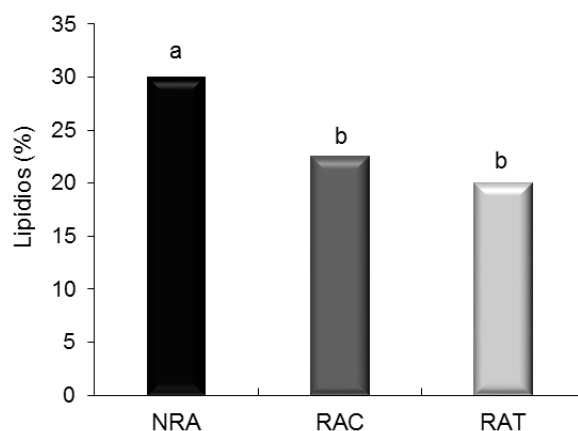


Figura 1. Porcentagem de lipídios de rainhas de *Ac. subterraneus* submetidas a três tratamentos: NRA - não receberam alimento; RAC - receberam alimento diretamente na câmara; RAT - receberam alimento à 3 metros da câmara.

Durante o período de fundação, a perda de peso entre rainhas dos três tratamentos foi diferente (Anova: $F = 5.07$, GL= 2, $P = 0.01$), sendo que rainhas que não receberam alimento apresentaram uma taxa de perda de peso significativamente mais baixa em relação aos demais grupos (Holm: NRA - RAC: $P = 0.048$, NRA - RAT: $P = 0.01$, RAC - RAT: $P = 0.29$, Fig. 2).

Rainhas do NRA não foram capazes de cultivar o fungo nem criar prole, portanto a análise comparativa da produção de prole é apenas entre RAC e RAT. Apesar do número médio de ovos ter sido similar entre os dois grupos (Teste t: $t = -0.07$, GL= 24, $P = 0.94$), o número de larvas (Teste t com correção de Welch: $t = 2.48$, GL= 18.713, $P = 0.01$) e de pupas (Teste t: $t = 2.69$, GL= 24, $P = 0.01$) foram significativamente maiores no grupo RAC (Fig. 3).

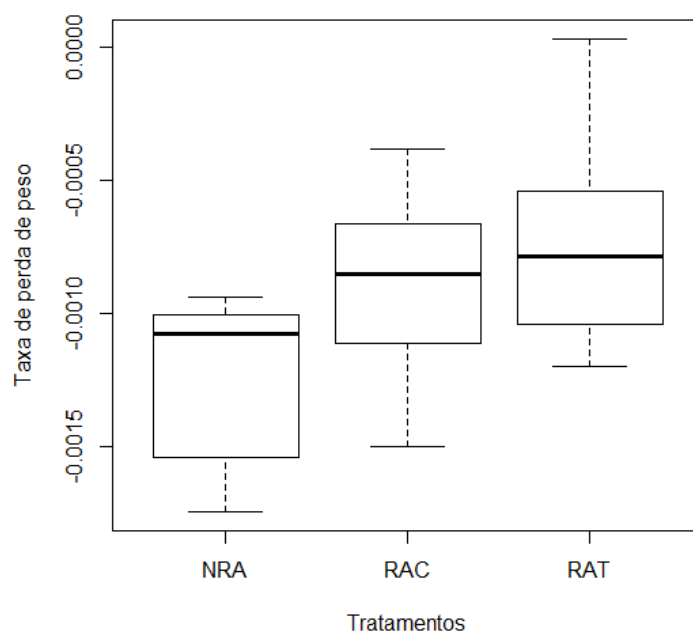


Figura 2. Taxa de perda de peso de rainhas de *Ac. subterraneus* durante a fase de fundação submetidas a três tratamentos: NRA - não receberam alimento; RAC - receberam alimento diretamente na câmara; RAT - receberam alimento à 3 metros da câmara.

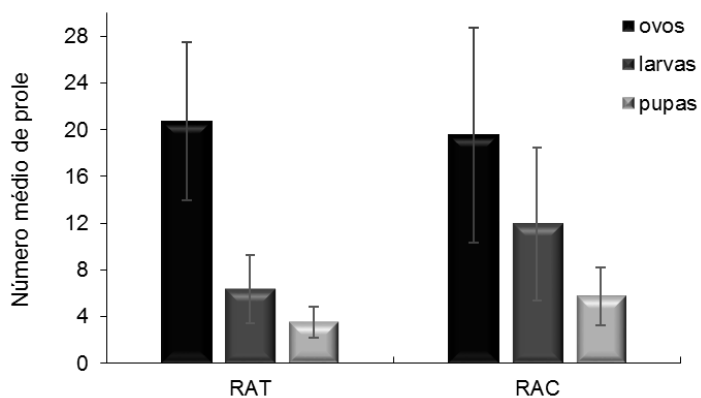


Figura 3. Número médio de prole - ovos, larvas e pupas - de rainhas de *Ac. subterraneus* dos tratamentos RAT (receberam alimento à 3 metros da câmara) e RAC (receberam alimento na câmara).

O peso do fungo simbiote de colônias que receberam alimento diretamente na câmara (RAC) foi significativamente maior do que o das que buscaram a 3 metros da colônia (RAT) (Teste t: $t = 2.07$, $df = 24$, $P < 0.05$). Não houve desenvolvimento do fungo simbiote em colônias que não receberam alimento (NRA) (Fig. 4).

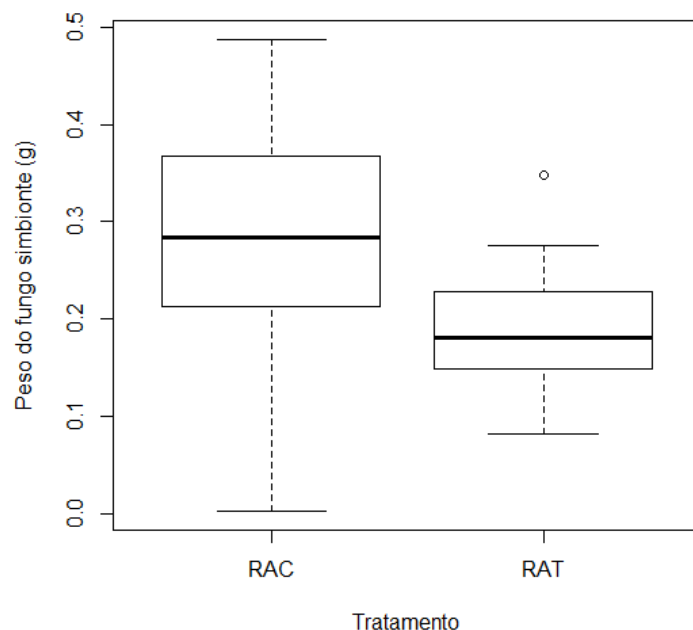


Figura 4. Peso do jardim de fungo de rainhas de *Ac. subterraneus* que receberam alimento na câmara (RAC) e de rainhas que buscaram-no à 3 metros da câmara (RAT).

As colônias de ambos os tratamentos que atingiram a fase ergonômica (n=26) produziram a primeira geração de operárias entre a 8^a e a 10^a semana, e quase todas produziram apenas uma operária na primeira geração, com exceção de duas colônias RAC e duas RAT que produziram duas operárias cada. O tamanho da cabeça das operárias não foi significativamente diferente entre os dois grupos (Teste t: $t = -0.39$, $df = 27$, $P = 0.70$), apresentando valores médios de 0.087cm em RAC e 0.089cm em RAT, caracterizando a menor classe de tamanho em operárias de *Ac. subterraneus* (Moreira et al. 2010, Forti et al. 2004).

Discussão

Os testes realizados em colônias incipientes de *Ac. subterraneus* permitem avaliar como a falta e a busca/transporte do alimento afetam o fitness das colônias. Independentemente se as rainhas não recebem alimento (NRA), ou recebem na colônia (RAC) ou precisam forragear a 3 metros da colônia (RAT), as chances de sobrevivência no tempo relativo ao período de fundação foram similares. Rainhas que receberam alimento (tanto RAC quanto RAT) apresentaram uma maior taxa de perda de peso e menor quantidade de lipídios ao final do experimento quando

comparadas às rainhas que não receberam alimento (NRA). Tal resultado, pode estar relacionado com a produção de prole, uma vez que rainhas do grupo NRA não tiveram sucesso na fundação da colônia, isto é, não produziram prole nem cultivaram fungo simbiote. Quando se comparou somente os grupos que receberam alimento, houve similaridade no número de ovos. Porém, o peso do fungo simbiote e número de larvas e pupas foi maior no tratamento em que as rainhas receberam o alimento diretamente na câmara, indicando que os custos do forrageamento se refletem no tempo de cuidado com a colônia, o que acarreta um desenvolvimento mais lento em colônias onde as rainhas despendem um tempo precioso fora do ninho forrageando (RAT).

Similar chances de sobrevivência para os três grupos permite refutar a hipótese de que o alimento é essencial para a sobrevivência das rainhas. No entanto, ele é fundamental para a fundação da colônia e perpetuação da espécie, uma vez que a nutrição da colônia é dependente do fungo simbiote e o cultivo e nutrição deste é dependente do alimento. Rainhas que não receberam alimento não apresentaram altos índices de mortalidade, mas perderam os ovos que já haviam depositado e nenhuma conseguiu cultivar o jardim de fungo. O forrageamento, e, portanto, a fundação do tipo semi-claustral, é obrigatória para fundadoras de *Acromyrmex* não em função de sua sobrevivência, mas da do jardim de fungo, uma vez que sem folhas frescas este morre (Brown e Bonhoeffer 2003) e elas perdem a fonte de alimento e local de desenvolvimento dos imaturos. Certamente elas são capazes de mobilizar suas reservas corporais para garantir sua sobrevivência, mas não metabolizam reservas nutricionais para criar a primeira geração de adultos, estratégia comum nos gêneros mais avançados (Hölldobler e Wilson 1990).

Em termos energéticos, a busca por alimento a uma distância de 3 metros da colônia não afetou o conteúdo de lipídios das rainhas, que foi similar ao das que receberam alimento na câmara. Em campo, rainhas de *Ac. octospinosus* forrageiam vegetais frescos para o crescimento do jardim de fungo a uma distância que varia entre 5 cm e 4 m do ninho (Fernández-Marín et al. 2003). Baseando-se nessa informação, a distância de 3m para *Ac. subterraneus* utilizada neste experimento não ocasionou um sobreuso de energia, ademais, esta pode ser uma distância regular de forrageamento para rainhas desse gênero. Além disso, as exigências energéticas para um forrageamento a esta distância podem ter sido ainda menores, pois nesse caso o caminho foi feito em sistema fechado e unidirecional, ou seja, não necessitaram despende energia para procurar pelo alimento, apenas caminhar pelo sistema em linha reta.

A ingestão de seiva durante a manipulação das folhas pode ser outro fator que contribui para contrabalancear a quantidade de lipídios entre rainhas que receberam alimento na câmara e à 3 metros da colônia. Grandes operárias de *Atta cephalotes* e *Ac. octospinosus* ingerem boa parte da seiva das folhas durante o forrageamento e operárias médias e pequenas durante a preparação do substrato (Littledyke e Cherrett 1976, Silva et al. 2003 para *Atta sexdens*). Por isso, é plausível supor que durante o corte e manipulação das folhas de *Acalypha* sp., as rainhas também tivessem ingerido seiva, rica em carboidratos (Madziga et al. 2010). A conversão de carboidratos em lipídios no corpo gorduroso dos insetos é bem documentada (Hines e Smith 1963, Venkatesh e Morrison 1980, Inagaki e Yamashita 1986, Briegel 1990). A formação do corpo gorduroso por lipogênese a partir da glicose é muito maior do que a síntese de glicogênio, o que explica o alto conteúdo de lipídios comparado ao de glicogênio no corpo gorduroso dos insetos. Em fêmeas de *Aedes aegypti*, 50% da glicose incorporada na dieta é utilizada na síntese de lipídios, e 35% usada na síntese de glicogênio (Zhou et al. 2004). Dessa forma, a similaridade no conteúdo de lipídios entre ambos os tratamentos pode ser explicada pela conversão de carboidratos em lipídios no decorrer do período de fundação.

Ainda, quando comparadas às rainhas que não receberam alimento, a maior taxa de perda de peso e menor conteúdo de lipídios das que receberam alimento pode ser um indicativo de que boa parte dos lipídios são utilizados na produção de prole. A mobilização de lipídios tem alguns propósitos, que incluem fornecimento energia para o voo e a manutenção geral da atividade metabólica dos tecidos, incluindo o corpo gorduroso. Se os animais passam por um longo período sem se alimentar, também ocorre mobilização de lipídios, promovendo assim sua sobrevivência (Beenackers et al. 1985, Arrese e Soulages 2010). No entanto, para o desenvolvimento dos ovos é exigida uma substancial mobilização de reserva do corpo gorduroso para os ovários (Arrese e Soulages 2010), e o alimento ingerido pelo inseto nessa fase adulta ampliam sua energia, particularmente na preparação para a reprodução. Em outras palavras, nos três grupos de rainhas houve a mobilização de lipídios. Porém, a mobilização foi maior nas rainhas que desenvolveram a prole, devido à alta quantidade de energia que esta atividade demanda.

Surpreendentemente, o maior fitness não foi relacionado com o gasto de lipídios mas pode ser associado com o tempo despendido no cuidado com a colônia. Fernandez-Marín et al. (2003) relatam que rainhas de *Ac. octospinosus* gastam entre 25 segundos a 182 minutos durante as viagens de forrageamento (16.1 ± 30.5 min) em distâncias que varia de 5 cm a 4 metros ($1.34 \pm$

1.68 m). Certamente, rainhas que não forragearam fora da colônia investiram mais tempo nos cuidados com a prole e com o fungo simbiote, o que a médio e longo prazo pode significar uma colônia mais populosa com maior capacidade de competição.

Portanto, as condições de forrageamento impostas para rainhas de *Ac. subterraneus* durante o período de fundação não influenciaram na sobrevivência das mesmas em nenhum dos três grupos. Assim, o não desenvolvimento das colônias constituídas por rainhas que não receberam alimento está relacionado à falta de substrato para a criação e manutenção do fungo simbiote, e não diretamente com a subnutrição e morte das rainhas. Já a mobilização de lipídios pode estar relacionada com atividades direcionadas a fins reprodutivos. Dessa maneira, o forrageamento influencia o fitness da colônia, não em relação ao custo energético, mas em relação ao tempo gasto para desempenhar esta atividade. Rainhas que não deixaram o ninho para obter o alimento apresentaram maiores valores de prole e peso do fungo, provavelmente porque dispuseram de mais tempo para realizar os cuidados com a colônia. Além disso, um jardim de fungo maior significa mais alimento para as larvas, contribuindo diretamente para o desenvolvimento de uma prole mais numerosa.

Referências Bibliográficas

- Arrese EL, Soulages JL. 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, And Regulation. **Annual Review of Entomology** 55: 207–225. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356.
- Beenackers AM, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJ. 1985. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. **Progress in Lipid Research** 24:19–67. doi: 10.1016/0163-7827(85)90007-4.
- Breed MD, Moore J. 2012. **Animal Behavior**. Academic Press, San Diego, California. 469p.
- Briegel H. 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology** 36:165–72. doi: 10.1016/0022-1910(90)90118-Y.
- Brown MJF, Bonhoeffer S. 2003. On the evolution of claustral colony founding in ants. **Evolutionary Ecology Research** 5: 305–313.
- Camargo RS, Lopes JFS, Forti LC, Somera AF, Bacci M. 2013. Energy substrate used by workers of leaf-cutting ants during nest excavation. **Revista Brasileira de Entomologia** 57(4): 397–400. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262013005000034>.
- Cockburn A. 1991. **An introduction to evolutionary ecology**. Blackwell Scientific, Oxford. 357p.
- Ehrlich PR, Roughgarden J. 1987. The science of ecology. Macmillian, New York.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK, Wcislo WT. 2003. Nest-founding in *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera, Formicidae, Attini): demography and putative prophylactic behaviors. **Insectes Sociaux** 50: 304–308. doi: 10.1007/s00040-003-0687-z.
- Fewell JH, Harrison JF, Lighton JRB, Breed MD. 1996. Foraging energetics of the ant, *Paraponera clavata*. **Oecologia** 105:419-427. doi:10.1007/BF00330003.
- 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(1): 59-63. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262004000100011>.
- Gilby AR. 1965. Lipids and their metabolism in insects. **Annual Review of Entomology** 10:141–60. doi: 10.1146/annurev.en.10.010165.001041.

- Hines WJW, Smith MJH. 1963. Some aspects of the intermediary metabolism in the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskål). **Journal of Insect Physiology** 9:463–468. doi:10.1016/0022-1910(63)90056-8.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. **The Ants**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 743p.
- Inagaki S, Yamashita O. 1986. Metabolic shift from lipogenesis to glycogenesis in the last instar larval fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry** 16:327–31. doi: 10.1016/0020-1790(86)90043-0.
- Johnson RA. 2002. Semi-claustral colony founding in the seed-harvester ant *Pogonomyrmex californicus*: a comparative analysis of colony founding strategies. **Oecologia** 132:60–67. doi: 10.1007/s00442-002-0960-2.
- Jutsum AR, Quinlan RJ. 1978. Flight and substrate utilization in laboratory-reared males of *Atta sexdens*. **Journal of Insect Physiology** 24: 821–825.
- Littleddyke M, Cherrett JM. 1976. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research** 66(2): 205-217. doi: 10.1017/S0007485300006647.
- Madziga HA, Sanni S, Sandabe UK. 2010. Phytochemical and elemental analysis of *Acalypha wilkesiana* leaf. **Journal of American Science**. 6(11): 510-514. doi: 10.14196/sjpas.v2i9.982.
- Sudd JH, Franks NR. 1987. **The Behavioral Ecology of Ants**. Chapman & Hall, New York. 200p.
- Moreira DDO, Viana Bailez AM, Erthal M, Bailez O, Carrera MP, Samuels RI. 2010. Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. **Journal of Insect Physiology** 56:1665–1670. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.06.018.
- Peeters C, Ito F. 2001. Colony dispersal and the evolution of queen morphology in social Hymenoptera. **Annual Review of Entomology** 46:601–30. doi: 10.1146/annurev.ento.46.1.601.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

- Silva A, Bacci M Jr, Gomes de Siqueira C, Correa Bueno O, Pagnocca FC, Aparecida Hebling MJ. 2003. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology** 49(4):307-13. doi: 10.1016/S0022-1910(03)00004-0.
- Venkatesh K, Morrison PE. 1980. Studies of weight changes and amount of food ingested by the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera, Muscidae). **The Canadian Entomologist** 112:141-49. doi: 10.4039/Ent112141-2.
- Wiernasz DC, Cole BJ. 2003. Queen size mediates queen survival and colony fitness in harvester ants. **Evolution** 57(9): 2179-2183. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00396.x.
- Ziegler R. 1991. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Physiology B** 161:125-31. doi:10.1007/BF00262874.
- Zhou G, Pennington JE, Wells MA. 2004. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:919-25. doi: 10.1016/j.ibmb.2004.05.009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises sobre o período reprodutivo e de fundação de *Acromyrmex subterraneus* revelaram a utilização de estratégias mistas que aumentam a probabilidade de sucesso no acasalamento e fundação das futuras colônias, garantindo assim a perpetuação da espécie. Com este trabalho foi possível constatar que um ponto chave para sucesso destas estratégias está intimamente relacionado à massa dos indivíduos reprodutivos no momento logo após o voo nupcial. Amparado pelo uso de marcadores genéticos, o esclarecimento sobre alguns aspectos da ocorrência de mais de um evento reprodutivo anual demonstra o quanto ferramentas genéticas têm sido grandes aliadas em estudos ecológicos.

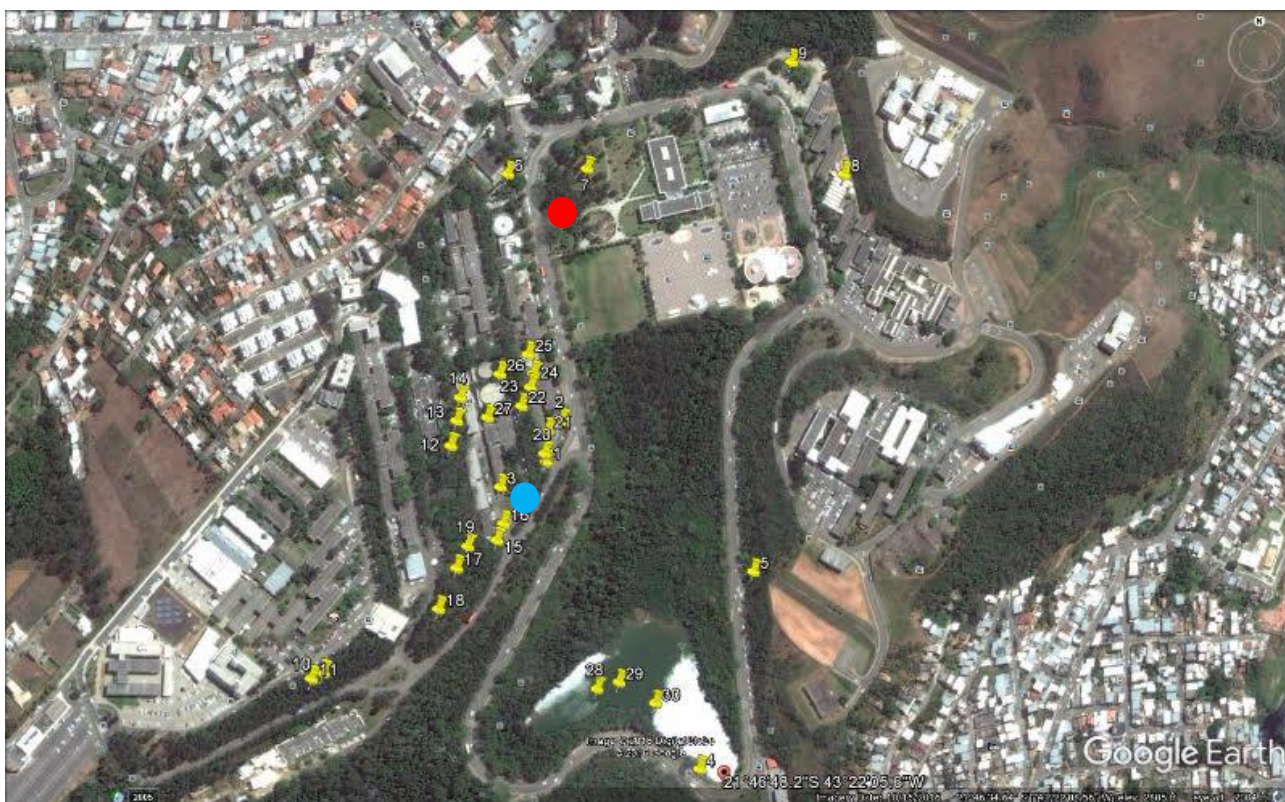
Dada sua ocorrência anual, o voo nupcial prematuro não deve ser considerado acidental, pois, de fato, através do genótipo dos indivíduos foi possível revelar que é um evento restrito a poucas colônias. A observação deste evento em anos consecutivos pode também indicar que sua sincronicidade está em evolução, podendo haver duas possíveis vias: 1) apesar de ser restrito, as colônias tendem a ajustar o momento de deixar a colônia-mãe para iniciarem sua jornada simultaneamente, ou 2) algumas colônias tendem a antecipar o desenvolvimento e liberação de indivíduos reprodutivos a fim de reduzir a competição no acasalamento e pelo local de nidificação. Também se supõe a redução do potencial para o conflito reprodutivo entre rainhas e da atenção de predadores, aumentando as chances de sucesso na fundação. Além disso, o fator genético deve atuar no período de desenvolvimento dos indivíduos acelerando esse processo, e resultando em alados menores que atingem a maturidade mais rapidamente e tão logo partem para o voo.

A massa inicial das jovens fundadoras também é um fator relevante relacionado à sua sobrevivência nas primeiras semanas de fundação e, apesar de indivíduos mais leves terem menores chances de sobrevivência no início deste período, as vantagens de participar de um voo prematuro deve sobrepujar as desvantagens de uma menor massa. Isto posto, uma vez que sobrevivem, as rainhas engajam-se na tarefa de promover o crescimento populacional, que é semelhante a todas independentemente da sua massa inicial. O segundo fator de maior importância para o sucesso de uma colônia após a massa inicial das rainhas é o alimento. A falta de substrato para forragear resulta indiretamente na sua morte, pois o material forrageado é essencial ao cultivo do fungo simbiote, e este por sua vez, fundamental na alimentação de larvas e operárias. As chances de uma colônia

de obter sucesso se tornam maiores quando elas atingem o período ergonômico, ou seja, quando o número de operárias aumenta rapidamente.

Assim, propõe-se um terceiro fator tão importante quanto os outros para o sucesso da colônia: o cuidado com prole, inicialmente feito pela rainha. Apesar do tempo gasto no cuidado com a prole não ter sido mensurado nesta pesquisa, é plausível supor que as rainhas que não precisavam sair para buscar alimento dispunham de mais tempo para cuidar da prole acarretando um rápido crescimento populacional. Este estudo irrompe questões relacionadas à assincronia do evento reprodutivo, respondendo a algumas perguntas e abrindo um leque de questões para novas investigações acerca desse fenômeno. Além disso, deixa registrada a relevância da massa dos alados tanto no período reprodutivo quanto na sobrevivência inicial, enfatizando também que além do alimento, o tempo gasto com cuidado com a prole pode aumentar a população rapidamente, aumentando as chances de sucesso das colônias.

ANEXOS



Anexo 1. Imagem de satélite (Google Earth) em 20/01/2017 da área que compreende a Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, mostrando o local exato dos ninhos de onde as operárias foram coletadas (marcadores amarelos) e o local onde foram capturados os alados no primeiro evento reprodutivo (círculo vermelho) e no segundo (círculo azul).