

# Respostas comportamentais da formiga *Pheidole minutula* (Hymenoptera: Formicidae) a estímulos químicos e biológicos: compostos voláteis são identificados pelas formigas?

Paulo Enrique Cardoso Peixoto

---

## 1. Introdução

Estudos sobre interações entre plantas e formigas têm sido importantes para o entendimento dos processos relacionados à evolução de associações mutualísticas (Bronstein 1998). Algumas dessas associações são facultativas, como plantas que apresentam nectários extraflorais ou homópteros, que são especialmente atrativos para as formigas (Hölldobler & Wilson 1990). Em outras situações, essas interações são íntimas como, por exemplo, plantas mirmecófitas que apresentam estruturas especializadas, denominadas domáceas, usadas para o estabelecimento de colônias de formigas (Benson 1985; Agrawal & Rutter 1998).

A presença de formigas em plantas reduz a herbivoria e, provavelmente, está relacionada a um aumento no crescimento da planta hospedeira (Agrawal 1998; Brouat *et al.* 2000; Christianini & Machado 2004). Em contrapartida, a planta oferece abrigo e, em algumas espécies, alimento. Por exemplo, espécies do gênero *Cecropia* (Cecropiaceae), que apresentam associações com formigas do gênero *Azteca*, possuem estruturas especializadas para a produção de substâncias ricas em glicogênio (corpúsculos Müllerianos) que são utilizadas como fonte de alimento pelas formigas (Benson 1985; Folgarait *et al.* 1994; Agrawal 1999). Por outro lado, existem situações como nas associações entre a planta *Hirtella myrmecophila* (Chrysobalanaceae) e a formiga *Allomerus octoarticulatus*, ou em *Maieta*

*guianensis* (Melastomataceae) e a formiga *Pheidole minutula*, nas quais a planta oferece apenas abrigo (Vasconcelos 1991; Romero & Izzo 2004). Nessas associações as formigas se alimentam principalmente de insetos capturados sobre as folhas das plantas, além da seiva do floema liberada por coccídeos mantidos no interior das domáceas (Vasconcelos 1991).

A presença de formigas normalmente é tratada como um sistema de defesa biológico da planta (Agrawal & Dubin-Thaler 1999), existindo algumas evidências de que folhas que são fortemente defendidas por formigas apresentam menores quantidades de defesas químicas ou mecânicas (Brouat *et al.* 2000). Alguns estudos têm demonstrado benefícios em longo prazo da presença de formigas sobre as plantas (Janzen 1966; Vasconcelos 1991). Contudo, pouco se conhece sobre o comportamento imediato de resposta das formigas frente a perturbações na planta. Será que formigas são capazes de perceber estímulos liberados pela planta? Será que é necessário o contato da formiga com a região danificada da folha para que exista alguma resposta? Se as formigas são capazes de perceber esses estímulos, será que existe alguma comunicação entre operárias presentes em plantas vizinhas? Agrawal (1998) demonstrou que formigas do gênero *Azteca* presentes em folhas da planta *Cecropia obtusifolia* respondem a estímulos causados pela liberação de compostos voláteis em folhas danificadas de plantas vizinhas.

No entanto, além do possível efeito de compostos voláteis, a presença de formigas sobre a folha que sofreu corte, aparentemente aumenta o recrutamento das formigas nas folhas de plantas próximas.

É possível que a percepção de compostos voláteis seja benéfica tanto para as formigas quanto para as plantas hospedeiras. A percepção desses compostos pelas formigas pode funcionar como uma pista segura da presença de presas sobre a planta, aumentando assim a eficiência na captura de alimento. Alternativamente, para formigas que nidificam em domáceas foliares, a percepção de compostos voláteis liberados com o consumo da folha pode indicar risco de destruição da domácea, resultando em comportamentos que visem principalmente à retirada do herbívoro do local (Romero & Izzo 2004; Christianini & Machado 2004). Para a planta, essas pistas químicas podem aumentar a eficiência de defesa ao deslocar rapidamente as formigas até as áreas onde se encontram os herbívoros. Finalmente, se formigas são capazes de reagir a compostos voláteis liberados pelas folhas danificadas, plantas que crescem próximas umas das outras podem se beneficiar, já que o dano causado em uma delas poderia ser percebido pelas formigas em plantas vizinhas. Dessa forma, as formigas poderiam se preparar antecipadamente para a captura ou expulsão de animais que venham a atacar a planta, enquanto a planta, por sua vez, teria seu sistema de defesa ativado (recrutamento das formigas) antes da chegada dos herbívoros.

Neste estudo analisei a intensidade de resposta da espécie *Pheidole minutula* associada à planta *Maieta guianensis* frente a estímulos liberados pela folha e estímulos liberados por herbívoros. Também avaliei a possibilidade de percepção das formigas frente a danos causados em plantas vizinhas.

## 2. Materiais & métodos

### 2.1 Organismos estudados

*Maieta guianensis* e *M. poeppigii* são plantas comumente encontradas na Amazônia central. Essas duas espécies apresentam folhas opostas com uma delas bem maior que a outra. As folhas maiores apresentam domáceas localizadas na sua base que comumente são utilizadas para o estabelecimento de colônias da formiga *Pheidole minutula*. Outra espécie, *Crematogaster* sp., também pode nidificar nessas plantas, entretanto sua ocorrência é rara (Vasconcelos 1993).

*Maieta guianensis* é comumente encontrada nas áreas de vertente. Essa espécie apresenta reprodução vegetativa, normalmente formando aglomerados de plantas. *Maieta guianensis* não possui estruturas especializadas para a alimentação das formigas, as quais se alimentam da seiva do floema liberada por coccídeos criados no interior das domáceas e pela captura de invertebrados presentes na superfície das folhas (Vasconcelos 1991). A presença de *P. minutula* aumenta o crescimento da planta (Vasconcelos 1991) e já foi demonstrado que, para *M. poeppigii*, as formigas respondem rapidamente a estímulos químicos (extratos de folhas) e biológicos (cupins) aplicados sobre a folha (Christianini & Machado 2004). No entanto, a colocação de cupins ou de extratos sobre a folha permite que a formiga encoste no material causador do estímulo e talvez sua resposta seja mediada pelo contato físico e não pela liberação de substâncias voláteis.

### 2.2 Área de estudo

O estudo foi realizado na reserva KM 41 (02°24'S; 59°22'O), pertencente ao Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais

(PDBFF) do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), no Estado do Amazonas, durante o mês de agosto de 2005. O clima da região é tropical quente úmido, com pluviosidade média anual de 2,186 mm e temperatura anual média de 26,7 °C. A vegetação consiste em uma floresta tropical úmida, com alta diversidade de espécies arbóreas (Oliveira & Mori 1999).

### 2.3 Coleta de dados

Áreas próximas às calhas dos riachos foram vasculhadas à procura de indivíduos de *M. guianensis* associados com *P. minutula*. Somente plantas que apresentavam colônias ativas (presença de indivíduos de *P. minutula* sobre duas folhas ou mais) foram incluídas na amostragem.

### 2.4 Experimento 1: Percepção de estímulos liberados por folhas e por presas em potencial

Para avaliar a possibilidade de que indivíduos de *P. minutula* são capazes de perceber e identificar diferentes tipos de compostos voláteis, quatro tipos de tratamentos foram montados para serem aplicados às plantas: o primeiro tratamento consistia de algodão embebido em água (controle), o segundo tratamento consistia na colocação de duas ninfas de cupim sobre o algodão (presa); o terceiro tratamento consistia de algodão embebido em extrato de folhas com domáceas (tratamento FCD) e, finalmente, o quarto tratamento consistia de algodão embebido em extrato de folhas sem domáceas (tratamento FSD). Cupins não são herbívoros naturais de *M. guianensis*, entretanto se colocados sobre a folha desta espécie de planta são consumidos pelos indivíduos de *P. minutula* (obs. pessoal). Portanto, os cupins utilizados neste estudo representam apenas presas em potencial de *P. minutula*.

Para a preparação dos extratos, foram coletadas folhas presentes na região apical de indivíduos de *M. guianensis* que não foram utilizados nas amostragens. Folhas que apresentavam domáceas foram separadas das folhas que não apresentavam domáceas. Essas folhas foram maceradas com água (proporção de 7,5 ml de água por grama de folha) e uma quantidade fixa de algodão era embebida no extrato deste macerado. Cada mecha de algodão foi colocada a aproximadamente 2 cm acima da face adaxial da folha durante 10 min consecutivos. Durante o período de exposição da folha ao estímulo, foram feitas contagens do número de operárias juntamente com observações comportamentais a cada 2 min. Operárias grandes foram separadas de operárias pequenas em todas as observações. Antes da apresentação dos tratamentos foi contado o número de indivíduos presentes na folha de forma a estabelecer o número de operárias presentes antes que qualquer perturbação fosse aplicada à planta (tempo zero).

A variação do número de formigas por intervalo de tempo em relação a cada tipo de tratamento foi analisada utilizando análise de variância com medidas repetidas. Entretanto, o número de formigas recrutadas em uma folha pode depender da quantidade de domáceas da planta e da quantidade inicial de formigas patrulhando a folha. Para verificar esta relação, o número de domáceas em cada planta e o número de formigas patrulhando as folhas antes da aplicação dos tratamentos foram correlacionadas com a quantidade máxima de formigas sobre a folha através de regressão linear. Os dados referentes à contagem de formigas sobre a folha foram transformados utilizando logarítmo para reduzir a heterogeneidade de variâncias entre os tratamentos. A quantidade de operárias grandes foi muito baixa, havendo raramente mais de um

indivíduo sobre a folha. Por esta razão, a presença ou a ausência de operárias grandes em cada folha foi correlacionada com o tipo de tratamento utilizando o teste de qui-quadrado.

## **2.5 Experimento 2: Capacidade de percepção de estímulos foliares liberados em plantas vizinhas**

Para testar a possibilidade de percepção de estímulos liberados em plantas vizinhas (comunicação entre colônias), pares de *M. guianensis* foram amostrados. Em cada par era selecionada uma das folhas que recebia corte (aproximadamente 1/3 da área foliar) e durante 10

min foi observado o comportamento das formigas na folha cortada, em uma outra folha da mesma planta (acima ou lateralmente à folha com corte) e na folha mais próxima da planta vizinha. Medidas das distâncias da folha danificada até as folhas observadas foram feitas. A cada 2 min foram feitas observações do comportamento das formigas e contagens do número de operárias grandes e pequenas. O aumento da agitação das formigas e/ou o aumento do número de operárias foi considerado como uma resposta ao corte. A ocorrência de resposta em cada folha foi correlacionada com a sua distância até a folha cortada através de regressão logística.

## **3. Resultados**

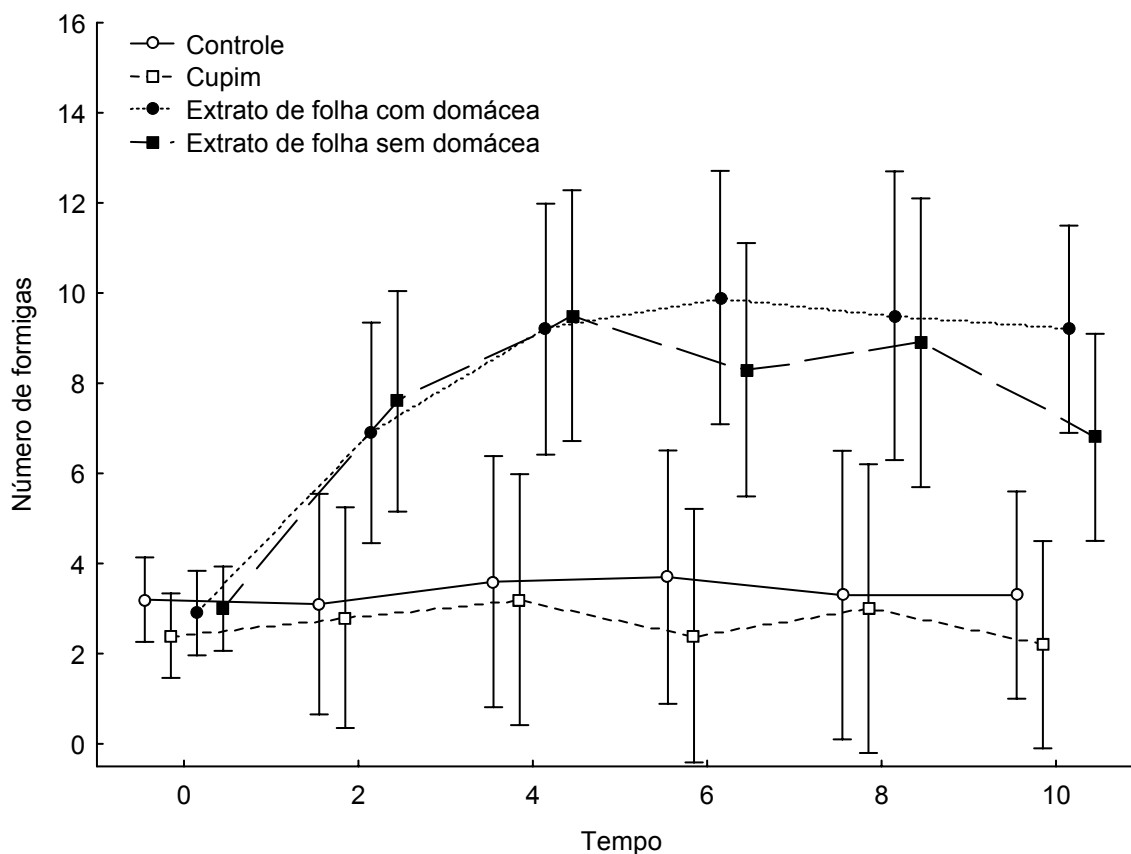
### **3.1 Experimento 1: Percepção de estímulos liberados por folhas e por presas em potencial**

A maioria das plantas encontradas apresentava colônias ativas de *P. minutula*, havendo normalmente entre um e quatro indivíduos andando constantemente sobre a folha antes da aplicação dos tratamentos. A quantidade de formigas na folha variou em relação ao período de exposição de cada tratamento (Tabela 1). Os tratamentos controle e presa não provocaram alterações na quantidade ou no comportamento de formigas sobre a folha, enquanto que os extratos de folhas com domáceas e folhas sem domáceas resultaram em um aumento do número de operárias ao longo do tempo (Figura 1). Para o tratamento FCD houve um aumento do número de operárias até 4 min, permanecendo constante pelo restante do período de exposição. O aumento do número de operárias em folhas que receberam o tratamento FSD foi semelhante ao aumento do número de operárias em folhas que receberam tratamento FCD. No entanto, para o tratamento FSD, houve uma pequena tendência de redução do número de formigas a partir de 6 min de exposição ao extrato (Figura 1). Nesses dois últimos tratamentos, as formigas ficavam mais agitadas sobre a folha, caminhando rapidamente em várias direções.

Não foram observadas operárias grandes nos tratamentos controle e presa. No entanto, as operárias grandes estavam presentes em 70% das folhas quando o estímulo consistia de extrato de folhas com domáceas e em 30% delas quando o estímulo consistia de extrato de folhas sem domáceas, sendo esta diferença marginalmente significativa ( $\chi^2=3,2$ ; g.l.=1;  $p=0,07$ ).

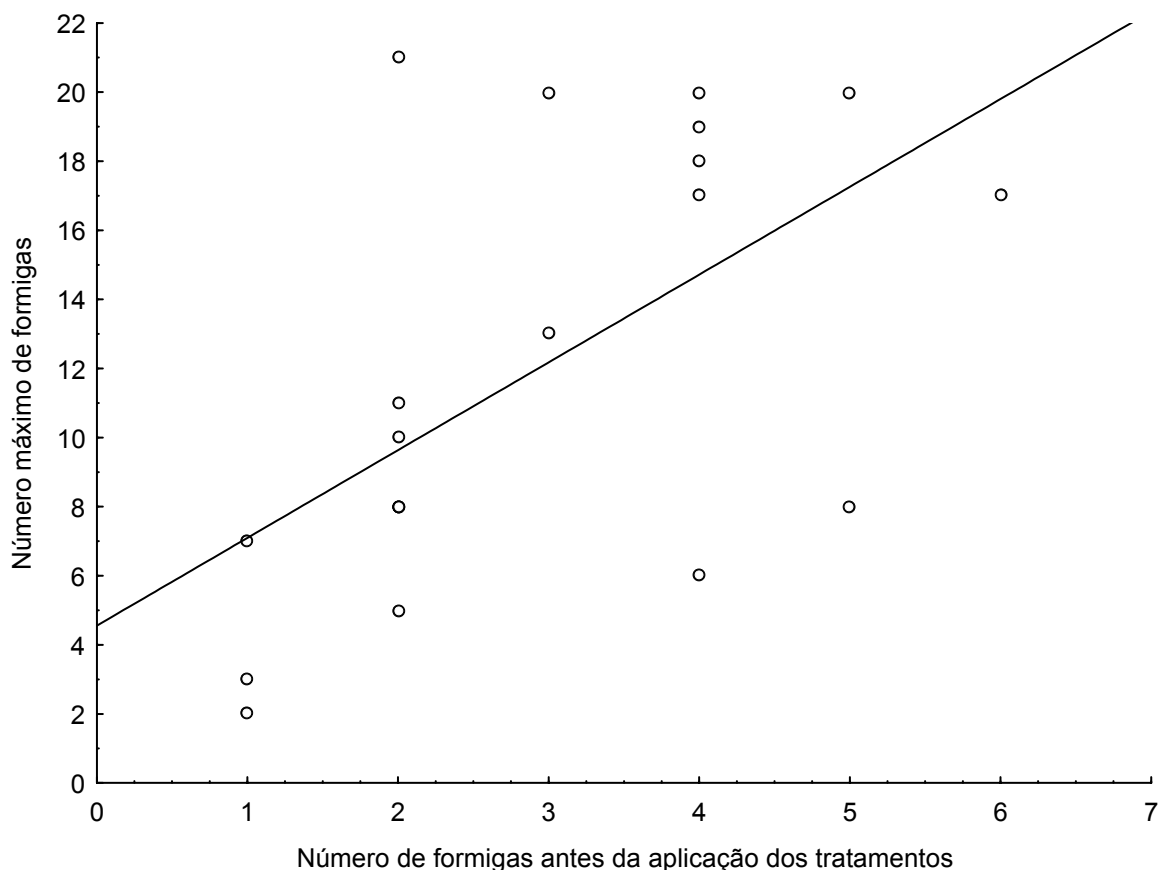
**Tabela 1.** Análise de variância com medidas repetidas para o número de formigas de *Pheidole minutula* presentes *Maieta guianensis* recrutadas a cada 2 min após a aplicação de quatro tratamentos: extrato de folhas com domáceas, extrato de folhas sem domáceas, presas e controle.

Efeito	SQ	g.l.	QM	F	P
Tratamento	24,22	3	8,07	6,22	0,002
Tempo	6,4	5	1,28	10,39	<0,001
Tempo*Tratamento	5,28	15	0,35	2,86	<0,001



**Figura 1.** Número médio de formigas de *Pheidole minutula* encontradas a cada dois minutos após a aplicação dos tratamentos sobre folhas da planta *Maieta guianensis*. Barras indicam o intervalo de 95% de confiança.

Para as amostras que receberam os tratamentos FSD ou FCD, o número máximo de formigas patrulhando a folha não foi relacionado com o número de domáceas da planta (regressão múltipla,  $\beta = -0,09$ ;  $t_{(17)} = 0,65$ ;  $p = 0,53$ ), mas foi maior em plantas que apresentavam maiores quantidades de formigas antes da aplicação dos tratamentos (regressão múltipla,  $\beta = 2,53$ ;  $t_{(17)} = 3,00$ ;  $p = 0,008$ ; Figura 2). Aproximadamente 39% da variação do número de formigas foi explicada pelo número de domáceas e pelo número de formigas no tempo inicial.



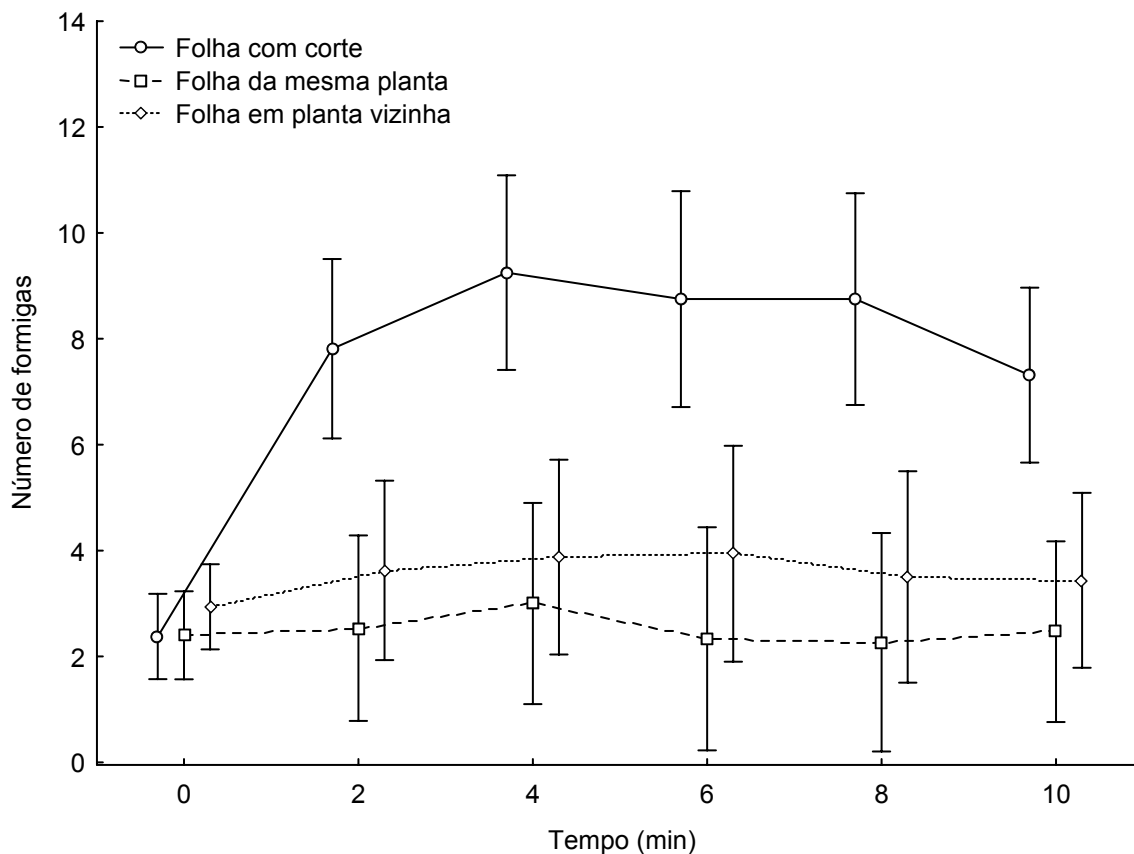
**Figura 2.** Relação entre o número de formigas de *Pheidole minutula* presentes antes da aplicação dos extratos de folhas com domáceas e folhas sem domáceas e o número máximo de formigas sobre a folha de *Maieta guianensis*.

### 3.2 Experimento 2: Capacidade de percepção de estímulos foliares liberados em plantas vizinhas

Nos experimentos de corte foliar, apenas a folha que sofreu dano apresentou um aumento do número de formigas em relação ao tempo transcorrido após o corte da folha (Tabela 2; Figura 3). Mesmo não havendo diferença numérica, algumas formigas em plantas vizinhas apresentaram alteração de comportamento, passando a correr por toda a folha. No entanto, esta alteração não esteve relacionada com a distância da folha da planta vizinha até a folha cortada (regressão logística,  $\chi^2=1,23$ ; g.l.=1; n=16; p=0,27).

**Tabela 2.** Análise de variância com medidas repetidas para testar a variação do número de formigas de *Pheidole minutula* recrutadas em folhas de *Maieta guianensis* que sofreram corte de 1/3 da sua área, em folhas da mesma planta e em folhas de plantas vizinhas.

Efeito	SQ	g.l.	QM	F	p
Tratamento	36,44	2	18,22	12,72	<0,001
Tempo	4,65	5	0,93	6,05	<0,001
Tempo*Tratamento	9,7	10	0,97	6,31	<0,001



**Figura 3.** Número médio de formigas de *Pheidole minutula* encontradas a cada dois minutos na folha de *Maieta guianensis* que sofreu o corte, na folha da mesma planta e em uma folha de indivíduos de *M. guianensis* próximos. Barras indicam o intervalo de 95% de confiança.

#### 4. Discussão

A capacidade das formigas de perceber compostos voláteis liberados pelas plantas hospedeiras já foi relatada para algumas associações mutualísticas como em *Cecropia-Azteca* (Agrawal 1998; Agrawal & Durbin-Thaler 1999); *Hirtella myrmecophila-Allomerus octoarticulatus* (Romero & Izzo 2004) e *Leonardoxa-Petalomyrmex* (Brouat *et al.* 2000). Entretanto, apesar de algumas variações, em todos esses sistemas as formigas aparentemente são capazes de perceber estímulos liberados pelas folhas danificadas somente quando estão próximas do local de liberação dos compostos voláteis. Em algumas dessas espécies de plantas, os estímulos estão restritos às áreas de maior susceptibilidade a herbivoria (Brouat *et al.* 2000).

Já em outras, os estímulos liberados pela folha provocam maior recrutamento de formigas somente se estiverem associados a estímulos liberados pelas operárias (Agrawal 1998). Indivíduos de *Pheidole minutula* são sensíveis aos extratos de folhas de *Maieta guianensis*, sendo capazes de perceber compostos voláteis. Por outro lado, os resultados do estímulo dos cupins indicam que as formigas aparentemente não são capazes de perceber odores ou eventuais compostos que possam ser liberados diretamente por presas. Nessa situação, os compostos liberados com o corte da folha poderiam ser utilizados como uma pista segura da presença de presas em potencial sobre a folha. Talvez os cupins não sejam bons representantes de presas para as formigas. Contudo, ninfas de cupim

colocadas em contato com as folhas são carregadas para o interior da domácea e possivelmente, são utilizadas como alimento (obs. pessoal). Este mesmo comportamento de remoção de cupins para o interior da domácea já foi relatado para indivíduos de *P. minutula* associados a *M. poeppigii* (Christianini 2001).

Alternativamente, *P. minutula* pode associar o dano foliar com uma ameaça a destruição da folha e, conseqüentemente, da domácea onde se encontra parte da colônia. Se as operárias maiores são utilizadas para a defesa da colônia, a sua maior freqüência quando o extrato consistia de folhas com domáceas pode indicar percepção diferencial das formigas. O resultado do teste para a presença de operárias sugere que não existe diferença na sua freqüência entre folhas que receberam os extratos FCD e FSD. No entanto, o poder do teste foi de apenas 42% e talvez o resultado marginalmente significativo indique a possibilidade de resposta diferencial das operárias grandes frente aos estímulos FSD e FCD. Se esta diferença existe, as operárias grandes poderiam ser deslocadas para as áreas danificadas com a função de defender a colônia.

Curiosamente, mesmo sendo capazes de perceber compostos voláteis, formigas presentes em folhas da mesma planta ou em folhas de plantas vizinhas não responderam ao estímulo de folhas cortadas. Isso indica que *P. minutula* possui uma baixa capacidade de perceber compostos liberados a mais de 2 cm da folha. Talvez estes compostos representem um estímulo inicial que aumente o patrulhamento das formigas, mas o contato delas com o substrato deve ser necessário para que o recrutamento ocorra. Essa necessidade de contato com o substrato para haver recrutamento também já foi sugerida para a formiga *Allomerus octoarticulatus* presente na planta *Hirtella myrmecophila*.

Os resultados deste trabalho seguem o mesmo padrão encontrado em estudos anteriores que sugerem que as formigas são capazes de perceber e identificar compostos voláteis liberados por folhas danificadas quando elas estão próximas da fonte do estímulo (Agrwal 1998; Agrawal & Durbin-Thaler 1999; Bouat *et al.* 2000; Romero & Izzo 2004). Uma questão interessante é entender como os processos evolutivos podem ter moldado essa capacidade de percepção. O esclarecimento desses processos e dos seus mecanismos subjacentes poderia ajudar a entender porque, apesar da capacidade de perceber compostos voláteis, a resposta das formigas é restrita apenas às áreas próximas à fonte do estímulo. Em uma perspectiva evolutiva, é possível que os comportamentos exibidos pelas formigas frente a danos foliares e sua capacidade de perceber estímulos liberados pela planta estejam relacionados com o grau de ameaça que estes danos representam para a colônia. Por exemplo, em espécies de *Cecropia*, a redução de até 40% da área foliar não provoca uma diminuição da produção de alimento nos corpúsculos Müllermanos (Friez & Dirzo 1996 *apud* Agrawal 1998). Adicionalmente, a colônia de formigas se encontra dentro do caule e a destruição da folha não deve representar uma ameaça direta para a colônia. Já em plantas que não fornecem alimento e nas quais as domáceas estão localizadas nas folhas, a destruição da lâmina foliar pode representar redução de área de forrageio, além de constituir uma ameaça para a destruição da domácea e, conseqüentemente, da colônia. Talvez diferenças na localização das domáceas e no grau de dependência das formigas ao alimento fornecido pela planta possam explicar algumas das variações entre as espécies de formiga na capacidade de percepção dos estímulos químicos liberados pela planta ou de estímulos liberados por presas.



## 5. Agradecimentos

A Marco Aurélio Pizo pela formulação do primeiro projeto que deu origem a este estudo. A Glauco Machado e Adalberto Santos pelas discussões teóricas e sugestões de coleta. A Agustín Camacho pela companhia durante as coletas de campo e pelas discussões durante a formulação e escrita deste estudo. A todos os revisores que auxiliaram na melhoria da qualidade deste trabalho. E, finalmente, a todos os professores e alunos que participaram do “Curso de Ecologia da Floresta Amazônica” - versco 2005, por contribuírem de diversas formas para o meu crescimento pessoal e profissional.

## 6. Referências bibliográficas

- Agrawal, A.A. 1998. Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a neotropical ant-plant. *Ecology* 79: 2100-2112.
- Agrawal, A.A. & Rutter, M.T. 1998. Dynamic anti-herbivore defense in ant-plants: the role of induced responses. *Oikos* 83: 227-236.
- Agrawal, A.A. & Dubin-Thaler, B.J. 1999. Induced responses to herbivory in the neotropical ant-plant association between *Azteca* ants and *Cecropia* trees: response of ants to potential inducing cues. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45: 47-54.
- Benson, W.W. 1985. Amazon ant-plants, pp. 239-266. *In* Amazonia. Prance, G.T. & Lovejoy, T.E. (eds.). Pergamon Press, Oxford.
- Bronstein, J.L. 1998. The contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism. *Biotropica* 30: 150-161.
- Brouat, C.; Mckey, D.; Bessiére, J.; Pascal, L. & Hossaert-Mckey, M. 2000. Leaf volatile compounds and the distribution of ant patrolling in an ant-plant protection mutualism: preliminary results on *Leonardoxa* (Fabaceae: Caesalpinaceae) and *Petalomyrmex* (Formicidae: Formicinae). *Acta Oecologica* 21: 349-357.
- Christianini, A.V. 2001. Respostas a herbívoros simulados na mirmecófita *Maieta poeppigii* (Melastomataceae): *Pheidole minutula* Mayr (Formicidae) é que era a formiga de verdade! *In* “Livro do curso de Ecologia da Floresta Amazônica”, edição 2001..
- Christianini, A.V. & Machado, G. 2004. Induced biotic responses to herbivory and associated cues in the Amazon ant-plant *Maieta poeppigii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, no prelo.
- Folgarait, P.J.; Johnson, H.L. & Davidson, D.W. 1994. Responses of *Cecropia* to experimental removal of Müllerian bodies. *Functional Ecology* 8: 22-28.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990. *The Ants*. The Belknap Press, Cambridge, Massachusetts.
- Oliveira, A.A. & Mori, S.A. 1999. A Central Amazonian terra firme Forest. I. High tree species richness on poor soils. *Biodiversity and Conservation* 8: 1219-1244.
- Romero, G.Q. & Izzo, T.J. 2004. Leaf damage induces ant recruitment in the Amazonian ant-plant *Hirtella myrmecophila*. *Journal of Tropical Ecology* 20: 675-682.
- Vasconcelos, H.L. 1991. Mutualism between *Maieta guianensis* Aubl., a myrmecophytic melastome, and one of its ant inhabitants: ant protection against insect herbivores. *Oecologia* 87: 295-298.
- Vasconcelos, H.L. 1993. Ant colonization of *Maieta guianensis* seedlings, an Amazon ant-plant. *Oecologia* 95: 439-443.