

ETHEL FERNANDES DE OLIVEIRA PETERNELLI

**INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS E SEMENTES, COM ÊNFASE NAS  
CORTADEIRAS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

ETHEL FERNANDES DE OLIVEIRA PETERNELLI

**INTERAÇÃO ENTRE FORMIGAS E SEMENTES, COM ÊNFASE NAS  
CORTADEIRAS**

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

APROVADA: 6 de julho de 2007.

---

Prof. Luiz Alexandre Peternelli  
(Co-Orientador)

---

Prof. Sebastião Venâncio Martins  
(Co-Orientador)

---

Prof. José Henrique Schoereder

---

Dra. Riviane Rodrigues da Hora

---

Prof<sup>ª</sup>. Terezinha M. C. Della Lucia  
(Orientadora)

Dedico.  
Aos meus pais, Sebastião e Nilda,  
Ao meu marido, Alexandre,  
Aos meus Filhos, Mariana e Mateus.

**“Never let them tell you to think small”.**  
**(John Vandemeer/Laboratory in Field Ecology – Michigan, 2006)**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois inexplicavelmente sua energia sempre fez com que minha intuição falasse por ele e não me deixasse desistir.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Terezinha M.C. Della Lucia, pela orientação, pela paciência, pelas oportunidades oferecidas no decorrer destes anos e pelos momentos de “terapia”.

Ao professor Luiz Alexandre Peternelli – DPI/UFV, pelo aconselhamento, pelas sugestões e pelo auxílio na execução das análises estatísticas.

Ao professor Sebastião Venâncio Martins – DEF/UFV, pelo aconselhamento, pelas idéias e confiança depositada em mim desde o início dos trabalhos.

Ao Professor Arne Janssen, pelas idéias, credibilidade, apoio, incentivo, críticas e sugestões durante a elaboração e execução dos trabalhos de campo e laboratório.

Ao professor José Henrique Schoereder à Dra Riviane Rodrigues da Hora pelas críticas e sugestões.

Aos professores Ivette Perfecto e John Vandemeer da University of Michigan, pela humildade, sabedoria e confiança durante nossa curta e agradável convivência.

Ao Professor Simon Elliot pelas sugestões e apoio nas correções do Inglês.

Às secretárias do curso de pós-graduação em Entomologia-UFV, Maria Paula A. da Costa e Miriam Magalhães, pela paciência, compreensão, ajuda e amizade durante esses anos.

Ao Sr. Manoel, funcionário do Insetário, pela amizade e pelo inestimável apoio. Aos colegas de curso, em especial, Maria Augusta, Walkymário, Janina, Vinícius, Solange e Mariana, pelo convívio e pelas boas horas de descontração e amizade.

Aos amigos do Insetário, Ilka, Gabriela, Fabrícia, Marquinhos, Myriam (Guilherme), Neliane, Lucas, Alice, Mário, pelas sugestões e ajuda nos trabalhos de laboratório e campo.

À grande amiga Renata C. Daguer pelas inúmeras “mensagens” de apoio, otimismo, confiança, torcida e incondicional amizade.

A companheira Antonia por promover horas de folga da missão de ser mãe.

Aos meus pais Sebastião e Nilda pelo carinho, confiança, torcida e amor.

Aos meus amados irmãos que anonimamente torcem pelo meu sucesso.

Especialmente ao meu marido e companheiro Luiz Alexandre e aos meus filhos, Mariana e Mateus, pela paciência, energia, incentivo, confiança, principalmente nas horas de dúvida, ansiedade e desânimo. “Vocês fazem parte desse caminho que agora eu sigo em paz”.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

**ETHEL FERNANDES DE OLIVEIRA PETERNELLI**, filha de Sebastião Gonçalves de Oliveira e Nilda Maria Fernandes de Oliveira nasceu em Curvelo, Minas Gerais, em 31 de Janeiro de 1969.

Bióloga pela Universidade Federal de Viçosa em 1994. Após a graduação trabalhou como assistente de laboratório no Soil and Plant Testing Laboratory na Iowa State University, Iowa, USA, no período de 1994 a 1999.

Em janeiro de 2000, iniciou estágio no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, no setor de Entomologia, sob orientação da Prof. Dra. Terezinha M. C. Della Lucia. No ano seguinte, 2001, ingressou-se no Mestrado em Entomologia também pela Universidade Federal de Viçosa.

Em julho de 2003, iniciou o curso de Doutorado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 6 de julho de 2007. Durante o doutorado foi estudante visitante da *University of Michigan* sob a orientação da Prof. Dra. Ivette Perfecto do Departamento de *School of Natural Resources and Environment*, no período de Janeiro de 2006 a Janeiro de 2007.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. BIBLIOGRAFIA GERAL.....</b>	<b>9</b>
<b>3. CAPÍTULO 1</b>	
<b>Leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) are attracted by volatiles from seeds with elaiosomes.....</b>	<b>12</b>
Abstract.....	12
Introduction.....	14
Materials and Methods.....	16
Results.....	21
Discussion.....	23
References.....	25
<b>4. CAPÍTULO 2</b>	
<b>Seed transport and removal of elaiosome of <i>Mabea fistulifera</i> by workers of <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Hymenoptera: Formicidae).....</b>	<b>34</b>

Abstract.....	34
Introduction.....	35
Methods.....	38
Results.....	42
Discussion.....	46
References.....	50
<b>5. CAPÍTULO 3</b>	
<b>Taxa de remoção de sementes por formigas em ambientes Tropical e Temperado: habitat de floresta secundária e pasto abandonado.....</b>	<b>54</b>
Resumo.....	54
Introdução.....	56
Materiais and Metodos.....	59
Resultados.....	63
Discussão.....	66
Referências.....	70
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>77</b>



## RESUMO

PETERNELLI, Ethel Fernandes de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Interação entre formigas e sementes, com ênfase nas cortadeiras.** Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-Orientadores: Luiz Alexandre Peternelli e Sebastião Venâncio Martins.

Dispersão de semente por formigas (mirmecocoria) é importante para muitas espécies de plantas. Formigas respondem a estímulos externos promovidos por um apêndice (elaiosoma) rico em lipídeos, ligado à semente, transportando as sementes para seus ninhos, onde o apêndice é removido e utilizado como alimento. Neste trabalho foram investigados o comportamento e os aspectos ecológicos da interação entre formigas e sementes diplocórica e mirmecocórica. Parte dos experimentos foi realizada em laboratório e parte no campo. Os testes em laboratório foram executados no Insetário do Departamento de Biologia Animal – Entomologia, UFV. Experimentos de campo foram realizados em áreas de pasto e fragmentos florestais no Município de Viçosa, MG, Brasil, e a última parte realizada em área de pasto e fragmento florestal na Reserva Edwin S. George nos Estados Unidos. Inicialmente foi investigado o papel de voláteis produzidos pelo elaiosoma de sementes de *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) na atração de formigas (*Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*), com a utilização da técnica de olfatômetro em laboratório. Em seguida, em campo, também foi investigada a atratividade de iscas à base de elaiosoma, iscas comerciais, isca de capim

e isca de elaiosoma-capim, com as mesmas espécies de formigas já mencionadas. No olfatômetro, as formigas foram atraídas por voláteis das sementes com elaiosoma e pelo odor das iscas comerciais quando ar foi oferecido como fonte alternativa. Operárias de *A. sexdens rubropilosa* preferiram voláteis de iscas comerciais a iscas de elaiosoma, enquanto *A. bisphaerica* preferiu de iscas de capim-elaiosoma. No campo, *A. sexdens rubropilosa* transportou mais a isca comercial do que a de elaiosoma. Contudo *A. bisphaerica* coletou ambas as iscas na mesma proporção. Operárias desta espécie coletaram mais a isca feita da combinação capim-elaiosoma. Foi concluído que voláteis do elaiosoma de sementes foram atrativos para as formigas, e também que compostos do elaiosoma têm potencial para serem utilizados na confecção de iscas. A segunda parte dos trabalhos foi responder a seguinte pergunta: Por que operárias de *A. sexdens rubropilosa* transportam sementes com elaiosoma se apenas o apêndice é usado? Três experimentos de comportamento de formigas com sementes de *M. fistulifera* foram realizados em laboratório: no primeiro teste, sementes livres foram oferecidas na arena dos formigueiros de *A. sexdens rubropilosa*. No segundo teste, sementes coladas foram oferecidas. No terceiro teste, as sementes foram exploradas pelas operárias da formiga cortadeira com a presença de duas espécies invasoras, *Pheidole sp.* (competidora) e *Solenopsis invicta* (predadora). Operárias de *A. sexdens rubropilosa* não competiram pelas sementes na presença das espécies invasoras. A presença dessas invasoras influenciou no tempo de exploração, corte e transporte das sementes pelas formigas cortadeiras. A remoção do elaiosoma foi feita essencialmente pelas operárias mínimas dentro da colônia. Operárias de *A. sexdens rubropilosa* coletam sementes com elaiosoma porque este comportamento foi mais rápido e eficiente, significando uma melhor decisão durante o forrageamento. Na terceira e última parte avaliou-se a taxa de remoção de sementes em dois estágios sucessionais; pasto abandonado com regeneração arbustiva e floresta secundária, tanto em ambientes tropicais, quanto em áreas temperadas. Também foi objetivo chamar a atenção do importante papel que as formigas podem exercer nestes ambientes. Assim sendo, responder as seguintes perguntas foi o alvo principal deste último trabalho: (1) quais espécies de formigas interagem com as sementes? E (2) como esses insetos se comportam em relação às sementes? As seguintes hipóteses também foram testadas:

(1) As formigas dispersam mais sementes na floresta do que o fazem em pasto abandonado, (2) formigas removem mais sementes do que vertebrados e (3) os efeitos dos períodos diurno e noturno influenciam a taxa de remoção de sementes por formigas. Foram escolhidas duas áreas de estudo. Uma de clima tropical (Acamari), Brasil; e a outra de clima temperado foi a Reserva Edwin S. George Reserve (ESGR), USA. Em ambas as áreas de estudo, as pesquisas foram conduzidas em dois habitats, floresta secundária e pasto abandonado. No Acamari trabalhou-se com sementes de *M. fistulifera* (Euphorbiaceae) e na ESGR com sementes de *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae). Nas áreas em estudo, para determinar quais formigas interagiram com as sementes, foram registradas todas as interações formigas-semente observadas ao longo de um transecto de 250 m. Para comparar a remoção de sementes por formigas e vertebrados nas duas áreas (floresta e pasto abandonado), foram estabelecidos dois transectos paralelos de 500 m em cada área. Nos experimentos foram utilizadas gaiolas de arame (15 x 15 x 10 cm; 1,5 cm mesh) que tinham por objetivos evitar que roedores e pássaros coletassem as sementes, porém permitindo livre acesso às formigas. Foi observado que, diferentes espécies de formigas interagem com as sementes de *M. fistulifera* e *S. canadensis*. Cada espécie de formiga tratou as sementes de diferentes maneiras. Elas efetivamente dispersaram as sementes de *S. canadensis*, na mesma taxa, tanto na floresta quanto no pasto abandonado, mas as sementes de *M. fistulifera* foram mais removidas no habitat floresta. A contribuição de vertebrados na remoção de sementes é bastante expressiva na área tropical. No entanto, nessas áreas, a contribuição dada pelas formigas é também relativamente importante. O período do dia influenciou na taxa de remoção somente na área tropical, sendo maior no período noturno. Sementes mirmecocóricas típicas são relativamente mais coletadas que as diplocóricas. O estudo e entendimento da mirmecocoria têm se tornado ferramenta importante para o entendimento da dinâmica de estabelecimento de muitas comunidades de plantas. Esta ferramenta poderá ser utilizada para o entendimento dos processos de sucessão em ambientes em recuperação.

## ABSTRACT

PETERNELLI, Ethel Fernandes de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2007. **Interaction between ants and seeds, with emphasis in the leaf-cutting ants.** Adviser: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-Advisers: Luiz Alexandre Peternelli and Sebastião Venâncio Martins.

Seed dispersal by ants (myrmecochory) is important for many species of plants. Ants respond to the external stimulations promoted by an appendage (elaiosome) rich in lipids, attached on to the seed, by carrying the seeds to their nests, where the appendage is removed and used as food. In this work the behavioral and ecological aspects of the interaction between ants and seeds were investigated. Part of the experiments was carried out in laboratory and part in the field. The tests in laboratory were executed in the Insectary of the Department of Animal Biology - Entomology, UFV. Field experiments were conducted in areas of old field and forest fragments in the City of Viçosa, MG, Brazil, and in the Edwin S. George Reserve, Ann Arbor, in the United States. Initially the role of volatile produced by elaiosome of seeds of *Mabea fisutlifera* (Euphorbiaceae) in the attraction of ants (*Atta sexdens rubropilosa* and *Atta bisphaerica*) was investigated, with the use of olfactometry in laboratory. After that, in the field, the attractiveness of baits made of elaiosome, elaiosome-grass and

commercial baits were investigated. In olfactometer, the ants were attracted by volatile of the seeds with elaiosome and by odor of commercial baits when air was offered as alternative source. Workers of *A. sexdens rubropilosa* preferred volatiles of elaiosome and commercial baits, while *A. bisphaerica* preferred elaiosome-grass baits. In the field *A. sexdens rubropilosa* carried more commercial baits than elaiosome; however *A. bisphaerica* collected both baits at the same rates. Workers of this species collected more the combination of elaiosome-grass bait. It was concluded that volatiles of seed elaiosomes were attractive to the ants, and also that composites of elaiosome have potential to be used in the confection of toxic baits. The second part of the work was to answer the following questions: Why workers of *A. sexdens rubropilosa* carry seeds with elaiosome if only the appendage is used? Three experiments of behavior with seeds of *M. fistulifera* and ants were carried out in laboratory: in the first test, free seeds were offered in the arena area of *A. sexdens rubropilosa* colony. In the second test, glued seeds were offered; in the third test, the seeds were allowed to be explored by the workers of leaf-cutting ants with the presence of two invading species, *Pheidole* sp. (competitor) and *Solenopsis invicta* (predator). Workers of *A. sexdens rubropilosa* did not compete for the seeds in the presence of the invading species. The presence of these invaders influenced the exploration, cut and transport time of the seeds by the leaf-cutting ants. The removal of elaiosome was made essentially by the minor workers inside the colony. Workers of *A. sexdens rubropilosa* collected seeds with elaiosome because this behavior was faster and efficient, meaning that this was a better decision during the foraging behavior. In the third and last part removal rates of seeds in two succession stage; old field with shrub regeneration and secondary forest, in tropical and temperate environments were evaluated. Another objective was to emphasize the important role the ants can exert in these environments. Thus the aim of this last experiment was to answer the following questions: (1) which ant species attend the seeds? (2) How do the workers behave towards the seeds? And test the following hypothesis: (1) Do ants disperse more seeds in the forest than they do in the old field; (2) ants remove more seeds than vertebrates in the secondary forest and old field and (3) the effects of day time influence the seeds removal rates by ants. Two areas were chosen to conduct this last work: one of tropical climate was in (Acamari), Brazil and

one of temperate climate was in Edwin S. George Reserve (ESGR), the USA. In both the study areas, the research was conducted in two habitats, secondary forest and old field, using seeds of *M. fistulifera*, in Acamari and seeds of *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae) in the ESGR. To determine which ants had interacted with the seeds, all the observed interactions between ant and seed were registered throughout a 250 m transect. To compare the removal of seeds by ants and vertebrates in the two areas (forest and old field), two parallel 500 m transects were established in each area within the Acamari or ESGR. In the experiments wire cages (15 x 15 x 10 cm; 1.5 cm mesh) that avoided that seed collecting by rodents and birds were used. These cages allowed free access to the ants. It was observed that, different species of ants interacted with the seeds of *M. fistulifera* and *S. canadensis*. Each species of ant treated the seeds in different ways. They effectively dispersed the seeds of *S. canadensis*, in the same rate, in the forest and in the old field, but the seeds of *M. fistulifera* removed more in the forest habitat. The contribution of vertebrates in seed removal was expressive in the tropical area. However, in these areas, the contribution given by the ants was also relatively important. The period of the day only influenced the rate of removal in the tropical area, being higher in the nocturnal period. Typical myrmecochorous seeds were relatively more collected than the diplochorous. The study and understanding of the mirmecochory have become important tools for the comprehending the dynamics of establishment of many plant communities. This tool could be further used for understanding succession processes in environment recovery.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos e as plantas estão em associação, provavelmente, desde o Carbonífero. Porém, fósseis sugerem que a maioria dos insetos fitófagos se tornaram diversos apenas no final do período Cretáceo, quando as angiospermas aumentaram em diversidade e se tornaram um grupo dominante no final do Jurássico. Esse sucesso, entre insetos e plantas, pode ser atribuído ao fato de que, possivelmente, as primeiras angiospermas foram beneficiadas pela polinização por insetos, provavelmente por besouros (Gullan e Cranston, 1999). É fato que as relações entre insetos e plantas são antigas e estão numa “corrida evolutiva” recíproca em intenso processo co-adaptativo. Importantes interações surgiram entre eles, as quais são vistas como benéficas e não benéficas e que promovem importantes funções no ecossistema. Segundo Hocking (1975), as plantas são para os insetos: alimento, lugar para viver e/ou reproduzir e os insetos são para as plantas: polinizadores e dispersores de sementes. De acordo com Gullan e Cranston (1999) na interação inseto-planta existem categorias definidas, que são baseadas no efeito do inseto sobre a planta. Um primeiro exemplo seria a fitofagia (ou herbivoria), onde inclui os insetos mastigadores, sugadores, predadores de sementes, galhadores e minadores. Um segundo seria o mutualismo, composta pelos insetos polinizadores, dispersores de sementes (mirmecocoria) e os insetos que vivem em uma estrutura especializada da planta e fornecem ao seu hospedeiro defesa contra ataque de herbívoros e/ou alimento.

### *Interação formiga-planta*

As formigas dentro do contexto inseto/planta têm importante papel. Elas são organismos dominantes no planeta (Hölldobler e Wilson, 1990). Na floresta amazônica, por exemplo, 1 hectare de solo possui cerca de 10 milhões de formigas. Isso representa de 30 a 35% da biomassa animal presente nessa região. No mundo são conhecidas quase 12.030 espécies de formigas distribuídas em quase todos os ecossistemas ([www.antbase.org](http://www.antbase.org)). Para o meio ambiente natural o papel desse inseto é de grande importância na ciclagem de nutrientes orgânicos, aeração do solo, fluxo de energia, predação e dispersão de sementes (Beattie e Hughes, 2002).

As formigas diferem da maioria dos demais insetos na sua interação com as plantas. Elas podem ser vistas utilizando as plantas ou produtos delas como alimento, como por exemplo, seiva, néctar, pólen e sementes. Há também o caso, como os das espécies de formigas cortadeiras, em que elas utilizam folhas como substrato para seu fungo simbiote. Apesar de ser mais freqüente a nidificação de seus ninhos no solo, as formigas podem utilizar as plantas como moradia. Os ninhos dos formicídeos podem ser encontrados nas partes aéreas das plantas, como galhos, folhas e nas partes inferiores, como as raízes. Fendas e rachaduras de árvores mortas também são abrigos de diversas espécies de formigas. Muitas plantas atraem as formigas para que estas as defendam de animais herbívoros e inclusive das epífitas e trepadeiras. São conhecidas espécies de plantas que produzem nectários extra-florais, corpos de Müller, cavidades para abrigar ninhos de formigas e muitos outros artifícios para atraírem esses insetos. A ajuda dada pelas formigas a estas plantas é tão importante que algumas delas, raramente, sobrevivem na ausência da formiga, como é o caso de *Pseudomyrmex ferruginea* e a planta *Acacia cornigera*, além do gênero *Azteca* e a planta *Cecropia glaziovii*. Em certos ecossistemas, até 90% de todas as plantas epífitas têm alguma relação mutualística com formigas (Hölldobler e Wilson, 1990). Apesar de não serem eficientes polinizadoras, devido a suas características morfológicas e comportamentais, as formigas também podem ser polinizadoras: a planta *Theobroma cacao*, é apontada na literatura como exemplo de planta polinizada por formigas (Hocking, 1975).



### *Mirmecocoria – dispersão de sementes por formiga*

A dispersão de sementes por formigas é um fato antigo entre os botânicos, sendo as primeiras divulgações científicas ocorridas em regiões tropicais nos anos de 1834 e 1860 (Gorb e Gorb, 2003). Porém, estudos pioneiros publicados sobre este fenômeno foram às monografias do botânico Johan Rutger Sernander nos anos de 1901 e 1906. Este botânico foi o responsável pela introdução do termo mirmecocoria, sendo este termo de origem grega, onde *myrmex* significa formiga; e *kore*, significa dispersão (Handel e Beattie, 1990). Sernander também foi o responsável pela proposta de um novo termo, elaiosoma (Ciccarelli et al., 2005). Essa denominação foi dada aos apêndices ligados às sementes que atraíam formigas. Além disso, Sernander foi o pioneiro em realizar uma primeira tentativa de classificação das plantas mirmecocóricas, trabalho este que se baseou nos aspectos morfológicos e anatômicos do elaiosoma, assim como nos aspectos ecológicos deste fenômeno (Gorb e Gorb, 2003). E ainda, segundo Gorb e Gorb (2003), essa classificação já foi alterada e modificada nos tempos atuais. Tendo a seguinte classificação: mirmecocóricas obrigatórias, composta de espécies que são dispersadas apenas por formigas; as facultativas, que possuem outros métodos de dispersão das sementes, além das formigas e as não-mirmecocóricas, são as espécies que não possuem nenhuma adaptação especializada (ex. elaiosoma) para que as sementes sejam dispersadas por formigas.

A mirmecocoria é um mecanismo de dispersão utilizado por diferentes espécies de plantas, onde as formigas servem como os agentes dispersores (Handel e Beattie, 1990). Segundo Handel e Beattie (1990), Sernander dividiu esse fenômeno em mirmecocoria especializada e não especializada. Na mirmecocoria especializada, sementes possuem um apêndice especializado, chamado elaiosoma, que teria como principal função atrair formigas. Para Sernander o elaiosoma, além de atrair, também desencadeava, no inseto, o comportamento de remoção dos diásporos. Os diásporos são deixados pelas plantas no ambiente sendo rapidamente localizados pelas formigas (Handel e Beattie, 1990), levados para o interior da colônia (Beattie e Lyons, 1975), onde o elaiosoma é removido e consumido como alimento para as larvas (Bono e Heithaus, 2002; Fischer et al. 2005). As sementes geralmente ficam intactas, e são frequentemente descartadas e abandonadas em galerias dentro da colônia ou são deixadas fora, nas

proximidades da colônia, onde a semente pode vir a germinar (Kjellsson, 1985; Handel e Beattie, 1990). Na evolução deste mutualismo entre formigas e plantas mirmecocóricas, as formigas adquirem alimento enquanto as plantas são beneficiadas com a dispersão de suas sementes (Handel e Beattie, 1990; Gorb e Gorb, 2003).

Na mirmecocoria não especializada, as sementes não possuem o elaiosoma. De acordo com Handel e Beattie (1990), algumas espécies de formigas colhedoras de sementes, como por exemplo, as do gênero *Messor*, *Pogonomyrmex* e *Veromessor*, podem acidentalmente ser agentes de dispersão. Essa interação, entretanto, não pode ser caracterizada como um mutualismo verdadeiro, pois durante a atividade de coletas e transporte das sementes, essas espécies de formigas ocasionalmente perdem suas sementes, resultando na chance que as sementes têm para se estabelecer e eventualmente germinar.

O principal agente de atração na mirmecocoria especializada é o elaiosoma, como já mencionado. Esse apêndice é constituído de um conjunto de células do parênquima rico em lipídeos e proteínas (Kusmenoglu et al., 1989), e pode variar quanto a sua morfologia, seu tamanho, sua cor e também sua posição de inserção na semente (Gorb e Gorb, 1995; Ciccarelli et al., 2005). Muitos autores utilizam diferentes terminologias para nomear essa estrutura, como por exemplo, arilo. Isso ocorre, pois essas terminologias são dadas de acordo com a origem do elaiosoma. Se uma semente serve como um diásporo funcional e o seu apêndice é originado de tecidos da planta, o termo arilo para elaiosoma é usado. Arilo ou *arillus* é um termo comum para descrever a estrutura que cobre muitas sementes de gimnospermas. A distinção entre arilo e elaiosoma é mais funcional do que anatômica. Ambas as estruturas apresentam semelhanças morfológicas, com a mesma origem embriológica (Pizo e Oliveira, 2001). Diversos trabalhos têm demonstrado a atratividade do elaiosoma para as formigas, assim como já tentaram isolar o composto que seria o responsável por essa atração. Trabalhos como o de Marshall et al. (1979) apontam um diglicerídeo, o 1,2 dioleína como o principal composto responsável pela atração das formigas e também o responsável por desencadear nas formigas o comportamento de transporte das sementes.

O efeito do tamanho da semente e do elaiosoma é ponto importante de vários trabalhos científicos. Esses trabalhos apontam que esse tamanho pode influenciar na taxa

de remoção das sementes (Davidson e Morton, 1981; Mark e Olesen, 1996; Gorb e Gorb, 1995 e 2003). Segundo esses autores quanto maior for o elaiosoma maior será sua atratividade e, conseqüentemente maior será a sua taxa de remoção pelas formigas.

Além do elaiosoma, muitas adaptações das plantas mirmecocóricas têm contribuído para o sucesso deste mutualismo. Handel e Beattie (1990) destacaram algumas dessas adaptações em seu artigo. Por exemplo, as hastes de uma planta mirmecocórica são curtas e se inclinam para o solo quando as sementes estão aptas a serem coletadas pelas formigas. De acordo com Beattie e Lyons (1975), o período de floração e frutificação das plantas mirmecocóricas ocorre mais cedo do que o das demais plantas, além de que, em algumas regiões, a exemplo, das temperadas, a floração e frutificação, coincidem com a alta atividade das formigas (Handel e Beattie, 1990).

Autores como Gorb e Gorb (2003) vêm assumindo o conceito de síndrome mirmecocórica e diplocórica para o fenômeno de dispersão de sementes por formiga. Os diferentes métodos de dispersão de uma planta nada mais são que uma resposta adaptativa delas (Fahn e Werker, 1972; Gorb e Gorb, 2003). Por isso, para Gorb e Gorb (2003), o conjunto de adaptações das plantas mirmecocóricas pode ser chamado de síndrome mirmecocórica ou síndrome diplocórica, uma vez que elas possuem adaptações, morfológicas, anatômicas, bioquímicas e fenológicas e que, por meio delas, tornam-se atrativas para as formigas, promovendo uma dispersão mais eficaz de suas sementes. Na síndrome diplocórica, algumas adaptações da síndrome mirmecocórica podem ser menos expressas ou até mesmo ter desaparecido. Como por exemplo, o tamanho do elaiosoma, que surge reduzido nas sementes diplocóricas; as hastes das espécies diplocóricas são mais longas e eretas durante a deiscência dos frutos; a cápsula que envolve as sementes se rompe de maneira explosiva durante a deiscência (Beattie e Lyons 1975).

Sementes mirmecocóricas são removidas por diferentes espécies de formigas; ainda não foi relatado que uma determinada semente fosse coletada apenas por uma espécie. A interação formiga-sementes envolve uma grande lista de espécies de ambos grupos, com mais de quatro subfamílias de formigas e mais de 3.000 espécies de plantas já foram listadas (Beattie e Culver, 1981; Hanzawa et al., 1988; Hölldobler e Wilson, 1990 e Handel e Beattie, 1990). Plantas que têm suas sementes dispersadas por formigas podem ser localizadas em diferentes habitats em todos os continentes, exceto na Antártica

(Handel e Beattie, 1990). Elas são mais densamente encontradas em regiões quentes como da Austrália (Fischer et al., 2005) e da África (Hölldobler e Wilson, 1990), mas também podem ser vistas em áreas temperadas (Hanzawa et al., 1988) e tropicais (Leal e Oliveira, 1998; Passos e Ferreira, 1996; Pizo e Oliveira, 1998; Leal et al. 2003; Peternelli et al. 2003 e 2004).

Dessa interação já é sabido que existem vantagens para ambos os organismos, formigas e plantas. De acordo com Handel e Beattie (1990), quando as formigas estão interagindo com as sementes e operando como agentes de dispersão, elas são importantes para o meio ambiente, pois reduzem a competição entre plântulas e sua planta-mãe. Além disso, as formigas podem reduzir a quantidade de sementes consumidas por predadores, pois estes insetos transportam as sementes para o interior de seus ninhos, tornando mais difícil para outros animais granívoros alcançá-las (Manzaneda et al., 2005). Indiretamente, estes insetos podem ainda, fornecer condições favoráveis para o crescimento das plântulas, uma vez que, o solo sob o ninho e ao redor dele é menos compacto e rico em nutrientes (Passos e Oliveira, 2004). Segundo Passos e Oliveira (2004), a atividade de remoção do solo na edificação dos ninhos e a deposição de matéria orgânica pelas formigas é uma das grandes vantagens para as plântulas em ambientes áridos, os quais geralmente têm solo compacto e infértil. As formigas também podem fornecer proteção contra circunstâncias ambientais adversas pela relocação das sementes para o interior de seus ninhos, onde elas estarão protegidas contra fogo e altas temperaturas (Handel e Beattie, 1990). Apesar dos benefícios deste mutualismo à planta, poucos estudos investigaram sua vantagem para as formigas. A grande vantagem para estes insetos parece ser aquisição de alimento pelos nutrientes obtidos do elaiosoma. Espécie de formiga, como *Aphaenogaster rudis*, têm sua relação do investimento do sexo aumentada, quando elaiosoma é adicionado à dieta da rainha (Bono e Heithaus 2002). Fischer et al. (2005) também verificaram que os elaiosomas têm papel importante no ciclo de vida das formigas em áreas temperadas, porque são usados como uma fonte do alimento para larvas, como é o exemplo de operárias de *Myrmica rubra*.

Nos últimos tempos, vários têm sido os trabalhos publicados quanto ao comportamento das formigas em relação às sementes e também quanto aos aspectos ecológicos deste mutualismo. A partir de algumas hipóteses geradas com esses estudos de

interação formiga-semente, este trabalho teve sua origem. Como ainda é controverso na literatura como as formigas detectam sementes com elaiosoma, apesar de ser claro que, ele é o agente responsável em atrair e desencadear o comportamento de coleta. Alguns trabalhos defendem a hipótese de que as formigas encontram a semente ao acaso e outros acreditam na presença de voláteis na atração. O primeiro capítulo deste trabalho objetivou testar se as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*, ambas espécies de formigas cortadeiras, podem detectar os sinais químicos liberados pelo elaiosoma de sementes de *Mabea fistulifera*, usando técnica de olfatômetro. Além disso, a atratividade de iscas à base de elaiosoma também foi testada em campo. No segundo capítulo, ainda se trabalhando com as formigas cortadeiras, levantou-se a questão do comportamento que essas formigas têm quando encontram no campo sementes com elaiosoma. De maneira geral, elas coletam toda a semente (elaiosoma-semente), mas apenas o apêndice será utilizado por elas. Assim, nesse trabalho, o objetivo foi responder por que as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* coletam toda a semente se apenas o elaiosoma as interessa? Foi objetivo do terceiro e último capítulo avaliar a taxa de remoção de sementes em dois estágios sucessionais: pasto com regeneração florestal e floresta secundária, tanto em ambientes tropicais, onde se esperava ter uma maior diversidade de formigas, quanto em áreas temperadas, onde se esperava uma diversidade menor desses insetos. Objetivou-se, ainda, chamar a atenção para o importante papel que as formigas podem exercer nesses ambientes. Assim sendo, foram coletadas informações e conduzidos experimentos em ambientes tropical e temperado em dois habitats, floresta secundária e pasto abandonado com regeneração florestal, para responder às seguintes perguntas: (1) quais espécies de formigas interagem com as sementes? (2) Como esses insetos se comportam em relação às sementes? (3) As formigas dispersam mais sementes na floresta do que o fazem em pasto abandonado? (4) As formigas removem mais sementes do que vertebrados na floresta e no pasto abandonado? E (5) a taxa de remoção das sementes pode ser influenciada pelo período do dia (dia-noite)?

Os três capítulos estão apresentados na forma de artigos científicos. O primeiro intitulado “Leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) are attracted by volatiles from seeds with elaiosomes” foi submetido à Revista *Insectes Sociaux*. O segundo, “Seed transport and removal of the elaiosome of *Mabea fistulifera* by workers of *Atta sexdens*

*rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)” foi submetido ao Journal Insect Behavior; e o terceiro denominado “Taxa de remoção de sementes por formigas em ambientes Tropical e Temperado: habitat de floresta e campo abandonado”, futuramente será submetido à Revista Behavioral Ecology and Sociobiology com o título “Removal rates of seeds by ants in Tropical and Temperate environments: forest and old field habitats”.

## 2. Bibliografia Geral

- Beattie, A. J. and Lyons, N. 1975. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): adaptations and strategies. *American Journal of Botany*. 62(7): 714-722.
- Beattie, A. J. and Culver, D. C. 1981. The guild of myrmecochores in the herbaceous flora of West Virginia forests. *Ecology*. 62(1): 107-115.
- Beattie, A. J. and Hughes, L. 2002. Ant-plant interactions. 211-235. In: Herrera, C. M. and Pellmyr, O. *Plant-animal interactions – An evolutionary approach* (ed.) Blackwell Publ. Co.
- Bono, J. M. and Heithaus, E. R. 2002. Sex ratios and the distribution of elaiosomes in colonies of the ant, *Aphaenogaster rudis*. *Insectes Sociaux*. 49: 320-325.
- Ciccarelli, D., Andreucci, A. C., Pagni, A. M. and Garbari, F. 2005. Structure and development of the elaiosome in *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) seeds. *Flora*. 200: 326-331.
- Davidson, D. W. and Morton, S. R. 1981. Myrmecochory in some plants (*F. chenopodiaceae*) of the Australian arid zone. *Oecologia*. 50: 357-366.
- Fahn, A. and Werker, E. 1972. Anatomical mechanisms of seed dispersal. In: Kozłowski, T. T. *Seed biology – Importance, development and germination*. Academic press, ed. 151-217.
- Fischer, R. C., Ölzant, S. M., Wanek, W. and Mayer, V. 2005. The fate of *Corydalis cava* elaiosome within an ant colony of *Myrmica rubra*: elaiosomes are preferentially fed to larvae. *Insectes Sociaux*. 52: 55-62.
- Gorb, S. N. and Gorb, E.V. 1995. Removal rates of seeds of five myrmecochorous plants by the ant *Formica polyctena* (Hymenoptera: Formicidae). *OIKOS*. 73: 367-374.
- Gorb, E. and Gorb, S. 2003. Seed dispersal by ants in a Deciduous Forest ecosystem. Mechanisms, strategies, adaptations. Kluwer Academic Publ. 225pp.
- Gullan, P. J. and Cranston, P. S. 1999. *The insects: an outline of entomology*. Blackwell Science Publ.

- Handel, S. N. and Beattie, A. J. 1990. Seed dispersal by ants. *Scientific American*. 263: 76-83. 1990.
- Hanzawa, F. M. Beattie, A. J. and Culver, D. C. 1988. Directed Dispersal: demographic analysis of an ant-seed mutualism. *The American Naturalist*. 131(1): 1-11.
- Hocking, B. 1975. Ant-plant mutualism: 79-90p. *Evolution and energy*. Academic Press, London and New York.
- Hölldobler, B and Wilson, E. O. 1990. *The ants*. Harvard University Press, Cambridge  
<http://www.antbase.org>, acessada em julho 2007.
- Kjellsson, G. 1985. Seed fate in a population of *Carex pilulifera* L. *Oecologia*. 67: 416-423.
- Kusmenoglu, S., Rockwood, L. L. and Gretz, M. R. 1989. Fatty acids and diacylglycerols from elaiosome of some ant-dispersed seeds. *Phytochemistry*. 28(10): 2601-2602.
- Leal, I. R. and Oliveira, P. S. 1998. Interactions between fungus-growing ants (*Attini*), fruits and seeds in cerrado vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica*. 30: 170-178.
- Leal, I. R., Tabarelli, M. and Silva, J. M. C. 2003. *Ecologia e conservação da caatinga*. ed. Universitária da UFPE.
- Manzaneda, A. J., Fedriani, J. M. and Rey, P.J. 2005. Adaptive advantages of myrmecochory: the predator-avoidance hypothesis tested over a wide geographic range. *Ecography*. 28: 583-592.
- Mark, S. and Olesen, J. M. 1996. Importance of elaiosome size to removal of ant-dispersed seeds. *Oecologia*. 107: 95-101.
- Marshall, D. L., Beattie, A. J. and Bollenbacher, W. E. 1979. Evidence for diglycerides as attractants in an ant-seed interaction. *Journal of Chemical Ecology*. 5(3): 335-344.
- Passos, L. and Ferreira S. O. 1996. Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in Southeastern Brazil. *Biotropica*. 28: 697-700.
- Passos, L. and Oliveira, P. S. O. 2004. Interaction between ants and fruits of *Guapira opposita* (Inyctaginaceae) in a Brazilian sandy plain rainforest: ant effects on seeds and seedling. *Oecologia*. 139: 376-382.
- Peternelli, E. F. O., Della Lucia, T. M. C., Peternelli, L. A., Martins S. V. and Borges, E. E. L. 2003. The interaction among workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) and seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil. *Sociobiology*. 42(3): 597-603.
- Peternelli, E. F. O., Della Lucia T. M. C. and Martins, S. V. 2004. Espécies de formigas que interagem com sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). *Revista Árvore*. 28(5): 733-738.
- Pizo, M. A. and Oliveira, P. S. 1998. Interaction between ants and seeds of a nonmyrmecochorous neotropical tree, *Cabralea canjerana* (Meliaceae), in the Atlantic forest of Southeast Brazil. *American Journal of Botanic*. 85: 669-674.



Pizo, M. A. and Oliveira, P. S. 2001. Size and lipid content of nonmyrmecochorous diaspores: effects on the interaction with litter-foraging ants in the Atlantic rain forest of Brazil. *Plant Ecology*. 157, 37-52

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) are attracted by volatiles from seeds with elaiosomes**

E. F. O. Peternelli<sup>1</sup>, T. M. C. Della Lucia<sup>1,\*</sup>, Arne Janssen<sup>2</sup>, L. A. Peternelli<sup>3</sup> and N. C. Moreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Biology, Section Entomology (BIOAGRO), Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil;

<sup>2</sup> IBED, Section Population Biology, University of Amsterdam, the Netherlands;

<sup>3</sup> Department of Informatic, Section Statistics, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

Keywords: ant-plant interactions, granulated baits, myrmecochory, olfactometer

**Abstract.** Leaf-cutting ants do not only defoliate trees, but are also involved in a mutualistic interaction with some tree species. Several tree species produce seeds with elaiosomes, which is a food source for the ants. In exchange, ants transport the seeds to their nest, where they are cast out after removal of the elaiosome. Such seeds have a higher probability of germination, hence, the trees profit from the action of the ants. It is still unclear how ants find seeds with elaiosomes. We therefore investigated the role of volatiles produced by seeds with elaiosomes in ant attraction with an olfactometer in the laboratory and in field experiments. We assessed the suitability of the olfactometer by offering odours of commercially available citrus pulp bait to workers of the ant species *Atta sexdens rubropilosa* and the grass-cutter *Atta bisphaerica*. Subsequently, the attractiveness of the elaiosome of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) seeds was compared with commercial baits. For attraction in the field, workers of eight colonies of each ant species were offered the following treatments: commercial citrus pulp bait, an elaiosome bait, a grass bait, and a combined grass-elaiosome bait. In the olfactometer, ants were attracted by volatiles of seeds with elaiosomes and by odours of commercial baits when air was offered as alternative. Workers of *A. sexdens rubropilosa* preferred volatiles of

---

\* Corresponding author: Campus Universitário, Departamento de Biologia Animal, Setor Entomologia. Viçosa, MG, 36570-000. Telephone: +5531 3899 2915; Fax: +5531 3899 4012, e-mail: [tdlucia@ufv.br](mailto:tdlucia@ufv.br)

commercial bait to baits of seeds with elaiosomes, whereas *A. bisphaerica* preferred the grass-elaiosome bait. In the field, *A. sexdens rubropilosa* transported more commercial bait than elaiosome bait to the nest; however, *A. bisphaerica* collected both baits in the same proportion. Workers of *A. bisphaerica* collected more combined grass-elaiosome bait than other baits. Our study demonstrates that volatiles from seeds with elaiosomes are attractive to ants, as well as the potential of compounds of seeds with elaiosomes for manufacturing baits.

## Introduction

Ants of the tribe Attini, specifically in the genera *Atta* and *Acromyrmex*, are classified as pests in agroecosystems because they cut leaves from various plants species to use as substrate for their symbiotic fungus (Cherrett, 1972; Rockwood, 1976). In contrast, they are not considered pests in natural ecosystems. They are even involved in mutualistic interactions with some plant species, for example, through seed dispersion (Pizo and Oliveira, 1998; Peternelli et al., 2003). This so-called myrmecochory has been widely investigated in temperate, tropical and arid regions, where elaiosomes of seeds of typical myrmecochoric plants are the main food source of some Myrmicinae (Berg, 1972; Handel and Beattie, 1990). Elaiosomes are rich in lipids, proteins and amino acids (Brew et al., 1989; Fischer et al., 2005). Many plants have elaiosomes, and ants take the seeds to their nest where they feed the elaiosome to their larvae. The seeds without elaiosome are thrown on the waste disposal area, which is rich in nutrients from ant frass and dead ant bodies, and seeds have a higher probability to germinate there than in other soil (Beattie and Culver, 1981; Handel and Beattie, 1990). The relationship appears to be mutualistic, as the plant benefits because its seeds are dispersed and planted in favourable germination sites and the ants gain food. Elaiosomes are an example of convergent evolution, having evolved many times in many plant species (Berg, 1972; Beattie and Culver, 1981; Hanzawa et al., 1988; Hölldobler and Wilson, 1990; Handel and Beattie, 1990; Gómez et al., 2005). Plants with elaiosomes occur in temperate areas (Beattie and Culver, 1981; Handel and Beattie, 1990), as well as in the tropics, including Brazil (Pizo et al., 2004; Pizo and Oliveira, 1998; Passos and Ferreira, 1996; Peternelli et al., 2003, 2004; Leal and Oliveira, 1998; Leal et al., 2003).

Formicidae of different subfamilies collect seed elaiosomes of myrmecochorous plants or arilos (fleshy covers of certain seeds) of nonmyrmecochorous plants (Anderson and Owens, 2003; Handel and Beattie, 1990; Pizo et al, 2004). Elaiosomes are known to contain substances such as 1,2 diolein (Marshall et al, 1979, Kusmenoglu et al, 1989), which induce ants to pick up these seeds. It is unclear, however, how ants find seeds with elaiosomes. Sheridan et al. (1996) claim that workers of *Aphaenogaster rudis*, *Formica subsericea* and *Camponotus ferrugineus* were not attracted to the elaiosome of *Asarum canadense* seeds by olfaction but, rather, responded to the seeds only after touching them

with their antennae and after tasting them. However, their experimental set-up was not tested for the diffusion of volatiles from the container with seeds into the environment. Hence, it is unclear whether the ants in principle could perceive the volatiles. From the point of view of the plant, it could be advantageous to attract seed-carrying ants to the seeds, and this could be achieved through the production of volatiles by the seed and elaiosome.

In short, it is not clear how ants detect seeds with elaiosomes, although it stands to reason that plants that produce seeds with elaiosomes would also signal this to ants to ensure seed dispersal. One means of signalling that is commonly found in insects is through volatiles. The objective of this work was therefore to test if workers of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta bisphaerica* can detect chemical signals released by the elaiosome of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) from a distance, using an olfactometer. The attractiveness of elaiosome baits was also tested in the field.

## Materials and methods

### *Seed collection*

*Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae) is a native pioneer plant, widely distributed in the Cerrado and in transition areas of semideciduous seasonal forests (Lorenzi, 2000). The plant is usually found in aggregates at the borders of forests and in areas with severe human disturbance. Several invertebrates and vertebrates use the pollen, nectar and seeds of *M. fistulifera* as an alternative food source during the dry season, when other food items are scarce (Daud and Feres, 2004). In the research area, the seeds plus elaiosomes of *M. fistulifera* are constantly transported by at least 16 species of ants during the fruiting period (Paternelli et al. 2004). One of the species studied here, *A. sexdens rubropilosa* was found to carry seeds inside the nest, whereas seeds without elaiosome were removed from the nest (Paternelli et al. 2004). The other species shows the same behaviour with respect to seeds of *M. fistulifera* (pers.obs.). Hence, the two species do not prey on the seeds, but collect them and carry them to the waste disposal area.

Seeds were collected in the period of fruit maturation (September to October 2004) and were kept refrigerated at 4° C until used. Because we wanted to test several combinations of commercial baits as well as elaiosomes in the field as well as in olfactometer experiments, and we were not interested in differences in the collection rates of seeds and baits due to their size or form, we decided to prepare granular baits of all materials.

### *Preparation of Baits*

Ants in the field always encounter seeds with elaiosomes attached. Hence, separation of seeds from elaiosomes in order to produce baits would not give a proper representation of the natural situation. Furthermore, an infrared spectroscopic analysis of seeds and elaiosomes (following Barbosa, 2007 extraction of fatty acids and diacylglycerols according to Kusmenoglu et al 1989) showed no difference between seeds and elaiosomes with respect to these compounds that have been shown to play a role in inducing ants to pick up these seeds. This is contrary to findings by Hughes et al. (1994), which may be caused by intact seeds being analysed here, whereas Hughes et al. (1994)

analysed seeds without seed coats. For these reasons, whole seeds (seeds-elaiosomes) were used to manufacture baits.

Baits were prepared using a method modified from Lima et al. (2003). One hundred grams of entire seeds of *M. fistulifera* were ground and mixed with 10 g of wheat flour (agglutinant) and 100 ml of distilled water, resulting in a paste, which was used to produce elaiosome baits. To produce grass-based bait, previously dried and ground grass was mixed with wheat flour as agglutinant and soybean oil as lubricant in a 14:5:1 (w/w) proportion (Lima et al. 2003). Thirty percent of elaiosome (w.w.) was added when preparing the grass-elaiosome bait, no soybean oil was added to this bait, resulting in granules that could not be broken by ants. The paste was passed through an acrylic plate with holes (diam 2.10 mm), resulting in granules that were subsequently oven-dried (2 h, 50<sup>0</sup> C). Granules made of 9 g of wheat and water was used as control. Granules weighed on average 1.93 mg and had the same dimensions as commercial bait granules. We furthermore used commercial granulated non-toxic baits (placebos) with citrus pulp as the attractant (97% citrus pulp) and an average weight of 1.25 mg per granule and a diameter of  $2.15 \pm 0.12$  mm.

### *Olfactometer Bioassays*

Workers of six laboratory colonies of *A. sexdens rubropilosa* (maintained at  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  RH and a photoperiod of 12:12) were used. Each colony provided 20 workers for the tests. Because *A. bisphaerica* is difficult to maintain in the laboratory, workers of this species were collected in the field for each replicate. They were collected from six nests in a pasture located in Viçosa, MG ( $20^{\circ}45'\text{S}$ ,  $42^{\circ}55'\text{W}$ ), where the dominant grass species was *Paspalum notatum*.

A Y-tube olfactometer was used to study the response of ants to volatiles (Sabelis and van de Baan 1983; Janssen, 1999). It consisted of a glass tube (diameter 55 mm) in the form of a Y. The arms of the tube were 40 cm long and the base was 55 cm long. The base of the tube was connected to a pump that produced airflow from the arms of the tube to its base. A glass tube (20 cm, diameter 5.5 cm), closed with mesh on both sides, and was connected to each arm. The mesh served to produce a laminar airflow, as well as to block the vision of the ants being tested, thus eliminating visual cues that could possibly affect their choice. Either 2g of bait granules was put inside the tube with mesh, or the tube was left empty. When wind speeds in both arms are equal (c. 0.48 m/s), the volatiles form two separate fields in the base of the Y-tube with the interface in the middle of the base tube (Sabelis and van de Baan 1983). A hot-wire anemometer was used to measure the wind speed in both arms of the olfactometer and wind speeds were calibrated by putting small pieces of cotton wool on the mesh at the air entrance of the tubes containing the odour source.

Upon collection from the colonies, ants were kept in a Petri dish and were introduced into the olfactometer one at a time by disconnecting the pump and releasing an ant at the base of the tube. After reconnecting the pump, the ant started moving upwind to the junction of the tube, where she had to choose one arm. Each individual was observed until she had reached the end of one arm or for a maximum of 5 minutes, whereupon it was removed. Note that the ants could not contact or see the baits because of the mesh. The olfactometer was cleaned with alcohol after each worker tested to remove cues left behind by the ants. Ants that did not make a choice within 5 minutes were excluded from further analysis. Twenty ants were tested per replicate. To correct for unforeseen asymmetries in the experimental set-up or for possible trails left behind by the



ants that could not be removed with alcohol, the odour sources were connected to the opposite arm of the olfactometer after each 5 ants that made a choice. A minimum of two replicates were done per experiment, using different baits and different ants to avoid pseudoreplication. Differences in numbers of ants choosing for any of the odour sources were tested using the replicated goodness of fit test (Sokal and Rohlf 1995).

Three experiments were done with each ant species. First, they were offered a choice between volatiles from commercial baits and air to verify that the olfactometer was appropriate to study the response of ants to volatiles. Second, they were offered a choice between volatiles from bait from elaiosomes plus seeds and air, and third, they were offered a choice between volatiles from both types of baits.

#### *Attraction in the field*

Commercial and elaiosome baits were applied nearby field trails of *A. sexdens rubropilosa* and *A. bisphaerica*, following a methodology modified from Delabie et al (2000) and Lima et al (2003). The following treatments were used: commercial bait containing citrus pulp, elaiosome bait, a grass (*Hypharhenia rufa*) bait that is considered very attractive to the grass-cutter *A. bisphaerica* (Della Lucia, 1993), a combined grass-elaiosome bait and control baits.

*Atta sexdens rubropilosa* was tested in a forest fragment at the university campus in Viçosa. Eight foraging trails separated by at least 1.5 m and belonging to different ant nests were used. Based on previous observations on foraging activity of the ant colonies, we started experiments at 7:30 p.m., the peak of foraging activity. We offered control bait, commercial bait and elaiosome bait at the same time. Two grams of each type of bait were offered inside a glass tube (diam. 2 cm), one tube per bait type. Tubes were placed at the sides of the trail, near the exit of the workers from the nest. Eight replicates (one per day) were conducted, and the position of the glass tubes was switched every day. The time until first contact and time until the first bait was transported were recorded. The duration of the tests was 40 minutes or until one of the baits was almost completely depleted.

For *A. bisphaerica*, the field tests were conducted in two phases at different times. The first test was conducted in a similar way as with *A. sexdens rubropilosa*. Two extra

types of bait, i.e. grass bait and grass elaiosome bait were offered in the second test. Experiments with this species started at 8:30 p.m. in a pasture covered with grass (*Paspalum notatum*), located at a farm about 7 km from Viçosa, MG.

All experiments followed a randomized block design, with eight blocks. Each nest corresponded to one block. For each treatment, data on the mass of transported baits (difference between initial and final masses) by each nest during all days of the experiment resulted in an average value to be used in the analyses. These data were analyzed by means of an analysis of variance, and when necessary, treatment means were compared with a Tukey test at 5% significance level.

## Results

### *Olfactometer Bioassays*

All workers moved their antennae while walking through the olfactometer, suggesting that they were perceiving volatiles. Upon arrival at the bifurcation, antennation was intensified and ants often went straight into the olfactometer arm with volatiles of the bait of their preference. A few workers entered the other arm; some of them returned and then entered the arm with the bait odours. Very few individuals did not make a choice within 5 minutes. In the experiments with *A. sexdens rubropilosa*, on average  $2.38 \pm 1.19$  ants (mean  $\pm$  SD) did not make a choice per replicate, whereas with *A. bisphaerica* on average  $1.17 \pm 0.64$  ants did not make a choice.

Both ant species were attracted by odours from commercial baits and baits manufactured from seeds plus elaiosome (Figs. 1 and 2). Significant attraction of workers of *A. sexdens rubropilosa* by odours of commercial bait was found in all replicates (Fig. 1A). The different replicates were not heterogeneous (Gh = 7.29, d.f. = 3, P = 0.063). Overall, 91.3% of the workers of *A. sexdens rubropilosa* preferred the odour of commercial bait to air (Pooled results: Gp = 61.44; df = 1, P < 0.001, Fig. 1A). In total, 92.5% of the workers of this species preferred the odour of elaiosome baits to air (Gh = 0.73; df = 3; P = 0.86; Gp = 68.28; df = 1; P < 0.001, Fig. 1B). When offered a choice between odours of commercial bait and of elaiosome bait, they showed a significant preference for commercial bait (Gh = 3.97; df = 3; P = 0.26; Gp = 28.14; df = 1; P < 0.001, Fig. 1C).

Workers of *A. bisphaerica* were slower than *A. sexdens rubropilosa*; they spent much more time exploring the olfactometer, but in the end almost always made a choice (Fig. 2). About 87.5% of them preferred the odours of the elaiosome bait to air (Gh = 0.22; df = 1; P = 0.63; Gp = 25.31; df = 1; P < 0.001, Fig. 2A), whereas 77.5% preferred odours of the commercial baits to air (Gh = 1.31; df = 1; P = 0.25; Gp = 12.79; df = 1; P < 0.005, Fig. 2A). When offered a choice between odours of commercial bait and elaiosome bait, none of the replicates showed a significant preference, but there was a significant overall trend towards preference for the elaiosome bait (Gh = 1.47; df = 4; P = 0.83; Gp = 7.94; df = 1; P < 0.005, Fig. 2B).

Workers of both species spent on average less time to make their choice in experiments in which one bait was tested against air than in experiments in which they had a choice between the two bait types.

#### *Attraction in the field*

##### *Atta sexdens rubropilosa*

A significantly higher weight of commercial bait was transported to the nest than of elaiosome bait or control bait (Fig. 3A), whereas the weights of collected elaiosome baits and control baits were not significantly different, but showing a trend towards elaiosome baits being more attractive than control baits. On average, the first bait being contacted and retrieved was the commercial bait, followed by both elaiosome and control (Fig. 3B). Workers of *A. sexdens rubropilosa* were very fast in choosing among treatments and were always very active inside the tubes containing commercial baits.

##### *Atta bisphaerica*

When offered a choice between commercial bait, elaiosome bait and control bait, *A. bisphaerica* collected more commercial bait and elaiosome bait than control bait ( $P < 0.05$ ), whereas the difference between commercial baits and elaiosome baits was not significant (Fig. 4). There was no significant difference in the average time to first bait contact ( $F = 1$ ,  $p = 0.4096$ ) and in the time to initial bait transportation ( $F = 1.97$ ,  $p = 0.2006$ ) among baits. These results show that elaiosome baits are attractive to ants in the field.

When offered a choice between control bait, commercial bait, and bait made of elaiosome, grass and grass plus elaiosome, the highest amount of bait collected was of combined grass-elaiosome baits ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5). The lowest amount of bait was collected from the control, followed by the commercial bait and the elaiosome bait (Fig. 5). The shortest time to the first contact observed was for grass bait, which did not differ ( $P > 0.05$ ) from both grass-elaiosome bait and commercial bait, whereas the longest time was found for control baits, however not differing ( $P > 0.05$ ) from elaiosome bait (Fig. 6). The same pattern occurred for the time of first bait retrieval (Fig. 6).

## Discussion

Chemical analyses of many elaiosomes and seeds had led to the conclusion that certain chemicals induce seed dispersal by ants (Marshall et al., 1979; Kusmenoglu et al., 1989; Brew et al. 1989; Sheridan et al., 1996; Ciccarelli et al., 2005). Our results support the hypothesis that seeds with elaiosomes elicit volatile compounds that are attractive to leaf-cutting ants. This hypothesis was first voiced by Soukup and Holman (1987), who suggested that attraction of another species of ants by dehisced fruits of the plant *Pedicillate trillium* involved volatile compounds emitted by the ripening fruit or by the elaiosomes themselves. Sheridan et al. (1996) claimed that four species of ants did not use volatiles of seeds, but did not offer volatiles under controlled conditions and did not demonstrate that their experimental set up is in principle suitable to demonstrate attraction of ants. In general, without a positive response of the species investigated to some volatile, nothing can be concluded with respect to attractiveness: the experimental set-up could simply be unsuitable to demonstrate attraction in the species in question. Besides differences in the species tested, the unsuitability of the experimental set-up of Sheridan et al (1996), may be the cause for the lack of attraction claimed by these authors. Hence, our olfactometer experiments provide the first conclusive evidence that volatiles of seeds plus elaiosomes are indeed attractive to seed-collecting ants that had no previous experience with the seeds or the volatiles.

We used commercial bait in the olfactometer experiments because it is known that citrus pulp is preferentially collected by leaf-cutting ants (Boaretto and Forti, 1997; Della Lucia, 1993). Our olfactometer results are the first to show that the volatiles of this commercial bait are attractive to the two species of leaf-cutting ants tested here (Fig. 1A, 2A), but the attraction of the grass-cutting ants was not very strong. Moreover, *A. bisphaerica* showed a strong attraction towards elaiosome baits when both baits were offered at the same time (Fig. 2B), suggesting that the ants may find more attractive material than commercial baits in the field. This would explain the fact that these ants do not seem to collect commercial baits (Boaretto and Forti, 1997; Boaretto et al. 2003). The attraction of *A. bisphaerica* to elaiosome baits is a promising first step towards the production of baits to control this ant species. For *A. sexdens rubropilosa*, the use of elaiosome baits offers an alternative to the attractive citrus-based baits.

In the field, *A. sexdens rubropilosa* was also attracted more to the commercial bait than to the elaiosome bait. Because these two baits were offered at the same time, the strong preference for commercial bait may have obscured the difference in preference between elaiosome bait and control bait. The collection of baits by *A. bisphaerica* in the field did not entirely match the attraction in the laboratory: there was no difference in the weight of commercial baits and elaiosome baits collected in the field, whereas the latter were more attractive in the lab. Nevertheless, the significant difference between the weight of control baits and elaiosome baits collected in the field are clear evidence for the attractiveness of elaiosome baits.

In conclusion, we present evidence that leaf-cutting ants use volatiles produced by seeds plus elaiosomes of a myrmecochoric tree to localize the seeds. These volatiles may not have been detected in previous research on the chemical composition of elaiosomes because these were mainly aimed at the analysis of fatty acids (Hughes et al, 1994). Further research should elucidate the identity of these volatiles, as well as their role in the coevolution between trees and seed-transporting ants. Moreover, these volatiles could be used in producing more effective baits for leaf-cutter ants.

### **Acknowledgements**

We thank the National Council for Research and Development (CNPq) for supporting this project in the form of scholarships. Arne Janssen was a visiting teacher supported by CAPES, Brasil (PVE). We are grateful to UNIBRÁS for providing the non-toxic commercial baits.

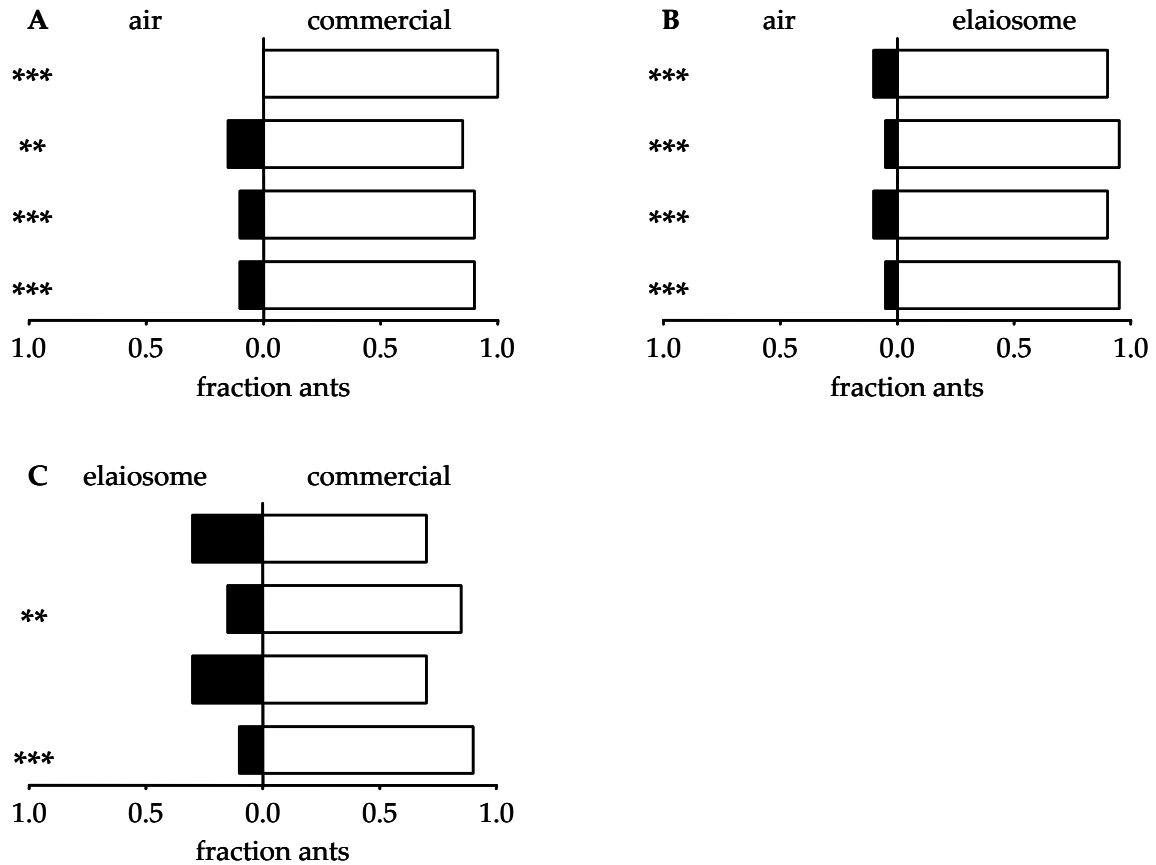
## References

- Anderson E. and Owens J. N. 2003. Analysing the reproductive biology of *Taxus*: should it be included in Coniferales? *Acta Hort.* **615**: 233-234.
- Barbosa L. C. A. 2007. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Editora UFV; Viçosa.
- Berg R. Y. 1972. Dispersal ecology of *Vancouveria* (Berberidaceae). *Amer. J. Bot.* **59**: 109-122.
- Beattie A. J. and Culver D. 1981. The guild of myrmecochores in the herbaceous flora of West Virginia Forests. *Ecology.* **62**(1): 107-115
- Boaretto M. A. C., Forte L. C., Lopes J. F. S., Nagamoto N. S., Andrade A. P. P., Moreira A. A., Viana A. E. S. and Ramos V. M. 2003. Response of the grass-cutting ant *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) to sugar and artificial sweeteners. *Scientia Agricola.* **60**(3): 505-509.
- Boaretto M. A. C. and Forti L. C. 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. Série Técnica IPEF. **11**(30): 31-46.
- Brew C. R., O'Dowd D. J. and Rae I. D. 1989. Seed dispersal by ants: behavior-releasing compounds in elaiosomes. *Oecologia.* **80**: 490-497.
- Cherrett J. M. 1972. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forests. *Journal of Animal Ecology.* **41**(3): 647-660.
- Ciccarelli D., Andreucci A. C., Pagni A. M. and Garbari F. 2005. Structure and development of the elaiosome in *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) seeds. *Flora.* **200**: 326-331.
- Daud R. D. and Feres R. J. F. 2004. O valor de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), planta nativa do Brasil, como reservatório para o predador *Euseiue citrifolius* Denmark & Muma (Acari, Phytoseiidae). *Revista Brasileira de Zoologia.* **21**(3): 453-458.
- Delabie J. H. C., Della Lucia T. M. C. and Pastre L. 2000. Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no campo. *An. Soc. Entomol. Brasil* **29**(4): 843-847.
- Della Lucia T. M. C. and Vilela E. F. 1993. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: *As formigas cortadeiras* (Della Lucia T. M. C., Ed.), Viçosa, MG. pp 163-190.
- Fischer R. C., Ölzant S. M., Wanek and Mayer V. 2005. The fate of *Corydalis cava* elaiosomes within an ant colony of *Myrmica rubra*: elaiosomes are preferentially fed to larvae. *Insectes Sociaux.* **52**: 55-62.
- Gómez C., Espadaler X. and Bass J. M. 2005. Ant behaviour and seed morphology: a missing link of myrmecochory. *Oecologia.* **146**(2): 244-246.

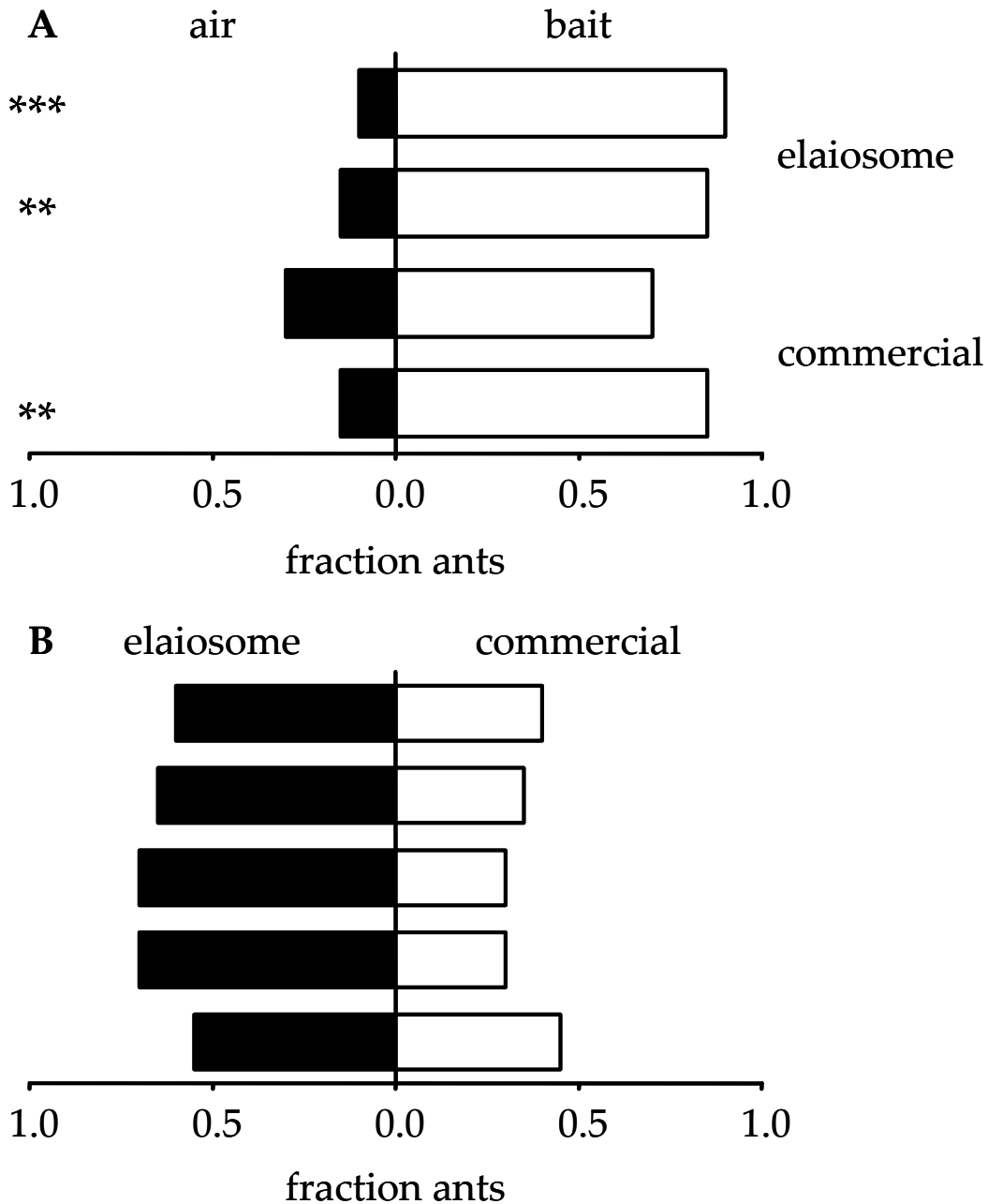
- Handel S. N. and Beattie A. J. 1990. Seed dispersal by ants. *Scientific American*. **263**: 76-83. 1990.
- Hanzawa F. M., Beattie A. J. and Culver D. C. 1988. Directed dispersal: demographic analysis of an ant-seed mutualism. *The American Naturalist*. **131**(1): 1-11.
- Hölldobler B. and Wilson E. O. 1990. *The ants*. Cambridge, Mass: The Belknap Press, Harvard University. 732pp.
- Hughes L., Westoby M. and Jurado E. 1994. Convergence of elaiosomes and insect prey: Evidence from ant foraging behaviour and fatty acid composition. *Functional Ecology*. **8**(3): 358-365.
- Janssen A. 1999. Plants with spider-mite prey attract more predatory mites than clean plants under greenhouse conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **90**:191-198.
- Kusmenoglu S., Rockwood L. L. and Gretz M. 1989. Fatty acids and diacylglycerols from elaiosomes of some ant-dispersed seeds. *Phytochemistry*. **28**(10): 2601-2602.
- Leal I. R. and Oliveira P. S. 1998. Interactions between fungus-growing ants (*Attini*), fruits and seeds in Cerrado vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica*. **30**: 170-178.
- Leal I. R., Tabarelli M. e Silva J. M. C. 2003. *Ecologia e conservação da caatinga*. Editora Universitária UFPE, Recife. 800pp.
- Lima C. A., Della Lucia T. M. C., Guedes R. N. e Veiga C. E. 2003. Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. *Neotropical Entomology*. **32**(3): 497-501.
- Lorenzi H. 2000. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, Editora Plantarum, vol. 1, 3<sup>a</sup> ed., 352pp.
- Marshall D. L., Beattie A. J. and Bollenbacher W. E. 1979. Evidence for diglycerides as attractants in an ant-seed interaction. *Journal of Chemical Ecology*. **5**(3): 335-344.
- Passo L. and Ferreira S. O. 1996. Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in Southeastern Brazil. *Biotropica*. **28**: 697-700.
- Peternelli E. F. O., Della Lucia T. M. C., Peternelli L. A., Martins S. V. and Borges E. E. L. 2003. The interaction among workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) and seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil. *Sociobiology*. **42**(3): 597-603.
- Peternelli E. F. O., Della Lucia T. M. C. and Martins S. V. 2004. Espécies de formigas que interagem com sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). *Revista Árvore* **28**(5): 733-738.
- Pizo M. A. and Oliveira P. S. 1998. Interaction between ants and seeds of a nonmyrmecochorous neotropical tree, *Cabrlea canjerana* (Meliaceae), in the Atlantic forest of Southeast Brazil. *American Journal of Botany*. **85**: 669-674.
- Pizo M.A., Passos L. and Oliveira P. S. 2004. Ants as seed dispersers of fleshy diaspores in Brazilian Atlantic forests. In: *Seed fate: Predation and secondary dispersal*. (Forget



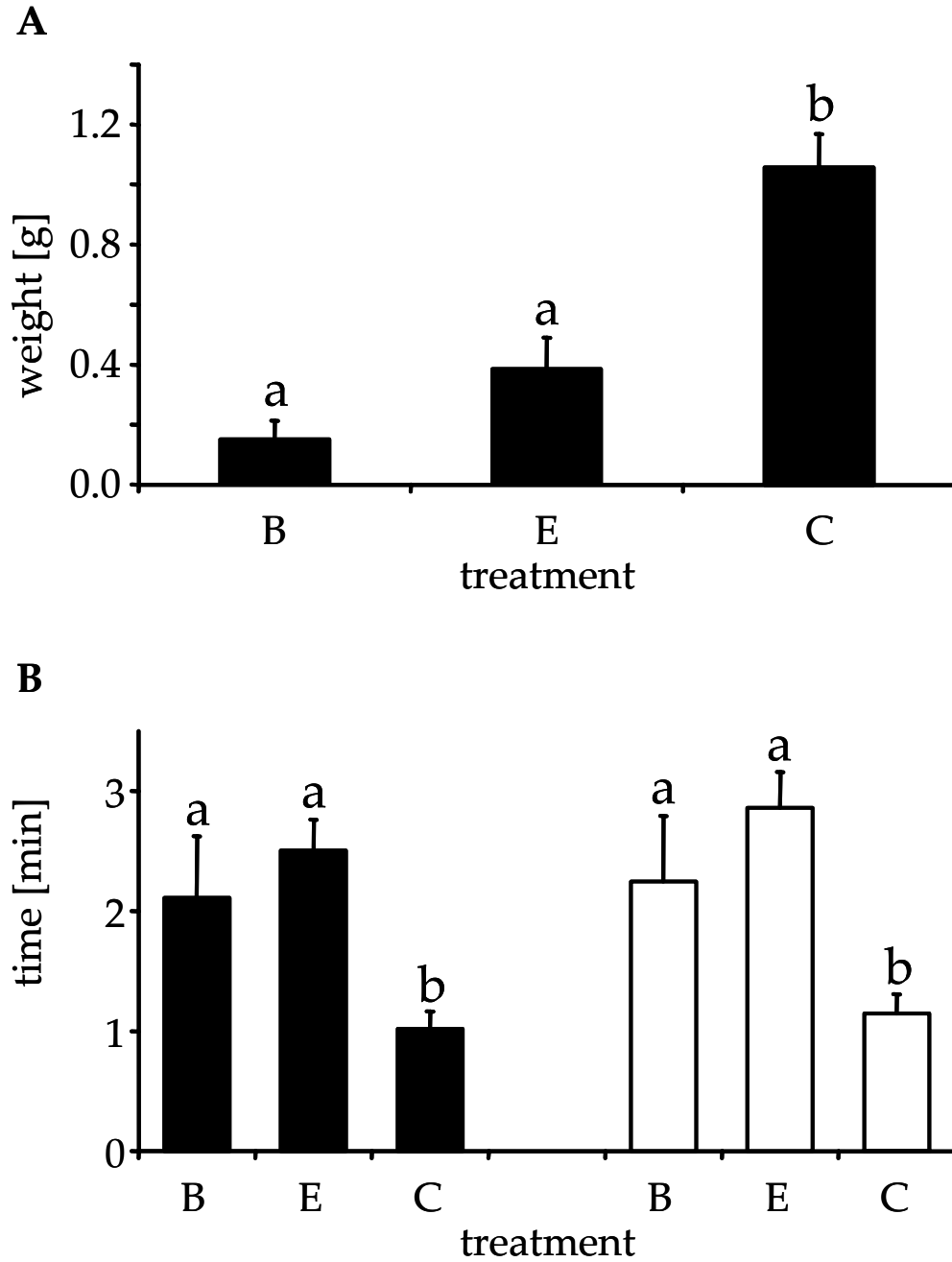
- P. M., Lambert J. E., Hulme P. E. and Vander Wall S. B., Eds.), CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. pp 315-329
- Rockwood L. L. 1976. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecology*. **57**: 48-61.
- Sabelis M. W. and van de Baan H. E. 1983. Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **33**: 303-314.
- Sheridan S. L., Iversen K. A. and Itagaki H., 1996. The role of chemical senses in seed-carrying behavior by ants: a behavioral, physiological and morphological study. *J. Insects Physiol.* **42**(2): 149-159.
- Sokal R. R. and Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*. 3rd ed. New York, USA: Freeman. 887pp.
- Soukup V. G. and Holman R. T. 1987. Fatty acids of seeds of North American *Pedicillate trillium* species. *Phytochemistry*. **26**(4): 1015-1018.



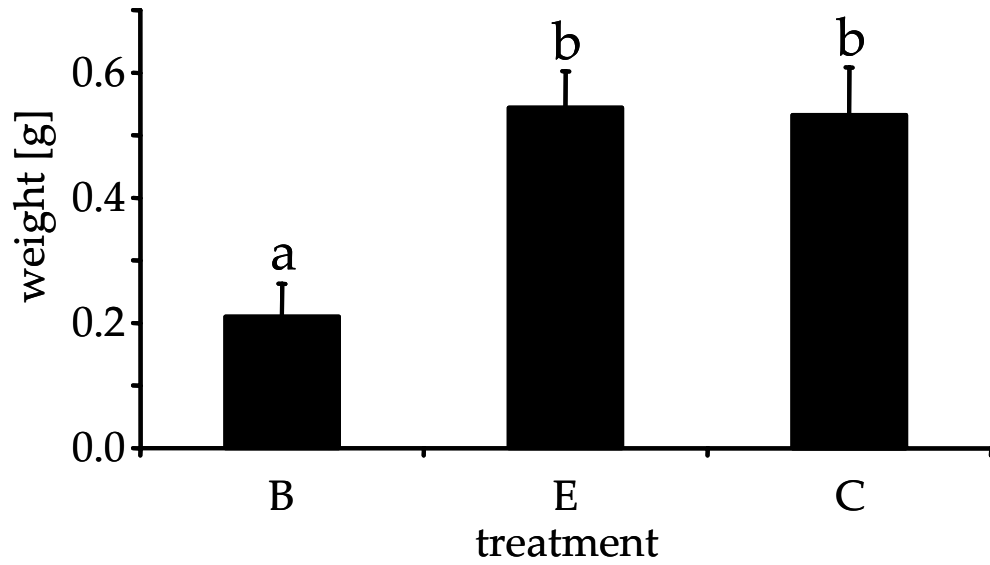
**Figure 1.** The response of workers of *Atta sexdens rubropilosa* to volatiles emanating from commercial citrus-based bait and bait prepared from elaiosomes and seeds of the tropical myrmecochorous tree *Mabea fistulifera*. **A.** Choice between air and the odours of commercial bait; **B.** Choice between air and elaiosome bait; **C.** Choice between elaiosome bait and commercial bait. Each bar represents the response in an independent replicate with 20 ant workers, asterisks next to the bars indicate significance (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.005$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ , goodness-of-fit test).



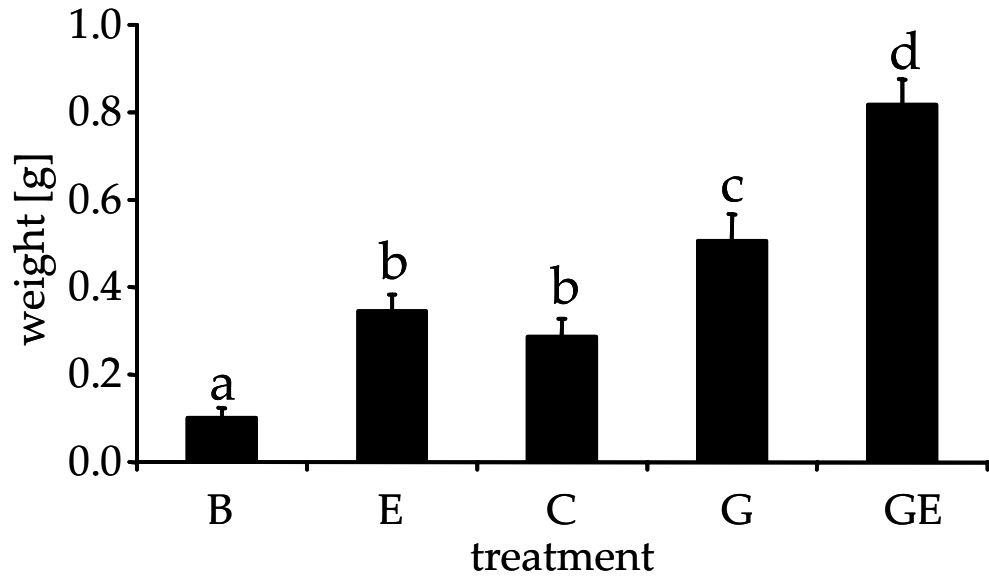
**Figure 2.** The response of workers of *Atta bisphaerica* to volatiles emanating from commercial citrus-based bait and bait prepared from elaiosomes and seeds of the tropical myrmecochorous tree *Mabea fistulifera*. **A.** Choice between air and commercial bait and choice between air and elaiosome bait; **B.** Choice between elaiosome bait and commercial bait. Asterisks next to the bars indicate significance of each replicate (\*:  $P < 0.05$ ); \*\*:  $P < 0.005$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ , goodness-of-fit test).



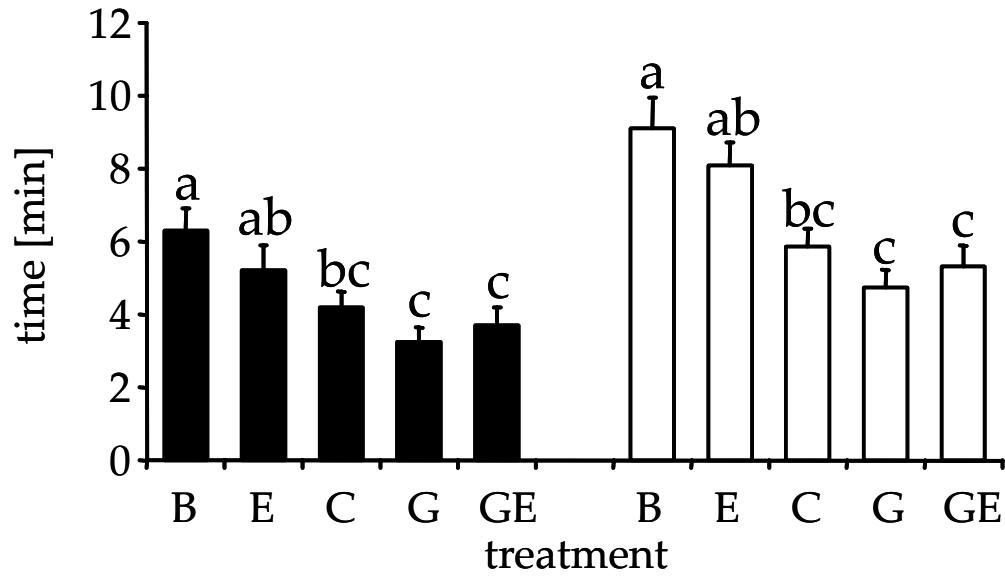
**Figure 3.** Collection of control bait (B), elaiosome bait (E) and commercial bait (C) by workers of *Atta sexdens rubropilosa*. **A.** Average weight (+ SEM) of bait transported to the nest. **B.** Average time/minutes (+ SEM) to first contact (black bars) and first bait retrieval (white bars). Averages with the same letter are not significantly different (Tukey test,  $P > 0.05$ ).



**Figure 4.** Average weight ( $\pm$  SEM) of control bait (B), elaiosome bait (E) and commercial bait (C) transported to the nest by workers of *Atta bisphaerica*. Averages with the same letter are not significantly different (Tukey test  $P > 0.05$ ).



**Figure 5.** Average weight ( $\pm$  SEM) of control bait (B), elaiosome bait (E), commercial bait (C), grass bait (G) and grass-elaiosome bait (G/E) transported to the nest by workers of *Atta bisphaerica*. Averages with the same letter are not significantly (Tukey test,  $P > 0.05$ ).



**Figure 6.** Average time/minutes ( $\pm$  SEM) to first contact and first bait retrieval of control bait (B), elaiosome bait (E), commercial bait (C), grass bait (G) and grass-elaiosome bait (G/E) by workers of *Atta bisphaerica*. First contact (black bars), and first bait retrieval (white bars). Averages with the same letter are not significantly different (Tukey test  $P < 0.05$ ).

## 4. CAPÍTULO 2

### Seed transport and removal of the elaiosome of *Mabea fistulifera* by workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)

\*<sup>1</sup>Ethel F. O. Peternelli, <sup>1</sup>Terezinha M. C. Della Lucia, <sup>2</sup>Luiz A. Peternelli, <sup>1</sup>Neliane C. Moreira.

**Abstract.** Commonly known as leaf-cutting ants, *Atta sexdens rubropilosa* can collect different parts of the plant, including fruits and seeds. When they collect whole seeds with an elaiosome they use only this appendage; later the seeds are discarded unharmed. Why do they collect the entire diaspore if only the appendage will be used? To answer this question three behavioral experiments were performed in laboratory with seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) and workers of *Atta sexdens rubropilosa*. In the first experiment free seeds were offered in the foraging arena. In the second, they were offered glued. In the third, the leaf-cutting ant workers were allowed to explore the seeds in the presence of other ant species *Pheidole* sp. (competitor) and *Solenopsis invicta* (predator) workers. The interactions between these species and the leaf-cutting ants were analyzed separately. The results indicated that leaf-cutting ant workers treated the seeds they found differently depending on how they were found. The presence of a competitor and a predator had an influence on exploring, cutting and harvesting times. Workers of *A. sexdens rubropilosa* prefer to carry out diaspores that are bearing elaiosome, even if only the appendage is their goal, because such behavior is faster, safer and more efficient, meaning a better foraging decision for them. The workers of *A. sexdens rubropilosa* did not compete for the seeds with other species in this study. The removal of the elaiosome from the seeds is done essentially, by small workers inside the colony.

**Key Words** – *Atta sexdens rubropilosa*, elaiosome, *Mabea fistulifera*, myrmecochory, seed dispersal

---

\* <sup>1</sup>Departamento de Biologia Animal - Entomologia. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Informática - Estatística. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brazil

**Correspondence:** Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli, Departamento de Biologia Animal - Setor Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil. Tel: +55 31 3899 2915; Fax: +55 31 3899 4012. E-mail: [epeternelli@yahoo.com](mailto:epeternelli@yahoo.com)



## Introduction

Seed dispersal by ant (myrmecochory) is a mutualism between ants and plants observed in different ecosystems. In this interaction the plants benefit by their seed dispersal and the ants benefit by food obtaining. Myrmecochorous plants possess seeds coated with appendage (elaiosome) rich in lipids, proteins that attract many species of ants (Handel and Beattie, 1990).

Even fungus growing ants (Attini), traditionally regarded as plant pests, have been recorded removing seeds with elaiosome (Dalling and Wirth 1998; Pizo and Oliveira, 1998, Peternelli et al, 2004).

Leaf-cutting ants are often involved as a secondary dispersal agent of seeds (Passos and Oliveira 2004). Once a seed leaves the parent plant, its movement to a germination site can be seen as the result of two phases in dispersal. The first phase, primary dispersal is the movement of a seed from the maternal plant to the ground by gravity. The second phase, secondary dispersal is the movement of seeds after they have fallen to the ground. This second phase may be mediated by wind, animal and water (Griffith and Forseth, 2002). According to Passos and Oliveira (2004), the secondary removal by leaf-cutting ants promote the same benefits to the plants as primary dispersal, such as avoiding intraspecific competition, when the seed is moved away from the parent plant, and reducing interspecific competition (Handel and Beattie 1990). Apart from, this relocation of seeds by leaf-cutting ants to the inside of their nests or areas close to them, they protect the diaspore (seed-elaiosome) against fire, predators. They also benefit seed germination (Peternelli et al. 2003), since the colony area is a moist and nutrient-rich place. According to Pizo et al. (2004), the tropical forest soil, where the environment is moist, should be the place where greater contribution of leaf-cutting ants to plants in the myrmecochory process is observed. This contribution includes reduction in fungus infestation on the seeds whose elaiosomes were removed by these insects. Despite the benefits of this mutualism to the plant, few studies have investigated its advantage to the leaf-cutting ants, as for example, how important is seed collection for *Atta* diet? Other species of ants, as *Aphaenogaster rudis* for example, have their sex investment ratio increased, when elaiosomes are added to the queen's diet (Bono and Heithaus 2002). Fischer et al. (2005) also verified that elaiosomes have an important role in the life cycle

of ants in temperate areas, because they are used as a food resource for larvae of *Myrmica rubra*, for instance.

During the foraging activity, leaf-cutting ants have foraging decisions to make and many different behaviors to obtain their fungus substrate (Lewis et al. 1974; Forti et al. 1984). According to Lewis et al. (1974) and Forti et al. (1984), the foraging activities by these ants are characterized by selection, cut and transport of the vegetal material to the interior of the nest. During this task these insects are selective, and some species of plants can be free from attacks. As others animals, these insects also may have behavioral traits which minimize the energetic or time cost of foraging. They may also have morphological features which physically determine the maximum size of the food item they can retrieve, and the speed with which they can retrieve an item of a given size. Additionally, other factors such as intraspecific competition, risk of predation, distance to food patches, and knowledge about food can influence the preference in the plant choice (Hubbell and Wiemer, 1983).

Several questions may be addressed about the behavior of these insects when they collect seeds as in the myrmecochory phenomena. During their foraging activity, mainly in the dry season in the tropical forests and in arid areas, when fresh leaves are scarce, many kinds of seeds are found by leaf-cutting ants (Leal and Oliveira 1998; Pizo and Oliveira 2000), but those that have elaiosome or came from fruits that have pulp are the most manipulated and transported (Peternelli et al. 2001). According to Pizo et al. (2004), the behavior of finding and carrying out seeds is strongly influenced by diaspore traits such as size. When found, the smallest and medium seeds are carried inside the nest where the elaiosomes are removed. The clean seeds are taken out of the nest, and then discarded unharmed (Dalling and Wirth 1998; Leal and Oliveira 1998; Peternelli et al. 2003). The biggest and heavy seeds, that are difficult to be transported, have their pulp removed at the site where the seed is found or abandoned by external interference. It would be interesting, in this case, to investigate some of the factors responsible for seeds that are abandoned (Pizo and Oliveira 2001; Pizo et al. 2004).

It is curious, as mentioned above, that leaf-cutting ants transport the entire diaspore (seed-elaiosome), but they just use the elaiosome as fungus substrate. Other ant species also have this same behavior when they find seeds, as for example, of the genus

*Pheidole*, *Odontomachus* and *Pachycondyla* (Passos and Oliveira, 2004). This fact can be seen as an obvious event, but it has never have been investigated before. In the field, workers expend energy transporting and collecting the entire seeds of different sizes. Thus, the purpose of this work was to answer the following questions: why do workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* carry the entire diaspore if only the elaiosome will be used? Is it beneficial to the colony that the harvesting is that way? Why do they not collect only the appendage?

## Methods

### Study Insects

Colonies of *A. sexdens rubropilosa* and of *Solenopsis invicta* and adult workers of *Pheidole* sp. were used in the behavioral experiments.

We worked with colonies of *A. sexdens rubropilosa*, with approximately twelve months of age and fungus garden volume of about 5.5 liters, kept in laboratory (Insectary of the Animal Biology Department of the Federal University of Viçosa, MG, Brazil - 20° 45' S and 42° 55' W) under controlled temperature of  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$  and humidity of  $75 \pm 5\%$ . They were maintained according to rearing procedures described by Della Lucia et al. (1993). They were supplied daily with leaves of *Acalifa wilkesiana* and *Ligustrum vulgare*.

As we planned to work with two other species that could have direct interaction with the workers of the leaf-cutting ants, when they were manipulating the seeds, we chose, a species considered a predator, *Solenopsis invicta* and a competitor, *Pheidole* sp. These species are chose because, in field, the *S. invicta* are all aggressive with any species that try collect seeds and *Pheidole* are not aggressive but they are efficient seed collector. The polygynous colonies of *S. invicta* were collected using a methodology adapted and modified from Burns et al. (2005). The colonies were placed in large trays (52 cm long; 39 cm wide; 7.5 cm deep) with inner sides coated with Fluon<sup>®</sup> (ICI Americas, Inc. Exton, PA) to prevent ants from escaping. Nest cells consisted of a bamboo tube (20 cm length and 1.5 cm diameter) and were supplied with *Tenebrio molitor* larvae and a cotton ball moistened by a sweet solution prepared with honey diluted in water.

Due to difficulties maintaining *Pheidole* sp colonies in the laboratory, the workers and soldiers of this species were collected in the field with bamboo tube traps (approximately 20 cm in length and 1.5 cm in diameter). In one end of the tube a piece of sardine was placed. Ten traps were distributed in the field for 24 hours. After this, the traps were brought to the laboratory; the ants were identified and immediately used in the behavioral tests.

### Seeds

Fresh seeds of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), a typical pioneer species in forest edges and disturbed areas of Viçosa, MG were used. The seeds, approximately 1 cm in size (seed-elaiosome), were manually collected during the fruit maturation period between September and November. Seeds were refrigerated at 4<sup>0</sup>C for at least four weeks before being used in the tests, to maintain freshness so that they would remain attractive to the ants (Bono and Heithaus 2002).

### **Behavioral Experiments**

Three behavioral experiments were carried out in the laboratory. In the first, the behavior of leaf-cutting ant workers was observed when free seeds-elaiosome were offered in the foraging arena, so that workers could carry the entire seed or only the elaiosome. In the second, the seeds-elaiosome were glued to the arena, so that, only the elaiosome could be carried. The workers behavior towards these seeds was observed, as for example, how the workers treated the seeds in both situations, free and glued seeds. In the third experiment the interaction between the *A. sexdens rubropilosa* workers and the seeds-elaiosome in the presence of a competitor ant species (*Pheidole* sp.) and a predator species (*S. invicta*) was verified.

#### **Behavioral Experiment 1 – Offering Free Seeds**

Five colonies of leaf-cutting ants, with approximately 5.5 L of fungi each, were used. A total of 80 seeds of *M. fistulifera* were distributed in two plastic containers of 14 cm diameter and were offered to the colonies. In each container, 40 fresh seeds were placed. A foraging arena was assembled 90 cm away from the nest entrance, where the two containers with seeds were placed. Twenty workers were individually observed interacting with the seeds. The following parameters were measured: seed exploration time (ET, in minutes); entire seed transportation time, which means seed-elaiosome (TT, in seconds) and head capsule width of workers that removed the seeds (CC, in millimeters). Also, the behavior of each worker that had any interaction with the seeds was observed.

The behavioral experiment was finished when all seeds were removed from the plastic containers. At the end of each test, the time the seeds remained inside the colony

to complete elaiosome removal was estimated. To do this, the time between the ending of the test and the moment in which the seeds started to be returned to the pile area or to the nest arena without the elaiosome was observed.

### **Behavioral Experiment 2 – Offering the Glued Seeds**

As all free seeds were transported to the nest interior, we decided to make the foraging decision of the ants more difficult, to observe different strategies of seed collecting or seed abandonment.

The same methodology of behavioral experiment 1 was used, except that in this case the seeds were glued on the plastic container, leaving the elaiosome of each seed exposed. Thus, the elaiosome had to be removed from the seeds at the arena; the entire seed could not be transported to the colony, where the elaiosome is usually removed.

Previous tests with different types of glues were performed with the ants before we decided to use temp-glue. During the tests this glue did not show any interference in the ant's activity. In this way the seeds were glued with adhesive tech-high temp-glue and were allowed to dry for 30 min before being offered to the ants. The following parameters were measured, during observations of 20 workers individually, that interacted with the glued seeds: seed exploration time (ET, in minutes), cutting time of the entire elaiosome and/or fragments (CTE; CTF, in minutes), transportation time of the entire elaiosome or fragments of this material (TTE; TTF, in seconds) and head capsule width of the workers that interacted with the seeds (CC, in millimeters). The exploration time was measured while the workers were walking over the seeds and examining them with their antennae and legs. The exploration time ended when these workers tried to remove and cut the elaiosome. The behavior of the workers during their interaction with the seeds was observed and registered. This behavioral experiment ended when all seeds had their elaiosome totally removed.

### **Behavioral Experiment 3 - Interactions: *Atta sexdens rubropilosa* vs. *Pheidole* sp. and *Atta sexdens rubropilosa* vs. *Solenopsis invicta***

In this behavioral experiment, workers of the five colonies of the *S. invicta* and workers and soldiers of *Pheidole* sp. were used. The groups of workers of *Pheidole* sp.

were used in the behavioral experiment immediately after their collection and were discarded after the test.

A foraging area with three arenas was assembled; the seeds were placed at the central one. Attached to the left side of the central arena, there was a second arena, where *Pheidole* sp. or *S. invicta* workers were released, and to its right side, a third arena was connected, where the colonies of *A. sexdens rubropilosa* were placed.

After adding the seeds to the central arena and releasing the *A. sexdens rubropilosa* workers, the tests and the observations began. The exploration time was recorded as soon as they found the seeds. During the time of exploration, the workers of *Pheidole* sp. or *S. invicta* were released, by connecting the separation between the two arenas, allowing free access of these insects to the seeds. With the arrival of new species in the central arena, a new exploration time of the seeds by workers of the leaf-cutting ants was observed. At this moment, the interactions of the two ant species between themselves and with the seeds were observed.

During these encounters the aggressive degree was evaluated by the following aggression index: 0 – if no aggressive interaction occurred; 1 – opening mandibles and abdomen flexions; 2 – bites; 3 – mutilations and 4 – death.

As in the other behavioral experiment, 80 fresh seeds were offered in each test and 20 workers of *A. sexdens rubropilosa* were observed in each of the five colonies.

### **Statistical Analysis**

Each behavioral experiment was repeated five times. Five similar colonies of *A. sexdens rubropilosa* were used. For the parameters evaluated the data measured from each group of twenty workers were reduced to group means to be used on the posterior analyses, since there was no interest on measuring the among-individual variation. The resulting data were initially analyzed using descriptive statistics techniques. The comparisons between averages, when possible, were performed using Student t-Test (Steel et al. 1997).

## **Results**

### **Behavioral experiment 1 – Offering free seeds**

The exploration behavior consisted of the workers walking on the seeds and touching them with the antennae, essentially on the elaiosome area. The average exploration time was  $1.62 \pm 0.08$  minutes (mean  $\pm$  SD).

After exploration, the seeds were easily apprehended by the portion connecting the elaiosome with the seed body. Next, they were transported inside the nest or left at the entrance, and later, they were collected by other workers and carried inside the nest. The average time to transport the entire seeds for the five colonies was  $0.74 \pm 0.06$  minutes (mean  $\pm$  SD). The time needed to do this behavioral experiment was approximately 50 minutes for each colony, meaning that the colonies spent less than one hour to transport all of the entire seeds offered on the arena.

Ten hours after the end of this behavioral experiment the first seeds without elaiosome appeared back on the foraging arena or refuse pile of the colonies. Twenty-four hours after the experiment, the majority of seeds were seen outside the nest, without the appendage.

No minor workers were seen collecting outside the nest. We observed medium (1.75 to 2.40 mm) and large (2.55 to 4.00 mm) workers interacting and transporting the seeds.

### **Behavioral experiment 2 – Offering the glued seeds**

During the exploration, the ants were observed walking on the seeds; the same behavior had been seen in behavioral experiment 1. The measurement of the exploration time ended when the ants tried to remove the seeds or the elaiosomes, grasping at the connection between the appendage and the seeds with their mandibles. On average, the five colonies spent  $3.65 \pm 0.17$  min (mean  $\pm$  SD) exploring the glued seeds that were placed in the arena. The average exploration time with free seeds experiments ( $1.62 \pm 0.08$  minutes, mean  $\pm$  SD; Table 1), was significantly smaller ( $t = 23.21$ ,  $df = 8$ ,  $P < 0.001$ ), compared to the same behavior when the seeds were glued ( $3.65 \pm 0.17$  minutes, mean  $\pm$  SD; Table 1).



After exploring the seeds the worker started cutting the elaiosome in different ways. During this task the workers put their legs on the seeds and cut the appendage with their mandibles. It was observed that the majority of the larger workers and some media cut off the entire appendage, while the minors and the majority of the media cut fragments of it. The workers that cut the entire elaiosome spent on average, for the five nests,  $23.86 \pm 4.06$  min (mean  $\pm$  SD) to do this task; on the other hand, those that cut elaiosome fragments spent, on average,  $6.7 \pm 1.16$  min (mean  $\pm$  SD) (Table 1) in this activity.

Both behaviors of cutting and transporting exhibited much variation among the workers. Many times the large workers that cut the entire elaiosome did not transport it to the nest. They left the elaiosome on the arena and went to work with other seeds, while another smaller worker was in charge of transporting this cut material. It was observed also that, after the appendage was removed, some ants came back to the seeds that were being manipulated before and performed a scarification behavior on the elaiosome residue left on the seed. Most of the times, the minor and media workers were responsible for taking the entire elaiosome or fragments of it inside the colony. Sometimes these ants left this cut material at the entrance, and other workers took the appendage inside the nest. The average time spent to transport the entire elaiosome or fragments was about 23 seconds.

The colonies spent, on average,  $3.91 \pm 0.74$  hours (mean  $\pm$  SD) to remove the elaiosome of all glued seeds. It should be emphasized that, during the observation, other workers interacting with seeds exposed on the arena were not being observed. This procedure was performed in order to get data with a minimum of interference in the active colonies.

It was also observed, that after the elaiosomes had been removed, the seeds were ignored by the ants, and they were not further explored by any other worker.

In this second behavioral experiment minors (0.95 to 1.55 mm), medium (1.75 to 2.40 mm) and large (2.55 to 4.00 mm) workers were observed interacting with the seeds that were glued.

### **Behavioral experiment 3 - Interaction: *Atta sexdens rubropilosa* vs. *Pheidole* sp. and *Atta sexdens rubropilosa* vs. *Solenopsis invicta***

Before releasing the workers of *Pheidole* sp., *A. sexdens rubropilosa* workers spent on average  $1.30 \pm 0.27$  min (mean  $\pm$  SD) exploring the seeds and after the arrival of this invasive species the time increased to  $3.01 \pm 0.11$  min (mean  $\pm$  SD).

With the beginning of seed transportation by the workers of *A. sexdens rubropilosa* and with the release of *Pheidole* sp. on the foraging arena, it was observed that the encounters between those two species were accidental, without aggressive reaction. During these accidental encounters a light antennal touch that lasted less than one second was observed, followed by the two individuals quickly moving away from each other.

The workers of *Pheidole* sp. always searched for seeds not being manipulated by other species and vice-versa. Individuals of both *A. sexdens rubropilosa* and *Pheidole* sp. that were manipulating the seeds were not attacked or taken away from the seeds. They continued their activity of exploring and transporting without difficulty. The seeds found by *Pheidole* sp. were always manipulated and removed by many workers, including soldiers.

No seeds that were being transported by workers of *A. sexdens rubropilosa* were abandoned due to the presence of workers of *Pheidole* sp. However, a smaller number of seeds were taken inside the nest of *A. sexdens rubropilosa*, compared with behavioral experiment 1. This occurred because the workers of *A. sexdens rubropilosa* had to share seeds on the arena. On average, for each colony tested, the leaf-cutting ants transported  $17 \pm 0.70$  (mean  $\pm$  SD) seeds of those 20 observed, while in behavioral experiment 1 all seeds found were collected. Total time duration of behavioral experiment 3, with *Pheidole* sp. presence, was about 82 min.

In the second interaction evaluated, between *A. sexdens rubropilosa* and *S. invicta*, it was observed that leaf-cutting ant workers spent on average  $1.51 \pm 0.02$  min (mean  $\pm$  SD) exploring the seed before the release of *S. invicta* workers. After the entrance of this species at the arena, this time increased to  $3.68 \pm 0.25$  min (mean  $\pm$  SD).

After arriving at the foraging arena, where many workers of *Atta* were exploring and transporting seeds, the *S. invicta* workers spread quickly and promoted constant

attacks when they encountered leaf-cutting ants. The majority of attacks were bites, even resulting in leaf-cutting workers death (Figure 1). The attacks were directed either to workers that were walking on the arena or exploring seeds, as well as to those that were already manipulating and transporting seeds. Attacks from the leaf-cutting ant workers against *S. invicta* workers were not observed at any moment.

When *S. invicta* were close to *A. sexdens rubropilosa* workers, they usually performed abdomen flexion and mandible opening behaviors. After this, the *A. sexdens rubropilosa* workers were always attacked with bites and those that could not get away, often the smaller ones were always immobilized, when many *S. invicta* workers came out to attack. Many times these attacks caused the death of leaf-cutting ants. No *A. sexdens rubropilosa* workers were mutilated (Figure 1).

Often, when leaf-cutting ant workers were attacked or had a first contact with *S. invicta*, they ran away from the arena leaving seeds behind and going back to their nests.

With the frequent attacks by *S. invicta* workers, the leaf-cutting ants quit exploring and carrying seeds. Because of this, it was impossible to measure the seed transportation time, since all seeds were abandoned before reaching the nest.

*Solenopsis invicta* workers did not remove seeds at any moment; they aggregated and seemed to suck the elaiosome at the site where seeds were found.

## Discussion

In ants, foraging behavior does not only include the collection of food but also the transmission of information about its location and quality (Hölldobler and Wilson, 1990), and it is affected by many abiotic and biotic aspects, as temperature, humidity, competition etc. According to those authors the foraging behavior can be adapted to maximize the return on their investment in time and energy when foraging for food. Our results demonstrated that the workers of *A. sexdens rubropilosa* instantly collected all free seeds, while, the same workers demonstrated complex behaviors to collect the elaiosome in glued seeds and in the presence of a competitor and predator ant species.

In these three experiments the elaiosome attached to the seeds was the ultimate goal of workers. This was evident, when the first two behavioral experiments were compared; there was an increase of the exploration time and an increase in complexity of the behavior of the forager caste in the second behavioral experiment (glued seed). In the glued seeds, the exploration time was greater, indicating that a better inspection was necessary to evaluate the importance of the exploration of this resource (elaiosome) by foraging workers. Also because seeds could not be removed, we have seen that the colony used minors, media and large workers as foragers to collect the elaiosome, while in behavioral experiment 1 (free seeds on arena), only media and large workers were recruited. We have clearly seen an addition of one more caste in the foraging activity in behavioral experiment 2. Maybe this is the reason why the ants have spent greater time in the exploration process of the resource found. It is known that the minors in leaf-cutting ants are responsible for the care of the offspring, hyphae, implantation of fungus substrate and also they are seen “hitchhiking” with forager workers. We believe that the presence of minor workers in the experiment 2, is more related to nutritional and food quality aspects, since they are responsible by cutting of the elaiosome inside the nest. Future investigation should be set out for more details about this.

It is known that among leaf-cutting ant species there are different strategies and decisions to obtain success during foraging, depending on the necessity of the colony. As for example, when Wetterer (1995) compared foraging activity between *Atta colombica* and *Atta cephalotes*, he observed that to explore the available resources to a great extent, *A. colombica* used a great variation of worker sizes during its foraging activity; the same

was not observed in *A. cephalotes* colonies. Probably this was associated with the food resource being explored. In a field environment, these workers will be prone to predator attack and competition, besides the exposition to environmental changes such as temperature, humidity, pressure etc. All those factors can affect survivorship and efficiency of workers that leave the colony to search for food (Traniello 1989).

The results present evidence that the removal of the elaiosome outside the colony demands a greater number of workers, and also the presence of minor workers. However, when this appendage was removed inside the colony, possibly a smaller number of individuals of the minima were involved in this activity. This was evident, because the permanence time of seeds inside the nest was at least 10 hours and only after this time the first seeds without elaiosome started to appear on the arena. According to Wetterer (1992), working with *Acromyrmex octospinosus* and Wetterer (1993), working with *Acromyrmex volcanus*, the gardeners with a head capsule of approximately 1.4 mm, as well as the youngest ones, stay inside the colony. The largest ones, with 2.2 mm of head capsule width and the oldest can leave the colony to forage. Besides the matter of security, transportation of entire seeds by the foragers guarantees that same number of seeds get to the colony with a smaller exploration and transportation times. This suggests that later the colony would still have free time to go back and get more seeds. In this study, leaf-cutting ants showed different foraging behaviors and decision to obtain seeds, as was demonstrated by Morehead and Feener, Jr (1998) in their study with harvester ants of the genus, *Pogonomyrmex*. These ant species have foraging strategies which minimize the time costs of traveling with seeds, supporting previous work which showed that time cost is most important in seed selection for *Pogonomyrmex*.

When leaf-cutting ants were exposed to a competitor, *Pheidole* sp. and a predator, *S. invicta* workers, the expectation was that the exploration time of the seeds by the leaf cutting workers would decrease, however the results found showed the contrary. In both situations this exploration time increased. This might have occurred because, during the measuring of this exploration time, workers of leaf-cutting ants temporarily stopped exploration with the approximation of the other species and only resumed the exploration behavior after the invader moved away.

Besides the interference in exploration time, the presence of workers of *Pheidole* sp., in the arena, also interfered in the total time of transporting seeds to the colony, and in the number of seeds transported. The workers of leaf-cutting ants spent more time to remove fewer seeds, compared with the results obtained in behavioral experiment 1. The aggressiveness of *S. invicta* impeded that the leaf-cutting ants collected and transported seeds to their colony. The presence of these two species during the foraging activity of the leaf-cutting ants demonstrated that to guarantee the possession of the resource, speed and efficiency in choice, in capture and in transport of the resource found is necessary.

The experimental results demonstrate that this speed and efficiency occur when seeds with elaiosome are entirely transported inside the colony. Therefore, an effort to get all entire seeds to the colony, and not only the elaiosomes, guarantees that the colony collects more seeds in less time. Also, this strategy avoids the exposure of more kinds of castes to the environmental conditions outside. Finding, capturing and transporting quickly the seeds with elaiosome allow safety for workers when they encounter predators, competitors and other adverse abiotic factors. It is evident that seeds found were manipulated differently by foragers in the different conditions in which they were found.

In conclusion, workers of leaf-cutting ants, in this case, *A. sexdens rubropilosa*, carried all seeds that contained elaiosome, even if only the appendage was their interest, because this behavior was more efficient and faster, what means a better foraging decision for them. Small ants were not exposed to external factors when the removal of the elaiosome was done inside the nest, since minors workers are responsible for this task in that situation. The workers of *A. sexdens rubropilosa* did not dispute seeds with other species, either a competitor or a predator.

## **Acknowledgments**

Financial support was provided by a doctoral fellowship and by researcher scholarships from the Brazilian Researcher Council (CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). We thank Dr. Arne Janssen for his helpful comments and suggestions on the experiments. We thank Dr. Mariana Vilhena and Dr. Simon Elliot for valuable comments and English assistance in manuscript preparation.

## References

- Bono, J. M. and Heithaus, E. R. (2002). Sex ratios and the distribution of elaiosomes in colonies of the ant, *Aphaenogaster rudis*. *Insectes Sociaux*. 49: 320-325.
- Burns, S. N., Vander Meer, R. K and Tea, P. E. A. (2005). The effect of age and social environment on dealation in *Solenopsis invicta* (hymenoptera: Formicidae) female alates. *Florida Entomologist*. 88(4): 452-457.
- Dalling, J. W. and Wirth, R. (1998). Dispersal of *Miconia argentea* seeds by the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Journal of Tropical Ecology*. 14: 705-710.
- Della Lucia, T. M. C. (1993). As formigas cortadeiras. Viçosa, Folha de Viçosa, ed.
- Fischer, R. C., Olzant, S. M., Wanek, W. and Mayer, V. (2005). The fate of *Corydalis cava* elaiosomes within an ant colony of *Myrmica rubra*: elaiosomes are preferentially fed to larvae. *Insectes Sociaux*. 52: 55-62.
- Forti, L. C., Silveira Neto, S. and Pereira-da-Silva, V. (1984). Atividade forrageira de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae): fluxo e velocidade dos indivíduos na trilha, caracterização dos indivíduos forrageiros e duração e número de jornadas de coleta de vegetais. *Rev. Bras. Entomol.* 28: 275: 284.
- Griffith, A. B. and Forseth, I. N. (2002). Primary and secondary seed dispersal of a rare, tidal, wetland annual, *Aeschynomene virginica*. *Wetlands*. 22(4): 696-704.
- Handel, S. N. and Beattie, A. J. (1990). Seed dispersal by ants. *Scientific American*. 263: 76-83.
- Hölldobler, B. and Wilson, E. O. (1990). The ants. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press.
- Hubbell, S.P. and Wiemer, F. (1983). Host plant selection by an attine ant. In: Jaisson, P. (ed.). *Social insects in the tropics*, 2: 133-154.
- Leal, I. R. and Oliveira, P. S. (1998). Interactions between fungus-growing ants (Attini), fruits and seeds in cerrado vegetation in southeast Brazil. *Biotropica*. 30: 170-178.
- Lewis, T. Pollard, G. V. and Dibley, G. C. (1974). Rhythmic foraging in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Attini). *J. Anim. Ecol.* 43: 129-141.
- Morehead, S. A. and Feerner, Jr., D. H. (1998). Foraging behavior and morphology: seed selection in the harvester ant genus, *Pogonomyrmex*. *Oecologia*. 114: 548-555.
- Passos, L. and Oliveira, P. S. (2004). Interaction between ants and fruits of *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) in a Brazilian sandy plain rainforest: ant effects on seeds and seedlings. *Oecologia*. 139: 376-382.
- Peternelli, E. F.O.; Della Lucia, M. T. C; Martins, S. V. (2004). Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). *Revista Árvore*. 28(5): 733-738.
- Peternelli, E. F. O., Della Lucia, T. M. C., Peternelli, L. A., Martins, S. V. and Borges, E. E. (2003). The interaction among workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex*



(Hymenoptera: Formicidae) and seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil. *Sociobiology*. 42 (3): 597-603.

Peternelli, E. F. O., Della Lucia, T. M. C. and Borges, E. E. (2001). Mirmecocoria – Dispersão de sementes por formigas. *Folha Florestal*. 100: 17-18.

Pizo, M. A., Passos, L. and Oliveira, P. S. (2004). Ants as seed dispersers of fleshy diaspores in Brazilian Atlantic forests. In Forget, P. M., Lambert, J. E., Hulme, P. E. and Vander Wall, S. B. (ed.), *Seed fate: Predation and secondary dispersal*: CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp 315-329.

Pizo, M. A. and Oliveira, P. S. (2001). Size and lipid content of nonmyrmecochorous diaspores: effects on the interaction with litter-foraging ants in the Atlantic rain forest of Brazil. *Plant Ecology*. 157: 37-52.

Pizo, M. O. and Oliveira, P. S. (2000). The use of fruits and seeds by ants in the Atlantic Forest of southeast Brazil. *Biotropica*. 32(4b): 851-861.

Pizo, M. A. and Oliveira, P. S. (1998). Interaction between ants and seeds of a nonmyrmecochorous neotropical tree, *Cabralea canjerana* (Meliaceae), in the Atlantic forest of Southeast Brazil. *American Journal of Botanic*. 85: 669-674.

Steel, R. G. D.; Torrie, J. H. and Dickey, D. A. (1997). *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Companies.

Traniello, J. F. A. (1989). Foraging strategies of ants. *Ann. Rev. Entomol*. 34: 191-210.

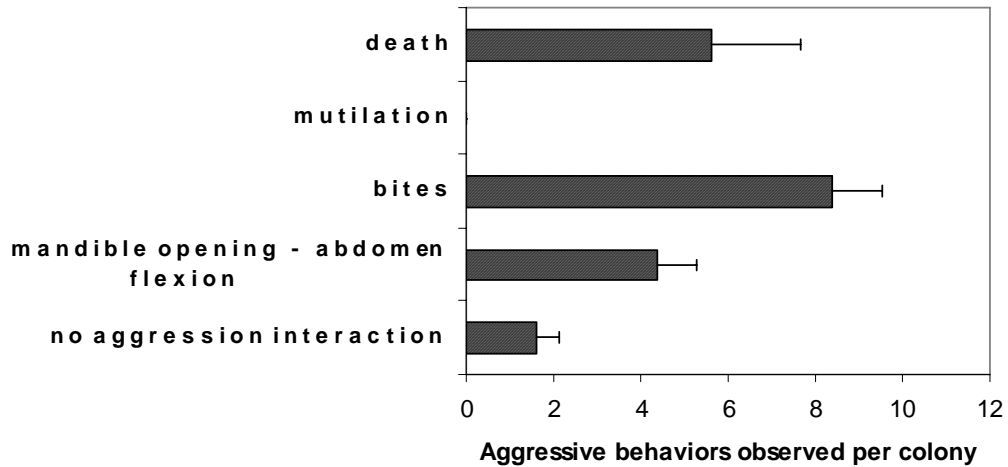
Wetterer, J. K. (1995). Foraging polymorphism and foraging ecology in the leaf-cutting ant, *Atta colombica*. *Psyche*. 102: 131-145.

Wetterer, J. K. (1993). Foraging and nesting ecology of a Costa Rica leaf-cutting ant, *Acromyrmex volcanus*. *Psyche*. 100: 65-76.

Wetterer, J. K. (1992). Foraging ecology of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex octopinosus* in a Costa Rica rain forest. *Psyche*. 98: 361-371.

**Table 1** – Comparing behavioral experiment 1 (free seeds) with behavioral experiment 2 (glued seeds)

Behavioral experiment	Exploration time (min)	Cutting elaiosome (min)		Transporting (min)		
		fragments	entire	Fragment elaiosome	Entire elaiosome	Seed - elaiosome
Free seeds	1.62 ± 0.08					0.74 ± 0.06
Glued seeds	3.65 ± 0.17	6.7 ± 1.16	23.86 ± 4.06	0.39 ± 0.023	0.36 ± 0.05	



**Figure 1** – Behavioral Experiment 3 – Average numbers ( $\pm$  SD) of occurrences of different levels of aggressiveness between workers of *Atta sexdens rubropilosa* and *Solenopsis invicta*, during the manipulation of *Mabea fistulifera* seeds in laboratory. The averages were obtained from the number of occurrences in each category, in five colonies of *Atta sexdens rubropilosa*.

## 5. CAPÍTULO 3

### **Taxa de remoção de sementes por formigas em ambientes Tropical e Temperado: habitat de floresta secundária e campo abandonado**

Ethel F. O. Peternelli<sup>1\*</sup>, Terezinha M. C. Della Lucia<sup>1</sup>, Luiz A. Peternelli<sup>2</sup>, Ivette Perfecto<sup>3</sup>, Sebastião Venâncio Martins<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, Departamento de Biologia Animal-Entomologia. E-mail: [epeternelli@yahoo.com](mailto:epeternelli@yahoo.com), [tdlucia@ufv.br](mailto:tdlucia@ufv.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, Departamento de Informática-Estatística. E-mail: [peternelli@dpi.ufv.br](mailto:peternelli@dpi.ufv.br)

<sup>3</sup>University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA. School of natural resource and environment. E-mail: [perfecto@umich.edu](mailto:perfecto@umich.edu)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Departamento de Engenharia Florestal. E-mail: [venancio@ufv.br](mailto:venancio@ufv.br)

**Resumo:** Em ambientes tropicais e temperados é freqüente o abandono de áreas agropastoris. A regeneração natural dessas áreas é dependente de aspectos bióticos e abióticos. Invertebrados, como as formigas, são importantes nesse processo de regeneração, pois transportam e limpam as sementes, promovendo o restabelecimento de vários grupos de plantas. Neste trabalho, objetivou-se responder as seguintes questões: (1) quais são as espécies de formigas encontradas com as sementes? (2) Como esses insetos se comportam em relação às sementes? (3) As formigas dispersam mais sementes na floresta do que o fazem em pasto abandonado? (4) As formigas removem mais sementes do que vertebrados na floresta e no pasto abandonado? E (5) a taxa de remoção das sementes pode ser influenciada pelo período do dia (dia-noite)? Os experimentos foram conduzidos em ambiente tropical e temperado em dois habitats, floresta secundária e pasto abandonado. Trabalhou-se na região tropical com sementes de *Mabea fistulifera* e na região temperada com sementes de *Sanguinaria canadensis*. Em transectos foram determinadas as espécies de formigas interagindo com as sementes. Comparou-se a taxa de remoção de sementes por formigas e vertebrados, pelo método de “gaiola” e “não-gaiola”, considerando os períodos diurno e noturno. Doze espécies de formigas foram vistas no ambiente tropical. Nesse ambiente, o tratamento “não-gaiola” teve a maior taxa

---

\* Para quem as correspondências deverão ser encaminhadas

de remoção das sementes. A frequência de remoção nessa área foi maior na floresta no período noturno. No ambiente temperado, 11 espécies de formigas foram observadas. Nesse ambiente as taxas de remoção foram altas, porém não houve diferenças quanto ao tratamento “gaiola” e “não-gaiola” e nem influência quanto ao período do dia. Concluiu-se que diferentes espécies de formigas interagiram com as duas espécies de sementes. A taxa de remoção pelos vertebrados, o período noturno e área de floresta influenciaram na taxa de remoção na área tropical. Sementes mirmecocóricas típicas foram mais coletadas que as diplocóricas.

**Palavras-chave:** dispersão de sementes; floresta temperada; floresta tropical; mirmecocoria e regeneração natural

## **Introdução**

Grandes áreas de florestas em todo o mundo têm sido perdidas ou degradadas e usadas, como áreas de agricultura ou pasto (Lamb e Gilmour, 2003). Essa prática tem aumentado em muitos países tropicais (Dunn, 2004) e temperados (Bellemare *et al.*, 2002).

Apesar dessa freqüente transformação de florestas em áreas de práticas humanas, ironicamente, também ocorre, seu posterior abandono (Lamb e Gilmour, 2003) em escala considerável. O reflorestamento dessas áreas abandonadas em ambos os ambientes tropicais e temperados varia em torno de 3,6 milhões de hectares anualmente, segundo informações da FAO – Food and Agricultural Organization of the United Nations (2001). A transformação de florestas em áreas agropastoris conduz à formação de vários fragmentos florestais, além de provocar conseqüências negativas ao ambiente transformado, como por exemplo, a redução da biodiversidade de plantas e animais, bem como a interferência na composição química e física do solo e qualidade da água (Lamb e Gilmour, 2003; Bellemare *et al.*, 2002).

A regeneração natural de árvores em pastagens apresenta características distintas da regeneração no interior das florestas (Bellemare *et al.*, 2002). Esse processo é geralmente dependente da ocorrência de espécies de animais considerados dispersores de propágulos, de vertebrados frugívoros ou invertebrados. Essa regeneração também é dependente da dispersão, e das taxas de predação e germinação de sementes de espécies florestais, além da sobrevivência e crescimento das plântulas (Keesing e Wratten, 1998; Holl *et al.*, 2000; Holl, 2002). Esses autores ainda comentam que cada um desses fatores é influenciado por um número de aspectos bióticos e abióticos, como por exemplo, a alta intensidade luminosa, a compactação do solo, a escassez de nutrientes, a temperatura, umidade e a presença de predadores.

Ao estudar esses vários fatores que afetam o sucesso da regeneração natural de uma área degradada, pode-se ressaltar a redução da biodiversidade da fauna como um dos fatores de grande importância (Majer, 1992). Ela afeta não só a sobrevivência de espécies predadoras e dispersoras de sementes, como também influencia significativamente o potencial dos dispersores (Holl *et al.*, 2000; Dunn, 2004).

Invertebrados, tais como formigas, estão envolvidos na dispersão de sementes de várias espécies florestais (Pizo *et al.*, 2004), bem como de espécies pioneiras (Peternelli *et al.*, 2003 e 2004). Essa atividade varia ao longo do ano, sendo influenciada pela temperatura e umidade. O benefício das formigas em dispersar sementes garante que bancos de sementes viáveis sejam criados para garantir o crescimento de espécies de plantas em áreas que sofreram distúrbio (Holl *et al.*, 2000).

A composição e a diversidade da fauna de formigas mudam drasticamente quando florestas são convertidas em pastagens (Mitchell *et al.*, 2002; Carvalho e Vasconcelos, 1999). Algumas espécies ausentes ou pouco abundantes na floresta encontram condições favoráveis nas áreas de pastagens e aumentam em abundância (Vasconcelos e Cherrett 1996). Quando esses pastos são abandonados e se inicia o processo de recuperação e de sucessão florestal, novamente ocorrem mudanças na fauna dos formicídeos. Possíveis implicações dessas mudanças poderão influenciar na regeneração florestal dessas áreas (Mitchell *et al.*, 2002).

Uma dessas implicações pode ser exemplificada pelo fato de que a perda dos grandes dispersores como pássaros e mamíferos, decorrentes da fragmentação e degradação florestal, pode promover mudanças em populações ou mesmo a extinção de muitas espécies de plantas (Guimarães-Jr e Cogni, 2002). Além disso, segundo esses autores, importantes invertebrados, como as formigas, que carregam e limpam sementes, provavelmente aumentem em número e podem exercer a função de agente de dispersão. Segundo Mitchell *et al.* (2002), a mirmecocoria é um mutualismo importante entre planta-inseto, com relevância direta ao restabelecimento de vários grupos de plantas depois de um distúrbio. Acredita-se que o estudo deste mutualismo seja importante, pois essa relação exerce papel crítico na manutenção de funções ecológicas e oferece aos ecologistas uma oportunidade de aumentar sua compreensão dos processos de sucessão de muitas comunidades de plantas.

Este trabalho teve como objetivo geral comparar e avaliar a taxa de remoção de sementes em áreas de pasto com regeneração florestal e floresta secundária, tanto em ambientes tropicais, onde se espera ter maior diversidade de formigas, quanto em áreas temperadas, onde se espera uma diversidade menor desses insetos. Também foi objetivo chamar a atenção do importante papel que as formigas podem exercer nestes ambientes.

Assim sendo, foram coletadas informações e conduzidos experimentos em ambiente tropical e temperado em dois habitats, floresta e pasto abandonado, para responder às seguintes perguntas: (1) quais espécies de formigas são encontradas com as sementes? (2) Como esses insetos se comportam em relação às sementes? E também testar as seguintes hipóteses: (1) As formigas dispersam mais sementes na floresta do que o fazem em pasto abandonado; (2) formigas removem mais sementes do que os vertebrados e (3) os efeitos do período diurno e noturno influenciam a taxa de remoção de sementes por formigas.



## **Material e Métodos**

### **Áreas de Estudo**

Foram escolhidas duas áreas de estudo. Para representar ambiente de clima tropical foi escolhida a área denominada Acamari, Minas Gerais, Brasil (20°45'S e 42°55'W); enquanto para representar ambiente de clima temperado foi escolhida a área Edwin S. George Reserve (ESGR), Michigan, EUA (42° 28 "N, 84° 00" W). Em ambas as áreas de estudo, as pesquisas foram conduzidas em dois habitats, floresta e pasto abandonado, estando este último em processo de regeneração.

Na área Acamari os trabalhos de campo foram conduzidos de setembro a dezembro de 2005. Essa área de estudo está localizada próxima ao campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, na Zona da Mata de Minas Gerais, com altitude de 790 m e em processo de regeneração natural há cerca de 23 anos. Faz parte da unidade fitogeográfica da Floresta Atlântica, enquadrando-se na formação da Floresta Estacional Semidecidual Montana. O clima da região é do tipo Cwb (subtropical moderado úmido), segundo a classificação de Köppen, apresentando déficit hídrico no período de maio a setembro e um excedente de precipitação entre dezembro e março.

Na área Edwin S. George Reserve (ESGR), os trabalhos de campo foram conduzidos de junho a julho de 2006. Esse local do estudo, no passado, foi fazenda e teve grande parte de sua terra usada como um pasto por um longo período. Nos últimos 76 anos a área vem sendo mantida como um santuário de animais selvagens e como local de pesquisas de estudantes e pesquisadores da Universidade de Michigan. A Reserva Edwin S. George (ESGR) está situada, aproximadamente a 46,3 km noroeste de Ann Arbor, Michigan, EUA. O clima da reserva é do tipo úmido caracterizado por baixas temperaturas e por chuvas ao longo do ano. A precipitação média anual é de aproximadamente 762 mm e as temperaturas mensais médias são de aproximadamente -5°C em janeiro e cerca de 22°C em junho e julho. A diversidade fitogeográfica da reserva é grande. Aproximadamente 35% da terra são ocupados por pasto e outros 38% por floresta secundária; os brejos são aproximadamente 15%, pântano aproximadamente 10%, e áreas inundadas aproximadamente 2%.

## **Plantas**

### *Mabea fistulifera*

Conhecida pelo nome comum de canudo-de-pito, *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) é uma espécie nativa amplamente encontrada em pastos abertos e áreas de transição de floresta estacional semidecidual. Ela ocorre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Lorenzi, 2000). Normalmente as plantas são encontradas agregadas em bordas de florestas e em lugares com grande influência antrópica. A maturação do fruto ocorre de setembro a outubro; a floração, de fevereiro a junho, alcançando seu pico entre abril e maio (Lorenzi, 2000), correspondendo ao início da estação seca na região. Devido à sua ocorrência durante o período de escassez de alimento, muitos animais, como macacos, morcegos, gambás, pássaros e insetos, usam seu pólen e néctar como fonte alternativa de alimento (Vieira e Carvalho-Okano, 1996). Suas sementes são constantemente transportadas por diferentes espécies de formigas durante seu período de frutificação (Peternelli *et al.*, 2004). Segundo esses autores, algumas espécies de formigas exercem importante papel como dispersores secundários das sementes de *M. fistulifera*. As sementes frescas de *M. fistulifera* foram coletadas em setembro de 2005.

### *Sanguinaria canadensis*

É uma Papaveraceae, a única espécie do gênero *Sanguinaria* (Morales e Heithaus, 1998); conhecida pelo nome comum de “Bloodroot”. Esta planta herbácea perene e nativa do leste do continente norte americano é encontrada de Nova Escócia, Canadá, até a parte sul da Flórida, nos Estados Unidos. Ela cresce à altura de 60 cm e suas flores são produzidas de março a maio. “Bloodroot” é uma das muitas típicas plantas mirmecocóricas, cujas sementes são dispersas por formigas (Morales e Heithaus, 1998), processo este chamado mirmecocoria. As sementes frescas de *S. canadensis* foram coletadas em junho de 2006.

## **Interação formiga-semente**

Para determinar quais formigas interagiram com as sementes nos habitats pasto abandonado e floresta, em ambas as áreas de estudo, foram registradas todas as interações

formigas-semente observadas ao longo de toda a estação de frutificação. O método utilizado para medir essas interações foi adaptado e modificado de Passos e Oliveira (2002) e de Pizo e Oliveira (2001).

Ao longo de transectos de 250 m foi realizado o censo de formigas interagindo com sementes colocadas no solo da floresta e do pasto abandonado. Em cada área (Brasil e Estados Unidos), 50 sementes frescas de *M. fistulifera* ou 50 de *S. canadensis*, respectivamente, foram alocadas ao longo do transecto, afastadas 5 metros umas das outras. Para facilitar a visualização da formiga interagindo com a semente, fragmentos de papel-filtro brancos (4 x 4 cm) foram colocados sob as sementes. Segundo Pizo e Oliveira (2001), o uso do papel-filtro não interfere na atividade das formigas. Cada semente era protegida de ser removida por vertebrados com gaiolas de arame (15 x 15 x 10 cm; 1,5 cm mesh). Sementes foram arranjadas nos transectos às 7:30 h no período da manhã, e às 15:00 h no período da tarde e observadas a intervalos de 15 minutos, por um período de 2 horas. Foram anotadas quais formigas eram atraídas e também se essas formigas removiam as sementes e/ou recrutavam companheiras para auxiliá-las. Quando possível algumas formigas carregando sementes eram seguidas até sua entrada no ninho ou seu desaparecimento na vegetação, de modo que alguma informação da distância do carregamento pudesse ser obtida. Alguns indivíduos foram coletados para identificação futura. No Brasil, os indivíduos coletados e identificados eram depositados no Museu Regional da Universidade Federal de Viçosa. Nos Estados Unidos, esse depósito era feito no Museu de Entomologia da Universidade Estadual de Michigan.

### **Remoção de sementes por formigas versus vertebrados**

A metodologia utilizada foi adaptada e modificada de Pizo e Oliveira (2001).

Para comparar a remoção de sementes por formigas e vertebrados nas duas áreas em estudo (floresta e pasto abandonado), foram estabelecidos dois transectos paralelos de 500 m, afastados entre si por 2 m, de modo a incluir pontos de observação em ambos os habitats. Cada transecto possuía 100 pontos de observação, afastados 5 m uns dos outros. Cem sementes (*M. fistulifera* e *S. canadensis*) foram utilizadas no tratamento com gaiola (“gaiola”) e cem no tratamento sem gaiola (“não-gaiola”), de modo que em cada ponto de observação era alocada uma única semente. As gaiolas (15 x 15 x 10 cm; 1,5 cm mesh)

eram manufaturadas em arame e tinham por objetivos evitar que roedores e pássaros coletassem as sementes, porém permitindo livre acesso às formigas (Pizo e Oliveira, 2001). Desse modo, a taxa de remoção realizada apenas pelas formigas poderia ser quantificada. No transecto 1 os tratamentos “gaiola” e “não-gaiola” eram alocados aleatoriamente, enquanto no segundo transecto, os tratamentos eram alocados de maneira invertida, ou seja, se no primeiro ponto de observação do transecto 1 foi alocado o tratamento “gaiola”, então no primeiro ponto do transecto 2 seria alocado o tratamento “não-gaiola”. As sementes foram colocadas em cada ponto do transecto em dois horários, caracterizando a outra fonte de variação (“dia” e “noite”). Na classificação “dia” as sementes eram colocadas nos pontos de observação às 7:00 h da manhã e a anotação do número de sementes removidas era realizada antes da 7:00 h da noite do mesmo dia. Na classificação “noite”, em cada ponto de observação, as sementes eram colocadas às 7:00 h da noite, e a contagem das sementes removidas eram realizadas antes das 7:00 h da manhã do dia seguinte. Sementes que não haviam sido coletadas pelos animais no período anterior eram descartadas, de modo que apenas sementes frescas eram utilizadas nos experimentos. As sementes eram consideradas removidas se não encontradas a um raio de 15 cm do local de deposição original.

### **Análises Estatísticas**

Cada tratamento, “gaiola” e “não-gaiola”, foi repetido cinco vezes, correspondendo a cinco dias seguidos de observação. Para evitar que houvesse correlação entre as observações realizadas nos cinco dias de avaliação, em cada dia, os tratamentos alocados no primeiro transecto eram novamente sorteados e deslocados um metro do ponto de observação anterior, seguindo a linha do transecto. Dessa forma seria garantida a ausência de viés nas respostas. Os dados foram inicialmente analisados usando técnicas de estatística descritiva (Sokal e Rohlf, 1981). As taxas de remoções de sementes nos diferentes tratamentos segundo os objetivos do trabalho foram comparadas, utilizando-se o teste de Qui-quadrado com a correção de Yates (Sokal e Rohlf, 1981; Zar, 1984). As análises foram realizadas utilizando-se o software livre R (R Development Core Team, 2006).

## Resultados

### Interação formiga-semente

A lista das subfamílias e espécies de formigas envolvidas nos eventos de interação semente-formiga em cada área, Acamari e Edwin George S. Reserve (EGSR), bem como as porcentagens dos eventos associados a cada espécie estão apresentadas na Tabela 1.

Na área Acamari, 12 espécies de formigas (quatro subfamílias e nove gêneros) foram vistas interagindo com sementes de *M. fistulifera*. As espécies mais frequentes observadas interagindo com a semente foram *A. sexdens rubropilosa*, seguida pelas *Pheidole* sp. 1 e 2. As duas espécies de formigas cortadeiras encontradas removeram as sementes a consideráveis distâncias: *A. sexdens rubropilosa* a  $1,57 \pm 0,48$  m, n= 8 (média  $\pm$  SD); e *Ac. subterraneus subterraneus* a  $0,97 \pm 0,28$  m, n = 8 (média  $\pm$  SD). Cinco espécies tentaram remover as sementes e ocasionalmente conseguiram transportá-las menos do que 5 cm ou algumas delas as exploraram, mas não as removeram. As espécies de *Pheidole* tipicamente recrutavam companheiras de ninho para remover as sementes do local onde a semente era encontrada. No local onde as sementes eram encontradas, as operárias de *S. invicta*, cobriam as sementes com terra antes de limpá-las, removendo pequenos fragmentos do elaiosoma.

Na área ESGR as formigas rapidamente encontravam as sementes colocadas no chão. Onze espécies de formigas (duas subfamílias e seis gêneros) foram vistas interagindo com as sementes de *S. canadensis*. Sete espécies de formigas removeram e transportaram as sementes mais do que 5 cm. *Aphaenogaster rudis* foi a espécie mais frequente envolvida nos eventos das interações semente-formiga (38,30 % dos eventos). A distância média transportada foi de  $0,86 \pm 0,47$  m, n = 10 (média  $\pm$  SD). *Lasius neoniger*, *Myrmica latifrons* e *Tetramorium caespitum* removeram as sementes menos de 5 cm. Três espécies exploraram as sementes, mas não as removeram. Recrutamento de companheiras foi observado em duas espécies de formigas, *Formica viculans* e *L. neoniger*. Foi observado que as espécies de *P. impairs* e *T. caespitum* limpavam as sementes pela remoção de fragmentos do elaiosoma sem retirá-las do local encontrado.

### Remoção de sementes por formigas versus vertebrados

Na área Acamari, considerando a comparação dos tratamentos “gaiola” e “não-gaiola”, em ambos os habitats (floresta e pasto abandonado), nos respectivos períodos “diurno” e “noturno”, as sementes de *M. fistulifera* foram significativamente removidas em maior proporção no tratamento “não-gaiola” do que no tratamento “gaiola” (floresta/dia:  $\chi^2 = 115,50$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ; floresta/noite:  $\chi^2 = 34,29$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ; pasto abandonado/dia:  $\chi^2 = 175,24$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ; pasto abandonado/noite:  $\chi^2 = 29,71$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 1). A taxa de remoção no caso de tratamento “gaiola” variou de pouco mais de 5% a cerca de 35%.

A tabela 2 apresenta os resultados das comparações entre as áreas de estudo e habitats quando foi desconsiderada a separação dos dados de acordo com os tratamentos “gaiola” e “não-gaiola”. Observou-se que a frequência de remoção na área Acamari foi significativamente maior ( $\chi^2 = 36,87$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ) na floresta (62,20%) do que no pasto abandonado (48,41%).

A comparação entre os períodos diurno (“dia”) e noturno (“noite”) em cada habitat está apresentada na Tabela 3. Houve diferença significativa ( $\chi^2 = 10,12$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,0014$ ) entre o período diurno (57,63%) e noturno (66,78%) na floresta. Entretanto, não houve diferença significativa ( $\chi^2 = 1,95$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,1622$ ) na taxa de remoção entre os períodos diurno e noturno no pasto abandonado.

Na Tabela 3 também é possível comparar a taxa de remoção entre ambos os habitats em cada período do dia. No período diurno não houve forte evidência de diferença entre floresta e pasto abandonado ( $\chi^2 = 4,05$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,0439$ ), ao passo que tal diferença se mostra mais evidente ( $\chi^2 = 46,68$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ), quando a comparação é realizada dentro do período noturno (floresta: 66,78% e pasto abandonado: 45,85%) no Acamari.

Na área ESGR ficou evidente (Figura 2) que não havia diferença entre os tratamentos “gaiola” e “não-gaiola” com relação à taxa de remoção de sementes. Dessa forma, analisando-se os dados agrupados apresentados na Tabela 2 observou-se uma taxa de remoção extremamente alta em ambos os habitats (floresta: 94,55%; e pasto abandonado: 95,63%), não havendo diferença significativa ( $\chi^2 = 1,02$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,312$ ).

Também não foi encontrada diferença significativa na taxa de remoção entre os períodos diurno e noturno em ambos os habitats (Tabela 3).

## Discussão

Um número considerável de espécies de formigas interagiu com as duas espécies de sementes avaliadas nas áreas de estudo. Não foi encontrada especialização de uma espécie particular de formiga nos dois tipos de sementes avaliadas. Este resultado está de acordo com alguns autores que afirmam ter encontrado grande diversidade de formigas coletando sementes mirmecocóricas (Culver e Beattie, 1978; Horvitz e Schemske, 1986; Handel e Beattie, 1990; Passos e Ferreira, 1996); isso também confirma não haver espécies de formigas específicas para este mutualismo. Observou-se que as formigas tratavam as sementes de maneiras diferentes e que cada espécie de formiga exibia comportamento específico com a semente, conforme já verificado por Gorb e Gorb (1995).

A taxa de remoção no ambiente tropical (Acamari) não foi tão grande quanto a que foi encontrada no ambiente temperado (ESGR). Este resultado pode ter ocorrido devido ao fato de que a semente oferecida na área Acamari é de uma espécie de planta (*M. fistulifera*) que tem sua dispersão caracterizada como síndrome diplocórica, ou seja, suas sementes são primariamente dispersadas por deiscência explosiva do fruto, seguida pela dispersão secundária por formigas (autocoria + mirmecocoria = diplocoria) (Beattie e Lyons, 1975). Segundo esses autores este tipo de semente normalmente possui um elaiosoma relativamente pequeno comparado com as sementes mirmecocóricas típicas (Figura 3). Além disso, após a deiscência, o elaiosoma das sementes diplocóricas rapidamente desidratam perdendo a sua atratividade, ao passo que os elaiossomas das sementes mirmecocóricas desidratam vagorosamente, permanecendo atrativas por mais tempo (Beattie e Lyons, 1975). Este fato pode ser importante, pois durante as realizações dos experimentos na área do Acamari as temperaturas variavam de 26 a 28<sup>0</sup>C, enquanto as da área do ESGR variavam de 21 a 23<sup>0</sup>C. No ambiente temperado a taxa de remoção foi rápida porque nessa área foi oferecida a *S.canadensis*, que é uma espécie tipicamente mirmecocórica (Beattie e Lyons, 1975; Handel e Beattie, 1990).

Na área Acamari (ambiente tropical) foi observada maior taxa de remoção na floresta quando comparada com o pasto abandonado. Também foi observada maior taxa de remoção no período noturno, quando comparado dentro dos dois habitats. Tais fatos podem ser explicados pela ocorrência de maior diversidade e abundância de espécies de



animais em geral, incluindo formigas, na floresta do que no pasto abandonado (Mitchell *et al.*, 2002) e também pela maior incidência de calor na área aberta do pasto durante o dia; esses fatos influenciam de maneira incisiva no ritmo de forrageamento das formigas (Hölldobler e Wilson, 1990). Assim sendo, a baixa taxa de remoção no período diurno na área tropical parece ser compensada no período noturno. Os tratamentos “gaiola” e “não-gaiola” apresentaram diferença significativa na taxa de remoção de sementes, sendo maiores para o tratamento “não-gaiola”. Isso evidencia uma expressiva contribuição de outros animais, além das formigas, na remoção de sementes de seu local original. No entanto, mesmo com uma menor taxa de remoção apresentada no tratamento “gaiola”, o que essencialmente implica apenas na contribuição das formigas no transporte das sementes, essa taxa representaria cerca de 50% de todo o transporte de semente realizado. Resultados semelhantes, em área tropical, foram também encontrados por Pizo e Oliveira (2001). Acredita-se que, mesmo não sendo tão expressiva a taxa de remoção no período diurno na área tropical, esse resultado foi compensado pelo período noturno.

Os resultados encontrados na área temperada foram bem diferentes daqueles da área tropical. Eles, de maneira geral, demonstraram que tanto no ambiente de floresta quanto no pasto abandonado, em ambas as áreas, as formigas coletaram e transportaram as sementes encontradas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos “gaiola” e “não-gaiola”, dificultando a quantificação da taxa de remoção de sementes por vertebrados. Também não foi encontrada diferença significativa entre a taxa de remoção de sementes entre os habitats e entre os períodos do dia.

Dessa interação entre formigas e sementes já é sabido que existem vantagens para ambos os organismos, formigas e plantas. De acordo com Handel e Beattie (1990), quando as formigas estão interagindo com as sementes e operando como agentes de dispersão, elas são importantes para o meio ambiente, pois reduzem a competição entre plântulas e suas planta-mãe. Além disso, elas podem reduzir a quantidade de sementes consumidas por predadores, pois elas transportam as sementes para o interior de seus ninhos, tornando mais difícil para outros animais granívoros alcançá-las (Manzaneda *et al.*, 2005). Indiretamente, as formigas poderiam, ainda, fornecer condições favoráveis para o crescimento das plântulas, uma vez que, o solo sob o ninho e ao redor dele é menos compacto e rico em nutrientes (Passos e Oliveira, 2004). Segundo esses autores

essa é uma das grandes vantagens para as plântulas em ambientes áridos, os quais geralmente têm solo compacto e infértil. As formigas também podem fornecer proteção contra as adversidades do ambiente, por meio da relocação das sementes para o interior de seus ninhos: aí estarão protegidas contra fogo e as altas temperaturas (Handel e Beattie, 1990). Estudos futuros serão necessários para se tentar quantificar e demonstrar como essa interação poderá contribuir, por exemplo, com a sucessão de uma área em recuperação. Esse papel exercido pelas formigas em ambientes alterados consiste em assunto ainda pouco estudado, mas de grande importância para o entendimento do funcionamento da sucessão vegetal em áreas perturbadas.

Enfim, foi concluído que diferentes espécies de formigas interagem com as sementes de *M. fistulifera* e *S. canadensis*. Cada espécie de formiga exibiu diferentes comportamentos frente as sementes. As formigas efetivamente dispersaram as sementes de *S. canadensis*, na mesma taxa, tanto na floresta quanto no pasto abandonado. Já as sementes de *M. fistulifera* foram mais removidas no habitat floresta. A contribuição de vertebrados na remoção de sementes é bastante expressiva na área tropical. No entanto, nessas áreas, a contribuição dada pelas formigas é também relativamente importante. O período do dia influenciou na taxa de remoção somente na área tropical, sendo maior no período noturno. Sementes mirmecocóricas típicas são relativamente mais coletadas que as diplocóricas.

## **Agradecimentos**

Nós agradecemos ao Dr. Frank W. Telewski da Michigan State University que gentilmente permitiu a coleta de dez exemplares do fruto de *Sanguinaria canadensis*, que estavam em exposição no Jardim Botânico W. J. Beal Botanical Garden, do qual ele é curador, para que fosse facilitada a identificação dos mesmos na área de floresta em estudo; Dr. Bernice B. DeMarco do Departamento de Entomologia da Michigan State University, pela identificação dos exemplares de formigas. Nós também gostaríamos de agradecer a University of Michigan pelo suporte e permissão para que pudéssemos trabalhar na Reserva Edwin S. George Reserves (ESGR). O suporte financeiro foi fornecido como bolsa de pós-graduação (nível - Doutorado) pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## Referências

- Beattie, A. J. and Lyons, N. 1975. Seed dispersal in *Viola* (Violaceae): adaptations and strategies. *American Journal of Botany*. 62(7): 714-722.
- Bellemare, J.; Motzkin, G. and Foster, D.R. 2002. Legacies of the agricultural past in the forest present: an assessment of historical land-use effects on rich mesic forests. *Journal of Biogeography*. 29: 1401-1420.
- Carvalho, K. S. and Vasconcelos, H. L. 1999. Forest fragmentation in Central Amazônia and its effects on letter-dwelling ants – analyses by ant communities. *Biological Conservation*. 91(2): 151-157.
- Culver, D.C. and Beattie, A. J. 1978. Myrmecochory in *Viola*: Dynamics of seed-ant interactions in some west Virginia species. *Journal of Ecology*, 66: 53-72.
- Dunn, R. R. 2004. Managing the tropical landscape: a comparison of the effects of logging and forest conversion to agriculture on ants, birds, and Lepidoptera. *Forest Ecology and Management*. 191: 215-224.
- FAO. 2001. Global forest resources assessment 2000. Food and agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2001. <http://www.fao.org/forestry/fo/fra/index.jsp>
- Gorb, S. N. and Gorb, E. V. 1995. Removal rates of seeds of five myrmecochorous plants by the ant *Formica polyctena* (Hymenoptera: Formicidae). *OIKOS*, 73: 367-374.
- Guimarães-Jr, P. R. and Cogni, R. 2002. Seed cleaning of *Cupania vernalis* (Sapindaceae) by ants: edge effect in a highland forest on southeast Brazil. *Journal of Tropical Ecology*. 18: 303-307.
- Handel S. N. and Beattie, A. J. 1990. Seed dispersal by ants. *Scientific American*. 263(2): 76-83.
- Hölldobler B. and Wilson E. O. 1990. The ants. Cambridge, Mass: The Belknap Press, Harvard University. 732pp.
- Holl, K. D. 2002. Effect of shrubs on tree seedling establishment in an abandoned tropical pasture. *Journal of Ecology*. 90: 179-187.
- Holl, K. D.; Loik, M. E.; Lin, E.H.V. and Samuels, I. A. 2000. Tropical montane Forest restoration in Costa Rica: Overcoming barriers to dispersal and establishment. *Restoration Ecology*. 8(4): 339-349.
- Horvitz, C. C. and Schemake, D. W. 1986. Seed dispersal of a neotropical myrmecochore: variation in removal rates and dispersal distance. *Biotropica*. 18(4): 319-323.
- Keesing, V. and Wratten, S. D. 1998. Indigenous invertebrate components in ecological restoration in agricultural landscapes. *New Zealand Journal of Ecology*. 22(1): 99-104.
- Lamb, D. and Gilmour, D. 2003. Rehabilitation and restoration of degraded forest. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK and WWF, Gland, Switzerland. 110pp.
- Lorenzi H. 2000. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, Editora Plantarum, vol. 1, 3ª ed., 352pp.

- Majer, J. D. 1992. Ant recolonisation of rehabilitated bauxite mines of Poços de Caldas, Brazil. *J. Trop. Ecol.* 8: 97-108.
- Manzaneda, A. J.; Fedriani, J. M. and Rey, P.J. 2005. Adaptive advantages of myrmecochory: the predator-avoidance hypothesis tested over a wide geographic range. *Ecography*. 28: 583-592.
- Mitchell, C. E.; Turner, M. G. and Pearson, S. M. 2002. Effects of historical land use and forest patch size on myrmecochores and ant communities. *Ecological Application*. 12(5): 1364-1377.
- Morales, M. A. and Heithaus, E. R. 1998. Food from seed-dispersal mutualism shifts sex ratios in colonies of the ant *Aphaenogaster rudis*. *Ecology*, 79(2): 734-739.
- Passos, L. and Oliveira, P. S. 2002. Ants affect the distribution and performance of seedlings of *Clusia criuva*, a primarily bird-dispersed rain forest tree. *Journal of Ecology*. 90: 517-528.
- Passos, L. and Ferreira S. O. 1996. Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in Southeastern Brazil. *Biotropica*. 28: 697-700.
- Peternelli, E. F. O., Della Lucia T. M. C., Peternelli L. A., Martins S. V. and Borges E. E. L. 2003. The interaction among workers of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) and seeds of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae), a pioneer tree species in Brazil. *Sociobiology*. 42(3): 597-603.
- Peternelli, E. F. O., Della Lucia T. M. C. and Martins S. V. 2004. Espécies de formigas que interagem com sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). *Revista Árvore* 28(5): 733-738.
- Pizo, M.A., Passos, L. and Oliveira, P. S. 2004. Ants as seed dispersers of fleshy diaspores in Brazilian Atlantic forests. In: *Seed fate: Predation and secondary dispersal*. (Forget P. M., Lambert J. E., Hulme P. E. and Vander Wall S. B., Eds.), CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. pp 315-329
- Pizo, M. A. and Oliveira, P. S. 2001. Size and lipid content of nonmyrmecochorous diaspores: effects on the interaction with litter-foraging ants in the Atlantic rain forest of Brazil. *Plant Ecology*, 157, 37-52.
- R Development Core Team. 2006. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1981. *Biometry*. 2<sup>nd</sup> ed. W.H.Freeman and Company, San Francisco, USA. 859p.
- Vasconcelos, H. L. and Cherrett, J. M. 1996. The effect of wilting on the selection of leaves by the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 78: 215-220.
- Vieira, M. F. and Carvalho-Okano, R. M. 1996. Pollination biology of *Mabea fistulifera* (Euphorbiaceae) in southeastern Brazil. *Biotropica*, Washington, 28 (1): 61-68.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall International Editions, London.

**Tabela 1** – Lista das subfamílias e espécies de formigas envolvidas nos eventos de interação entre semente-formiga em cada área, Acamari e Edwin George S. Reserve (EGSR) e porcentagem dos eventos associados a cada espécie

Subfamílias e espécies de formiga	Eventos *	Porcentagem de ocorrência dos comportamentos (N = 47)
Acamari		
<b>Formicinae</b>		
<i>Camponotus rufipes</i>	t, e	4,25
<b>Myrmicinae</b>		
<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	R	8,51
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	R	36,17
<i>Megalomyrmex</i> sp.1	t, e, c	17,02
<i>Pheidole</i> sp.1	t, rc	25,53
<i>Pheidole</i> sp.2	r, rc, c	21,27
<i>Pheidole</i> sp.4	c, rc	14,89
<i>Pheidole</i> sp.5	c, e, rc	10,64
<i>Pogonomyrmex</i> sp.1	E	2,13
<i>Solenopsis invicta</i>	e, c	2,13
<b>Ponerinae</b>		
<i>Pachycondyla</i> sp.	t, e	2,13
<b>Ectatomninae</b>		
<i>Ectatomma edentatum</i>	t, e	10,64
ESGR		
<b>Formicinae</b>		
<i>Formica pallidefulva nitidiventris</i>	R	17,02
<i>Formica subsericea</i>	R	2,13
<i>Formica viculans</i>	rc,r	2,13
<i>Lasius neoniger</i>	rc, t	10,64
<i>Prenolepis imparis</i>	e, c	2,13
<b>Myrmicinae</b>		
<i>Aphaenogaster rudis</i>	R	38,30
<i>Myrmica americana</i>	R	10,64
<i>Myrmica latifrons</i>	e, t	8,51
<i>Myrmica lobifrons</i>	R	2,13
<i>Myrmica punctiventris</i>	R	2,13
<i>Tetramorium caespitum</i>	e, t, c	6,38

\* **r**, remove e transporta as sementes (> 5 cm); **t**, tenta remover e transportar as sementes (< 5 cm); **e**, explora as sementes, mas não remove; **rc**, recrutamento de outras operária; **c**, limpa as sementes removendo porções do elaiosoma no próprio local.

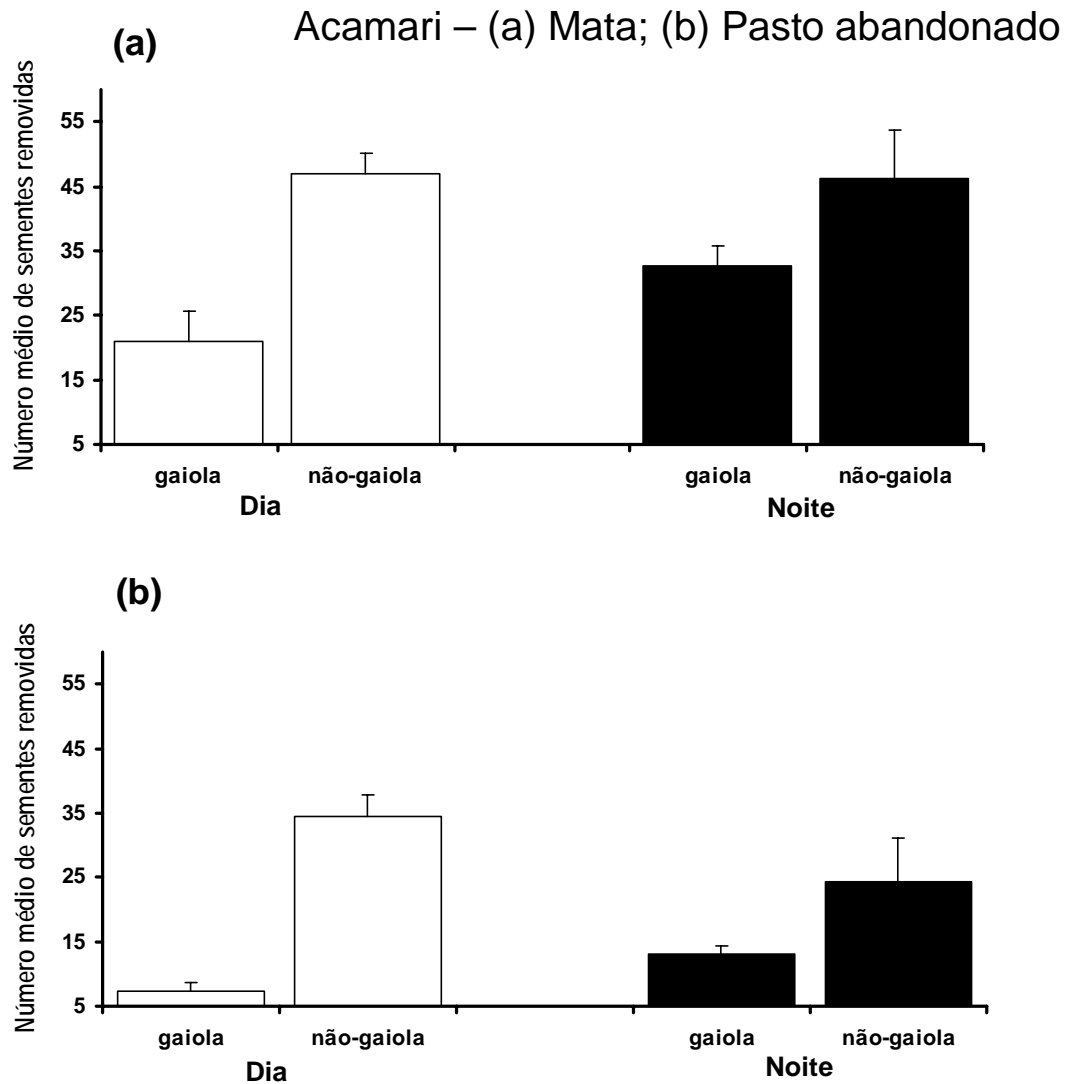
**Tabela 2.** Porcentagens de sementes removidas nas áreas Acamari e Edwin George S. Reserve (EGSR) nos habitats Floresta e Pasto abandonado, após agrupamento dos dados referentes aos tratamentos “gaiola” e “não-gaiola”

Habitat	Áreas	
	Acamari	ESGR
Floresta	62,20 (N = 1180)	94,55 (N = 880)
Pasto abandonado	48,41 (N = 820)	95,63 (N = 1120)

**Tabela 3.** Porcentagens de sementes removidas nas áreas Acamari e Edwin George S. Reserve (EGSR) nos habitats Floresta e Pasto abandonado, de acordo com o período do dia, após agrupamento dos dados referentes aos tratamentos “gaiola” e “não-gaiola”

Habitat	Período do dia*	Área	
		Acamari	ESGR
Floresta	”dia”	57,63 (N = 590)	96,82 (N = 440)
	”noite”	66,78 (N = 590)	96,79 (N = 440)
Pasto abandonado	”dia”	50,98 (N = 410)	92,27 (N = 560)
	”noite”	45,85 (N = 410)	94,46 (N = 560)

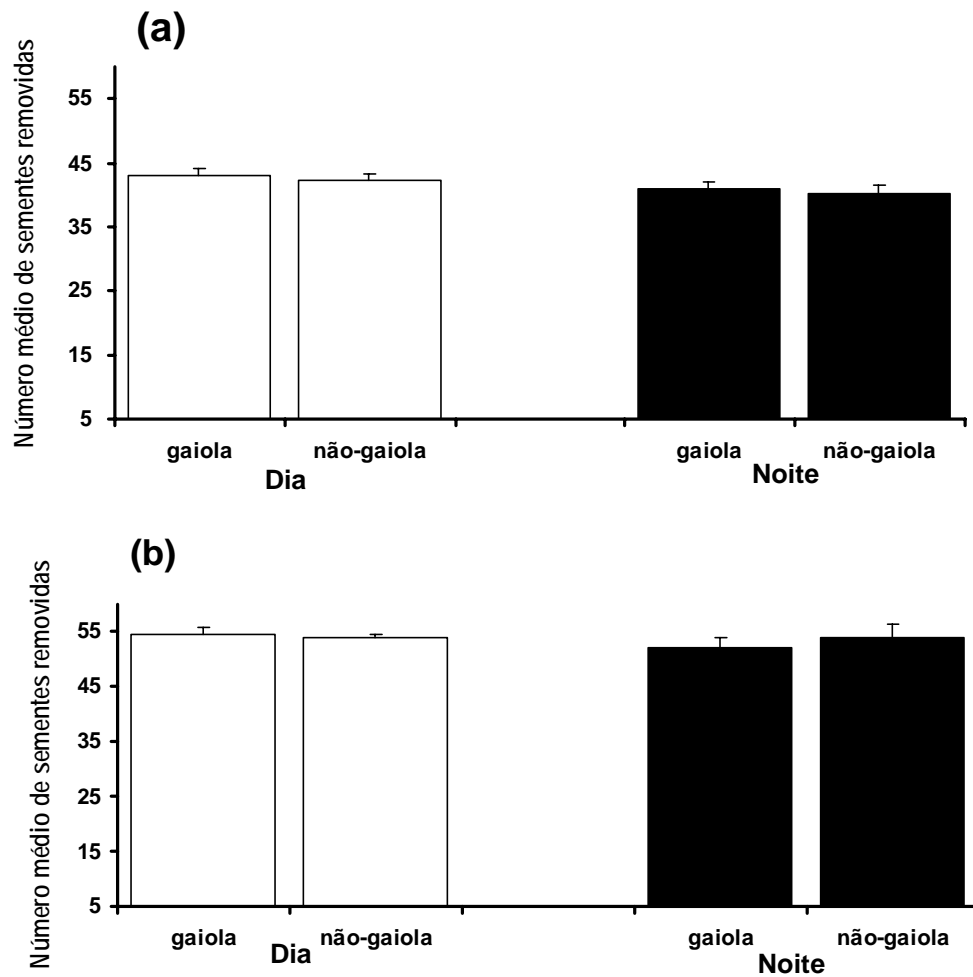
\* “dia”: de 07h00min h da manhã às 07h00min h da noite; “noite”: de 07h00min h da noite às 07h00min h da manhã.



**Figura1** - Número médio de sementes removidas na área Acamari (ambiente tropical), nos tratamentos gaiola e não gaiola, nos períodos diurno e noturno



ESGR – (a) Floresta; (b) Pasto abandonado



**Figura2** - Número médio de sementes removidas na área Edwin S. George Reserve (ESGR) (ambiente temperado), nos tratamentos gaiola e não gaiola, nos períodos diurno e noturno.



**Figura 3** - (a). Semente-elaiosoma de *Sanguinaria canadensis*; (b). semente-elaiosoma de *Mabea fistulifera*.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Dos trabalhos realizados foram obtidas as seguintes conclusões:

1. Operárias de formigas cortadeiras, para encontrar uma semente, utilizaram voláteis emitidos pelas sementes e seu elaiosoma.
2. Semente-elaiosoma pode ser uma fonte alternativa de agente atrativo em iscas tóxicas utilizadas no controle de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*.
3. Operárias de *A. sexdens rubropilosa* transportaram a semente inteira (semente-elaiosoma) porque esse comportamento foi mais eficiente e mais rápido, possibilitando que um maior número de sementes/elaiosomas entrasse na colônia e porque operárias mínimas não foram expostas ao meio externo.
4. Operárias de *A. sexdens rubropilosa* não disputaram as sementes se outras espécies de formigas invasoras estivessem presentes.
5. Diferentes espécies de formigas interagiram com as sementes de *Mabea fistulifera* e *Sanguinaria canadensis*. Essas espécies trataram as sementes diferentemente; sementes de *S. canadensis* foram dispersadas na mesma taxa, tanto na floresta quanto no pasto; sementes de *M. fistulifera* foram mais dispersadas na floresta.
6. A contribuição de vertebrados na remoção de sementes foi bastante expressiva na área tropical.
7. O período do dia influenciou na taxa de remoção somente na área tropical, sendo maior no período noturno.
8. Sementes mirmecocóricas típicas foram relativamente mais coletadas que as diplocóricas.