

COMPORTAMENTO DE TERRITORIALIDADE EM *Acromyrmex*
subterraneus subterraneus FOREL, 1893 (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE)

SHÊNIA SANTOS SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
DEZEMBRO - 2012

COMPORTAMENTO DE TERRITORIALIDADE EM *Acromyrmex*
subterraneus subterraneus FOREL, 1893 (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE)

SHÊNIA SANTOS SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientadora: Prof^a Ana Maria Matoso Viana-Bailez

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

DEZEMBRO - 2012

COMPORTAMENTO DE TERRITORIALIDADE EM *Acromyrmex*
subterraneus subterraneus FOREL, 1893 (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE)

SHÊNIA SANTOS SILVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 19 de dezembro de 2012

Comissão Examinadora:

“Denise Dolores Oliveira Moreira (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF”

“Prof. Milton Erthal Junior (D. Sc., Produção Vegetal) - IFF/UCAM”

“Prof. Omar Eduardo Bailez (D. Sc., Biologia do Comportamento) - UENF”

“Prof.^a Ana Maria M. Viana Bailez (D. Sc., Biologia do Comportamento) - UENF”
(Orientadora)

Aos meus pais Everaldo Marques da Silva e Maria Luzinete Santos da Silva e em especial a minha avó Josefa Rodrigues dos Santos (*in memorian*) por todo amor, ensinamentos e incentivo aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por ter a oportunidade de concluir mais uma etapa. Pelo seu imenso amor;

Aos meus pais Everaldo e Luzinete que não pouparam esforços para a minha formação. E pelas palavras de carinho, conforto, apoio e incentivo principalmente nos momentos mais difíceis;

Às minhas irmãs Shirley, Sheila e Shanna pelo amor, amizade e apoio mesmo distantes;

A minha orientadora Ana Maria M. Viana-Bailez pelas orientações, conselhos, ajudas, palavras de apoio e paciência durante o decorrer do Doutorado;

Ao meu coorientador Omar Bailez e à minha conselheira Denise D. O. Oliveira pelos ensinamentos e esclarecimentos durante o decorrer desse trabalho;

A CAPES pela bolsa concedida e a UENF pela oportunidade de realização deste curso;

Aos membros da Banca Examinadora pelas contribuições do manuscrito;

Ao “Tio Neanes” e à Tia Neide” pelo incentivo, apoio, suporte e assistência desde a minha vinda a Campos;

Ao Omar, Vinícius e Victor pelo auxílio nas análises estatísticas. Em especial ao Victor por sempre se mostrar disponível a ajudar e por me ensinar a usar o programa de análises estatísticas;

A Karla Malaquias pelas análises químicas e pela amizade. Mesmo distante e sempre sem tempo é uma amiga que sempre posso contar. Obrigada pelo seu incentivo eterno;

Ao Milton pelas contribuições ao longo do trabalho;

Ao Felipe Matias Bailez Viana pelos desenhos que ficaram ótimos;

Ao professor Richard pelo suporte muitas vezes fornecido no setor de Mirmecologia;

A Arli e Rita por sempre me ajudarem e por nossas conversas;

Ao Hildefonso pela amizade e companheirismo ao longo desses mais de quatro anos;

A Gabriela pelas longas conversas em laboratório;

Aos Colegas de laboratório Hildefonso, Gabriela, Fabíola, Victor, Thayanne, Jéssica, Camila, Igor por todo auxílio prestado e pelos momentos de descontrações;

A todos do LEF, professores, funcionários e colegas por contribuírem direta ou indiretamente para a minha formação. Pelas conversas nos laboratórios, nos corredores e pelos auxílios que possam ter havido;

As amigas Letícia, Roberta, Ruthanna, Naiara, Liliana, Suelen, Fernanda, Dyana, Inês, Vivianne, Érica e Élide vocês são as minhas irmãs aqui em Campos;

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram nesta etapa da minha vida.

Os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3. TRABALHOS.....	21
3.1. Reconhecimento e Marcação de Território em <i>Acromyrmex</i>	
<i>subterraneus subterraneus</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE).....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados.....	30
Discussão.....	38
Resumos e Conclusões.....	41
Referências Bibliográficas.....	42

3.2. Polimorfismo no comportamento de marcação de território em <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	44
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	48
Resultados.....	56
Discussão.....	63
Resumos e Conclusões.....	67
Referências Bibliográficas.....	68
4. RESUMOS E CONCLUSÕES	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
6. APÊNDICE	86

RESUMO

SILVA, Shênia Santos; D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Dezembro de 2012. Comportamento de territorialidade em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). Orientadora: Ana Maria Matoso Viana Bailez. Coorientador: Omar Eduardo Bailez e Conselheira: Denise Dolores Oliveira Moreira.

O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de marcação de território em *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Para observar os comportamentos de territorialidade operárias de 4 ninhos foram expostas a arena de forrageamento explorada pela própria colônia, a arena de forrageamento não explorada e a arena de forrageamento explorada por operárias de outras colônias. Em um segundo experimento duas colônias foram expostas a arenas de forrageamento não exploradas, explorada por sua própria colônia com ou sem a presença de indivíduos heterocoloniais. Em arenas de forrageamento exploradas por indivíduos da própria colônia e em área sem exploração o comportamento que ocorreu com maior frequência foi o de arraste de abdome - friccionamento da extremidade do abdome na superfície. Quando encontraram intrusas nas próprias arenas as operárias apresentaram arraste de abdome com inclinação de cabeça e curvamento de abdome - cabeça abaixada e abdome curvado para baixo. Para identificar o local onde é feita a marcação do território as proximidades da entrada do ninho, a trilha, as margens da trilha e a arena de forrageamento foram forradas com papel filtro, cortados em pedaços de 5 cm² e colocados em trilha heterocolonial. A abertura de mandíbula, curvamento de abdome, mordida e

carregamento do papel foram mais frequentes em marcações da trilha heterocolonial e suas margens. Para esclarecer se o comportamento de território envolve classes específicas de operárias foram feitos extratos de glândula de Dufour de operárias de cápsulas cefálicas de 0,8 a 1,0 mm (C1), 1,2 a 1,5 mm (C2), 1,6 a 2,0 mm (C3) e 2,1 a 2,4 mm (C4). Cinco formigas foram colocadas em uma arena com papel filtro impregnado com 0,1 mL de extrato de glândula de Dufour, a uma concentração de 10 glândulas/ mL. Os comportamentos foram observados por 5 minutos. O extrato de operárias da classe 2 desencadeou maior resposta de curvamento de abdome em operárias da classe 3 e o extrato de operárias da classe 3 em indivíduos das classes 2, 3 e 4. As classes operárias maiores responderam com maior frequência de abertura de mandíbula a todos os estímulos. Os extratos de glândula de Dufour foram analisados através da cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM) e foram encontrados hidrocarbonetos de cadeia longa. *Acromyrmex subterraneus subterraneus* reconhece e efetua marcação química do seu território, o que se expressa com comportamentos específicos. A marcação é realizada através de substância liberada pela glândula de Dufour. As operárias da classe 3 são provavelmente as maiores responsáveis pela marcação e reconhecimento de território.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the occurrence of territorial marking in *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. In order to observe whether workers recognize the territory workers of 4 nests were exposed to foraging site with their own colony mark as well as without it, and with the mark of workers from other colonies. In the second experiment two colonies were exposed, consecutively, to foraging site without any mark, with their own colony mark and with their own colony mark with intruders. In foraging site marked with individuals of the colony itself as well as in the unmarked land, workers had a higher frequency of abdominal drag - rubbing the tip of the abdomen. When they found intruders, the resident workers presented abdominal drag with head tilt and abdominal bend - head downwards and abdomen bent. In order to identify the location where the territorial mark is performed, the nest entrance, the main forage trail and its margins as well as the foraging site were lined with filter paper cut in 5 cm² pieces and placed in hetero colonial trail. The mandible opening, abdominal bend, bite and paper loading were more frequent in hetero colonial main-trail mark and its margins. To clarify the role of workers' classes in territorial behavior, extracts from each class of worker were made: 0.8 to 1.0 mm (C1), 1.2 to 1.5 mm (C2), 1, 6 to 2.0 mm (C3) and 2.1 to 2.4 mm (C4). Five ants and a disk of filter paper impregnated with 0.1 ml of extract, the concentration of glands 10 / ml were placed in an arena. Their behavior was observed for 5 minutes. The extract of class 2 triggered better response to abdominal bend in workers of class 3 as well as the extract of class 3 to individuals

in classes 2 and 3. The workers of classes 2, 3 and 4 responded with more frequent abdominal bend to the extract of class 3. The major classes of workers responded with a higher frequency of mandible opening to all extracts and the solvent. The constituents of the extracts (concentration of 20 glands / 0.3 ml) were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). In Dufour's gland extract long-chain hydrocarbons were found. Therefore, we concluded that this species recognizes and chemically marks their its territory by developing specific behavior. The territorial mark is carried out through the substance released by Dufour's gland. The workers of class 3 are probably responsible for the territorial recognition and marking.

1. INTRODUÇÃO

A comunicação é um processo que envolve a transmissão de sinais entre os organismos. Os insetos usam quatro diferentes vias de comunicação: visual, auditiva, tátil e química. A predominância de um destes sinais em relação aos demais depende de fatores como o habitat e o modo de vida da espécie. A comunicação em formigas pode ocorrer também através de sinais táteis e sonoros, entretanto a via mais utilizada é a comunicação química (Hölldobler e Wilson, 1990).

Em insetos sociais, a comunicação química representa a principal via de obtenção de informação além de ser a base da integração da sociedade. Através da comunicação química, mensagens são transmitidas entre indivíduos de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes (Nordlund e Lewis, 1976). Dentre as substâncias envolvidas na comunicação química estão os feromônios, infoquímicos mediadores de interação entre organismos da mesma espécie, capazes de produzir resposta comportamental ou fisiológica no receptor, no emissor ou em ambos (Dicke e Sabelis, 1988).

Os feromônios desempenham um papel central na organização da sociedade das formigas (Hölldobler e Wilson, 1990). Eles podem agir como marcadores de trilha, propiciar o comportamento de agregação, alarme, reconhecimento individual, delimitação de território, etc (Vilela e Della Lucia, 1987).

A marcação de substratos por meio de odores é um dos comportamentos mais conspícuos em mamíferos e outros vertebrados terrestres. As marcas

químicas estão vinculadas à defesa dos territórios. Assim como nos vertebrados, muitas espécies de formigas defendem os territórios de forrageamento (Viana-Bailez et al., 2011).

Em formigas cortadeiras, a marcação e o reconhecimento do território favorecem o abastecimento de alimento necessário para a colônia e sua defesa contra intrusos (Salzemann et al., 1992; Vilela, 1983). Formigas de diferentes colônias podem reconhecer outras espécies como invasoras e atacar umas as outras (Hölldobler e Wilson, 1990).

Contudo, o conceito de "território" ainda é controverso, pois é utilizado em diferentes contextos como, por exemplo, em *Myrmica*, onde se refere à diferença na velocidade de caminhada em substratos marcados territorialmente versus substratos sem marcas (Cammaerts e Cammaerts, 1987), e em *Atta laevigata* onde faz alusão a um combate territorial efetivo (Whitehouse e Jaffé, 1996).

Relatos sobre marcação de território nas formigas-cortadeiras são encontrados apenas para o gênero *Atta* para as espécies *Atta cephalotes*, *Atta sexdens rubropilosa* e *A. laevigata*, onde foi demonstrada a participação da glândula de Dufour como estrutura responsável pela produção do feromônio de marcação de território (Evershed e Morgan, 1981).

A marcação de território possivelmente ocorre também em *Acromyrmex*, pois existem evidências de reconhecimento do território colonial-específico por meio de marcas de odores deixadas no substrato em *Acromyrmex landolti* (Jaffé, Navarro, 1985).

Sendo assim, este trabalho teve por finalidade verificar se existe comportamento de territorialidade na espécie de formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Os resultados desse estudo estão apresentados em dois artigos. O primeiro objetivou demonstrar se há o comportamento de territorialidade com reconhecimento de território marcado, identificar qual é o local onde é realizada essa marcação. O segundo artigo procurou identificar a casta responsável pela marcação e reconhecimento de território e as substâncias que compõem o perfil químico da glândula de Dufour.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Formigas Cortadeiras

As formigas são consideradas insetos eusociais por apresentarem três características comportamentais na colônia: indivíduos adultos cooperam no cuidado dos indivíduos mais jovens; a divisão de tarefas entre castas reprodutivas e estéreis e pelo menos duas gerações de indivíduos na colônia (Hölldobler e Wilson, 1990).

Presentes em todos os ecossistemas terrestres, as formigas são notáveis pela sua adaptação e elevado grau de organização social, sendo consideradas parte dos insetos mais adaptados, com alta frequência e abundância (Della Lucia et al., 2001).

As formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, também conhecidas como formigas cortadeiras, possuem o hábito de cortar fragmentos de folhas, flores e sementes de diversos vegetais e causam prejuízos econômicos na agricultura (Della Lucia e Fowler, 1993). Ambos os gêneros são considerados herbívoros dominantes dos trópicos e subtropicais, consumindo mais material vegetal do que qualquer outro grupo de animais, como os mamíferos ou até mesmo outros insetos (Della Lucia e De Souza, 2011; Hölldobler e Wilson, 1990). Essas formigas acarretam danos diretos principalmente a cultura de cana-de-açúcar, gramíneas de pastagens (Cherrett, 1986; Della Lucia e De Souza, 2011) e florestas plantadas ou naturais (Boaretto e Forti, 1997; Della Lucia e De Souza, 2011; Della Lucia et al., 2008). Atacam ainda plantas cultivadas como cacau, milho, arroz, mandioca, algodão, café, plantas ornamentais e fruteiras (citros) (Cherrett, 1986).

As formigas cortadeiras apresentam uma complexa interação com fungo simbiote consistindo em um mutualismo obrigatório. O material vegetal cortado por essas formigas serve como substrato para o fungo pertencente a um dos dois gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* (Agaricales: Basidiomycota) cultivado dentro dos seus ninhos subterrâneos, de onde elas retiram o alimento para as suas larvas (Della Lucia e De Souza, 2011).

2.2. *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

A formiga *A. subterraneus subterraneus* é conhecida vulgarmente no Brasil como caiapó (Della Lucia, 1993). É encontrada frequentemente nos estados do Amazonas, Amapá, Mato Grosso, Ceará, Rio Grande do Norte, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (Cassanello, 1998; Delabie et al., 2011; Gonçalves, 1961; 1964; Quirán, 1998) e ainda na Argentina (Delabie et al., 2011).

As operárias dessa espécie apresentam coloração castanho-clara ou amarelada, com espinhos mesonotais anteriores do mesmo tamanho dos pronotais laterais. Já os espinhos pronotais inferiores são retos ou ligeiramente curvados, dirigidos diagonalmente para frente e um pouco para baixo. Caracterizam-se, ainda, por apresentarem olhos grandes e salientes e os tubérculos do gáster mais ou menos arrumados em quatro fileiras longitudinais (Mayhé-Nunes, 1991).

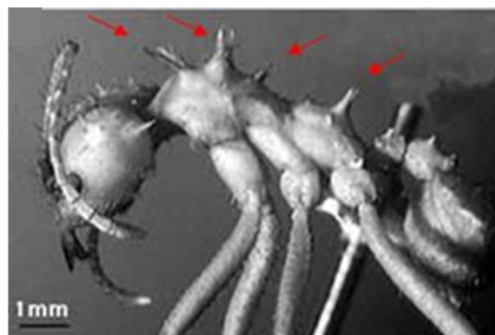


Figura 1. Vista lateral de *Acromyrmex*. Setas em vermelho mostram os espinhos dorsais que caracterizam a espécie. Fonte: Longino (2004).

Seus ninhos podem chegar a 20m², podem ser subterrâneos ou parcialmente subterrâneos (Della Lucia e Moreira, 1993), com até três câmaras, ligadas por meio de canais subterrâneos e situadas ao lado e embaixo uma da outra. O fungo pode ter o formato irregular. É encontrado dentro de panelas e pode não tocar nas paredes laterais, ficando aderido às raízes de plantas (Forti et al., 2011, Gonçalves, 1961). Podem atingir uma profundidade de 90 cm em relação ao nível do solo (Forti et al., 2011). Os canais de saída das galerias se dirigem para cima e têm no máximo 2,5 cm de diâmetro (Gonçalves, 1961).

Esta espécie tem os maiores e mais populosos formigueiros do seu gênero. Os ninhos são encontrados em eucaliptais já formados, apresentando trilhas bastante evidentes. Ninhos com volume de fungo com mais de 40L são frequentes (Della Lucia e Moreira, 1993). Podem ser reconhecidos pelo montículo de terra solta que as operárias depositam do lado de fora, porém as folhas das árvores podem escondê-los, o que dificulta a sua localização e controle. Assim, quando a trilha é encontrada torna-se mais fácil encontrar o montículo de terra solta.

A preferência em cortar folhas de hortaliças, videira, pessegueiro, laranjeira, *Eucalyptus* spp. e espécies de plantas ornamentais (acalypha, roseira, ligustrum, cássia, etc), torna-a muito prejudicial aos setores agrícolas e florestais dos países latino americanos, adaptando-se a terrenos cultivados ou abandonados pelo homem (Della Lucia e De Souza, 2011).

Como cortam folhas, reduzem a área fotossintética das plantas, diminuindo sua produção ou ocasionando sua morte. Os fragmentos de folhas servem de substrato para o fungo mutualístico que cultivam. Segundo Gomides et al. (1997), a cada dia as “quenquéns” vêm ocupando lugar de maior importância em áreas de pastagens e de reflorestamentos, pois em alguns casos podem superar em abundância as espécies de *Atta*.

2.3. Território

Um território é definido como uma área ocupada exclusivamente por um ou mais animais mantidos por meio de repulsa aos invasores através de defesa ou advertência. Uma vez estabelecido, o território poderá ser defendido o tempo todo em prol de um local provedor de alimentos ou qualquer outro recurso especial, ou ainda de uma área onde se encontra o ninho (Hölldobler e Wilson, 1990).

De acordo com estudos etológicos a marcação do território em formigas pode ter uma função antagonística de defesa onde a formiga intrusa se torna submissa, enquanto as residentes, em territórios marcados, se tornam alertas e agressivas. Além de uma segunda função na orientação, onde operárias usam marcas químicas para distinguir as várias entradas de sua colônia (Della Lucia et al., 2001; Salzemann e Jaffé, 1990).

O comportamento de território pode variar de grandes domínios para uma pequena área nas proximidades do ninho, de acordo com a espécie, a fase de crescimento da colônia residente ou ainda presença de colônias vizinhas. O território pode ocorrer em um dado espaço e tempo, o que significa que apenas domínios limitados da área de forrageamento são defendidos em determinado momento, locais onde os recursos estão temporariamente localizados (Hölldobler e Wilson, 1990).

Existem diferenças importantes na utilização do espaço de forrageamento entre as diversas espécies de formigas, podendo ser observadas estratégias distintas e complexas de proteção em áreas associadas à ocorrência do recurso alimentar. Quando o recurso alimentar ocorre de forma fragmentada, mas de maneira relativamente estável e previsível o local será protegido de modo geométrico, diferente do território com recursos estáveis, porém distribuídos em uma vasta área (Hölldobler e Wilson, 1990).

Diferentes estratégias também estão relacionadas ao tipo e tamanho da ameaça. Segundo experimentos realizados por Whitehouse e Jaffé (1996), operárias menores são responsáveis por responder a interações interespecíficas e intraespecíficas, enquanto que o recrutamento de operárias maiores ou soldados está associado à ameaça por vertebrados. De acordo com a Teoria de Lanchester (1916) *apud* Whitehouse e Jaffé (1996), o comportamento territorial ocorre de acordo com duas leis, a Lei Quadrada e a Lei Linear. Caso todos os indivíduos sejam vulneráveis a ataques, muitos lutadores, não necessariamente os maiores, são mais vantajosos que alguns poucos bons, então o lado com o maior número de lutadores ganha a disputa, Lei Quadrada. Enquanto que em conflitos de um para um, alguns bons lutadores são melhores que muitos lutadores não muito bons, seria o caso da Lei Linear.

As mortes causadas pela defesa territorial têm um significado qualitativamente diferente para formigas e outros insetos sociais que para animais

solitários, devido à divisão entre indivíduos reprodutivos e castas trabalhadoras estéreis (Hölldobler e Wilson, 1990). A morte de indivíduos estéreis representa apenas um débito trabalhista, ou uma perda de energia, não havendo extinção de agentes reprodutivos. Os atos comportamentais realizados com risco de morte podem compensar o custo da morte através do fornecimento ou da manutenção de recursos para a colônia, neste sentido mortes frequentes podem até mesmo se tornar um elemento positivo para a colônia, sob aspecto adaptativo (Porter e Jorgensen, 1981; Schmid-Hempel e Schmid-Hempel, 1984).

Durante inspeção, uma operária aproxima-se do outro indivíduo tocando com as antenas. Se a formiga for intrusa de outra colônia, ela poderá ser atacada. A convivência de indivíduos da mesma espécie, mas de colônias diferentes em uma mesma área de forrageamento, de modo geral, é eficaz na redução da agressividade (Hölldobler e Wilson, 1990). Provavelmente isso se deve a uma redução proposital do gasto energético, já que os indivíduos estão familiarizados e não representam uma ameaça de invasão de território, uma vez que possuem o seu próprio (Langen et al., 2000).

As formigas podem apresentar agressividade frente a indivíduos que residem a uma determinada distância, enquanto que podem não ser agressivas a indivíduos quem residem próximos do ninho. Esse fenômeno pouco estudado é referido como o Fenômeno do Inimigo Estimado (do inglês dear-enemy phenomenon) (Ydenberg et al., 1998). Entretanto, confrontos entre vizinhos também são passíveis de ocorrer, principalmente quando territórios estáveis apresentam boa variabilidade de recursos, levando a uma competição entre vizinhos pelos recursos novos, sem que haja competição com estranhos (Dunn e Messier, 1999).

Vilela e Howse (1986) evidenciaram que para as formigas cortadeiras *Atta laevigata* o território inclui além da área ao redor do ninho a área no contorno da trilha-tronco. Possivelmente, isso ocorre para que o contingente de forrageadoras de ninhos vizinhos e hostis tome direções contrárias (Hölldobler e Wilson, 1990), e sejam evitadas grandes batalhas por causa de alimento. Atritos esporádicos de trilhas de diferentes colônias podem resultar em confronto agressivo, até que as trilhas não se intersectem mais (Salzemann e Jaffé, 1990).

As trilhas-tronco de colônias intraespecíficas vizinhas raramente se cruzam. A trilha-tronco, juntamente com os arredores da entrada da colônia, pode

ser considerada o núcleo da área do território da colônia. Embora a função principal da trilha-tronco seja facilitar a orientação à longa distância e a exploração de alimentos distribuídos de forma fragmentada e relativamente estável, o desenho topográfico da rota do sistema de cada colônia, por sua vez, depende muito da rota das suas colônias vizinhas (Hölldobler e Wilson, 1990).

De acordo com Traniello (1989), o alto padrão direcional de forrageamento feito aleatoriamente posterior à confrontação com indivíduos vizinhos, sugere que o sistema de trilhas minimiza a confrontação com competidores.

2.4. Tamanho do território

O tamanho do território ainda é objeto de controvérsias em insetos sociais. Apesar de haver alguns estudos, muitas questões pertinentes ainda são colocadas, sobretudo em formigas (Jaffé, 1987). Nem sempre a estratégia mais eficiente é defender grandes áreas de território de forma permanente. De acordo com a espécie, o território pode estar determinado pela marcação de pequenas áreas próximas ao ninho e por intervalos de tempo definido (Viana-Bailez et al., 2011). A defesa de território pode afetar a distribuição espacial de colônias de formigas e pode exercer uma força regulamentar sobre populações de formiga (Adams e Tschinkel, 2001). Mudanças na oferta de alimentos para *Solenopsis invicta* têm pouco efeito sobre a sua área de território, mas mudanças na população de operárias podem causar mudanças grandes e rápidas nas posições da fronteira (Adams, 2003), que conseqüentemente podem modificar o tamanho do território e este afetar o tamanho da colônia.

O tamanho do território pode ser controlado por interações competitivas entre vizinhos (Krebs, 1971; Norman e Jones, 1984). Quando o território está rodeado por vizinhos próximos, pode ser mais difícil de expandi-lo (MacLean e Seastedt, 1979; Mares et al., 1982). Em espécies sociais, frequentemente a área do território está correlacionada com o tamanho do grupo, com a capacidade competitiva (Adams e Levings, 1987; Macdonald, 1983), já que os grupos próximos podem causar diminuição ou até a perda de um território (Adams, 1990). Portanto, o tamanho do território está positivamente correlacionado com o tamanho da colônia (Adams, 1998; Tschinkel et al., 1995). Em formigas cortadeiras a estratégia que favorece maior economia de energia e tempo é a de defender as trilhas-tronco que conduzem o alimento ao ninho (Hölldobler e Wilson, 1990).

2.5. Marcação Química de Território em Cortadeiras

Compostos secretados pelas glândulas de veneno, identificados como n-nonadecadieno, foram propostos como componentes específicos de marcação de território para *A. cephalotes* (Jaffé et al., 1979). Mas a confirmação da existência do feromônio de território em formigas cortadeiras regulando encontros intraespecíficos foi demonstrada por Vilela (1983). Esse autor citou o (Z)-9-nonadeceno, como um componente importante no comportamento territorial para *A. sexdens rubropilosa*. No decorrer do processo de marcação da área, a secreção produzida na glândula de Dufour (Evershed e Morgan, 1981) é liberada pela ponta do gaster de tempo em tempo, quando essa estrutura é tocada na superfície (Vilela et al., 1987).

Estudos realizados em laboratório por Hölldobler e Wilson (1986) demonstraram a existência de um feromônio territorial em *A. cephalotes*, sugerindo que marcações químicas na entrada dos ninhos seriam usadas como sinais para orientação, e que secreções da glândula de veneno produzem apenas feromônio de alarme para essa espécie, diferentemente do encontrado por Jaffé et al. (1979). Com base em testes de agressividade, Vilela e Howse (1986) demonstraram que as formigas cortadeiras do gênero *Atta* distinguem seu próprio território, a área ao redor do ninho e a trilha-tronco e os defendem contra intrusos.

Salzemann e Jaffé (1991) demonstraram que as operárias de *A. laevigata* marcam a área ao redor do ninho com um feromônio produzido na glândula de Dufour, fato confirmado por Salzemann et al. (1992) em seus testes etológicos. Esses autores compararam o efeito de extratos obtidos de diferentes glândulas e estruturas sobre o comportamento territorial das espécies. Dentre os componentes encontrados nessas glândulas e estruturas os alcenos em *A. laevigata* e alcanos em *A. cephalotes* foram os principais (Evershed e Morgan, 1980). Quatro componentes foram encontrados em territórios marcados naturalmente por várias espécies de Attini; (Z)-9-tricoseno, (Z)-9-nonadeceno, 8,11-nonadecadieno e n-heptadeceno (Evershed e Morgan, 1980, 1981), desses compostos apenas o 8,11-nonadecadieno (Jaffé et al., 1979) e o (Z)-9-nonadeceno (Vilela, 1983) foram relacionados como possíveis compostos do feromônio de território em espécies de *Atta*.

De acordo com Viana-Bailez et al. (2011), apesar da glândula de Dufour ter sido indicada como fonte do feromônio de marcação de território por mais de um

autor, seu papel nesse processo ainda não está totalmente esclarecido. A glândula de Dufour está associada à produção de feromônios de apaziguamento e propaganda nas espécies de formigas escravistas *Protomognathus americanus* e *Harpagoxenus sublaevis*, por exemplo (Brandt et al. 2006), feromônios de alarme, recrutamento, trilha e atração sexual, atração entre indivíduos, marcação de território, entre outros (Billen, 1993).

Normalmente os indivíduos apresentam um determinado comportamento ou posturas corporais variadas, em resposta à percepção de um estímulo, neste caso de um feromônio. Entre os comportamentos apresentados por operárias da espécie *A. cephalotes*, quando estão em um território de outra colônia, cita-se o curvamento e levantamento de abdome. Porém, diante de um novo substrato ou sobre um território marcado com secreções de outras formigas, essas operárias apenas encurvam o abdome (Jaffé et al., 1979). Vilela (1983) observou o mesmo comportamento para a espécie de formiga *A. sexdens rubropilosa*. Salzemann et al. (1992) relataram o comportamento de alarme de residentes de *A. laevigata* devido ao reconhecimento de território heteroespecífico. Os comportamentos observados foram o movimento do corpo rápido e descoordenado, junto com a abertura de mandíbula. Salzemann e Jaffé (1990) incluíram ainda ataques com mordidas e transportes de indivíduos realizados pelas residentes dessa espécie e submissões pelas intrusas.

Segundo Viana-Bailez et al. (2011), a marcação de território possivelmente ocorre também para formigas do gênero *Acromyrmex*, pois existem evidências de marcas de odores deixadas no substrato em *A. landolti* (Jaffé e Navarro, 1985). Mas nenhum outro estudo foi realizado com este gênero. Portanto, este é o primeiro trabalho que evidencia a marcação e defesa de território através de feromônio em formigas do gênero *Acromyrmex*.

3. TRABALHOS

3.1. RECONHECIMENTO E MARCAÇÃO DE TERRITÓRIO EM *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO

O presente trabalho procurou demonstrar a existência de marcação química de território e identificar os locais onde é realizada essa marcação para a espécie de formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Operárias foram liberadas em arena de forrageamento não explorada, em arena de forrageamento explorada por indivíduos da própria colônia (residentes) e arena de forrageamento explorada por indivíduos de outras colônias (intrusas). Quatro ninhos foram colocados em contato com área de forrageamento em arenas em pisos removíveis. No segundo experimento duas colônias compartilharam a mesma arena de forrageamento. Para uma das colônias foi permitido o acesso à arena de forrageamento não explorada. Após os indivíduos da colônia residente terem explorado a área, foi dado acesso aos indivíduos da colônia intrusa. Identificaram-se os seguintes comportamentos de reconhecimento e marcação de território: arraste de abdome (ocorre com o friccionamento da extremidade do abdome no

substrato), arraste de abdome com inclinação de cabeça e curvamento de abdome. Em arena de forrageamento explorada por indivíduos homocoloniais e arena de forrageamento sem exploração houve maior frequência de arraste de abdome. Quando encontraram intrusas as operárias residentes apresentaram arraste de abdome com inclinação de cabeça e curvamento de abdome. Em local explorado por indivíduos de outra colônia foi observada uma maior frequência de arraste de abdome e um maior número de formigas explorando. Para verificar o local onde ocorreu a marcação de território foram colocados papéis filtros (5 cm²) retirados da entrada do ninho, da trilha-tronco e suas margens e da área de forrageamento em uma trilha heterocolonial. A abertura de mandíbula, o curvamento de abdome, mordida e carregamento do papel foram os atos mais frequentes em marcação da trilha-tronco heterocolonial e suas margens. Verificou-se que *A. subterraneus subterraneus* reconhece território marcado e desenvolve comportamento específico.

ABSTRACT

This study tried to demonstrate the existence of chemical territorial mark and identify where this marking is performed for the leaf-cutting ant species, *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. So, workers were exposed to foraging arena unexplored, in foraging arena exploited by individuals of their own colony (residents) and foraging arena explored by individuals from other colonies (intrusive). Four nests were placed in contact with an area of foraging arenas in removable floors. In a second experiment, two colonies shared the same foraging arena. For one of the colonies, the access to foraging site was allowed without any marking. After a resident colony has explored the area, the access to workers of the second colony, the intruders, was given. We identified the behavior of recognition and territorial mark. The behavior related to recognition and territorial mark was: abdominal drag - the tip of the abdomen rubbing occurs on the substrate; abdominal drag with head tilt and abdominal bend. In foraging site with its colony marks and in unmarked arena, a higher frequency of abdominal drag was observed. When the

resident workers found intruders, they presented abdominal drag with head tilt and abdominal bend. In land marked by individuals from other colony, it was observed a higher frequency of abdominal drag and a greater number of ants exploring. To check the location where territorial mark occurs, filter paper was placed (5 cm²) marked from the nest entrance, trail and its margins and foraging site in a heterocolonial trail. Mandible opening, abdominal bend, bite and paper loading were more frequent in the heterocolonial trail marking and its margins. It was found that *A. subterraneus subterraneus* territory marked recognizes and develops specific behavior.

INTRODUÇÃO

Estudos comportamentais em algumas espécies de formigas cortadeiras comprovaram que estas marcam o território ao redor do ninho. A fronteira desse território é mantida com a finalidade de prevenir a presença de indivíduos heteroespecíficos, bem como impedir que indivíduos de outras colônias da própria espécie explorem o recurso alimentar próximo (Hölldobler e Wilson, 1990).

Em período de intensa atividade de forrageamento não é raro observar conflitos entre ninhos vizinhos causando mortes nas sociedades envolvidas. Em locais com alta densidade de colônias as formigas adotam estratégias de forrageamento espaço-temporal, como por exemplo, compartilhamento de trilhas (Salzemann e Jaffé, 1990a). A marcação territorial parece cessar ou diminuir as invasões de território de uma colônia para outra.

O comportamento territorial, portanto é essencial e nele está incluído o reconhecimento de formigas da mesma espécie ou de outras espécies. Esse comportamento pode ter evoluído para evitar gastos energéticos com combates. Jaffé e Marquez (1987) propuseram que a evolução do comportamento de território em formigas pode ter ocorrido inicialmente com o reconhecimento das operárias por sinais visuais, odores ambientais, ou odores de diversas origens como o da cutícula dos insetos. Posteriormente operárias passaram a reconhecer o território através de odores produzidos por elas e fixados acidentalmente no meio, ou seja,

não ocorre um feromônio territorial específico, mas um odor da colônia, assim o reconhecimento do território estaria relacionado ao reconhecimento de parentes. E por último, operárias passaram a usar um feromônio territorial específico para marcação. O reconhecimento de ninho seria feito através da discriminação de diferentes proporções relativas de compostos.

Estudos demonstraram a existência de feromônio territorial específico da colônia para algumas espécies do gênero *Atta* (Salzemann e Jaffé, 1990b). Essa substância é capaz de aumentar a vigilância, estimular a agressividade com ataques e combates a intrusos ou induzir o comportamento de transporte de intrusas (Salzemann e Jaffé, 1990a). Já os indivíduos intrusos adotam um comportamento de submissão quando encontram operárias residentes, o que demonstra a existência de um efeito intimidatório do território marcado (Salzemann e Jaffé, 1990a).

Para formigas cortadeiras, a marcação e o reconhecimento do território favorecem o abastecimento de alimento necessário para a colônia e sua defesa contra intrusos (Salzemann et al., 1992; Vilela, 1983). Registros de marcação química de território foram relatados para espécies do gênero *Atta*: *Atta cephalotes* (Jaffé et al., 1979), *Atta sexdens rubropilosa* (Vilela, 1983) e *Atta laevigata* (Salzemann e Jaffé, 1991). Para o gênero *Acromyrmex* somente Jaffé e Navarro (1985) apontaram evidências da existência de uma marcação química de território na espécie *Acromyrmex landolti*.

O objetivo desse trabalho foi demonstrar a existência de reconhecimento e marcação química de território para a espécie de formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e estabelecer os locais onde é realizada a marcação de território.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 4 ninhos de *A. subterraneus subterraneus* mantidos em condições controladas na Unidade de Mirmecologia, do Laboratório de Entomologia

e Fitopatologia, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro em Campos dos Goytacazes-RJ.

As criações foram mantidas em bandejas plásticas de acordo com modelo proposto por Della Lucia et al. (1993), sob 25 ± 2 °C de temperatura, 80 ± 10 % de umidade e fotoperíodo de 12 horas. O jardim de fungo foi mantido dentro de pote plástico ou de vidro (2 L) fechado e com chumaço de algodão umedecido na parte superior para manter a umidade do fungo. As formigas tiveram acesso ao jardim de fungo através de aberturas laterais. As colônias receberam folhas das espécies vegetais acalifa (*Acalypha wilkezi*) e/ou alfeneiro (*Ligustrum japonicum*) e esporadicamente flocos de cereais e pétalas de rosas. As folhas foram colocadas em bandejas plásticas.

Os bioensaios foram realizados sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo.

1. Identificação dos atos comportamentais relacionados à marcação de território em *A. subterraneus subterraneus*.

1.1. Marcação e reconhecimento de território.

Nesse teste foi observado e quantificado o comportamento de operárias em 3 situações experimentais: 1) arenas de forrageamento sem explorações (neutro), 2) arenas de forrageamento exploradas pela própria colônia e 3) arenas de forrageamento exploradas por outra colônia.

Em cada teste, bandejas contendo o ninho foram conectadas a pisos removíveis de vidro (60 x 30 x 4 cm). As operárias acessavam os pisos através de mangueiras de silicone (28 cm de extensão x 2 cm de \varnothing) possibilitando uma eventual marcação (Figura 1).

Os pisos foram deixados por aproximadamente 12 horas, posteriormente foram retirados e expostos a outras colônias. O experimento consistiu em liberar as operárias para exploração do piso removível explorado por indivíduos de outra colônia e observar o comportamento.

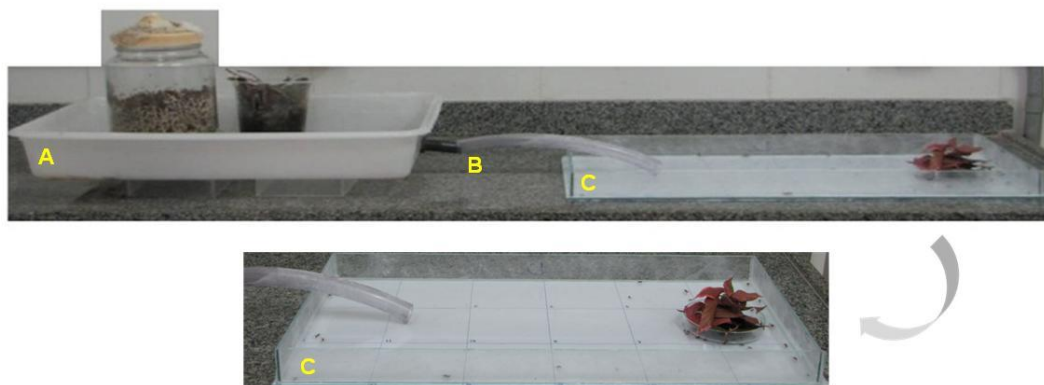


Figura 1. Colônia de *Acromymex subterraneus subterraneus* e arena de forrageamento com piso de vidro removível. Na arena foram oferecidas folhas de *Acalypha wilkeziiana* como fonte de alimento. Bandejas contendo o ninho (A), mangueira de silicone interligando o ninho ao piso removível (B) e piso removível de vidro (C).

Foi registrado o tempo transcorrido até a primeira operária contactar o alimento e tempo até a quinta operária carregar folha. A fonte de substrato, folhas de *Acalypha wilkeziiana*, foram colocadas em placa de Petri (9 cm de \varnothing) a 50 cm da entrada.

Os testes iniciaram após a primeira operária chegar ao piso removível. Os testes foram realizados por aproximadamente uma hora ou até serem quantificados todos os atos descritos acima. Para marcar o tempo foi utilizado cronômetro digital.

Foi também quantificado o número de indivíduos visitando a arena. Para isso a arena foi dividida em 18 quadrantes de 100 cm² cada. Quatro quadrantes foram escolhidos aleatoriamente e o número de operárias foi quantificado no primeiro e aos 5^o, 10^o, 20^o e 30^o minutos.

Os testes foram repetidos dezesseis vezes com 4 colônias em diferentes combinações. Testes controles com superfície homocolonial (isto é, explorado pela própria colônia) e testes branco com superfícies neutras, isto é, sem marcação também foram realizados.

1.2. Comportamentos de reconhecimento e de defesa de território.

Seis colônias mantidas em laboratório com aproximadamente 5 L de fungo foram selecionadas para utilização nos testes. Foram formados 3 grupos com duas colônias cada. Um dia antes da realização dos testes as colônias foram colocadas

em uma arena de vidro (60 x 30 x 4 cm) para haver aclimatação das operárias. Os testes foram divididos em três etapas: na primeira etapa foi observado o comportamento das operárias da colônia sobre arena de forrageamento sem exploração (arena de vidro de 30 x 30 x 4 cm) (Figura 2A e 2C). Na segunda etapa foi observado o comportamento das operárias da mesma colônia (residente) na arena já explorada por operárias dessa colônia (Figura 2A e 2C). Na terceira etapa foi observado o comportamento de operárias com a presença de operárias da colônia intrusa. Por 20 minutos foi permitida a passagem de operárias intrusas (Figura 2B).

Para as formigas terem acesso à área de forrageamento foram utilizadas pontes de madeira (30 x 1,5 x 1,5 cm) forradas com papel de filtro para evitar a impregnação de odores e dessa forma possibilitar a reutilização (Figura 2). Folhas foram colocadas no centro da arena de forrageamento para que as operárias desenvolvessem uma atividade de exploração e forrageamento.

Durante aproximadamente quarenta minutos foram observados os comportamentos das operárias e quantificado seu fluxo na primeira etapa, em seguida a ponte foi retirada impedindo a passagem para a área de forrageamento. Aguardou-se trinta minutos para iniciar a próxima etapa, folhas novas foram depositadas no centro da arena e a ponte foi posicionada novamente entre a entrada do ninho e a arena de forrageamento, o mesmo foi realizado para a terceira e última etapa. Foram realizadas vinte repetições de cada teste.

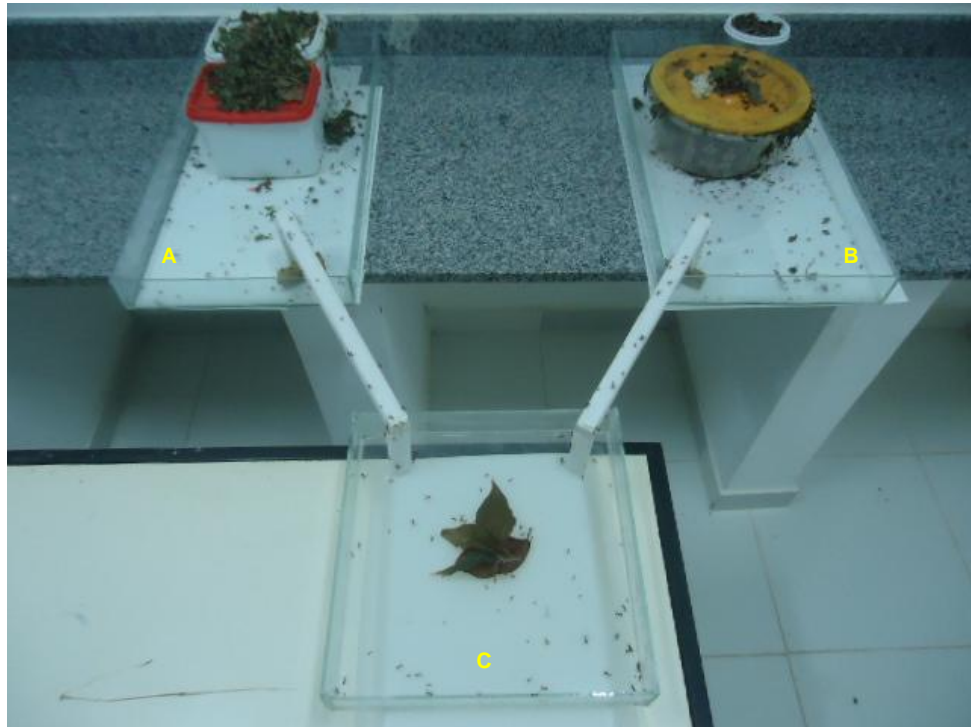


Figura 2. Duas colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, (A) residente e (B) intrusa, interligado a uma única área de forrageamento (C).

O comportamento das operárias foi observado direta e indiretamente com auxílio de filmagens. Os atos comportamentais das operárias na arena vinculados à marcação de território foram quantificados durante os testes, assim como os seguintes comportamentos: marcação de trilha - a operária toca a extremidade do abdome na superfície enquanto caminha (Figura 5C), carregamento de folha - a operária retorna ao olheiro com fragmento de folha e combate - operárias atacam com mordidas, pode haver amputações de partes do corpo.

O fluxo das operárias residentes foi registrado após a primeira formiga atravessar a ponte e quantificado durante um minuto. A cada cinco minutos e durante quarenta minutos foram quantificadas todas as operárias que passavam por um ponto predeterminado na ponte. Foram contabilizadas as operárias que regressaram sem fragmento de folhas ou com fragmento de folhas.

Os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) e as médias dos atos comportamentais e os fluxos de operárias obtidos foram comparados através do teste de Tukey, $p < 0,05$.

2. Determinação das áreas marcadas.

Nesse teste foi observado o comportamento de formigas expostas a papéis filtros deixados sobre parte da trilha e suas margens, da entrada do olheiro e da área de forrageamento de formigas heterocoloniais.

Os ninhos utilizados nos testes foram preparados 15 dias antes dos testes e mantidos em salas separadas para que não houvesse habituação dos seus odores. Cada colônia foi colocada em uma bandeja de plástico (60 x 30 x 15 cm) constituindo a área do ninho (Figura 3A), conectada a uma bandeja de plástico com paredes menores (60 x 30 x 5 cm) (Figura 3B) para a formação da trilha, que por sua vez foi conectada a um pote de vidro (5 L) (Figura 3C) correspondendo à área de forrageamento. As três partes foram conectadas por tubos de silicone (Figura 3).

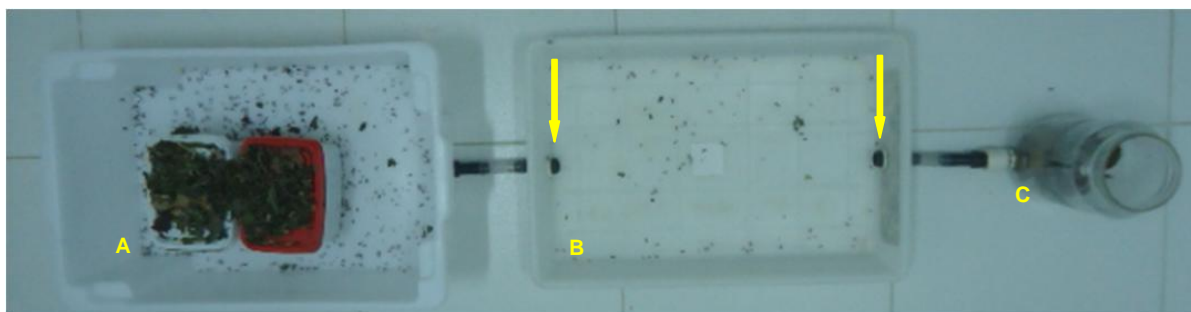


Figura 3. Colônia de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*: A) Ninho, B) área de formação da trilha e C) área de forrageamento. Seta amarela: entrada do ninho e entrada da arena de forrageamento onde foi feita a contagem do fluxo de operárias.

A entrada do ninho, o local correspondente a trilha-tronco e suas margens e a área de forrageamento foram forradas com papel filtro. Após 12 horas, o papel filtro foi retirado e cortado em pedaços de 5 cm². Os pedaços foram acondicionados em caixas gerbox e mantidos em freezer 10°C até a utilização nos testes. Para cortar o papel filtro foi observada a formação da trilha e das suas margens através da medição com régua.

Nos testes um pedaço de papel filtro foi colocado sobre uma trilha heterocolonial. Por cinco minutos foi observado o comportamento de abertura de mandíbula, curvamento da cabeça e abdome, rejeição do substrato observado quando operárias carregando fragmentos de folhas desviavam o papel filtro,

mordidas e carregamento do papel para fora da trilha. Esses comportamentos foram identificados em pré-testes.

Foi realizada a contagem de operárias entrando e saindo do ninho e com e sem fragmentos para estabelecer o fluxo da colônia. Também se registrou o número de operárias que entraram e saíram da área de forrageamento com ou sem fragmentos de folhas.

O fluxo foi estabelecido 15 e 5 minutos antes de colocado o papel filtro, durante e 5 e 15 minutos depois de retirado o papel filtro. Com o papel filtro na trilha foram feitas três contagens das operárias a cada 5 minutos. Cada contagem foi realizada durante um minuto.

Os dados foram avaliados com Análise de Variância (ANOVA). As médias dos atos comportamentais e das três contagens do fluxo de operárias obtidas foram comparadas através do teste de Tukey, $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Identificação dos atos comportamentais relacionados à marcação de território em *A. subterraneus subterraneus*.

Foram identificados três atos relacionados à marcação ou ao reconhecimento de território: I) arraste do abdome, II) curvamento de abdome e III) arraste de abdome com inclinação da cabeça. No arraste de abdome o indivíduo caminha sem direcionamento aparente e com o abdome em contato com o substrato (Figura 5A). No curvamento de abdome as operárias abaixam a cabeça, esticam as antenas para frente com as mandíbulas abertas e abdome curvado para baixo (Figura 5B). E no arraste de abdome com inclinação da cabeça o indivíduo arrasta a extremidade do abdome e ao mesmo tempo inclina a cabeça próxima à superfície.

Outros comportamentos também foram observados durante os bioensaios: marcação de trilha (Figura 5C), carregamento de folha, combate, exploração da

área - onde a operária caminha com as antenas abertas e em movimento de zigue-zague, tocando a superfície ou as paredes da arena. Eliminação de excreção - pode ocorrer durante o combate, ou antes, com o curvamento de abdome algumas formigas liberam excreções pela região posterior do abdome. A excreção é de tonalidade marrom-amarelada. Batida de pernas na superfície - a operária posiciona o corpo próximo ao chão, mantém as pernas abertas e batem essa na superfície inferior. E posição arqueada - a operária mantém as pernas esticadas, corpo longe do chão, faz estridulação de abdome, mantém as antenas recuadas, encostadas na cabeça. Nesse comportamento a formiga parece maior (Figura 5D).

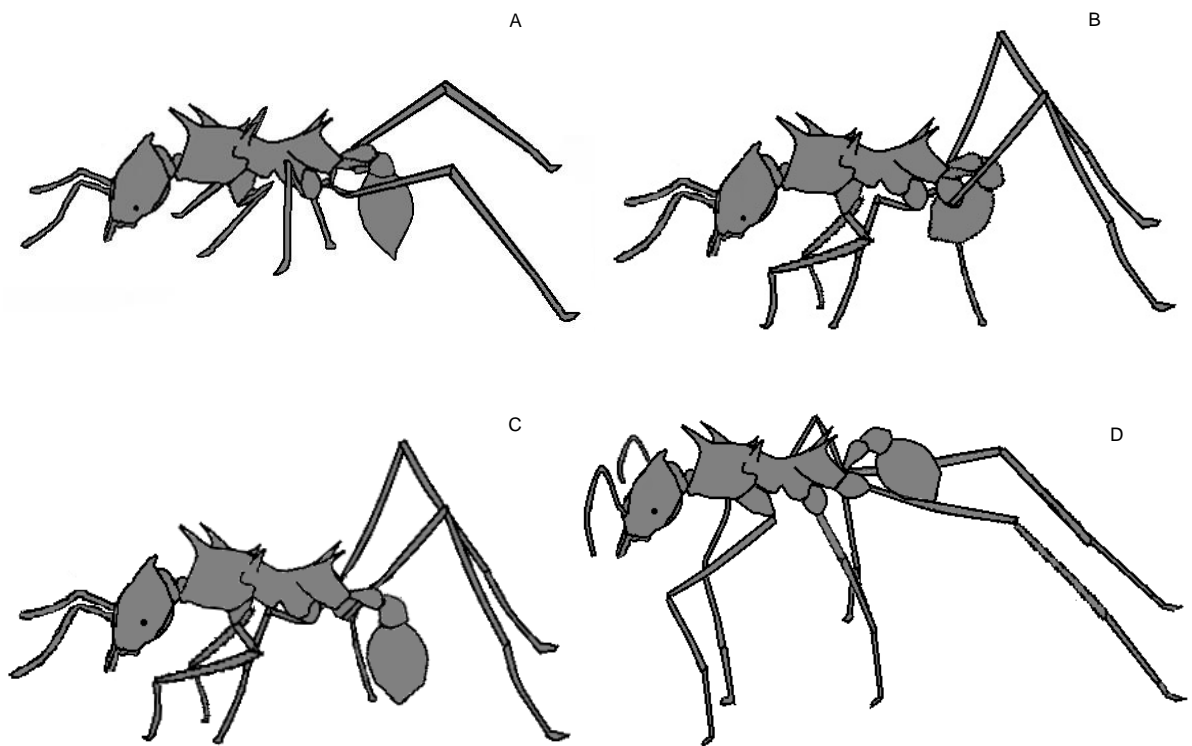


Figura 5. Operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* arrastando o abdome (A), encurvando o abdome (B), marcando trilha (C) e arqueada (D). Desenho de Felipe Matias Bailez Viana.

1.1. Marcação e reconhecimento de território.

Em arena de forrageamento sem marcação foi observada locomoção rápida, exploração da área, antenação de companheiras e arraste de abdome. As operárias se locomoveram sem direção aparente e realizaram marcação de

território arrastando o abdome. Algumas operárias encontraram alimento e voltaram para o ninho marcando trilha.

Em arena de forrageamento marcada por homocoloniais as operárias apresentaram locomoção lenta, exploração da área, antenação de companheiras e em 67% das observações observou-se o comportamento de arraste de abdome. Após o contato com as folhas, algumas operárias retornaram a entrada do ninho marcando trilha em um período de tempo menor do que observado nas outras áreas.

Em arena de forrageamento marcada por heterocoloniais foi observada locomoção rápida, exploração da área, antenação de companheiras, curvamento do abdome e o deslocamento das formigas com mandíbulas abertas. Investidas aconteceram, mas sem morder as companheiras. Arraste de abdome ocorreu em 83% das observações e foi verificado um maior número de formigas explorando a área ($F_{2,64}=6,35$, $P < 0,002$) (Figura 6).

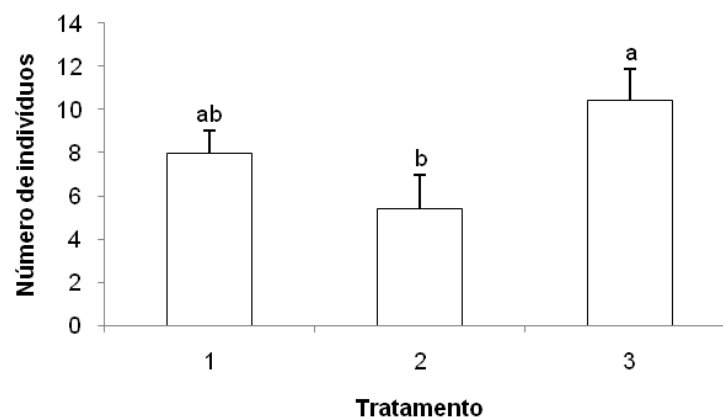


Figura 6. Número de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em arena de forrageamento sem marcação (1) (n=16), com marcação da própria colônia (2) (n=16) e com marcação de outra colônia (3) (n=24). Teste de Tukey a 5% de significância.

Em arena de forrageamento marcadas por homocoloniais as operárias gastaram menos tempo para chegar ao fundo extremo da arena, ao recurso e para carregar fragmentos de folhas (Tabela 1). Operárias expostas a arena de

forrageamento sem marcação ou marcada por outras colônias, gastaram mais tempo para os mesmos parâmetros (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo gasto pelas operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* para chegar ao extremo da arena (1), ao alimento (2) e para uma operária efetuar o carregamento de folhas (3).

Arena de forrageamento	Tempo (min)		
	1	2	3
Sem marcação (neutro)	3,22 ± 0,38 (a)*	5,35 ± 0,61 (a)*	45,13 ± 4,40 (a)*
Com marcação da própria colônia (homocolonial)	1,14 ± 0,15 (a)	1,75 ± 0,20 (b)	28,05 ± 1,01 (b)
Com marcação de outra colônia (heterocolonial)	6,96 ± 2,42 (a)	3,96 ± 0,59 (a)	40,22 ± 4,86 (ab)

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (5%).

1. 2. Comportamentos de reconhecimento e de defesa de território.

Na observação dos comportamentos de reconhecimento e defesa de território através do uso de arena de forrageamento comum a duas colônias, foi obtida uma maior frequência de arraste de abdome em arena de forrageamento marcada e sem marcações quando comparado com arena de forrageamento marcada e com intrusos, sugerindo que esse é o comportamento de marcação de território ($F_{2,57}=11,8739$, $P<0,001$) (Figura 7A).

Quando as operárias residentes encontraram operárias intrusas em sua arena de forrageamento, elas apresentaram arraste de abdome com inclinação de cabeça e batidas de pernas na superfície, curvamento de abdome, arqueamento do corpo e combates. Os comportamentos de arraste de abdome, marcação de trilha e carregamento de folhas foram observados em menor frequência.

Foi observada uma maior frequência de curvamento de abdome ($F_{2,57}=13,6275$, $P<0,001$) (Figura 7B) e arraste de abdome com inclinação da cabeça na área de forrageamento marcada e com intrusos ($F_{2,57}=4,6495$, $P<0,05$) (Figura 7C) indicando que esses dois últimos comportamentos estão relacionados ao reconhecimento e defesa de território, quando este encontra-se invadido.

A frequência do comportamento de marcação de trilha ($F_{2,57}=2,9582$, $P<0,05$) e carregamento de folhas ($F_{2,57}=6,0115$, $P<0,05$) foi maior em área sem

marcações (Figura 7D e 7E, respectivamente). O comportamento de combate só ocorreu nesse território ($F_{2,57}=20,5899$, $P<0,05$).

O fluxo de retorno das operárias sem fragmentos de folhas e com fragmentos de folhas da área de forrageamento para o ninho foi similar nos três tipos de área de forrageamento (sem marcações, área marcada e área marcada invadida por intrusos) observados ($F_{2,57}=1,0091$, $P>0,05$ e $F_{2,57}=0,348$, $P>0,05$, respectivamente) (Figura 8).

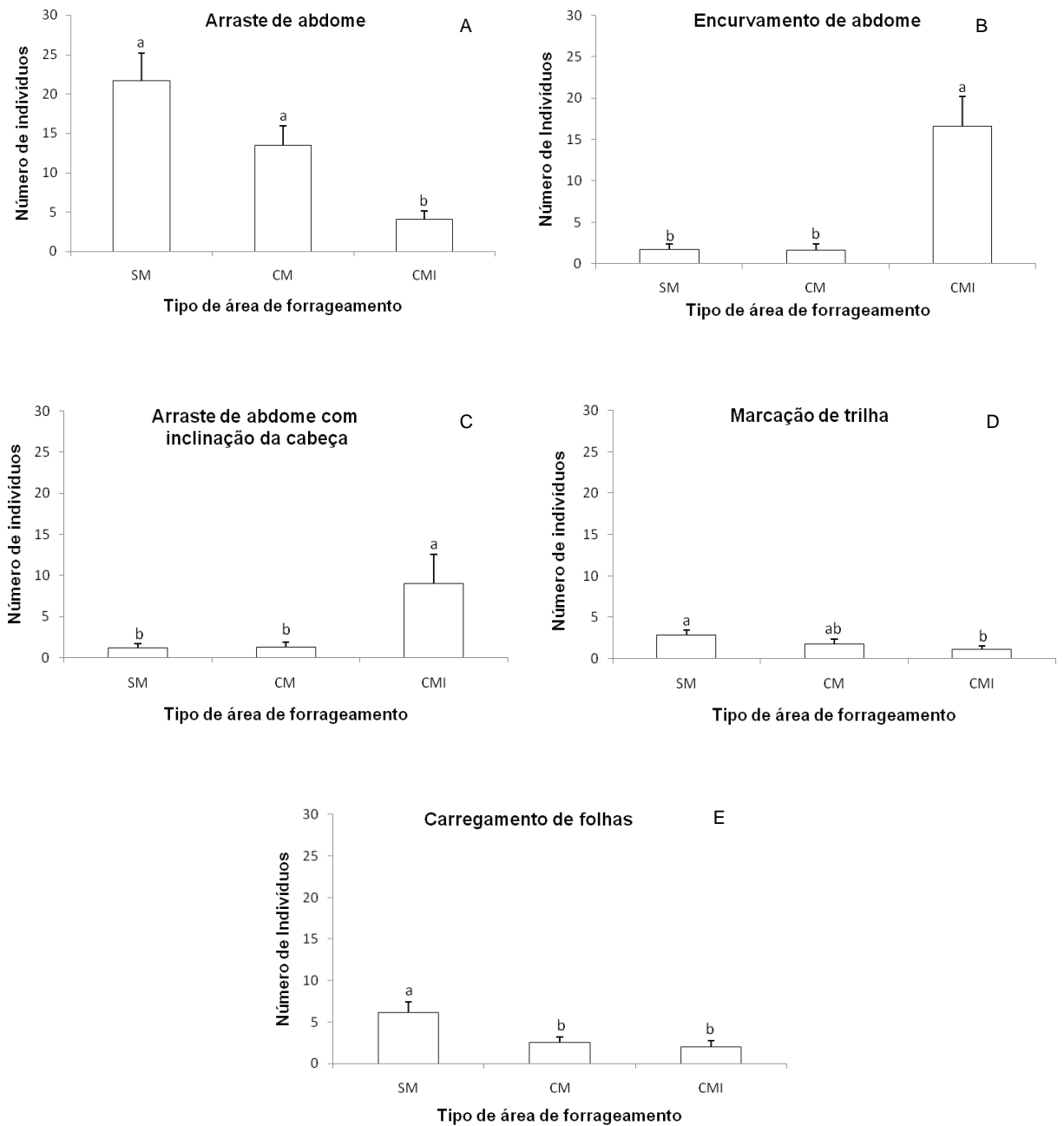


Figura 7. Número total de indivíduos que apresentaram o comportamento de arraste de abdome, curvamento de abdome, arraste de abdome com inclinação da cabeça, marcação de trilha e carregamento de folhas nos tratamentos SM (a área de forrageamento como um território sem marcações) (n=20), CM (área de forrageamento com marcações da própria colônia) (n=20) e CMI (área de forrageamento com marcações da colônia residente invadido por indivíduos da colônia intrusa) (n=20).

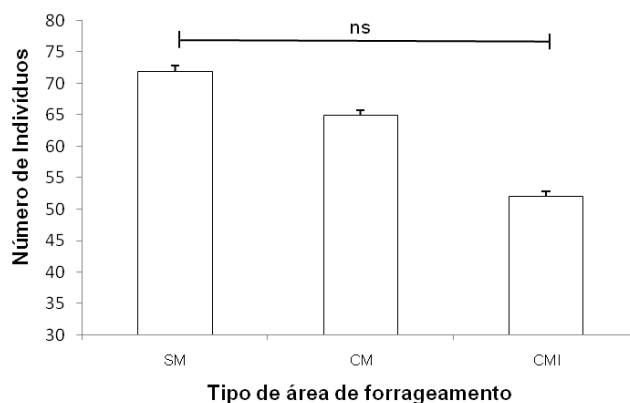


Figura 8. Fluxo de operárias que retornaram da arena de forrageamento carregando fragmentos de folhas. Arena sem marcação (SM) (n=20), com marcação da própria colônia (CM) (n=20) e com marcação da própria colônia, mas visitado por indivíduos de outra colônia (CMI) (n=20).

O fluxo de operárias que saíram do ninho para a arena com marcação não apresentou diferença significativa durante todo o período de teste ($F_{7,152}=1,7941$, $P>0,05$), uma vez que essa arena já estava sendo explorada, portanto as operárias reconheceram o território e apresentaram o mesmo comportamento.

O fluxo das operárias sem fragmentos de folhas retornando da arena de forrageamento sem marcação e com marcação aumentou durante o decorrer do experimento e apresentaram um pico aos quinze minutos da realização do experimento ($F_{7,152}=5,2014$, $P<0,001$ e $F_{7,152}=2,4036$, $P<0,05$, respectivamente). A quantidade de indivíduos caiu logo após os vinte minutos.

O fluxo das operárias carregando fragmentos de folhas apresentou diferença significativa na arena de forrageamento sem marcação, com um pico aos trinta minutos de experimento ($F_{7,152}=4,2052$, $P<0,001$) (Figura 9). Enquanto que nas arenas de forrageamento marcada e marcada com intrusos não houve diferença significativa no fluxo no decorrer do experimento ($F_{7,152}=1,8873$, $P>0,05$ e $F_{7,152}=1,1933$, $P>0,05$, respectivamente).

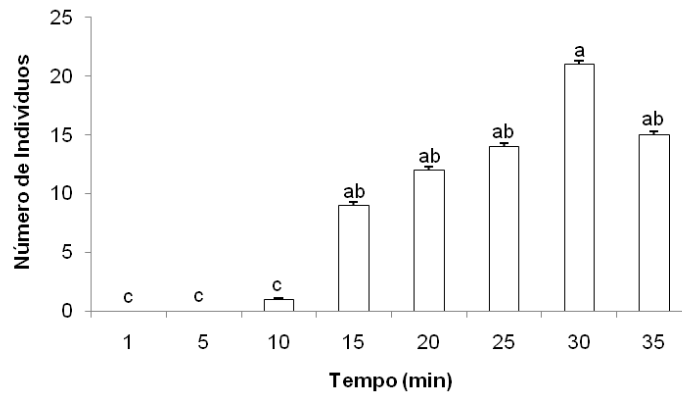


Figura 9. Fluxo de operárias que retornaram da arena de forrageamento sem marcação carregando fragmentos de folha, no 1^o, 5^o, 10^o, 15^o, 20^o, 25^o, 30^o e 35^o minutos (n=20).

2. Determinação do local de marcação do território

As operárias exibiram uma maior frequência de rejeição do substrato quando expostas ao papel correspondente a 10 e 15 cm de distância das margens da trilha-tronco de colônia heterocolonial e uma menor frequência de rejeição do substrato quando expostas aos papéis correspondentes a entrada de ninho e arena de forrageamento de colônia heterocolonial ($F_{6,75}= 6,2276$, $P <0,001$) (Figura 10A). Os comportamentos de abertura de mandíbula ($F_{6,82}=6,3385$, $P <0,001$), curvamento de abdome ($F_{6,75}=11,8895$, $P <0,001$) e morder e carregar ($F_{6,75}= 2,2474$, $P <0,05$) foram mais observados quando as operárias foram expostas aos papéis deixados na trilha-tronco da colônia heterocolonial e suas margens (Figuras. 10B, 10C e 10D, respectivamente).

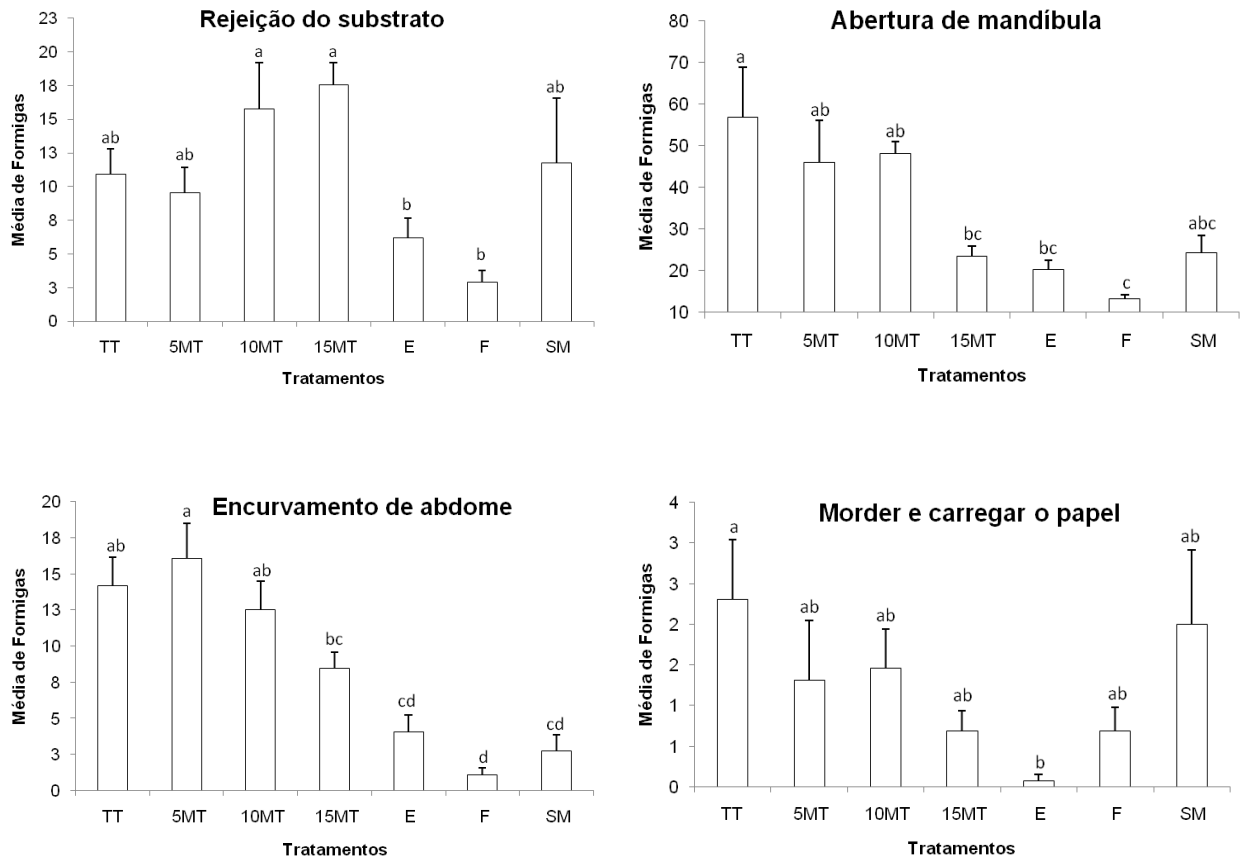


Figura 10. Frequência observada de comportamentos quando papel filtro retirado de determinada área do ninho e foi colocado na trilha-tronco de outra colônia. TT: papel filtro impregnado com marcação da trilha-tronco heterocolonial, 5MT: papel impregnado com 5 cm da margem da trilha, 10MT: papel impregnado com 10 cm da margem da trilha, 15MT: com 15 cm da margem da trilha, E: com a entrada do ninho, F: com a área de forrageamento e SM: papel sem marcação (controle) (n=13).

O período de exposição aos tratamentos (antes, durante e depois da instalação do teste) aumentou o fluxo de operárias que regressaram com fragmento de folhas depois do teste ($F_{2,410} = 6,0514$, $P < 0,01$) (Figura 11).

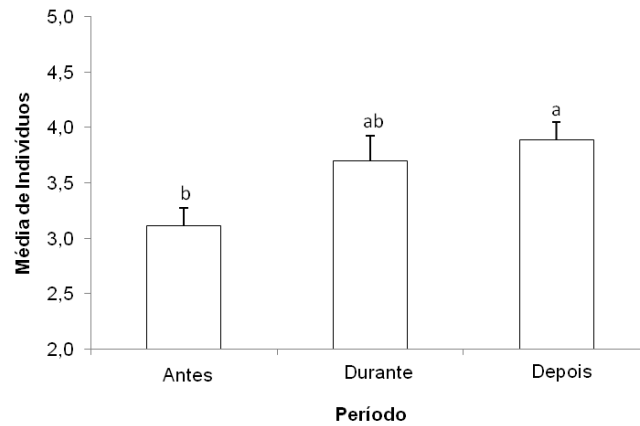


Figura 11. Fluxo de operárias observadas voltando com fragmentos de folha da arena de forrageamento em direção à área correspondente à trilha antes (15 e 5 minutos antes), durante e depois (5 e 15 minutos depois) dos tratamentos (n=13).

DISCUSSÃO

Essa é a primeira demonstração experimental em que foi evidenciado comportamento de marcação e reconhecimento de território da formiga cortadeira *A. subterraneus subterraneus*. Nesse trabalho constatou-se que as operárias dessa espécie reconhecem seu próprio território e o defendem contra intrusos e discriminam o território novo de territórios de outra colônia.

Embora tenham apresentado locomoção rápida durante a exploração de um território novo e de outra colônia as operárias gastaram mais tempo explorando essas áreas e demoraram mais em iniciar o carregamento de fragmentos de folhas. Jaffé et al. (1979) observaram que operárias da espécie de formiga cortadeira *Atta cephalotes* exploram extensivamente toda a área nova disponível e quando necessário recrutam outras operárias.

No presente trabalho constatou-se que operárias foram recrutadas quando a colônia acessa novas áreas de exploração e dessa forma aumentou o número de indivíduos na arena em comparação com uma área já explorada. Resultados similares foram observados por Wilson (1962) em *Solenopsis saevissima*. As operárias dessa espécie marcaram trilhas de recrutamento para atrair

companheiras para a nova área. Jaffé e Puche (1984) relataram comportamento semelhante em *Solenopsis geminata*. Esses autores sustentam que é possível que aconteçam grandes variações no número de formigas recrutadas devido às diferenças no nível de atividade ou na motivação a exploração. Esse fenômeno pode ser observado em *A. cephalotes*, as operárias dessa espécie só recrutam novas companheiras quando a área for consideravelmente grande (Jaffé et al., 1979).

Algumas operárias de *A. subterraneus subterraneus* exploraram o novo território e desenvolveram comportamento de arraste de abdome. Comportamento semelhante foi descrito em *Atta cephalotes*. As operárias dessa espécie quando acessam novo território encostam o extremo do abdome na superfície e mantêm a mandíbula aberta ou elevam o abdome no ar (Jaffé et al., 1979). Operárias de *A. sexdens* e *Acromyrmex octospinosus* não apresentaram o comportamento de elevar o abdome, e sim o descem em algumas situações (Jaffé et al., 1979).

O comportamento de curvamento de abdome com abertura de mandíbula foi observado em arena de forrageamento de outra colônia. As espécies de formigas cortadeiras *Atta cephalotes* (Jaffé et al., 1979) e *A. sexdens rubropilosa* (Vilela, 1983) também curvam o abdome quando colocadas na arena de forrageamento de uma colônia diferente.

A presença de intrusos no próprio território diminuiu o comportamento de carregamento de fragmentos de folhas das operárias e retardou a marcação da trilha. O comportamento de curvamento de abdome diminuiu e foi observado o curvamento de abdome com inclinação de cabeça (ocorre quando a operária deixa um dos lados da mandíbula quase tocando a superfície) de indivíduos que estavam explorando a área. Outros indivíduos desenvolviam comportamento agonístico contra intrusos como abertura de mandíbula, curvamento de abdome, liberação de excreção, arqueamento do corpo, mordida e combate, demonstrando a defesa do território através desses comportamentos. Salzemann et al. (1992) e Salzemann e Jaffé (1990a) relataram o comportamento de território de *A. laevigata* caracterizado pelo rápido e não coordenado movimento do corpo, junto com abertura de mandíbula. E Salzemann e Jaffé (1990a) incluíram ameaças, mordidas, transportes de intrusas e submissão das formigas.

As operárias apresentaram uma maior resposta de evitação de território de outra colônia marcada na trilha e suas margens que da entrada do ninho e da

arena de forrageamento. Esta marcação induziu comportamento de defesa de território com abertura de mandíbula, curvamento de abdome e carregamento de papel marcado para fora da trilha-tronco. Diferente da marcação da entrada do ninho e arena de forrageamento que desencadearam baixa resposta agonística.

O efeito similar do feromônio de território e do feromônio de trilha (este em poucas concentrações: 250 vezes menor do que a concentração para um recrutamento de trilha normal) em *A. cephalotes* foi relatado por Jaffé et al. (1979), que sugerem que o feromônio de trilha é usado como um marcador da trilha-tronco. Desse modo as trilhas são usadas constantemente para forrageamento por um longo período de tempo, não sendo necessário reforçar com novas deposições de feromônio e da mesma maneira com uma nova pista para o recrutamento de trilha. Esse mecanismo pode permitir que as formigas conservem a trilha de feromônio, que então poderiam usar extensivamente para trilhas de recrutamento, a partir da trilha-tronco. A trilha-tronco embora marcada de uma forma diferente da área que circunda o ninho pode ser em seguida, defendida em forma semelhante. As trilhas são também defendidas, mas são consideradas entidades separadas (Jaffé et al., 1979).

De acordo com Salzemann e Jaffé (1990a), a espécie *A. laevigata* defende trilhas e, em certa medida, novos sítios de forrageamento. A forma de defesa não é rígida, no entanto, as formigas evitam adversárias, guardando a entrada do ninho ou até mesmo fechando-as. Muitas vezes preferem se retirar do local do forrageio ou marcam extensivamente o local novo.

O fluxo de operárias com fragmento de folhas aumentou depois do teste comparado com o fluxo normal obtido no momento anterior à instalação dos testes. O que indica um sistema de recrutamento para o carregamento mais ágil de substrato diante de ameaças. O transporte e o comportamento agonístico apresentado sugere que houve reconhecimento da marcação territorial heteroespecífica da trilha e de suas margens da colônia. Salzemann e Jaffé (1990a) constataram marcação de território na trilha-tronco, ao redor do ninho e em menor proporção na área de forrageamento de *Atta laevigata*. Esses autores relatam que no final da trilha-tronco não houve reconhecimento de marcação territorial por intrusas.

No campo, operárias de *A. laevigata* marcam todos os olheiros ativos do ninho e a primeira parte da trilha-tronco. Quando a colônia explora especialmente

fonte de recurso atrativo, a agressividade de operárias geralmente aumenta. O mesmo ocorre na trilha-tronco, também marcada com feromônio de território. Por sua vez, trilhas que levam ao alimento atrativo são marcadas com feromônio territorial em todo o caminho até a fonte de alimento (Salzemann e Jaffé, 1990a).

RESUMOS E CONCLUSÕES

- As operárias de *A. subterraneus subterraneus* discriminam um território novo, do próprio território ou do território de heterocoloniais e o próprio território invadido por indivíduos de outra colônia;
- O comportamento exibido por *A. subterraneus subterraneus* em um território heterocolonial é de curvamento do abdome. No próprio território arrastam o abdome e inclinam a cabeça;
- A marcação de território para essa espécie ocorre com a deposição da secreção através do comportamento de arraste de abdome;
- A marcação química do território de *A. subterraneus subterraneus* ocorre principalmente na trilha-tronco e em suas margens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Della Lucia, T.M.C., Fowler, H.G. (1993) As formigas cortadeiras. *In*: Della Lucia, T.M.C. (ed) *As formigas cortadeiras*. 1. ed. Viçosa: UFV, p. 1-3.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The ants*. 1. ed. Massachusetts: Belknap Press. 732p.
- Jaffé, K., Bazire-Benazet, M., Howse, P.E. (1979) An integumentary pheromone secreting gland in *Atta* sp.: territorial marking with a colony specific pheromone in *Atta cephalotes*. *Journal of Insect Physiology*, 25: 833-839.
- Jaffé, K., Marquez, M. (1987) On agonistic behavior among workers of the ponerine ant *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, 34: 87-95.
- Jaffé, K., Navarro, J.G. (1985) Comunicacion quimica entre obreras de la hormiga cortadora de grama *Acromyrmex landolti*. *Revista Brasileira Entomologia*, 28: 351-362.
- Jaffé, K., Puche, H. (1984) Colony-specific territorial marking with the metapleural gland secretion in the ant *Solenopsis geminata* (Fabr). *Journal of Insect Physiology*, 30: 265-270.
- Salzemann, A., Jaffé, K. (1990a) On the territorial behavior of field colonies of the leaf cutting ant *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Physiology*, 36: 133-138.
- Salzeman, A., Jaffé, K. (1990b) Territorial ecology of the leaf-cutting ant, *Atta laevigata*. *In*: Vander Meer R.K., Jaffé K., Cedeno A. (eds) *Applied myrmecology. A world perspective*. Westview Press, Boulder, CO, pp 345-354.

- Salzeman, A., Jaffé, K. (1991) Polyethisme et defense de la société chez la fourmi champignoniste *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux*, 38: 149-159.
- Salzemann, A., Nagnan, P., Tellier, F., Jaffé, K. (1992) Leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini) marks its territory with colony-specific Dufour gland secretion. *Journal of Chemical Ecology*, 18: 183-196.
- Vilela, E.F. (1983) *Behavior and control of leaf-cutting ants (Hymenoptera: attini)*. PhD thesis, University of Southampton, Southampton, 209p.
- Wilson, E.O. (1962) Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima*. *Animal Behaviour*, 10: 134-164.

3.2. POLIMORFISMO NO COMPORTAMENTO DE MARCAÇÃO DE TERRITÓRIO EM *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi identificar as substâncias presentes na glândula Dufour de *A. subterraneus subterraneus* e verificar como as classes de tamanho de operárias respondem aos extratos dessa glândula. As operárias foram separadas em classes de tamanho de acordo com a largura da cápsula cefálica: 0.8 a 1.0 mm (C1), 1.2 a 1.5 mm (C2), 1.6 a 2.0 mm (C3) e 2.1 a 2.4 mm (C4). Os testes comportamentais consistiram em colocar em uma arena retangular 5 formigas sobre um pedaço de papel filtro (9 cm de Ø) impregnado com 0,1 mL de extrato de GD (10 glândulas/ mL) de operárias de uma outra colônia. Durante 5 minutos foi quantificado o número de vezes que as formigas curvaram o abdome e efetuaram abertura de mandíbula. Os constituintes do extrato foram analisados através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O extrato da classe 2 desencadeou maior resposta de curvamento de abdome em operárias da classe 3 e o extrato da classe 3 em indivíduos da classe 2, 3 e 4. As classes maiores de operárias responderam com maior frequência de abertura de mandíbula a todos os extratos e ao solvente. A marcação é realizada por substâncias liberadas pela glândula de Dufour. No extrato de glândula de Dufour foram encontrados hidrocarbonetos de cadeia longa. A proporção de substâncias que compõem o perfil da glândula de Dufour difere entre as castas. As operárias da classe 3 são provavelmente responsáveis pela marcação de território.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the substances in Dufour's gland (DG) of *A. subterraneus subterraneus* and see how classes of workers respond to the gland extracts of this species. The workers were divided into classes according to the size of the head capsule: 0.8 to 1.0 mm (C1), 1.2 to 1.5 mm (C2), 1.6 to 2.0 mm (C3) and 2.1 to 2.4 mm (C4). Behavioral tests consisted of placing 5 ants and a disc of filter paper impregnated with 0.1 ml of extract DG (10 glands / mL) of another colony in an arena. For 5 minutes, the frequency that ants bent the abdomen and opened the jaw was quantified. The constituents of the extracts (20 glands / 0.3 ml) were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The extract of Class 2 triggered better response to abdomen bending in Class 3 workers as well as the extract of Class 3 in Class 2 individuals. The workers of classes 2, 3 and 4 responded significantly to Dufour's gland extract in Class 3. The major classes of workers responded to all extracts and solvent with a higher frequency of jaw opening. In Dufour's gland extract, long-chain hydrocarbons were found. The proportion of substances that make up Dufour's gland profile differs between castes. Class 3 workers are probably responsible for territorial recognition and mark.

INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras possuem um sofisticado mecanismo de comunicação através do uso de feromônios, cuja função principal está associada à manutenção da integridade territorial e da estrutura social da colônia (Jaffé et al., 1979; Whitehouse e Jaffé, 1995). Várias espécies de formigas utilizam marcas químicas na defesa de seu território. De acordo com Hölldobler e Wilson (1990), território é uma área ocupada exclusivamente por um ou mais animais mantidos

por meio de repulsa aos invasores através de defesa ou advertência. Em formigas, o território pode ser marcado ou reconhecido por sinais visuais, odores do ambiente (Jaffé e Marcuse, 1983; Jaffé e Villegas, 1985), odores dos indivíduos ou da colônia, ou uma marcação química específica com feromônio territorial (Jaffé, 1983; Jaffé et al., 1986; Jaffé e Navarro, 1985; Jaffé e Sanchez, 1984).

A marcação do território em formigas pode ter duas funções. Uma função de defesa, claramente antagonística, onde em territórios marcados a formiga intrusa se tornaria submissa, enquanto as residentes permaneceriam em alerta e reagiriam com agressividade aos intrusos. A outra seria uma função de orientação às operárias para as várias entradas de sua colônia (Della Lucia et al., 2001; Salzemann e Jaffé, 1990). Em formigas cortadeiras, a marcação e o reconhecimento do território favorecem o abastecimento de alimento necessário para a colônia, a sua defesa contra intrusos (Salzemann et al., 1992; Vilela, 1983) e reduz conflitos agressivos entre colônias vizinhas (Salzemann e Jaffé, 1990).

Estudos sobre marcação de território nas formigas cortadeiras são encontrados apenas para o gênero *Atta* para as espécies *Atta cephalotes* (Jaffé et al., 1979), *A. sexdens rubropilosa* (Vilela, 1983) e *A. laevigata* (Salzemann e Jaffé, 1991). E pesquisas apontam a participação da glândula de Dufour como estrutura responsável pela produção do feromônio de marcação de território.

Os componentes identificados na secreção da glândula de Dufour em *Atta laevigata* (Salzemann et al., 1992) foram o (Z)-9-tricoseno, o (Z)-9-nonadeceno, o 8,11-nonadecadieno e o n-heptadeceno. Apesar da glândula de Dufour ter sido indicada como fonte desse feromônio por mais de um autor, seu papel neste processo ainda não está totalmente esclarecido. Essa estrutura está associada à produção de feromônios de apaziguamento e propaganda nas espécies de formigas escravagistas *Protomognathus americanus* e *Harpagoxenus sublaevis* (Brandt et al. 2006), mas também o feromônio produzido tem função de alarme, recrutamento, trilha e atração sexual, atração entre indivíduos, marcação de território, entre outros (Billen, 1993).

As operárias das formigas cortadeiras exibem um elevado grau de polimorfismo, as castas têm tamanhos e atividades diferenciadas dentro da colônia (Fowler et al, 1986). No gênero *Acromyrmex* o polimorfismo é menos acentuado se comparado com o gênero *Atta*. Após estudos realizados com operárias de *Acromyrmex*, Camargo et al. (2007), Forti et al. (2004) e Moreira et al. (2010)

dividiram as castas desse gênero em quatro classes, onde a menor classe está envolvida na atividade de manutenção e cuidado com o fungo e imaturos e as outras três classes maiores estão envolvidas na atividade de forrageamento. Em outros estudos as classes de castas em *Acromyrmex* são divididas em apenas menores com média de largura de cápsula cefálica de 0,8 mm e maiores com média de 1,8 mm (Hughes et al., 2003).

Essas diferenças morfológicas também são constatadas nas glândulas das formigas cortadeiras. Moreira e Della Lucia (1993) e Pereira et al., (1995) verificaram que o tamanho da glândula de veneno de *A. subterraneus subterraneus* e *A. subterraneus molestans* aumenta em função do tamanho da operária. Nascimento et al. (1993) verificaram em *A. sexdens rubropilosa* variações no conteúdo da glândula mandibular segundo a casta estudada. Operárias mínimas possuem principalmente 4-metil-3-heptanona enquanto que operárias maiores, encarregadas do forrageamento, e soldados possuem compostos neral e geranial como majoritários. Outros trabalhos demonstraram que as diferentes castas de formigas cortadeiras podem responder de maneira diferente a um mesmo estímulo externo (Wilson, 1971).

Operárias forrageadoras de *A. sexdens sexdens* e *A. opaciceps* responderam fortemente com comportamento de alarme ao extrato de cápsulas cefálicas maceradas de indivíduos menores de outras castas (Francelino et al, 2006). Operárias de diferentes castas podem desenvolver estratégias diferentes para obter sucesso em um combate. Em conflito com outras formigas ou organismos menores normalmente são recrutadas operárias menores, a estratégia é ter um grande número de combatentes que é melhor do que poucos bons lutadores. Se a batalha é de conflitos um-para-um ou com um organismo grande, então alguns bons lutadores serão melhores do que muitos pequenos (Whitehouse e Jaffé, 1996).

Para formigas do gênero *Acromyrmex* não existem estudos sobre a marcação de território, apenas o trabalho de Jaffé e Navarro (1985), que aponta evidência de marcas de odores deixadas no substrato em *Acromyrmex landolti*. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar como as diversas classes de operárias respondem aos extratos da glândula de Dufour e obter o perfil químico desse extrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 ninhos de *A. subterraneus subterraneus* mantidos em condições controladas na Unidade de Mirmecologia, do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro em Campos dos Goytacazes-RJ.

As criações foram mantidas em bandejas plásticas de acordo com modelo proposto por Della Lucia et al. (1993), sob 25 ± 2 °C de temperatura, 80 ± 10 % de umidade e fotoperíodo de 12 horas. O jardim de fungo foi mantido dentro de pote plástico ou de vidro (2 L) fechado e com chumaço de algodão umedecido na parte superior para manter a umidade do fungo. As formigas tiveram acesso ao jardim de fungo através de aberturas laterais. As colônias receberam folhas das espécies vegetais acalifa (*Acalypha wilkeiziana*) e/ou alfeneiro (*Ligustrum japonicum*) e esporadicamente flocos de cereais e pétalas de rosas. As folhas foram colocadas em bandejas plásticas.

Os bioensaios foram realizados sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo. As análises químicas foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

1.1. Determinação do tamanho das operárias:

As operárias de *A. subterraneus subterraneus* foram separadas segundo a qualificação utilizada por Forti et al. (2004) e Moreira et al. (2010). Esses autores sugerem a divisão de castas em quatro classes de tamanho de acordo com a largura da cápsula cefálica e a localização e/ou função na colônia de cada classe. Os intervalos de largura de cápsula cefálica foram os seguintes: classe 1 entre 0,8 a 1,0 mm (C1), classe 2 entre 1,2 a 1,5 mm (C2), 3 entre 1,6 a 2,0 mm (C3), 4 entre 2,1 a 2,4 mm (C4).

As cápsulas cefálicas das formigas foram medidas com auxílio de microscópio estereoscópico acoplado a uma lente micrométrica (aumento 40x).

1.2. Preparação das amostras:

Para preparação dos extratos de glândula de Dufour das quatro classes de formigas, operárias foram retiradas do ninho, mortas por congelamento e dissecadas em placa de Petri (9 cm de \varnothing) com auxílio de microscópio estereoscópico (40x). Os abdomes foram separados e imersos em água destilada e abertos com auxílio de pinça. As glândulas de Dufour foram localizadas e depois de retiradas foram maceradas em tubo Wheaton (3 mL) contendo 1 mL de hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) como solvente (Figura 1). Foram feitos extratos de glândula de Dufour a concentração de 10 glândulas/mL para os testes comportamentais, definidos em pré-testes, e 10, 20 e 30 glândulas de Dufour/ 0,3 mL de hexano para as análises cromatográficas. Os extratos foram preservados em freezer a 10°C até a utilização nos bioensaios. Para determinar a concentração ideal dos extratos nos testes foram realizados pré-testes.

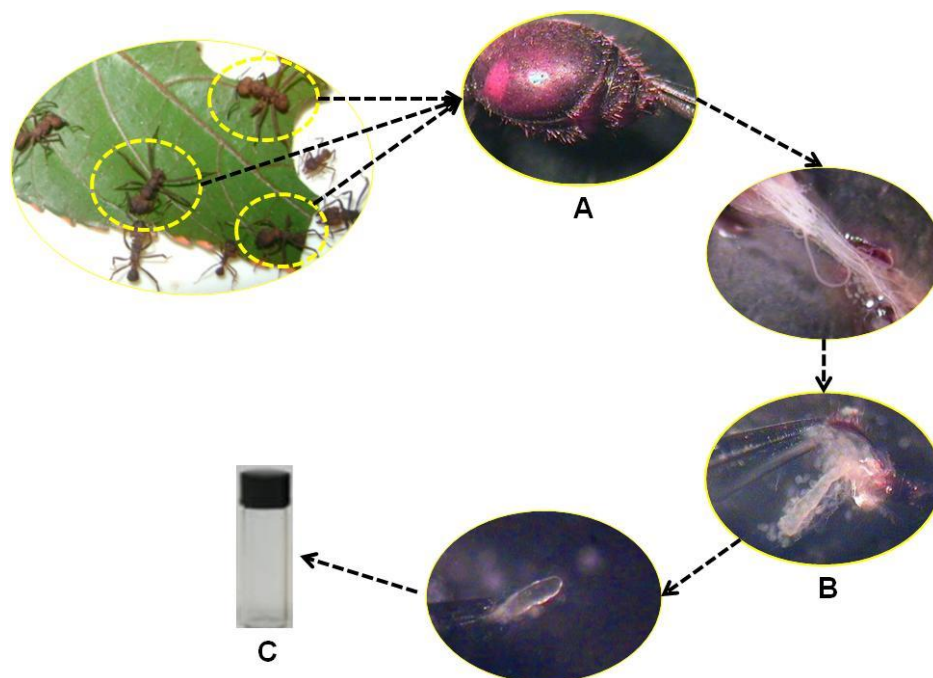


Figura 1. Preparação do extrato de glândula de Dufour. Os abdomes das formigas são retirados (A). A glândula de Dufour é localizada e retirada (B). A glândula de Dufour em um frasco contendo solvente (C). Fotos Karla Malaquias e Shênia S. Silva.

1.3. Teste: reconhecimento de território pelas diferentes castas

Os testes comportamentais consistiram em observar o comportamento de curvamento de abdome (curvamento de abdome e cabeça, com antenas voltadas para frente) e abertura de mandíbula das operárias das classes C1, C2, C3 e C4. Estes atos comportamentais foram identificados como parte do comportamento de reconhecimento de território em trabalhos prévios.

Discos de papéis filtro (9 cm de Ø) foram impregnados com 0,1 mL de extrato de glândula de Dufour com auxílio de pipeta Pasteur (Gazal et al., 2009; Moreira e Della Lucia, 1993). Foram realizados testes controle com papel filtro impregnado com solvente. Esperou-se o extrato evaporar por 20 segundos e logo em seguida o disco foi colocado no centro da arena (bandejas plásticas de 20 x 10 x 4 cm) (Figura 2).

Cinco formigas foram colocadas na arena por repetição. Os testes iniciaram dois minutos depois para permitir a adaptação das formigas ao ambiente. Com auxílio de filmagens foi quantificado o número de vezes que as formigas exibiam curvamento de abdome e abertura de mandíbula durante cinco minutos. A arena possuía talco inodoro em suas paredes internas para prevenir a fuga das formigas.

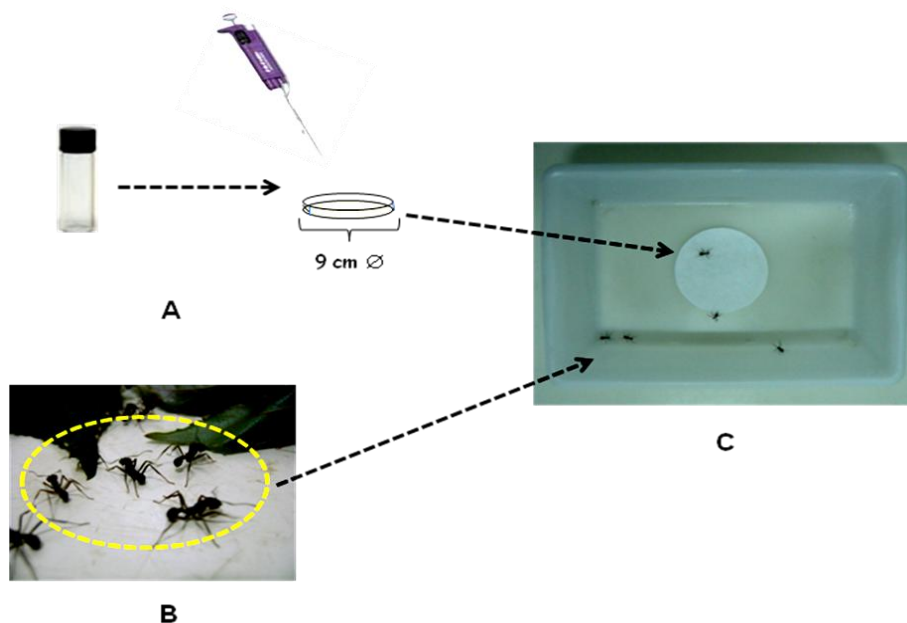


Figura 2. Impregnação do papel filtro (9 cm de Ø) com extrato de glândula de Dufour (A). Retirada de cinco formigas da espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* do ninho (B). Arena (20 x 10 x 4 cm) com o papel filtro impregnado com extrato e com cinco operárias. Fotos: Shênia S. Silva.

1.3.1. Situações experimentais:

Foram realizados 4 testes nos quais formigas de todas as classes foram expostas aos extratos das classes C1, C2, C3 e C4 de ninhos heterocoloniais. No teste controle formigas de todas as classes foram expostas aos papéis filtros impregnados com solvente. Cada teste foi repetido vinte vezes. As variáveis analisadas foram a ocorrência de curvamento de abdome e abertura de mandíbula.

1.3.2. Análise estatística:

As respostas comportamentais das operárias de diferentes castas por extratos de glândula de Dufour e o efeito dos extratos de glândula de Dufour de cada casta nas operárias foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ($p < 0,05$). O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo o primeiro fator o extrato das castas C1, C2, C3, C4 e solvente com as operárias das diferentes castas e o segundo fator testado às classes de operárias C1, C2, C3 e C4.

1.4. Análises químicas:

Extratos da glândula de Dufour foram analisados usando a técnica de cromatografia gasosa aliada à espectrometria de massas (CG-EM). Para otimização da qualificação e quantificação dos compostos foi desenvolvido e validado um método de análise.

As condições de análise do cromatógrafo gasoso linha 17A SHIMATZU QP3000 foram as seguintes:

- Coluna Optima-5 (30 m X 0,25 mm).

- Programa de temperatura:

Injetor = 230 °C;

Detector = 280 °C;

Temperatura inicial da análise = 100 °C (por 1 min);

Temperatura final da análise = 280 °C (por 10 min);

Taxa de aquecimento = 15 °C·min⁻¹.

1.4.1. Validação do método cromatográfico:

Os extratos obtidos foram submetidos às análises químicas para identificação e quantificação dos constituintes. A validação tem por objetivo garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Foram analisados os extratos das diferentes castas de *A. subterraneus subterraneus*. Em todos os ensaios relativos à validação do método confirmatório desenvolvido foi utilizado um extrato glandular. No total foram três concentrações utilizadas 10, 20 e 30 glândulas de cada uma das quatro castas, C1, C2, C3 e C4, em triplicata.

1.4.1.1. Linearidade e Sensibilidade:

Linearidade corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. É necessário elaborar uma curva de calibração para cada analito que se deseja determinar e para cada corrida analítica (ANVISA, 2003; US-FDA, 2001).

Volumes de 0,3 mL do extrato glandular foram adicionados às soluções padrão dos analitos e padrão interno MBDB (N-metilbenzodioxazolibutamina). Cada amostra foi brevemente agitada em vórtex, os analitos foram eluídos com 0,5 mL de hexano (1 mL, 2 vezes) e os eluatos foram secos completamente sob atmosfera de N₂. Volumes de 1 µL foram injetados no CG-EM e analisados em duplicata. Os resultados foram analisados utilizando-se um modelo de regressão linear, ajustado com base no método dos mínimos quadrados. As razões área analito/área padrão interno correspondiam ao eixo das coordenadas (y) e as concentrações ao eixo das abscissas (x) obtidas a partir das equações de ajuste em cada substância padrão.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir dos resultados obtidos com as análises dos brancos preparados no estudo de linearidade. Para tanto, as 3 replicatas de cada branco foram analisadas 3 vezes (3 replicatas de injeção) cada uma. Os cálculos foram feitos tendo como base os valores de desvio padrão obtidos para as razões $\frac{\text{área}_{\text{analito}}}{\text{área}_{\text{padrão interno}}}$ correspondentes ao branco nas análises de linearidade. As equações utilizadas nos cálculos de LD e LQ foram respectivamente:

$$3x \frac{s}{a} \text{ e } 10x \frac{s}{a}$$

Onde,

s = desvio padrão absoluto para todas as replicatas;

a = inclinação da reta, coeficiente angular da equação de ajuste do modelo linear (y = ax + b).

Tempo de retenção (TR) é o tempo gasto por um componente desde a sua injeção na coluna até a sua detecção na saída do sistema. O tempo de retenção engloba todo o tempo que um componente fica no sistema cromatográfico, seja diluído na fase móvel, seja retido na fase estacionária.

1.4.1.2. Precisão:

A precisão de um método bioanalítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea (ANVISA, 2003; US-FDA, 2001). Este é um importante parâmetro que possibilita decidir se o método bioanalítico é confiável ou não para o objetivo da análise (Cassiano et al. 2009).

A precisão pode ser expressa como uma estimativa do desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%), de uma série de repetições da mesma amostra, em diferentes preparações (Peters, et al. 2007; Peters e Maurer 2002; US-FDA, 2001).

a) Precisão intradia:

Define a precisão do método em repetir, em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise, ou seja, com o mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e fazendo uso dos mesmos reagentes (Cassiano et al., 2009).

A repetibilidade não deve ser confundida com a análise da precisão instrumental ou repetibilidade de injeções de uma mesma amostra (Shabir, 2003). É importante ressaltar que a precisão do método avaliada através da repetibilidade é investigada pela análise das amostras controle de qualidade preparadas em replicatas para cada concentração (Cassiano et al., 2009).

Esse estudo foi realizado em três níveis de concentração dos extratos, contendo: 10, 20 e 30 glândulas. A concentração de cada padrão interno foi 10 ng/mL. Ao longo de um dia, foram preparadas 3 replicatas para cada nível de concentração acima. O intervalo médio entre as replicatas de cada nível foi aproximadamente duas horas. Os resíduos foram solubilizados em 200 µL de hexano. Uma alíquota de 1 µL de cada replicata foi injetada em duplicata e analisada por CG-EM. Os resultados foram expressos em porcentagem, como Coeficiente de Variação (CV), calculado a partir da equação:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

Onde,

s = desvio padrão absoluto para as razões $\text{área}_{\text{analito}}/\text{área}_{\text{padrão interno}}$ de cada replicata, e

\bar{x} = valor médio das áreas sob os picos.

b) Precisão interdia:

Define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por

diferentes analistas e diferentes equipamentos. Para a determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (Cassiano et al., 2009).

Esse estudo também foi realizado em três níveis de concentração dos extratos, contendo: 10, 20 e 30 glândulas. A concentração de cada padrão interno foi de 10 ng/mL. Uma vez por dia, ao longo de 6 dias consecutivos, 3 replicatas foram preparadas para cada nível acima. Uma alíquota de 1 µL de cada replicata foi injetada em duplicata e analisada por CG-EM. Os resultados foram expressos em porcentagem, como Coeficiente de Variação (CV), calculado a partir da equação:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

s = desvio padrão absoluto para as razões $\text{área}_{\text{analito}}/\text{área}_{\text{padrão interno}}$ de cada replicata, e

\bar{x} = valor médio das áreas sob os picos.

1.4.1.3. Estabilidade da amostra (congelamento/ descongelamento):

Frequentemente, as amostras do estudo são congeladas e descongeladas para re-análises. Por esse motivo, deve ser avaliada a estabilidade do analito na matriz biológica após, no mínimo, três ciclos de congelamento e degelo. Um experimento para avaliar este tipo de estabilidade é proposto nos guias para validação de métodos bioanalíticos elaborados pelo FDA e pela ANVISA (ANVISA, 2003; US-FDA, 2001).

Esse estudo também foi realizado em três níveis de concentração dos extratos, contendo: 10, 20 e 30 glândulas. A concentração de cada padrão interno foi de 10 ng/ML. Para cada nível foram preparadas 3 replicatas. Após a solubilização em 200 µL de hexano, volumes de 1 µL foram injetados e analisados em duplicata. O restante das amostras foi guardado no congelador.

Passadas 21 horas de congelamento e 3 horas de estabilização térmica, uma nova alíquota foi retirada de cada replicata. O tratamento e a análise dessas novas amostras foram exatamente como antes da etapa de congelamento. O restante das amostras foi novamente guardado no congelador. Essa rotina foi executada mais duas vezes, após outros dois ciclos de 21 horas de congelamento e 3 horas de estabilização. Os resultados foram expressos pelo Coeficiente de

Varição. Esse coeficiente foi calculado para cada concentração após cada ciclo. Para avaliar a estabilidade geral, um coeficiente de variação total (%CV_{total}) foi calculado para cada concentração após todos os ciclos.

RESULTADOS

1. Reconhecimento de território:

Todas as classes de operárias responderam com curvamento de abdome e abertura de mandíbula aos extratos de glândula de Dufour de indivíduos heterocoloniais de todas as classes de castas.

As operárias mínimas, pertencentes à classe 1 responderam com pouco curvamento de abdome ao extrato de glândula de Dufour. Não houve diferença na resposta dessas formigas aos extratos das diferentes classes com o controle (solvente) ($F_{4,95}=1,2705$, $P > 0,05$) (Figura 3).

As operárias da classe 2 responderam significativamente com curvamento de abdome ao extrato da classe 3 ($7,35 \pm 1,46$) ($F_{4,95}=10,6418$, $P < 0,001$). As operárias da classe 3 responderam significativamente com curvamento de abdome ao extrato da classe 3 ($12,05 \pm 1,31$) e da classe 2 ($6,15 \pm 0,81$) ($F_{4,95}=27,8982$, $P < 0,001$). As operárias da classe 4 responderam significativamente com curvamento de abdome ao extrato da classe 4 ($3,45 \pm 0,42$) ($F_{4,95}=8,0329$, $P < 0,001$).

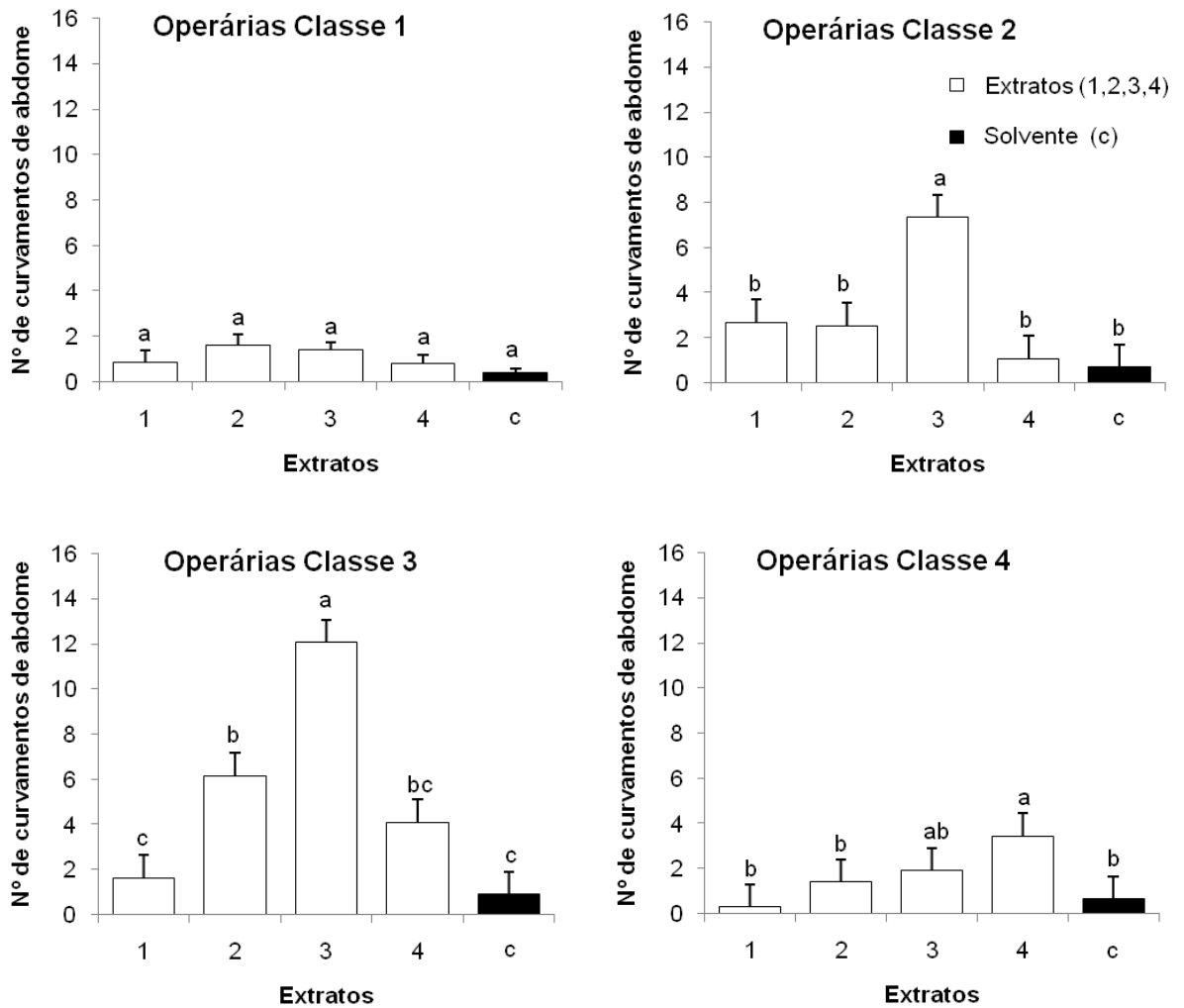


Figura 3. Número de curvamentos de abdome realizados por cinco formigas de quatro classes de tamanho (1=0,8 - 1,0 mm, 2=1,2 - 1,5 mm, 3=1,6 - 2,0 mm e 4=2,1 - 2,4 mm) de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* quando expostas aos extratos de glândula de Dufour produzidos a partir de glândulas de operárias das classes de tamanho 1, 2, 3, 4 e solvente (c) (n=20). Colunas seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

As operárias da classe 1 responderam significativamente com abertura de mandíbula ao extrato da classe 3 ($1,75 \pm 1,48$) ($F_{4,95}=4,7090$, $P < 0,01$).

As classes maiores de operárias foram as que responderam com maior frequência de abertura de mandíbula a todos os extratos (classe 3: $F_{4,95}=9,7185$, $P < 0,001$; classe 4: $F_{4,95}=14,4503$, $P < 0,001$) (Figura 4).

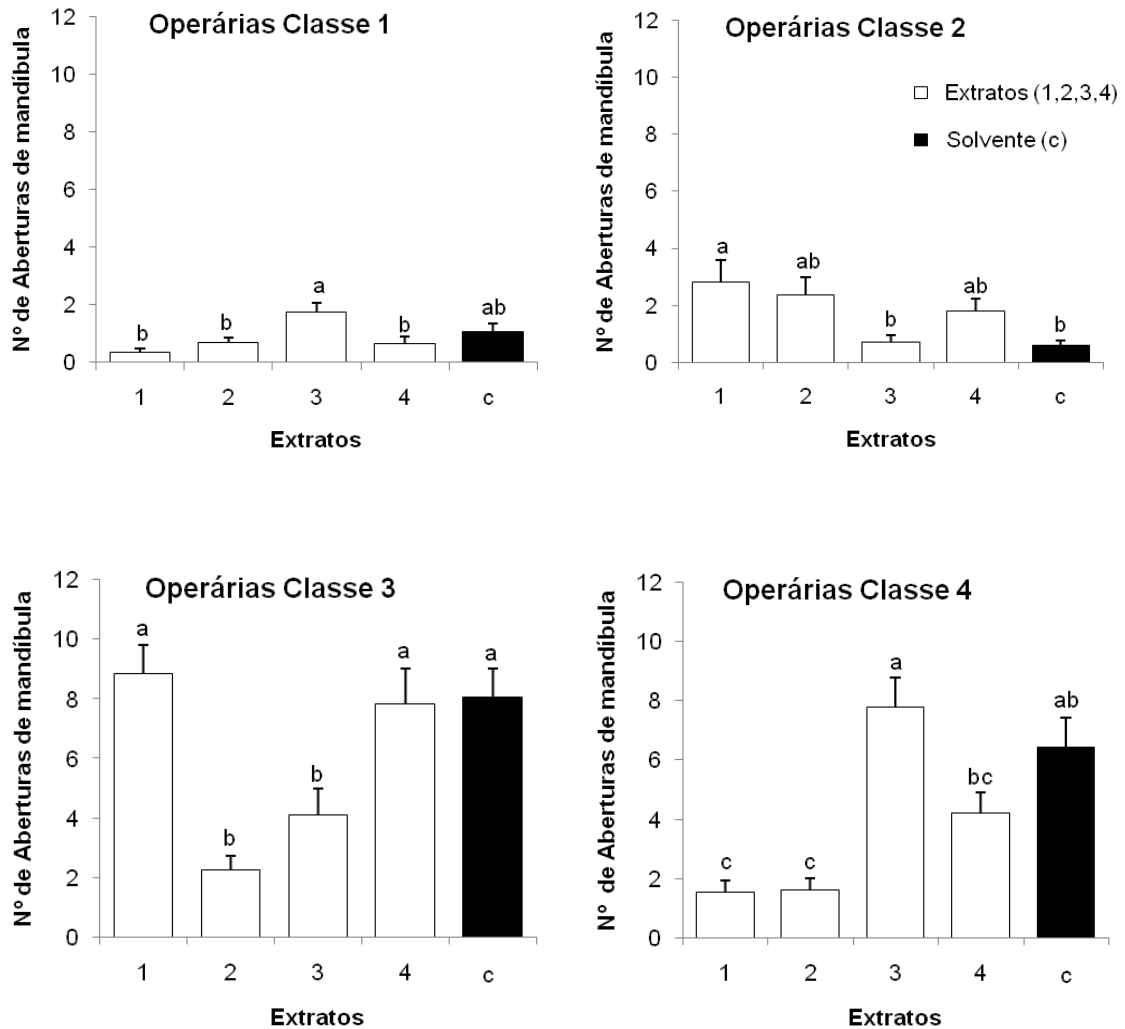


Figura 4. Número de aberturas de mandíbula realizado por cinco formigas de quatro classes de tamanho (1=0,8 - 1,0 mm (a), 2=1,2 - 1,5 mm (b), 3=1,6 - 2,0 mm (c) e 4=2,1 - 2,4 mm (d)) de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* quando expostas aos extratos de glândula de Dufour produzidos a partir de glândulas de operárias das classes de tamanho 1, 2, 3, 4 e solvente (c) (n=20). Colunas seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Outros comportamentos observados foram deslocamento aleatório, caminhamento rápido de aproximadamente 1 a 3 segundos com a mandíbula aberta, seguido de parada do indivíduo com as antenas afastadas ou de curvamento do abdome e da cabeça.

2. Análises químicas:

Após análise prévia, optou-se por fazer os extratos em Hexano.

2.1. Validação do método cromatográfico:

A fim de otimizar as condições de extração, foi validado o método cromatográfico para análise dos constituintes da glândula de Dufour. Os dados de Linearidade e Sensibilidade foram colocados no apêndice.

A sensibilidade do método foi avaliada, baseando-se nos valores de Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) calculados a partir das análises realizadas com as amostras de referência negativa. Em relação a esse parâmetro, pode-se dizer que o método apresentou uma sensibilidade muito boa para todos os analitos estudados.

As concentrações encontradas dos principais constituintes na glândula Dufour das espécies em estudo encontram-se na Tabela 1. A análise cromatográfica permitiu constatar que o perfil da glândula de Dufour é composto por uma série homóloga de hidrocarbonetos com cadeia C₂₀ a C₃₂. Tais hidrocarbonetos tiveram suas estruturas confirmadas pela comparação com tempo de retenção (TR) dos padrões, fragmentação característica e Índice de *Kovats* (IK) calculados.

Tabela 1. Hidrocarbonetos presentes no extrato da glândula de Dufour.

N^o	Composto Identificado	TR (min)	m/z característicos	IK_{calculado}	IK_{real}
1	Eicosano	7.745	43,57, 71, 85, 99, 113	1992	2000
2	Heneicosano	8.373	43,57, 71, 85, 99, 113	2103	2100
3	Docosano	8.977	43,57, 71, 85, 99, 113	2192	2200
4	Tricosano	9.559	43,57, 71, 85, 99, 113	2301	2300
5	Tetracosano	10.152	43,57, 71, 85, 99, 113	2398	2400
6	Pentacosano	10.804	43,57, 71, 85, 99, 113	2499	2500
7	Hexacosano	11.538	43,57, 71, 85, 99, 113	2600	2600
8	Heptacosano	12.387	43,57, 71, 85, 99, 113	2706	2700
9	Octacosano	12.789	43,57, 71, 85, 99, 113	2803	2800
10	Nonacosano	13.391	43,57, 71, 85, 99, 113	2910	2900
11	Triacotano	14.592	43,57, 71, 85, 99, 113	2999	3000
12	Hentriacotano	16.050	43,57, 71, 85, 99, 113	3108	3100
13	Dotriacotano	17.832	43,57, 71, 85, 99, 113	3201	3200

Na Tabela 2 são mostradas as concentrações dos compostos por casta de *A. subterraneus subterraneus*.

Tabela 2. Concentrações dos compostos obtidos no extrato de glândula de Dufour por casta de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*.

Nº	Composto Identificado	C1*	C2*	C3*	C4*
1	Eicosano	T	T	T	T
2	Heneicosano	T	T	T	T
3	Docosano	0.1	0.2	T	0.6
4	Tricosano	0.3	0.3	0.9	0.5
5	Tetracosano	0.9	0.8	0.8	1.5
6	Pentacosano	2.0	1.9	0.3	4.0
7	Hexacosano	3.3	3.3	1.7	6.3
8	Heptacosano	4.7	5.0	2.4	9.1
9	Octacosano	5.0	5.2	3.0	9.2
10	Nonacosano	5.4	5.6	3.1	9.6
11	Triacotano	4.2	4.2	2.0	8.2
12	Hentriacotano	3.6	3.6	1.9	6.9
13	Dotriacotano	2.3	2.2	0.9	4.2

* ng/glândula e T = traços

Verificou-se também a sobreposição dos cromatogramas, mostrando a precisão nas injeções pela correlação com o tempo de retenção (Figura 5).

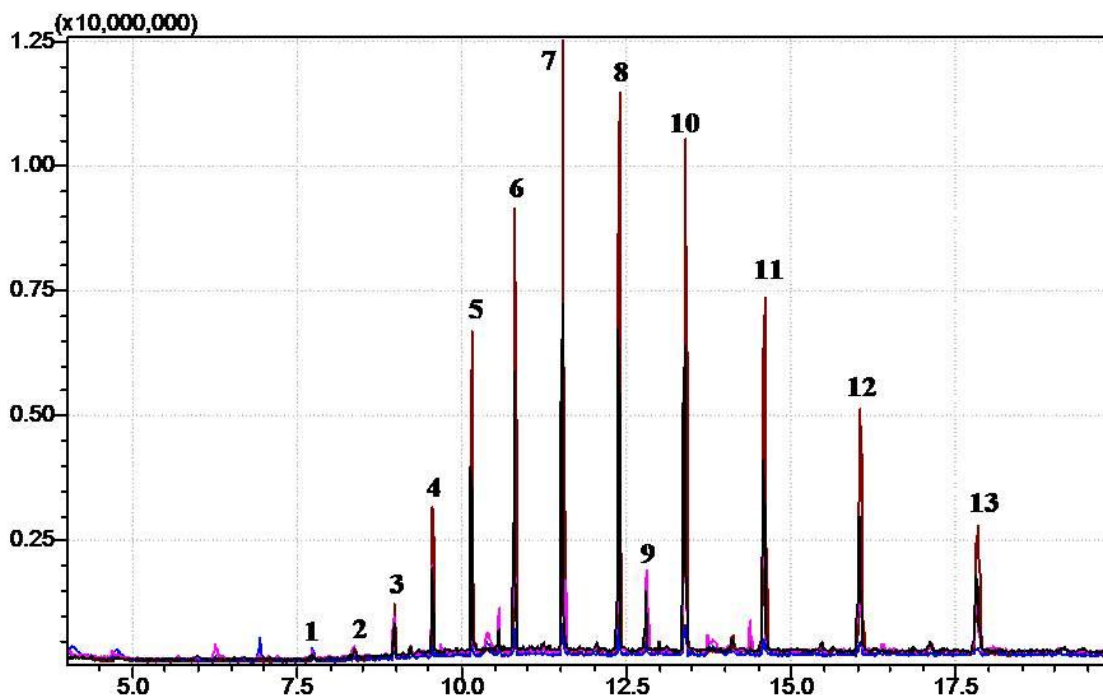


Figura 5. Sobreposição dos cromatogramas das diferentes castas, indicando a precisão nas injeções pela correspondência do tempo de retenção.

2.1.1. Precisão:

a) Precisão intradia:

A precisão intradia está relacionada principalmente com o cuidado no preparo das amostras e com a estabilidade do equipamento. Os resultados apresentados na Tabela 2 (no Apêndice) indicam uma precisão intradia média superior a 95% (CV inferior a 5%), o que é bastante satisfatório para análises realizadas em matrizes biológicas. Isso sugere que as amostras foram cuidadosamente preparadas, minimizando o erro experimental que poderia haver durante as análises.

b) Precisão interdia:

A precisão interdia reflete a variabilidade de um método de um dia para outro. Por isso, está associada com a preparação das amostras e da flutuação da resposta do equipamento.

Nesse estudo, o método também apresentou uma precisão interdia média de 95%. Uma variação de aproximadamente 5% no interensaio para análises biológicas é considerada muito baixa (até 10% é aceitável) e está associada ao erro sistemático.

2.1.2. Estabilidade da amostra (congelamento/ descongelamento):

No estudo de estabilidade da amostra, observou-se que, após o primeiro e segundo ciclos de descongelamento das amostras, não houve redução significativa na concentração dos analitos. Após o terceiro descongelamento, houve maior variação.

Embora tenha ocorrido redução significativa na concentração dos analitos ao final do ensaio, observa-se que tal variação encontra-se dentro do limite aceitável de trabalho (inferior a 20%). Portanto, pode-se dizer que mesmo quando as amostras já foram congeladas mais de uma vez, ainda é possível realizar as análises, embora esse não seja o procedimento mais aconselhável.

DISCUSSÃO

Para o gênero *Acromyrmex* relatos de uma possível evidência de marcação química de território são encontrados apenas para a espécie *Acromyrmex landolti* (Jaffé e Navarro, 1985). Outros estudos comportamentais demonstraram a participação de secreções da glândula de Dufour na marcação de território em attines como *A. sexdens rubropilosa* (Vilela, 1983), *A. cephalotes* (Jaffé et al., 1979) e *A. laevigata* (Salzemann e Jaffé, 1991; Salzemann et al., 1992). Os indivíduos dessas espécies marcam ativamente a área ao redor do ninho com um feromônio produzido no final do gáster. Diante de um novo substrato ou sobre um território marcado com secreções de outra formiga operárias de *A. sexdens rubropilosa* curvam o abdome ventralmente e marcam o território com deposição do feromônio produzido na ponta do gáster (Vilela et al, 1987).

Nos encontros heterocoloniais em superfícies impregnadas com extrato de GD foi observada liberação de excretas. Nas formigas tecelãs *Oecophylla longinoda* foi observada que a liberação de excreções é realizada para marcação de território. As operárias dessa espécie somente defendem o seu território quando essas marcações são realizadas pelos seus companheiros de ninho (Leston, 1973; Majer, 1972). Operárias intrusas em superfície impregnada com extrato de GD e com residentes apresentaram comportamento de eliminação de excretas, indicando um reconhecimento de território.

As operárias residentes expostas à superfície impregnada com GV e EC com intrusas apresentaram curvamento de abdome. Tal fato não foi observado com operárias intrusas onde o comportamento agonístico de reconhecimento de território como o curvamento de abdome não foi expressivo em superfície marcada com glândula de Dufour. Uma possível explicação para estes fenômenos é a presença de residentes no seu próprio território, que pode ter inibido o comportamento agressivo das intrusas. Somente em superfície impregnada com extrato de GD e sem residentes que as operárias intrusas apresentaram comportamento de curvamento de abdome.

Salzemann e Jaffé (1990) e Salzemann et al. (1992) observaram que operárias no próprio território obtiveram vantagem em confrontos heterocoloniais. Em território sem marcação a primeira operária a explorar o ambiente teve uma significativa vantagem sobre outras operárias homoespecíficas que chegaram a esse território. Intrusos adotaram postura de submissão em confrontos com residentes. No presente experimento não houve um comportamento expressivo de submissão, mas uma menor proporção de comportamentos agonísticos dos intrusos.

Nesse trabalho verificou-se que as operárias de *A. subterraneus subterraneus* reagiram ao extrato de glândulas de Dufour de heterocoloniais com curvamento de abdome ao mesmo tempo que posicionaram a cabeça para baixo, deixando as antenas para frente do corpo. As operárias de *A. subterraneus subterraneus* respondem a marcação de território de indivíduos de outro ninho.

Verificou-se uma especialização com operárias sensíveis na percepção e marcação química do território. As quatro classes de operárias possuem diferentes capacidades de responder ao extrato de GD, sendo que, a classe 3 parece ser a responsável pela marcação do território, pois os extratos provenientes de operárias

dessa classe desencadearam maior resposta de curvamento de abdome em indivíduos das classes 2 e 3. Os indivíduos da classe 3 responderam ao extrato de glândula de Dufour das classes 2, 3 e 4. Comportamento semelhante foi observado por Brindis et al, (2008) em operárias forrageadoras de *Solenopsis geminata*, estas respondem com alto seguimento de trilha ao extrato de glândula de Dufour das três castas, sendo maior a resposta ao extrato de sua própria casta.

Segundo Moreira et al. (2010), os indivíduos C2 de *A. subterraneus subterraneus* são frequentemente encontrados na trilha e na área de forrageamento e os indivíduos C3 são encontrados cortando. Isto pode sugerir que a C2 seja especializada em atividades de forrageamento, como patrulhamento de trilha e detecção de ameaças (Hughes e Goulson, 2001), enquanto a C3 em marcar e cortar folhas.

O presente trabalho evidenciou que a função das castas C2 e C3 é muito importante no processo de reconhecimento de substâncias da glândula de Dufour e marcação de território. Tanto na emissão quanto na percepção do feromônio, estas castas são responsáveis pelo maior eliciamento de resposta em operárias de outras castas e respondem mais eficientemente ao seu próprio feromônio.

A baixa resposta apresentada pelas operárias da C1 pode ser explicada pela sua especialização a realizar atividades no ninho. Nos trabalhos de Della Lucia et al. (1993) e Forti et al. (2004) foi observado que operárias mínimas de *A. subterraneus brunneus* são responsáveis pelo cultivo do fungo e cuidado com a prole, por isso são encontradas frequentemente na câmara de fungo, mas também são observadas na área de forrageamento ou “andando de carona” sobre o fragmento de material vegetal transportado, por outras operárias comportamento normalmente associado à proteção contra ataque de forídeos (Vieira-Neto et al., 2006).

A abertura de mandíbula é um comportamento associado a alarme. Esse ato comportamental é verificado em testes de agressividade de formigas (Hölldobler e Wilson, 1977; Hölldobler e Wilson, 1990; Whitehouse e Jaffé, 1996; Wilgenburg et al., 2010), sempre acompanhado com deslocamentos rápidos (Hughes e Goulson, 2001; Hughes et al., 2001; Human e Gordon, 1999; Waddington e Hughes, 2010) ou congelamento do indivíduo (Mercier et al., 1997). As operárias da classe 3 e 4 responderam com comportamento de abertura de mandíbula ao extrato de glândula de Dufour e ao solvente. A abertura de

mandíbula assim como outros comportamentos de alarmes observados nas formigas pode estar relacionada ao reconhecimento e defesa de território.

O comportamento de abertura de mandíbula não parece ser próprio para avaliação de reconhecimento de marcação de território, diferentemente do comportamento de curvamento de abdome, já mencionado na literatura como um comportamento próprio de reconhecimento territorial (Jaffé et al., 1979; Salzeman e Jaffé, 1990; Salzeman et al., 1992; Vilela, 1983).

Operárias maiores respondem com maior frequência a estímulos externos, estranhos (Hölldobler e Wilson, 1977). Forti et al. (2004) observaram uma maior probabilidade das operárias maiores de *A. subterraneus brunneus* desempenhar tarefa de carregamento de folhas para a colônia. A resposta das castas 3 e 4 é esperada, uma vez que estas castas encontram-se com maior frequência desenvolvendo atividades fora do ninho, portanto mais expostas.

Nas análises químicas da glândula de Dufour de *A. subterraneus subterraneus* foram encontrados hidrocarbonetos, semelhantemente ao encontrado em *A. laevigata* por Salzemann et al. (1992). Esses autores encontraram 14 componentes hidrocarbonetos majoritariamente de cadeia longa na glândula de Dufour. Destes somente a substância eicosano foi encontrada em ambas as formigas.

A eficácia da secreção depende da mistura de substâncias, assim como a relativa proporção de componentes pode ser essencial. Quando se comparou perfis cromatográficos da secreção da glândula de Dufour das castas de operárias de *A. subterraneus subterraneus* foi observada uma correlação entre o tamanho e a quantidade de cada substância na secreção. Talvez esse fenômeno explique o comportamento diferente obtido pelas operárias quando expostas aos extratos de diferentes castas.

Vilela (1983) confirma a existência de um feromônio territorial em formigas cortadeiras, que regula encontros intraespecíficos. Excluindo o papel da glândula de veneno na secreção territorial, relata que o (Z)-9-nonadeceno produzido pela glândula Dufour (Evershed e Morgan, 1981) é um importante composto que age no comportamento territorial de *A. sexdens rubropilosa*.

No presente trabalho foram observados os comportamentos das castas quando expostas ao extrato de glândula de Dufour de operárias heterocoloniais. Observou-se que as operárias forrageadoras (classe 3) respondem a esse extrato

com curvamento de abdome, portanto pode-se inferir que essa classe seja a responsável pela marcação e reconhecimento de território. Nesse trabalho também foram identificados Hidrocarbonetos de cadeias longas como substâncias presentes na glândula de Dufour. Essas pesquisas podem ajudar no controle dessas formigas, uma vez que o comportamento de territorialidade influencia tanto na organização da colônia, como no forrageamento. O comportamento de territorialidade envolve a capacidade de reconhecimento dos companheiros de ninho, fatores que podem desencadear um combate, a capacidade de avaliar o recurso disponível a ser defendido e a marcação da área. Portanto, é um comportamento importante no ponto de vista da organização da colônia. Pesquisas futuras são necessárias para identificar quais compostos dentro do perfil químico formam o feromônio de território para essa espécie.

RESUMOS E CONCLUSÕES

- A marcação de território para essa espécie ocorre com a deposição da secreção da glândula de Dufour;
- Concluí-se que operárias forrageadoras (classe 3) são as que exibem maior número de curvamento de abdome quando expostas à secreção da glândula de Dufour. Esse fator e a sua relativa abundância na área de forrageamento sugerem que essa casta seja também responsável pela marcação e reconhecimento de território;
- No extrato de glândula de Dufour de *A. subterraneus subterraneus* foram encontrados Hidrocarbonetos de cadeia longa. Quantitativamente verificou-se que a proporção de substâncias que compõem o perfil da glândula de Dufour difere entre as castas de operárias dessa espécie de formiga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.
- Billen, J. (1993) Morphology of the exocrine system in ants. Proceedings of the Colloquia on Social Insects. *In: Kipyatkov, V.E. (ed.) St. Petersburg: Socium*, p. 1-15.
- Brandt, M., Heinze, J., Schmitt, T., Foitzik, S. (2006) Convergent evolution of the Dufour's gland secretion as a propaganda substance in the slave-making ant genera *Protomognathus* and *Harpagoxenus*. *Insectes Sociaux*, 53: 291-299.
- Brindis, Y., Lachaud, J.P., Gómez, B.G., Rojas, J.C., Malo, E.A., Cruz-López, L. (2008) Behavioral and olfactory antennal responses of *Solenopsis geminate* (Fabricius) (Hymenoptera: Formicidae) workers to their Dufour gland secretion *Neotropical Entomology*, 37: 131-136.
- Camargo, R.S., Forti, L.C., Lopes, J.F.S., Andrade, A.P.P., Ottati, A.L.T. (2007) Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *Journal of Applied Entomology*, 131: 139-145.
- Cassiano, N.M., Barreiro, J.C., Martins, L.R.R., Oliveira, R.V., Cass, Q.B. (2009) Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, 32: 1021-1030.
- Della Lucia, T.M.C., Fowler, H.G., Araújo, M.S. (1993) Castas de formigas cortadeiras. *In: Della Lucia, T.M.C. (ed) As formigas cortadeiras*. Viçosa: UFV, p. 43-53.

- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Moreira, D.D.O. (2001) Feromônios de formigas pragas. *In: Vilela, E.F., Della Lucia, T.M.C. (eds) Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, p. 73-82.
- Evershed, R.P., Morgan, E.D. (1980) A chemical study of the Dufour gland of two Attini ants. *Insect Biochemistry*, 10: 81-86.
- Evershed, R.P., Morgan, E.D. (1981) Chemical investigations of the Dufour gland contents of Attini ants. *Insect Biochemistry*, 11: 343-351.
- Forti, L.C., Camargo, R.S., Matos, C.A.O., Andrade, A.P.P., Lopes, J.F. (2004) Aloetismo em *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel (Hymenoptera, Formicidae), durante o forrageamento, cultivo do jardim de fungo e devolução dos materiais forrageados. *Revista Brasileira de Entomologia*, 48: 59-63.
- Fowler, H.G., Pereira-da-Silva, V., Forti, L.C., Saes, N.B. (1986) Population Dynamics of Leaf-Cutting Ants: A Brief Review. *In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (ed) Fire ants e leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder: Westview Press. p. 123-146.
- Francelino, M.R.V., Mendonça, A.L., Nascimento, R.R., Sant'Ana, A.E.G. (2006) The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *Atta opaciceps* exhibit intercaste and intercolony variations. *Journal Chemical Ecology*, 32: 643-656.
- Gazal, V., Bailez, Omar, Viana-Bailez, A.M. (2009) Mechanism of host recognition in *Neodohrniphora elongata* (Brown) (Diptera: Phoridae). *Animal Behaviour*, 78: 1177-1182.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1977) Colony-specific territorial pheromone in the African weaver ant *Oecophylla longinoda* (Latreille). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 2072-2075.

- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The ants*. 1. ed. Massachusetts: Belknap Press. 732p.
- Hughes, W.O.H, Goulson, D. (2001) Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant, *Atta capiguara*. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 49: 503-508.
- Hughes, W.O.H., Howse, P.E., Goulson, D. (2001) Mandibular gland chemistry of grass cutting ants; species, caste and colony variation. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 109-124.
- Hughes, W.O.H., Sumner, S., Van Borm, S., Boomsma, J.J. (2003) Worker caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100: 9394-9397.
- Human, K.G., Gordon, D.M. (1999) Behavioral interactions of the invasive Argentine ant with native ant species. *Insectes sociaux*. 46: 159-163.
- Jaffé, K. (1983) *Chemical communication among workers of leaf-cutting ants*. *Social insects in the Tropics*, Jaisson Ed. Univ. Paris Nord, v.2, 165-180.
- Jaffé, K., Bazire-Benazet, M., Howse, P.E. (1979) An integumentary pheromone secreting gland in *Atta* sp.: territorial marking with a colony specific pheromone in *Atta cephalotes*. *Journal of Insect Physiology*, 25: 833-839.
- Jaffé, K., Lopez, M.E., Aragort, W. (1986) On the communication systems of the ants *Pseudomyrmex termitarius* & *P. triplarinus*. *Insectes Sociaux*, 33: 105-117.
- Jaffé, K., Marcuse, M. (1983) Individual recognition and territorial behavior in the ant *Odontomachus bauri*. *Insectes Sociaux*, 30: 466-481.
- Jaffé, K., Navarro, J.G. (1985) Comunicacion quimica entre obreras de la hormiga cortadora de grama *Acromyrmex landolti*. *Revista Brasileira Entomologia*, 28: 351-362.

- Jaffé, K., Sanchez, C. (1984) Nestmate recognition and territorial behavior in the ant *Camponotus rufipes*. *Insectes Sociaux*, 31: 302-315.
- Jaffé, K., Villegas, G. (1985) On the communication systems of the fungus growing ant *Trachymyrmex urichi*. *Insectes Sociaux*, 32: 257-274.
- Leston, D. (1973) The ant mosaic; tropical tree crops and the limiting of pests and diseases. *Pesticides Abstracts*, 19: 311-341.
- Majer, J.D. (1972) The ant mosaic em Ghana cocoa farms. *Bulletin of Entomological Research*, 62: 151-160.
- Mercier, J.L., Lenoir, A., Dejean, A. (1997) Ritualised versus aggressive behaviours displayed by *Polyrhachis laboriosa* (F. Smith) during intraspecific competition. *Behavioural Processes*, 41: 39-50.
- Moreira, D.D.O., Della Lucia, T.M.C. (1993) Duração do feromônio de trilha de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e sua capacidade de atração em diferentes concentrações. *Revista Árvore*, 17: 202-212.
- Moreira D.D.O., Viana Bailez, A.M., Erthal Jr., M., Bailez, O.E., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2010) Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1665-1670.
- Nascimento, R.R., Morgan, E.D., Billen, J., Schoeters, E., Della Lucia, T.M.C., Bento, J.M.S. (1993) Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 907-918.
- Pereira, R.C., Moreira, D.D.O., Della Lucia, T.M.C. (1995) Descrição morfológica da glândula de veneno de *Acromyrmex subterraneus molestans* Santschi, 1925 (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Biológica Leopoldensia*, 17: 81-86.

- Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165: 216-224.
- Peters, F.T., Maurer, H.H. (2002) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology. *Accred. Qual. Assur.* 7, 441-450.
- Salzeman, A., Jaffé, K. (1990) On the territorial behavior of field colonies of the leaf cutting ant *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Physiology*, 36: 133-138.
- Salzeman, A., Jaffé, K. (1991) Polyethisme et defense de la société chez la fourmi champignoniste *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux*, 38: 149-159.
- Salzeman, A., Nagnan, P., Tellier, F., Jaffé, K. (1992) Leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini) marks its territory with colony-specific Dufour gland secretion. *Journal of Chemical Ecology*, 18: 183-196.
- Shabir, G.A. (2003) *Journal of Chromatography A*, 987: 57.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA) (2001) *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*.
- Viana, A.M.M., Frézard, A., Malosse, C., Della Lucia, T.M.C., Errard, C., Lenoir, A. (2001) Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology*, 11: 29-36.
- Vieira-Neto, E., Mundim, F., Vasconcelos, H. (2006) Hitchhiking behaviour in leaf-cutter ants: An experimental evaluation of three hypotheses. *Insectes Sociaux*, 53: 326-332.
- Vilela, E.F. (1983) *Behavior and control of leaf-cutting ants (Hymenoptera: attini)*. PhD thesis, University of Southampton, Southampton, 209p.

- Vilela, E.F., Della Lucia, T.M.C., Jaffé, K. (1987) A linguagem dos odores. *Revista Ciência Hoje*, 6: 26-31.
- Waddington, S.J., Hughes, W.O.H. (2010) Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*, the role of worker size, age and plasticity. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64: 1219-1228.
- Whitehouse, M.E.A., Jaffé, K. (1995) Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux*, 42: 157-166.
- Whitehouse, M.E.A., Jaffé, K. (1996) Ant wars: combat strategies, territory and nest defence in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Animal Behaviour*, 51: 1207-1217.
- Wilgenburg, E.V., Clémencet, J., Tsutsui, N.D. (2010) Experience influences aggressive behaviour in the Argentine ant. *Biology Letters*, 6: 152-155.
- Wilson, E.O. (1971) *The Insect Societies*. Harvard University Press. Cambridge. MA. 548p.

4. RESUMOS E CONCLUSÕES

- As operárias de *A. subterraneus subterraneus* marcam quimicamente seu território e são capazes de reconhecer e discriminar o seu território de uma área sem marcação, de um território de outra colônia;
- O comportamento exibido por *A. subterraneus subterraneus* quando em um território heterocolonial é de curvamento do abdome. Na defesa do seu território além do curvamento de abdome, exibem também o comportamento de arraste do abdome com inclinação da cabeça;
- A marcação química de território para essa espécie ocorre com a deposição da secreção da glândula de Dufour na trilha-tronco e suas margens. A marcação se dá através do comportamento de arraste de abdome;
- A casta da classe 3 é a principal responsável pela marcação e reconhecimento de território;
- O extrato de glândula de Dufour de *A. subterraneus subterraneus* é composto por Hidrocarbonetos de cadeia longa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, E.S. (1990) Boundary disputes in the territorial ant *Azteca trigona*: effects of asymmetries in colony size. *Animal Behavior*, 39: 321-28.
- Adams, E.S. (1998) Territory size and shape in fire ants: a model based on neighborhood interactions. *Ecology*, 79: 1125-1134.
- Adams, E.S. (2003) Experimental analysis of territory size in a population of the fire ant *Solenopsis invista*. *Behavioral Ecology*, 14: 48-53.
- Adams, E.S., Levings, S.C. (1987) Territory size and population limits in mangrove termites. *Journal Animal Ecology*, 56: 1069-1081.
- Adams, E.S., Tschinkel, W.R. (2001) Mechanisms of population regulation in the fire ant *Solenopsis invicta*: an experimental study. *Journal Animal Ecology*, 70: 355-369.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.

- Beattie, A.J., Hughes, L. (2002) Ant-plant interactions. *In*: Herrera, C.M., Pellmyr, O. (eds) *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*. Oxford: Blackwell Science, p.211-235.
- Bento, J.M.S. (2001) Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-praga. *In*: Vilela, E.F., Della Lucia, T.M.C. (eds) *Feromônios de insetos: biologia, química e aplicação*. Ribeirão Preto: Holos. p.135-144.
- Billen, J. (1993) Morphology of the exocrine system in ants. *In*: Kipyatkov, V.E. (ed). *Proceedings of the Colloquia on Social Insect*. St. Petersburg: Socium, p.1-15.
- Boaretto, M.A.C., Forti, L.C. (1997) Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*. 11: 31-46.
- Brandt, M., Heinze, J., Schmitt, T., Foitzik, S. (2006) Convergent evolution of the Dufour's gland secretion as a propaganda substance in the slave-making ant genera *Protomognathus* and *Harpagoxenus*. *Insectes Sociaux*, 53: 291-299.
- Brindis, Y., Lachaud, J.P., Gómez, B.G., Rojas, J.C., Malo, E.A., Cruz-López, L. (2008) Behavioral and olfactory antennal responses of *Solenopsis geminate* (Fabricius) (Hymenoptera: Formicidae) workers to their Dufour gland secretion. *Neotropical Entomology*, 37: 131-136.
- Camargo, R.S., Forti, L.C., Lopes, J.F.S., Andrade, A.P.P., Ottati, A.L.T. (2007) Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *Journal of Applied Entomology*, 131: 139-145.
- Cammaerts, R., Cammaerts, M.C. (1987) Nest topology, nestmate recognition, territorial marking and homing in the ant *Manica rubida* (Hymenoptera, Formicidae). *Biology Behavioral*, 12: 65-81.

- Cassanello, A.M.L. (1998) As formigas cortadeiras no Paraguai. *In*: Berti Filho, E., Mariconi, F.A.M., Fontes, L.R. (eds) Anais do Simpósio sobre formigas cortadeiras do cone sul. p. 77-83.
- Cassiano, N.M., Barreiro, J.C., Martins, L.R.R., Oliveira, R.V., Cass, Q.B. (2009) Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, 32: 1021-1030.
- Cherrett, J.M. (1986) The biology, pest status and control of leaf-cutting ants. *Agricultural Zoology Reviews*, 1: 1-27.
- Cherrett, J.M., Peregrine, D.J. (1976) A review of the status of leaf-cutting ants and their control. *Annals of Applied Biology*, 84: 124-128.
- Delabie, J.H.C., Alves, H.S.R., Reuss-Strenzel, G.M., Carmo, A.F.R. do, Nascimento, I.C. do, (2011) Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no novo mundo. *In*: Della Lucia, T.M.C. (ed), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa: UFV, p. 80-101.
- Della Lucia, T.M.C. (1993) *As formigas cortadeiras*. Viçosa: UFV.
- Della Lucia, T.M.C., De Souza, D.J. (2011) Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. *In*: Della Lucia, T.M.C. (ed), *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa: UFV, p. 14-26.
- Della Lucia, T.M.C., Fowler, H.G. (1993) As formigas cortadeiras. *In*: Della Lucia, T.M.C. (ed) *As formigas cortadeiras*. 1. ed. Viçosa: UFV, p. 1-3.
- Della Lucia, T.M.C., Marinho, C.G.S., Ribeiro, M.M.R. (2008) Perspectivas no manejo de formigas-cortadeiras. *In*: Vilela, E.F., Santos, I.A. dos, Schoederer, J.H., Serrão, J.E., Campos, L.A. de O., Lino-Neto, J. (eds) *Insetos sociais*. 1. ed. Viçosa: UFV, p. 370-380.

- Della Lucia, T.M.C., Moreira, D.D.O. (1993) Caracterização dos ninhos. *In: Della Lucia, T.M.C. (ed) As formigas cortadeiras*. Viçosa: UFV, p. 32-42.
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Moreira, D.D.O. (2001) Feromônios de formigas pragas. *In: Vilela, E.F., Della Lucia, T.M.C. (eds) Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, p. 73-82.
- Dicke, M., Sabelis, M.W. (1988) Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Functional Ecology*, 2: 131-139.
- Dunn, R., Messier, S. (1999) Evidence for the opposite of the dear enemy phenomenon in têmites. *Journal of Insect Behaviour*, 12: 461-464.
- Evershed, R.P., Morgan, E.D. (1980) A chemical study of the Dufour glands of two Attine ants. *Insect Biochemistry*, 10: 81-86.
- Evershed, R.P., Morgan, E.D. (1981) Chemical investigation of the Dufour glands contents of Attine ants. *Insect Biochemistry*, 11: 343-351.
- Forti, L.C., Moreira, A.A., Andrade, A.P.P., Castellani, M.A., Caldato, N. (2011) Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas-cortadeiras. *In: Della Lucia, T.M.C. (ed), Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa: UFV, p. 102-125.
- Fowler, H.G., Pereira-da-Silva, V., Forti, L.C., Saes, N.B. (1986) Population Dynamics of Leaf-Cutting Ants: A Brief Review. *In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (ed) Fire ants e leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder: Westview Press. p. 123-146.
- Francelino, M.R.V., Mendonça, A.L., Nascimento, R.R., Sant'Ana, A.E.G. (2006) The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens sexdens* and *Atta opaciceps* exhibit intercaste and intercolony variations. *Journal Chemical Ecology*, 32: 643-656.

- Gazal, V., Bailez, Omar, Viana-Bailez, A.M. (2009) Mechanism of host recognition in *Neodohrniphora elongata* (Brown) (Diptera: Phoridae). *Animal Behaviour*, 78: 1177-1182.
- Gomides, C.H.F., Della Lucia, T.M.C., Araújo, F.S., Moreira, D.D.O. (1997). Velocidad de forrajeo y área foliar transportada por la hormiga *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista de Biología Tropical*, 45: 1663-1667.
- Gonçalves, C.R. 1961. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomológica*, 4: 113-180.
- Gonçalves, C.R. 1964. As formigas cortadeiras. *Boletim do Campo*, 20: 17-23.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1977) Colony-specific territorial pheromone in the African weaver ant *Oecophylla longinoda* (Latreille). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 2072-2075.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1986) Nest area exploration and recognition in leaf cutting ants (*Atta cephalotes*). *Journal of Insect Physiology*, 32: 143-150.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The ants*. 1. ed. Massachusetts: Belknap Press. 732p.
- Hughes, W.O.H, Goulson, D. (2001) Polyethism and the importance of context in the alarm reaction of the grass-cutting ant, *Atta capiguara*. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 49: 503-508.
- Hughes, W.O.H., Howse, P.E., Goulson, D. (2001) Mandibular gland chemistry of grass cutting ants; species, caste and colony variation. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 109-124.

- Hughes, W.O.H., Sumner, S., Van Borm, S., Boomsma, J.J. (2003) Worker caste polymorphism has a genetic basis in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Proceedings of the National Academy of Science*, 100: 9394-9397.
- Human, K.G., Gordon, D.M. (1999) Behavioral interactions of the invasive Argentine ant with native ant species. *Insectes sociaux*. 46: 159-163.
- Jaffé, K. (1983) *Chemical communication among workers of leaf-cutting ants*. *Social insects in the Tropics*, Jaisson Ed. Univ. Paris Nord, v.2, 165-180.
- Jaffé, K. (1987) Evolution of territoriality and nestmate recognition systems in ants. *Experientia Supplementum, Behavior in Social Insects*, 54: 295-311.
- Jaffé, K., Bazire-Benazet, M., Howse, P.E. (1979) An integumentary pheromone secreting gland in *Atta* sp.: territorial marking with a colony specific pheromone in *Atta cephalotes*. *Journal of Insect Physiology*, 25: 833-839.
- Jaffé, K., Lopez, M.E., Aragort, W. (1986) On the communication systems of the ants *Pseudomyrmex termitarius* & *P. triplarinus*. *Insectes Sociaux*. 33: 105-117.
- Jaffé, K., Marcuse, M. (1983) Individual recognition and territorial behavior in the ant *Odontomachus bauri*. *Insectes Sociaux*, 30: 466-481.
- Jaffé, K., Marquez, M. (1987) On agonistic behavior among workers of the ponerine ant *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera: Formicidae). *Insectes Sociaux*, 34: 87-95.
- Jaffé, K., Navarro, J.B. (1985) Comunicacion quimica em obreras de la hormiga cortadora de pasto, *Acromyrmex landolti* Forel, 1884 (Hymenoptera, Formicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 29: 351-361.
- Jaffé, K., Puche, H. (1984) Colony-specific territorial marking with the metapleural gland secretion in the ant *Solenopsis geminata* (Fabr). *Journal of Insect Physiology*, 30: 265-270.

- Jaffé, K., Sanchez, C. (1984) Nestmate recognition and territorial behavior in the ant *Camponotus rufipes*. *Insectes Sociaux*, 31: 302-315.
- Jaffé, K., Villegas, G. (1985) On the communication systems of the fungus growing ant *Trachymyrmex urichi*. *Insectes Sociaux*, 32: 257-274.
- Krebs, J.R. (1971) Territory and breeding density in the great tit, *Parus major* L. *Ecology*, 52:2-22.
- Langen, T.A., Tripet, F., Nonacs, P. (2000) The red and the black: habituation and the dear-enemy phenomenon in two desert Pheidole ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 48: 285-292.
- Leston, D. (1973) The ant mosaic; tropical tree crops and the limiting of pests and diseases. *Pesticides Abstracts*. 19: 311-341.
- Macdonald, D.W. (1983) The ecology of carnivore social behaviour. *Nature* 301: 379-384.
- MacLean, S.F.Jr, Seastedt, T.R. (1979) Avian territoriality: sufficient resources or interference competition. *American Naturalist*, 114: 308-12.
- Majer, J.D. (1972) The ant mosaic em Ghana cocoa farms. *Bulletin of Entomological Research*, 62: 151-160.
- Mares, M.A., Lacher, T.E.Jr., Willig, M.R., Bitar, N.A., Adams, R., Klinger, A., Tazik, D. (1982) An experimental analysis of social spacing in *Tamias striatus*. *Ecology*, 63: 267-73.
- Mayhé-Nunes, A.J. (1991) *Estudo de Acromyrmex (Hymenoptera, Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: Subsídios para uma análise filogenética*. Tese (Mestrado em Entomologia) - Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 122p.

- Mercier, J.L., Lenoir, A., Dejean, A. (1997) Ritualised versus aggressive behaviours displayed by *Polyrhachis laboriosa* (F. Smith) during intraspecific competition. *Behavioural Processes*, 41: 39-50.
- Moreira, D.D.O., Della Lucia, T.M.C. (1993) Duração do feromônio de trilha de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e sua capacidade de atração em diferentes concentrações. *Revista Árvore*, 17: 202-212.
- Moreira D.D.O., Viana Bailez, A.M., Erthal Jr., M., Bailez, O.E., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2010) Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1665-1670.
- Nascimento, R.R., Morgan, E.D., Billen, J., Schoeters, E., Della Lucia, T.M.C., Bento, J.M.S. (1993) Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 907-918.
- Nordlund, D.A., Lewis, W.J. (1976) Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2: 211-220.
- Norman, M.D., Jones, G.P. (1984) Determinants of territory size in the pomacentrid reef fish, *Parma victoriae*. *Oecologia*, 61: 60-69.
- Pereira, R.C., Moreira, D.D.O., Della Lucia, T.M.C. (1995) Descrição morfológica da glândula de veneno de *Acromyrmex subterraneus molestans* Santschi, 1925 (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Biológica Leopoldensia*, 17: 81-86.
- Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165: 216-224.

- Peters, F.T., Maurer, H.H. (2002) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology. *Accred. Qual. Assur.* 7, 441-450.
- Porter, S.D., Jorgensen, C.D. (1981) Foragers of the harvester ant, *Pogonomyrmex owyheei*: a disposable caste? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 9: 247-256.
- Quirán, E.M. (1998) Hormigas cortadoras en Argentina. *In*: Berti Filho, E., Mariconi, F.A.M., Fontes, L.R. (eds) Anais do Simpósio sobre formigas cortadeiras do cone sul. p. 57-75.
- Salzemann, A., Jaffé, K. (1990) On the territorial behaviour of field colonies of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Journal of Insect Physiology*, 36: 133-138.
- Salzeman, A., Jaffé, K. (1990) Territorial ecology of the leaf-cutting ant, *Atta laevigata*. *In*: Vander Meer R.K., Jaffé K., Cedeno A. (eds) *Applied myrmecology. A world perspective*. Westview Press, Boulder, CO, pp 345-354.
- Salzemann, A., Jaffé, K. (1991) Polyethisme et defense de la société chez la fourmi champignoniste *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux*, 38: 149-159.
- Salzemann, A., Nagnan, P., Tellier, F. Jaffé, K. (1992) Leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Formicidae: Attini) marks its territory with colony-specific dufour gland secretion. *Journal of Chemical Ecology*, 18: 183-196.
- Schmid-Hempel, P., Schmid-Hempel, R. (1984) Life duration and turn-over of foragers in the ants *Cataglyphis bicolor* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 31: 345-360.
- Shabir, G.A. (2003) *Journal of Chromatography A*, 987: 57.

- Souza, D.J., Della Lucia, T.M.C., Errard, C., Richard, F.-J., Lima, E.R. (2006) Behavioural and chemical studies of discrimination processes in the leaf-cutting ant *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* (Forel, 1908). *Brazilian Journal of Biology*, 66: 863-871.
- Traniello, J.F.A. (1989) Foraging strategies of ants. *Annual Review Entomology*, 34: 191-210.
- Tschinkel, W.R., Adams, E.S., Macom, T. (1995) Territory area and colony size in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal Animal Ecology*, 64: 473-480.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA) (2001) *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*.
- Vasconcelos, H.L., Cherrett, J.M. (1997) Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on tree seedling establishment. *Journal of Tropical Ecology*, 13: 357-370.
- Viana, A.M.M., Frézard, A., Malosse, C., Della Lucia, T.M.C., Errard, C., Lenoir, A. (2001) Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology*, 11: 29-36.
- Viana-Bailez, A.M., Bailez, O., Malaquias, K.S. (2011) Comunicação química em formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C. (ed) *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa: Ed. UFV. p. 141-164.
- Vieira-Neto, E., Mundim, F., Vasconcelos, H. (2006) Hitchhiking behaviour in leaf-cutter ants: An experimental evaluation of three hypotheses. *Insectes Sociaux*, 53: 326-332.
- Vilela, E.F. (1983) *Behavior and control of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Attini)*. PhD thesis, University of Southampton, Southampton, 209p.

- Vilela, E.F., Della Lucia, T.M.C. (1987) *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 1. ed. Viçosa: Holos, 155p.
- Vilela, E.F., Howse, P.E. (1986) Territoriality in leaf-cutting ants, *Atta* spp. In: Lofgren, C.S., Vander Meer, R.K. (eds) *Fire ants and leaf-cutting ants*. Biology and management. Boulder: Westview Press. p. 159-171.
- Waddington, S.J., Hughes, W.O.H. (2010) Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*, the role of worker size, age and plasticity. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64: 1219-1228.
- Whitehouse, M.E.A., Jaffé, K. (1995) Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Insectes Sociaux*, 42: 157-166.
- Whitehouse, M.E.A., Jaffé, K. (1996). Ants wars: combat strategies, territory and nest defense in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Animal Behaviour*, 51: 1207-1217.
- Wilson, E.O. (1962) Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima*. *Animal Behaviour*, 10: 134-164.
- Wilson, E.O. (1971) *The Insect Societies*. Harvard University Press. Cambridge. MA. 548p.
- Wilgenburg, E.V., Clémencet, J., Tsutsui, N.D. (2010) Experience influences aggressive behaviour in the Argentine ant. *Biology Letters*, 6: 152-155.
- Ydenberg, R.C., Giraldeau, L.A., Falls, J.B. (1998) Neighbors, strangers and the asymmetric war of attrition. *Animal Behaviour*, 36: 343-347.

6. APÊNDICES

A. 1. CONTINUAÇÃO DOS RESULTADOS DO TRABALHO

3.2. POLIMORFISMO NO COMPORTAMENTO DE MARCAÇÃO DE TERRITÓRIO EM *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

3.2.1. Validação do método cromatográfico:

Para um método quantitativo apresentar boa linearidade, em matrizes biológicas, é necessário que o valor do coeficiente de correlação (R^2) seja superior a 0,99. Nesse trabalho, os valores obtidos para esses coeficientes são superiores a esse mínimo, indicando que os modelos lineares estão bem ajustados (Tabela 1).

Tabela 1. Linearidade e Sensibilidade para os padrões em estudo.

Padrão	Linearidade	Equação de ajuste	R²	LD (ng)	LQ (ng)
Hexadecano	0.1-2000	$y=(0.00408\pm 0.0001)x + (0.95\pm 0.05)$	0.99777	0.14	0.45
Octadecano	0.1-2000	$y=(0.00152\pm 0.00004)x + (0.30\pm 0.02)$	0.99827	0.15	0.46
Eicosano	0.1-2000	$y=(0.00455\pm 0.00007)x - (0.07\pm 0.03)$	0.99896	0.15	0.45
Docosano	0.1-2000	$y=(0.00258\pm 0.00005)x + (0.54\pm 0.02)$	0.99828	0.11	0.46
Tetracosano	0.1-2000	$y=(0.00087\pm 0.00001)x + (0.3\pm 0.01)$	0.99928	0.13	0.36
Hexacosano	0.1-2000	$y=(0.044\pm 0.001)x - (1.4\pm 0.5)$	0.99712	0.11	0.31
Octacosano	0.1-2000	$y=(0.00459\pm 0.00004)x + (0.11\pm 0.03)$	0.99955	0.11	0.32
Triacotano	0.1-2000	$y=(0.00465\pm 0.00005)x + (0.06\pm 0.04)$	0.99923	0.13	0.40
Dotriacotano	0.1-2000	$y=(0.00099\pm 0.00006)x - (0.17\pm 0.02)$	0.99826	0.19	0.55
Tetratriacontano	0.1-2000	$y=(0.00368\pm 0.00003)x + (0.46\pm 0.03)$	0.99934	0.18	0.56
Hexariacontano	0.1-2000	$y=(0.00107\pm 0.00001)x + (0.33\pm 0.01)$	0.99812	0.14	0.46
Octatriacontano	0.1-2000	$y=(0.00804\pm 0.00008)x + (1.95\pm 0.03)$	0.99854	0.18	0.49

*LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação.

Tabela 2. Precisões intra-dia e inter-dia para os extratos glandulares da espécie em estudo.

Analitos (constituintes glandulares)	Concentração (n° glândulas)	Precisão Intra-dia (%CV)	Precisão Inter-dia (%CV)
Hexadecano	10	5.87	3.15
	20	3.44	2.94
	30	2.51	2.99
Octadecano	10	4.02	4.05
	20	4.67	4.89
	30	3.94	4.23
Eicosano	10	2.94	4.81
	20	3.65	3.99
	30	2.90	3.94
Docosano	10	3.56	3.84
	20	4.57	2.45
	30	4.10	2.59
Tetracosano	10	2.34	4.92
	20	4.59	3.95
	30	3.55	4.86
Hexacosano	10	3.67	3.95
	20	3.95	3.95
	30	3.02	2.99
Octacosano	10	2.68	2.84
	20	2.94	1.56
	30	3.05	2.93
Triacotano	10	2.94	2.93
	20	3.91	2.88
	30	3.94	3.65
Dotriacotano	10	4.06	3.13
	20	4.02	3.95
	30	4.44	3.04
Tetratriacontano	10	4.32	3.47
	20	4.67	4.58
	30	4.85	4.10
Hexatriacontano	10	4.81	3.56
	20	3.56	3.61
	30	3.95	3.04
Octatricotano	10	4.20	3.69
	20	4.07	4.33
	30	3.95	4.27