

LAILLA CRISTINA GANDRA

**MECANISMO DE SUPRESSÃO DE COLÔNIAS DA FORMIGA-
CORTADEIRA *Acromyrmex subterraneus subterraneus* POR FIPRONIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Gandra, Lailla Cristina, 1989-

L196m
2014

Mecanismo de supressão de colônias da formiga-cortadeira
Acromymex subterraneus subterraneus por fipronil / Lailla
Cristina Gandra. – Viçosa, MG, 2014.
ix, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Terezinha Maria Castro Della Lucia.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Formiga-cortadeira. 2. *Acromymex*. 3. Supressão.
4. Fipronil. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Entomologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 595.796|



LAILLA CRISTINA GANDRA

**MECANISMO DE SUPRESSÃO DE COLÔNIAS DA FORMIGA-
CORTADEIRA *Acromyrmex subterraneus subterraneus* POR FIPRONIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 21 de fevereiro de 2014.

Prof. Marco Antônio Oliveira

Prof^a. Maria Augusta L. Siqueira

Prof. Gustavo Ferreira Martins
(Co-orientador)

Prof. Raul Narciso C. Guedes
(Co-orientador)

Prof^a. Terezinha M. C. Della Lucia
(Orientadora)

À Deus por ter me dado vida e saúde para chegar até aqui

Agradeço

Aos meus pais Manoel e Maria das Graças,

À minha avó Maria Henriques,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, em especial, ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade e condições oferecidas para a realização deste curso;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida;

A Prof^a. Terezinha Della Lucia pela orientação, confiança, amizade, exemplo profissional e pessoal;

Ao Prof. Raul Guedes pelas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho, pela confiança e ensinamentos;

Ao Prof. Eugênio Oliveira, pela prontidão, pela ajuda nas ideias e delineamentos dos experimentos;

Ao Prof. Gustavo Ferreira pela prontidão e pelos ensinamentos ao longo desse trabalho;

Aos professores Dr. Marco Antônio Oliveira e Dr^a Maria Augusta Siqueira pela disposição para participar da banca;

Ao pessoal do Laboratório de Ultraestrutura Celular pelo acolhimento, brincadeiras e auxílio;

A Myriam, por sempre me apoiar, por tantos ensinamentos e torcida;

Aos amigos do laboratório Joel, Karina, Vanessa, Bressane e Hendria, pelos momentos engraçados, risadas, “dias de gado” e pela amizade;

Ao Sr. Manoel, pela amizade e auxílio em todas as horas;

Aos colegas do curso de pós-graduação em Entomologia Michela, Marcus, Aninha, Daiane, Jorgiane, Fernanda, Rômulo, André, Matheus, Mauricélia, Iara, Cléber e Rafael, pela convivência, amizade e momentos de descontração;

À TROPA, Stéphanie, Vanessa, Jansen, Tiago, Nelson, Felipe, Carlos, Aline e Bruno pela amizade sincera e pelo estímulo em todos os momentos;

Aos amigos de Viçosa, Bio2007 e BIODESAGRADÁVEIS que fizeram esses anos momentos ainda mais alegres;

As minhas “gatonas” das repúblicas, Andreza Angélica e Aline Elizabeth, Natália, Rayane, Nathalia, Raisa e Lívia, que me ouviram e estiveram ao meu lado sempre apoiando mesmo sem nada entender da minha pesquisa;

Aos meus pais, Manoel e Maria das Graças, pelo exemplo de dignidade, força e coragem, pelo amor incondicional, pela amizade verdadeira, por toda dedicação e afeto e por terem me proporcionado chegar até aqui;

A minha avó, Maria Henriques, que sempre rezou por mim;

Aos meus tios e tias, primos e primas, por acreditarem em mim;

A Antônio de Pádua, Maria Goreti e João Vitor pela atenção e carinho;

Ao Thomé Almeida, pelo carinho, atenção e apoio;

A todos que participaram dos bons momentos que tive nessa jornada.

BIOGRAFIA

LAILLA CRISTINA GANDRA, filha de Manoel Gandra e Maria das Graças Miranda Gandra, nasceu em Rio Casca, em 15 de março de 1989.

Em 2007 iniciou o Curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais. Em março de 2008 iniciou um estágio em pesquisa no Laboratório de Formigas-Cortadeiras/Entomologia – Departamento de Biologia Animal da UFRV, onde foi bolsista de iniciação científica FAPEMIG por dois anos consecutivos. De março de 2008 a dezembro de 2008 foi monitora voluntária das disciplinas de Zoologia dos Invertebrados I e II do Departamento de Biologia Animal da UFRV. De abril de 2011 a dezembro de 2011 foi monitora oficial da disciplina de Entomologia Geral do Departamento de Entomologia da UFRV.

Em janeiro de 2012, graduou-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2012, iniciou o Curso de Mestrado na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de biologia e controle de formigas-cortadeiras, terminando-o em fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
2. Material e métodos.....	6
2.1. Manutenção dos formigueiros no laboratório.....	6
2.2. Aplicação de fipronil por pulverização.....	6
2.2.1. Observações comportamentais.....	8
2.2.2. Quantificação do corte de folhas.....	9
2.2.3. Obtenção da massa de lixo.....	9
2.3. Aplicação de fipronil em iscas granuladas.....	10
2.3.1. Observações comportamentais.....	11
2.3.2. Quantificação do corte de folhas.....	12
2.3.3. Mortalidade de formigas.....	12
2.4. Análises estatísticas.....	12
3. Resultados.....	13
3.1. Pulverização de solução de fipronil.....	13
3.1.1. Observações comportamentais.....	13
3.1.2. Quantificação do corte de folhas.....	15
3.1.3. Quantidade de lixo.....	16
3.2. Aplicação de fipronil em iscas granuladas.....	16
3.2.1. Carregamento de iscas.....	16
3.2.2. Observações comportamentais.....	16
3.2.3. Quantificação do corte de folhas.....	22
3.2.4. Mortalidade de operárias.....	23
4. Discussão.....	26
5. Conclusão.....	32
6. Referências.....	33

RESUMO

GANDRA, Lailla Cristina, MSc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Mecanismo de supressão de colônias da formiga-cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* por fipronil.** Orientadora: Terezinha M. C. Della Lucia. Co-orientadores: Raul Narciso C. Guedes e Gustavo Ferreira Martins.

As formigas-cortadeiras são consideradas pragas de grande importância na economia brasileira por causarem grandes perdas nos setores agrícolas e florestais. Anualmente grandes somas são gastas buscando seu controle, que é feito principalmente através de produtos sintéticos disponíveis no mercado. Alguns deles encontram-se sob forte pressão das certificadoras nacionais e internacionais devido à necessidade de proteção dos ecossistemas, pois seus princípios ativos não são considerados adequados ao ambiente. O repertório comportamental apresentado pelas formigas é um dos responsáveis pela dificuldade encontrada em seu controle. Entre os principais comportamentos executados pelas formigas operárias encontra-se o “autogrooming”, “allogrooming”, trofalaxia e manipulação do lixo que são responsáveis pela manutenção da higiene da colônia, mantendo-a fora da ação de parasitas e patógenos. O inseticida fipronil é causador de efeitos no sistema nervoso podendo comprometer os indivíduos expostos e suprimir a colônia. Neste trabalho as operárias entraram em contato com o inseticida fipronil por duas vias: pulverização de solução de fipronil e iscas formicidas. No primeiro, aspergiu-se uma concentração subletal do inseticida fipronil no solo onde foram colocadas seis colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. No segundo três gramas de iscas formicidas foram oferecidas a cinco colônias de *A. subterraneus subterraneus*. Os principais comportamentos executados foram medidos através da frequência de acontecimento. Os comportamentos de “autogrooming”, descarte de adultos e a manipulação do lixo foram menores em colônias tratadas com o inseticida do que nas colônias testemunhas quando o inseticida foi pulverizado. Já com as iscas, os comportamentos de “autogrooming”, “allogrooming”, remoção de lixo, e atividades realizadas dentro do jardim de fungo pelas jardineiras foram reduzidos

o que propiciou o aumento no desenvolvimento do fungo parasita *Escovopsis* presente no jardim de fungo das colônias. Assim, as duas formas de aplicação do inseticida possuem efeitos nas operárias de *A. subterraneus subterraneus*, no entanto, as iscas possuem um efeito mais pronunciado nas colônias e operárias dessa espécie e foram letais às operárias jardineiras. Uma vez que essas operárias são responsáveis pela manutenção do fungo simbiote, sua ausência culmina no decaimento e morte do jardim de fungo e posterior morte das operárias por falta de substrato alimentar, ocorrendo por fim a supressão completa da colônia.

ABSTRACT

GANDRA, Lailla Cristina, MSc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Fipronil-mediate suppression of nests of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus***. Advisor: Terezinha M. C. Della Lucia. Co-advisors: Raul Narciso C. Guedes and Gustavo Ferreira Martins.

The leaf-cutting ants are considered pests in the Brazilian economy because they cause big losses in the agricultural and forestry systems. Annually, large sums are spent seeking their control, which is done primarily through available insecticides. Their use is under heavy pressure of national and international certification due to the need to protect the environment because the current active ingredients available in the commercial insecticide formulations are not considered safe to the environment. The behavioral repertoire displayed by the ants is responsible for the difficulty in achieving ant control. Among the main behaviors performed by worker ants there are the “autogrooming”, “allogrooming”, trophallaxis and waste handling, which are responsible for maintaining the colony hygiene keeping it free of parasites and pathogens. The insecticide fipronil cause neural effects leading the individuals to death by hyperactivity, impairing key behavioral traits important for the colony maintenance. In this work, the workers were expose to fipronil by two ways: spraying and toxic baits. In the first, fipronil was sprayed in the soil where six colonies of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* were placed. In the second, three grams of toxic bait were offered to five colonies to *A. subterraneus subterraneus*. The frequency of occurrence of the main behaviors was recorded. Under insect sprayed in soil, ant behaviors like “autogrooming”, disposal of adults and waste handling were reduced in colonies. Under toxic bait exposure, the ant behaviors of “autogrooming”, “allogrooming”, waste removal, and activities undertaken within the fungus garden by the minors workers were reduced resulting in the development of parasitic fungus *Escovopsis* present in the fungus garden of the colonies. Thus the two forms of the insecticide application have effects on workers of *A. subterraneus subterraneus*, however the baits have a more pronounced effect in the colonies and colony suppressed was achieved by affecting mainly minor workers. Since these workers are responsible for maintaining the symbiotic fungus, its absence culminates in the decay and death of the fungus garden and subsequent death of workers due to lack of food substrate, occurring, finally the complete suppression of colony.

1. INTRODUÇÃO

Em colônias de formigas-cortadeiras há uma sofisticada divisão de trabalho durante o forrageamento e o cultivo do jardim de fungo que visa à geração de recursos alimentares (Camargo et al., 2004). *Acromyrmex* mostra nitidamente um grupo de operárias mínimas que estão envolvidas nos cuidados com o fungo e nos cuidados com a prole. Outro grupo faz o forrageamento, atividade que envolve exploração e recrutamento para o corte, o corte em si e o transporte do material vegetal cortado até o ninho, e sua degradação inicial antes da incorporação ao fungo (Della Lucia et. al., 1993).

Vários podem ser os fatores que levam a seleção de um vegetal para ser cortado. Várias características físicas e químicas das folhas possivelmente influenciam na escolha do vegetal a ser selecionado para o corte, e não apenas um único aspecto (Ribeiro & Marinho, 2011). Griffiths & Hughes (2010) sugerem que o nível de contaminação microbiana nas folhas pode ter um papel importante na seleção do material forrageado pelas formigas-cortadeiras. E mesmo após transportarem a planta para o ninho, as formigas ao perceberem que esse substrato contém alguma substância danosa ao jardim de fungo, retiram-no do interior da colônia e o transportam para o exterior (North et. al., 2000).

As iscas aplicadas para o controle químico do formigueiro utilizam as operárias forrageadoras para coleta e transporte dos inseticidas para o interior do ninho. Uma boa isca, portanto, deve possuir as seguintes qualidades: ser não-repelente às formigas forrageadoras e ser preferida ao competir com fontes alimentares. As iscas devem conter uma combinação de um atrativo e uma concentração de princípio ativo que não detenham a alimentação e o recrutamento

(Nyamukondiwa & Addison, 2011). Devem ainda ter uma vida no campo relativamente longa e estável, e persistir em uma colônia tempo suficiente para atingir a rainha e as larvas (Mathieson et. al., 2012).

Outro fator de grande importância para o sucesso das formigas é um eficiente sistema de distribuição de alimentos dentro da colônia (Moreira et. al., 2006), que permite a membros não envolvidos na atividade de forrageamento receber nutrientes vitais. A troca de nutrientes por trofalaxia, ou seja, passagem de líquidos de uma formiga para outra de “boca a boca” (Richard & Errard, 2009), é considerada importante parte do repertório comportamental descrito como a regurgitação de líquidos, estocados no papo que são passados para as companheiras, acompanhados por um complexo ritual comportamental de antenação (Moreira et. al., 2010).

Segundo Moreira e colaboradores (2010), a transferência de nutrientes por trofalaxia entre todas as classes de operárias é importante na dinâmica da colônia e não está restrita a um grupo específico de operárias, o que resulta em um aumento nas taxas de distribuição de nutrientes por toda colônia. Ao contrário do que possa se imaginar infecções não induzem a uma redução dessa interação social, ao contrário, o comportamento de trofalaxia pode até ser aumentado (De Souza et. al., 2008)

Formigas-cortadeiras, como quase todos os insetos sociais adultos, sofrem mudanças comportamentais ao longo do tempo as quais ocasionam mudança de seu papel dentro da colônia. O polietismo etário é relacionado com o aumento do risco de mortalidade durante as atividades desenvolvidas fora do ninho e cada espécie possui seu próprio padrão distinto de polietismo etário (Camargo et. al.,

2007). O polietismo etário foi observado em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* onde operárias jovens desempenham tarefas dentro do ninho enquanto indivíduos mais velhos realizam as atividades fora do ninho (Moreira et. al. 2010). Segundo Camargo e colaboradores (2006), a forte coesão entre operárias e prole em colônias de formigas tem sido amplamente reconhecida e estudada. O cuidado parental é um fator chave na vida social das colônias, com as operárias sendo capazes de avaliar as necessidades da prole tais como higienização e alimentação.

O comportamento de “grooming” é considerado um mecanismo de defesa e auxilia nas tarefas dentro de uma colônia. É considerado como uma estratégia bastante útil dentre as sofisticadas estratégias defensivas para conter a propagação de doenças entre membros da colônia e também evitar infestação do jardim de fungo por patógenos e saprófitas (Galvanho et. al., 2013); essas estratégias visam ao aumento da higiene dos ninhos (Reber et. al., 2011). Operárias de formigas se descontaminam através de “autogrooming” e descontaminam a outros membros da colônia por “allogrooming” (Mattoso et. al., 2012). A quantidade e eficiência desses comportamentos podem variar de acordo com o estágio da infecção e até mesmo com o tamanho do grupo (Reber et. al., 2011).

Nas formigas-cortadeiras, o “grooming” é um comportamento muito freqüente, utilizado juntamente com outras defesas comportamentais e químicas, incluindo capina, secreções glandulares antimicrobianas e metabólitos antibióticos de bactéria (Fernandéz-Marín et. al., 2007), o “grooming” é comportamento muito frequente. É possível que esse comportamento possa ser um meio pelo qual operárias recebem informações e se comunicam (Lopes et. al., 2005).

O “autogrooming” é caracterizado pela passagem de uma perna sobre a outra, esfregando as pernas dianteiras com as partes bucais, as antenas com as partes bucais ou pernas anteriores, o abdome com as partes bucais ou pernas posteriores e a cabeça com os tarsos (Galvanho et. al., 2013). O “allogrooming” por sua vez, requer avaliações de custo/benefício quando o grupo é exposto a um parasita. A expressão desse comportamento é comumente ligada à presença e localização da ameaça parasítica, sendo geralmente considerada uma resposta condicional. O “autogrooming” é mais comum a 10m da entrada do ninho, enquanto o “allogrooming” é mais frequente próximo à entrada do ninho e realizado pelas operárias mínimas (Griffiths & Hughes, 2010).

O lixo pode ser perigoso ao conter patógenos ou compostos tóxicos e a divisão de trabalho pode reduzir a quantidade de indivíduos expostos à infecção minimizando o número de operárias que irá entrar em contato com o material que constitui o lixo (Waddington & Hughes, 2010). Em colônias de formigas-cortadeiras o manejo do lixo se faz necessário para proteger a prole, a rainha, o fungo simbiote e as próprias operárias. A exposição da colônia a inseticidas pode supostamente alterar os comportamentos de “grooming” e manejo do lixo reduzindo a sobrevivência colonial.

Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de elucidar como funciona a supressão de colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* pelo inseticida fipronil. Para tanto, neste trabalho foram testados os efeitos do inseticida fipronil aplicado de duas maneiras (pulverização e iscas granuladas) em colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Os efeitos das aplicações foram avaliados por meio de comparações entre atividades comportamentais de operárias forrageadoras e jardineiras, incluindo: “grooming”- “autogrooming” e

“allogrooming”, consumo foliar e manipulação do lixo, manipulação do micélio, higienização do micélio e transporte de larvas. A mortalidade de operárias foi também avaliada assim como possíveis efeitos secundários no sistema reprodutor das rainhas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Manutenção dos formigueiros em laboratório:

Os experimentos foram realizados em operárias de dezesseis colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* coletadas na região de Viçosa, MG, Brasil (20°45'14" S e 42°52'54" O) e trazidas para o Laboratório do Insetário/DBA da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidas a 25±5 °C, 75±5% UR e 12 horas de escotofase (Della Lucia, et al., 1993). As colônias possuíam aproximadamente um litro de fungo e exibiam atividade de forrageamento semelhante.

2.2. Aplicação do fipronil por pulverização:

Uma vez que iscas formicidas a base de fipronil apresentam uma concentração de 0,003% p/p de princípio ativo (Atack iscas granuladas® - Biocarb Agroquímica), fez-se necessária a utilização do fipronil na forma de concentrado emulsionável para fins de uso no trabalho proposto.

O concentrado emulsionável possui concentração de 2,5% m/v (Termidor® 25 CE – BASF S.A.). Para gerar uma solução estoque, a partir do concentrado, que continha as mesmas propriedades inseticidas de uma isca foi usada a quantidade de 0,12 mL do produto. Esse volume apresenta a mesma concentração de fipronil presente na isca. A essa quantidade de concentrado foram adicionados 0,38 mL de água destilada.

Para realizar os testes era preciso que as colônias não percessem rapidamente na presença do inseticida. A solução estoque, por ter concentração

semelhante a das iscas formicidas, levava a colônia à morte em curto período de tempo. Em testes preliminares, essas colônias em contato com o solo pulverizado com a solução estoque morriam em prazo inferior a uma semana. Assim, diluições a partir da solução estoque foram feitas com o objetivo de encontrar uma diluição que permitisse a execução do repertório comportamental das operárias forrageadoras após as pulverizações. A concentração determinada nesses testes foi de 0,12m/v diluída em água destilada 100 vezes.

Assim, aproximadamente 400g de solo retirados dos fundos do Laboratório do Insetário/DBA da Universidade Federal de Viçosa foram colocados em seis bandejas de 30cmx30cm de forma que cobrissem completamente o seu fundo. Essas bandejas foram levadas ao laboratório onde receberam 1mL da solução diluída do inseticida. Esse inseticida foi pulverizado com auxílio de um pincel ligado a uma bomba de alta pressão para garantir uma distribuição mais homogênea da solução. O solo das testemunhas foi pulverizado com 1mL de água destilada.

Posteriormente, cada bandeja recebeu uma colônia de *A. subterraneus subterraneus*. As colônias foram acondicionadas em potes plásticos transparentes de volume de 500 mL com uma abertura que permitia o fluxo de operárias da colônia para o solo pulverizado com o inseticida. Como o fundo do pote era fechado, não houve qualquer contato do fungo simbionte com o solo, apenas das operárias.

2.2.1. Observações comportamentais:

Após o contato da colônia com o solo, os seguintes comportamentos das operárias forrageadoras foram avaliados: “grooming” (“autogrooming” e “allogrooming”), trofalaxia, descarte de operárias mortas e manipulação do lixo (operárias que exerciam atividades nos monte de lixo).



Figura 1: Colônias usadas no experimento acondicionadas no laboratório;
A - colônia controle; B - colônia em solo tratado com solução de fipronil.

2.2.2. Quantificação do corte de folhas:

Foram oferecidos cinco gramas de folhas de acalifa (*Acalipha wilkesiana*) para avaliar as possíveis diferenças na quantidade de folhas cortadas, em gramas, das colônias tratadas. A quantidade de material vegetal cortado foi avaliada, pela fórmula adaptada de Antunes & Della Lucia (1999):

$$Cr = QFi - (QFf - \%PA)$$

Onde, Cr: consumo real de folhas;

QFi: quantidade de folhas oferecidas ;

QFf: quantidade de folhas restantes após 24h;

%PA: perda d'água das folhas.

2.2.3. Obtenção da massa do lixo:

Como não foi possível separar as formigas mortas com precisão devido à presença de partículas do solo, foi medida a massa do lixo como um todo, tentando-se obter apenas as formigas.



Figura 2: Detalhe do lixo produzido pelas colônias.

2.3. Aplicação de fipronil em iscas granuladas

Dez colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* com volume de jardim de fungo de aproximadamente um litro e com forrageamento semelhante foram mantidas no laboratório recebendo por uma semana iscas granuladas sem princípio ativo (placebo). Dessa forma, as operárias foram condicionadas a forragearem as iscas evitando que essas fossem rejeitadas durante o experimento.

As colônias foram divididas em dois grupos: controle e tratamento. A quantidade de iscas a ser oferecida durante o experimento foi definida baseando-se na recomendação de uso de três gramas de iscas para colônias de aproximadamente 1L de volume de jardim de fungo. Assim, a quantidade de 3g de isca foi usada no tratamento de cada colônia. O grupo controle continha cinco colônias que receberam iscas placebo (i. e. sem o inseticida) na quantidade de três gramas/colônia. Já o grupo tratamento, composto por outras cinco colônias, recebeu três gramas de iscas com fipronil por colônia, na concentração de 0,003 p/p, uma vez. Após 24 horas, todas as colônias, tratadas e não tratadas com iscas, foram alimentadas com folhas de acalifa.

As colônias foram acondicionadas em bandejas de área de 30cmx30cm. Cada bandeja foi marcada com 14 centímetros a partir da borda até a entrada da colônia e uma subdivisão foi feita na distância de sete centímetros da entrada e da borda (Figura 3). Na marca feita na borda foram colocados os grânulos das iscas. A isca era considerada carregada assim que ultrapassava a marca de sete centímetros, indo em direção a colônia.

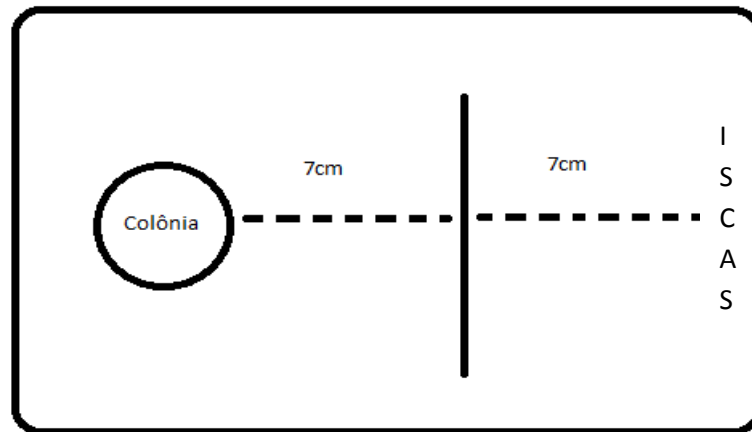


Figura 3: Desenho esquemático da disposição do experimento nas bandejas.

2.3.1. Observações comportamentais:

Os trinta minutos iniciais na presença das iscas (placebo e com inseticida) foram gravados com uma câmera filmadora Sony HDR-XR520V para avaliações posteriores no caso possíveis comportamentos adversos após a presença das iscas.

As observações comportamentais se repetiram a cada 24 horas, sempre pela manhã até a morte das colônias tratadas. Nos dois tratamentos foi avaliado o número de operárias forrageadoras que realizavam os comportamentos de “autogrooming”, “allogrooming”, remoção de fragmentos de lixo de dentro do ninho para o monte de lixo, manipulação do lixo e trofalaxia. As operárias mínimas por permanecerem mais tempo junto ao jardim de fungo tiveram os seguintes comportamentos avaliados: manipulação do micélio (transferência de um fragmento de hifa de um local para outro dentro do jardim de fungo), lambertura do micélio (higienização do micélio) e transporte de larvas.

2.3.2. Quantificação do corte de folhas:

A quantificação do corte de folhas foi realizada de modo semelhante à realizada no item 2.2.2.

2.3.3. Mortalidade de formigas:

As formigas mortas foram separadas o máximo possível do lixo, recolhidas e pesadas diariamente até a morte das colônias tratadas.



Figura 4: Formigas mortas separadas e pesadas para posterior comparação.

2.4. Análises estatísticas

Os dados de número de operárias foram analisados mediante análise de falha temporal usando estimadores Kaplan-Meier a 5% de probabilidade utilizando o programa SigmaPlot12®, já os dados de mortalidade de formigas e corte de folhas por serem valores de média foram analisados mediante teste t a 5% de probabilidade com o programa Statistica 7.0®.

3. RESULTADOS

3.1. Pulverização de solução de fipronil:

3.1.1. Observações comportamentais:

A frequência do comportamento de “autogrooming” diferiu entre as colônias, as quais foram, então, agrupadas em colônias testemunhas e colônias tratadas mediante análise de falha temporal usando estimadores Kaplan-Meier (χ^2 Log-Rank = 67,38; $P < 0,001$) (Figura 5). Já para o comportamento de “allogrooming” não se observaram diferenças significativas entre as colônias que foram tratadas mediante análise de falha temporal usando estimadores Kaplan-Meier (χ^2 Log-Rank = 0,82; $P = 0,37$).

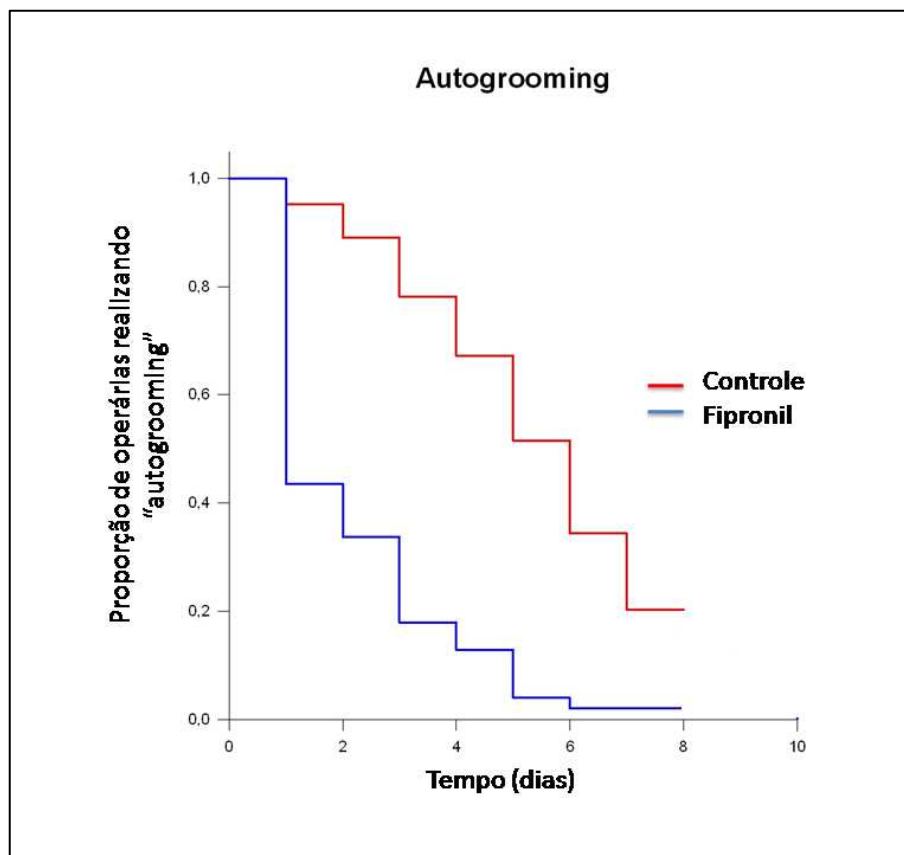


Figura 5: Proporção de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* realizando “autogrooming” em colônias tratadas e colônias não tratadas com a solução do inseticida fipronil.

O número médio de indivíduos adultos que foram descartados ao longo do experimento também foi significativamente diferente entre os tratamentos mediante análise de falha temporal usando estimadores Kaplan-Meier (χ^2 Log-Rank = 7,51; $P = 0,006$) (Figura 6).

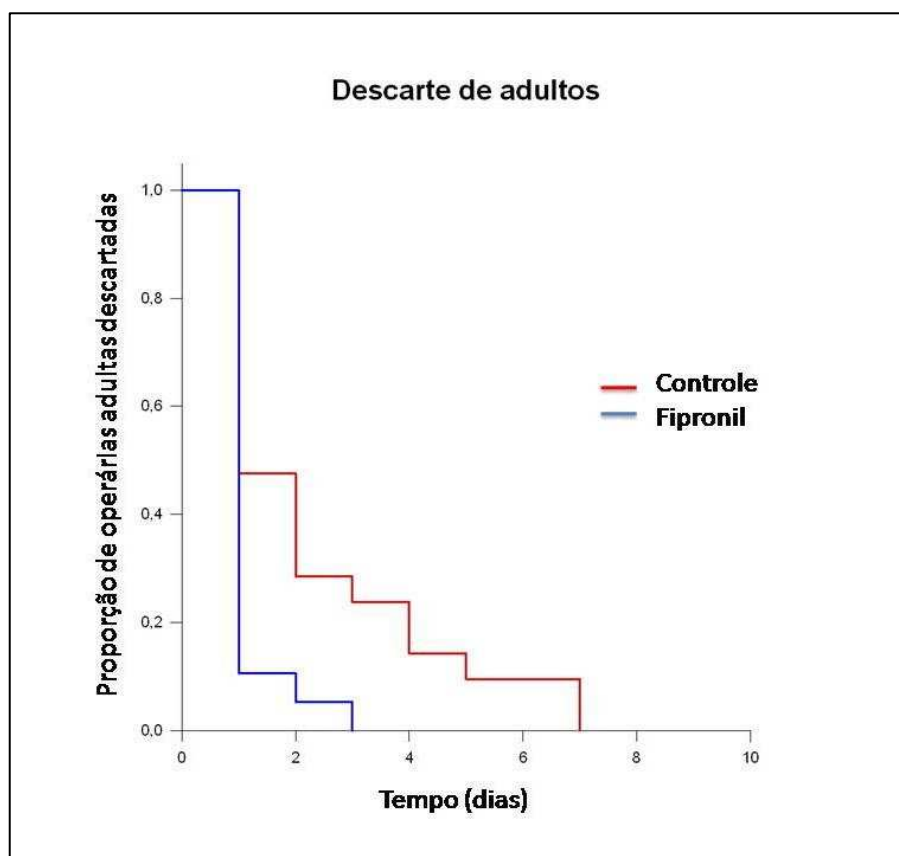


Figura 6: Proporção de operárias adultas de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* descartadas em colônias tratadas e colônias não tratadas com a solução do inseticida fipronil.

O número médio de operárias envolvidas na manipulação do lixo de colônias testemunhas e de colônias tratadas foi significativamente diferente mediante análise de falha temporal usando estimadores Kaplan-Meier (χ^2 Log-Rank = 7,38; $P = 0,007$) (Figura 7).

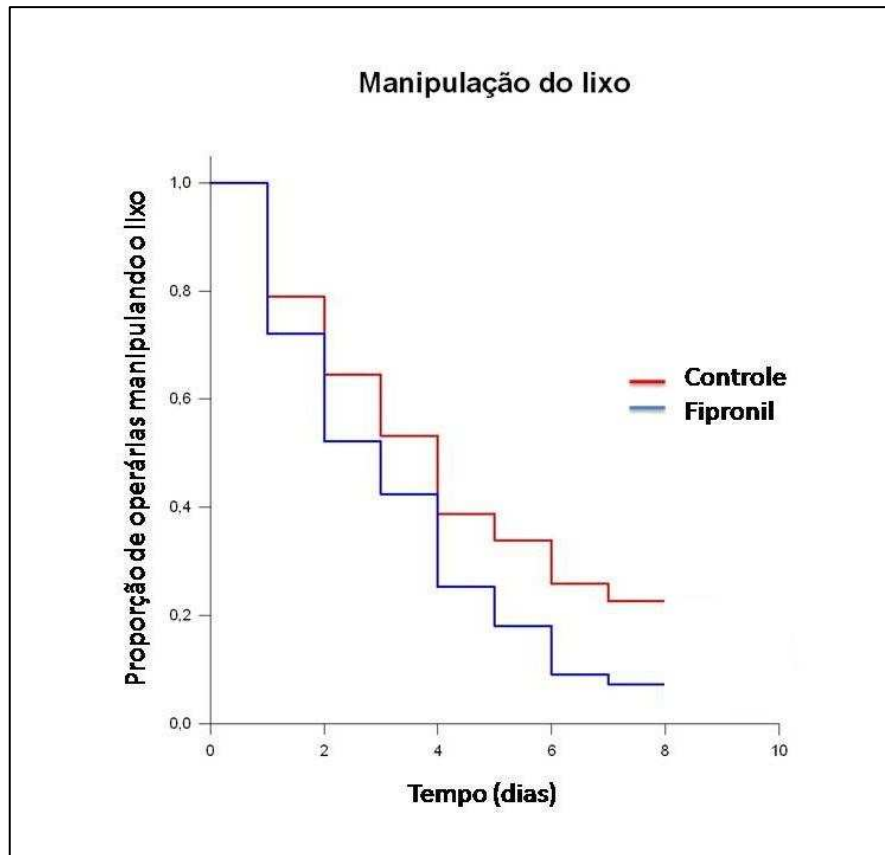


Figura 7: Proporção de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* manipulando do lixo em colônias tratadas e colônias não tratadas com a solução do inseticida fipronil.

3.1.2. Quantificação do corte de folhas:

A quantidade de folhas cortadas pelas operárias não diferiu significativamente pelo teste t ($t= 0,50$; $F=2,25$; $P=0,62$) entre colônias controle e colônias tratadas com solução de fipronil que cortaram em média 3,45g (desvio padrão $\pm 1,17$) e 3,33g (desvio padrão $\pm 1,75$) de folha, respectivamente.

3.1.3. Quantidade de lixo:

A quantidade média de lixo (g) produzida pelas colônias foi de 6,96g ($\pm 4,55$) para as colônias controle e de 7,49g ($\pm 5,99$) para as colônias tratadas com solução de fipronil. Essas quantidades não foram significativamente diferentes mediante o teste t ($P=0,81$)

3.2. Aplicação de fipronil em iscas granuladas:

3.2.1. Carregamento de iscas

A massa de iscas carregadas (g) não diferiu significativamente entre os tratamentos pelo teste t ($t= -1,24$; $F=3,82$; $P=0,25$). As colônias testemunhas carregaram, em média, 1,09g (desvio padrão $\pm 0,58$) e as colônias tratadas com fipronil carregaram aproximadamente 1,8g (desvio padrão $\pm 1,14$) de iscas granuladas.

3.2.2. Observações comportamentais:

Operárias forrageadoras:

Os comportamentos de “autogrooming” (Figura 8), “allogrooming” (Figura 9) e a manipulação do lixo (Figura 10) foram diferentes significativamente entre os tratamentos mediante análise de falha temporal usando estimadores Kaplan-Meier (χ^2 Log-Rank = 29,84; $P < 0,001$; χ^2 Log-Rank = 14,30; $P < 0,001$; χ^2 Log-Rank = 8,60; $P = 0,003$, respectivamente). As colônias

testemunhas apresentaram maiores médias nas frequências desses comportamentos do que as colônias tratadas com iscas contendo fipronil.

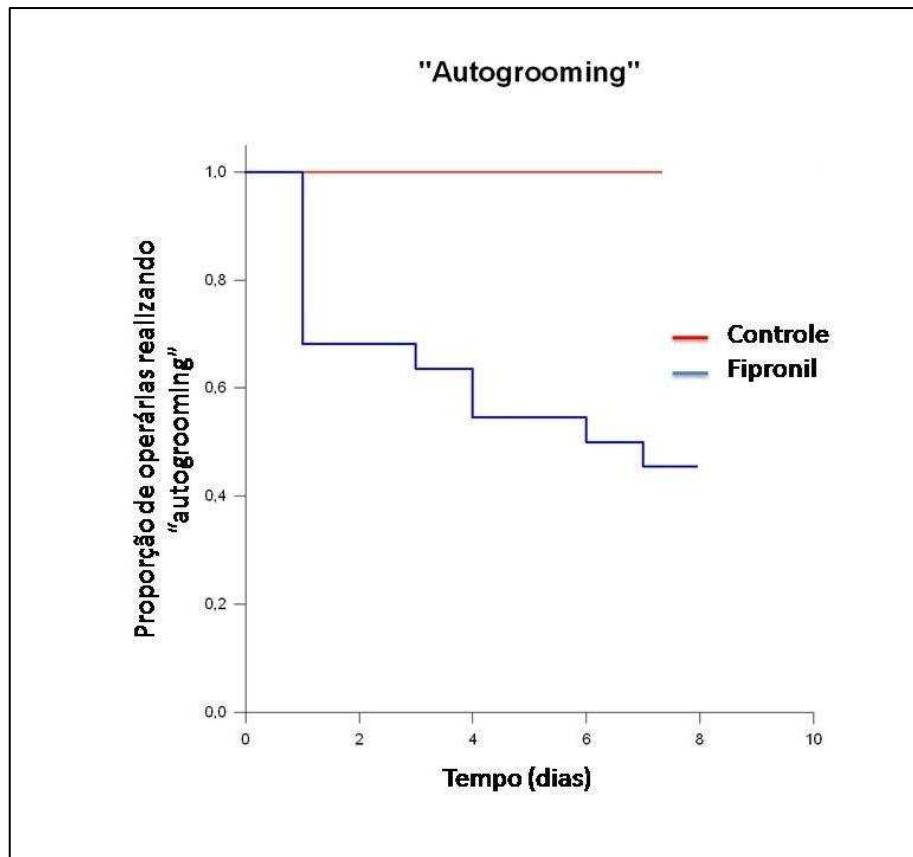


Figura 8: Proporção de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* realizando “autogrooming” em colônias tratadas e colônias não tratadas com iscas com fipronil.

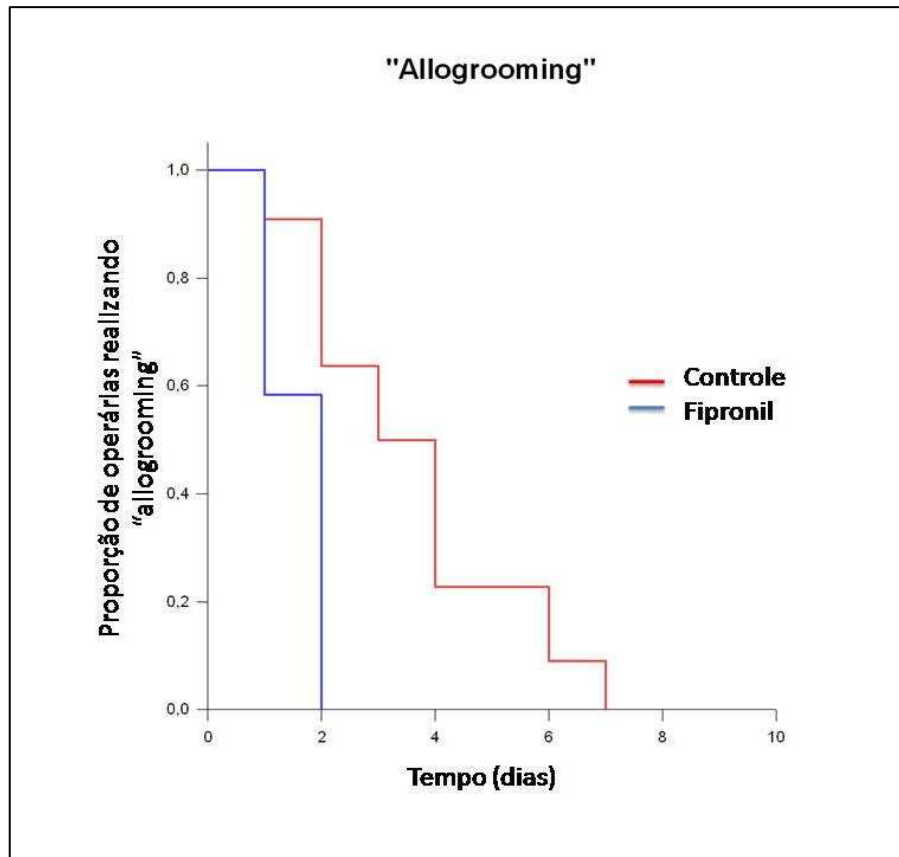


Figura 9: Proporção de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* realizando “allogrooming” em colônias tratadas e colônias não tratadas com iscas com fipronil.

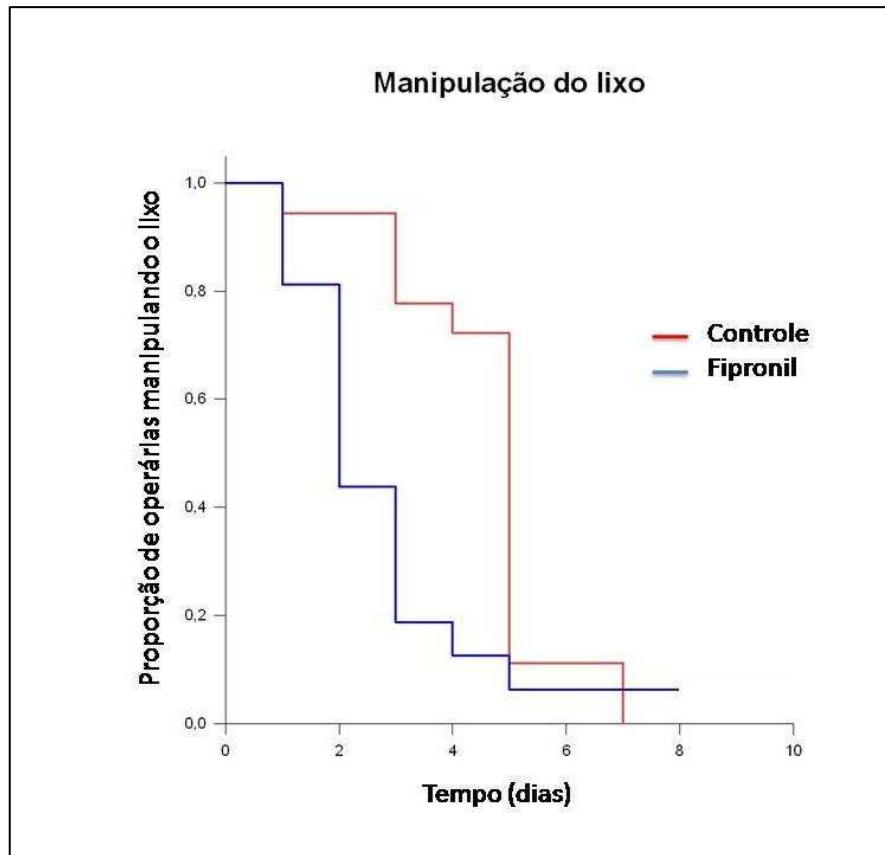


Figura 10: Proporção de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* manipulando o lixo em colônias tratadas e colônias não tratadas com iscas com fipronil.

A remoção do lixo não diferiu entre os tratamentos através do teste t ($P=0,57$). O comportamento de trofalaxia foi observado em raríssimas vezes em ambos os tratamentos e por isso não foi incluído nas estatísticas.

Operárias jardineiras:

Os comportamentos mais conspícuos observados no grupo das operárias jardineiras foram a manipulação de hifas do micélio (Figura 11), a lambedura do micélio (Figura 12) e o transporte de larvas dentro do jardim de fungo (Figura 13). Todos os comportamentos apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos tratadas mediante análise de falha temporal usando estimadores Kaplan-Meier (χ^2 Log-Rank = 9,14; $P = 0,003$; χ^2 Log-Rank = 12,44; $P < 0,001$; χ^2 Log-Rank = 9,37; $P = 0,002$, respectivamente), sendo que as médias da frequência da realização desses comportamentos foram maiores para as colônias testemunhas do que para as colônias tratadas com iscas com fipronil.

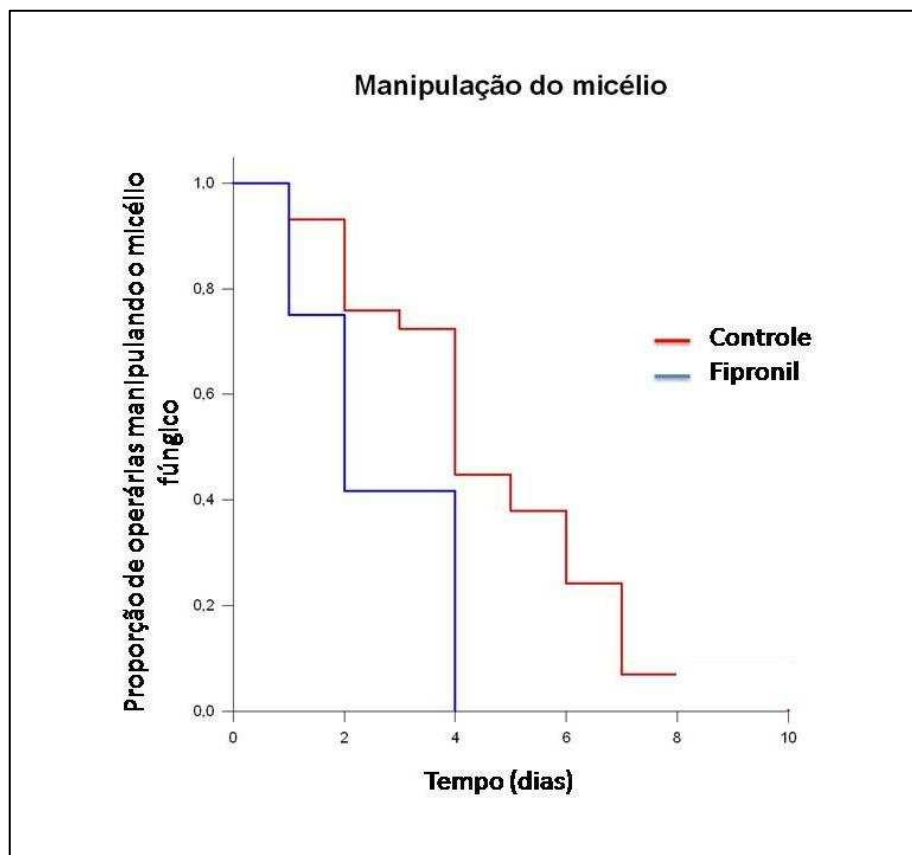


Figura 11: Proporção de jardineiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* manipulando o micélio em colônias tratadas e colônias não tratadas com iscas com fipronil.

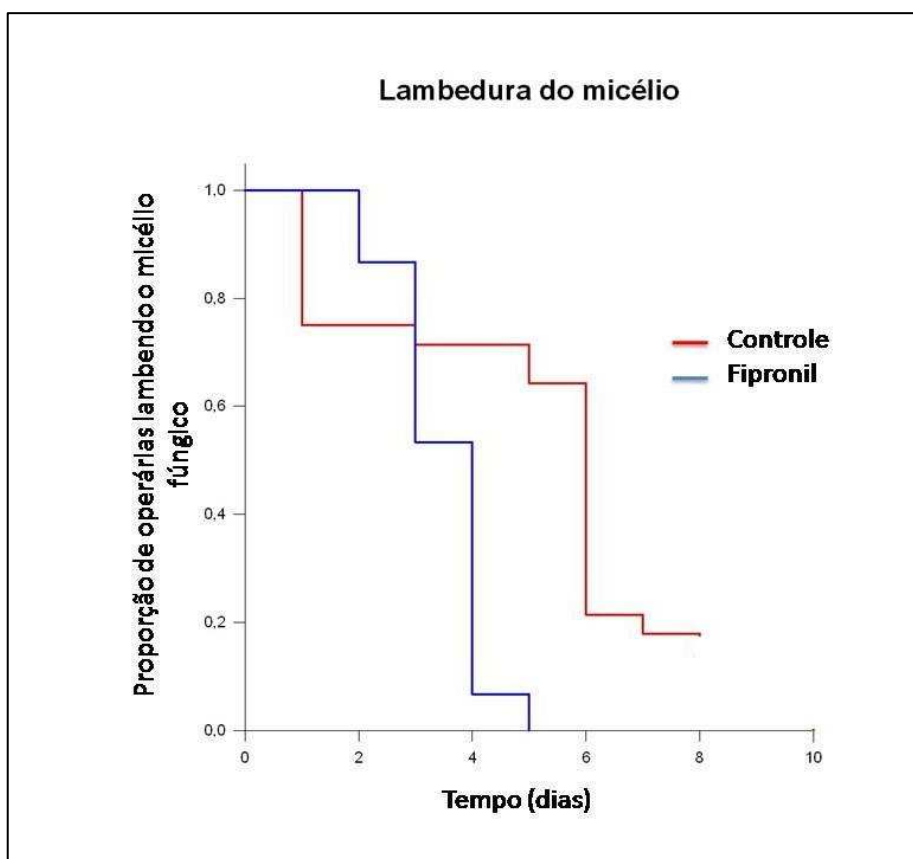


Figura 12: Proporção de jardineiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* lambendo o micélio em colônias tratadas e colônias não tratadas com iscas com fipronil.

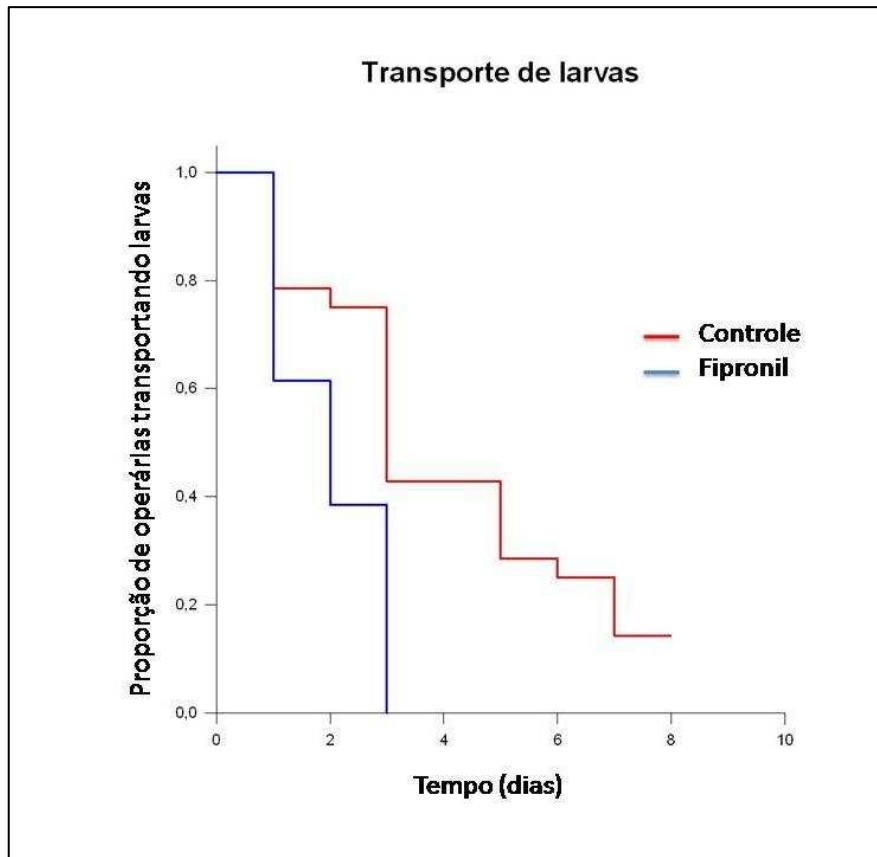


Figura 13: Proporção de jardineiras de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* transportando larvas em colônias tratadas e colônias não tratadas com iscas com fipronil.

3.2.3. Quantificação do corte de folhas:

A massa (g) de vegetais cortados, em média, apresentou diferenças significativas entre os tratamentos através do teste t ($t=3,33$; $F=14,66$; $P=0,00$) (Figura 14). Para as colônias controle a média foi de 2,67g (desvio padrão $\pm 0,31$) e para as colônias tratadas a média foi de 1,66g (desvio padrão $\pm 1,19$).

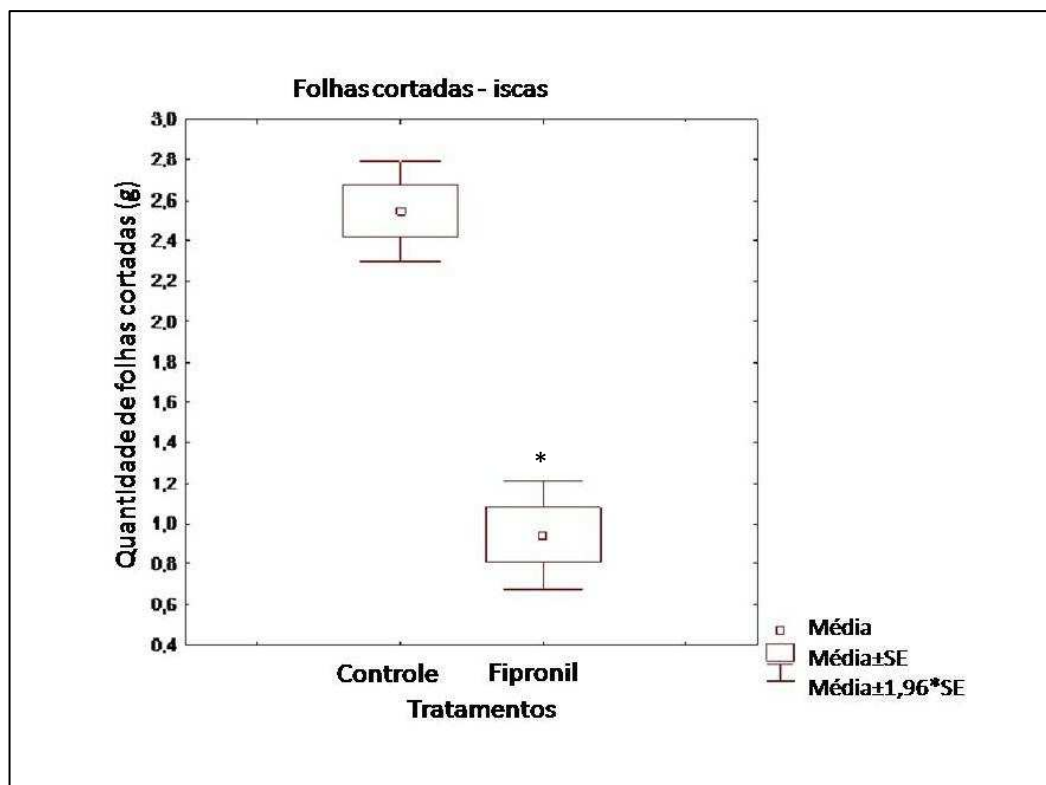


Figura 14: Quantidade média de folhas cortadas, em gramas, por colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* testemunhas e por colônias tratadas com iscas com fipronil. * indica diferença significativa em relação ao controle.

3.2.4. Mortalidade de operárias:

A massa de formigas mortas (g) foi pesada em ambos os tratamentos e verificou-se que houve diferenças significativas entre eles através do teste t ($t = -3,30$; $F = 2587,68$; $P = 0,00$) (Figura 16). O tratamento à base de iscas com fipronil forneceu maior média de massa de formigas mortas em relação ao tratamento à base de iscas placebo. Essas médias foram 0,96g (desvio padrão $\pm 1,10$) e 0,02 (desvio padrão $\pm 0,02$), respectivamente.

Uma observação pertinente foi o grande número de operárias jardineiras mortas em colônias tratadas com iscas com fipronil durante o experimento (Figura

15). Isso sempre inviabilizou a contagem dessas registrando-se então a massa de formigas mortas nos tratamentos, parâmetro que mostrou diferença significativa.



Figura 15: Detalhe da quantidade de operárias mortas, principalmente jardineiras.

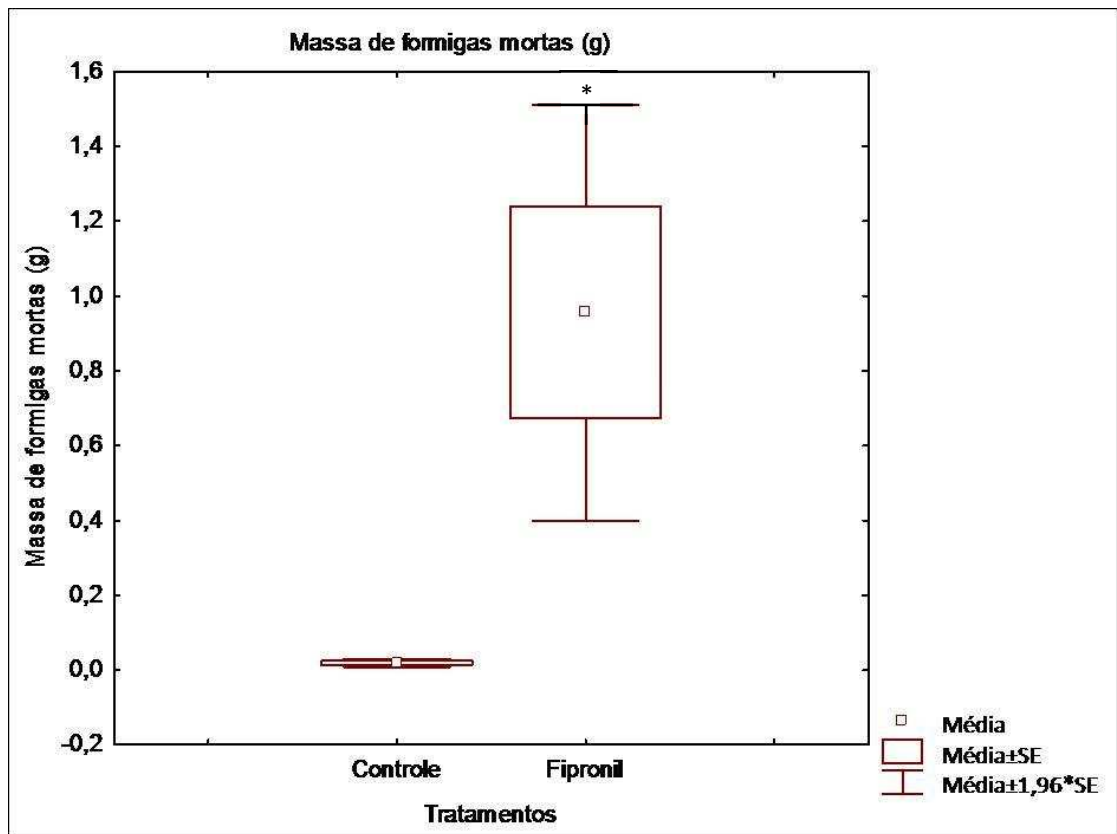


Figura 16: Massa média (g) de operárias mortas em colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* testemunhas e colônias tratadas com iscas com fipronil. * indica diferença significativa em relação ao controle.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi testada a hipótese de que o inseticida fipronil reduz drasticamente as atividades realizadas pelas operárias acarretando na morte das colônias. Os resultados encontrados neste trabalho mostraram uma diminuição nos comportamentos apresentados pelas operárias em ambas as formas em que o inseticida fipronil foi oferecido: pulverização e iscas.

No entanto, a redução drástica não aconteceu com a pulverização, muito provavelmente devido ao pouco contato que as operárias tiveram com o inseticida. O tempo de exposição ao inseticida parece ser um fator chave para a redução de comportamentos. Quando as colônias foram tratadas com iscas, que requerem maior tempo de contato com as operárias no seu transporte e degradação, houve redução na maioria dos comportamentos executados.

No caso da pulverização, o “autogrooming”, o descarte de operárias e o número de operárias manipulando o lixo foram os comportamentos que diminuíram na presença do inseticida. O comportamento de “allogrooming” frente a solução de fipronil pulverizado não foi alterado, uma vez que o inseticida na concentração usada pode não ter causado contaminação suficiente para alterar tais comportamentos sociais.

Já na presença de iscas granuladas que continham o inseticida fipronil os comportamentos de “autogrooming”, “allogrooming”, o número de operárias manipulando o lixo apresentados pelas operárias forrageadoras foram diminuídos. De modo semelhante, os comportamentos de manipulação (transferência) do micélio, lambedura (higienização) do micélio e transporte de larvas apresentados pelas operárias jardineiras foram reduzidos.

Sabe-se que formigas-cortadeiras realizam ambos “autogrooming” e “allogrooming” para eliminar parasitas delas mesmas e de seu jardim de fungo (Galvanho et. al., 2013). Richard & Errard (2009) observaram que em *A. subterraneus*, operárias maiores são mais envolvidas em “autogrooming” e “allogrooming” do que operárias menores. E que as operárias se envolvem mais significativamente nesses comportamentos quando retornam ao ninho do que aquelas que não saíram dele.

Segundo Santos e colaboradores (2007), a redução de comportamentos ligados à higienização, como “autogrooming” e “allogrooming” em operárias pode levá-las a um quadro de maior susceptibilidade a infecções por microorganismos. Ao utilizarem o inseticida Imidaclopride em operárias de *Atta sexdens rufopilosa*, os autores constataram que essas operárias foram mais susceptíveis a ação do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Decréscimo no comportamento de “autogrooming” em operárias de *A. subterraneus subterraneus* frente a aplicação do inseticida Imidaclopride também foi verificado por Galvanho e colaboradores (2013). O comportamento de “autogrooming” é uma importante estratégia que evoluiu para redução do risco de infecção por parasitas. Isso é importante numa base individual, mas ainda mais quando se considera animais sociais, dado o risco de transmissão de doenças entre membros da colônia (Galvanho et. al., 2013), já que essas colônias compreendem milhares de indivíduos vivendo em proximidade.

O comportamento de “allogrooming” não apresentou alterações significativas frente ao inseticida fipronil pulverizado no solo o que pode ser devido a não alteração no reconhecimento do perfil de hidrocarbonetos

apresentado pelas operárias que entraram em contato com o inseticida. No entanto, colônias que receberam o inseticida na forma de isca apresentaram redução no comportamento de “allogrooming” o que pode ser decorrente de uma diminuição na vigilância das operárias.

Além de inseticidas, fungos entomopatogênicos também podem alterar os comportamentos de higienização. Reações de alterações no “autogrooming” na presença de fungos entomopatogênicos foram observados quando se aplicaram altas doses de esporos de *Metarhizium brunneum* (antigo *Metarhizium anisopliae*) em câmaras de *Formica selysi* (Reber et. al., 2011). Esses autores obtiveram aumento significativo na frequência de “autogrooming” entre as operárias.

Também Okuno e colaboradores (2012) encontraram aumento na frequência de “autogrooming” com a aplicação de baixas dosagens de *M. brunneum* na formiga *Lasius japonicus* e a duração do “autogrooming” também aumentou sob alta dosagem de fungo.

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que o inseticida fipronil reduziu os comportamentos de higienização das operárias e acarretou a morte das mesmas levando a colônia, como um todo, a um estado de debilidade e posterior morte.

A massa de lixo produzido pelas colônias pulverizadas com fipronil não diferiu significativamente do controle. No entanto, a frequência de descarte de operárias adultas foi maior nas colônias não tratadas, bem como a frequência de operárias que manipularam o lixo.

O corte de folhas apresentado pelas cortadeiras pode variar de acordo com o tamanho dos formigueiros, com a espécie de formiga envolvida e com as

condições ambientais às quais as colônias estão submetidas (Ribeiro & Marinho, 2011). No experimento em que houve pulverização de fipronil não ocorreram diferenças na quantidade de folhas cortadas entre as colônias tratadas e as não tratadas com solução de fipronil. No entanto, no experimento com as iscas granuladas as colônias tratadas e não tratadas diferiram entre si, sendo a quantidade de folhas cortadas maior nas colônias não tratadas.

Nas colônias que foram tratadas com iscas houve uma redução na remoção de fragmentos de lixo e ocorreu ainda alta mortalidade de operárias em relação às colônias controle. O principal componente do lixo foram as formigas jardineiras muito provavelmente devido ao maior tempo que ficam expostas as iscas manipulando-as.

Uma vez que as jardineiras são as principais responsáveis pela manutenção do jardim de fungo, os comportamentos de lambertura micélio e manipulação do micélio foram reduzidos. Isso, sem dúvida, implica no comprometimento da vida da colônia.

O jardim de fungo das formigas-cortadeiras hospeda parasitas microfúngicos, os quais matam e consomem os tecidos do fungo mutualista (Taerum et. al., 2010). O principal fungo parasita encontrado no jardim de fungo é pertencente ao gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) (Currie et. al., 1999; Reynolds & Currie, 2004). Segundo Currie e colaboradores (1999) *Escovopsis* é um fungo comum, abundante e persistente nos jardins de fungo de formigas da tribo Attini. *Escovopsis* exibe crescimento mínimo em jardins saudáveis sendo necessária a morte do hospedeiro para que o parasita consiga nutrientes, tornando-o, portanto, necrófito (Reynolds & Currie, 2004).

A redução da atividade de higienização encontrada nas colônias tratadas com iscas debilitou o jardim de fungo e gerou as condições favoráveis para que o parasita *Escovopsis* se desenvolvesse e dominasse as colônias até que elas pereceram. Carlos e colaboradores (2011) sugeriram que fungos parasitas como *Escovopsis* podem rapidamente se disseminar em colônias debilitadas. A utilização de inseticidas aliada ao uso de um agente de controle biológico é uma possibilidade a ser considerada no manejo de formigas-cortadeiras uma vez que a relação entre os fungos hospedeiro e parasita oferece uma oportunidade única para explorar inimigos naturais específicos como potenciais agentes de controle biológico dessas formigas (Folgarait et. al., 2011). Uma possibilidade a partir daí seria a utilização de fungos entomopatogênicos em associação com o fipronil com o intuito de eliminar a rainha, que permaneceu viva durante todo o trabalho.

Outro comportamento relevante das jardineiras é sua ação de cuidado com a prole, na qual segundo Viana-Bailez e colaboradores (2011) as operárias gastam muito tempo. Neste trabalho, essa atividade também foi reduzida e contribuiu para que as colônias tratadas pudessem perecer. As larvas são excepcionalmente vulneráveis a parasitas, uma vez que são incapazes de realizar comportamentos como “grooming” o que torna a relação de cuidado com a prole por parte das jardineiras uma interação de grande importância para a perpetuação da colônia (Lopes et. al., 2005).

Quando se trata de inseticidas no controle de formigas-cortadeiras, as pesquisas estão voltadas para o tempo que ele levaria para cessar os danos causados pela colônia ou em sua forma de ação no indivíduo. Pouco se sabe sobre como os inseticidas vão agir dentro das castas, qual delas será a afetada e quais os

efeitos que isso pode ter para a colônia como um todo. O entendimento desses processos pode facilitar o desenvolvimento de táticas de controle mais eficientes.

Desse modo, este trabalho permitiu constatar que o fipronil suprime as colônias da formiga-cortadeira *A. subterraneus subterraneus* por levar as operárias à morte, principalmente as jardineiras. Com a morte dessas operárias o jardim de fungo ficou susceptível a fungos parasitas como o *Escovopsis* que geralmente tem sua infecção controlada por elas. A falta de jardineiras causada pelo fipronil e a infecção por *Escovopsis* acabam por suprimir a colônia.

5. CONCLUSÕES

O inseticida fipronil pulverizado no solo, onde foram alojadas colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, reduziu os comportamentos de “autogrooming”, de descarte de operárias adultas e de manipulação do lixo por operárias nas colônias tratadas. O “allogrooming”, trofalaxia e descarte de jovens não foram afetados pela presença do inseticida.

As iscas contendo fipronil oferecidas à colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* reduziram todos os comportamentos avaliados tanto para as operárias forrageadoras (“autogrooming”, “allogrooming”, remoção de lixo), quanto para operárias jardineiras (manipulação do micélio, lambedura do micélio e transporte de larvas).

A quantidade de folhas cortadas pelas colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* diminuiu significativamente após o oferecimento das iscas granuladas.

Nenhum efeito secundário no sistema reprodutor das rainhas de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* tratadas com fipronil foi observado.

A entrada da isca no jardim de fungo de colônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* possibilitou maior interação desta com as jardineiras levando-as a morte, indicando que essas operárias são o principal alvo do fipronil. A ausência de jardineiras contribuiu para o decaimento do jardim de fungo acarretando infecções generalizadas pelo fungo parasita *Escovopsis* nas colônias tratadas e posterior supressão da colônia.

6. REFERÊNCIAS

- Antunes EC and Della Lucia TMC, Consumo foliar em *Eucalyptus urophylla* por *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Ciênc Agroctec* **23**:208-211 (1999).
- Camargo RS, Forti LC, Matos CAO, Lopes JF and Andrade APP, Physical resistance as a criterion in the selection of foraging material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *JEN* **128**(5):329-331 (2004).
- Camargo RS, Lopes JFS and Forti LC, Behavioural responses of workers toward worker-produced male larvae and queen-produced worker larvae in *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J Appl Entomol*, **130**(1):56-60 (2006).
- Camargo RS, Forti LC, Lopes JF, Andrade APP and Ottati ALT, Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J Appl Entomol* **131**(2):139-145 (2007).
- Carlos AA, Rodrigues A, Forti LC, Passador MM and Sierra JF, Filamentous fungi found in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different toxic bait formulation. *J Appl Entomol* **135**: 326-331 (2011).
- Currie CR, Mueller UO and Malloch D, The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Nat Acad Sci USA* **96**:7998-8002 (1999).
- Della Lucia TMC, Fowler HG and Araújo MS, Castas de formigas-cortadeiras, in: *Formigas cortadeiras*. Vol. 1, ed. by Della Lucia TMC. Folha de Viçosa, Brasil, pp. 43-59 (1993).

- Della Lucia TMC, Vilela EF, Anjos N and Moreira DDO, Criação de formigas-cortadeiras em laboratório, in: *Formigas cortadeiras*. Vol. 1, ed. by Della Lucia TMC. Folha de Viçosa, Brasil, pp. 151-162 (1993).
- De Souza DJ, Vlaenderen JV, Moret Y and Lenoir A, Immune response affects ant trophallactic behaviour. *J Insc Physiol* **54**: 828-832 (2008).
- Fernandéz-Marín H, Zimmerman JK and Wcislo WT, Fungus garden platforms improve hygiene during nest establishment in *Acromyrmex* ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Insect Soc* **54**:64-69 (2007).
- Folgarait PJ, Marfetan JA and Cafaro MJ, Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). *Environ Entomol* **40**(2): 342-349 (2011).
- Galvanho JP, Carrera MP, Moreira DDO, Erthal Jr M, Silva CP and Samuels RI, Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *J Insect Behav* **26**: 1-13 (2013).
- Griffiths HM and Hughes WHO, Hitchhiking and the removal of microbial contaminants by leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Ecol Entomol* **35**: 529-537 (2010).
- Lopes JFS, Hughes WOH, Camargo RS and Forti LC, Larval isolation and brood care in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Insect Soc* **52**: 333-338 (2005).

- Mathieson M, Toft R and Lester PJ, Influence of toxic bait type and starvation on worker and queen mortality in laboratory colonies of argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol* **105**(4):1139-1144 (2012).
- Mattoso TC, Moreira DDO and Samuels RI, Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology Letters* **8**:461-464 (2012).
- Moreira DDO, Erthal Jr M, Carrera MP, Silva CP and Samuels RI, Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Soc* **53**:345-348 (2006).
- Moreira DDO, Viana-Bailez AM, Erthal Jr M, Bailez O, Carrera MP and Samuels RI, Resource allocation among worker castes of the leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* through trophallaxis. *J Insect Physiol* **56**:1665-1670 (2010).
- North RD, Howse PE and Jackson CW, Agonistic behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* elicited by caryophyllene. *J Insect Behav* **13**(1):1-13 (2000).
- Nyamukondiwa C and Addison P, Preference of foraging ants (Hymenoptera: Formicidae) for bait toxicants in South African vineyards. *Crop Prot* **30**:1034-1038 (2011).
- Okuno M, Tsuji K, Sato H and Fujisaki K, Plasticity of grooming against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the ant *Lasius japonicus*. *J Ethol* **30**:23-27 (2012).

- Reber A, Purcell J, Buechel SD, Buri P and Chapuisat M, The expression and impact of antifungal grooming in ants. *J Evol Biol* **24**: 954-964 (2011).
- Ribeiro MMR and Marinho CGS, Seleção e forrageamento em formigas-cortadeiras, in: *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Vol. 1, ed. by Della Lucia TMC. Editora UFV, Brasil, pp. 189-203 (2011).
- Richard FJ and Errard C, Hygiene behavior, liquid-foraging, and trophallaxis in the leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* and *Acromyrmex octospinosus*. *J Insect Sci*, **9**:1-9 (2009).
- Reynolds HT and Currie CR, Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant–microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia* **96**(5):955-959 (2004).
- Santos AV, Oliveira BL and Samuels RI, Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Mycopathologia* **163**: 233-240 (2007).
- Taerum SJ, Cafaro MJ and Currie CR, Presence of multiparasite infection within individual colonies of leaf-cutter ants. *Environ Entomol* **39**(1):105-113 (2010).
- Viana-Bailez AM, Bailez O and Malaquias KS, Comunicação química em formigas-cortadeiras, in: *Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Vol. 1, ed. by Della Lucia TMC. Editora UFV, Brasil, pp. 141-1164 (2011).

Waddington SJ and Hughes WHO, Waste management in the leaf-cutting ant
Acromyrmex echinator: The role of worker size, age and plasticity. *Behav*
Ecol Sociobiol **64**:1219-1228 (2010).