

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE HIDROCARBONETOS  
CUTICULARES DA RAINHA DE *Atta sexdens*  
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

**JHONATTAN RODRÍGUEZ GUERRERO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO – 2019

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE HIDROCARBONETOS  
CUTICULARES DA RAINHA DE *Atta sexdens*  
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

**JHONATTAN RODRÍGUEZ GUERRERO**

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 Doutorado em Produção Vegetal

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Matoso Viana Bailez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
Julho – 2019

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

G934 Guerrero, Jhonattan Rodriguez.

Caracterização do perfil de hidrocarbonetos cuticulares da rainha de *Atta sexdens* (Hymenoptera : Formicidae) / Jhonattan Rodriguez Guerrero. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

85 f. : il.  
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.  
Orientadora: Ana Maria Matoso Viana Bailez.

1. Ecologia química. 2. Formigas-cortadeiras. 3. Comunicação química. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

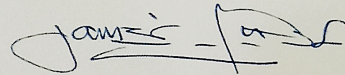
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE HIDROCARBONETOS  
CUTICULARES DA RAINHA DE *Atta sexdens*  
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

JHONATTAN RODRÍGUEZ GUERRERO

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 Doutorado em Produção Vegetal

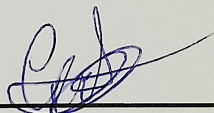
Aprovada em 22 de julho de 2019

Comissão Examinadora:



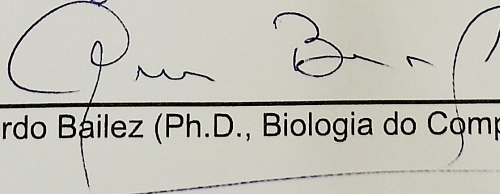
---

Prof. James Montoya Lerma (Ph.D., Parasitologia Médica) – Univalle - Colômbia



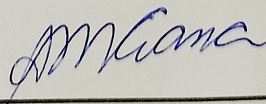
---

Prof.<sup>a</sup> Gerson Adriano Silva (D.Sc., Entomologia) - UENF



---

Prof. Omar Eduardo Bailez (Ph.D., Biologia do Comportamento) - UENF



---

Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Viana Bailez (Ph.D., Biologia do Comportamento) - UENF  
(Orientadora)



## AGRADECIMENTO

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro;

À minha orientadora professora Ana Maria Viana Bailez pela orientação, confiança e oportunidade a mim destinada;

Ao LCQUI em especial à professora Maria Cristina Canela pela colaboração, orientação e pelos equipamentos de cromatografia, essenciais no desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Moacir Rossi Forim e a Marília Silva Pires do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pelas análises de amostras e contribuição na qualidade da pesquisa;

Ao professor José Mauricio Simões Bento do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da ESALQ-USP, e sua equipe pela colaboração nas análises de amostras;

A todos os membros da banca examinadora pelas sugestões no sentido de melhorar a qualidade do trabalho;

A Anália, Jean, Renata e demais colegas do laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos do LEF;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Formação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares.....	6
2.2. Alterações no reconhecimento de companheiras.....	7
2.3. Feromônio de rainha.....	8
3. TRABALHOS.....	10
3.1 PRIMEIRO REGISTRO DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE RAINHA DE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA: FORMICIDAE .....	10
RESUMO .....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS .....	14
RESULTADOS .....	17
DISCUSSÃO.....	21

REFERÊNCIAS.....	25
3.2 HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE MACHOS E FÊMEAS DE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA : FORMICIDAE).....	34
RESUMO .....	34
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	38
RESULTADOS .....	40
DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS .....	45
3.3. VARIAÇÃO TEMPORAL DO PERFIL DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES EM RAINHAS JOVENS DE <i>Atta sexdens</i> (HYMENOPTERA : FORMICIDAE).....	51
RESUMO .....	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS .....	55
RESULTADOS .....	58
DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIAS .....	64
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## RESUMO

RODRÍGUEZ, Jhonattan, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2019. Caracterização do perfil de hidrocarbonetos cuticulares da rainha de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Viana-Bailez.

As colônias de formigas-cortadeiras de folhas, assim como outros insetos sociais, funcionam como uma unidade social coerente e organizada, na qual milhões de indivíduos realizam diferentes tarefas. Nas formigas-cortadeiras, a reprodução é feita unicamente pela rainha e se desconhece como acontece a regulação da mesma sobre as operárias no interior do ninho, porém é possível que sinais químicos sejam usados. Esta é a primeira pesquisa desenvolvida com o objetivo de identificar o perfil químico da rainha de *Atta sexdens* e conhecer como a presença da rainha é comunicada dentro da colônia. Foram coletadas rainhas jovens (virgens e acasaladas) e machos de *A. sexdens* durante as revoadas de 2017 e 2018. Com a finalidade de comparar os perfis químicos, também foram analisadas rainhas maduras e operárias obtidas de colônias criadas em laboratório. Os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de operárias e rainhas foram preparados e analisados através de cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (CG-EM). O perfil químico de rainhas apresentou uma grande diversidade de hidrocarbonetos metilados quando comparadas com as operárias. As rainhas maduras apresentaram um perfil químico dominado por metil ésteres que



representaram mais do 60% da proporção relativa dos compostos identificados. Por sua parte, os machos apresentaram compostos exclusivos na sua cutícula, que podem estar relacionados com seu reconhecimento no interior da colônia. As operárias se caracterizaram por apresentar compostos de menor massa molecular e maior diversidade de alcanos. Os resultados permitem identificar uma diferenciação da casta reprodutiva dentro de *A. sexdens*. Alguns compostos exclusivos das rainhas permitem fazer inferências sobre sua relação com a fertilidade e reconhecimento como indivíduo reprodutor dentro da colônia. Esta investigação abre as portas para o desenvolvimento de futuras pesquisas encaminhadas à caracterização do feromônio de rainha das formigas-cortadeiras e sua aplicabilidade dentro de estratégias de controle amigáveis com o meio ambiente.

## ABSTRACT

RODRÍGUEZ, Jhonattan, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July, 2019. Characterization of the cuticular hydrocarbons profile of *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Advisor: Professor Ana Maria Viana-Bailez.

Leaf-cutting ant colonies, like other social insects, function as a coherent and organized social unit in which millions of individuals perform different tasks. In leaf-cutting ants, reproduction is done only by the queen and it is not known how it regulates the workers inside the nest, but chemical signals may be used. This is the first research developed to identify the chemical profile of the queen of *Atta sexdens* and to know how the queen's presence is communicated within the colony. Young queens (virgin and mated) and male of *A. sexdens* were collected during the 2017 and 2018 flights mating. In order to compare chemical profiles, mature and worker queens obtained from laboratory-reared colonies were also analyzed. Worker and queen cuticular hydrocarbon profiles were prepared and analysed by mass spectrometer coupled gas chromatography (GC-MS). The chemical profile of queens presented a great diversity of methylated hydrocarbons when compared to the workers. Mature queens presented a chemical profile dominated by methyl esters that represented more than 60% of the relative proportion of the identified compounds. On the other hand, the males presented unique compounds in their cuticle, which may be related to their recognition within the colony. The workers were characterized by having a lower molecular weight compound and greater

alkane diversity. The results allow to identify a differentiation of the reproductive caste within *A. sexdens*. Some exclusive compounds of queens make inferences about their relationship to fertility and recognition as a reproductive individual within the colony. This research opens the door for further research on the characterization of queen pheromone of leaf-cutting ants and its applicability within environmentally friendly control strategies.

## 1. INTRODUÇÃO

As colônias de formigas cortadeiras de folhas, assim como outros insetos sociais, funcionam como uma unidade social organizada, na qual diferentes grupos de indivíduos realizam tarefas específicas. O sucesso destes insetos está baseado em um sistema de comunicação bem desenvolvido e uma sofisticada regulação social (Le Conte e Hefetz, 2008). A comunicação química é o eixo central do funcionamento das colônias, que através do reconhecimento de diferentes compostos permite às formigas discriminar as companheiras do ninho (Hölldobler e Wilson, 2011; Monnin, 2006; Guerreri et al., 2009), reconhecer o local para coletar alimento (Monnin, 2006) e até inibir a reprodução de operárias (Endler et al., 2004; Le Conte e Hefetz, 2008; van Oystaeyen et al., 2014; Motais de Narbonne et al., 2016).

O uso dos hidrocarbonetos cuticulares (HC) dentro do sistema de reconhecimento nas formigas tem sido amplamente estudado (Howard e Blomquist, 2005; d'Etorre e Lenoir, 2010). As formigas usam os HC para reconhecer as companheiras do ninho e assim garantir que os recursos sejam utilizados exclusivamente pelos membros da colônia (Nehring et al., 2011). Além de identificar as operárias da colônia, o perfil de HC parece estar relacionado com a distribuição de tarefas desenvolvidas pelas subcastas no interior do ninho (Wagner et al., 2001; Valadares e do Nascimento, 2016). Os HC permitem às operárias também



reconhecer a rainha e o seu nível de fertilidade (d’Ettorre, 2004; Smith et al., 2009; Holman et al., 2010).

Na maioria das espécies de formigas, a oviposição é uma tarefa exclusiva da rainha e se relaciona com o perfil de HC específico. Não existe ainda um consenso se o perfil químico das rainhas é conservado na filogenia ou não (Villalta et al., 2018). Alguns estudos demonstram que existem alguns compostos altamente conservados através dos gêneros, o que sugere que o feromônio de rainha deriva de um sistema de comunicação ancestral (Smith et al., 2013; van Oystaeyen et al., 2014; Oi et al., 2016). Porém, isso não é observado em todas as formigas. Evinson et al., (2012) encontraram que sinais associados com o status reprodutivo das rainhas de morfoespécies de *Pachycondyla verenae* são diferentes entre populações geograficamente separadas. Por sua vez, Smith et al., (2016) encontraram que os HC que distinguem as rainhas do gênero *Odontomachus* não são conservados.

Duas hipóteses têm sido amplamente discutidas para explicar os possíveis cenários evolutivos nos quais se desenvolveram os sinais químicos das rainhas (Amsalem et al., 2015; Smith e Liebig, 2017). Na primeira hipótese o feromônio da rainha atua como inibidor do desenvolvimento dos ovários das operárias (Holman et al., 2010, 2013; Smith e Liebig, 2017). Esse feromônio é percebido por contato direto com a rainha ou com seus ovos (Ebie et al., 2015). Holman et al., (2010) observaram que as rainhas (e seus ovos) de *Lasius niger* possuem grandes quantidades de 3-MeC<sub>31</sub>. Este composto afeta negativamente o desenvolvimento dos ovários das operárias. Neste cenário evolutivo, prevê-se uma corrida armamentista entre rainha (dominante) e operárias (subordinadas) (Le Conte e Hefetz, 2008). A outra hipótese prediz que o feromônio da rainha é um “sinal honesto de fertilidade”, onde o perfil de HC da rainha representa um sinal de dominância e as operárias respondem ajudando com o cuidado das crias (Amsalem et al., 2015). Neste caso, o perfil de HC indica a fertilidade do indivíduo e sua capacidade de colocar ovos (Liebig et al., 2000; Smith e Liebig, 2017). O composto (Z)-9-Nonacosene é considerado um sinal de fertilidade das rainhas de *Odontomachus brunneus* (Smith et al., 2012; 2013). Já as gamergates de *Dinoponera quadriceps* se caracterizam por altos níveis de 9-MeC<sub>31</sub> na sua cutícula (Peeters et al., 1999; Monnin e Ratnieks, 2001).

Nas formigas cortadeiras é pouco o conhecimento que se tem sobre o feromônio da rainha. Bento (1983) observou que a rainha de *Atta sexdens rubropilosa* é atrativa às operárias da sua própria colônia, mas nada se sabe sobre a composição do seu perfil de HC. Dijkstra et al., (2005) observaram que operárias de *Atta* e *Acromyrmex* que permanecem perto da rainha têm o aparelho reprodutor desenvolvido e colocam ovos tróficos, porém as operárias que desenvolvem tarefas fora do ninho (forrageiras) têm o aparelho reprodutor inativo e pouco desenvolvido. Dessa forma, é provável que o “feromônio da rainha” estimule a produção de ovos nas operárias mais próximas. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho é identificar e analisar o perfil de HC da casta reprodutiva de *A. sexdens*. A partir dos dados são feitas inferências sobre a relação de alguns compostos e o status reprodutivo das rainhas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os insetos apresentam diferentes níveis de organização social, desde as espécies solitárias, cujos indivíduos interagem apenas na reprodução, até as espécies sociais, que possuem grandes colônias persistentes constituídas por indivíduos agrupados em castas, que executam tarefas específicas (Wilson 1980; Leonhardt et al., 2016). As colônias de formigas, assim como de outros insetos sociais, possuem uma auto-organização caracterizada por uma regulação social sofisticada e comunicação bem desenvolvida (Le Conte e Hefetz, 2008).

A comunicação entre os membros da colônia é necessária para identificar os integrantes do ninho, coordenar as atividades e identificar o papel de cada indivíduo dentro da sociedade (Richard et al., 2013). Essa comunicação, em formigas, ocorre por meio de hidrocarbonetos da cutícula, os quais protegem os insetos da dessecação e funcionam como barreira contra microrganismos (Howard e Blomquist, 2005; Gibbs e Rajpurohit, 2010; Menzel et al., 2018). Os hidrocarbonetos cuticulares (HC) são sintetizados pelos enócitos associados com células da epiderme ou células da periferia de corpos gordurosos e depois são transportados pela lipoforina, via hemolinfa (Bagnères e Blomquist, 2010). Os HC, nas formigas, estão representados por alcanos e alcenos (Martin e Drijfhout, 2009), os quais variam pela adição de grupos metila ou posição das duplas ligações, respectivamente (Jackson e Morgan, 1993). Essas modificações nas cadeias são

responsáveis pela diversidade e complexidade dos perfis de HC (Nascimento et al., 2012).

O perfil de HC é diferente entre espécies (Martin et al., 2008), colônias (Dahbi et al., 1996; Martin et al., 2008) e castas (Martin e Drijfhout, 2009; Valadares e do Nascimento, 2016). O reconhecimento dos indivíduos não depende de um único composto, geralmente é preciso uma mistura complexa de hidrocarbonetos para fazer uma adequada discriminação (Boomsma e Frank, 2006). Formigas forrageadoras de *Pogonomyrmex barbatus* têm uma maior proporção de alcanos na sua cutícula, quando comparadas com as demais operárias (Wagner et al., 1998). No caso da rainha ou indivíduos férteis, compostos únicos podem ser suficientes para sua discriminação (d’Ettorre e Lenoir, 2010; Sturgis et al., 2012). Na formiga *Pachycondyla inversa* o hidrocarboneto 3,11-DiMeC<sub>27</sub> é abundante na cutícula da rainha (Heinze et al., 2002; d’Ettorre et al., 2004). Nos ovos colocados pela rainha e “gamergates” da formiga *Herpegnathos saltator* foram encontrados alguns compostos também presentes no perfil cuticular, mas diferentes dos encontrados nas demais formigas, sendo o composto 13,23-DiMe-C<sub>37</sub> exclusivo das formigas reprodutivas (Liebig et al., 2000).

As formigas-cortadeiras cultivam o fungo *Leucocoprinus gongylophorus* para alimentar as formas imaturas e a rainha. Alguns estudos encontraram que as formigas possuem na sua cutícula todos os compostos encontrados no fungo simbiote, porém não todos os compostos achados no fungo simbiote estão presentes nas formigas (Viana et al., 2001; Lambardi et al., 2007; Richard et al., 2007a; 2007b). Richard et al., (2007a) encontraram que o fungo simbiote possui alguns compostos específicos dependendo da espécie de formiga com a qual esteja associado. Richard et al., (2007b) acharam que o fungo cultivado por colônias de *Acromyrmex octospinosus* e *Ac. echinator* tem os mesmos compostos, porém em quantidades diferentes em ambas as espécies. Viana et al., (2001) propõem que o fungo é um membro da colônia e pode participar da formação do odor colonial.

## **2.1. Formação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares**

Existem dois modelos que explicam a criação do “odor” ou da identidade da colônia: Modelo Individualista, onde cada membro da colônia mantém seu



próprio odor (geneticamente determinado) e assim é reconhecido (Lenoir et al., 2001) e o Modelo Gestalt, proposto para colônias populosas, onde todos os indivíduos dentro da colônia compartilham seus sinais para formar um só odor colonial (Crozier e Dix, 1979). d'Ettorre e Lenoir (2010) propõem uma explicação ao reconhecimento dos membros da colônia através do modelo *U-present* (indivíduo não desejado presente). Neste modelo, as formigas estão habituadas ao odor da sua colônia e respondem de maneira individual a sinais não reconhecidos. Os sinais são recebidos pelas antenas e se os receptores neuronais não são ativados por eles, então a formiga é membro da colônia. Se os receptores são ativados a resposta é proporcional à dissimilaridade com o odor colonial.

As formigas continuamente compartilham hidrocarbonetos através de diferentes vias. A trofalaxia permite que HC passem da glândula pós-faringiana para a glândula pós-faringiana de sua companheira. Durante a limpeza das companheiras do ninho, os HC passam da cutícula de um indivíduo para a glândula pós-faringiana do outro (Soroker et al., 1995; Soroker e Hefetz, 2000; Morgan, 2008). Desta maneira, o perfil químico das formigas é continuamente modificado, qualitativa e quantitativamente, pelas sucessivas trocas, o que torna o perfil de HC dinâmico no tempo (Soroker e Hefetz, 2000). Os perfis de HC são influenciados pela temperatura e umidade (Menzel et al., 2018), químicos (Marinho et al., 2008) e genéticos (Silverman e Liang, 2001; van Zweden et al., 2010; Martin et al., 2012). Além disso, o perfil de HC também muda conforme o indivíduo envelhece (Cuvillier-Hot et al., 2001).

A glândula pós-faringiana está presente em formigas e algumas espécies de vespas (Viera e Bueno, 2015). Localiza-se na parte dorsal entre a faringe e o esôfago (Hölldobler e Wilson, 2011). Diferentes hipóteses sobre a função da glândula foram propostas, uma delas é que atua como reservatório de hidrocarbonetos, tanto exógenos como endógenos, para criar o odor característico da colônia (Soroker et al., 1995; Leonhardt et al., 2007). Essa glândula tem comunicação com a cavidade bucal, e isto possibilita o ingresso de hidrocarbonetos obtidos durante a trofalaxia ou a limpeza das companheiras (Soroker et al., 1995; Soroker e Hefetz, 2000).

## 2.2. Alterações no reconhecimento de companheiras

O isolamento de operárias da colônia afeta o reconhecimento destas como membros da colônia. Whitehouse e Jaffé (1995) observaram que formigas isoladas por 24 horas tiveram uma menor capacidade de reconhecimento. As operárias da *Ac. octospinosus* e *Ac. echinator* (Richard et al., 2007b) desencadeiam comportamentos agressivos contra suas companheiras depois de oito dias de isolamento. Em *Camponotus fellah* (Boulay et al., 2000) e *Formica aquilona* (Sorvari et al., 2007) o isolamento de operárias gera um maior nível de agressão entre companheiras de ninho.

A dieta alimentar é outro fator que afeta o reconhecimento entre as operárias. Richard et al., (2004) mostraram que formigas de colônias sem rainha da *Ac. subterraneus subterraneus*, provenientes de um mesmo ninho, apresentam comportamentos agressivos quando alimentadas com diferentes dietas. Valadares et al., (2015) observaram o mesmo fenômeno em colônias da *A. sexdens rubropilosa*. Em ambos os casos a agressão foi atribuída a diferenças no perfil de HC. Silverman e Liang (2001) indicaram que colônias vizinhas de *Linepithema humile* têm acesso às mesmas presas e seus perfis de HC são similares, porém quando receberam diferentes dietas o comportamento agressivo entre os ninhos aumentou. Sorvari et al., (2007) observaram que pequenos formigueiros da *F. aquilona* que receberam diferentes dietas apresentaram diferentes perfis de HC e o grau de agressão foi maior entre formigas com os perfis mais divergentes.

O componente principal da dieta das formigas cortadeiras é material vegetal com o qual cultivam o fungo. Geralmente as formigas evitam plantas que contêm metabólitos secundários que possam afetar o fungo. Marsaro et al., (2004) reportaram que o composto  $\beta$ -eudesmol, presente nas folhas de *Eucalyptus maculata*, causa agressão nas operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Posteriormente, Marinho et al., (2008) observaram que o comportamento de agressão é originado porque o sistema de reconhecimento dos HC nas operárias é afetado.

### 2.3. Feromônio da rainha

Um fator essencial para o funcionamento das colônias de insetos sociais é a habilidade da rainha para comunicar sua presença e saúde (Grüter e Keller, 2016). Em colônias pequenas, a presença da rainha pode ser percebida através da interação física com as operárias (Olejarz et al., 2017). Em colônias maiores, a presença da rainha é comunicada de maneira direta (HC) e indireta, através de hidrocarbonetos da rainha que são depositados na cutícula dos ovos (Endler et al., 2004; Helanterä et al., 2014). O sinal químico da rainha atrai as operárias (Bento, 1983; Dietemann et al., 2003) e em alguns casos, pode inibir a maturação dos seus ovários (Endler et al., 2004; Holman et al., 2010; Van Oystaeyen et al., 2014). A ausência do sinal da rainha geralmente é associado à morte e desencadeia mudanças no interior do ninho, como o desenvolvimento de novas rainhas ou ativação do aparelho reprodutor das operárias (Dijkstra et al., 2005; Dijkstra e Boomsma, 2006; Camargo et al., 2007; Smith et al., 2007; Grüter e Keller, 2016).

Existem duas hipóteses que explicam o efeito do feromônio da rainha sobre as operárias. A hipótese da “manipulação da rainha” sugere que o feromônio da rainha tem um efeito sobre a fisiologia das operárias, e ocasiona a inativação de seus ovários (Kocher e Grozinger, 2011). Neste cenário, prevê-se uma concorrência pela reprodução entre rainha (dominante) e operárias (subordinadas) (Le Conte e Hefetz, 2008), o que resulta evolutivamente instável e muito difícil de manter (Keller e Nonacs, 1993). A segunda hipótese, “o sinal honesto” sugere que o feromônio da rainha atua como um sinal indicador de fertilidade para as operárias, as quais abandonam sua reprodução e cooperam com o cuidado de suas irmãs (Keller e Nonacs, 1993; Heinze e d’Ettorre, 2009). Neste caso, o fitness das operárias incrementa pela cooperação com uma rainha fértil e reflete uma situação evolutiva estável por que os interesses da rainha e operárias estão alinhados (Keller e Nonacs, 1993).

Os ninhos de formigas-cortadeiras do gênero *Atta* podem conter milhões de indivíduos e pouco se conhece sobre a comunicação no interior dele. Os estudos feitos, até agora, mostram que as operárias têm a capacidade de reconhecer sua rainha (Bento, 1993) e que sua ausência desencadeia a reprodução das operárias (Dijkstra e Boomsma, 2006) e a adoção de uma nova rainha (Sotelo et al., 2015). Valadares e do Nascimento (2016) reportaram que a divisão de tarefas se relaciona

com diferentes perfis de HC nas operárias. Por sua parte, Richard et al., (2007b) descobriram que o fungo simbiote de *A. colombica* tem maior diversidade de compostos que as operárias. Estes autores propõem que os HC nas formigas cortadeiras são transferidos entre as operárias quando fazem a limpeza do fungo simbiote e companheiras, porém não é claro se eles são produzidos pelo fungo e passam para as formigas ou vice e versa. Por outro lado, se desconhece o perfil químico da rainha e como é difundido em colônias tão grandes, onde geralmente as câmaras de criação se encontram restringidas a uma área do ninho e nem todas as formigas conseguem ter contato com a câmara da rainha. É importante verificar se nas colônias de formigas-cortadeiras o fungo é um membro a mais do grupo e pode ter um papel crucial na comunicação de sinais entre as formigas.

### 3. TRABALHOS

#### 3.1 PRIMEIRO REGISTRO DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE RAINHA DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

##### RESUMO

A divisão das tarefas é uma das principais características dos insetos sociais. A presença da rainha é comunicada para os outros membros da colônia por interação direta rainha/operária ou por meio de sinais químicos. Estudos realizados com diferentes espécies de formigas têm demonstrado a relação entre compostos químicos na cutícula da rainha e sua fertilidade. Nas formigas cortadeiras é desconhecida a composição do feromônio da rainha e a estratégia de comunicação dentro da colônia. Neste trabalho foram realizadas análises quantitativas e qualitativas do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas de *Atta sexdens*. 12 rainhas coletadas durante a revoada, quatro rainhas maduras e operárias tomadas de ninhos mantidos foram usadas para análises químicas. Extratos cuticulares das rainhas jovens e maduras, assim como de operárias

medianas foram analisados mediante CG-EM. Um total de 51 compostos foi encontrado na cutícula das formigas analisadas. A cutícula da rainha contém uma diversidade grande de alcanos ramificados e uma menor variedade de alcanos lineares. A presença exclusiva do Ácido Dodecanoico octadecil ester e Ácido Tetradecanoico eicosil ester, na cutícula das rainhas maduras sugere uma relação destas substâncias com a fertilidade das rainhas. É preciso de mais estudos para identificar se esses compostos têm efeitos sobre outros membros da colônia.

#### ABSTRACT

The division of tasks is one of the main characteristics of social insects. The presence of the queen is communicated to the other members of the colony by direct interaction queen/worker, or by chemical signals. Several studies carried out with different species of ants have demonstrated the relation between chemical compounds from the queen's cuticle and its fertility. In the leafcutter ants, it is unknown the pheromone composition of the queen, and their role in the communication inside the colony. In this work, quantitative and qualitative analyses of the cuticular hydrocarbons of *Atta sexdens* queens were performed. Twelve queens collected in the field during the mating flight, four mature queens taken from nests reared in laboratory conditions and worker ants taken from the same nests were used for chemical analyses. The cuticular extracts from young queens, mature queens and medium worker were analysed using GC-MS. A total of 51 compounds were found in the cuticle of worker ants and the queens. The cuticle of the queens showed a great diversity of branched alkanes, and a smaller variety of linear alkanes. The worker ant cuticle contained a higher concentration of linear alkanes. The exclusive presence of the dodecanoic acid octadecyl ester and tetradecanoic acid eicosyl ester, in the cuticle of mature queens, suggest a possible relation of these compounds with queen fertility. Further research is needed to investigate if these compounds have pheromonal properties on the other member of the colony.

## INTRODUÇÃO

Os insetos têm diferentes níveis de organização social, desde espécies solitárias com indivíduos que se encontram somente na época de reprodução, até espécies sociais com colônias persistentes constituídas por centenas de indivíduos (Leonhardt et al., 2016). As colônias de insetos eussociais exibem um alto nível de auto-organização (Le Conte e Hefetz, 2008) baseado na divisão de tarefas e defesa dos recursos (Rossi et al., 2019), além de uma comunicação bem desenvolvida (Le Conte e Hefetz 2008). Nas formigas, a comunicação é realizada por meio de hidrocarbonetos cuticulares (HC) (Bos e d’Ettorre, 2012; Monnin, 2006; Richard e Hunt, 2013), que servem principalmente para proteger os insetos da dessecação (Gibbs e Rajpurohit, 2010; Howard e Blomquist, 2005; Menzel et al., 2018). Os HC são sintetizados pelos enócitos associados com células da epiderme ou células da periferia de corpos gordurosos e depois transportados pela lipoforina, via hemolinfa (Bagnères e Blomquist, 2010). Os HC, nas formigas, estão representados por alcanos de cadeias simples ou ramificadas (Martin e Drijfhout, 2009) e alcenos, os quais variam pela adição de grupos metilo ou posição das duplas ligações (Jackson e Morgan 1993). Essas modificações nas cadeias são responsáveis pela diversidade e complexidade dos perfis de HC (Nascimento et al., 2012). Os HC permitem às formigas reconhecer as companheiras do ninho (Berthelot et al., 2017; Guerrerri et al., 2009), identificar o lugar para coletar alimento (Monnin, 2006), reconhecer o status reprodutivo da rainha e outros membros da colônia (d’Ettorre et al., 2004; Heinze et al., 2002; Holman et al., 2010; Peeters et al., 1999; Smith et al., 2009; Smith e Liebig, 2017).

O reconhecimento das companheiras através de sinais químicos é uma das características principais dos insetos sociais (Bos e d’Ettorre, 2012; Lahav et al., 1999; Lenoir et al., 2001), que permitiu a evolução e manutenção do seu comportamento social (d’Ettorre e Lenoir, 2010; Rossi et al., 2019). O reconhecimento das companheiras é muito importante para garantir que os recursos sejam restritos aos membros da colônia (Nehring et al., 2011). Alguns estudos indicam que esse reconhecimento está baseado na conciliação entre o perfil químico do indivíduo e a representação na memória do odor colonial (Lacy e

Sherman, 1983; Tsutsui, 2004). A importância dos HC na identidade das formigas tem sido demonstrada em diferentes espécies: *Camponotus floridanus* (Endler et al., 2004; 2006), *Camponotus fellah* (Boulay et al., 2000), *Pachycondyla villosa* (Lucas et al., 2004); *Pachycondyla apicalis* (Soroker et al., 1998), *Pogonomyrmex barbatus* (Wagner et al., 2000); *Formica paralugubris* (Chapusait et al., 2005); *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Viana et al., 2001); *Formica exsecta* (Martin et al., 2012); *Atta sexdens rubropilosa* (Valadares e Nascimento, 2016).

Os HC também são utilizados para reconhecer os indivíduos encarregados da reprodução. Em colônias pequenas, a presença da rainha pode ser percebida pela interação física com as operárias (Olejarz et al., 2017). Em colônias maiores, a presença da rainha é comunicada de maneira direta por contato físico e indiretamente pelos hidrocarbonetos próprios da mesma depositados nos ovos (Endler et al., 2004; Helanterä et al., 2014). O sinal químico da rainha atrai as operárias (Bento, 1983; Dietemann et al., 2003) e em alguns casos inibe a maturação dos seus ovários (Endler et al., 2004; Holman et al., 2010; Van Oystaeyen et al., 2014). A ausência do sinal da rainha geralmente é associada à morte e desencadeia mudanças no interior do ninho, como o desenvolvimento de novas rainhas ou ativação do aparelho reprodutor das operárias (Camargo et al., 2007; Dijkstra et al., 2005; Dijkstra e Boomsma, 2006; Grüter e Keller, 2016; Smith et al., 2007).

O feromônio da rainha (compostos específicos do perfil de HC) pode ser interpretado de duas maneiras: como um sinal da presença de uma fêmea reprodutora na colônia ou como sinal coercivo que inibe a reprodução das operárias (Brunner et al., 2011; Keller e Nonacs, 1993; Peso et al., 2015; Villalta et al., 2018). Recentemente, Holman (2018) demonstrou que substâncias produzidas por rainhas de diversas espécies de formigas estão associadas à sua fisiologia reprodutiva (Smith e Liebig, 2017) e que as operárias respondem a essas substâncias com a inativação do seu aparelho reprodutivo. No entanto, ainda não é claro se esta resposta é um comportamento voluntário ou uma resposta fisiológica inata (Oldroyd, 2018). Trabalhos realizados com sinais biológicos indicam que os receptores desses sinais evoluíram ao ponto de conseguir ignorá-los, se esses sinais reduzem seu próprio fitness (Oldroyd, 2018). Assim, a resposta ao feromônio da rainha e a organização social estão ligadas a padrões evolutivos do sinal e



podem ser encontradas em diferentes cenários dependendo da espécie (Smith e Liebig, 2017).

Nas formigas-cortadeiras é desconhecida a composição de HC da rainha. Bento (1983) observou que a rainha de *Atta sexdens rubropilosa* é muito atrativa para as operárias da sua própria colônia e que as substâncias responsáveis por essa atratividade são pouco voláteis. Sotelo et al., (2015) observaram a adoção de formas imaturas e de uma nova rainha, por parte de operárias de uma colônia de *Atta cephalotes* sem rainha. Dijkstra et al., (2005) observaram que operárias de *A. cephalotes* e *A. sexdens* mais próximas da rainha têm o aparelho reprodutor ativo e colocam ovos tróficos que servem de alimento para a rainha. Por sua vez, as operárias que ficam mais tempo fora do ninho têm o aparelho reprodutor inativo e pouco desenvolvido (Dijkstra e Boomsma, 2006). Espera-se que o perfil de HC das rainhas de *A. sexdens* seja diferente, qualitativa e quantitativamente, quando comparado com as operárias. Neste trabalho é descrito o perfil de hidrocarbonetos da rainha de *A. sexdens* e são feitas inferências sobre a presença de compostos exclusivos e sua relação com o status reprodutivo da rainha.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta de rainhas de Atta sexdens*

Doze rainhas de *Atta sexdens* foram coletadas durante o voo nupcial em novembro de 2017, em Campos dos Goytacazes, Brasil (21°46'18,81"S 41°16'26,46"W). A captura foi realizada no momento em que realizavam a escavação do ninho. As rainhas foram transferidas ao laboratório e mantidas individualmente em copos plásticos transparentes (350 mL) com terra obtida no local da coleta. Nenhum alimento foi oferecido. Foi observado o desenvolvimento do fungo simbiote, assim como a presença de formas imaturas (ovos, larvas e pupas) durante 60 dias após a coleta em campo.

Três rainhas de *A. sexdens* com aproximadamente 4 anos de idade, foram retiradas de ninhos mantidos em laboratório, os quais foram obtidos em São

Francisco de Itabapoana, Brasil (21°26'42.38"S 41°12'01.30"W). As colônias de laboratório continham cerca de 6 L de fungo simbiote e foram mantidas com uma dieta que inclui folhas de *Acalipha wilkesiana*, *Manguifera indica* e *Ligustrum* sp.

### *Extratos cuticulares*

#### *Ovos*

Após 20 dias da coleta, três rainhas jovens que cultivaram fungo simbiote foram selecionadas aleatoriamente, e isoladas individualmente em uma placa de Petri. Em cada placa ( $\varnothing=7\text{cm}$ ) foi colocado algodão umedecido com solução de água e mel (50%). Após 24 horas, os ovos foram coletados com um pincel fino umedecido com pentano e depositados em um frasco de 250  $\mu\text{L}$ . Em cada frasco foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de pentano e após cinco minutos, retirado com uma seringa. O pentano extraído foi depositado em outro frasco (250  $\mu\text{L}$ ) e mantido a  $-4^{\circ}\text{C}$ . No microscópio estereoscópico certificou-se que os ovos não estivessem danificados ou sua forma afetada pelo tratamento com pentano.

#### *Rainhas*

Foram preparados extratos de 9 rainhas jovens (coletadas em campo) e 4 rainhas maduras (colônias de laboratório). As rainhas foram mantidas a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e depois inseridas, individualmente, em um frasco de vidro com 3 mL de pentano. Depois de 10 minutos, as rainhas foram retiradas e o pentano evaporado com nitrogênio. Os frascos de vidro com os extratos e as rainhas foram mantidos a  $-4^{\circ}\text{C}$  até as análises cromatográficas.

#### *Operárias*

Extratos foram preparados a partir de 50 operárias médias (largura da cápsula cefálica: 1,8–2,4 mm) coletadas na arena de forrageamento dos mesmos ninhos dos quais foram retiradas as rainhas maduras.

Extratos com uma operária e 20  $\mu\text{L}$  de pentano apresentaram a concentração dos compostos muito baixa. Assim, foi preciso realizar vários

extratos, com diferentes quantidades de formigas e pentano, para garantir a identificação dos compostos presentes na cutícula das formigas. Os melhores resultados foram obtidos em frascos de 2 mL, com 5 operárias e 1 mL de pentano. As operárias foram mantidas no pentano por 10 min e depois retiradas com auxílio de uma pinça. Os extratos foram armazenados no freezer (-4°C) até análise em Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM).

#### *Análise cromatográfica*

Os extratos cuticulares das rainhas e operárias foram analisados em um Cromatógrafo a Gás acoplado com Espectrômetro de Massas (CG-EM) SHIMADZU MSTQ8040, no departamento de química da Universidade Federal de São Carlos, Brasil. Todas as amostras foram ressuspensas em 40 µL de hexano grau HPLC e injetadas manualmente (1,0 µL) no modo *splitless*. A coluna utilizada foi Restek Rtx-5MS (30 m x 0.250 mm x 0.25 µm). Hélio foi utilizado como gás de arraste em uma vazão constante de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial do forno foi de 100°C, mantida por 2 min, elevada até 150°C com uma taxa de variação de 10°C.min<sup>-1</sup>; seguido por um aumento até 280°C, com uma taxa de variação de 3°C.min<sup>-1</sup>, sendo mantido nesta temperatura por de 10 min; por fim, o forno foi aquecido até 290°C com uma taxa de variação de 5°C.min<sup>-1</sup> e um tempo de espera de 15 min. A ionização foi realizada por impacto eletrônico (70 eV), com um *scan time* de 0.3 s e um intervalo de massa entre 50 e 500 Da. A temperatura do injetor e da interface foi de 240° e 290°C, respectivamente. Os dados foram gerenciados e processados através do *software* Shimadzu GCSolution V.4.11 (Tóquio, Japão).

Para identificação da composição dos hidrocarbonetos foi calculado o Índice de Retenção Linear (IRL) para cada composto com ajuda de um padrão externo (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) de alcanos saturados Sigma-Aldrich®. Cada composto foi identificado pelo seu espectro de massas e do IRL como registrado na literatura. Também foi consultada a Biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technologies, Mass Spectra Libraries).

### *Análise estatística*

Foi utilizada a Análise Multivariada de Permutação de Variância (PerMANOVA), com 9999 permutações, para determinar as diferenças entre os compostos presentes na cutícula das formigas analisadas. Os compostos que contribuíram com menos de 0,3% para o total de compostos por indivíduo foram excluídos da análise. Posteriormente, foi realizada a Análise de Similaridade SIMPER, para identificar as diferenças qualitativas entre os grupos de indivíduos analisados. Finalmente, foi realizada a Análise de Escalonamento Multidimensional não métrica (nMDS) para visualizar a contribuição dos compostos na separação dos indivíduos, segundo seu perfil de HC. As análises estatísticas foram feitas no programa PAST 3.02.

## RESULTADOS

O fungo simbiote cultivado por algumas rainhas morreu antes dos 60 dias, pelo qual foi necessário fazer extratos das rainhas nesse momento. Os compostos presentes no extrato cuticular das formigas (n=51) se detalham na Tabela 1. Desses compostos 25,49% eram alcanos de cadeia simples, 3,92% alcenos, 58,83% alcanos de cadeia ramificada (1, 2 ou 3 grupos metila) e 5,88% metil ésteres. Três compostos não foram identificados (5.88%). O perfil químico de HC das rainhas se caracteriza por ter uma alta concentração de hidrocarbonetos ramificados, os quais representam mais de 80% da concentração total. Já nas rainhas maduras os hidrocarbonetos ramificados representam menos do 15% e os metil ésteres representam mais do 80% da concentração (Tabela 1). As operárias apresentaram compostos exclusivos na sua cutícula, como alcanos de menor peso molecular e alcenos (Tabela 1). A maioria dos compostos esteve presente no perfil cuticular de todas as formigas analisadas, porém as concentrações foram diferentes em cada grupo. Por exemplo:  $n\text{-C}_{27}$ ,  $n\text{-C}_{29}$  e  $n\text{-C}_{31}$  tiveram uma maior concentração nas operárias (Tabela 1).

Tabela 1. Média e erro padrão da porcentagem da área dos hidrocarbonetos cuticulares de rainhas e operárias de *Atta sexdens*

Composto	Índice de retenção	Rainhas jovens n=9	Rainhas maduras n=4	Operárias n=10
<i>Alcanos</i>				
<i>n</i> -C <sub>17</sub>	1700	-	-	0,25±0,05
<i>n</i> -C <sub>21</sub>	2100	-	-	0,67±0,06
<i>n</i> -C <sub>22</sub>	2200	-	-	1,44±0,13
<i>n</i> -C <sub>23</sub>	2300	-	-	2,35±0,17
<i>n</i> -C <sub>24</sub>	2400	-	-	3,37±0,23
<i>n</i> -C <sub>25</sub>	2500	-	-	6,65±0,27
<i>n</i> -C <sub>26</sub>	2600	-	-	6,76±0,36
<i>n</i> -C <sub>27</sub>	2700	2,70±0,68	1,15±0,40	14,57±0,49
<i>n</i> -C <sub>28</sub>	2800	0,47±0,14	0,18±0,13	9,09±0,49
<i>n</i> -C <sub>29</sub>	2900	8,35±1,95	1,73±0,42	19,16±1,09
<i>n</i> -C <sub>30</sub>	3000	0,19±0,06	0,14±0,09	5,91±0,48
<i>n</i> -C <sub>31</sub>	3100	2,16±0,35	0,81±0,16	4,56±0,27
<i>n</i> -C <sub>33</sub>	3300	-	-	0,92±0,18
Total		13,88	4,01	75,70
<i>Alcenos</i>				
( <i>Z</i> )-9-nonadecene	1878	-	-	1,56±0,17
( <i>Z</i> )-9-tricosene	2270	-	-	2,30±0,28
Total		-	-	3,86
<i>Alcanos metilados</i>				
5-MeC <sub>33</sub>	3349	-	0,74±0,20	-
Total			0,74	
<i>Alcanos dimetilados</i>				
8,12-DiMeC <sub>30</sub>	3060	-	0,74±0,20	-
6,10-DiMeC <sub>30</sub>	3073	0,30±0,06	-	-
7,11-DiMeC <sub>31</sub>	3165	1,69±0,13	0,38±0,26	0,61±0,04
5,9-; 5,11-; 5,13-; 5,15-DiMeC <sub>31</sub>	3181	1,38±0,20	0,77±0,14	0,72±0,09
8,12-DiMeC <sub>32</sub>	3260	1,54±0,12	0,12±0,12	-
6,10-DiMeC <sub>32</sub>	3272	3,23±0,21	0,29±0,13	0,33±0,08
4,8; 4,10; 4,12; 4,14-DiMeC <sub>32</sub>	3289	2,99±0,23	0,34±0,15	0,28±0,08
7,11-DiMeC <sub>33</sub>	3364	0,60±0,11	0,18±0,11	-
5,9-DiMeC <sub>33</sub>	3380	0,98±0,19	1,13±0,66	-
8,12-DiMeC <sub>34</sub>	3459	0,25±0,06	-	-
6,10-DiMeC <sub>34</sub>	3473	1,20±0,22	0,48±0,38	-
4,8; 4,10; 4,12; 4,14-DiMeC <sub>34</sub>	3488	2,00±0,52	0,15±0,09	-
Total		16,52	3,97	1,94

<i>Alcanos trimetilados</i>				
3,7,11-TriMeC <sub>29</sub>	3034	1,61±0,12	0,39±0,09	-
4,8,12-TriMeC <sub>30</sub>	3114	4,25±0,24	0,29±0,17	1,61±0,08
3,7,11-TriMeC <sub>30</sub>	3134	0,21±0,07	0,07±0,07	-
7,11,15-TriMeC <sub>31</sub>	3189	0,41±0,05	0,12±0,07	-
5,9,13-TriMeC <sub>31</sub>	3203	2,74±0,21	0,56±0,15	-
4,8,12-TriMeC <sub>31</sub>	3212	0,58±0,03	0,44±0,19	-
3,7,11-TriMeC <sub>31</sub>	3233	16,93±1,14	1,67±0,62	5,57±0,28
8,12,16-TriMeC <sub>32</sub>	3254	1,40±0,12	0,07±0,07	0,32±0,05
6,10,14-TriMeC <sub>32</sub>	3294	5,06±0,16	0,34±0,06	0,78±0,11
4,8,12-TriMeC <sub>32</sub>	3314	22,06±1,69	1,34±0,21	4,42±0,33
3,7,11-TriMeC <sub>32</sub>	3333	0,99±0,18	0,53±0,21	-
7,11,15-TriMeC <sub>33</sub>	3387	0,82±0,15	0,07±0,07	-
5,9,13-TriMeC <sub>33</sub>	3402	3,36±0,47	0,57±0,33	0,82±0,19
3,7,11-TriMeC <sub>33</sub>	3434	3,58±0,30	0,38±0,14	0,48±0,15
8,12,16-TriMeC <sub>34</sub>	3452	0,29±0,07	-	-
6,10,14-TriMeC <sub>34</sub>	3493	0,75±0,29	0,26±0,26	-
4,8,12-TriMeC <sub>34</sub>	3514	3,28±0,42	0,11±0,07	0,34±0,12
Total		68,33	7,19	14,34
<i>Metil ésteres</i>				
Ácido dodecanoico eicosil éster	3374	-	6,18±1,48	-
Ácido tetradecanoico eicosil éster	3583	-	38,87±9,15	1,43±0,64
Ácido hexadecanoico eicosil éster	3781	-	38,57±12,93	-
Total		-	83,62	1,43
<i>Não identificados</i>				
1	3086	0,47±0,10	-	-
2	3184	0,20±0,04	0,11±0,06	-
3	3196	0,60±0,04	0,38±0,16	2,73±0,23
Total		1,26	0,48	2,73

A composição química do perfil das rainhas (jovens e maduras) e operárias de *A. sexdens* foi significativamente diferente (Pseudo-F=90,76; P<0,0001). O perfil químico das rainhas jovens foi significativamente diferente do perfil das rainhas maduras (P=0,0022) e operárias (P=0,0002). As rainhas maduras também foram significativamente diferentes das operárias (P=0,0013). Segundo a análise SIMPER, sete compostos tiveram maior peso na caracterização dos três grupos (Fig. 1 e 2). Alguns compostos foram exclusivos das operárias ou das rainhas. O extrato cuticular das rainhas maduras apresentou 5-MeC<sub>33</sub> e metil ésteres. O

resultado da análise nMDS permite observar a separação de operárias e rainhas, assim como rainhas jovens e rainhas maduras (Fig. 2). Não foram detectados compostos químicos nos extratos de ovos.

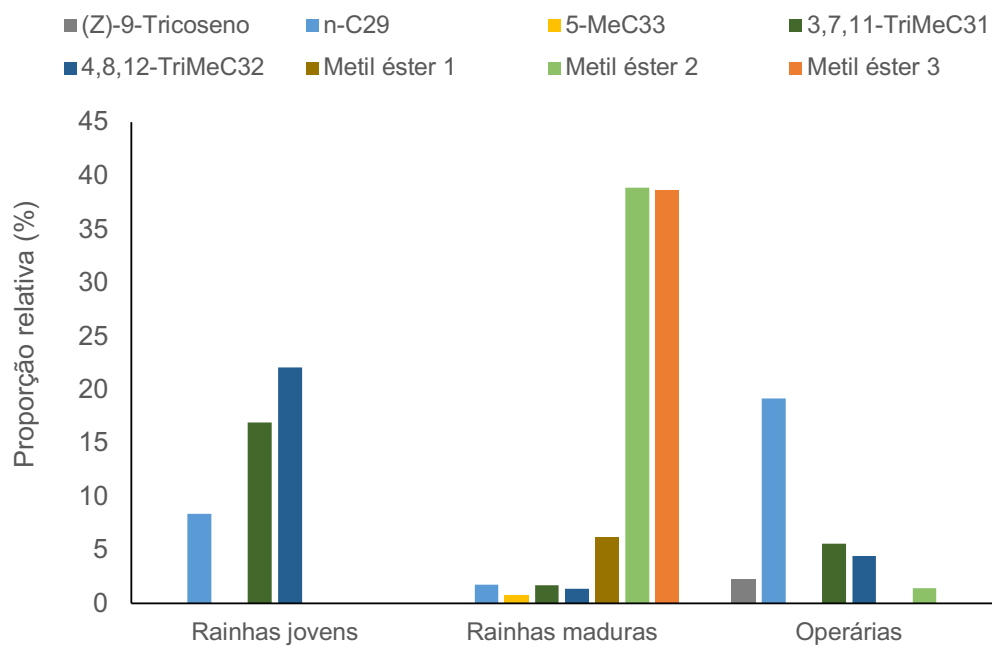


Figura 1. Proporção relativa de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas jovens e maduras e operárias de *Atta sexdens*.

Metil éster 1= ácido dodecanoico eicosil éster;

Metil éster 2= ácido tetradecanoico eicosil éster;

Metil éster 3= ácido hexadecanoico eicosil éster.

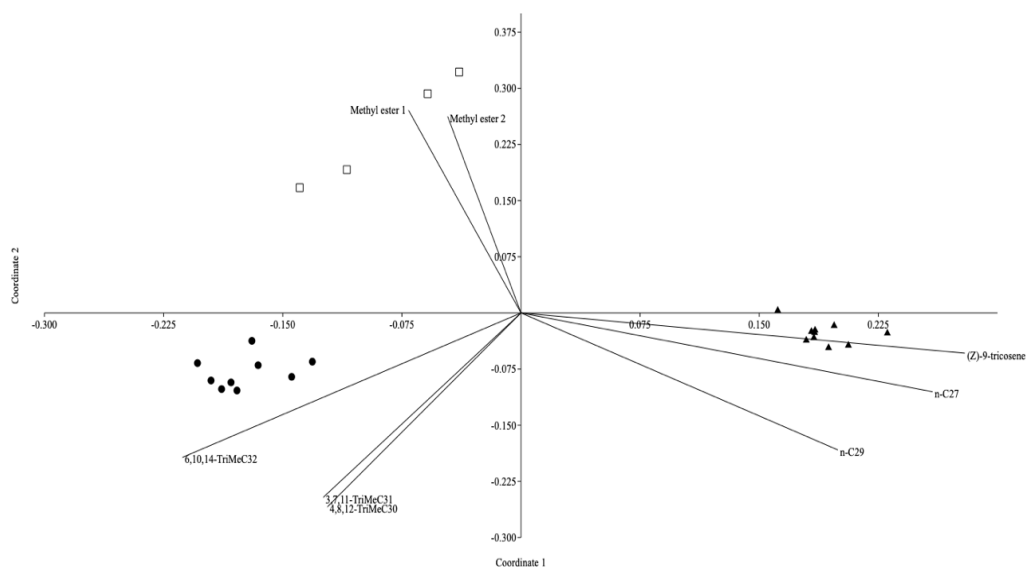


Figura 2. Análise dos hidrocarbonetos identificados em Rainhas e operárias de *A. sexdens* por *n*-MDS. (●) Rainhas jovens; (□) Rainhas maduras; e (▲) Operárias. Metil éster 1= ácido dodecanoico eicosil éster; Metil éster 2= ácido tetradecanoico eicosil éster.

## DISCUSSÃO

O perfil de hidrocarbonetos das rainhas tem compostos exclusivos ausentes na cutícula das operárias, o que evidencia uma separação entre a casta reprodutiva e a operária. A presença de alguns compostos exclusivos na cutícula de rainhas maduras permite fazer inferências sobre a relação destes com seu status reprodutivo. O perfil das rainhas foi caracterizado por uma grande diversidade de alcanos ramificados, enquanto que as operárias apresentaram altas concentrações de alcanos lineares e menor concentração de compostos ramificados. Alguns estudos demonstram a importância dos alcenos e alcanos ramificados no reconhecimento das companheiras de ninho (Guerreri et al., 2009; Lucas et al., 2005; Martin e Drijfhout, 2009). Segundo van Wilgenburg et al., (2011), os alcanos ramificados e alcenos são caracteres ancestrais das formigas, sendo os trimetil-alcanos caracteres derivados. Para Valadares e Nascimento (2016), a presença de diversos trimetil-alcanos na cutícula das formigas-cortadeiras



concorda com a sua posição derivada dentro do grupo das formigas cultivadoras de fungo proposta por Schultz e Brady (2008).

O perfil de HC de operárias e formas imaturas de algumas espécies de formigas-cortadeiras foi estudado (Richard et al., 2007a; 2007b; Valadares e Nascimento, 2016; 2017; Viana et al., 2001). Martin e MacConnell (1970) reportaram que duas séries homólogas de trimetil-alcanos (3,7,11-TriMeC<sub>3x</sub> e 4,8,12-TriMeC<sub>3x</sub>) foram os compostos mais abundantes na cutícula de operárias de *Atta colombica*. Em operárias generalistas de *A. sexdens* (Valadares e Nascimento 2016) e em operárias de *A. colombica* e *A. cephalotes* (Richard et al., (2007a), foram encontrados alguns dos compostos das séries homólogas descritas por Martin e MacConnell (1970), porém com diferente massa molecular. Neste estudo foram encontrados os compostos: 3,7,11-TriMeC<sub>29</sub>; 3,7,11-TriMeC<sub>30</sub>; 3,7,11-TriMeC<sub>31</sub>; 3,7,11-TriMeC<sub>32</sub>; 3,7,11-TriMeC<sub>33</sub>; 4,8,12-TriMeC<sub>30</sub>; 4,8,12-TriMeC<sub>31</sub>; 4,8,12-TriMeC<sub>32</sub>; 4,8,12-TriMeC<sub>34</sub> dessa série homóloga. Os compostos 3,7,11-TriMeC<sub>31</sub>; 3,7,11-TriMeC<sub>33</sub>; 4,8,12-TriMeC<sub>30</sub>; 4,8,12-TriMeC<sub>32</sub> e 4,8,12-TriMeC<sub>34</sub> estiveram presentes na cutícula das operárias, porém tiveram maior concentração dentro do perfil químico das rainhas.

Operárias jardineiras, forrageiras, generalistas e soldados de *A. sexdens* foram analisadas por Valadares e Nascimento (2016). Os autores não encontraram compostos exclusivos para nenhuma das subcastas avaliadas, porém diferenças na concentração de alguns compostos, especialmente alcanos ramificados, foram essenciais na separação dos grupos. A quantidade de hidrocarbonetos encontrados na cutícula das operárias nesta pesquisa é similar à reportada por Valadares e do Nascimento (2016; 2017). Porém, alguns compostos, especialmente os alcanos ramificados, são reportados pela primeira vez. As diferenças encontradas com o perfil reportado por Valadares e Nascimento (2016), podem ser explicadas pela influência da dieta no perfil de HC em formigas-cortadeiras (Lambardi et al., 2004; Richard et al., 2004), além de variações genéticas (van Zweden et al., 2010) e ambientais (Duarte et al 2019; Menzel et al., 2018), que também podem afetar os HC, ou ainda um maior limite de detecção na metodologia usada neste trabalho.

A regulação da reprodução no interior das colônias é um componente importante na evolução dos insetos sociais e pode ocorrer através da ação de feromônios produzidos pela rainha, que atuam como inibidores da reprodução

de operárias ou como sinais indicadores da sua fertilidade (Amsalem et al., 2015; Keller e Nonacs, 1993). As colônias de formigas-cortadeiras do gênero *Atta* têm uma única rainha que oviposita ovos férteis. O aparelho reprodutor das operárias maduras do gênero *Atta* é rudimentar, porém na ausência da rainha algumas operárias conseguem ovipositar (Dijkstra et al., 2006). Dijkstra et al., (2005) observaram que um pequeno grupo de operárias de *A. sexdens* e *A. cephalotes*, que se mantêm perto da rainha, colocam ovos tróficos que são utilizados na alimentação da rainha. As operárias com ovos prontos nem sempre ovipositam espontaneamente. Sinais produzidos pela rainha ou larvas, podem ser necessários para induzir esse comportamento, o que sugere um controle próprio da ovulação. (Dijkstra et al., 2005). O fato de não ter detectado compostos químicos no extrato da superfície dos ovos, pode ser resultado da ausência desses compostos neles ou uma concentração abaixo do limite de detecção do método. Recomenda-se realizar a análise dos ovos em diferentes estágios de desenvolvimento do formigueiro e comparar colônias pequenas e grandes, já que o aumento de tamanho da colônia pode desencadear a marcação dos ovos por parte da rainha (Endler et al., 2004).

Os HC são os principais candidatos a serem os sinalizadores da rainha, transmitindo informações sobre sua presença e fertilidade (Heinze e d'Ettoire, 2009; Howard e Blomquist, 2005; Le Conte e Hefetz, 2008). Em várias espécies de formigas a variação no perfil de HC foi associada às diferenças no desenvolvimento ovariano (Cuvillier-Hot et al., 2001; Liebig et al., 2000; Monnin et al., 1998; Will et al., 2012). Em rainhas acasaladas de *Leptothorax gredleri* (Oppel e Heinze, 2009) e *Ectatomma tuberculatum* (Hora et al., 2007) a proporção de alcanos ramificados diminuiu e de *n*-alcanos aumentou em comparação com as rainhas virgens. Essas mudanças podem dar uma maior proteção durante o forrageio (Hora et al., 2007) ou fazer as rainhas “quimicamente insignificantes” e favorecer sua adoção por parte de colônias com uma rainha fértil da mesma espécie (Oppel e Heinze, 2009).

## CONCLUSÕES

Este trabalho é o primeiro a descrever o perfil de HC de rainhas de *Atta sexdens*. O perfil de HC das rainhas mudou quantitativa e qualitativamente entre os grupos analisados. Os hidrocarbonetos ramificados representam a maior parte do perfil das rainhas jovens, porém nas rainhas maduras são os metil ésteres que constituem mais de 80% dos compostos encontrados. Por sua vez, os alcanos lineares representam mais de 70% do perfil de HC das operárias. Os resultados do presente trabalho abrem a possibilidade para futuras pesquisas sobre a composição do feromônio da rainha e sua difusão no interior do ninho, assim como os efeitos desse feromônio sobre as operárias. Segundo nossos resultados, os Metil ésteres são compostos que se relacionam com a fertilidade da rainha e sua concentração aumenta com o desenvolvimento da colônia. São necessárias mais pesquisas focadas na origem desses compostos e seu efeito nas operárias da colônia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amsalem E, Orlova M, Grozinger CM (2015) A conserve class of queen pheromones? Re-evaluating the evidence in bumblebees (*Bombus impatiens*). Proc R Soc B 282 (1817):20151800. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.1800>

Bagnères AG, Blomquist GJ (2010) Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbon. In: Blomquist GJ, Bagnères AG (eds) Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology, Cambridge University Press, pp 75-99

Bento JMS (1983) Condições climáticas para o voo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Dissertation. Universidade Federal de Viçosa

Berthelot KV, Portugal FR, Jeanson R (2017) Caste discrimination in the ant *Odontomachus hastatus*: What role for behavioral and chemical cues?. *J Insect Physiol* 98:291-300. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.018>

Bos N, d'Ettorre P (2012) Recognition of social identity in ants. *Front in Psychol* 3:1-6. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2012.00083>

Boulay R, Hefetz A, Soroker V, Lenoir A (2000) *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. *Anim Behav* 59(6):1127-1133. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1408>

Brunner E, Kroiss J, Trindl A, Heinze J (2011) Queen pheromones in *Temnothorax* ants: control or honest signal. *BMC Evol Biol*: 11:55. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-55>

Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS, Noronha N, Ottati ALT (2007) Worker laying in leafcutter ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Formicidae, Attini). *Insect Sci* 14(2):157-163. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2007.00138.x>

Chapusait M, Bernasconi G, Hoehn S, Reuter M (2005) Nestmate recognition in the unicolonial ant *Formica paralugubris*. *Behav Ecol* 16(1):15-19. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh128>

Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C (2001) Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J Insect Physiol* 47:485-493. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00137-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00137-2)

d'Ettorre P, Heinze J, Schulz C, Francke W, Ayasse M (2004) Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *J Exp Biol* 207(7):1085-1091. <https://doi.org/10.1242/jeb.00865>

d'Ettorre P, Lenoir A (2010) Nestmate recognition. In: Lach L, Parr C, Abbott K (eds) *Ant ecology*, Oxford University Press, New York, pp 194-208

Dietemann V, Peeters C, Liebig J, Thievet V, Hölldobler B (2003) Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18):10341-10346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834281100>

Dijkstra MB, Boomsma JJ (2006) Are workers of *Atta* leafcutter ants capable of reproduction?. *Insect Soc* 53(2):136-140. <https://doi.org/10.1007/s00040-005-0848-3>

Dijkstra MB, Nash DR, Boomsma JJ (2005) Self-restraint and sterility in workers of *Acromyrmex* and *Atta* leafcutter ants. *Insect Soc* 52(1):67-76. <https://doi.org/10.1007/s00040-004-0775-8>

Duarte BF, Michelutti KB, Antonioli-Junior WF, Cardoso CAL (2019) Effect of temperature on survival and cuticular composition of the three different ant species. *J Therm Biol* 80:178-189. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.02.005>

Endler A, Liebig J, Hölldobler B (2006) Queen fertility, egg marking and colony size in the ant *Camponotus floridanus*. *Behav Ecol Sociobiol* 59:490-499. <https://doi.org/10.1007/s00265-005-0073-0>

Endler A, Liebig J, Schmitt T, Parker JE, Jones GR, Schreier P, Hölldobler B (2004) Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):2945-2950. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308447101>

Gibbs AG, Rajpurohit S (2010) Cuticular lipids and water balance. In: Blomquist GJ, Bagnères AG (eds) *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*, Cambridge University Press, pp 100-120

Grüter C, Keller L (2016) Inter-caste communication in social insects. *Curr Opin Neurobiol* 38:6-11. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.01.002>

Guerreri FJ, Nehring V, Jørgensen CG, Nielsen J, Galizia G, d'Ettorre P (2009) Ants recognize foes and not friends. *Proc R Soc B* 276:2461-2468. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1860>

Heinze J, d'Ettorre P (2009) Honest and dishonest communication in social Hymenoptera. *J Exp Biol* 212(12):1775-1779. <https://doi.org/10.1242/jeb.015008>

Heinze J, Stengl B, Sledge MF (2002) Worker rank, reproductive status and cuticular hydrocarbon signature in the ant, *Pachycondyla* cf. *inversa*. *Behav Ecol Sociobiol* 52:59-65. <https://doi.org/10.1007/s00265-002-0491-1>

Helanterä H, Martin SJ, Ratnieks FLW (2014) Recognition of nestmate eggs in the ant *Formica fusca* is based on queen derived cues. *Curr Zool* 60:131-136. <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.1.131>

Holman L, Jørgensen C, Nielsen J, d'Ettorre, P (2010) Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proc R Soc B* 277(1701):3793-3800. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0984>

Holman L (2018) Queen pheromones and reproductive division of labor: a meta-analysis. *Behav Ecol* 29(6):1199-1209. <https://doi.org/10.1093/beheco/ary023>

Hora RR, Ionescu-Hirsh A, Simon T, Delabie J, Robert J, Fresneau D, Hefetz A (2008) Postmating changes in cuticular chemistry and visual appearance in *Ectatomma tuberculatum* queens (Formicidae: Ectatomminae). *Naturwissenschaften* 95:55-60. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0287-2>

Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50(1):371-393. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359>

Jackson BD, Morgan ED (1993) Insect chemical communication: pheromones and exocrine glands of ants. *Chemoecology* 4:125-144. <https://doi.org/10.1007/BF01256548>

Keller L, Nonacs P (1993) The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal?. *Anim Behav* 45:787-794. <https://doi.org/10.1006/anbe.1993.1092>

Lacy RC, Sherman PW (1983) Kin recognition by phenotype matching. *Amer Nat* 121:489-512. <https://doi.org/10.1086/284078>

Lahav S, Soroker V, Hefetz A (1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86(5):246-249. <https://doi.org/10.1007/s001140050609>

Lambardi D, Chegia B, Turillazzi S, Boomsma JJ (2004) Diet-aggression among colonies of the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Redia* 87:219-221.

Le Conte Y, Hefetz A (2008) Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 53(1):523-542. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091434>

Lenoir A, Hefetz A, Simon T, Soroker V (2001) Comparative dynamics of gestalt odour formation in two ant species *Camponotus fellah* and *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera: Formicidae). *Physiol Entomol* 26(3):275-283. <https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00244.x>

Leonhardt SD, Menzel F, Nehring V, Schmit T (2016) Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell* 164(6):1277-1287. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.035>

Liebig J, Peeters C, Oldham NJ, Markstädter C, Hölldobler B (2000) Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*?. *PNAS* 97(8):4124-4131. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4124>

Lucas C, Pho DB, Fresneau D, Jallon JM (2004) Hydrocarbon circulation and colonial signature in *Pachycondyla villosa*. *J Insect Physiol* 50(7):595-607. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.04.006>

Lucas C, Pho DB, Jallon JM, Fresneau D (2005) Role of cuticular hydrocarbons in the chemical recognition between ant species in the *Pachycondyla villosa* species complex. *J Insect Physiol* 51:1148-1157. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.06.003>

Martin MM, MacConnel JG (1970) The alcanos of *Atta colombica*. *Tetrahedron* 26:307-319.

Martin SJ, Drijfhout FP (2009) Nestmate and task cues are influenced and encoded differently within ant cuticular hydrocarbon profiles. *J Chem Ecol* 35(3):368-374. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9612-x>

Martin SJ, Shemilt S, Drijfhout, FP (2012) Effect of time on colony odour stability in the ant *Formica exsecta*. *Naturwissenschaften* 99(4):327-331. <https://doi.org/10.1007/s00114-012-0898-0>

Menzel F, Zumbusch M, Feldmeyer B (2018) How ants acclimate: Impact of climatic conditions on the cuticular hydrocarbon profile. *Funct Ecol* 32:657-666. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13008>

Monnin T, Malosse C, Peeters C (1998) Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *J Chem Ecol* 24:473-490. <https://doi.org/10.1023/A:1022360718870>

Monnin T (2006) Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann Zool Fennici* 43:515-530.

Monnin T, Helft F, Leroy C, d'Ettorre P, Doums C (2018) Chemical characterization of young virgin queens and mated egg-laying queens in the ant *Cataglyphis cursor*.



Random Forest classification analysis for multivariate datasets. *J Chem Ecol* 44(2):127-136. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0923-7>

Nascimento FS, Tannure-Nascimento IC, Dantas JO, Turatti IC, Lopes PN (2012) Task-related variation of cuticular hydrocarbon profiles affect nestmate recognition in the giant ant *Dinoponera quadriceps*. *J Insect Behav* 26(2):212-222. <https://doi.org/10.1007/s10905-012-9353-5>

Nehring V, Evison SEF, Santorelli LA, d'Etorre P, Hughes OH (2011) Kin-informative recognition cues in ants. *Proc R Soc B* 278(1714):1942-1948. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2295>

Oldroyd BP (2018) Queen pheromone: contraceptive or a queen presence signal? -A comment on Holman. *Behav Ecol* 29(6):1213-1214. <https://doi.org/10.1093/beheco/ary048>

Olejarz J, Veller C, Nowak MA (2017) The evolution of queen control over worker reproduction in the social Hymenoptera. *Ecol Evol* 7(20):8427-8441. <https://doi.org/10.1002/ece3.3324>

Oppelt A, Heinze J (2009) Mating is associated with immediate changes of the hydrocarbon profile of *Leptothorax gredleri* ant queens. *J Insect Physiol* 55(7):624-628. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.03.010>

Peeters C, Monnin T, Malosse C (1999) Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queenless ant. *Proc R Soc B* 266(1426):1323-1327. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0782>

Peso M, Elgar MA, Barron AB (2014) Pheromonal control: reconciling physiological mechanism with signalling theory. *Biol Rev* 90(2):542-559. <https://doi.org/10.1111/brv.12123>

Richard FJ, Hefetz A, Christides JP, Errard C (2004) Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant

*Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Chemoecology* 14(1):9-16.  
<https://doi.org/10.1007/s00049-003-0251-3>

Richard FJ, Hunt JH (2013) Intracolony chemical communication in social insects. *Insect Soc* 60(3):275-291. <https://doi.org/10.1007/s00040-013-0306-6>

Richard FJ, Poulsen M, Drijfhout F, Jones G, Boomsma JJ (2007a) Specificity in chemical profiles of workers, brood and mutualistic fungi in *Atta*, *Acromyrmex*, and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. *J Chem Ecol* 33(12):2281-2292.  
<https://doi.org/10.1007/s10886-007-9385-z>

Richard FJ, Poulsen M, Hefetz A, Errard C, Nash DR, Boomsma JJ (2007b) The origin of the chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol* 61(11):1637-1649. <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0395-1>

Rossi N, Baracchi D, Giurfa M, d'Ettorre P (2019) Pheromone-Induced accuracy of nestmate recognition in Carpenter ants: Simultaneous decrease in type I and type II errors. *Amer Nat* 193(2):267-278. <https://doi.org/10.1086/701123>

Schultz TR, Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *PNAS* 14:5435-5440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711024105>

Smith AA, Liebig J (2017) The evolution of cuticular fertility signals in eusocial insects. *Curr Opin Insect Sci* 22:79-84. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.017>

Smith CR, Schoenick C, Anderson KE, Gadau J, Suarez AV (2007) Potential and realized reproduction by different worker castes in queen-less and queen-right colonies of *Pogonomyrmex badius*. *Insect Soc* 54(3):260-267.  
<https://doi.org/10.1007/s00040-007-0940-y>

Smith AA, Hölldobler B, Liebig J (2009) Cuticular hydrocarbons reliably identify cheaters and allow enforcement of altruism in a social insect. *Curr Biol* 19(1):78-81.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.059>

Soroker V, Fresneau D, Hefetz A (1998) Formation of colony odor in Ponerine ant *Pachycondyla apicalis*. J Chem Ecol 24(6):1077-1090. <https://doi.org/10.1023/A:1022306620282>

Soroker V, Vienne C, Hefetz A (1995) Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera: Formicidae). J Chem Ecol 21(3):365-378. <https://doi.org/10.1007/BF02036724>

Sotelo G, Ortiz-Giraldo DS, Rodríguez J, Montoya-Lerma J (2015) Adoption of a surrogate artificial queen in a colony of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in Colombia. Sociobiology 62(4):613-614. <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.754>

Tsutsui ND (2004) Scents of self: The expression. Component of self/non self-recognition systems. Ann Zool Fenicci 41(6):713-727.

Valadares L, do Nascimento FS (2016) Chemical cuticular signature of leafcutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) worker subcastes. Rev Bras Entomol 60(4):308-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.06.008>

Valadares L, do Nascimento FS (2017) Changes in the cuticular hydrocarbon profile associated with the molting cycle correlate with the hydrocarbon profile of the fungus cultivated by the ant *Atta sexdens*. Insect Soc 64(4):591-596. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0581-8>

van Oystaeyen A, Oliveira RC, Holman L, van Zweden JS, Romero C, Oi CA, d'Ettorre P, Khalesi M, Billen J, Wäckers F, Millar JG, Wenseleers, T (2014) Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. Science 343(6168):287-290. <https://doi.org/10.1126/science.1244899>

van Wilgenburg E, Symonds MRE, Elgar MA (2011) Evolution of cuticular hydrocarbon diversity in ants. J Evol Biol 24(6):1188-1198. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02248.x

van Zweden JS, Brask JB, Christensen JH, Boomsma JJ, Linksvayer TA, d'Ettorre P (2010) Blending of heritable recognition cues among ant nestmates creates distinct colony gestalt odours but prevents within-colony nepotism. *J Evol Biol* 23(7):1498-1508. doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02020.x

Viana AMM, Frézard A, Malosse C, Della Lucia TMC, Errard C, Lenoir A (2001) Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* 11(1):29-36. <https://doi.org/10.1007/PL00001829>

Villalta I, Abril S, Cerdá X, Boulay R (2018) Queen control or Queen signal in ants: What remains of the controversy 25 years after Keller and Nonacs' Seminal paper?. *J Chem Ecol* 44(9):805-817. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0974-9>

Wagner D, Tissot M, Cuevas W, Gordon DM (2000) Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *J Chem Ecol* 26:2245-2257. <https://doi.org/10.1023/A:1005529224856>

Will S, Delabie JHC, Heinze J, Ruther J, Oettler J (2012) Cuticular lipid profiles of fertile and non-fertile *Cardiocondyla* ant queens. *J Insect Physiol* 58(9):1245-1249. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.06.009>

### 3.2 HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE MACHOS E FÊMEAS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA : FORMICIDAE)

#### RESUMO

As atividades no interior das colônias de insetos sociais são coordenadas principalmente por sinais químicos. Entre essas atividades, uma das mais importantes é o reconhecimento das companheiras do ninho, especialmente da casta reprodutiva. Alguns trabalhos, com diferentes espécies de formigas, demonstraram uma relação entre os hidrocarbonetos cuticulares da rainha e sua fertilidade. Em formigas-cortadeiras, se desconhecem os hidrocarbonetos relacionados com a fertilidade da rainha, assim como o perfil de hidrocarbonetos dos machos. Este estudo tem como objetivo elucidar a composição de hidrocarbonetos cuticulares das rainhas jovens e machos da formiga-cortadeira *Atta sexdens*. Espera-se que os indivíduos da casta reprodutiva tenham um perfil químico diferente das operárias. Foram preparados extratos de fêmeas (n=25) e machos (n=14), coletados em campo durante o voo nupcial. Os extratos cuticulares foram analisados através de CG-EM. Quarenta e seis compostos foram encontrados na cutícula de machos e rainhas. A cutícula da casta reprodutiva de *A. sexdens* contém uma grande diversidade de alcanos ramificados e pouca variedade de alcanos lineares. A presença exclusiva do ácido hexadecanoico eicosil éster e do ácido tetradecanoico eicosil éster na cutícula das rainhas jovens

analisadas sugere uma relação com sua identidade como fêmea reprodutora. Os machos também apresentaram compostos exclusivos. São necessários mais estudos para avaliar se os hidrocarbonetos cuticulares da machos e rainhas jovens têm um papel durante o acasalamento das formigas-cortadeiras.

#### ABSTRACT

The activities inside the social insect colonies are mainly coordinated by chemical signals. Among these activities, one of the most important is the recognition of nestmates, especially the reproductive caste. Some works with different ant species have shown a relationship between the queen's cuticular hydrocarbons and their fertility. In leafcutter ants, the fertility-related hydrocarbons of the queen, as well as the hydrocarbon profile of males, are unknown. This study aims to elucidate the cuticular hydrocarbon composition of young queens and males of *Atta sexdens*. I would expect reproductive caste individuals to have a different chemical profile than workers. Extracts of females (n = 25) and males (n = 14) were collected from the field during the mating flight. The cuticle extracts were analyzed by GC-MS. Forty-six compounds were found in the cuticle of males and queens. The cuticle of caste reproductive individuals contains a large diversity of branched alkanes and little variety of linear alkanes. The exclusive presence of Hexadecanoic acid eicosyl ester and Tetradeconoic acid eicosyl ester in the cuticle of the young queens analyzed suggests a relationship with her identity as a breeding female. The males also presented exclusive compounds. Further studies are needed to assess whether cuticle hydrocarbons in male and young queens play a role during leaf-cutting ants mating.

## INTRODUÇÃO

A coesão das sociedades de insetos é mantida através de um sistema de reconhecimento e comunicação baseado em sinais químicos cuticulares ou glandulares (Johnson e Sundström 2012). Os sinais químicos cuticulares estão compostos principalmente por hidrocarbonetos, que são os lipídios mais abundantes na cutícula dos insetos (Thomas e Simmons 2008). Os hidrocarbonetos cuticulares (HC) constituem uma importante barreira para evitar a perda de água (Blomquist e Bagnères 2010) e contra patógenos (Herzner e Strohm 2007). Estudos têm demonstrado que os HC também são essenciais para o reconhecimento das companheiras do ninho, o que permite que atos altruísticos sejam direcionados a indivíduos aparentados (Blomquist e Bagnères 2010; Martin et al., 2008a; Vilela e Della Lucia 2001).

Assim como é importante reconhecer as companheiras do ninho, é também importante identificar os parceiros sexuais (Howard e Blomquist 2005). Em diversas espécies de insetos, os HC têm um papel importante durante o acasalamento (Beibl et al., 2007). Em *Drosophila*, por exemplo, a percepção de alguns HC específicos permite o desencadeamento de algumas fases durante o acasalamento (Ferveur 2005). Machos de *Tenebrio molitor* (Carazo et al., 2004) e *Teleogryllus oceanicus* (Thomas e Simmons 2007) são capazes de reconhecer o status reprodutivo das fêmeas (virgens ou acasaladas) através do seu perfil de HC. Em insetos sociais, a percepção do macho pelas operárias afeta a distribuição espacial da colônia, assim como a divisão de tarefas e possíveis conflitos com a produção de machos (Smith et al., 2014).

Poucos estudos têm analisado o perfil de HC de machos em insetos sociais, quando comparados com os estudos feitos com rainhas e operárias (Chernenko et al., 2012; Smith et al., 2014). A maioria desses estudos encontrou diferenças quantitativas na concentração de HC entre machos e fêmeas jovens (Antonialli et al., 2007; Beibl et al., 2007; Carlos 2013; Chernenko et al., 2012; Inbar e Privman, 2019). Smith et al., (2016) reportaram que o perfil de HC de machos de quatro espécies de *Odontomachus* foi diferente do perfil das fêmeas (operárias e rainhas) devido ao incremento relativo de pentacosadienes, pentacosenes e pentacosane, os quais representaram entre 39 e 58% do perfil. Por outro lado,

Johnson e Sundström (2012) encontraram que o C<sub>27:1</sub> esteve presente só na cutícula dos machos e operárias de *Formica truncorum*, e os compostos: C<sub>19:1</sub>, *n*-C<sub>31</sub>, 3-MeC<sub>31</sub>, 10-MeC<sub>32</sub> e C<sub>33:1</sub> foram encontrados somente na cutícula das rainhas jovens. Campos et al., (2012) analisaram os perfis cuticulares de rainhas (virgens e acasaladas), machos e operárias de *Camponotus textor*, e observaram que alguns compostos foram exclusivos para as rainhas e que eles poderiam estar associados ao seu status reprodutivo. Por outro lado, machos e operárias não apresentaram nenhum composto exclusivo.

Em formigas-cortadeiras não há informação sobre o perfil de HC dos machos, os estudos realizados até agora foram focados nas suas glândulas mandibulares. Bento et al., (2007) demonstraram que as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* respondem de maneira mais intensa aos compostos da glândula mandibular de machos que de rainhas virgens. Segundo os autores, a metade das operárias analisadas responderam correndo com a mandíbula aberta até a fonte do extrato e 40% correram “excitadas” pela arena. Segundo Fowler (1982), a agressividade observada nas operárias frente aos compostos da glândula mandibular de machos, é um comportamento que evitaria que rainhas recém-acasaladas construam seus formigueiros perto de uma colônia madura. As glândulas mandibulares de machos virgens de *Atta laevigata* contêm 4-methyl-3-heptanone e 4-methyl-3-heptanol (Hernández et al., 1999), esse último composto também foi encontrado em machos de *A. sexdens rubropilosa* e sua alta concentração sugere um papel importante na atração das rainhas (do Nascimento et al., 1993). Até agora os estudos realizados sobre os HC de formigas-cortadeiras têm sido focados nas operárias (Richard et al., 2007; Valadares e Nascimento 2016; 2017; Viana et al., 2001). O objetivo deste trabalho é descrever pela primeira vez o perfil de HC de machos de *A. sexdens* e comparar este com o perfil de rainhas capturadas após a revoadada.



## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta de rainhas e machos de Atta sexdens*

Foram coletadas 25 rainhas e 14 machos de *A. sexdens* durante a revoada, em 12 de novembro de 2017, no distrito de Santa Maria de Campos, RJ, Brasil (21°15'58.09"S 41°25'46.70"W). As formigas foram capturadas no solo. As rainhas aladas e os machos foram colocados individualmente em copos plásticos transparentes (200 mL). Nos copos das fêmeas foram adicionados, aproximadamente, 150 g de terra do mesmo lugar onde foram capturadas. Nos copos de macho não foi adicionada terra. Nenhum tipo de alimento foi oferecido. Após 24 horas, as rainhas foram categorizadas segundo o comportamento. Foi assumido que as fêmeas que perderam as asas e começaram a escavação eram acasaladas, portanto são como rainhas fecundadas, segundo descrito por Fujihara et al., (2012). As fêmeas que não escavaram e mantiveram suas asas foram consideradas como rainhas virgens.

### *Preparação de extratos cuticulares*

Os indivíduos foram colocados individualmente em frascos de 5 mL e mantidos a -4°C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de pentano em cada frasco e após 10 minutos, os indivíduos foram retirados do frasco e o pentano evaporado com nitrogênio. Os extratos foram conservados a -4°C.

### *Análise de cromatografia gasosa e identificação dos hidrocarbonetos cuticulares*

Os extratos cuticulares das rainhas acasaladas (n=12), rainhas virgens (n=12) e machos (n=11) foram analisados em um cromatógrafo acoplado com espectrômetro de massas (CG-EM) SHIMADZU QP2010, no Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil. Todas as amostras foram ressuspensas em 30 µL de pentano e injetadas manualmente (1µL) no modo *splitless*. A coluna utilizada foi DB-5 (30 m x 0.250 mm x 0.25 µm) fundida com sílica. Hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura inicial foi

de 100°C, mantida por 2 min., elevada até 240°C com uma taxa de variação de 30°C.min<sup>-1</sup>; seguido por um aumento até 280°C com uma taxa de variação de 3°C.min<sup>-1</sup>, sendo mantido nessa temperatura por 10 min. Finalmente, o forno foi aquecido até 290°C com uma taxa de variação de 2°C.min<sup>-1</sup> e um tempo de espera de 10 min. A ionização foi realizada por impacto de elétrons (70 eV) e obtenção do fragmentograma de íons totais (TIC). A temperatura de interface e da fonte de íons foi de 240°C. Foi calculado o Índice de Retenção Linear (IRL) para cada composto com ajuda de um padrão externo (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) de alcanos saturados Sigma-Aldrich®. Cada composto foi identificado pelo seu espectro de massas e consulta das bibliotecas NIST (National Institute of Standards and Technologies, Mass Spectra Libraries). O IRL foi utilizado para a comparação dos compostos como registrado na literatura.

#### *Análise estatística*

O número de hidrocarbonetos cuticulares usado nas análises foi reduzido segundo proposto por Liebig et al., (2000). Os compostos que contribuíram com menos de 0.3% para o total de compostos por indivíduo e estiveram presentes em até 70% dos indivíduos não foram incluídos nas análises estatísticas. Os HC que mostraram diferenças qualitativas entre os grupos foram comparados separadamente. Os HC restantes foram standardizados a 100% e submetidos a análises multivariadas. As áreas foram transformadas de acordo com a fórmula de Reyment:  $Z_{ij} = \log[X_{ij}/g(X_j)]$ , onde  $X_{ij}$  é a área do pico  $i$  encontrado na formiga  $j$ ,  $g(X_j)$  é a média geométrica da área de todos os picos presentes no perfil da formiga  $j$ , e  $Z_{ij}$  é a área transformada para o pico  $i$  da formiga  $j$  (Reyment, 1989). As variáveis que não cumpriram com o suposto da normalidade não foram incluídas na análise. Foi realizada a análise de componentes principais (PCA) para reduzir o número de variáveis descritivas. Os fatores extraídos foram usados para realizar uma análise discriminante (DA) e verificar se machos e rainhas podem ser separados em base ao seu perfil de HC. Foi utilizada a Análise Multivariada de Permutação de Variância (PerMANOVA), com 9999 permutações, para determinar as diferenças entre os perfis químicos das rainhas e machos. Finalmente foi realizada a análise de componentes coordenados (PCoA), utilizando as distâncias de Gower, para

visualizar as diferenças entre os grupos, incluindo todos os compostos. As análises estatísticas foram feitas no programa PAST 3.02.

## RESULTADOS

Foram identificados 46 compostos na cutícula de machos e rainhas de *A. sexdens*. Após retirar os compostos que representavam menos de 0.3% para o total de compostos por indivíduo e que estiveram presentes em até 70% dos indivíduos a quantidade de compostos passou a ser de 38. Desses compostos, *n*-C<sub>35</sub>; 7,11-; 7,13-DiMeC<sub>35</sub>; 5,9-; 5,11-; 5,13-DiMeC<sub>35</sub> e 7,11,15-TriMeC<sub>35</sub> foram encontrados somente na cutícula dos machos (Fig. 1). O 3,7,11-TriMeC<sub>32</sub>, ácido Tetradecanoico eicosil éster e ácido Hexadecanoico eicosil éster foram encontrados exclusivamente na cutícula das rainhas fecundadas e virgens (Fig. 1). Já o *n*-C<sub>33</sub> e 6,10,14-TriMeC<sub>34</sub> foram encontrados na cutícula das rainhas fecundadas e machos (Fig. 1).

Segundo a análise de PerManova existem diferenças significativas entre os perfis de HC dos grupos (Pseudo-F=5.559; p=0.0029). Quando comparados os perfis, incluindo os compostos exclusivos para cada grupo, foi possível visualizar que rainhas virgens (p=0.0129) e as rainhas acasaladas (p=0.0033) são significativamente diferentes dos machos. Não houve diferenças significativas entre rainhas virgens e acasaladas. Após retirar os compostos exclusivos, a análise de PerManova foi repetida, desta vez com 27 compostos e confirmou diferenças quantitativas entre os grupos (F=4.4; p=0.0078). As rainhas acasaladas (p=0.0042) e virgens (p=0.0327) foram significativamente diferentes dos machos. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos de rainhas.

A análise de PCA separou parcialmente os machos dos grupos de rainhas (Fig. 2). O PCA foi realizado sem os compostos exclusivos para cada grupo e produziu 23 componentes principais. Desses componentes foram escolhidos os primeiros cinco, os quais explicaram 98.32% da variabilidade observada. Esses componentes foram utilizados para fazer o DA, o qual produz um único eixo que explicou 100% da variabilidade, o qual significa que machos e fêmeas podem ser

classificados separadamente a partir do seu perfil de HC. Assim, 100% dos indivíduos foram classificados corretamente dentro dos grupos designados.

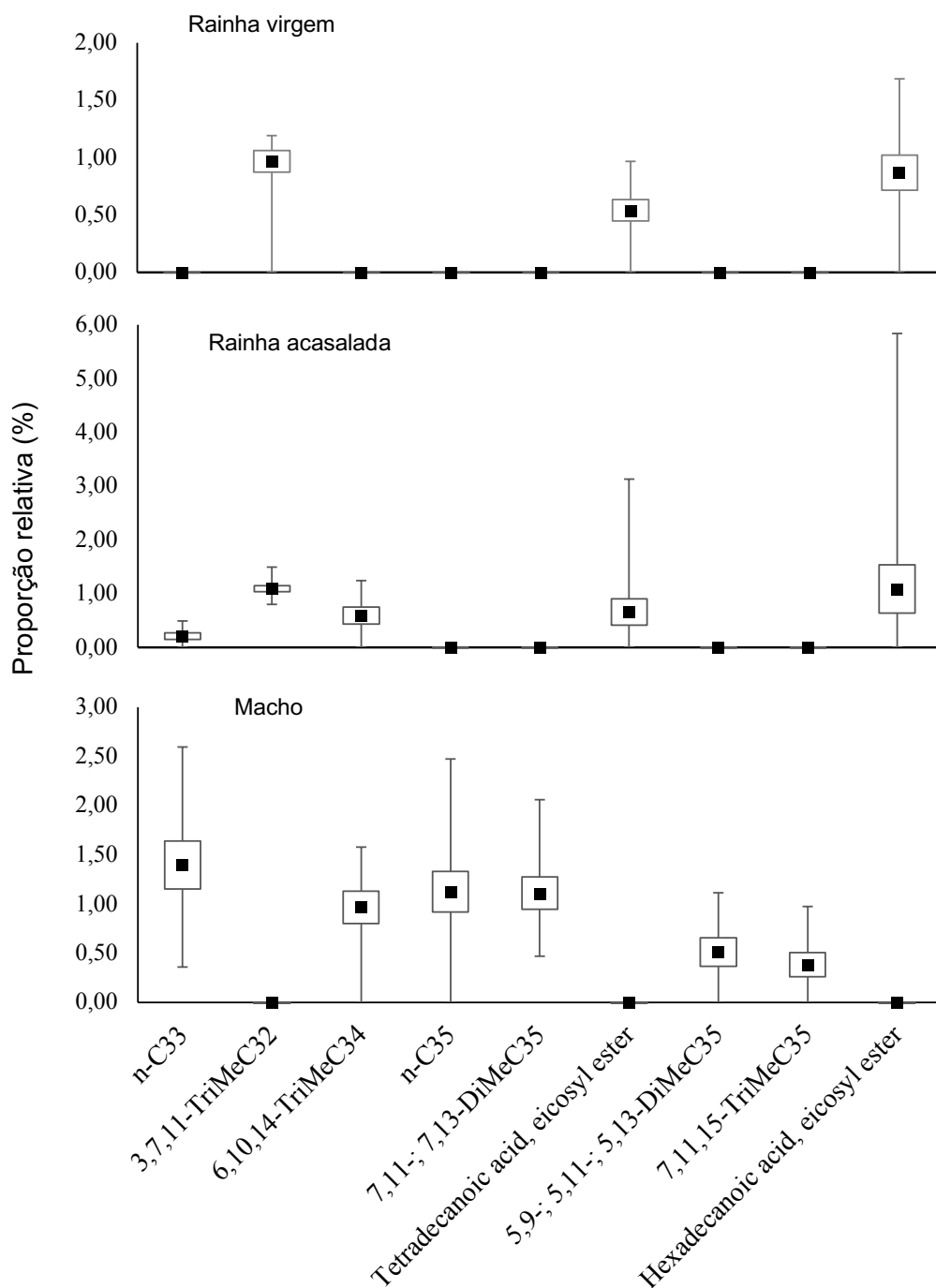


Figura 1. Compostos exclusivos encontrados na cutícula das rainhas e machos de *Atta sexdens*. ■ Média □ Média ± Erro padrão; ⊥ Máximo e Mínimo.

Finalmente foi feita a análise de PCoA, incluindo os compostos exclusivos para cada grupo, onde se visualizou a separação total entre machos e fêmeas (Fig. 3), demonstrando a importância dos compostos exclusivos na classificação das formigas analisadas.

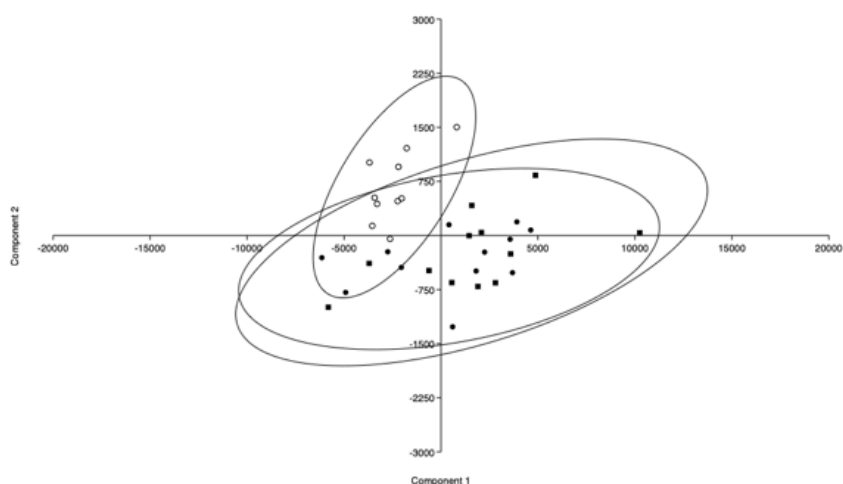


Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares de machos e rainhas (virgens e acasaladas) de *A. sexdens*. Foram utilizados 27 compostos. ● Rainhas acasaladas. ■ Rainhas virgens. ○ Machos. As elipses representam intervalos de confiança ( $p < 0.05$ ).

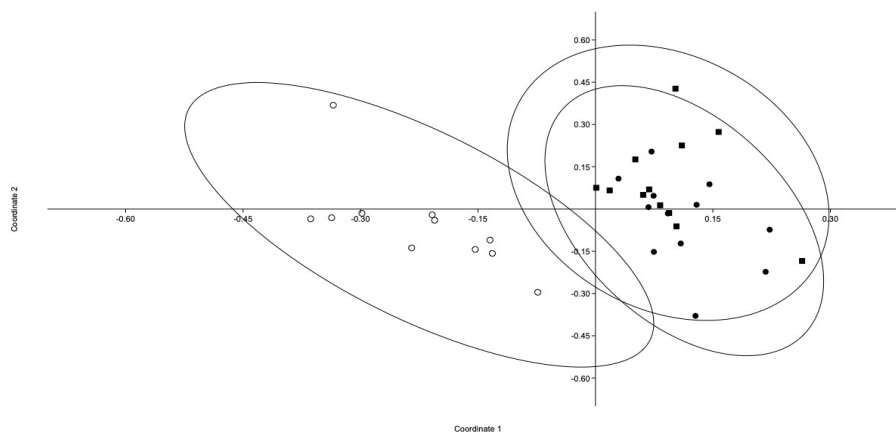


Figura 3. Análise de Componentes Coordenados (PCoA) dos perfis de HC de machos e fêmeas incluindo os compostos exclusivos. ● Rainhas acasaladas. ■ Rainhas virgens. ○ Machos. As elipses representam intervalos de confiança ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado que machos e rainhas de *A. sexdens* possuem perfis de hidrocarbonetos cuticulares diferentes. Os machos, assim como as rainhas, têm na sua cutícula compostos exclusivos. Além das diferenças qualitativas, os perfis apresentaram também diferenças quantitativas. Esses resultados são similares aos reportados por Carlos (2013), que encontrou diferenças quantitativas e qualitativas no perfil de machos e fêmeas jovens de quatro espécies de formigas-cortadeiras. Chernenko et al., (2012) encontraram que machos e rainhas jovens de *Formica fusca* além de apresentar diferenças qualitativas e quantitativas no seu perfil de HC, também possuem compostos colônia-específicos.

Na maioria de espécies de formigas, os machos não realizam tarefas específicas no interior dos ninhos e têm um período curto de vida, pois morrem após o acasalamento (Boomsma et al., 2005). As rainhas do gênero *Atta* podem acasalar múltiplas vezes, o que incrementa a exposição a patógenos e predadores (Fjerdingstad e Boomsma, 1998). Nesta situação, o reconhecimento rápido do parceiro sexual resulta conveniente. Esse reconhecimento pode ser através de compostos voláteis produzidos pela glândula mandibular dos machos (Nascimento et al., 1993; Hernández et al., 1999; Ayasse et al., 2001) ou através de compostos cuticulares, como tem sido descrito para outras ordens de insetos (Ginzel et al., 2003; Carazo et al., 2004). As diferenças quantitativas e qualitativas observadas entre machos e rainhas permitem pensar que os HC podem ter um papel no reconhecimento de indivíduos reprodutores de *A. sexdens* durante a revoada.

Até o momento só um estudo tem explorado o perfil de HC de machos de formigas-cortadeiras. Carlos (2013) observou que a cutícula de rainhas virgens de *Atta laevigata*, *Atta capiguara*; *Atta bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* apresenta uma maior diversidade de compostos que a cutícula dos machos. Rodríguez et al., (dados não publicados) observaram que rainhas jovens de *A. sexdens* têm diferenças qualitativas quando comparadas com as operárias. Por sua vez, Valadares e do Nascimento (2016) encontraram que existem diferenças quantitativas entre diferentes subcastas de operárias de *A. sexdens*. Alguns

compostos aqui reportados para os indivíduos reprodutores são diferentes dos encontrados por Valadares e do Nascimento (2016; 2017), os quais analisaram os HC de operárias de *A. sexdens*. Por outro lado, as diferenças entre perfis de HC podem ser explicadas por diferentes variáveis, tais como: a rampa de temperatura utilizada na análise cromatográfica, diferenças genéticas (Van Zweden et al., 2010), ambientais (Menzel et al., 2018) e nutricionais (Lambardi et al., 2004), que podem afetar o perfil de hidrocarbonetos em formigas.

Alguns estudos têm demonstrado a importância dos alcanos ramificados e alcenos no reconhecimento de companheiras no interior das colônias (Howard e Blomquist, 2005, Martin et al., 2008b). Neste estudo os machos apresentaram na sua cutícula compostos ramificados exclusivos, os quais podem ser importantes para seu reconhecimento por parte das operárias dentro do ninho. Segundo Martin et al., (2008b), os alcanos lineares não têm papel no reconhecimento das companheiras, pelo que considera que a presença do *n*-C<sub>35</sub> na cutícula dos machos oferece proteção contra a dessecação após sair do ninho. Segundo Hora et al., (2007), o aumento na concentração de *n*-C<sub>27</sub> em rainhas acasaladas de *Ectatomma tuberculatum* pode oferecer uma proteção contra as condições ambientais durante o acasalamento e a construção de um novo formigueiro.

## CONCLUSÕES

As análises estatísticas não mostraram diferenças significativas entre as rainhas, o que significa que o perfil de HC das rainhas de *A. sexdens* não muda após o acasalamento, como já foi demonstrado para outras espécies de formigas (Hora et al., 2008; Opiel e Heinz, 2009; Monnin et al., 2018). Opiel e Heinz (2009) observaram que o perfil de HC de fêmeas acasaladas de *Leptothorax gredleri* foi significativamente diferente das fêmeas virgens, após 30 minutos do acasalamento, resultando menos atrativas para os machos. Tendo em conta que não foram observadas diferenças quantitativas nem qualitativas no perfil das rainhas, foi proposto no presente trabalho que a ausência de mudanças no perfil de HC das rainhas de *A. sexdens* favorece a ocorrência de múltiplos acasalamentos das

rainhas de formigas-cortadeiras (Reichardt e Wheeler, 1996; Fjerdingstad e Boomsma, 1998). Desta maneira, os HC da rainha de *A. sexdens* estariam ligados à manutenção da hierarquia dentro do formigueiro, e indicariam a presença de um indivíduo fértil dentro da colônia. Recomenda-se a avaliação do caráter informativo do perfil de HC da rainha para o macho durante o acasalamento.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antoniali WF, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR (2007) Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet Mol Res* 6(3): 492-499.

Ayasse M, Paxton RJ, Tengö J (2001) Mating Behavior and Chemical Communication in the Order Hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 46:31-78. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.31>

Bagnères AG, Blomquist GJ (2010) Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbon. In: Blomquist GJ, Bagnères AG (eds) *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*, Cambridge University Press, pp 75-99

Beibl J, d'Ettorre P, Heinze J (2007) Cuticular profiles and mating preference in a slave-making ant. *Insect Soc* 54:174-182. <https://doi.org/10.1007/s00040-007-0929-6>

Bento JMS., Della Lucia TM, do Nascimento RR, Bergmann J, Morgan ED (2007) Response of workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) to mandibular gland compounds of virgin males and females. *Physiol Entomol* 32:283-286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2007.00570.x>



Boomsma JJ, Baer B, Heinze J (2005) The Evolution of Male Traits in Social Insects. *Annu Rev Entomol* 50:395-420. <https://10.1146/annurev.ento.50.071803.130416>

Campos MCGC, Campos MLG, Turatti IC, Nascimento FS (2012) Cuticular hydrocarbon variation of castes and sex in the weaver ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 59:1025-1035.

Carazo P, Sanchez E, Font E, Desfilis E (2004) Chemosensory cues allow male *Tenebrio molitor* beetles to assess the reproductive status of potential mates. *Anim Behav* 68:123-129. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.10.014>

Carlos AA (2013) Semioquímicos e comunicação sonora em formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae). Tese, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

do Nascimento RR, Morgan ED, Billen J, Schoeters E, Della Lucia TMC, Bento MS (1993) Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *J Chem Ecol* 19(5):907-918. <https://doi.org/10.1007/BF00992527>

Chernenko A, Holman L, Helanterä H, Sundström L (2012). Cuticular chemistry of males and females in the ant *Formica fusca*. *J Chem Ecol* 38:1474-1482. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0217-4>

Geiselhardt S, Otte T, Hilker M (2009) The Role of Cuticular Hydrocarbons in Male Mating Behavior of the Mustard Leaf Beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). *J Chem Ecol* 35:1162-1171 <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9704-7>

Ginzel MD, Blomquist GJ, Millar JG., Hanks LM (2003) Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *J Chem Ecol* 29:533-545. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-005-5296-z>

Fjerdingstad EJ, Boomsma JJ (1998) Multiple mating increases the sperm stores of *Atta colombica* leafcutter ant queens. *Behav Ecol Sociobiol* 42:257-261. <https://doi.org/10.1007/s00265005043>

Fowler HG (1982) Male induction and function of workers' excitability during swarming in leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera, Formicidae). *Int J Invertebr Reprod* 4:333-335. <https://doi.org/10.1080/01651269.1981.10553441>

Fujihara RT, Camargo RS, Forti LC (2012) Lipid and energy contents in the bodies of queens of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae): pre-and post-nuptial flight. *Rev Bras Entomol* 56(1):73-75. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262012005000015>

Hernández JV, Cabrera A, Jaffé K (1999) Mandibular gland secretion in different castes of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. *J Chem Ecol* 24:2433-2444.

Herzner G, Strohm E (2007) Fighting fungi with physics - prey embalming by a solitary wasp prevents water condensation. *Curr Biol* 17:R46-R47. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.060>

Hora RR, Ionescu-Hirsh A, Simon T, Delabie J, Robert J, Fresneau D, Hefetz A (2008) Postmating changes in cuticular chemistry and visual appearance in *Ectatomma tuberculatum* queens (Formicidae: Ectatomminae). *Naturwissenschaften* 95:55-60. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0287-2>

Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50(1):371-393. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359>

Inbar S, Privman E (2019) Differences in Long-Chained Cuticular Hydrocarbons between Males and Gynes in *Cataglyphis* Desert Ants. *bioRxiv* 538926. <https://doi.org/10.1101/538926>

Johnson CA, Sundström L (2012) Cuticular chemistry of two social forms in a facultatively polygyne ant (Hymenoptera: Formicidae: *Formica truncorum*). *Ann Zool Fennici* 49:1-17. <https://doi.org/10.5735/086.049.0101>

Lambardi D, Chegia B, Turillazzi S, Boomsma JJ (2004) Diet-aggression among colonies of the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Redia* 87:219-221.

Liebig J, Peeters C, Oldham NJ, Markstädter C, Hölldobler B (2000) Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*? *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):4124–4131. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4124>

Martin SJ, Helanterä H, Drijfhout FP (2008) Colony-specific hydrocarbons identify nest mates in two species of *Formica* ant. *J Chem Ecol* 34:1072-1080. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9482-7>

Menzel F, Zumbusch M, Feldmeyer B (2018) How ants acclimate: Impact of climatic conditions on the cuticular hydrocarbon profile. *Funct Ecol* 32:657-666. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13008>

Monnin T, Helft F, Leroy C, d’Ettorre P, Doums C (2018) Chemical characterization of young virgin queens and mated egg-laying queens in the ant *Cataglyphis cursor*. Random Forest classification analysis for multivariate datasets. *J Chem Ecol* 44(2):127-136. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0923-7>

Oppelt A, Heinze J (2009) Mating is associated with immediate changes of the hydrocarbon profile of *Leptothorax gredleri* ant queens. *J Insect Physiol* 55:624-628. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.03.010>

Reichardt AK, Wheeler DE (1996) Multiple mating in the ant *Acromyrmex versicolor*: a case of female control. *Behav Ecol Sociobiol* 38:219-225. <https://doi.org/10.1007/s002650050235>

Reyment RA (1989) Compositional data analysis. *Terra Nova* 1(1):29-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3121.1989.tb00322.x>

Richard FJ, Poulsen M, Drijfhout F, Jones G, Boomsma JJ (2007) Specificity in chemical profiles of workers, brood and mutualistic fungi in *Atta*, *Acromyrmex*, and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. *J Chem Ecol* 33(12):2281-2292. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9385-z>

Smith AA, Vanderpool W, Millar JG, Hanks LM, Suarez AV (2014) Conserved male-specific cuticular hydrocarbon patterns in the trap-jaw ant *Odontomachus brunneus*. *Chemoecology* 24:29-34. <https://doi.org/10.1007/s00049-013-0143-0>

Smith AA, Millar JG, Suarez AV (2016) Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. *J Exp Biol* 219(3):419–430. <https://doi.org/10.1242/jeb.128850>

Thomas ML, Simmons LW (2007) Male Crickets Adjust the Viability of Their Spermin Response to Female Mating Status. *Am Nat* 170(2):190-195. <https://doi.org/10.1086/519404>

Thomas ML, Simmons LW (2008) Sexual dimorphism in cuticular hydrocarbons of the Australian field cricket *Teleogryllus oceanicus* (Orthoptera: Gryllidae). *J Insect Physiol* 54:1081-1089. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.012>

Valadares L, do Nascimento FS (2016) Chemical cuticular signature of leafcutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) worker subcastes. *Rev Bras Entomol* 60(4):308-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.06.008>

Valadares L, do Nascimento FS (2017) Changes in the cuticular hydrocarbon profile associated with the molting cycle correlate with the hydrocarbon profile of the fungus cultivated by the ant *Atta sexdens*. *Insect Soc* 64(4):591-596. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0581-8>

van Zweden JS, Brask JB, Christensen JH, Boomsma JJ, Linksvayer TA, d'Ettorre P (2010) Blending of heritable recognition cues among ant nestmates creates distinct colony gestalt odours but prevents within-colony nepotism. *J Evol Biol* 23(7):1498-1508. doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02020.x

Viana AMM, Frézard A, Malosse C, Della Lucia TMC, Errard C, Lenoir A (2001) Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* 11(1):29-36. <https://doi.org/10.1007/PL00001829>

Vilela EF, Della Lúcia TMC (2001) Introdução aos semioquímicos e terminologia. In: Vilela EF, Della Lucia TMC, Feromônios de insetos - Biologia, química e emprego no manejo de pragas, 2nd ed., Holos, Ribeirão Preto, p. 9-206

### 3.3. VARIAÇÃO TEMPORAL DO PERFIL DE HIDROCARBONETOS CUTICULARES EM RAINHAS JOVENS DE *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

#### RESUMO

Para o adequado funcionamento das colônias de formigas é importante que a rainha comunique sua presença para as operárias. Essa comunicação é realizada por contato direto entre rainha e operárias ou através de sinais químicos. Como primeiro passo na identificação de um sinal químico que possa comunicar a presença da rainha de *Atta sexdens* dentro da colônia, foi analisado o perfil de hidrocarbonetos cuticulares de rainhas jovens, desde a fundação do formigueiro até seis meses de idade. Para isto, foram coletadas 72 rainhas durante a revoada. As rainhas foram individualizadas e mantidas em potes plásticos com terra durante 6 meses. Foram realizados extratos cuticulares das rainhas da seguinte maneira: Tempo 0: 24 horas após a coleta (N=20); Tempo 1: 50 dias de idade (N=10); Tempo 2: 180 dias de idade (N=10). Adicionalmente, foram analisados extratos cuticulares de rainhas com aproximadamente 4 anos de idade (N=7). Os resultados mostraram diferenças quantitativas entre os grupos. Três metil ésteres foram responsáveis pelas diferenças qualitativas entre as rainhas analisadas. Estes compostos apareceram nas rainhas com 50 dias de idade e sua concentração aumentou com o passar do tempo, chegando a representar mais de 60% da proporção relativa dos

compostos presentes na cutícula de rainhas maduras. Estes resultados permitem pensar que esses compostos podem fazer parte do sinal químico da rainha de *A. sexdens* e que sua concentração estaria diretamente relacionada com o desenvolvimento da colônia.

#### ABSTRACT

For the proper functioning of the ant colonies it is important that the queen communicates her presence to the workers. This communication is accomplished by direct contact between queen and workers or through chemical signals. As a first step in identifying a chemical signal that could communicate the presence of the queen of *Atta sexdens* within the colony, we analyzed the cuticular hydrocarbon profile of young queens from nest foundation to six months of age. Seventy-two queens were collected during flight mating. The queens were individualized and kept in plastic pots with soil for 6 months. Cuticular extracts of the queens were performed as follows: Time 0: 24 hours after collection (N = 20); Time 1: 50 days old (N = 10); Time 2: 180 days old (N = 10). Additionally, cuticular extracts from queens approximately 4 years old were analyzed (N = 7). The results showed quantitative differences between the groups. Three methyl esters were responsible for the qualitative differences between the queens analyzed. These compounds appeared in 50-day-old queens and their concentration increased over time, accounting for more than 60% of the relative proportion of the compounds present in mature queens' cuticle. These results allow us to think that these compounds may be part of the chemical signal of the queen of *A. sexdens* and that their concentration would be directly related to colony development.

## INTRODUÇÃO

As colônias de formigas-cortadeiras de folhas, assim como de outros insetos sociais, funcionam como uma unidade social organizada, na qual diferentes grupos de indivíduos (conhecidos como castas) realizam diversas tarefas. O sucesso destes insetos está baseado em um sistema de comunicação bem desenvolvido e uma sofisticada regulação social (Le Conte e Hefetz, 2008). A comunicação química, eixo central no funcionamento das colônias, faz uso dos hidrocarbonetos cuticulares (HC) como sinais informativos. Através do HC as formigas conseguem discriminar as companheiras do ninho (Guerreri et al., 2009; Hölldobler e Wilson, 2011; Monnin, 2006), garantindo assim que os recursos sejam para os membros da colônia (Nehring et al., 2011). Vários estudos têm demonstrado que o perfil de HC das rainhas serve para as operárias reconhecê-las como indivíduos encarregados da reprodução (d’Ettorre, 2004; Hannonen et al., 2002; Holman et al., 2010; Smith et al., 2009) e que alguns HC específicos inibem a atividade reprodutiva nas operárias (Endler et al., 2004; Le Conte e Hefetz, 2008; Motais de Narbonne et al., 2016; van Oystaeyen et al., 2014).

Na maioria das espécies de formigas a reprodução é feita unicamente pela rainha e atualmente, não existe um consenso sobre a origem e evolução do seu perfil químico (Villalta et al., 2018). Alguns estudos mostraram que certos compostos são compartilhados por vários gêneros de insetos sociais, o que sugere que o feromônio da rainha deriva de um sistema de comunicação ancestral (Oi et al., 2016; Smith et al., 2013; van Oystaeyen et al., 2014). Porém, isso não é observado em todos os insetos sociais. Evinson et al., (2012) encontraram que sinais associados com o status reprodutivo das rainhas de morfoespécies de *Pachycondyla verena* são diferentes entre populações geograficamente separadas. Por sua vez, Smith et al., (2016) encontraram que os HC próprios das rainhas não são os mesmos nas diferentes espécies do gênero *Odontomachus*.

Dois hipóteses têm sido amplamente discutidas para explicar os possíveis cenários evolutivos nos quais se desenvolveram os sinais químicos da rainha (Amsalem et al., 2015; Keller e Nonacs, 1993; Smith e Liebig, 2017; Villalta et al., 2018). Na primeira hipótese o feromônio da rainha atua como inibidor do desenvolvimento dos ovários nas operárias (Holman et al., 2010, 2013; Smith e



Liebig, 2017). Holman et al., (2010) observaram que rainhas (e seus ovos) de *Lasius niger* possuem grandes quantidades de 3-MeC<sub>31</sub>, composto que reduz a taxa de amadurecimento dos ovários nas operárias. Neste cenário, prevê-se uma competição entre rainha (dominante) e operárias (subordinadas) (Le Conte e Hefetz, 2008) evolutivamente instável (Keller e Nonacs, 1993). Outra hipótese prediz que o feromônio da rainha é um “sinal honesto de fertilidade”, o que representa um sinal de dominância ao qual as operárias respondem com o cuidado da cria (Amsalem et al., 2015). Este feromônio estaria relacionado com sua fertilidade e capacidade de ovipositar (Liebig et al., 2000; Smith e Liebig, 2017). O composto (Z)-9-Nonacosene é considerado o sinal de fertilidade das rainhas de *Odontomachus brunneus* (Smith et al., 2012, 2013). Já as gamergates de *Dinoponera quadriceps* estão caracterizadas por altos níveis de 9-MeC<sub>31</sub> na sua cutícula (Monnin e Ratnieks, 2001; Peeters et al., 1999).

Nas formigas cortadeiras pouco conhecimento se tem sobre a existência de um feromônio de rainha. Bento (1983) observou que a rainha de *Atta sexdens rubropilosa* é muito atrativa para as operárias de sua própria colônia, e propôs que os compostos responsáveis são pouco voláteis. Dijkstra et al., (2005) observaram que operárias (*Atta* e *Acromyrmex*) próximas da rainha têm o aparelho reprodutor ativo e colocam ovos tróficos, enquanto que as operárias forrageiras têm o aparelho reprodutor inativo ou pouco desenvolvido. Alguns compostos na cutícula de rainhas de *A. sexdens* poderiam estar relacionados com o desenvolvimento do seu aparelho reprodutor e constituir um sinal de fertilidade para as operárias (Rodríguez et al., *dados não publicados*). Assim, o objetivo deste trabalho é verificar se ocorre variação do perfil de HC de rainhas de *A. sexdens* ao longo do tempo, especialmente durante os primeiros meses de fundação do formigueiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Coleta de rainhas de Atta sexdens*

Rainhas de *A. sexdens* (N=72) foram coletadas durante a revoada ocorrida em 27 de outubro de 2018, em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil (21°46'01,63"S 41°16'18.98"W). As rainhas foram capturadas no momento que escavavam o formigueiro e posteriormente colocadas individualmente em copos plásticos transparentes (250 mL ou 500 mL) com terra (150 ou 300 g) do mesmo lugar de onde foram capturadas. Nenhum alimento lhes foi oferecido. As rainhas foram mantidas com temperatura ambiente no laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Fig. 1). As condições de luz e umidade não foram controladas.

### *Análise da variação do perfil de HC de rainha de A. sexdens*

Para avaliar o perfil de HC das rainhas coletadas foram definidos três momentos para realizar a amostragem: Tempo 0: depois da revoada; Tempo 1: aparição das primeiras operárias, Tempo 2: seis meses após a coleta em campo.



Figura 1. Esquerda: coleta em campo das rainhas de *A. sexdens*. Direita: Disposição no laboratório de cada formigueiro.

Tempo 0: Após 24 horas da coleta, foram escolhidas aleatoriamente rainhas acasaladas (que escavaram)(N=11) e rainhas virgens (que não escavaram)

(N=9). Para preparar os extratos, cada rainha foi colocada em um frasco de 5 mL, no freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e posteriormente adicionados 3 mL de pentano em cada. Depois de 10 minutos, cada rainha foi retirada e o pentano evaporado. Os frascos com os extratos foram etiquetados e conservados a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

Tempo 1: As primeiras operárias foram observadas 50 dias após a coleta das rainhas. Neste momento, se escolheram aleatoriamente 10 formigueiros e foi avaliado o perfil de HC das rainhas correspondentes. A preparação do extrato seguiu o procedimento descrito anteriormente. Ovos, larvas, pupas e operárias desses ninhos foram contabilizados.

Tempo 2: Após 60 dias da coleta das rainhas, 15 formigueiros foram dispostos em bandejas e seus potes abertos para permitir o forrageio por parte das operárias (Fig. 2). Os formigueiros receberam flores de rosa (*Rosa alba* L.) como recurso vegetal. Passados 180 dias, foram escolhidos aleatoriamente 10 destes formigueiros para avaliação do perfil de HC das rainhas. Os extratos foram preparados seguindo o procedimento já descrito. Ovos, larvas, pupas e operárias desses ninhos foram contabilizados.

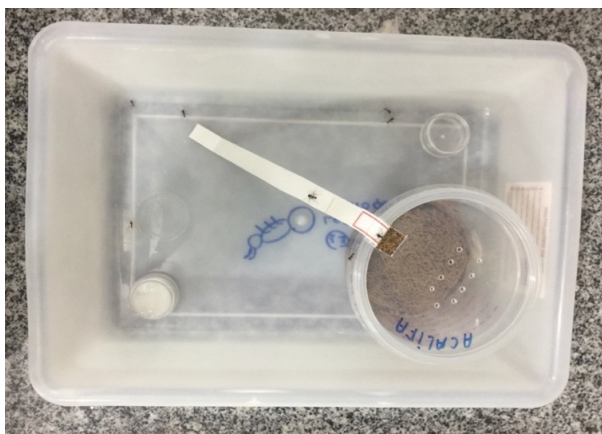


Figura 2. Formigueiro de *A. sexdens* com dois meses de idade.

Foram preparados extratos cuticulares de sete rainhas maduras de *A. sexdens*, de quatro anos de idade aproximadamente, pertencentes a colônias criadas no laboratório, seguindo o procedimento descrito anteriormente. Os ninhos foram coletados em São Francisco de Itabapoana, Brasil ( $21^{\circ}26'42.38''\text{S}$   $41^{\circ}12'01.30''\text{W}$ ), em 2015.

### *Análise de cromatografia gasosa e identificação dos HC*

Os extratos cuticulares foram analisados em um cromatógrafo acoplado com espectrômetro de massas (CG-EM) SHIMADZU QP2010, no Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil. Todas as amostras foram ressuspensas em 30 µL de pentano e injetadas manualmente (1µL). A coluna utilizada foi DB-5 (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm) fundida com sílica. Hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura inicial foi de 100 °C por dois min., e elevada até 240 °C com uma taxa de variação de 30 °C/min.; depois aumentou até 280 °C com uma taxa de variação de 3°C/min. e com um tempo de espera de 10 min; finalmente, até 290 °C com uma taxa de variação de 2°C/min. e um tempo de espera de 10 min. A ionização foi realizada por impacto de elétrons (70 eV) e obtenção do fragmentograma de íons totais (TIC). A temperatura de interface e da fonte de íons foi de 240°C. Foi calculado o Índice de Retenção Linear (IRL) para cada composto com ajuda de um padrão externo (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>) de alcanos saturados Sigma-Aldrich®. Cada composto foi identificado pelo seu espectro de massas e consulta das bibliotecas NIST. O IRL foi utilizado para a comparação dos compostos como registrado na literatura.

### *Análise estatística*

O número de hidrocarbonetos cuticulares usados nas análises foi reduzido segundo o proposto por Liebig et al., (2000). Os compostos que contribuíram com menos de 0,3% para o total de compostos por indivíduo e estiveram presentes em até 70% dos indivíduos não foram incluídos nas análises estatísticas. Os HC restantes foram estandardizados a 100% e submetidos a análises multivariadas. Foi realizada a Análise Multivariada de Permutação de Variância (PerMANOVA), com 9999 permutações, para determinar as diferenças entre os perfis químicos dos diferentes grupos. Posteriormente, foi realizada a Análise de Similaridade SIMPER, para identificar os compostos que mais influenciaram nas diferenças qualitativas entre os grupos de rainhas analisadas. Finalmente foi realizada a análise de componentes coordenados (PCoA), utilizando as distâncias de Gower, para visualizar as diferenças entre os grupos. As análises estatísticas foram feitas no programa PAST 3.02.

## RESULTADOS

Foram observadas diferenças quantitativas significativas entre os grupos de rainhas quando comparados os perfis de HC (Pseudo-F=70,64;  $p=0,001$ ). Só a comparação do perfil das rainhas virgens com as rainhas acasaladas (tempo 0) que não apresentou diferenças significativas ( $p=0,078$ ). Foram observadas diferenças significativas ao comparar o perfil de HC das rainhas do tempo 0 (virgens e acasaladas) com as rainhas que tinham 50 dias de idade (tempo 1) ( $p=0,003$ ); as rainhas com 180 dias de idade (tempo 2) ( $p=0,001$ ) e as rainhas maduras ( $p=0,001$ ).

Também foram observadas diferenças qualitativas entre os diferentes grupos. Alcanos lineares como  $n\text{-C}_{23}$  e  $n\text{-C}_{24}$  apareceram em algumas das rainhas mais jovens (tempo 0). Outros alcanos lineares como  $n\text{-C}_{25}$ ,  $n\text{-C}_{27}$  e  $n\text{-C}_{29}$  diminuíram sua concentração em 92,77%; 83,57% e 70,12%, respectivamente, quando comparadas as rainhas do tempo 0 com as rainhas maduras, porém observou-se que a concentração do  $n\text{-C}_{29}$  aumentou mais de 200% nas rainhas do tempo 1 (Fig. 3). Por sua vez, o ácido dodecanoico eicosil éster só esteve presente nas rainhas do tempo 2 (Fig. 4) e rainhas maduras (Fig. 5), sendo estas últimas os indivíduos com a concentração mais alta para esse composto. Portanto, o ácido tetradecanoico eicosil éster e o ácido hexadecanoico eicosil éster aumentaram sua concentração com o passar do tempo.

Os metil ésteres foram responsáveis pela separação das rainhas maduras dos outros grupos analisados, segundo o SIMPER. A análise de componentes coordenados (PCoA) permitiu observar a separação dos grupos a partir dos perfis de HC das rainhas (Fig. 6).

A população de formigas (imaturos e operárias adultas) foi variável entre os ninhos analisados (Tabela 1). Para o tempo 1, a população das colônias variou de 31 a 128 formigas. Já os ninhos do tempo 2 apresentaram populações de 112 a 1077 formigas por ninho.

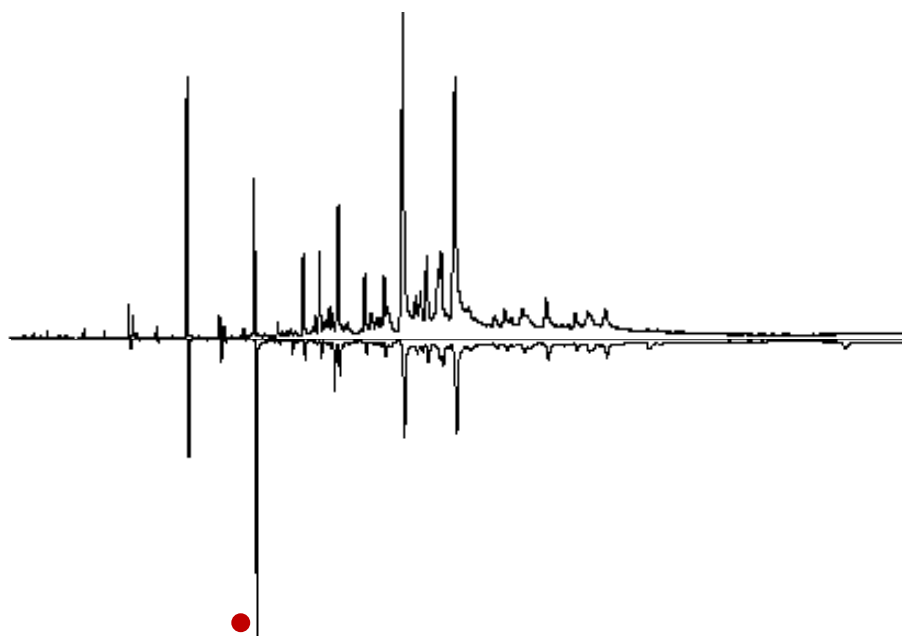


Figura 3. Cromatogramas de rainha 24 horas após a revoada (tempo 0) (parte superior) e rainha com 50 dias de idade (parte inferior). Observam-se diferenças quantitativas para os mesmos compostos nos dois indivíduos.  
● sinaliza o  $n\text{-C}_2$

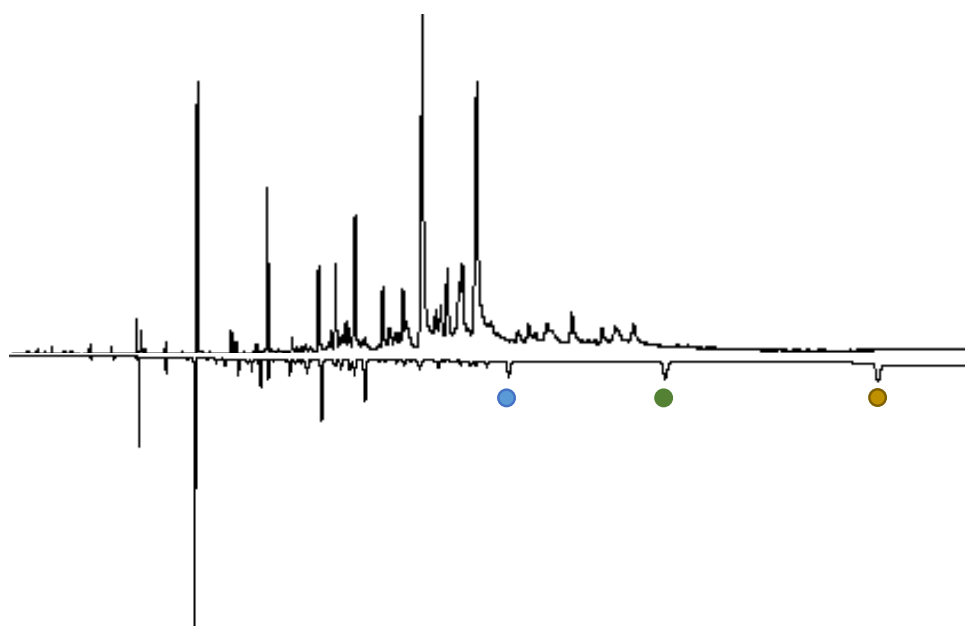


Figura 4. Cromatogramas de rainha 24 horas após a revoada (tempo 0)(parte superior) e rainha com 180 dias de idade (parte inferior). ● sinaliza o ácido dodecanoico eicosil éster. ● sinaliza o ácido tetradecanoico eicosil éster. ● sinaliza o ácido hexadecanoico eicosil éster.

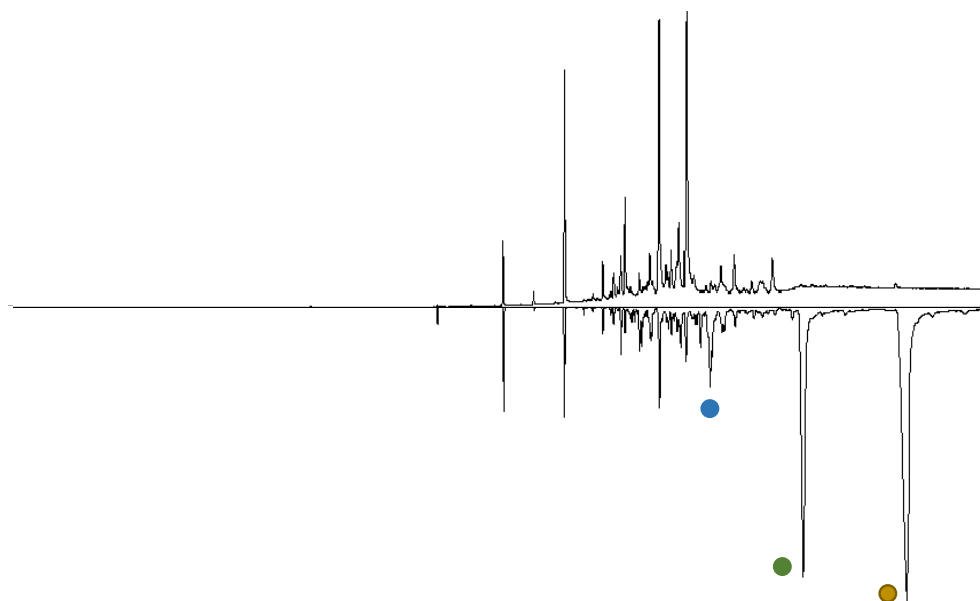


Figura 5. Cromatogramas de rainha 24 horas após a revoada (tempo 0) (parte superior) e rainha de 4 anos de idade (parte inferior). ● sinaliza o ácido dodecanoico eicosil éster. ● sinaliza o ácido tetradecanoico eicosil éster. ● sinaliza o ácido hexadecanoico eicosil éster.

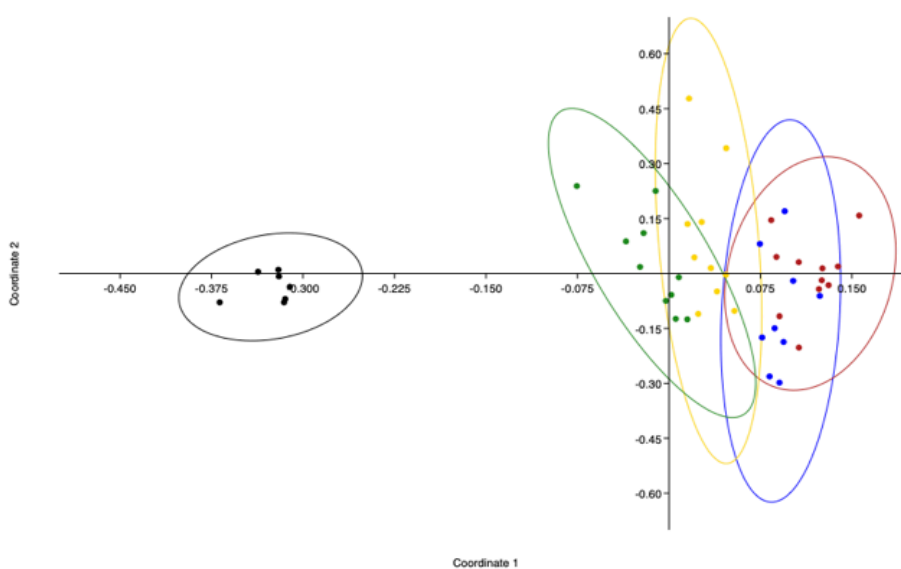


Figura 6. Análise de Componentes Coordenados (PCoA) dos perfis de HC de rainhas de *A. sexdens* de diferentes idades. ● representam rainhas virgens; os ● representam rainhas acasaladas (tempo 0); os ● as rainhas com 50 dias de idade; os ● as rainhas com 180 dias de idade e os ● as rainhas de 4 anos de idade.

Tabela 1. Imaturos e operárias contabilizados em ninhos de 50 dias (tempo 1) e 180 dias de idade (tempo 2)

	Ovos	Larvas	Pupas	Operárias	Total
<i>Tempo 1</i>					
Rainha 1	28	0	0	3	31
Rainha 2	36	0	13	8	57
Rainha 3	9	7	15	11	42
Rainha 4	52	17	35	24	128
Rainha 5	45	19	27	13	104
Rainha 6	35	20	23	16	94
Rainha 7	63	15	30	16	124
Rainha 8	16	15	30	17	78
Rainha 9	37	0	0	7	44
Rainha 10	28	10	26	12	76
Média	34,9	10,3	19,9	12,7	
<i>Tempo 2</i>					
Rainha 1	12	14	4	246	276
Rainha 2	4	2	13	93	112
Rainha 3	20	48	49	49	166
Rainha 4	112	73	63	277	525
Rainha 5	17	22	2	255	296
Rainha 6	193	124	98	662	1077
Rainha 7	45	97	55	231	428
Rainha 8	256	70	199	442	967
Rainha 9	88	89	48	279	504
Rainha 10	146	115	150	436	847
Média	89,3	65,4	68,1	297	

## DISCUSSÃO

Ao longo de 180 dias o perfil de HC das rainhas de *A. sexdens* apresentou variações tanto qualitativas como quantitativas. As variações quantitativas foram observadas principalmente nos alcanos lineares, cuja concentração diminuiu com o passar do tempo. Os alcanos lineares de menor massa molecular como *n*-C<sub>23</sub> e



*n*-C<sub>24</sub> que apareceram na cutícula de algumas rainhas avaliadas 24 horas depois da revoada, não foram encontrados posteriormente. Alguns alcanos ramificados também apresentaram variações na sua concentração, e podem estar envolvidos com variações de comportamento das rainhas durante o período avaliado. Por outro lado, variações qualitativas foram observadas principalmente quando as rainhas jovens foram comparadas com as rainhas maduras, as quais apresentaram altas concentrações de metil ésteres na sua cutícula.

As rainhas de *A. sexdens* aqui analisadas apresentaram uma variação temporal nos alcanos lineares da sua cutícula. Entre o primeiro dia de fundação do formigueiro e 50 dias depois, a concentração do *n*-C<sub>23</sub>; *n*-C<sub>24</sub>; *n*-C<sub>25</sub> e *n*-C<sub>26</sub> diminuiu. Rodríguez et al., (*dados não publicados*), assim como Valadares e do Nascimento (2015; 2016) encontraram o *n*-C<sub>25</sub> e *n*-C<sub>26</sub> na cutícula de operárias. É possível que esse composto seja compartilhado entre operárias e as rainhas virgens durante sua estadia dentro do ninho original e seu posterior desaparecimento da cutícula seja parte de um processo de diferenciação química entre as castas. Esta hipótese precisa de mais estudos para ser comprovada. Por outro lado, Johnson e Gibbs (2004) também observaram uma diminuição do *n*-C<sub>23</sub> em rainhas de *Pogonomyrmex barbatus* após a fundação dos seus formigueiros. A diminuição desses compostos parece estar relacionada com os danos ocasionados pela abrasão do solo sobre a cutícula no momento da escavação, o que afeta diretamente a taxa de perda de água (Johnson, 2000). É provável que a maior quantidade de HC lineares ofereça uma proteção às rainhas antes de iniciar a escavação da sua colônia, e sua diminuição após o enclausuramento seja um efeito dos danos na cutícula, assim como os efeitos da temperatura sobre características físicas dos HC (Johnson e Gibbs, 2004). Por outro lado, o aumento da concentração do *n*-C<sub>29</sub>, *n*-C<sub>30</sub> e *n*-C<sub>31</sub> poderia compensar a perda desses compostos menos pesados e ajudar a diminuir a perda da água nas rainhas.

Os alcanos ramificados também apresentaram variações ao longo do tempo. Nas rainhas avaliadas a concentração do 3,7,11-TriMeC<sub>31</sub> e 4,8,12-TriMeC<sub>32</sub> diminuiu com o passar do tempo. Essa situação é diferente da encontrada em estudos com outras formigas, onde a proporção dos alcanos ramificados geralmente aumenta (Johnson e Gibbs, 2004). Esses alcanos ramificados já foram encontrados em operárias de *A. sexdens* (Valadares e do Nascimento, 2016; 2017), o que significa que não é um composto exclusivo da casta reprodutiva. Tendo em

conta que o 3,7,11-TriMeC<sub>31</sub> e 4,8,12-TriMeC<sub>32</sub> foram encontrados no fungo simbiote de formigas-cortadeiras (Richard et al., 2007), é proposto que a diminuição observada esteja ligada à variação de comportamentos da rainha durante as primeiras semanas do formigueiro. Durante as primeiras semanas o cuidado do fungo é realizado unicamente pela rainha, o que permitiria a passagem de hidrocarbonetos do fungo para a mesma. Com a presença das operárias na colônia, a rainha deixa de cuidar do fungo paulatinamente (Augustin et al., 2011). Mais estudos são necessários para confirmar se esses compostos passam do fungo simbiote para a rainha e se sua concentração está ligada ao processo de cuidado e cultivo do mesmo.

Mudanças qualitativas no perfil de HC das rainhas de *A. sexdens* não aconteceram de maneira rápida como já foi demonstrado em outras espécies de formigas. Baseado em que depois do acasalamento as rainhas experimentam mudanças fisiológicas e comportamentais, o que inclui a perda das asas (Oppelt e Heinze, 2009; Fujihara et al., 2012), é assumido no presente trabalho que as rainhas que escavaram e perderam suas asas tinham acasalado, e aquelas que não escavaram e conservaram suas asas após 24 horas eram rainhas virgens. Oppelt e Heinze (2009) observaram que o perfil de HC de rainhas de *L. gredleri* após de 30 minutos do acasalamento foi significativamente diferente quando comparado com rainhas virgens. Segundo os autores, essa mudança faz as fêmeas acasaladas menos atrativas para os machos, sugerindo que os machos são capazes de reconhecer fêmeas virgens e fêmeas acasaladas. Essas variações no perfil de HC após acasalamento também foram descritas para gamergates da formiga *Streblognathus peetersi*. Neste caso as variações foram percebidas após 20 horas pelas companheiras do ninho (Cuvillier-Hot et al., 2005). Já que não houve mudanças significativas no perfil de HC das rainhas depois da escavação, foi considerado que o perfil de HC das fêmeas acasaladas não oferece informação aos machos sobre o estado de virgindade da rainha. Recomenda-se realizar mais estudos para confirmar esta hipótese.

O perfil de HC das rainhas maduras apresentou grandes concentrações de metil ésteres, o que permite pensar que existe uma relação com o status de fertilidade das rainhas de *A. sexdens*. Rodríguez et al., (*dados sem publicar*) observaram que o ácido hexadecanoico eicosil éster e o ácido tetradecanoico eicosil éster apareceram em fêmeas capturadas após o voo nupcial. É possível que

esses compostos sejam exclusivos das rainhas (virgens ou acasaladas) e sirvam como um sinal de reconhecimento por parte das operárias. O ácido hexadecanoico eicosil éster também foi encontrado nas operárias de colônias maduras (vide capítulo 1). Nesse caso, é possível pensar que esse composto faça parte do sinal químico da rainha e possa comunicar sua presença ao interior da colônia. São necessárias pesquisas comparando o perfil das operárias em colônias com e sem rainha, para poder confirmar essa situação.

## CONCLUSÕES

O ácido dodecanoico eicosil éster foi encontrado unicamente nas rainhas com 180 dias de idade e rainhas maduras. Tendo em conta que a produção de feromônios precisa de uma inversão energética alta e que após o voo nupcial as rainhas chegam a perder mais do 35% do teor de carboidratos (Silva, 2015) é possível que a produção do feromônio por parte das rainhas de *A. sexdens* inicie com a aparição das primeiras operárias e aumente sua concentração conforme a população de operárias cresce. Neste panorama, o feromônio da rainha não teria uma função sexual durante o voo nupcial e sim como um sinal da presença e fertilidade de rainha no interior da colônia. Para entender se o feromônio da rainha de *A. sexdens* afeta a reprodução das operárias, são necessárias pesquisas que avaliem a incidência desse composto no desenvolvimento do aparelho reprodutor das operárias, especialmente do séquito da rainha.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amsalem, E., Orlova, M. e Grozinger, C. M. 2015. A conserve class of queen pheromones? Re-evaluating the evidence in bumblebees (*Bombus impatiens*). Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 282 (1817): 20151800.

Augustin, J. O., Santos, J. F. L. e Elliot, S. L. 2011. A behavioral repertoire of *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) queens during the claustral founding and ergonomic stages. *Insectes Sociaux* 58: 197-206.

Bento, J. M. S. 1983. Condições climáticas para o voo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. pp. 98.

Cuvillier-Hot, V., Renault, V. e Peeters, C. 2005. Rapid modification in the olfactory signal of ants following a change in reproductive status. *Naturwissenschaften* 92: 73-77.

d’Ettorre, P. 2004. Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *Journal of Experimental Biology* 207(7): 1085-1091.

Dijkstra, M. B., Nash, D. R. e Boomsma, J. J. 2005. Self-restraint and sterility in workers of *Acromyrmex* and *Atta* leafcutter ants. *Insectes Sociaux*, 52(1), pp. 67–76.

Endler, A., Liebig, J., Schmitt, T., Parker, J. E., Jones, G. R., Schreier, P. e Hölldobler, B. 2004. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proceedings of the National Academy of Science* 101(9): 2945-2950.

Evison, S. E. F., Ferreira, R. S., d’Ettorre, P., Fresneau, D. e Poteaux, C. 2012. Chemical signature and reproductive status in the facultatively polygynous ant *Pachycondyla verенаe*. *Journal of Chemical Ecology* 38(11): 1441-1449.

Fujihara, R. T., Camargo, R. S. e Forti, L. C. 2012. Lipid and energy contents in the bodies of queens of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae): pre-and post-nuptial flight. *Revista Brasileira de Entomologia* 56(1): 73-75.

Guerreri, F. J., Nehring, V., Jørgensen, C. G., Nielsen, J., Galizia, G. e d'Ettorre P. 2009. Ants recognize foes and not friends. *Proceedings of the Royal Society B* 276: 2461-2468.

Hannonen, M., Sledge, M. F., Turillazzi, S. e Sunström, L. 2002. Queen reproduction, chemical signalling and worker behaviour in polygyne colonies of the ant *Formica fusca*. *Animal Behaviour* 64: 477-485.

Hölldobler, B. e Wilson, E. O. 2011. *The leafcutter ants. Civilization by instinct*. W.W. Norton e Company, Inc. New York, Estados Unidos. 160p.

Holman, L., Jørgensen, C., Nielsen, J. e d'Ettorre, P. 2010. Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of the Royal Society B* 277(1701): 3793-3800.

Holman, L., Leroy, C., Jørgensen, C., Nielsen, J. e d'Ettorre, P. 2013. Are queen ants inhibited by their own pheromone? Regulation of productivity via negative feedback. *Behavioral Ecology* 24(2): 380-385.

Johnson, R. A. 2000. Water loss in desert ants: caste variation and the effect of cuticle abrasion. *Physiological Entomology* 25: 48-53.

Johnson, R. A. e Gibbs, A. G. 2004. Effect of mating stage on water balance, cuticular hydrocarbons and metabolism in the desert harvest ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *Journal of Insect Physiology* 50: 943-953.

Keller, L. e Nonacs, P. 1993. The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal?. *Animal Behaviour* 45(4): 787-794.

Le Conte, Y. e Hefetz, A. 2008. Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 53(1): 523-542.

Liebig, J., Peeters, C., Oldham, N. J., Markstädter, C. e Hölldobler, B. 2000. Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of

fertility in the ant *Harpegnathos saltator*?. Proceedings of the National Academy of Science 97(8): 4124-4131.

Monnin, T. 2006. Chemical recognition of reproductive status in social insects. Annales Zoologici Fennici 43: 515-530.

Monnin, T. e Ratnieks F. L. W. 2001. Policing in queenless ponerine ants. Behavioral Ecology and Sociobiology 50: 97-108.

Motais de Narbonne, M., van Zweden, J. S., Bello, J. E., Wenseleers, T., Millar, J. G. e d'Ettorre, P. 2016. Biological activity of the enantiomers of 3-Methylhentriacontane, a queen pheromone of the *Lasius niger*. Journal of Experimental Biology 219 (11): 1632-1638.

Nehring, V., Evison, S. E. F., Santorelli, L. A., d'Ettorre, P. e Hughes, O. H. 2011. Kin-informative recognition cues in ants. Proceedings of the Royal Society B 278(1714): 1942-1948.

Oi, C. A., Millar, J. G., van Zweden, J. S., Wenseleers, T. 2016. Conservation of queen pheromones across two species of vespine wasps. Journal of Chemical Ecology 42(11): 1175-1180.

Oppelt, A. e Heinze, J. 2009. Mating is associated with immediate changes of the hydrocarbon profile of *Leptothorax gredleri* ant queens. Journal of Insect Physiology 55(7): 624-628.

Peeters, C., Monnin, T. e Malosse, C. 1999. Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queenless ant. Proceedings of the Royal Society B 266(1426): 1323-1327.

Richard, F.J., Poulsen, M., Drijfhout, F., Jones, G., Boomsma, J.J. (2007) Specificity in chemical profiles of workers, brood and mutualistic fungi in *Atta*, *Acromyrmex*, and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. J Chem Ecol 33(12):2281-2292.

Smith, A.A., Hölldober, B. e Liebig, J. 2009. Cuticular hydrocarbons reliably identify cheaters and allow enforcement of altruism in a social insect. *Current Biology* 19(1): 78-81.

Smith, A. A., Millar, J. G., Hanks, L. M. e Suarez, A. V. 2012. Experimental evidence that workers recognize reproductives through cuticular hydrocarbons in the ant *Odontomachus brunneus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 1267-1276.

Smith, A. A., Millar, J. G., Hanks, L. M. e Suarez, A. V. 2013. A conserved fertility signal despite population variation in the cuticular chemical profile of the trap-jaw ant *Odontomachus brunneus*. *Journal of Experimental Biology* 216: 3917-3924.

Smith, A.A., Millar, J.G. e Suarez, A.V. 2016. Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. *Journal of Experimental Biology* 219(3): 419-430.

Smith, A. A. e Liebig, J. 2017. The evolution of cuticular fertility signals in eusocial insects. *Current Opinion in Insects Science* 22: 79-84.

Valadares, L., do Nascimento, F.S. (2015) Foliar substrate affects cuticular hydrocarbon profiles and intraspecific aggression in the leafcutter ant *Atta sexdens*. *Insect* 6(1).141-151.

Valadares, L. e do Nascimento, F. S. 2016. Chemical cuticular signature of leafcutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) worker subcastes. *Revista Brasileira de Entomology* 60(4): 308-311.

Valadares, L. e do Nascimento, F. S. 2017. Changes in the cuticular hydrocarbon profile associated with the molting cycle correlate with the hydrocarbon profile of the fungus cultivated by the ant *Atta sexdens*. *Insectes Sociaux* 64(4): 591-596.

van Oystaeyen, A., Oliveira, R. C., Holman, L., van Zweden, J. S., Romero, C., Oi, C. A., d'Ettorre, P., Khaledi, M., Billen, J., Wäckers, F., Millar, J. G. e Wenseleers,

T. 2014. Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. *Science* 343(6168): 287-290.

Villalta, I., Abril, S., Cerdá, X., Boulay, R. 2018. Queen control or Queen signal in ants: What remains of the controversy 25 years after Keller and Nonacs' Seminal paper?. *Journal of Chemical Ecology* 44(9):805-817.



#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho é a primeira pesquisa focada a identificar o perfil de hidrocarbonetos da rainha de uma espécie de formiga-cortadeira e seu papel como um sinal informativo dentro da colônia. As rainhas de *Atta sexdens* se caracterizam por possuir na sua cutícula uma grande diversidade de alcanos ramificados de alto peso molecular quando comparadas com as operárias. Além disso, alguns metil ésteres aparecem gradualmente na cutícula das rainhas de acordo com o passar do tempo, alcançando a maior concentração em rainhas com mais de 3 anos de idade.

Também foi analisado o perfil de hidrocarbonetos cuticulares dos machos de *A. sexdens* e encontrado que possuem alguns compostos exclusivos, os quais podem ser utilizados pelas operárias para seu reconhecimento ao interior do ninho. Os resultados desta pesquisa são os primeiros passos na caracterização do feromônio da rainha de *A. sexdens*, o qual pode trazer importantes avanços no conhecimento da ecologia e comportamento social deste inseto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amsalem, E., Orlova, M., Grozinger, C. (2015) A conserve class of queen pheromones? Re-evaluating the evidence in bumblebees (*Bombus impatiens*). *Proc R Soc B*. 282(1817):20151800.
- Antoniali, W., Lima, S., Andrade, L., Suárez, Y. (2007) Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet Mol Res*. 6(3):492-499.
- Augustin, J., Santos, J., Elliot, S. (2011) A behavioral repertoire of *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) queens during the claustral founding and ergonomic stages. *Insect Soc*. 58:197-206.
- Ayasse, M., Paxton, R., Tengö, J. (2001) Mating Behavior and Chemical Communication in the Order Hymenoptera. *Annu Rev Entomol*. 46:31-78.
- Bagnères, A., Blomquist, G. (2010) Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbon. In: Blomquist, G.J., Bagnères, A.G. (eds) *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 75-99.

- Beibl, J., d'Ettorre, P., Heinze, J. (2007) Cuticular profiles and mating preference in a slave-making ant. *Insect Soc.* 54:174-182.
- Bento, J. (1983) *Condições climáticas para o voo nupcial e reconhecimento dos indivíduos em Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae)*. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 89p.
- Bento, J., Della Lucia, T., do Nascimento, R., Bergmann, J., Morgan, E. (2007) Response of workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) to mandibular gland compounds of virgin males and females. *Physiol Entomol.* 32:283-286.
- Berthelot, K., Portugal, F., Jeanson, R. (2017) Caste discrimination in the ant *Odontomachus hastatus*: What role for behavioral and chemical cues?. *J Insect Physiol.* 98:291-300.
- Boomsma, J., Franks, N. (2006) Social insects: from selfish genes to self organization and beyond. *Trends Ecol Evol.* 21 (6):303-308.
- Boomsma, J., Baer, B., Heinze, J. (2005) The Evolution of Male Traits in Social Insects. *Annu Rev Entomol.* 50:395-420.
- Bos, N., d'Ettorre, P. (2012) Recognition of social identity in ants. *Front in Psychol.* 3:1-6.
- Boulay, R., Hefetz, A., Soroker, V., Lenoir, A. (2000) *Camponotus fellah* colony integration: worker individuality necessitates frequent hydrocarbon exchanges. *Anim Behav.* 59(6):1127-1133.
- Brunner, E., Kroiss, J., Trindl, A., Heinze, J. (2011) Queen pheromones in *Temnothorax* ants: control or honest signal. *BMC Evol Biol.* 11:55.

- Camargo, R., Forti, L., Lopes, J., Noronha, N., Ottati, A. (2007) Worker laying in leafcutter ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Formicidae, Attini). *Insect Sci.* 14(2):157-163.
- Campos, M., Campos, M., Turatti, I., Nascimento, F. (2012) Cuticular hydrocarbon variation of castes and sex in the weaver ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 59:1025-1035.
- Carazo, P., Sanchez, E., Font, E., Desfilis, E. (2004) Chemosensory cues allow male *Tenebrio molitor* beetles to assess the reproductive status of potential mates. *Anim Behav.* 68:123-129.
- Carlos A. (2013) *Semioquímicos e comunicação sonora em formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Rio Claro - SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, 162p.
- Chapusait, M., Bernasconi, G., Hoehn, S., Reuter, M. (2005) Nestmate recognition in the unicolonial ant *Formica paralugubris*. *Behav Ecol.* 16(1):15-19.
- Chernenko, A., Holman, L., Helanterä, H., Sundström, L. (2012). Cuticular chemistry of males and females in the ant *Formica fusca*. *J Chem Ecol.* 38:1474-1482.
- Crozier, R., Dix, M. (1979) Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. *Behav Ecol Sociobiol.* 4:217-224.
- Cuvillier-Hot, V., Cobb, M., Malosse, C., Peeters, C. (2001) Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J Insect Physiol.* 47:485-493.
- Cuvillier-Hot, V., Renault, V., Peeters, C. (2005) Rapid modification in the olfactory signal of ants following a change in reproductive status. *Naturwissenschaften* 92:73-77.

- Dahbi, A., Cerda, X., Hefetz, A., Lenoir, A. (1996) Social closure, aggressive behavior, and cuticular hydrocarbon profiles in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (Hymenoptera: Formicidae). *J Chem Ecol.* 22:2173-2186.
- d'Ettorre, P. (2004) Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *J Exp Biol.* 207(7):1085-1091.
- d'Ettorre, P., Heinze, J., Schulz, C., Francke, W., Ayasse, M. (2004) Does she smell like a queen? Chemoreception of a cuticular hydrocarbon signal in the ant *Pachycondyla inversa*. *J Exp Biol.* 207(7):1085-1091.
- d'Ettorre, P., Lenoir, A. (2010) Nestmate recognition. *In: Lach, L., Parr, C., Abbott, K. (eds) Ant ecology.* New York: Oxford University Press, p. 194-208
- Dietemann, V., Peeters, C., Liebig, J., Thievet, V., Hölldobler, B. (2003) Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(18):10341-10346.
- Dijkstra, M., Boomsma, J.J. (2006) Are workers of *Atta* leafcutter ants capable of reproduction?. *Insect Soc.* 53(2):136-140.
- Dijkstra, M., Nash, D., Boomsma, J. (2005) Self-restraint and sterility in workers of *Acromyrmex* and *Atta* leafcutter ants. *Insect Soc.* 52(1):67-76.
- do Nascimento, R., Morgan, E., Billen, J., Schoeters, E., Della Lucia, T., Bento, M. (1993) Variation with caste of the mandibular gland secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *J Chem Ecol.* 19(5):907-918.
- Duarte, B., Michelutti, K., Antonialli-Junior, W., Cardoso, C. (2019) Effect of temperature on survival and cuticular composition of the three different ant species. *J Therm Biol.* 80:178-189.

- Endler, A., Liebig, J., Hölldobler, B. (2006) Queen fertility, egg marking and colony size in the ant *Camponotus floridanus*. *Behav Ecol Sociobiol.* 59:490-499.
- Endler, A., Liebig, J., Schmitt, T., Parker, J.E., Jones, G., Schreier, P., Hölldobler, B. (2004) Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9):2945-2950.
- Evison, S., Ferreira, R.S., d'Ettorre, P., Fresneau, D., Poteaux, C. (2012) Chemical signature and reproductive status in the facultatively polygynous ant *Pachycondyla verenae*. *J Chem Ecol.* 38(11):1441-1449.
- Fjerdingstad, E., Boomsma, J. (1998) Multiple mating increases the sperm stores of *Atta colombica* leafcutter ant queens. *Behav Ecol Sociobiol.* 42:257-261.
- Fowler, H. (1982) Male induction and function of workers' excitability during swarming in leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera, Formicidae). *Int J Invertebr Reprod.* 4:333-335.
- Fujihara, R., Camargo, R., Forti, L. (2012) Lipid and energy contents in the bodies of queens of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae): pre- and post-nuptial flight. *Rev Bras Entomol.* 56(1):73-75.
- Geiselhardt, S., Otte, T., Hilker, M. (2009) The Role of Cuticular Hydrocarbons in Male Mating Behavior of the Mustard Leaf Beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). *J Chem Ecol.* 35:1162-1171.
- Gibbs, A., Rajpurohit, S. (2010) Cuticular lipids and water balance. In: Blomquist, G.J., Bagnères, A.G. (eds) *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 100-120.
- Ginzel, M., Blomquist, G., Millar, J., Hanks, L. (2003) Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *J Chem Ecol.* 29:533-545.

- Grüter, C., Keller, L. (2016) Inter-caste communication in social insects. *Curr Opin Neurobiol* 38:6-11.
- Guerreri, F., Nehring, V., Jørgensen, C., Nielsen, J., Galizia, G., d'Ettorre, P. (2009) Ants recognize foes and not friends. *Proc R Soc B*. 276:2461-2468.
- Hannonen, M., Sledge, M.F., Turillazzi, S., Sunström, L. (2002) Queen reproduction, chemical signalling and worker behaviour in polygyne colonies of the ant *Formica fusca*. *Anim Behav*. 64: 477-485.
- Heinze, J., d'Ettorre, P. (2009) Honest and dishonest communication in social Hymenoptera. *J Exp Biol*. 212(12):1775-1779.
- Heinze, J., Stengl, B., Sledge, M. (2002) Worker rank, reproductive status and cuticular hydrocarbon signature in the ant, *Pachycondyla cf. inversa*. *Behav Ecol Sociobiol*. 52:59-65.
- Helanterä, H., Martin, S., Ratnieks, F.L.W. (2014) Recognition of nestmate eggs in the ant *Formica fusca* is based on queen derived cues. *Curr Zool*. 60:131-136.
- Hernández, J., Cabrera, A., Jaffé, K. (1999) Mandibular gland secretion in different castes of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. *J Chem Ecol*. 24:2433-2444.
- Herzner, G., Strohm, E. (2007) Fighting fungi with physics - prey embalming by a solitary wasp prevents water condensation. *Curr Biol*. 17:R46-R47.
- Hölldobler, B., Wilson, E. (2011) *The leafcutter ants. Civilization by instinct*. New York: W.W. Norton e Company, Inc. 160p.
- Holman, L., Jørgensen, C., Nielsen, J., d'Ettorre, P. (2010) Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proc R Soc B*. 277(1701):3793-3800.

- Holman, L. (2018) Queen pheromones and reproductive division of labor: a meta-analysis. *Behav Ecol.* 29(6):1199-1209.
- Hora, R., Ionescu-Hirsh, A., Simon, T., Delabie, J., Robert, J., Fresneau, D., Hefetz, A. (2008) Postmating changes in cuticular chemistry and visual appearance in *Ectatomma tuberculatum* queens (Formicidae: Ectatomminae). *Naturwissenschaften* 95:55-60.
- Howard, R., Blomquist, G. (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol.* 50(1):371-393.
- Inbar, S., Privman, E. (2019) Differences in long-chained cuticular hydrocarbons between males and gynes in *Cataglyphis* Desert Ants. *BioRxiv* 538926.
- Jackson, B., Morgan, E. (1993) Insect chemical communication: pheromones and exocrine glands of ants. *Chemoecology* 4:125-144.
- Johnson, C., Sundström, L. (2012) Cuticular chemistry of two social forms in a facultatively polygyne ant (Hymenoptera: Formicidae: *Formica truncorum*). *Ann Zool Fennici* 49:1-17.
- Johnson, R. (2000) Water loss in desert ants: caste variation and the effect of cuticle abrasion. *Physiol Entomol.* 25: 48-53.
- Johnson, R., Gibbs, A. (2004) Effect of mating stage on water balance, cuticular hydrocarbons and metabolism in the desert harvest ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *J Insect Physiol.* 50: 943-953
- Keller, L., Nonacs, P. (1993) The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal?. *Anim Behav.* 45:787-794.
- Kocher, S., Grozinger, C. (2011) Cooperation, conflict, and the evolution of queen pheromones. *J Chem Ecol.* 37(11):1263–1275.



- Lacy, R., Sherman, P. (1983) Kin recognition by phenotype matching. *Amer Nat.* 121:489-512.
- Lahav, S., Soroker, V., Hefetz, A. (1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86(5):246-249.
- Lambardi, D., Chegia, B., Turillazzi, S., Boomsma, J. (2004) Diet-aggression among colonies of the leafcutter ant *Acromyrmex echinator* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Redia* 87:219-221.
- Le Conte, Y., Hefetz, A. (2008) Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annu Rev Entomol.* 53(1):523-542.
- Lenoir, A., Hefetz, A., Simon, T., Soroker, V. (2001) Comparative dynamics of gestalt odour formation in two ant species *Camponotus fellah* and *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera: Formicidae). *Physiol Entomol.* 26(3):275-283.
- Leonhardt, S., Menzel, F., Nehring, V., Schmit, T. (2016) Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell* 164(6):1277-1287.
- Leonhardt, S., Brandstaetter, A., Kleineidam, C. (2007) Reformation process of the neuronal template for nest-mate recognition cues in the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *J Comp Physiol A - Neuroethol Sensor Neural Behav Physiol.* 193:993-1000.
- Liebig, J., Peeters, C., Oldham, N., Markstädter, C., Hölldobler, B. (2000) Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*?. *PNAS* 97(8):4124-4131.
- Lucas, C., Pho, D., Fresneau, D., Jallon, J. (2004) Hydrocarbon circulation and colonial signature in *Pachycondyla villosa*. *J Insect Physiol.* 50(7):595-607.

- Lucas, C., Pho, D., Jallon, J.M., Fresneau, D. (2005) Role of cuticular hydrocarbons in the chemical recognition between ant species in the *Pachycondila villosa* species complex. *J Insect Physiol.* 51:1148-1157.
- Marinho, C., Della Lucia, T., Ribeiro, M., Magalhães, S., Guedes, R., Jham, G. (2008) Interference of  $\beta$ -eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bull Entomol Res.* 98(05):467–473.
- Martin, M., MacConnel, J. (1970) The alcanos of *Atta colombica*. *Tetrahedron* 26:307-319.
- Martin, S., Shemilt, S., Drijfhout, F. (2012) Effect of time on colony odour stability in the ant *Formica exsecta*. *Naturwissenschaften* 99(4):327-331.
- Martin, S., Drijfhout, F. (2009) Nestmate and task cues are influenced and encoded differently within ant cuticular hydrocarbon profiles. *J Chem Ecol.* 35(3):368-374.
- Martin, S., Helanterä, H., Drijfhout, F. (2008) Colony-specific hydrocarbons identify nest mates in two species of *Formica* ant. *J Chem Ecol.* 34:1072-1080.
- Menzel, F., Zumbusch, M., Feldmeyer, B. (2018) How ants acclimate: Impact of climatic conditions on the cuticular hydrocarbon profile. *Funct Ecol.* 32:657-666.
- Monnin, T., Malosse, C., Peeters, C. (1998) Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *J Chem Ecol.* 24:473-490.
- Monnin, T., Ratnieks, F. (2001) Policing in queenless ponerine ants. *Behav Ecol Sociobiol.* 50:97-108.
- Monnin, T. (2006) Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann Zool Fennici* 43:515-530.

- Monnin, T., Helft, F., Leroy, C., d'Etterre, P., Doums, C. (2018) Chemical characterization of young virgin queens and mated egg-laying queens in the ant *Cataglyphis cursor*. Random Forest classification analysis for multivariate datasets. *J Chem Ecol.* 44(2):127-136.
- Motais de Narbonne, M., van Zweden, J., Bello, J.E., Wenseleers, T., Millar, J.G., d'Etterre, P. (2016) Biological activity of the enantiomers of 3-Methylhentriacontane, a queen pheromone of the *Lasius niger*. *J Exp Biol.* 219 (11): 1632-1638.
- Morgan, D. (2008) Chemical sorcery for sociality: Exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* 11:79-90.
- Nascimento, F., Tannure-Nascimento, I., Dantas, J., Turatti, I., Lopes, P. (2012) Task-related variation of cuticular hydrocarbon profiles affect nestmate recognition in the giant ant *Dinoponera quadriceps*. *J Insect Behav.* 26(2):212-222.
- Nehring, V., Evison, S., Santorelli, L., d'Etterre, P., Hughes, O. (2011) Kin-informative recognition cues in ants. *Proc R Soc B.* 278(1714):1942-1948.
- Oi, C., Millar, J., van Zweden, J., Wenseleers, T. (2016) Conservation of queen pheromones across two species of vespine wasps. *J Chem Ecol.* 42(11):1175-1180.
- Oldroyd, B. (2018) Queen pheromone: contraceptive or a queen presence signal? - A comment on Holman. *Behav Ecol.* 29(6):1213-1214.
- Olejarz, J., Veller, C., Nowak, M. (2017) The evolution of queen control over worker reproduction in the social Hymenoptera. *Ecol Evol.* 7(20):8427-8441.

- Oppelt, A., Heinze, J. (2009) Mating is associated with immediate changes of the hydrocarbon profile of *Leptothorax gredleri* ant queens. *J Insect Physiol.* 55(7):624-628.
- Peeters, C., Monnin, T., Malosse, C. (1999) Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queenless ant. *Proc R Soc B.* 266:1323-1327.
- Peso, M., Elgar, M., Barron, A. (2014) Pheromonal control: reconciling physiological mechanism with signalling theory. *Biol Rev.* 90(2):542-559.
- Reichardt, A., Wheeler, D. (1996) Multiple mating in the ant *Acromyrmex versicolor*: a case of female control. *Behav Ecol Sociobiol.* 38:219-225.
- Reyment, R. (1989) Compositional data analysis. *Terra Nova* 1(1):29-34.
- Richard, F., Hefetz, A., Christides, J., Errard, C. (2004) Food influence on colonial recognition and chemical signature between nestmates in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Chemoecology* 14(1):9-16.
- Richard, F., Hunt, J. (2013) Intracolony chemical communication in social insects. *Insect Soc.* 60(3):275-291.
- Richard, F., Poulsen, M., Drijfhout, F., Jones, G., Boomsma, J. (2007a) Specificity in chemical profiles of workers, brood and mutualistic fungi in *Atta*, *Acromyrmex*, and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. *J Chem Ecol.* 33(12):2281-2292.
- Richard, F., Poulsen, M., Hefetz, A., Errard, C., Nash, D.R., Boomsma, J. (2007b) The origin of the chemical profiles of fungal symbionts and their significance for nestmate recognition in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol.* 61(11):1637-1649.

- Rossi, N., Baracchi, D., Giurfa, M., d'Ettorre, P. (2019) Pheromone-Induced accuracy of nestmate recognition in Carpenter ants: Simultaneous decrease in type I and type II errors. *Amer Nat.* 193(2):267-278.
- Schultz, T., Brady, S. (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *PNAS* 14:5435-5440.
- Silverman, J., Liang, D. (2001) Colony disassociation following diet partitioning in a unicolonial ant. *Naturwissenschaften* 88(2):73–77.
- Smith, A., Liebig, J. (2017) The evolution of cuticular fertility signals in eusocial insects. *Curr Opin Insect Sci.* 22:79-84.
- Smith, A., Millar, J., Suarez, A. (2016) Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. *J Exp Biol.* 219(3):419–430.
- Smith, A., Vanderpool, W., Millar, J., Hanks, L., Suarez, A. (2014) Conserved male-specific cuticular hydrocarbon patterns in the trap-jaw ant *Odontomachus brunneus*. *Chemoecology* 24:29-34.
- Smith, A., Millar, J., Hanks, L. M., Suarez, A. (2013) A conserved fertility signal despite population variation in the cuticular chemical profile of the trap-jaw ant *Odontomachus brunneus*. *J Exp Biol.* 216:3917-3924.
- Smith, A., Millar, J., Hanks, L., Suarez, A. (2012) Experimental evidence that workers recognize reproductives through cuticular hydrocarbons in the ant *Odontomachus brunneus*. *Behav Ecol Sociobiol.* 66:1267-1276.
- Smith, A., Hölldobler, B., Liebig, J. (2009) Cuticular hydrocarbons reliably identify cheaters and allow enforcement of altruism in a social insect. *Curr Biol.* 19(1):78-81.

- Smith, C., Schoenick, C., Anderson, K., Gadau, J., Suarez, A. (2007) Potential and realized reproduction by different worker castes in queen-less and queen-right colonies of *Pogonomyrmex badius*. *Insect Soc.* 54(3):260-7.
- Soroker, V., Hefetz, A. (2000) Hydrocarbon site of synthesis and circulation in the desert ant *Cataglyphis niger*. *J Insect Physiol.* 46:1097-1102.
- Soroker, V., Fresneau, D., Hefetz, A. (1998) Formation of colony odor in Ponerine ant *Pachycondyla apicalis*. *J Chem Ecol.* 24(6):1077-1090.
- Soroker, V., Vienne, C., Hefetz, A. (1995) Hydrocarbon dynamics within and between nestmates in *Cataglyphis niger* (Hymenoptera: Formicidae). *J Chem Ecol.* 21(3):365-378.
- Sorvari, J., Theodora, P., Turillazzi, S., Hakkarainen, H., Sundström, L. (2007) Food resources, chemical signaling, and nest mate recognition in the ant *Formica aquilonia*. *Behav Ecol.* 19(2):441-447.
- Sotelo, G., Ortiz-Giraldo, D., Rodríguez, J., Montoya-Lerma, J. (2015) Adoption of a surrogate artificial queen in a colony of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in Colombia. *Sociobiology* 62(4):613-614.
- Sturgis, S., Gordon, D. (2012) Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): a review. *Myrmecol News* 16:101-110.
- Thomas, M., Simmons, L. (2007) Male Crickets Adjust the viability of their spermin response to female mating status. *Am Nat.* 170(2):190-195.
- Thomas, M., Simmons, L. (2008) Sexual dimorphism in cuticular hydrocarbons of the Australian field cricket *Teleogryllus oceanicus* (Orthoptera: Gryllidae). *J Insect Physiol.* 54:1081-1089.
- Tsutsui, N. (2004) Scents of self: The expression. Component of self/non self-recognition systems. *Ann Zool Fenicci* 41(6):713-727.

- Valadares, L., do Nascimento, F. (2015) Foliar substrate affects cuticular hydrocarbon profiles and intraspecific aggression in the leafcutter ant *Atta sexdens*. *Insect* 6(1):141-151.
- Valadares, L., do Nascimento, F. (2016) Chemical cuticular signature of leafcutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) worker subcastes. *Rev Bras Entomol.* 60(4):308-311.
- Valadares, L., do Nascimento, F. (2017) Changes in the cuticular hydrocarbon profile associated with the molting cycle correlate with the hydrocarbon profile of the fungus cultivated by the ant *Atta sexdens*. *Insect Soc.* 64(4):591-596.
- van Oystaeyen, A., Oliveira, R., Holman, L., van Zweden, J., Romero, C., Oi, C., d'Ettorre, P., Khalesi, M., Billen, J., Wäckers, F., Millar J., Wenseleers, T. (2014) Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. *Science* 343(6168):287-290.
- van Wilgenburg, E., Symonds, M., Elgar, M. (2011) Evolution of cuticular hydrocarbon diversity in ants. *J Evol Biol.* 24(6):1188-1198.
- van Zweden, J., Brask, J., Christensen, J., Boomsma, J., Linksvayer, T., d'Ettorre, P. (2010) Blending of heritable recognition cues among ant nestmates creates distinct colony gestalt odours but prevents within-colony nepotism. *J Evol Biol.* 23(7):1498-1508.
- Viana, A., Frézard, A., Malosse, C., Della Lucia, T., Errard, C., Lenoir, A. (2001) Colonial recognition of fungus in the fungus-growing ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* 11(1):29-36.
- Vieira, A., Bueno, O. (2015) Mitochondrial and peroxisomal population in post-pharyngeal glands of leaf-cutting ants after lipid supplementation. *Micron* 68:8-16.

- Vilela, E., Della Lúcia, T. (2001) Introdução aos semioquímicos e terminologia. *In*: Vilela, E., Della Lucia, T. *Feromônios de insetos - Biologia, química e emprego no manejo de pragas*, 2nd ed. Ribeirão Preto: Holos. p:9-206.
- Villalta, I., Abril, S., Cerdá, X., Boulay, R. (2018) Queen control or Queen signal in ants: What remains of the controversy 25 years after Keller and Nonacs' Seminal paper?. *J Chem Ecol.* 44(9):805-817.
- Wagner, D., Brown, M., Broun, P., Cuevas, W., Moses, L., Chao, D., Gordon, D. (1998) Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *J Chem Ecol.* 24 (12):2021-2037.
- Wagner, D., Tissot, M., Cuevas, W., Gordon, D. (2000) Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *J Chem Ecol.* 26:2245-2257.
- Will, S., Delabie, J., Heinze, J., Ruther, J., Oettler, J. (2012) Cuticular lipid profiles of fertile and non-fertile *Cardiocondyla* ant queens. *J Insect Physiol.* 58(9):1245-1249.
- Wilson, E. (1980) Caste and division of labor in Leaf-Cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). *Behav Ecol Sociobiol.* 7:143-156.
- Witthehouse, M., Jaffé, K. (1995) Nestmate recognition in the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Insect Soc.* 42:157-166.