

SAZONALIDADE, PREFERÊNCIA POR HOSPEDEIRO E BIOLOGIA
DE FORÍDEOS PARASITÓIDES DA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta*
sexdens

RENATA CUNHA PEREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

SAZONALIDADE, PREFERÊNCIA POR HOSPEDEIRO E BIOLOGIA
DE FORÍDEOS PARASITÓIDES DA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta
sexdens*

RENATA CUNHA PEREIRA

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

Orientador: Prof. Omar Eduardo Bailez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P436

Pereira, Renata Cunha.

Sazonalidade, preferência por hospedeiro e biologia de forídeos parasitoides da formiga-cortadeira *Atta sexdens* / Renata Cunha Pereira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

86 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Omar Eduardo Bailez.

1. *Aphocephalus attophilus*. 2. Ciclo biológico. 3. *Eibesfeldtphora tonhascai*. 4. Phoridae. 5. Taxa de parasitismo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

SAZONALIDADE, PREFERÊNCIA POR HOSPEDEIRO E BIOLOGIA
DE FORÍDEOS PARASITÓIDES DA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta
sexdens*

RENATA CUNHA PEREIRA

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

Aprovada em 18 de fevereiro de 2020

Comissão Examinadora



Prof.ª Ana Maria Matoso Viana Bailez (D.Sc., Biologia do Comportamento) - UENF



Prof. Gerson Adriano Silva (D.Sc., Fitotecnia) - UENF



Prof. Vinícius Siqueira Gazal e Silva (D.Sc., Produção Vegetal) - UFRRJ



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

*Dedico este trabalho
aos meus pais Maria Helena e Lauro (em memória),
por todo apoio e amor que me permitiram chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos os professores que tive ao longo de minha jornada. A todos que acreditam e defendem a educação pública e de qualidade, pois foi essa educação que permitiu que eu chegasse até aqui. Em especial agradeço ao Flávio e a Maria Augusta, meu orientador e coorientadora durante o mestrado, a Flávia minha orientadora durante a graduação e ao professor Casali. Vocês foram fundamentais para que eu me tornasse a pessoa e profissional que sou hoje. Obrigada por me incentivarem e por acreditarem no meu potencial. Sorte a minha ter tido orientadores tão competentes, humanos e amigos.

Como é bom trabalhar com um orientador amigo, que além da orientação dá dicas sobre bons vinhos, filmes e compartilha as experiências vividas. Obrigada Omar por sua orientação, conselhos e grata amizade. À minha coorientadora Ana Maria agradeço especialmente por ser uma pessoa que ensina pelo exemplo: de mulher, de profissional, de ser humano. A vocês dois minha gratidão por cada ensinamento. Obrigada por tornarem essa jornada mais leve e agradável.

Meu agradecimento ao professor Gerson pelo auxílio nas análises dos dados, pelo grato convívio e amizade. Que exemplo de profissionalismo e competência, você me inspira como pessoa e profissional. Agradeço ao professor Mendonça pelo auxílio com os dados climatológicos. Aos membros da banca examinadora Ana Maria, Gerson, Vinícius e as suplentes Anália e Fabíola meu agradecimento pela revisão da tese e disponibilidade em participarem da defesa.

Agradeço a Fabíola Pimentel, Alexandre e Pedro pela amizade e por terem me ensinado os primeiros passos com os forídeos. A Anália pelas conversas e infinitos cafés. Ao Thalles por embarcar nessa aventura de trabalhar com os forídeos. A todos os colegas de laboratório meu agradecimento pelo agradável convívio durante estes quatro anos. Meu carinho e agradecimento especial aos amigos que contribuíram em alguma etapa deste trabalho: Junin, Bruno, Renato, Reginaldo, Thalles, José Inácio, Pedro, Ludmila, Willians, Anália e Nathalia.

Ao INEA-RJ e a Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba (EEEG) meu agradecimento pela autorização de pesquisa, infraestrutura e apoio durante as coletas de dados e experimentos na EEEG. Em especial, gostaria de agradecer a chefe da estação Vânia; aos funcionários Ângela, Luciana, Conceição, Cléber e Anderson e a todos os guarda-parques, em especial ao Bruno, Renato, Mirian, Francisco, Hérick e Alan. Vocês deveriam ser melhor valorizados pelo estado e pelo INEA, pois o trabalho de vocês é maravilhoso. Meu muito obrigada por tudo que fizeram por mim e para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Meu agradecimento ao Conselho Nacional de Pesquisa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pela concessão da bolsa.

Aos meus amigos meu obrigada por tornarem meus dias mais leves e felizes. A minha família agradeço todo o carinho, orações, energia positiva e especialmente por compreenderem minha ausência.

Ao meu companheiro de vida, Junin, gratidão pela parceria, amor e auxílio durante as estressantes, e ao mesmo tempo divertidas, coletas a campo. Obrigada por sua calma, sorriso sereno e abraço apertado em todos os momentos.

Meu mais sincero agradecimento à minha mãe que é meu amor maior, aquela que junto com meu pai (agora no céu) não mediram esforços, torcida, orações e amor para que eu pudesse chegar até aqui e para que eu possa alçar voos ainda maiores. Todo meu amor e gratidão a vocês, a melhor parte de mim.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Formigas-cortadeiras	3
2.2 Controle de formigas-cortadeiras	4
2.3 Inimigos naturais	5
2.3.1 <i>Forídeos parasitoides</i>	6
2.4 Relação formiga-cortadeira-forídeo parasitoide	6
2.4.1 <i>Seleção e ataque de hospedeiros</i>	7
2.4.2 <i>Taxa de parasitismo</i>	9
2.5 Influências dos fatores climáticos no parasitismo	10
3. TRABALHOS.....	11
3.1 SAZONALIDADE DO PARASITISMO DE FORÍDEOS (DIPTERA: PHORIDAE) NA FORMIGA-CORTADEIRA <i>Atta sexdens</i> EM MATA ATLÂNTICA.....	11
RESUMO	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO	13

MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO.....	28
RESUMO E CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
3.2 PREFERÊNCIA DO FORÍDEO PARASITOIDE <i>Eibesfeldtphora tonhascai</i> POR TAMANHO E ESPÉCIE DE FORMIGA-CORTADEIRA	35
RESUMO	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO.....	46
RESUMO E CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
3.3 CICLO BIOLÓGICO E FECUNDIDADE DE <i>Eibesfeldtphora tonhascai</i> (DIPTERA: PHORIDAE).....	51
RESUMO	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS.....	57
DISCUSSÃO.....	60
RESUMO E CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	65
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

PEREIRA, Renata Cunha; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2020. Sazonalidade, preferência por hospedeiro e biologia de forídeos parasitoides da formiga-cortadeira *Atta sexdens*. Orientador: Omar Eduardo Bailez.

Forídeos parasitoides da família Phoridae são inimigos naturais com potencial para serem utilizados no controle biológico das formigas-cortadeiras. É importante conhecer sobre a variação anual do parasitismo, as preferências do parasitoide por hospedeiros, seu ciclo biológico e capacidade reprodutiva. Os objetivos foram: 1) verificar se existe variação na taxa de parasitismo causada por forídeos à formiga-cortadeira *Atta sexdens*; 2) verificar se o forídeo *Eibesfeldtphora tonhascai* manifesta preferência por espécie ou por tamanho de hospedeiro e 3) determinar o ciclo biológico e a fecundidade de *E. tonhascai*. Duzentas operárias de *A. sexdens* foram mensalmente coletadas, durante dois anos, de cinco ninhos em área de Mata Atlântica. As taxas de parasitismo foram calculadas e o efeito das variáveis climáticas sobre o parasitismo foi calculado mediante análise de trilha. Testes de preferência foram feitos colocando fêmeas de *E. tonhascai* com operárias de distintos tamanhos e de duas espécies de *Atta*. As frequências de voos de inspeção, de tentativas de ataque e de ataques efetuados pelo forídeo às formigas foram registradas e calculados a taxa de parasitismo e de emergência para cada espécie e o tamanho do hospedeiro. Para determinar o ciclo biológico de *E. tonhascai* uma fêmea foi colocada em uma arena de ataque com operárias

de *A. sexdens* e registrou-se a duração dos estádios ovo-larva, pupa e a longevidade de adultos. Fêmeas adultas de *E. tonhascai* coletadas no campo e recém-emergidas foram sacrificadas e efetuou-se a contagem de ovos. A taxa de parasitismo na formiga *A. sexdens* foi de 5,8 %, causada pelos forídeos *Apocephalus attophilus* (4,2 %), *E. tonhascai* e *Eibesfeldtphora bragancai* (1,4 %) e *Myrmosicarius grandicornis* (0,2 %). O parasitismo de *A. attophilus* e de *Eibesfeldtphora* spp. apresentou variação sazonal. A temperatura teve efeito negativo significativo sobre o parasitismo total e das espécies *A. attophilus* e *Eibesfeldtphora* spp. O efeito negativo da umidade influenciou o parasitismo de *Eibesfeldtphora* spp. e os efeitos negativos da precipitação e umidade afetaram *M. grandicornis*. As fêmeas de *E. tonhascai* manifestaram preferência pelas operárias maiores e não discriminaram entre *A. sexdens* e *Atta laevigata*, mas a taxa de emergência foi superior em *A. sexdens*. O ciclo biológico de *E. tonhascai* teve duração total de $34,6 \pm 0,1$ dias ($11,7 \pm 0,9$ dias do estágio ovo/larva e $22,9 \pm 0,1$ da pupa) e a longevidade do adulto foi de $2,1 \pm 0,1$ dias. As fêmeas coletadas no campo tiveram entre 5 e 62 ovos em seus ovários e as emergidas em laboratório entre 16 e 35 ovos. Concluímos que a taxa de parasitismo causada pelo forídeo *A. attophilus* em operárias *A. sexdens* é sazonal. A fêmea de *E. tonhascai* prefere operárias maiores, não discriminam a espécie hospedeira, mas há uma maior emergência no hospedeiro *A. sexdens*. A duração total do ciclo biológico de *E. tonhascai* é em média de 34 dias e fêmeas coletadas no campo possuem mais ovos que fêmeas emergidas em laboratório, o que indica que *E. tonhascai* é um parasitoide sinovigênico porque há incremento do número de ovos após a emergência do adulto.

ABSTRACT

PEREIRA, Renata Cunha; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2020. Seasonality, host preference and biology of parasitoid phorids of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. Advisor: Omar Eduardo Bailez.

Parasitoid phorid of the Phoridae family are natural enemies with potential to be used in the biological control of leaf-cutting ants. It is important to know about the annual variation of parasitism, the preferences of the parasitoid for hosts, the biological cycle and reproductive capacity. The objectives were: 1) to verify if there is variation in the rate of parasitism caused by phorids to the leaf-cutting ant *Atta sexdens*; 2) verify if the phorid *E. tonhascai* has a preference either for a host species or a worker ant size and 3) determine the biological cycle and fertility of *E. tonhascai*. Two hundred workers of *A. sexdens* were collected monthly, for two years, in five nests located in the Atlantic Forest. Parasitism rates were calculated and the effect of climatic variables on parasitism was calculated through trail analysis. Preference tests were carried out by placing *E. tonhascai* females with workers of different sizes and two species of *Atta*. The frequencies of inspection flights, attempted attacks and attacks carried out by the phorid against ants were recorded and the parasitism and emergency rates were calculated for each species and host size. To determine the biological cycle of *E. tonhascai*, a female was placed in an attack arena with workers from *A. sexdens* and the duration of the stages egg-larvae, pupa and adult longevity were recorded. Adult females of

E. tonhascai collected in the field and newly emerged were sacrificed and egg counting was carried out. The parasitism rate in the ant *A. sexdens* was 5.8 %, caused by the phorids *Apocephalus attophilus* (4.2 %), *E. tonhascai* and *Eibesfeldtphora bragancai* (1.4 %) and *Myrmosicarius grandicornis* (0.2 %). The parasitism of *A. attophilus* and *Eibesfeldtphora* spp. presented seasonal variation. Temperature had a significant negative effect on total parasitism and of the phorids *A. attophilus* and *Eibesfeldtphora* spp. The negative effect of humidity influenced the parasitism of *Eibesfeldtphora* spp. and the negative effects of precipitation and humidity affected *M. grandicornis*. The females of *E. tonhascai* showed preference for the larger workers and did not discriminate between *A. sexdens* and *Atta laevigata*, but the rate of emergence was higher in *A. sexdens*. The biological cycle of *E. tonhascai* had a total duration of 34.6 ± 0.1 days (11.7 ± 0.9 days of the egg/larva stage and 22.9 ± 0.1 of the pupa) and the adult longevity was 2.1 ± 0.1 days. Females collected in the field had between 5 and 62 eggs in their ovaries and those emerged in the laboratory between 16 and 35 eggs. We conclude that the rate of parasitism caused by the phorid *A. attophilus* in *A. sexdens* workers is seasonal. Females of the *E. tonhascai* emerged from *A. sexdens* ants prefer larger sized workers and not for a host species, but that the adult emergence rate is higher in the species *A. sexdens*. The total duration of the *E. tonhascai* biological cycle is on average 34 days and females collected in the field have more eggs than females emerged in the laboratory, which indicates that *E. tonhascai* is a synovigenic parasitoid because there is an increase in the number of eggs after adult emergency.

1. INTRODUÇÃO

Em culturas agrícolas e florestais consideram-se pragas os organismos que em situação de desequilíbrio provocam danos econômicos às culturas (Machado et al., 2007). A diversificação dos ambientes eleva a biodiversidade e favorece o equilíbrio dos sistemas agrícolas, o que reduz a probabilidade de aparecimento de pragas (Almeida et al., 2008). Por outro lado, as monoculturas, o desmatamento e a fragmentação de habitats afetam a biodiversidade de inimigos naturais e favorecem a ocorrência de pragas (Forti et al., 2006).

As formigas-cortadeiras (Himenoptera: Formicidae), do gênero *Atta* Mayr (Myrmicinae: Attini) estão entre os insetos herbívoros dominantes dos neotrópicos (Montoya-Lerma et al., 2012). No Brasil, *Atta sexdens* Linnaeus e *Atta laevigata* Smith apresentam a mais ampla faixa de distribuição. Estas espécies cortam grandes quantidades de material vegetal e o transportam para o interior dos ninhos onde cultivam um fungo simbiote do qual se alimentam. Por esta razão, são consideradas pragas de importância econômica (Della Lucia et al., 2014).

O método mais utilizado para o controle das formigas-cortadeiras é o químico e se baseia no uso de iscas com inseticida, principalmente com a sulfluramida e fipronil (Della Lucia et al., 2014). Estas duas substâncias apresentam alto risco de contaminação ambiental e são de uso restrito em áreas certificadas pela Forest Stewardship Council, FSC (Bailez, 2016). No ano de 2015 ambas as substâncias foram listadas como pesticidas altamente perigosas pelo FSC e existe previsão de proibição em áreas florestais certificadas no Brasil

(Zanuncio et al., 2016). Além disso, a sulfluramida foi incluída como Poluente Orgânico Persistente no anexo B da Convenção de Estocolmo (Stockholm Convention on POP, 2009).

A necessidade de controlar as formigas-cortadeiras de maneira eficiente e sustentável intensificou as pesquisas que buscam explorar alternativas ao método de controle químico (Guillade e Folgarait, 2014). Os forídeos parasitoides (Diptera: Phoridae) de formigas-cortadeiras são inimigos naturais que representam uma alternativa para serem utilizados no controle biológico destas formigas (Galvão et al., 2019). No Brasil, os principais gêneros de forídeos são *Apocephalus* Coquillett, 1901, *Myrmosicarius* Borgmeier, 1928 e *Eibesfeldtphora* Disney, 2009 (= *Neodohrniphora*) (Disney et al., 2009; Uribe et al., 2014). Estes parasitoides ovipositam no corpo das formigas e provocam a morte do hospedeiro atacado (Guillade e Folgarait, 2015). As taxas médias de parasitismo em formigas-cortadeiras são, geralmente, de 2% a 5% (Elizalde e Folgarait, 2011; Galvão et al., 2019), mas valores próximos a 40% foram verificados em ninhos amostrados no campo (Elizalde e Fogarait, 2011; Pimentel, 2017).

Nos Estados Unidos os forídeos *Pseudacteon* são utilizados para controle biológico da formiga invasora *Solenopsis invicta* (Chen e Fadamiro, 2017). Métodos de criação em laboratório desses parasitoides foram desenvolvidos e pelo menos seis espécies de *Pseudacteon* foram liberadas no ambiente. Mas, esta liberação só ocorreu após pesquisas sobre ecologia, biologia e sobre as relações parasitoide-hospedeiro serem realizadas (Chen e Fadamiro, 2017).

Estudos sobre a bioecologia e comportamento de algumas espécies de forídeos de formigas-cortadeiras já foram realizados no Brasil (Bragança et al., 2002; Silva et al., 2007; 2008; Gazal et al., 2009; Arruda et al., 2019; Galvão et al., 2019). Entretanto, poucos estudos foram realizados para avaliar se existe um padrão de distribuição ao longo dos anos da taxa de parasitismo de forídeos em *A. sexdens* e pouco se conhece sobre as preferências dos parasitoides pelos seus hospedeiros, o ciclo biológico e fecundidade das espécies.

Os objetivos do trabalho foram: 1) verificar se há um padrão de distribuição temporal do parasitismo causado por forídeos à formiga *A. sexdens*; 2) verificar se o forídeo *E. tonhascai* manifesta preferência por tamanho e por espécie hospedeira e 3) estabelecer a duração dos estádios do ciclo biológico e estimar a fecundidade de fêmeas de *E. tonhascai*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Formigas-cortadeiras

As formigas são insetos sociais pertencentes à ordem Hymenoptera, família Formicidae (Hölldobler e Wilson, 1990). Dentro da subfamília Myrmicinae se encontra a tribo Attini, cujas espécies se caracterizam por cultivar um fungo simbiote do qual se alimentam. Esta tribo agrupa 297 espécies distribuídas entre os gêneros *Apterostigma*, *Attaichnus*, *Cyphomyrmex*, *Kalathomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycopepurus*, *Myrmicocrypta*, *Paramycetophylax*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex*, *Trachomyrmex*, *Atta* e *Acromyrmex* (Gallo et al., 2002). Entre as formigas da tribo Attini se destacam as formigas-cortadeiras, que pertencem aos gêneros *Atta* Mayr (saúvas) e *Acromyrmex* Fabricius (quenquéns) (Hölldobler e Wilson, 1990).

O alto nível de organização social e a eficiente estratégia de coleta de alimento torna possível às formigas-cortadeiras atingir colônias populosas, que se comportam como um superorganismo (Della Lucia e Souza, 2011). As formigas-cortadeiras possuem a casta reprodutora (fêmeas e machos férteis) e a casta das operárias (fêmeas estéreis). As operárias podem apresentar subcastas morfológicamente diferentes (polimorfismo) e desempenham diferentes funções dentro da colônia (polietismo) (Hölldobler e Wilson, 1990).

As formigas-cortadeiras ocorrem em todos os países do continente americano desde o sul da Argentina até o sul dos Estados Unidos, com exceção

do Chile (Weber, 1972; Della Lucia, 2011). Do ponto de vista ecológico estas formigas são consideradas engenheiras dos ecossistemas naturais, como nas florestas tropicais, devido às alterações físicas e químicas do solo e à regulação das comunidades vegetais (Griffiths et al., 2018). Por outro lado, sob o ponto de vista econômico, as formigas-cortadeiras podem ser consideradas pragas importantes. Espécies do gênero *Atta* são relatadas como pragas importantes em lavouras da região neotropical (Montoya-Lerma et al., 2012). *Atta sexdens* Linnaeus, 1758 e *Atta laevigata* Smith (1958) são consideradas pragas de grande importância econômica no Brasil, especialmente em ambientes agrícolas e em florestas plantadas, devido às perdas que provocam e por serem de difícil controle (Della Lucia, 2011; Montoya-Lerma et al., 2012).

2.2 Controle de formigas-cortadeiras

O método mais utilizado para o controle das formigas-cortadeiras é o químico e baseia-se principalmente no uso de iscas inseticidas (Zanetti et al. 2014). A sulfluramida e o fipronil são os princípios ativos inseticidas mais utilizados. No entanto, problemas ambientais e de toxicidade a organismos não alvos foram associados a estas duas substâncias em diversos estudos (Guillade e Folgarait, 2014; Zanetti et al., 2014; Goffré e Folgarait, 2015; Khan e Khan, 2015).

A sulfluramida tem como produto base na sua fabricação o perfluorooctano (PFOSF - Perfluorooctano Sulfonyl Fluoride). Ao se degradar no ambiente, a sulfluramida libera sulfonato de perfluorooctano (PFOS) e fluoreto de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF), que são substâncias poluentes, persistentes e bioacumuláveis no ambiente (Gilljam et al., 2016). Por esta razão, em 2009, a sulfluramida foi incluída no anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) com perspectivas de proibição no Brasil até o ano de 2021 (Zanetti et al., 2014; Bailez, 2016; FSC, 2017).

O fipronil apresenta toxicidade aguda para alguns mamíferos, peixes e abelhas (Stockholm Convention on POP, 2009) e foi relatado como responsável pela redução de abundância e diversidade de forídeos (Guillade e Folgarait, 2014), himenópteros parasitoides (Medina et al., 2007; Adán et al., 2011) e outros organismos não alvos (Morales et al., 2004; Khan e Khan, 2015).

No ano de 2015, tanto a sulfloramida quanto o fipronil, foram listados como pesticidas altamente perigosos pelo Conselho de Manejo Florestal (FSC - Forest Stewardship Council) (Zanuncio et al., 2016). A FSC é um sistema de certificação florestal, reconhecido internacionalmente, que visa o manejo sustentável dos cultivos florestais. Um dos objetivos da FSC é proibir o uso de pesticidas altamente perigosos nas áreas certificadas (FSC, 2017), mas as empresas certificadas pela FSC enfrentam dificuldades para encontrar alternativas eficazes para o controle de formigas-cortadeiras.

Devido à ausência de métodos alternativos eficientes, as empresas brasileiras certificadas pela FSC conseguiram, após rogativa, uma autorização para utilizar a sulfloramida e o fipronil até o ano de 2021. Em contrapartida, as empresas precisam reduzir a utilização dessas substâncias e buscar alternativas de controle que não causem impactos negativos ao ambiente e aos organismos não alvos (Zanuncio et al., 2016). Nesse contexto, o uso de inimigos naturais como agentes de controle biológico de formigas-cortadeiras representa uma alternativa a ser considerada que vem sendo explorada nos últimos anos (Guillade e Folgarait, 2014; Bailez, 2016).

2.3 Inimigos naturais

Inimigos naturais são organismos que reduzem o potencial reprodutivo ou causam a morte de outros organismos. Pertencem a cinco grupos: competidores, predadores, entomopatógenos, parasitas e parasitoides. Entre os inimigos naturais das formigas-cortadeiras se destacam os fungos entomopatogênicos (Alves e Sosa-Gomez, 1983), os predadores (Araújo et al., 2015) e os parasitoides (Bragança, 2011; Disney, 1994). Neste último grupo, se destacam as moscas parasitoides da família Phoridae pela diversidade de espécies que atacam as formigas-cortadeiras e pelas taxas de parasitismo que podem causar (Galvão et al., 2019).

2.3.1 *Forídeos parasitoides*

Os forídeos parasitoides são dípteros de pequeno tamanho, pertencentes à família Phoridae (Brown, 1992). O nome forídeo tem origem no termo grego *phora*, que significa movimento rápido e faz referência à velocidade de locomoção destes insetos (Disney, 1994). A maioria dos forídeos é saprófaga, mas existem espécies herbívoras, fungívoras, predadoras e parasitoides (Brown, 1992). Uma das hipóteses mais aceita sobre a origem dos parasitoides é que o ancestral seria uma mosca saprófaga que teria ovipositado sobre feridas de insetos. Com isso, as larvas recém-eclodidas teriam se alimentado de tecidos internos do inseto e aumentado seu valor adaptativo (Disney, 1994).

A família Phoridae agrupa diversos gêneros de parasitoides, alguns dos quais se especializaram no parasitismo de insetos sociais, como cupins (Disney, 1990), abelhas (Menail et al., 2016) e formigas (Galvão et al., 2019). Em 1928 Borgmeier realizou o primeiro registro de forídeos parasitoides em formigas-cortadeiras (Borgmeier, 1928; 1931) e em 1972 Weber sugeriu que forídeos parasitoides poderiam ser úteis no controle dessas formigas.

2.4 Relação formiga-cortadeira-forídeos parasitoides

Formigas hospedeiras de forídeos parasitoides foram identificadas nos gêneros *Camponotus*, *Crematogaster*, *Dinoponera*, *Paraponera*, *Pheidole*, *Solenopsis*, *Atta* e *Acromyrmex* (Disney, 1994). Os forídeos parasitoides de formigas-cortadeiras se distribuem entre os gêneros *Allochaeta* Borgmeier, 1925; *Dohrniphora* Dahl, 1898; *Lucianaphora* Disney, 2008; *Procliniella* Borgmeier, 1931; *Stenoneurellys* Borgmeier, 1931; *Apocephalus* Coquillett, 1901; *Myrmosicarius* Borgmeier, 1928 e *Eibesfeldtphora* (= *Neodohrniphora* Malloch 1914) (Disney et al., 2009). Os três últimos gêneros se destacam pelo maior número de espécies e a maior frequência de ocorrência no campo (Arruda et al., 2019; Galvão et al., 2019).

2.4.1 Seleção e ataque de hospedeiros pelos forídeos parasitoides

Na relação forídeo-formiga o forídeo sofre uma pressão de seleção que o leva a melhorar suas capacidades para encontrar, selecionar e atacar o maior número de hospedeiros (Elizalde e Folgarait, 2012; Bailez, 2016). As larvas de forídeos se alimentam exclusivamente de tecidos internos do corpo do hospedeiro (Bragança e Medeiros, 2006). Deste modo, a seleção do hospedeiro por parte da fêmea parasitoide é determinante para garantir o desenvolvimento adequado e a sobrevivência dos imaturos (Gandon et al., 2006).

O uso de sinais visuais e químicos pode ser utilizado pelo parasitoide para localizar um hospedeiro adequado (Gazal et al., 2009). Quando um forídeo detecta sinais do hospedeiro é desencadeada uma sequência de atos comportamentais como procura, inspeção, tentativas de ataque e ataques (Gazal et al., 2009). O voo de inspeção é considerado um sobrevoo a menos de cinco centímetros acima do hospedeiro. A tentativa de ataque é um contato do forídeo com duração de menos de um segundo a uma área do corpo do hospedeiro próxima ao local de oviposição. E, o ataque é quando ocorre a inserção do ovipositor em local específico do corpo da formiga para a deposição do ovo (Silva et al., 2008; Gazal et al., 2009).

A estratégia de parasitoidismo deve conduzir a sequências de ações que aumentem as chances de encontrar hospedeiros para produzir descendência fértil, com o menor custo energético e maiores chances de sobrevivência (Bailez, 2016). Existem duas táticas de procura de hospedeiros em forídeos parasitoides: a tática da emboscada e a tática da procura ativa (Elizalde e Folgarait, 2012; Bailez, 2016). A tática de emboscada, também conhecida como “senta e espera”, ocorre quando o forídeo espera, pousado sobre algum substrato, a passagem de um hospedeiro para realizar sobrevoos de inspeção, tentativas de ataque e o ataque (Elizalde e Folgarait, 2012) e após o ataque, pausa-se novamente à espera da passagem de outro hospedeiro (Feener e Brown, 1993; Bailez, 2016). Na tática da procura ativa, os forídeos efetuam voos exploratórios regulares a procura de hospedeiros (Gazal et al., 2009; Elizalde e Folgarait 2012). Na tática de emboscada, o maior investimento por hospedeiro corresponde ao tempo gasto, já na tática de procura ativa o maior investimento é o energético (Bailez, 2016).

Outras ações que determinam a estratégia de parasitismo dos forídeos são a escolha do sítio de ataque, o modo de aproximação do hospedeiro, o local de oviposição no corpo da formiga, o tamanho do hospedeiro ou a espécie hospedeira (Gazal et al., 2009; Bailez, 2016). A região do corpo do hospedeiro onde é realizada a oviposição pode ser a cabeça, o tórax ou o abdômen (Elizalde e Folgarait, 2012). As pupas podem ser formadas no interior da cápsula cefálica da formiga (Tonhasca et al., 2001), entre suas mandíbulas (Bragança et al., 2002), na cavidade do protórax (Bragança e Medeiros, 2006) ou fora do corpo do hospedeiro (Erthal e Tonhasca, 2000).

O tamanho da formiga é um fator importante no parasitismo, pois para algumas espécies de forídeos as operárias maiores oferecem maiores possibilidades de desenvolvimento das larvas (Silva et al., 2007) e pode contribuir para uma redução da competição interespecífica (Farder-Gomes et al., 2016) e do superparasitismo (Gandon et al., 2006). Algumas espécies de forídeos parasitoides são específicas e exploram apenas uma espécie de formiga, já outras podem parasitar mais de uma espécie (Pimentel, 2017; Galvão et al., 2019). Contudo, na maioria dos trabalhos se observa que os forídeos que atacam as formigas do gênero *Acromyrmex* não atacam as do gênero *Atta* e vice-versa (Elizalde e Folgarait, 2011).

A espécie *Apocephalus attophilus* ataca a formiga hospedeira próximo à área de forrageamento e a oviposição é feita na cavidade bucal da formiga. Ao eclodir a larva se alimenta do conteúdo da cápsula cefálica e ao completar seu desenvolvimento abandona o corpo da formiga. Normalmente mais de uma pupa se forma fora do corpo do hospedeiro. Há registro de até 14 pupas em uma única operária de *Atta laevigata* (Tonhasca, 2000) e de 17 pupas em *A. sexdens* (Galvão et al., 2019).

Mirmosycarius grandicornis sobrevoa as formigas próximo às entradas dos ninhos, pousa no lado direito da cabeça da formiga e oviposita entre as mandíbulas. Ao eclodir a larva se alimenta dos tecidos internos da cabeça, provoca a queda das mandíbulas e uma única pupa se forma, do lado direito, na parte interna da cabeça da formiga (Tonhasca et al., 2001; Brown, 2009; Bragança, 2011).

Os parasitoides do gênero *Eibesfeldtphora* selecionam seus hospedeiros ao longo das trilhas de forrageamento (Galvão et al., 2019). A espécie *E.*

tonhascai oviposita na membrana póstero-dorsal da cabeça da formiga e a larva se alimenta dos tecidos internos da cabeça e forma o pupário na cavidade bucal, entre as mandíbulas (Tonhasca, 1996; Bragança et al., 2002; Bragança, 2011). A espécie *E. bragancai* oviposita na extremidade do gáster da formiga. Ao eclodir a larva migra para a cabeça onde se alimenta até completar seu desenvolvimento e formar o pupário entre as mandíbulas (Bragança et al., 2002; 2003; Bragança, 2011).

Após a emergência, os forídeos parasitoides acasalam e as fêmeas procuram hospedeiros adequados para oviposição (Gazal et al., 2009). A larva eclode alguns dias depois e se alimenta dos tecidos internos da formiga (Bragança et al., 2002; Bragança e Medeiros, 2006). Conhecer a duração do ciclo biológico e de cada um dos estágios de desenvolvimento do forídeo parasitoide é uma informação importante para viabilizar o uso destes insetos em programas de controle de formigas-cortadeiras.

2.4.2 Taxa de parasitismo

A taxa de parasitismo natural dos forídeos representa a porcentagem de formigas parasitadas no campo em um determinado momento (Elizalde e Folgarait, 2011) e pode variar de acordo com o ambiente, ninho, época do ano, condições climáticas e espécie hospedeira (Silva et al., 2008; Elizalde e Fogarait, 2011; Arruda et al., 2019; Galvão et al., 2019). Há registros de taxas de parasitismo de amostras de ninhos que variam de 0,35 % a 16 % no hospedeiro *A. sexdens* (Pesquero, 2010; Souza, 2013; Galvão et al., 2019); 4,37 % em *Atta bisphaerica* (Martins, 2015), 35 % em *Atta vollenweideri* (Elizalde e Fogarait, 2011) e 4,49 % a 40 % em *Atta laevigata* (Souza, 2013; Pimentel, 2017).

O parasitismo ocasionado pelo forídeo *A. attophilus* na formiga *A. sexdens* pode variar de 1,2 % (Erthal e Tonhasca, 2000) até 16 % das operárias coletadas no campo (Galvão et al., 2019) e por *Eibesfeldtphora declinata* de até 2,2 % (Tonhasca, 1996). Na espécie de formiga *A. laevigata* há registros de parasitismo causado por *A. attophilus* de 5,6 % (Bragança e Medeiros, 2006) e de 8,97 % por *E. tonhascai* (Pesquero et al., 2010). Na espécie *A. bisphaerica* há registro de taxas de parasitismo causadas pelo parasitoide *M. grandicornis* de 1,34% (Martins, 2015). Além de ocasionar a morte da formiga atacada, os

forídeos, especialmente do gênero *Eibesfeldtphora*, provocam redução da atividade de forrageamento e abandono da carga transportada (Tonhasca et al., 2001; Bragança et al., 2002).

2.5 Influências dos fatores climáticos no parasitismo

As interações entre formigas e forídeos podem ser influenciadas por diversos fatores como tipo de habitat (Elizalde e Folgarait 2011; Galvão et al., 2019), pesticidas (Guillade e Folgarait, 2014) e fatores climáticos (Elizalde e Folgarait, 2011; Elizalde et al., 2017; Arruda et al., 2019). Os fatores climáticos podem influenciar diretamente o nível de parasitismo ao longo dos anos e na ocorrência de sazonalidade (Arruda et al., 2019).

Um maior número de parasitoides do gênero *Eibesfeldtphora* foi capturado em trilhas da formiga *A. sexdens* nos meses de setembro e outubro, que coincide com o início da estação chuvosa (Silva et al., 2008; Galvão et al., 2019). Bragança e Medeiros (2006) mostraram que a ocorrência da espécie *A. vicosae* em *A. laevigata* está associada ao período de seca e que *E. erthali* era indiferente aos períodos seco ou chuvoso. Arruda et al. (2018) verificaram que variações sazonais nas condições ambientais podem afetar a abundância de espécies de forídeos parasitoides das formigas *A. sexdens* e *A. laevigata*. Estes autores verificaram que as taxas de parasitismo ocasionadas ao hospedeiro *A. laevigata* são maiores na estação chuvosa, mas que para o hospedeiro *A. sexdens* a chuva não foi um fator determinante.

Alguns estudos sobre sazonalidade de forídeos das formigas *Solenopsis* nos Estados Unidos revelaram que espécies do gênero *Pseudacteon* provavelmente entram em diapausa durante o inverno devido às baixas temperaturas (Morrison et al., 2000). Já nas condições climáticas na Argentina, Folgarait et al. (2003) relatam que para forídeos do gênero *Pseudacteon* altas temperaturas e baixa precipitação podem ser limitantes ao parasitismo. Em condições de laboratório algumas espécies de forídeos de *Atta vollenweideri* e de *Acromyrmex lundii* são altamente sensíveis às variações de temperatura e umidade (Guillade e Folgarait, 2011). Essa sensibilidade a fatores climáticos em condições de laboratório poderia explicar a ocorrência de sazonalidade destes parasitoides em condições de campo na Argentina (Guillade e Folgarait, 2011).

3. TRABALHOS

3.1 SAZONALIDADE DO PARASITISMO DE FORÍDEOS (DIPTERA: PHORIDAE) NA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens* EM MATA ATLÂNTICA

RESUMO

A ocorrência de forídeos parasitoides (Diptera: Phoridae) de formigas-cortadeiras pode variar ao longo dos meses e anos em função das condições climáticas, mas se desconhece se estas variações ocasionam alterações na taxa de parasitismo causada às formigas. O objetivo do trabalho foi determinar se existe um padrão de variação do parasitismo causado por forídeos parasitoides à formiga *Atta sexdens*. Mil operárias foram coletadas a cada mês, durante 24 meses, de cinco ninhos de *A. sexdens* (200 operárias/ninho) localizados em uma reserva de Mata Atlântica semidecidual de Tabuleiro. As formigas foram levadas para o laboratório e diariamente foram observadas para separar os indivíduos parasitados. A taxa de parasitismo total e por espécie de forídeo para cada ninho, mês, estação e ano foi calculada. Análise de trilha foi utilizada para identificar e quantificar os efeitos diretos e indiretos entre taxa de parasitismo e temperatura, precipitação, umidade e velocidade do vento. Quatro espécies de forídeos parasitaram *A. sexdens*: *Apocephalus attophilus*, *Eibesfeldtphora tonhascai*, *Eibesfeldtphora bragancai* e

Myrmosicarius grandicornis. A taxa de parasitismo, em todo o período de amostragem, foi de 5,8 % \pm 0,68 %. O forídeo *A. attophilus* foi responsável por 4,2%, *Eibesfeldtphora* spp. 1,4 % e *M. grandicornis* 0,2 %. O parasitismo de *A. attophilus* e de *Eibesfeldtphora* spp. apresentou variação sazonal, com maiores taxas de parasitismo no inverno. Os efeitos negativos da temperatura foram importantes para explicar o parasitismo total e o causado por *A. attophilus* e *Eibesfeldtphora* spp. Os efeitos da umidade relativa e da precipitação foram significativos no parasitismo de *M. grandicornis*. O trabalho descreve como se distribui o parasitismo das espécies de forídeos que parasitam a formiga *A. sexdens* em área de Mata Atlântica ao longo dos anos e qual é a influência dos fatores climáticos sobre essa variação.

ABSTRACT

SEASONALITY OF PHORIDS PARASITISM (DIPTERA: PHORIDAE) IN CUTTING ANT *Atta sexdens* IN ATLANTIC FOREST

The occurrence of parasitoid phorids (Diptera: Phoridae) of leaf-cutting ants can vary over the months and years depending on the climatic conditions, but it is unknown whether these variations cause changes in the rate of parasitism caused to insects. The objective of the work was to determine if there is a pattern of variation in parasitism caused by phorids in *Atta sexdens*. A thousand ant workers were collected monthly, for 24 months, from five nests of *A. sexdens* (200 ants/nest) located in a semi-deciduous Atlantic Forest area in the Tabuleiro. The ants were taken to the laboratory and were observed daily to separate the parasitized ants. The rate of total parasitism and by species of phorid for each nest, month, season and year was calculated. Path analysis was used to identify and quantify the direct and indirect effects between parasitism rate and temperature, precipitation, humidity and wind speed. Four species of phorids parasitized *A. sexdens*: *Apocephalus attophilus*, *Eibesfeldtphora tonhascai*, *Eibesfeldtphora bragancai* and *Myrmosicarius grandicornis*. The parasitism rate of, throughout the sampling period, was 5.8 % \pm 0.68 %. The phorid *A. attophilus* was responsible for 4.2 % of the total parasitism, *Eibesfeldtphora* spp. 1.4% and *M. grandicornis* 0.2 %. The parasitism of *A. attophilus* and *Eibesfeldtphora* spp.

presented seasonal variation, with higher rates of parasitism in winter. The negative effects of temperature were important to explain the total parasitism in the *A. attophilus* and *Eibesfeldtphora* spp. The effects of relative humidity and precipitation were significant in the parasitism of *M. grandicornis*. The work describes how the parasitism rate of the phorid species that parasitize the ant *A. sexdens* is distributed in an Atlantic Forest area over the years and what is the influence of climatic factors on this variation.

INTRODUÇÃO

A formiga-cortadeira *Atta sexdens* (Myrmicinae: Attini) é considerada uma importante praga agrícola e florestal (Della Lucia et al., 2014). O principal método de controle é o químico e os ingredientes ativos mais utilizados são a sulfluramida e o fipronil. Estas duas substâncias apresentam riscos de contaminação do ambiente e podem afetar as populações de organismos não alvos (Adán et al., 2011; Guillade e Folgarait, 2014). A ausência de métodos alternativos eficientes tem estimulado pesquisas com parasitoides devido à especificidade destes organismos e o baixo de risco de impactos negativos ao ambiente (Bailez, 2016).

Nas últimas décadas foram desenvolvidas pesquisas com forídeos parasitoides de formigas-cortadeiras (Diptera: Phoridae) dos gêneros *Apocephalus* Coquillett 1901, *Eibesfeldtphora* (= *Neodohniphora* Malloch) e *Myrmosicarius* Borgmeier 1928 (Arruda et al., 2019; Galvão et al., 2019). Os forídeos parasitoides ovipositam no interior do corpo do hospedeiro, a larva se alimenta do conteúdo interno ao corpo da formiga e provoca a sua morte (Disney, 1994). A taxa média de parasitismo causada por estes insetos às formigas-cortadeiras varia entre 2 e 5% (Bragança et al., 2016; Arruda et al., 2019; Galvão et al., 2019). Todavia, em formigas do gênero *Atta* amostras de operárias de alguns ninhos podem chegar de 30 a 40% de formigas parasitadas (Elizalde e Forgarait, 2011; Pimentel, 2017).

A ocorrência dos parasitoides e a taxa de parasitismo podem variar ao longo dos meses e anos em função das condições climáticas (Folgarait et al.,

2003; Folgarait, 2013; Elizalde et al., 2017; Arruda et al., 2019). Períodos de temperaturas mais baixas na Argentina estão associados aos picos de ocorrência de *Pseudacteon borgmeier* Schmitz no inverno e temperaturas mais altas ao pico de *Pseudacteon curvatus* Borgmeier no verão (Folgarait et al., 2003). Arruda et al. (2019) constataram que altas temperaturas e baixas precipitações são fatores limitantes do parasitismo de espécies de forídeos de *A. sexdens* e de *A. laevigata* na região do cerrado. Silva et al. (2007) e Galvão et al. (2019) sugerem que variações climáticas durante o ano podem influenciar na ocorrência de forídeos parasitoides de *A. sexdens* em área de Mata Atlântica.

A criação de forídeos parasitoides de formigas-cortadeiras em condições de laboratório exige um conhecimento de como a temperatura e a umidade podem afetar a reprodução destes insetos (Guillade e Folgarait, 2014). Folgarait et al., (2005; 2006) estabeleceram que para um bom desenvolvimento de muitas espécies de forídeos em condições de laboratório requer umidade relativa acima de 80% e temperaturas próximas a 28°C. Entretanto, pouco se conhece sobre a influência destes e de outros fatores climáticos sobre as taxas de parasitismo que os forídeos causam em ambiente natural.

Saber como os fatores climáticos influenciam a dinâmica populacional dos forídeos é importante para prever o potencial destes parasitoides como agente de controle biológico. Este conhecimento permitirá selecionar as espécies com maior potencial de parasitismo e com maior atividade ao longo do ano (Folgarait et al., 2003). O objetivo do trabalho foi verificar se há um padrão anual de parasitismo causado por forídeos à formiga *A. sexdens*.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O trabalho foi realizado em uma área de Mata Atlântica dentro do perímetro da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba - EEEG (21°24'S 41°04'W), município de São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro. A unidade da EEEG foi instituída em 30 de dezembro de 2002 por meio do Decreto Estadual

nº 32.576 com uma área total de 3.253,53 hectares, dos quais 1.420,65 ha são brejos, 643,37 ha pertenceram a sistemas agrícolas e pastagens que estão em processo de recuperação e 1189,51 ha são de floresta de Mata Atlântica estacional semidecidual de tabuleiro terciária (INEA, 2013).

A mata sobre tabuleiros distingue-se de outras formações de floresta atlântica por ocupar uma extensa área de planície ou tabuleiro costeiro, de origem terciária, em altitudes inferiores a 200 m. Possuem espécies de plantas distribuídas ao longo de um gradiente climático, no sentido litoral-interior. A área de mata da reserva foi historicamente desmatada para a retirada de madeiras nobres e submetida a queimadas devido às atividades canavieiras, pecuárias e para a produção de carvão (Silva e Nascimento, 2001). O dossel da floresta é atualmente contínuo, com árvores com altura média de 15 m e sub-bosque pouco desenvolvido (Broggio, 2018). O solo predominante na região é latossolo argiloso amarelo álico, com pouca retenção de água e pobre em nutrientes (Villela et al., 2006). A precipitação média anual na região é de 1084 mm, com um período seco de maio a setembro e período chuvoso de outubro a abril (RadamBrasil, 1983).

Ninhos de *Atta sexdens*

Cinco ninhos de *A. sexdens*, com área de montículo maior a dois metros quadrados na entrada principal, foram selecionados na área de Mata Atlântica da EEEG (Figura 1). A área de montículo foi utilizada como parâmetro para estimativa de ninhos bem estabelecidos e que tiveram número de forrageadoras abundante durante os 24 meses do estudo. A distância entre os ninhos variou de 700 a 2000 metros e entre os ninhos e a borda da mata foi de 36m (ninho 1), 390m (ninho 2), 560m (ninho 3), 227m (ninho 4) e 193m (ninho 5).

Dados climáticos

Os dados de temperatura, precipitação, umidade relativa e velocidade do vento foram coletadas da estação meteorológica localizada na EEEG. As médias sazonais foram calculadas com base a valores médios dos meses de março, abril e maio para outono; junho, julho e agosto para inverno; setembro, outubro e novembro para primavera e de dezembro, janeiro e fevereiro para verão.

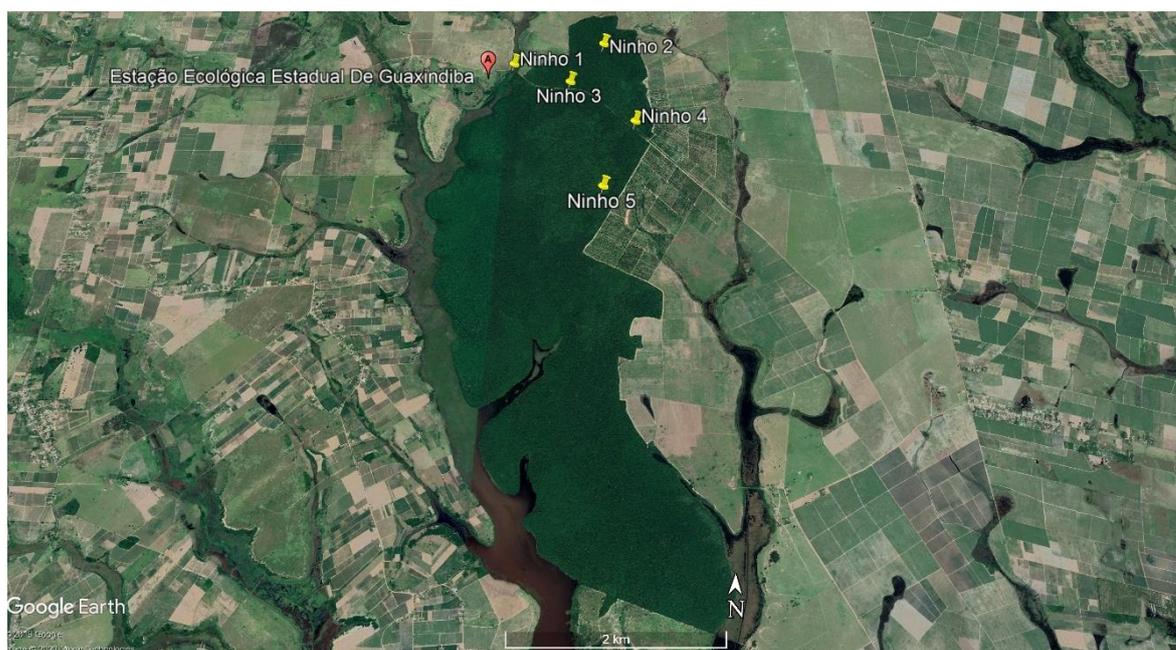


Figura 1: Imagem de satélite dos pontos georreferenciados dos cinco ninhos de *A. sexdens* (N1: 21°22'17.90"S, 41° 5'45.96"O; N2: 21°22'6.94"S, 41° 5'9.54"O; N3: 21°22'25.79"S, 41°5'22.60"O; N4: 21°22'43.47"S, 41° 4'55.93"O; N5: 21°23'12.59"S, 41° 5'7.90"O) amostrados durante os 24 meses na área de Mata Atlântica da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro.

Parasitismo

Duzentas operárias foram coletadas de forma contínua quando passaram por uma linha preestabelecida na trilha de cada um dos cinco ninhos (Pimentel, 2017; Galvão et al., 2019) de *A. sexdens* da EEGE. As coletas foram realizadas entre janeiro de 2017 e dezembro de 2018, uma vez por mês, entre 18:00 e 00:00 horas, em função da atividade de forrageamento das formigas.

As formigas de cada ninho foram transportadas, separadamente em potes fechados (30 × 20 × 10 cm), para o laboratório de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (25 ± 1° C, 80 ± 5 % UR e 12 h de fotoperíodo). Em cada pote foram adicionados dois tubos de ensaio, um com água e outro com alimento (solução de mel a 10 %), os quais foram trocados a

cada dois dias para evitar proliferação de fungos e bactérias (Galvão et al., 2019). As formigas dos potes foram monitoradas diariamente durante 20 dias.

As formigas mortas de cada pote foram retiradas e individualizadas em tubos de ensaio com tampa (20 mL) e examinadas diariamente para detectar sinais de parasitismo. Sinais de parasitismo foram considerados: 1. cabeça da formiga translúcida ao ser observada contra a luz; 2. presença de larvas ou pupas no interior ou fora do corpo da formiga; 3. pupário formado entre as mandíbulas; 4. cabeça da formiga desprendida do corpo e 5. queda de mandíbulas (Tonhasca et al., 2001; Bragança, 2011).

As formigas com sinais de parasitismo foram individualizadas em copos (30 mL) com gesso na base (2 cm de espessura) e tampa de malha plástica para permitir a ventilação e evitar a fuga de larvas e adultos do parasitoide (Galvão et al., 2019). O gesso foi umedecido a cada dois dias para manter alta a umidade. Formigas vivas nos potes após 20 dias da data da coleta foram descartadas por considerar que não estavam parasitadas (Tonhasca et al., 2001).

Formigas parasitadas foram consideradas aquelas que produziram larvas, pupas ou adultos de forídeos. Os forídeos emergidos foram sacrificados em álcool 70 %, armazenados em tubos Eppendorf® e identificados pela morfologia dos ovipositores com auxílio de microscópio estereoscópico e guias de identificação (Disney et al., 2006; 2009; Brown et al., 2010; Uribe et al., 2014). Quando não houve emergência do forídeo adulto a identificação foi realizada através de características auxiliares distintivas do parasitismo das espécies e gêneros relatados na literatura. Por exemplo, na região do estudo a formação de pupas fora do corpo do hospedeiro é uma característica exclusiva da espécie *A. attophilus* (Bragança e Medeiros, 2006); pupário situado entre as mandíbulas da formiga é uma característica exclusiva do gênero *Eibesfeldtphora* (Bragança, 2011) e pupa formada na lateral direita interna da cabeça da formiga e a queda das mandíbulas caracteriza a espécie *M. grandicornis* (Tonhasca et al., 2001).

A taxa de parasitismo (TP) das amostras foi calculada com base na fórmula: $TP = (\text{n}^\circ \text{ de formigas parasitadas} / \text{n}^\circ \text{ de formigas coletadas}) \times 100$. A taxa de emergência de forídeos adultos (TE) foi estimada pela fórmula: $TE = (\text{n}^\circ \text{ de forídeos emergidos de cada espécie} / \text{n}^\circ \text{ total de formigas parasitadas pela mesma espécie do parasitoide}) \times 100$.

Análise dos dados

Análise de regressão Gaussiana de pico através do parâmetro x_0 da equação $y = a \exp\{0,5[(x-x_0)/b]^2\}$ foi realizada com os dados conjuntos do parasitismo dos dois anos para verificar o mês com a máxima taxa de parasitismo. Os dados de parasitismo total dos dois anos e por estação climática foram comparados mediante análise de variância seguido de teste de média de Tukey, quando a distribuição dos dados foi normal. Quando os dados não seguiram a distribuição normal as médias foram comparadas mediante teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn.

A análise de trilha foi realizada para identificar e quantificar interações diretas e indiretas entre taxa de parasitismo total e de cada espécie com as variáveis climáticas. As interações nas trilhas são representadas pelo coeficiente de regressão, que quantifica a intensidade de cada efeito direto na variável resposta e através do coeficiente de correlação que representa a interação entre variáveis independentes (Sokal e Rohlf, 1995). O efeito direto (ED) foi calculado através da análise de regressão múltipla. O efeito indireto (EI) foi calculado para verificar o efeito que uma variável climática exerce sobre o parasitismo por meio da influência em outro fator. O EI de uma variável foi calculado quando a trilha passa por uma ou mais variáveis intermediárias até chegar à variável resposta e foi obtido através do produto de todos os coeficientes ao longo de uma trilha. Quando mais de uma trilha chega à variável resposta os coeficientes de trilha indiretos são somados para calcular o coeficiente indireto total (Li, 1975; Sokal e Rohlf, 1995). Se o coeficiente do efeito indireto for maior que o do efeito direto, significa que ele exerce maior influência na variável resposta. O efeito total (ET) é a soma dos coeficientes direto e indiretos. Os diagramas de trilha foram estabelecidos de acordo com o esquema apresentado na Figura 2 e as análises foram realizadas no programa estatístico SAEG (UFV, 1997).

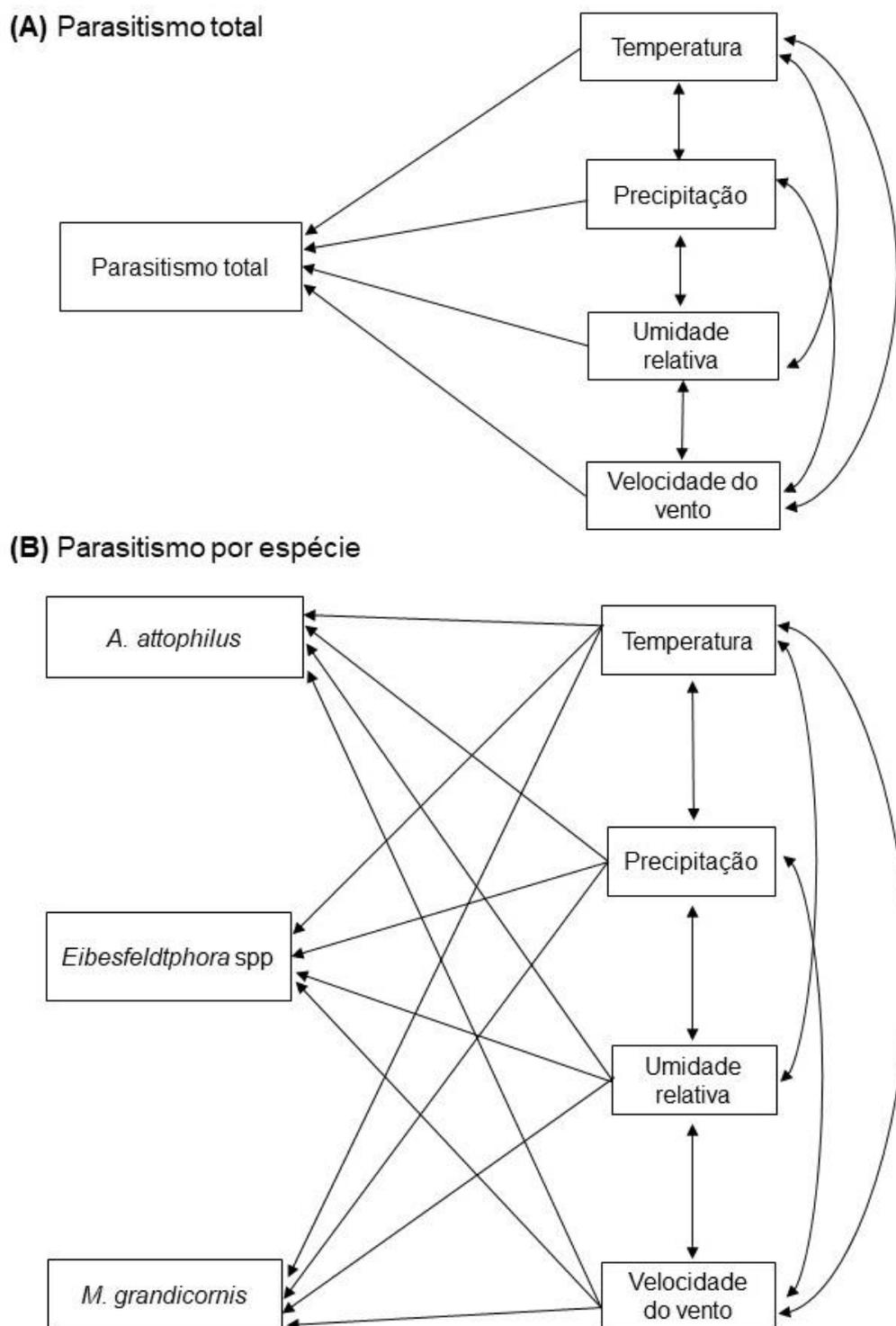


Figura 2. Esquemas de análise de trilha testada para a verificação do efeito da temperatura, precipitação, umidade relativa e velocidade do vento na taxa de parasitismo total (A) e das espécies de forídeos (B). Correlações entre variáveis independentes são indicadas por setas bidirecionais e as interações através de coeficientes de regressão indicados por setas unidirecionais.

RESULTADOS

Um total de 24.000 operárias de *A. sexdens* foi coletado durante os dois anos do estudo. A taxa de parasitismo total registrada foi de $5,8 \pm 0,7$ % (n =1395) e foi ocasionada por quatro espécies de forídeos: *A. atophilus* (4,2 %), *E. tonhascai* e *E. bragancai* (1,4 %) e *M. grandicornis* (0,2 %). A taxa de emergência de forídeos adultos de todas as espécies (TE) foi de 45,8 % (639/1395). A maior taxa de emergência foi registrada na espécie *A. atophilus* ($59,6 \pm 4,5$ %; 601/1009). O número de pupas produzidas por hospedeiro nesta espécie variou de 1 a 18. A TE de *Eibesfeldtphora* spp. foi de 8,8 % (29/331), e 3 % dos indivíduos emergidos foram fêmeas de *E. tonhascai* (n= 10), 1 % fêmeas de *E. bragancai* (n= 3) e 4,8 % machos (n= 16). A taxa de emergência de *M. grandicornis* foi de 16,4 % (9/55), com cinco indivíduos fêmeas e quatro machos.

As médias mensais de precipitação, temperatura, umidade relativa, velocidade do vento e parasitismo causado pelos forídeos são apresentadas na figura 3. O índice de precipitação nos dois anos de estudo esteve abaixo da média histórica (ano 2017= 670 mm; ano de 2018= 950 mm).

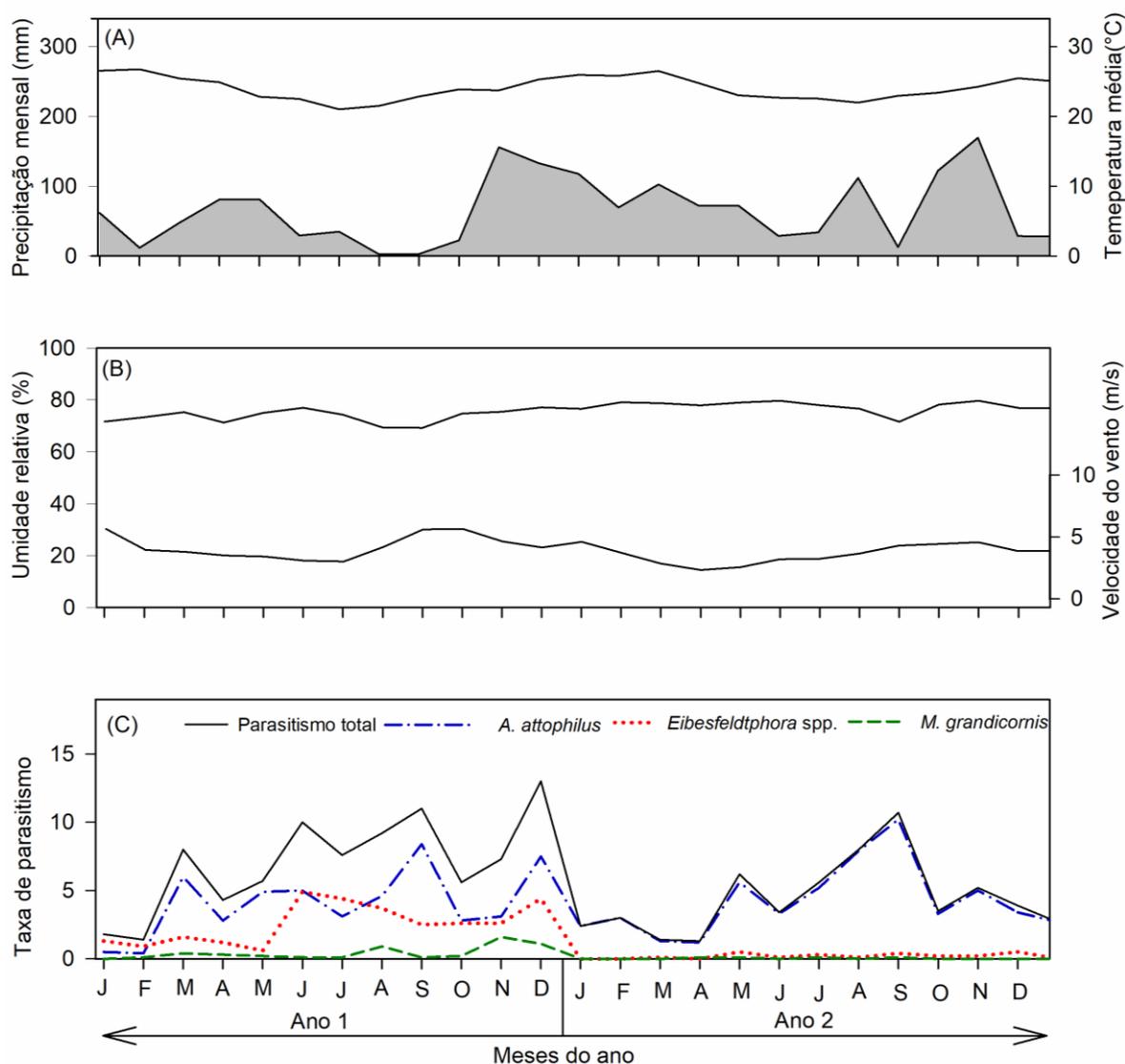


Figura 3. Variação mensal, entre janeiro de 2017 e dezembro de 2018, da precipitação (mm) e temperatura (°C) (A); da umidade relativa (%) e da velocidade do vento (m/s) (B); da taxa de parasitismo total (%) e da causada por cada uma das espécies (*Apocephalus attophilus*, *Eibesfeldtphora* spp. e *Myrmosicarius grandicornis*) (C) às operárias de *A. sexdens* (n= 200) coletadas de trilhas de ninhos (n= 5) localizados na área de Mata Atlântica da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro.

A maior taxa de parasitismo em um ninho amostrado foi de 22% (ninho 3, mês de junho de 2017; Figura 4 A). Parasitismo superior a 15% foi registrado em 11 amostras nos meses de março (N3= 20,5%), maio (N3=17,5%), junho (N2= 22% e N3= 18%), setembro (N3=15% e N4 18%) e dezembro de 2017 (N1=17%, N2=16%) (Figura 4 A) e agosto (N2=18%) e setembro de 2018 (N2=16,5% e N3=17,5%) (Figura 4 B). Parasitismo causado por pelo menos uma das espécies de forídeos foi verificado em 118 amostras (98,3%). Parasitismo causado por *A. attophilus* foi verificado em 92,3% das amostras (111/120), por *Eibesfeldtphora* spp. em 58,3% (70/120) e por *M. grandicornis* em 47,5% (57/120) (Figura 4).

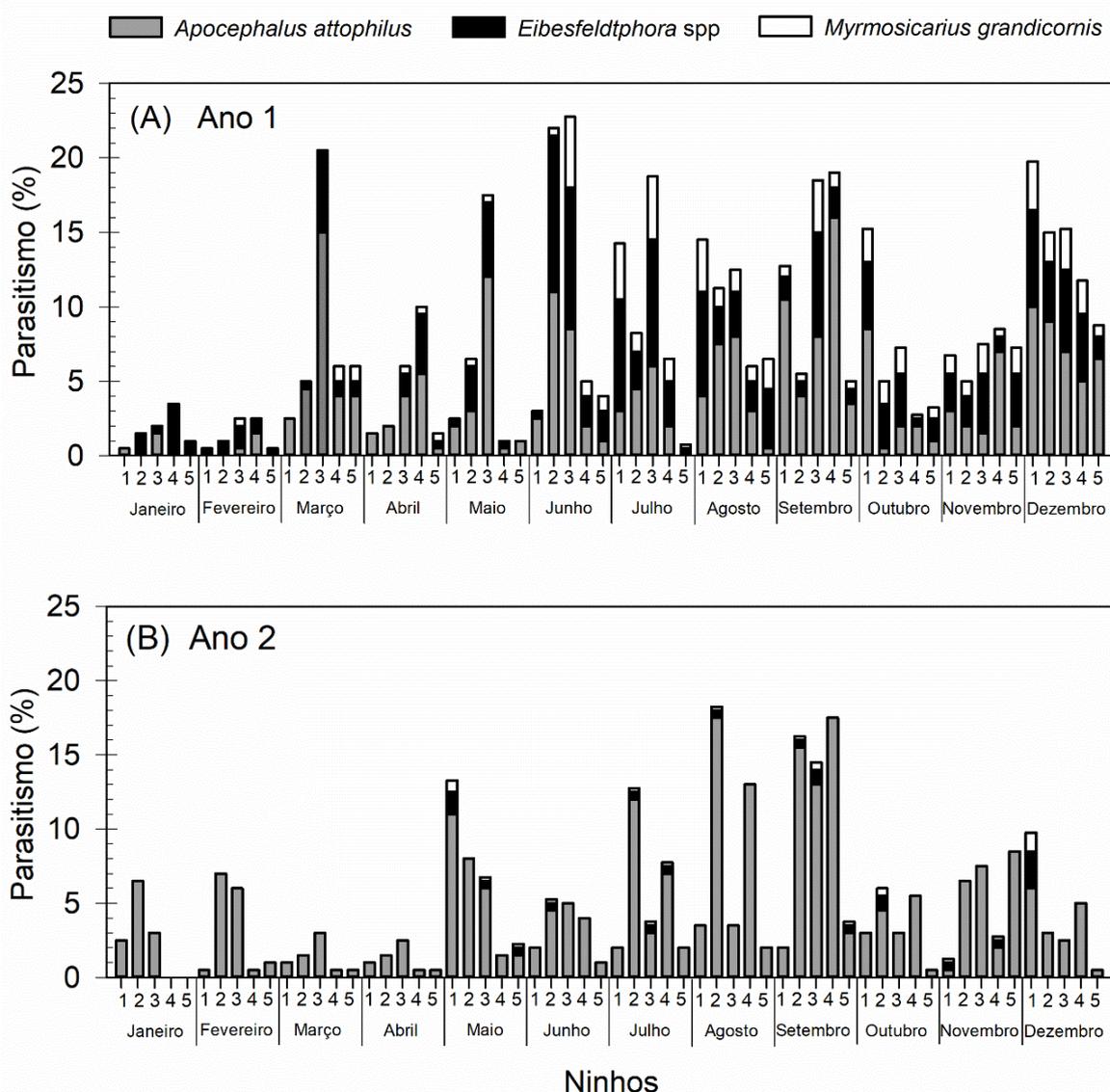


Figura 4. Taxa de parasitismo de *A. attophilus*, *Eibesfeldtphora* spp. e *M. grandicornis* causado às operárias de *A. sexdens* (n= 200) coletadas de cinco ninhos localizados na Mata Atlântica da EEG, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro amostrados mensalmente no ano de 2017 (A) e 2018 (B).

O pico anual de parasitismo de *A. attophilus* (Figura 5 A), *Eibesfeldtphora* spp. (Figura 5 B) e do parasitismo total (Figura 5 C) foi alcançado no mês de setembro, como comprova a análise de regressão que teve ajuste significativo (parâmetro x_0 da equação $y = a \exp\{-0,5[(x-x_0)/b]^2\}$). A equação calculada para *M. grandicornis* não apresentou ajuste significativo ($y = 99661,47 \exp\{-0,5[(x-111,23)/20,85]^2\}$; $R^2 = 0,49$; $F = 4,33$; $p > 0,05$).

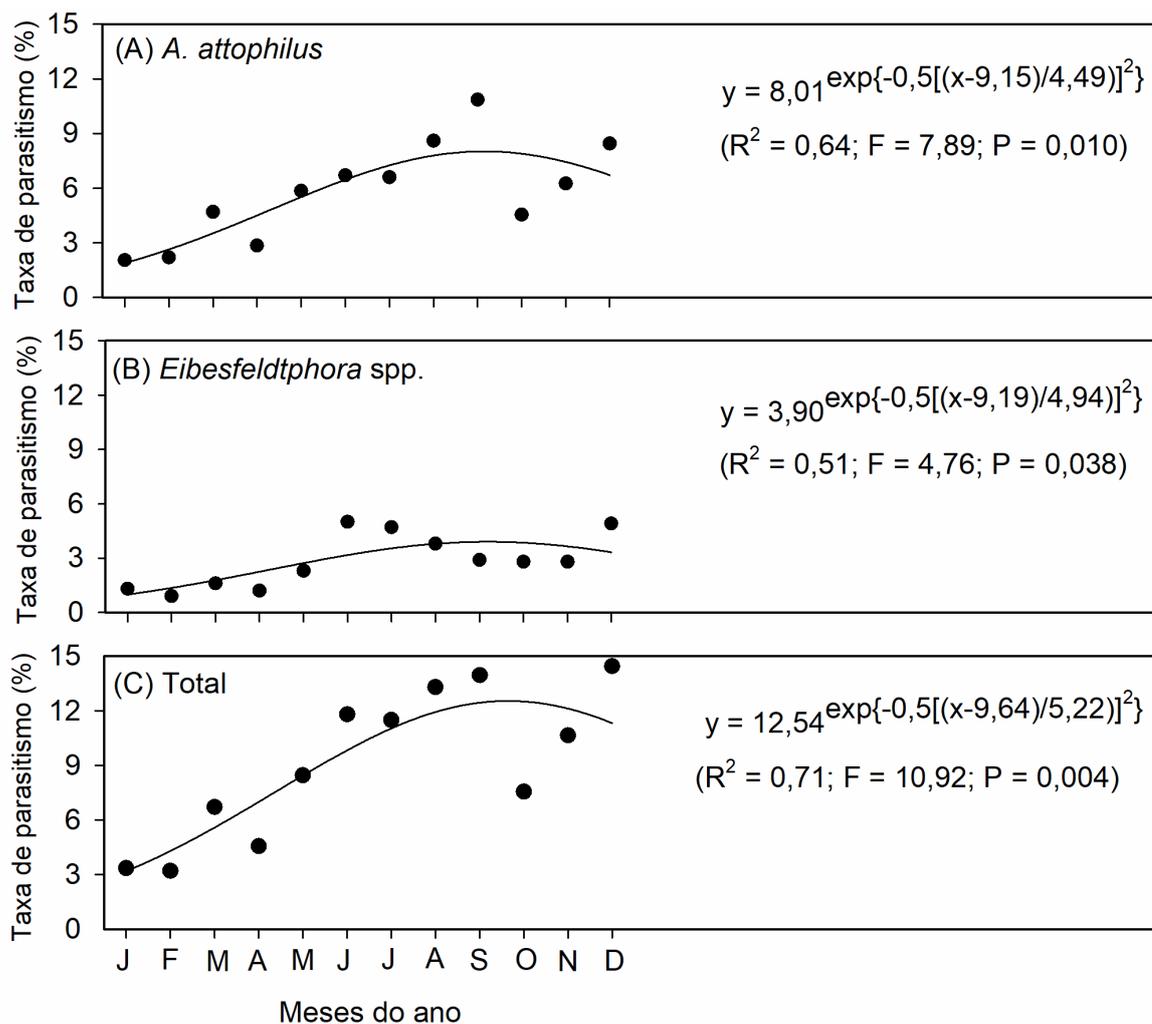


Figura 5. Curva ajustada de parasitismo causado às operárias de *A. sexdens* coletadas de ninhos localizados em Mata Atlântica, ao longo do ano, pelos parasitoides *A. attophilus* (A), *Eibesfeldtphora* spp. (B) e pelo parasitismo total (todas as espécies agrupadas) (C). Pontos no gráfico representam a média mensal de cinco ninhos amostrados de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.

A análise descritiva do parasitismo nas distintas estações climáticas dos dois anos sugere um padrão do parasitismo, com menores taxas no verão, seguidas de um aumento no outono, pico no inverno e queda na primavera (Figura 6). A taxa de parasitismo total foi maior no primeiro ano (2017: $7,1 \pm 0,7$ % vs. 2018: $4,5 \pm 0,6$ %; $F_{23,1} = 5,677$; $p = 0,03$), portanto a comparação do parasitismo total entre estações climáticas foi analisada separadamente para cada ano e não foram observadas diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis.

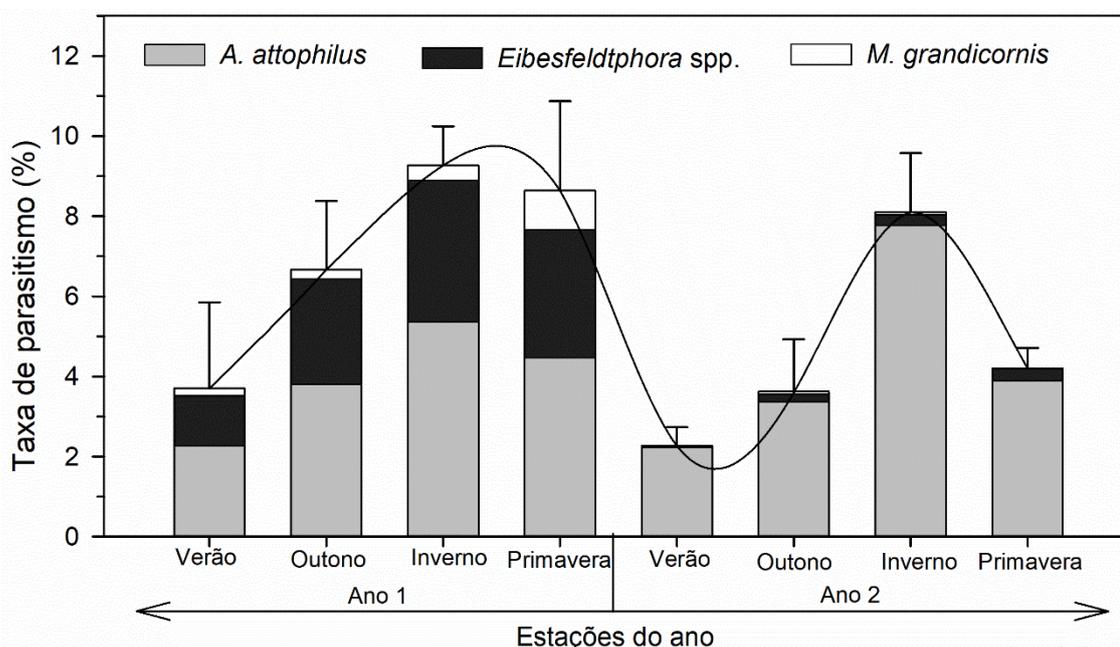


Figura 6. Taxa de parasitismo ($\bar{x} \pm EP$) causada por *A. attophilus*, *Eibesfeldtphora* spp. e *M. grandicornis* às operárias de *A. sexdens* ($n = 200$) coletadas nas quatro estações de 2017 (ano 1) e 2018 (ano 2), de ninhos localizados em área de Mata Atlântica da EEG, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro. A linha representa a tendência da taxa de parasitismo total.

A taxa de parasitismo de *A. attophilus*, analisada separadamente das outras espécies, não diferiu entre os anos (2017: $4,0 \pm 1,4$ %; 2018: $4,3 \pm 0,9$ %; $F_{23,1} = 0,144$; $p = 0,709$). Como a interação ano \times estação não foi significativa ($F_{23,3} = 0,596$; $p = 0,627$), a comparação entre estações climáticas do parasitismo desta espécie se fez com os dados agrupados dos dois anos e foi verificada diferença entre estações ($F_{23,3} = 4,016$; $p = 0,026$; Figura 7 A).

O parasitismo causado pela espécie *Eibesfeldtphora* spp. foi maior no primeiro ano (2017: $2,7 \pm 0,6$ % vs 2018: $0,2 \pm 0,08$ %; $F_{23,1} = 47,156$; $p < 0,001$).

No ano de 2017 foi observada diferença significativa entre estações climáticas, com a maior taxa de parasitismo no inverno e menor no outono (Kruskal-Wallis: $H_{(3,15)} = 10,331$; $p = 0,016$, Figura 7B). No ano de 2018 não foi observada diferença de parasitismo entre estações (Kruskal-Wallis: $H_{(3,15)} = 4,420$; $p = 0,220$).

O parasitismo causado pela espécie *M. grandicornis* foi maior no primeiro ano (2017 = $0,4 \pm 0,2\%$ vs 2018 = $0,03 \pm 0,01\%$; $F_{23,1} = 9,722$; $p = 0,007$), mas não foi observada diferença entre estações climáticas (Kruskal-Wallis: $H_{(3,15)}$ estações 2017 = 1,342; $p = 0,719$; $H_{(3,15)}$ estações 2018 = 2,107; $p = 0,550$).

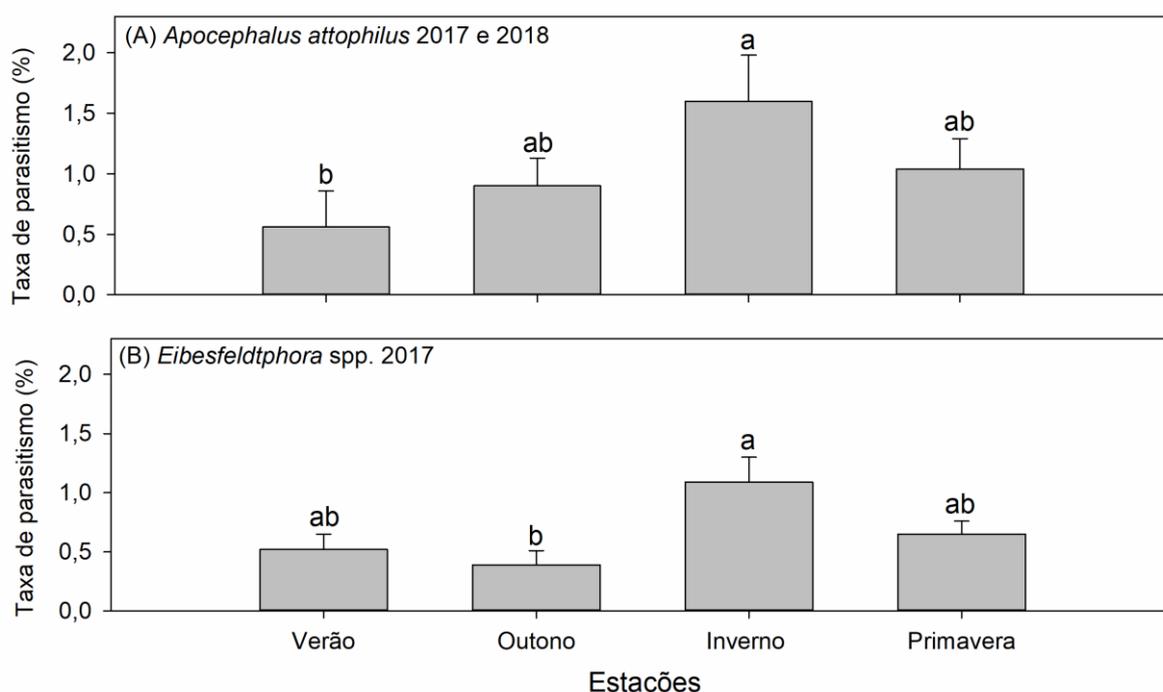


Figura 7. Sazonalidade da taxa de parasitismo ($\bar{x} \pm EP$) causada por *A. attophilus* nos anos 2017 e 2018 ($n = 6000$) (A) e por *Eibesfeldtphora* spp. no ano de 2017 ($n = 3000$) (B) às operárias de *A. sexdens* de cinco ninhos localizados em Mata Atlântica da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro. Letra distinta indica diferença significativa pelo Teste de Tukey $p < 0,005$ (A) e pelo Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,005$ (B).

Um efeito direto negativo sobre o parasitismo total e sobre o parasitismo de *A. attophilus* e *Eibesfeldtphora* spp. foi constatado por meio da análise de trilha (Figura 8). A taxa de parasitismo de *Eibesfeldtphora* spp. também foi influenciada negativamente pela umidade e a taxa de parasitismo de *M. grandicornis* teve efeito positivo da precipitação e da umidade relativa (Figura 8 B; Tabela 1).

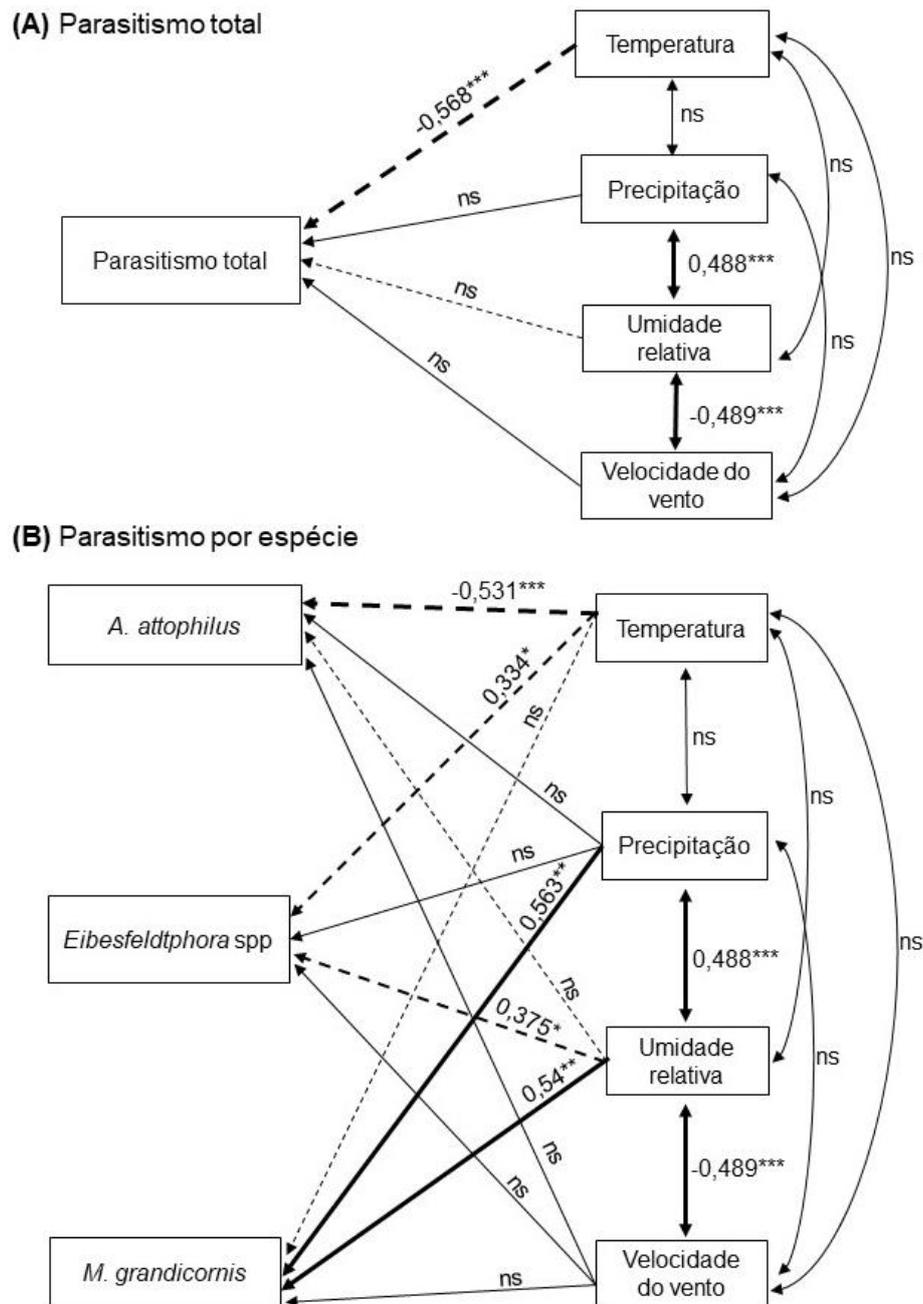


Figura 8. Diagrama da análise de trilha dos efeitos de variáveis climáticas na taxa de parasitismo total (A) e de *A. attophilus*, *Eibesfeldtphora* spp. e *M. grandicornis* (B) causada às operárias de *A. sexdens*. Setas unidirecionais indicam interação causal (efeitos diretos) de uma variável sobre outra e setas bidirecionais indicam correlação. Linhas contínuas indicam efeitos positivos e linhas tracejadas indicam efeitos negativos. A espessura das linhas é proporcional à magnitude da interação. Os coeficientes significativos a $p < 0,10$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ são acompanhados por um, dois ou três asteriscos (*), respectivamente. A ausência de significância está indicada por ns (não significativo $p > 0,10$).

Tabela 1. Efeito direto (ED), efeito indireto (EI) e efeito total (ET) do diagrama de trilha para o modelo de influência de fatores climáticos (temperatura, precipitação, umidade relativa e velocidade do vento) sobre a taxa de parasitismo ocasionada por todas as espécies de parasitoides (parasitismo total) e por *A. attophilus*, *Eibesfeldtphora* spp. e *M. grandicornis* às operárias de *A. sexdens* (n = 24000) coletadas de cinco ninhos localizados em área de Mata Atlântica da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro.

Efeito	Parasitismo total			<i>Apocephalus attophilus</i>			<i>Eibesfeldtphora</i> spp.			<i>Myrmosicarius grandicornis</i>		
	ED	EI	ET	ED	EI	ET	ED	EI	ET	ED	EI	ET
Temperatura (°C)	-0,568***	0,018	-0,550	-0,531**	0,038	-0,493	-0,334*	-0,034	-0,368	-0,128	0,048	-0,080
Precipitação (mm)	0,131	-0,261	-0,130	0,052	-0,136	-0,084	0,050	-0,261	-0,211	0,563*	-0,295	0,268
Umidade relativa (%)	-0,265	0,428	0,163	-0,027	0,130	-0,157	-0,375*	-0,026	-0,401	-0,540**	0,300	-0,240
Velocidade do vento (m/s ²)	0,127	0,036	0,163	0,176	-0,075	0,101	0,015	0,128	0,143	-0,084	0,246	0,162
R ²		0,406			0,280			0,265			0,278	

DISCUSSÃO

A taxa média de 5,8 % de parasitismo ocasionada por forídeos a operárias de *A. sexdens* em ambiente de Mata Atlântica é um valor superior ao máximo de parasitismo registrado por outros autores em levantamentos similares ocorridos em diversos ambientes (Bragança, 2011; Farder-Gomes et al., 2019; Galvão et al., 2019). A maior taxa de parasitismo registrada em uma amostra foi de 22 %. Outros autores relataram amostras com taxas de parasitismo de 16 % em *A. sexdens* (Galvão et al., 2019), 35 % em *A. vollenweideri* (Elizalde e Fogarait, 2011) e mais de 40 % em *A. laevigata* (Pimentel, 2017). Estes valores absolutos de parasitismo registrados em amostras independentes são importantes para considerar o potencial dos forídeos como agentes que possam vir a serem utilizados no controle biológico de formigas-cortadeiras.

A literatura relata que *A. sexdens* pode ser hospedeira de *A. atophillus*; *Apocephalus vicosae* Disney, 2000; *Myrmosicarius catharinensis* Borgmeier, 1928; *M. grandicornis*; *E. bragancai*; *Eibesfeldtphora declinata* Borgmeier, 1925; *Eibesfeldtphora elongata* Brown, 2001 e *E. tonhascai* (Bragança, 2011; Galvão et al., 2019). Porém, dessas oito espécies de forídeos parasitoides, o maior número relatado em um mesmo local foi de cinco espécies (Bragança et al., 2002; Pesquero et al., 2010; Bragança et al., 2016; Galvão et al., 2019).

No presente estudo, quatro espécies de forídeos parasitaram *A. sexdens*: *A. atophillus*, *E. bragancai*, *E. tonhascai* e *M. grandicornis*. Em levantamento similar realizado em Mata Atlântica na região norte do estado do Rio de Janeiro, Galvão et al. (2019) registraram, além destas, a espécie *Apocephalus vicosae*. No entanto, esse estudo de Galvão et al. (2019) foi realizado em áreas de Mata Atlântica primária, enquanto nossa área de estudo sofreu intenso processo de degradação e apresenta menor diversidade de espécies vegetais que outras matas estacionais semidecíduas (Silva e Nascimento, 2001; INEA, 2013). Modificações estruturais das florestas podem causar desequilíbrio nas interações competitivas de organismos e afetar a existência de algumas espécies de insetos (Graham et al., 2004). Possivelmente, *A. vicosae* seja um parasitoide mais sensível às alterações ambientais, como as que ocorreram no ambiente estudado.

O parasitoide *E. bragancai* é relatado pela segunda vez como parasitoide de *A. sexdens* em Mata Atlântica (Galvão et al., 2019), o que reforça a ocorrência deste forídeo como parasitoide de *A. sexdens* neste bioma. Os forídeos *E. elongata* e *E. declinata* são parasitoides frequentes de *A. sexdens* em áreas de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais (Silva et al., 2008; Bragança, 2011), mas, a ausência de registro de parasitismo destes forídeos durante os dois anos de amostragem reforça que estas duas espécies provavelmente não ocorrem na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro.

Forídeos do gênero *Eibesfeldtphora* podem ser identificados na fase de imaturos ao visualizar a pupa entre as mandíbulas das formigas, mas a confirmação em nível de espécie só é possível após verificar a morfologia do ovipositor do adulto. A baixa taxa de emergência de forídeos impediu identificar 96% do parasitismo deste gênero em nível de espécie pois, as fêmeas emergidas representaram apenas 4 % do total de pupas. A baixa taxa de emergência de espécies do gênero *Eibesfeldtphora* foi relatada por outros autores tanto na espécie *A. sexdens* (Galvão et al., 2019) quanto em *A. laevigata* (Pimentel, 2017).

O forídeo *A. attophilus* foi responsável por mais de 70 % do parasitismo total e teve a maior taxa de emergência. Galvão et al. (2019) em *A. sexdens* e Pimentel, 2017 em *A. laevigata*, também constataram maiores taxas de parasitismo de *A. attophilus* e altas taxas de emergência. Dezoito pupas encontradas em uma única operária de *A. sexdens* é o maior número registrado por hospedeiro, pois o maior número verificado na literatura até o momento era de 17 pupas (Galvão et al., 2019).

A variação na temperatura média, da estação mais quente para a mais fria, foi de até 4°C ($26,2 \pm 0,2$ °C nos verões e $22,2 \pm 0,3$ °C no inverno). Embora com uma variação pequena, a temperatura foi a variável climática com efeito mais importante no parasitismo das espécies *A. attophilus* e *Eibesfeldtphora* spp. e no parasitismo total. Altas taxas de parasitismo de *A. attophilus* em setembro foram também descritas por Galvão et al. (2019). Estes autores verificaram que a temperatura e o volume de precipitações não necessariamente explicam variações do parasitismo ao longo dos meses. Porém, o período de amostragem neste trabalho foi de seis meses e não contemplou as estações do verão e outono.

A espécie *A. attophilus* apresentou o máximo parasitismo no inverno e influenciou a curva de parasitismo total ao longo dos dois anos, principalmente no

segundo ano quando as taxas de parasitismo ocasionadas por *Eibesfeldtphora* spp. e *M. grandicornis* foram baixas. O forídeo *A. attophilus* é predominante tanto em ambientes perturbados, quanto em áreas de mata preservada (Galvão et al., 2019). Esta característica demonstra tolerância a variações das condições ambientais, o que é uma característica altamente desejável para um potencial agente de controle biológico de formigas-cortadeiras (Guillade e Folgarait, 2011).

As espécies do gênero *Eibesfeldtphora* são mais sensíveis às modificações ambientais e apresentam baixa ou nenhuma ocorrência em monoculturas de eucalipto (Pesquero et al., 2010; Galvão et al., 2019). Mas, em ambiente preservado e em região de temperaturas amenas há registro de ocorrência durante todo o ano (Silva et al., 2008).

A espécie *M. grandicornis* foi responsável por 0,2 % do parasitismo total (5,8 %). A baixa taxa de parasitismo causada no hospedeiro *A. sexdens* em área de Mata Atlântica foi verificada também por Galvão et al. (2019). Os efeitos da precipitação e da umidade foram os mais importantes sobre o parasitismo de *M. grandicornis*. Esta espécie ataca operárias pequenas próximas aos olheiros (Tonhasca et al., 2001) quando realizam atividades de manutenção do ninho, como a retirada de terra. Após as chuvas as operárias intensificam as atividades (Della Lucia, 2011), o que aumenta a exposição ao ataque de *M. grandicornis*.

Variações da taxa de parasitismo em formigas-cortadeiras já foram associadas a fatores climáticos (Elizalde e Folgarait, 2011; Arruda et al., 2018; Galvão et al., 2019). Altas temperaturas e baixa precipitação podem ser fatores limitantes ao parasitismo em algumas espécies do gênero *Pseudacteon* na Argentina (Folgarait et al., 2003). Variações de temperatura e umidade afetam forídeos de *Atta vollenweideri* e de *Acromyrmex lundii* em condições de laboratório (Guillade e Folgarait, 2011), mas nosso estudo foi o primeiro a analisar o efeito de diferentes variáveis climáticas sobre a taxa de parasitismo de forídeos parasitoides da formiga-cortadeira *A. sexdens* ao longo de dois anos em ambiente natural.

RESUMO E CONCLUSÕES

A taxa média de parasitismo ocasionado pelas espécies de forídeos *A. atophilus*, *E. bragancai*, *E. tonhascai* e *M. grandicornis* às operárias de *A. sexdens* na área de Mata Atlântica da EEEG é de 5,8 %. A espécie *A. atophilus* corresponde a 4,2 % desse parasitismo, *Eibesfeldtphora* spp. a 1,4 % e *M. grandicornis* a 0,2 %. Há um padrão sazonal na taxa de parasitismo ocasionada por *A. atophilus* e *Eibesfeldtphora* spp., com pico no inverno. Os efeitos negativos da temperatura são importantes para explicar as taxas de parasitismo de *A. atophilus*, *Eibesfeldtphora* spp. e do parasitismo total. Os efeitos positivos da umidade e precipitação são importantes sobre o parasitismo de *M. grandicornis*. Estes resultados permitem conhecer o padrão de distribuição do parasitismo das espécies de forídeos que parasitam *A. sexdens* em Mata Atlântica semidecidual de Tabuleiro no estado do Rio de Janeiro e como fatores climáticos podem afetar esse parasitismo, o que contribui para uma melhor avaliação do potencial de forídeos como agentes de controle biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adán, Á., Viñuela, E., Bengochea, P., Budia, F., Del Estal, P., Aguado, P., Medina, P. (2011) Lethal and sublethal toxicity of fipronil and imidacloprid on *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 104:1541-1549.
- Arruda, F.V., Teresa, F.B., Martins, H.C., Pesquero, M.A., Bragança, M.A.L. (2019) Seasonal and Site Differences in Phorid Parasitoidism Rates of Leaf-Cutting Ants. *Environ. Entomol.* 48:61-67.
- Bailez, O. (2016) Estratégias e táticas na interação forídeo-formiga. *Oecol. Aust.* 20:322-331.
- Bragança, M.A., Medeiros, Z.C. (2006) Ocorrência e características biológicas de forídeos parasitoides (Diptera:Phoridae) da saúva *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) em Porto Nacional, TO. *Neotrop. Entomol.* 35:408-411.

- Bragança, M.A.L. (2011) Parasitoides de formigas-cortadeiras. *In*: Della Lucia, T.M.C. (org) *Formigas cortadeiras: da Bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, p. 321-343.
- Bragança, M.A.L., Arruda, F.V., Souza, L.R.R., Martins, H.C., Della Lucia, T.M.C. (2016). Phorid flies parasitizing leaf-cutting ants: their occurrence, parasitism rates, biology and the first account of multiparasitism. *Sociobiology*, 63:1015-1021.
- Bragança, M.A.L., Tonhasca, A.J., Moreira, D.D.O. (2002) Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop. Entomol.*, 31:241-244.
- Broggio, I.S. (2018) *Dinâmica da biomassa arbórea em fragmentos de floresta estacional do Norte Fluminense, RJ*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 93p.
- Brown, B.V., Disney, R.H.L., Elizalde L., Folgarait, P.J. (2010) New species and new records of *Apocephalus* Coquillett (Diptera: Phoridae) that parasitize ants (Hymenoptera: Formicidae) in America. *Sociobiology*, 55:165-190.
- Della Lucia, T., Gandra, L.C., Guedes R.N. (2014) Managing leaf cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag. Sci.* 70:14-23.
- Della Lucia, T.M.C. (2011) *Formigas-cortadeiras: da biocologia ao manejo*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 91p.
- Disney, R.H.L. (1994) *Scuttle flies: The Phoridae*. London: Chapman and Hall: 467p.
- Disney, R.H.L., Elizalde, L., Folgarait, P.J. (2006) New species and revision of *Myrmosicarius* (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 47:771-809.
- Disney, R.H.L., Elizalde, L., Folgarait, P.J. (2009) New species and new records of scuttle flies (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter and army ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 54:601-632.
- Elizalde, L., Folgarait, J. (2011) Biological attributes of Argentinian phorid parasitoids of leaf-cutting ants, *Acromyrmex* and *Atta*. *J. Nat. Hist.*, 45:2701-2723.
- Elizalde, L., Patrock, R.J.W., Disney, R.H.L., Folgarait, P.J. (2017) Spatial and temporal variation in host-parasitoid interactions: leafcutter ant hosts and their phorid parasitoids. *Ecol. Entomol.* 43:114-125.

- Erthal Junior, M., Tonhasca Junior, A. (2000) Biology and oviposition behavior of the phorid *Apocephalus attophilus* and the response of its host, the leafcutting ant *Atta laevigata*. *Entomol Exp Appl.* 95:71-75.
- Farder-Gomes, C.F., Santos, H.C., Oliveira, M.A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., (2019) Morphology of ovary and spermathecae of the parasitoid *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae). *Protoplasma*, 256:3-11.
- Folgarait, P.J, Patrock, R.J.W., Gilbert, L.E. (2006) Development of *Pseudacteon nocens* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 99:295-307.
- Folgarait, P.J. (2013) Leaf-cutter ant parasitoids: current knowledge. *Psyche J. Entom.* 2013:1-10.
- Folgarait, P.J., Bruzzone, O. A., Gilbert, L.E. (2003) Seasonal patterns of activity among species of black fire ant parasitoid flies (*Pseudacteon*: Phoridae) in Argentina explained by analysis of climatic variables. *Biol. Control* 28:368-378.
- Folgarait, P.J., Chirino, M.G., Patrock, R.J.W., Gilbert, L.E. (2005) Development of *Pseudacteon obtusus* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 34:308-316.
- Galvão, A.R.A., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Abib, P.N., Pimentel, F.A., Pereira, T.P. (2019). Parasitism by phorids on leaf cutter ants *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) in natural and agricultural environments. *Zool. Sci.* 01:01-09.
- Graham, J.H., Hughie, H.H., Jones, S., Wrinn, K., Krzysik, A.J., Duda, J.J., et al. (2004) Habitat disturbance and the diversity and abundance of ants (Formicidae) in the southeastern fall-line sandhills. *J. Insect Sci.* 4:1-15.
- Guillade, A. C., Folgarait, P. J. (2011) Life-history traits and parasitism rates of four phorid species (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Atta vollenweideri* (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. *J. Econ. Entomol.* 104:32-40.
- Guillade, A.C., Folgarait, P.J. (2014) Natural enemies of *Atta vollenweideri* (Hymenoptera: Formicidae) leaf-cutter ants negatively affected by synthetic pesticides, chlorpyrifos and fipronil. *J. Econ. Entomol.* 107:105-114.
- Instituto Estadual do Ambiente (INEA), 2013. Plano de Manejo da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba (EEEG): <http://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/01/EEEG-RE-1.pdf> em: 12/03/2019.
- Li, C.C. (1975) *Path analysis - a primer*. 3 ed. Pacific Grove, The Boxwood. 347p.

- Pesquero, M.A., Bessa, L.A., Silva, H.C.M., Silvia, L.C., Arruda, F.V. (2010) Influência ambiental na taxa de parasitismo (Diptera:Phoridae) de *Atta laevigata* e *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Biol. Neotrop.* 7:25-38.
- Pimentel, F.A. (2017) Forídeos parasitoides de *Atta laevigata* (Smith, 1958) (Hymenoptera: Formicidae), em Mata Atlântica: Ocorrência, taxa de parasitismo e tamanho de hospedeiro Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 51p.
- RadamBrasil (1983) Levantamento de recursos naturais. V.32, folha S/F. 23/24. Rio de Janeiro/ Vitória. Ministério das Minas e Energia, Rio de Janeiro.
- Silva, G. C., Nascimento, M. T. (2001). Fitossociologia de um remanescente de mata sobre tabuleiros no norte do estado do Rio de Janeiro (Mata do Carvão). *Braz. J. Bot.* 24:51-62.
- Silva, S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca Jr., A., Della Lucia, T.M.C. (2008) Survey of *Neodohniphora* spp. (Diptera: Phoridae) at colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) and specificity of attack behaviour in relation to their hosts. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 98:203-206.
- Silva, V.S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca Jr., A. (2007) Effect of the size of workers of *Atta sexdens rubropilosa* o the attack behavior of *Neodohniphora*spp. (Diptera: Phoridae). *Sociobiology*, 50:35-44.
- Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG. Universidade Federal de Viçosa, UFV. (1997) Versão 7.1. Viçosa, MG. 150p.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Third edition. W. H. Freeman, New York, New York, USA.
- Tonhasca, A.Jr., Bragança, M.A.L., Erthal, M.Jr. (2001) Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera: Phoridae) in relationship to it host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Soc.* 48:154-158.
- Uribe, S., Brown, B.V., Bragança, M.A.L., Queiroz, J.M., Nogueira, C.A. (2014) New species of *Eibesfeldtphora* Disney (Diptera: Phoridae) and a new key to the genus. *Zootaxa*, 3814:443-450.
- Villela, D.M.; Nascimento, M.T.; Aragão, L.E.O.C. Gama, D.M. (2006) Effect of selective logging on forest structure and nutrient cycling in a seasonally dry Brazilian Atlantic forest. *J. Biogeogr.*, 33:506-516.

3.2 PREFERÊNCIA DO FORÍDEO PARASITOIDE *Eibesfeldtphora tonhascai* POR TAMANHO E ESPÉCIE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS

RESUMO

Forídeos parasitoides da espécie *Eibesfeldtphora tonhascai* são inimigos naturais das formigas-cortadeiras considerados promissores para o controle biológico. Em condições naturais *E. tonhascai* parasita operárias de tamanhos variados, das espécies *Atta sexdens* e *Atta laevigata*. O objetivo do trabalho foi verificar se o forídeo *E. tonhascai* apresenta preferência por espécie hospedeira ou por tamanho de forrageadora. Operárias de *A. sexdens* de largura de cápsula cefálica entre três e cinco milímetros foram preferidas por *E. tonhascai*. Não se verificou preferência por espécie porque o número de voos de inspeção, de tentativas de ataque e de ataques realizados pelos forídeos sobre *A. sexdens* e *A. laevigata* foram similares. Além disso, as taxas de parasitismo causadas por *E. tonhascai* às operárias de *A. sexdens* e *A. laevigata* também foram similares ($p < 0,01$) nos dois experimentos em que se comparou as espécies (5,6 % e 5,2 %; 37,0 % e 33,2 % respectivamente). A taxa de emergência de adultos foi maior em *A. sexdens* (45,4%) que em *A. laevigata* (7,2 %). Este estudo revela que fêmeas da espécie *E. tonhascai* emergidas da formiga *A. sexdens* apresentam preferência por operárias de tamanho maior e não por espécie hospedeira, mas que a taxa de emergência de adultos é maior na espécie *A. sexdens*.

ABSTRACT

PREFERENCE OF THE PARASITOID PHORID *Eibesfeldtphora tonhascai* BY SIZE AND SPECIE OF THE LEAF-CUTTER ANT

Phorid parasitoids of the species *Eibesfeldtphora tonhascai* are natural enemies of leaf-cutter ants and are considered promising for biological control. Under natural conditions, *E. tonhascai* parasitizes workers of different sizes of the species *Atta sexdens* and *Atta laevigata*. The objective of this study was to verify if the phorid *E. tonhascai* has a preference either for a host species or a forager size. Workers of *A. sexdens* with head capsule width between 3 - 5 mm were preferred by *E. tonhascai*. There was no preference for species because the number of inspection flights, attack attempts, and attacks of the phorids on *A. sexdens* and *A. laevigata* were similar. Furthermore, the parasitism rates of *E. tonhascai* on the workers of *A. sexdens* and *A. laevigata* were also similar ($p < 0.01$) in the two experiments that compared the species (5.6 % and 5.2 %; 37.0 % and 33.2 %, respectively). However, the adult emergence rate was higher in *A. sexdens* (45.4 %) than in *A. laevigata* (7.2 %). This study reveals that females of the species *E. tonhascai* emerged from *A. sexdens* ants prefer larger sized workers and not for a host species, but that the adult emergence rate is higher in the species *A. sexdens*.

INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) são herbívoros dominantes dos neotrópicos (Della Lucia et al., 2014). Estas formigas são consideradas pragas de grande importância econômica em ambientes agrícolas e florestais pelas perdas que provocam e por serem de difícil controle (Montoya-Lerma et al., 2012). O uso de iscas formuladas com os ingredientes ativos sulfluramida ou fipronil é o meio de controle mais utilizado (Della Lucia et al., 2014). Embora eficiente, a sulfluramida foi catalogada como poluente orgânico persistente pela Convenção de Estocolmo, o que restringe o uso desta substância (Stockholm Convention, 2009; Bailez 2016). Além disso, a sulfluramida e o fipronil foram listados como pesticidas altamente perigosos pela FSC (Forest Stewardship

Council, 2010) e existe previsão de serem proibidos em áreas certificadas no Brasil ano de 2021 (FSC, 2010; Zanuncio et al., 2016).

A ausência de métodos alternativos de controle estimulou pesquisas com inimigos naturais como fungos entomopatogênicos, fungos competidores e insetos parasitoides a fim de explorar seu potencial como agentes de controle biológico das formigas-cortadeiras (Goffré e Folgarait, 2015; Bailez 2016). O uso de inimigos naturais em programas de controle biológico destas formigas permitiria reduzir os efeitos negativos sobre organismos não alvos e não promoveria a contaminação ambiental (Guillade e Folgarait, 2014).

Entre os parasitoides com potencial para controle biológico de formigas-cortadeiras se destacam os forídeos (Diptera: Phoridae) dos gêneros *Apocephalus*, *Eibesfeldtphora* (= *Neodohrniphora*) e *Myrmosicaurius* (Galvão et al., 2019). Forídeos parasitoides provocam nas formigas-cortadeiras taxas médias de parasitismo de 2 a 5% (Arruda et al., 2019; Galvão et al., 2019). Além do parasitismo, a presença dos forídeos nas trilhas de forrageamento altera o comportamento de operárias, provoca abandono das cargas, retorno antecipado ao ninho e suspensão do forrageamento (Bragança et al., 1998; Bailez, 2016).

Eibesfeldtphora tonhascai Brown (2001) é um dos forídeos com potencial para controle biológico por ser parasitoide de duas das principais formigas-cortadeiras, *Atta sexdens* Linnaeus, 1758 (Galvão et al., 2019) e *Atta laevigata* Smith (1958) (Bragança et al., 2002). As fêmeas de *E. tonhascai* parasitam com maior frequência operárias maiores (Bragança et al., 2002), mas se desconhece se isto é consequência de uma preferência por atacar indivíduos maiores ou se é resultado de uma maior disponibilidade de hospedeiros destes tamanhos no momento do ataque. Do mesmo modo, se desconhece se o forídeo manifesta preferência por parasitar uma das duas espécies hospedeiras e se o sucesso reprodutivo é maior em alguma delas.

Verificar se há preferência pelo tipo de hospedeiro é importante para estabelecer o potencial destes insetos como agentes de controle biológico e para o correto desenvolvimento de métodos de criação do parasitoide. O objetivo deste trabalho foi verificar se *E. tonhascai* manifesta preferência por tamanho e espécie da formiga hospedeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Forídeos

Forídeos parasitoides adultos do gênero *Eibesfeldtphora* foram coletados no campo no mesmo dia dos experimentos. Os parasitoides foram capturados quando sobrevoavam as trilhas de forrageamento de ninhos de *A. sexdens* localizados na Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, 21°23' S e 41°05' W, Rio de Janeiro, Brasil. A vegetação do local corresponde ao bioma de Mata Atlântica e está caracterizada como floresta estacional semidecidual de tabuleiro. O clima da região é quente e úmido com influência marinha, apresenta inverno ameno e estação chuvosa no verão (INEA, 2013).

Os parasitoides foram capturados com aspirador entomológico quando sobrevoavam formigas operárias (Galvão et al., 2019). Os insetos coletados foram armazenados em caixa térmica (15-20°C) e transportados para o laboratório. Após serem utilizados em testes comportamentais os forídeos foram sacrificados e identificados em nível de espécie com auxílio de microscópio estereoscópico e guias de identificação (Brown, 2001; Uribe et al., 2014).

Formigas

As formigas utilizadas nos testes foram obtidas de colônias adultas de criação em laboratório (quatro a seis anos de idade) das espécies *A. sexdens* e *A. laevigata*. As colônias eram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura e $85 \pm 5\%$ de umidade relativa, fotoperíodo de 10:14 (luz/escuro) e com folhas de *Ligustrum japonicum*, *Acalypha wilkesiana* e *Rosa* spp. como alimento. Dez horas antes de cada teste formigas das duas espécies foram retiradas das colônias e agrupadas por espécie e por tamanho de operária em potes plásticos. Quatro classes de tamanho de operária foram estabelecidas de acordo com a largura da cápsula cefálica: I. (1,0 - 1,9 mm); II. (2,0 - 2,9 mm); III. (3,0 - 3,9 mm) e IV. (4,0 - 5,0 mm).

Experimento 1 - Preferência por tamanho de hospedeiro

Cinco operárias de cada uma das classes de tamanho I, II, III e IV (n= 20) foram marcadas no tórax com tinta à base de água (acrilex®) de distintas cores e introduzidas em uma arena de ataque fechada feita em acrílico transparente (20x20x20 cm). A cor da marcação das operárias de cada classe de tamanho foi aleatorizada a cada teste. A inocuidade da tinta foi verificada previamente mediante testes nos quais não se detectou diferença de comportamento, nem das formigas nem dos forídeos, quando confrontados a operárias com ou sem tórax marcado. Talco foi colocado nas paredes da arena para evitar o escape das formigas. Após 10 minutos uma fêmea de *E. tonhascai* foi liberada no interior da arena.

O teste teve duração de 15 minutos e foi registrado o tempo de latência, o número de voos de inspeção, o número de tentativas de ataque e de ataques efetuados pelo forídeo às formigas (Silva et al., 2008; Gazal et al., 2009). O teste foi repetido até alcançar 100 repetições nas quais ocorreu pelo menos um ataque do forídeo. Após terminar cada teste as formigas foram introduzidas em pote plástico com tampa (9 x 6 x 4 cm), alimentadas com solução de sacarose (10 %) e transferidas para sala climatizada (25 ± 1 °C, 80 ± 5 % UR e 12 h de fotoperíodo) (Galvão et al., 2019). Os potes foram vistoriados diariamente e as formigas mortas foram individualizadas em tubos de ensaio (5 mL) com tampa. As formigas sobreviventes após 20 dias da realização dos testes foram consideradas não parasitadas e foram descartadas (Bragança, 2011).

Os tubos com formigas mortas foram diariamente examinados durante 45 dias a procura de sinais de parasitismo (Tonhasca, 1996; Bragança, 2011) e em base ao número de formigas com sinais de parasitismo se estabeleceu a taxa de parasitismo de cada classe de operária submetida ao teste de ataque. A taxa de parasitismo das formigas (TP) foi calculada pela fórmula: $TP = (\text{n}^\circ \text{ de formigas parasitadas} / \text{n}^\circ \text{ de formigas do teste}) \times 100$. A taxa de emergência de adultos foi estimada pela fórmula: $TE = (\text{n}^\circ \text{ de forídeos emergidos em cada espécie} / \text{n}^\circ \text{ de formigas parasitadas}) \times 100$.

Experimento 2 - Preferência por espécie hospedeira

No centro de uma arena de ataque foram introduzidos dois potes plásticos sem tampa ($\varnothing = 7$; 4 cm altura) a quatro centímetros de distância um do outro. Cinco operárias de *A. sexdens* foram introduzidas em um dos potes e cinco de *A. laevigata* no outro. O tamanho da largura da cápsula cefálica das operárias de ambas as espécies variou de três a cinco milímetros (classes de tamanho III e IV). Após 10 minutos uma fêmea do forídeo foi introduzida na arena de ataque.

Os forídeos foram observados durante 15 minutos e registrou-se a latência, o número de voos de inspeção, o número de tentativas de ataque e o número de ataques realizados pelos forídeos às operárias de cada espécie. O teste foi repetido até obter 50 repetições, nas quais o forídeo efetuou pelo menos um ataque a alguma das formigas das duas espécies. Depois do teste as formigas foram mantidas em laboratório e a taxa de parasitismo foi determinada como foi descrito no experimento 1.

Experimento 3 – Taxa de emergência de adultos por espécie hospedeira

Cinco operárias da espécie *A. sexdens*, com largura de cápsula cefálica de três a cinco milímetros, foram introduzidas em uma arena de ataque. Após dez minutos uma fêmea de *E. tonhascai* foi introduzida na arena e durante 15 minutos registrou-se o tempo de latência, o número de voos de inspeção, o número de tentativas de ataque e o número de ataques efetuados. Ao final do teste o forídeo foi recolhido da arena e mantido em repouso no tubo de captura. Após 20 minutos o mesmo forídeo foi introduzido em outra arena contendo operárias de *A. laevigata*. A ocorrência dos mesmos atos comportamentais descritos no teste anterior com *A. sexdens* foi registrada. A ordem de apresentação das espécies de formiga foi alterada a cada teste. O experimento foi repetido até obter 100 testes em que ocorreu pelo menos um ataque. As formigas foram submetidas às mesmas condições descritas no experimento 1 e as taxas de parasitismo e de emergência foram calculadas.

Análises de dados

No experimento 1 os dados de latência, de voo de inspeção, de tentativas de ataque, de ataques e de taxas de parasitismo registradas nas quatro classes de tamanho de operária foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Nos experimentos dois e três as mesmas variáveis foram comparadas entre as espécies *A. sexdens* e *A. laevigata* pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. As proporções de indivíduos emergidos *versus* não emergidos registradas nas classes de tamanhos de operária III e IV do primeiro experimento foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado. O mesmo teste foi utilizado para comparar a proporção de emergidos *versus* não emergidos registrada para as duas espécies hospedeiras do terceiro experimento.

RESULTADOS

Um total de 560 forídeos adultos de *Eibesfeldtphora* foram coletados: três foram fêmeas de *Eibesfeldtphora bragancai* e 89 machos, os quais foram descartados. Os 468 indivíduos restantes foram fêmeas de *E. tonhascai* utilizadas nos testes (157; 148 e 163 nos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente).

3.1. Experimento 1: Preferência por tamanho de hospedeiro

As fêmeas de *E. tonhascai* tiveram latência de $2,2 \pm 0,2$ minutos antes de realizar voos de inspeção sobre operárias. As operárias das classes III e IV foram mais inspecionadas e sofreram maior número de tentativas de ataque e ataques ($H_{\text{inspeção}} (3, 100) = 256,70$; $p < 0,001$; $H_{\text{tentativas}} (3, 100) = 275,64$; $p < 0,001$; $H_{\text{ataques}} (3, 100) = 260,10$; $p < 0,001$; Fig. 1 A, B e C, respectivamente). Na classe de tamanho II apenas uma operária foi atacada e parasitada, mas não houve emergência (Fig. 1 C e D) e na classe I não houve ataque (Fig. 1 B e C). A taxa de parasitismo foi maior nas operárias das classes III e IV ($H (3, 400) = 51,27$; $p < 0,001$; Fig. 1 D). A porcentagem de forídeos adultos emergidos não diferiu entre as classes III e IV ($8/30 = 26,7\%$, vs. $5/36 = 13,8\%$; $\chi^2 = 0,98$; g.l. = 1; $p = 0,32$; Fig. 1 E).

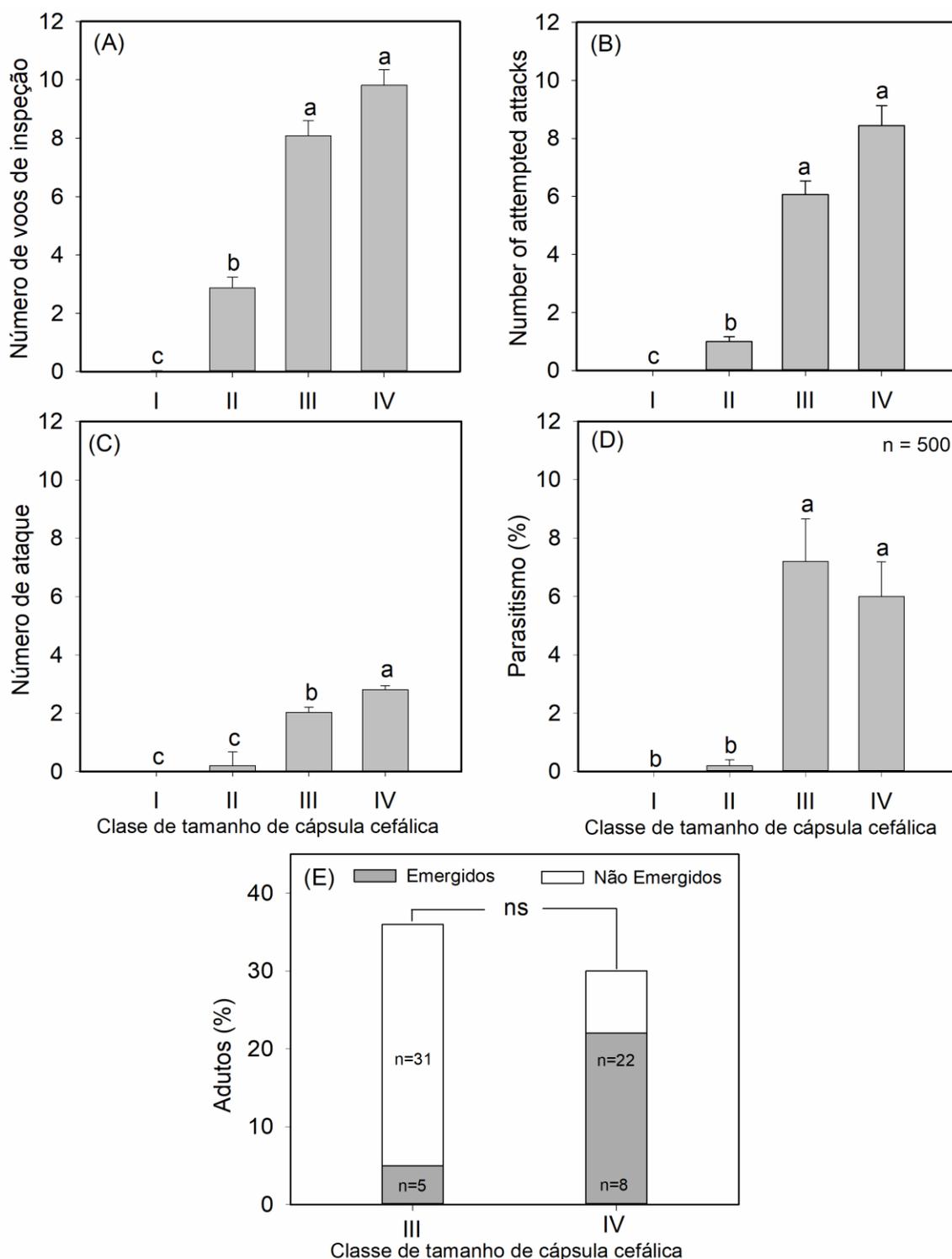


Figura 1. Número de voos de inspeção (A), de tentativas de ataque (B) e de ataques (C) efetuados pelo forídeo *E. tonhascai* a grupos de cinco operárias de *A. sexdens* das classes de tamanhos I. 1,0-1,9 mm; II. 2,0-2,9 mm; III. 3,0-3,9 mm e IV. 4,0-5,0 mm. Taxa de parasitismo (D) e proporção de adultos emergidos versus não emergidos (E). Figuras A,B,C e D: teste de Kruskal-Wallis; letra distinta indica diferença significativa pelo teste de Dunn $p < 0,001$. Figura E: teste de Qui-quadrado.

Experimento 2 - Preferência por espécie hospedeira

O tempo de latência de *E. tonhascai* foi de $7,8 \pm 0,32$ minutos. O número de voos de inspeção sobre ambas as espécies foi similar ($U_{(1, 50)} = 1155,0$; $p = 0,50$; Fig. 2 A). Do mesmo modo não houve diferença no número de tentativas de ataque e de ataques ($U_{(1, 50)} \text{ tentativas} = 1173,0$; $p = 0,59$; Fig. 2 B; $U_{\text{ataques}}(1, 50) = 1191,5$; $p = 0,68$; Fig. 2 C). A taxa de parasitismo dos forídeos nas operárias de *A. sexdens* não diferiu da registrada nas operárias de *A. laevigata* ($14/250 = 5,6\%$; vs. $13/250 = 5,2\%$; respectivamente; $U_{(1,50)} = 1238,0$; $P = 0,91$; Fig. 2 D). O menor número de indivíduos adultos emergidos em ambas as espécies (dois de cada espécie) impossibilitou a comparação das taxas de emergência.

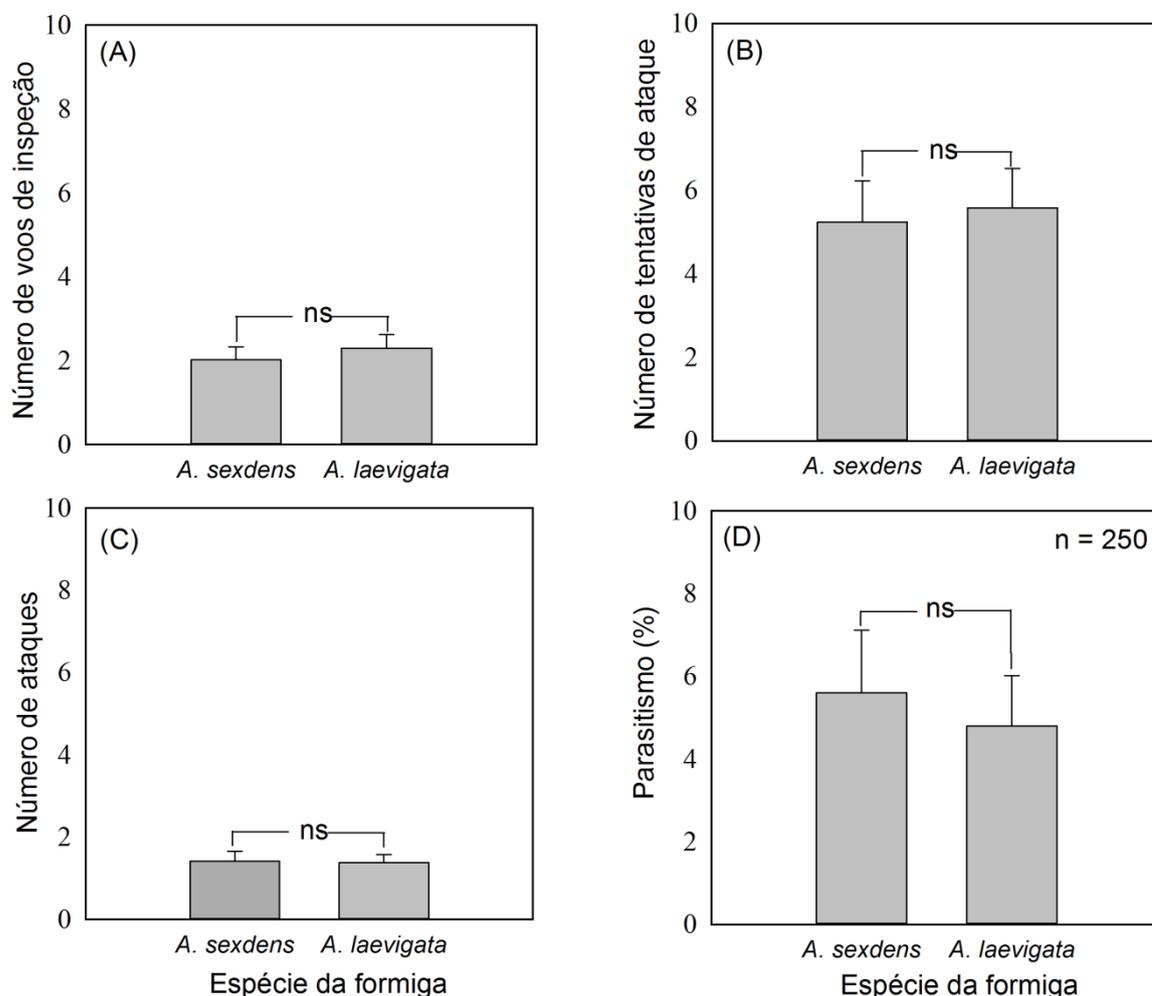


Figura 2. Número de voos de inspeção (A), de tentativas de ataque (B) e de ataques (C) efetuados durante 15 minutos por *Eibesfeldtphora tonhascai* ($n = 50$) a cinco operárias de *Atta sexdens* e de *Atta laevigata* e taxa de parasitismo (D) Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$, ns= diferença não significativa.

Experimento 3 - Taxa de emergência de adultos por espécie hospedeira

As frequências de voos de inspeção, de tentativas de ataque e de ataques realizados por fêmeas de *E. tonhascai* sobre operárias de *A. sexdens* não foram diferentes das realizadas em operárias de *A. laevigata* ($U_{\text{voos de inspeção}} (1, 100) = 4396,5$; $p = 0,140$; $U_{\text{tentativas de ataque}} (1, 100) = 4947,5$; $p = 0,899$; $U_{\text{ataques}} (1, 100) = 4780,5$; $p = 0,581$; Fig. 3 A, B e C).

A taxa de parasitismo de forídeos em *A. sexdens* (37,0 %; 185/500) foi similar à de *A. laevigata* (33,2 %; 166/500) ($t_{(1, 100)} = 10404,0$; $p = 0,370$; Fig. 3 D). No entanto, a taxa de emergência de adultos foi maior em *A. sexdens* ($84/185 = 45,4\%$ vs. $12/166 = 7,2\%$ de *A. laevigata*) ($\chi^2 = 62,27$; g.l. = 1; $p < 0,001$; Fig. 3 E).

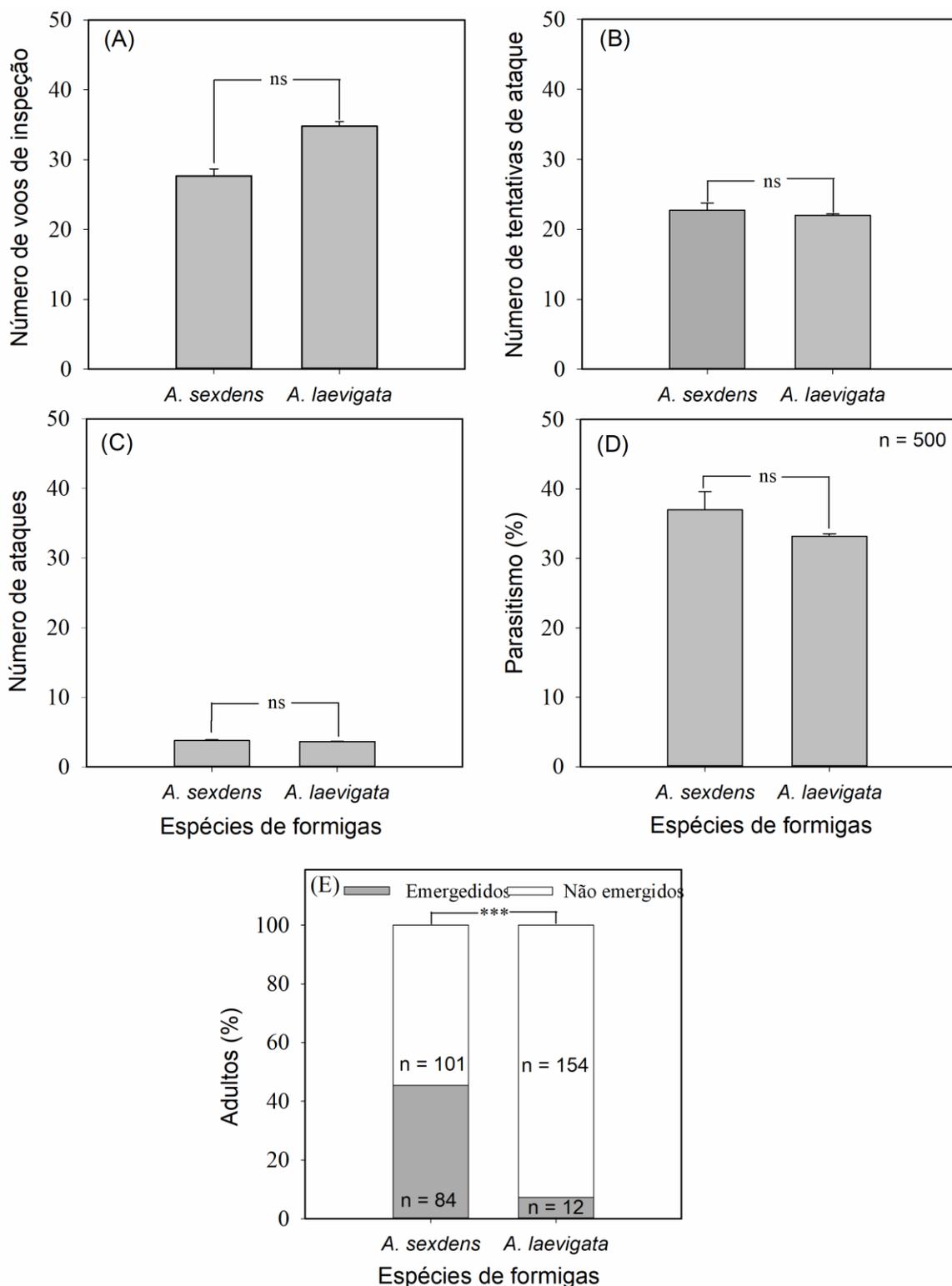


Figura 3. Número de voos de inspeção (A), de tentativas de ataque (B) e de ataques (C) efetuados durante 15 min pelo forídeo *E. tonhascai* a cinco operárias das espécies *Atta sexdens* ou *Atta laevigata*. Taxa de parasitismo (D) e proporção de forídeos adultos emergidos vs não emergidos (E). Figuras A, B, C e D: teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$; ns: diferença não significativa. Figura E: teste de Qui-quadrado; ***: diferença significativa $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

As fêmeas de *E. tonhascai* apresentaram preferência pelas operárias das classes III e IV. Os forídeos aceitam as formigas para a oviposição após reconhecimento de sinais específicos que indicam a aptidão deste hospedeiro para o parasitismo (Gazal et al., 2009; Bailez 2016). O tamanho da formiga hospedeira pode representar para o parasitoide um sinal visual que indique adequabilidade para um bom desenvolvimento da larva (Silva et al., 2007; Gazal et al., 2009; Farder-Gomes et al., 2019).

Hospedeiros maiores podem representar maior quantidade de recurso para o desenvolvimento e sobrevivência das larvas (Godfray, 1994; Bacci et al., 2019). As fêmeas de *E. tonhascai* podem ter desenvolvido preferência por hospedeiros maiores como consequência de um aumento de seu sucesso reprodutivo nestes indivíduos, como parece ocorrer em outras espécies de forídeos parasitoides (Feener, 1987; Farder-Gomes et al., 2017; 2019).

Forídeos do gênero *Pseudacteon* são altamente seletivos ao parasitar operárias de *Solenopsis invicta* e o tamanho do parasitoide emergido está diretamente correlacionado com o tamanho da cabeça da formiga parasitada (Folgarait et al., 2006; Chen e Fadamiro, 2017). Forídeos parasitoides que parasitam diversas espécies de formigas-cortadeiras podem parasitar hospedeiros sem distinção de tamanhos, como no caso de *Apocephalus attophilus* Borgmeier, 1928 (Erthal e Tonhasca, 2000) ou parasitar com maior frequência hospedeiros de tamanho específico, como é o caso de *Myrmosicarius grandicornis* e *Eibesfeldtphora* spp. (Silva et al., 2007; Farder-Gomes et al., 2017). A exploração de hospedeiros de tamanho específico possibilita que mais de uma espécie de forídeo possa explorar simultaneamente uma mesma espécie de formiga em nichos diferentes e evitar a competição interespecífica (Silva et al., 2008; Chen e Fadamiro, 2017).

O forídeo *E. tonhascai* parasita em condições naturais operárias de *A. sexdens* (Galvão et al., 2019) e de *A. laevigata* (Bragança et al., 2002). Sinais químicos do hospedeiro poderiam ser aprendidos no estágio imaturo e serem utilizados na fase adulta para identificar a espécie hospedeira (Barron, 2001; Canale et al., 2014). Neste trabalho esperava que *E. tonhascai* manifestasse

preferência para parasitar *A. sexdens*, porque as fêmeas utilizadas nos testes foram capturadas em trilhas dessa espécie. Entretanto, *E. tonhascai* não manifestou preferência por espécie de formiga, pois o número de ataques e a taxa de parasitismo foram similares em ambas as espécies. É provável, que conforme sugerido por Gazal et al. (2009) para fêmeas de *Eibesfeldtphora elongata*, *E. tonhascai* também selecione hospedeiros por meio de sinais visuais, os quais que não seriam suficientes para um forídeo discriminar formigas morfologicamente semelhantes (Chen e Fadamiro, 2017) como *A. sexdens* e *A. laevigata*.

O número de ataques e a taxa de parasitismo que *E. tonhascai* causa a *A. sexdens* e a *A. laevigata* não diferiu, mas, a taxa de emergência de adultos foi maior em *A. sexdens*. Fêmeas de parasitoide emergidas de operárias de *A. sexdens* poderiam transferir aos seus descendentes mecanismos de resistência imunológicos contra processos fisiológicos defensivos ao parasitismo em *A. sexdens* (Feener e Brown, 1997; Bailez, 2016). A menor emergência de adultos em *A. laevigata* pode ser consequência de um mecanismo fisiológico de resistência ao parasitismo mais eficiente nesta espécie de formiga como sugerem Arruda et al. (2019). Experimentos similares a serem efetuados com fêmeas de *E. tonhascai* originados de operárias de *A. laevigata* permitiriam verificar essa hipótese.

RESUMO E CONCLUSÕES

As taxas de parasitismo causadas por *E. tonhascai* às operárias de *A. sexdens* e *A. laevigata* foram similares, mas taxa de emergência de adultos foi maior em *A. sexdens* que em *A. laevigata*. Este estudo permite concluir que as fêmeas de *E. tonhascai* emergidas da formiga *A. sexdens* apresentam preferência por operárias maiores, que não manifestam preferência por espécie hospedeira, mas que a taxa de emergência de adultos é maior na espécie *A. sexdens*. Os resultados deste trabalho contribuem para uma melhor compreensão da relação parasitoide-hospedeiro, necessária para avaliar o potencial de *E. tonhascai* como agente de controle biológico de formigas-cortadeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arruda, F.V., Teresa, F.B., Martins, H.C., Pesquero, M.A., Bragança, M.A.L. (2019) Seasonal and site differences in phorid parasitoidism rates of leaf-cutting ants. *Environ Entomol*, 48:61-67.
- Bacci, L., Silva, E.M., Silva, G.A., Silva, L.J., Rosado, J.F., Samuels, R.I., Picanço, M.C. (2019) Natural mortality factors of tomato leafminer *Tuta absoluta* in open-field tomato crops in South America. *Pest Manag Sci*, 75:736-743.
- Bailez, O. (2016) Estratégias e táticas na interação forídeo-formiga. *Oecol Aust*, 20:322-331.
- Barron, A.B. (2001) The life and death of Hopkins' hostselection principle. *J Insect Behav*, 14:725-737.
- Bragança, M.A.L. (2011) Parasitoides de formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C. (org) *Formigas cortadeiras: da Bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, p. 321-343.
- Bragança, M.A.L., Tonhasca, Jr., A., Della Lucia, T.M.C. (1998) Reduction in the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora*. *Entomol Exp Appl*, 89:305-311.
- Bragança, M.A.L., Tonhasca, A.J., Moreira, D.D.O. (2002) Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol*, 31:241-244.
- Brown, B.V. (2001) Taxonomic revision of *Neodohrniphora*, subgenus *Eibesfeldtphora* (Diptera: Phoridae). *Insect Syst Evol*, 32:393-409.
- Canale, A., Geri, S., Benelli, G. (2014) Associative learning for host-induced fruit volatiles in *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), a koinobiont parasitoid of tephritid flies. *Bull Entomol Res*, 104:774-780.
- Chen, L., Fadamiro, H.Y. (2017) *Pseudacteon* phorid flies: host specificity and impacts on *Solenopsis* fire ants. *Annu Rev Entomol*, 63:47-67.
- Della Lucia, T., Gandra, L.C., Guedes R.N. (2014) Managing leaf cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci*, 70:14-23.
- Elizalde, L., Folgarait, J. (2011) Biological attributes of Argentinian phorid parasitoids of leaf-cutting ants, *Acromyrmex* and *Atta*. *J Nat Hist*, 45:2701-2723.

- Erthal Junior, M., Tonhasca Junior, A. (2000) Biology and oviposition behavior of the phorid *Apocephalus attophilus* and the response of its host, the leafcutting ant *Atta laevigata*. *Entomol Exp Appl*, 95:71-75.
- Farder-Gomes, C.F., Oliveira, M.A., Gonçalves, L., Gontijo, L.M., Zanuncio, J.C., Bragança, M.A.L., Pires, E.M. (2017) Reproductive ecology of phorid parasitoids in relation to the head size of leaf-cutting ants *Atta sexdens* Forel. *Bull. Forestry Forest Prod Res*, 107:487-492.
- Farder-Gomes, C.F., Santos, H.C., Oliveira, M.A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. (2019) Morphology of ovary and spermathecae of the parasitoid *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae). *Protoplasma*, 256:3-11.
- Feener, Jr., D.H. (1987) Size-selective oviposition in *Pseudacteon crawfordi* (Diptera: Phoridae), a parasite of fire ants. *Ann Entomol Soc Am*, 80:148-51.
- Feener, Jr., D.H., Brown, B. (1997) Diptera as parasitoids. *Annu Re Entomol*, 42:73-97.
- Folgarait, P.J., Patrock, R.J.W., Gilbert, L.E. (2006) Development of *Pseudacteon nocens* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Econ Entomol*, 99:295-307.
- Forest Stewardship Council (FSC), 2010. Pesticides guidance addendum: list of approved derogations for use of 'highly hazardous' pesticides. FSC-GUI-30-001a. <https://pt.fsc.org/download.fsc-gui-30-001a-v1-0-EN.pdf> (accessed 22 April 2019).
- Galvão, A.R.A., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Abib, P.N., Pimentel, F.A., Pereira, T.P. (2019) Parasitism by phorids on leaf cutter ants *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) in natural and agricultural environments. *Zool Sci*, 01:01-09.
- Gazal, V., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M. (2009) Mechanism of host recognition in *Neodohrniphora elongata* (Brown) (Diptera: Phoridae). *Anim*, 78:1177-1182.
- Godfray, H.C.J. (1994) Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology, first ed. Princeton University Press, New Jersey.
- Goffré, D., Folgarait, P.J. (2015) *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 130:107-115.
- Guillade, A.C., Folgarait, P.J. (2014) Optimal conditions to rear phorid parasitoids (Diptera: Phoridae) of *Atta vollenweideri* and *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). *Environ Entomol*, 43:458-466.

- Instituto Estadual do Ambiente (INEA), 2013. Plano de Manejo da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba (EEEG): <http://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/01/EEEG-RE-1.pdf> em: 12/03/2019.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z., (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int J Pest Manag*, 58:225-247.
- Silva, V.S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca, A. Jr. (2007) Effect of the size of workers of *Atta sexdens rubropilosa* on the attack behavior of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae). *Sociobiology*, 50:35-44.
- Silva, S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca Jr., A., Della Lucia, T.M.C. (2008) Survey of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae) at colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) and specificity of attack behaviour in relation to their hosts. *Bull Entomol Soc Am*, 98:203-206.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2009). Draft text for amendments to Annexes A, B and/or C to the Stockholm Convention: UNEP/POPS/COP.4/18.<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/COP4/UNEP-POPS-COP.4-18.English.PDF>. em 08/11/2019.
- Tonhasca, A.J. (1996) Interactions between a parasitic fly, *Neodohrniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropica*, 2:157-164.
- Uribe, S., Brown, B., Bragança, M.A.L., Queiroz, J.M., Nogueira, C.A. (2014) New species of *Eibesfeldtphora* Disney (Diptera: Phoridae) and a new key to the genus. *Zootaxa*, 3814:443-450.
- Zanuncio, J.C., Lemes, P.G., Antunes, L.R., Maia, J.L.S., Mendes, J.E.P., Tanganelli, K.M., Serrão, J.E. (2016) The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. *Ann Forest Sci*, 73:205-214.

3.3 CICLO BIOLÓGICO E FECUNDIDADE DE *Eibesfeldtphora tonhascai* (DIPTERA: PHORIDAE)

RESUMO

O forídeo parasitoide *Eibesfeldtphora tonhascai* (Diptera: Phoridae) apresenta potencial para ser utilizado no controle biológico das formigas-cortadeiras *Atta sexdens* e *Atta laevigata*. Mas, para seu uso é necessário conhecer a duração dos estádios do ciclo biológico e qual é a capacidade reprodutiva das fêmeas. Os objetivos deste trabalho foram determinar a duração de cada um dos estádios do ciclo biológico e estimar a fecundidade das fêmeas de *E. tonhascai*. Operárias de *A. sexdens* de ninhos de criação em laboratório foram submetidas a ataques por fêmeas de *E. tonhascai* coletadas no campo. As formigas parasitadas foram vistoriadas diariamente e registrou-se a duração dos estádios ovo-larva e pupa e a longevidade dos adultos. Fêmeas de *E. tonhascai* coletadas no campo e emergidas no laboratório foram dissecadas e o número de ovos contidos nos seus ovários foi contabilizado. As formigas parasitadas morreram $7,7 \pm 0,5$ dias após o ataque do forídeo. O estágio ovo/larva teve duração de $11,7 \pm 0,9$ dias e o de pupa de $22,9 \pm 0,1$ dias. A duração total do ciclo foi de $34,6 \pm 0,1$ dias e os adultos tiveram longevidade de $2,1 \pm 0,1$ dias. As fêmeas emergidas no laboratório tiveram $27,8 \pm 1,4$ ovos (16 a 35) e as coletadas no campo $27,1 \pm 2,4$ ovos (5 a 62). O maior número de ovos encontrado nas fêmeas coletadas no campo, em comparação com as fêmeas recém-emergidas em laboratório sugere que *E.*

tonhascai é uma espécie sinovigênica, que se caracteriza por ter uma quantidade de ovos já formados no momento da emergência mas, que durante a vida adulta a ovogênese continua e pode aumentar o estoque de ovos no seus ovários.

ABSTRACT

BIOLOGICAL CYCLE AND FECUNDITY OF *Eibesfeldtphora tonhascai* (DIPTERA: PHORIDAE)

The parasitoid phorid *Eibesfeldtphora tonhascai* (Diptera: Phoridae) has the potential to be used in the biological control of leaf-cutting ants *Atta sexdens* and *Atta laevigata*, but it is necessary to know about the duration of the different stages of the biological cycle and the reproductive capacity of this parasitoid. The objectives of this work were to know the duration of each of the stages of the biological cycle of the *E. tonhascai* phorid and to estimate the fecundity of this parasitoid. *Atta sexdens* workers from laboratory colonies were subjected to attacks by *E. tonhascai* females collected in the field until 100 adults emerged from the parasitized ants. The parasitized ants were inspected daily, and the duration of the stages egg-larva, pupa and adult longevity were recorded. *Eibesfeldtphora tonhascai* females collected in the field (n=50) and emerged in the laboratory (n=20) were dissected and the number of eggs was counted. The parasitized ants died 7.7 ± 0.5 days after the phorid attack. The egg/larva stage lasted 11.7 ± 0.9 days and the pupal stage lasted 22.9 ± 0.1 days. The total duration of the cycle was 34.6 ± 0.1 days and the adults had a longevity of 2.1 ± 0.1 days. Females emerged in the laboratory had 27.8 ± 1.4 eggs (16 to 35) and those collected in the field 27.1 ± 2.4 eggs (5 to 62). The maximum value in the number of eggs from females collected in the field in relation to the newly emerged in the laboratory suggests the occurrence of synovigenia, which is characterized by a number of eggs already formed at the time of emergence, but that during adulthood the ovogênese continues and can increase the egg stock.

INTRODUÇÃO

Forídeos parasitoides dos gêneros *Apocephalus*, *Eibesfeldtphora* (= *Neodohniphora*) e *Myrmosicarius* (Diptera: Phoridae) apresentam potencial para serem utilizados em controle biológico de formigas-cortadeiras (Arruda et al., 2019; Galvão et al., 2019). *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown, 2001 é um forídeo parasitoide de *Atta sexdens* Forel, 1908 e de *Atta laevigata* Smith, 1958 que causa a morte das operárias parasitadas e afeta negativamente a atividade de forrageamento das colônias atacadas (Tonhasca, 1996; Bragança et al., 1998).

A fêmea de *E. tonhascai* sobrevoa operárias nas trilhas de forrageamento para selecionar hospedeiros para a oviposição (Silva et al., 2008). Um único ovo é inserido na cabeça do hospedeiro e ao eclodir a larva consome os tecidos internos da cabeça da formiga. Ao final do desenvolvimento da larva ocorre a morte da formiga e alguns dias depois o pupário é formado entre as mandíbulas do hospedeiro (Tonhasca, 1996; Bragança et al., 2002).

A duração dos diferentes estádios do ciclo biológico de um forídeo parasitoide é um conhecimento essencial para avaliar sua capacidade reprodutiva e para desenvolver métodos de criação em condições de laboratório. Nos Estados Unidos seis espécies de forídeos do gênero *Pseudacteon* foram utilizadas em programas de controle biológico da formiga *Solenopsis invicta* (Chen e Fadamiro, 2017). Para isto, foi necessário desenvolver métodos de criação em laboratório dessas espécies, o que somente foi possível depois de realizar diversos estudos sobre a biologia destes insetos (Fadamiro e Chen, 2005; Chen e Fadamiro, 2017).

Outro conhecimento essencial para viabilizar a criação de forídeos em laboratório é a capacidade de oviposição das fêmeas. Recentemente, Fardergomes et al. (2019) estudaram o processo de ovogênese de *E. tonhascai* e descreveram a morfologia do aparelho reprodutor desta espécie. Estes autores verificaram que fêmeas de *E. tonhascai* coletadas no campo apresentam folículos ovarianos com diferentes estádios de desenvolvimento e descrevem esta espécie como sinovigênica. Espécies sinovigênicas emergem com poucos ovos maduros, mas a ovogênese continua durante a vida adulta, o que permite a maturação dos ovócitos existentes e a formação de novos ovos (Flanders, 1950; Heimpel e Rosenheim, 1998).

Determinar a capacidade de oviposição das fêmeas e estabelecer a duração dos estádios do ciclo biológico dos forídeos parasitoides é essencial para avaliar o potencial reprodutivo da espécie e para validar seu eventual uso em programas de manejo das formigas-cortadeiras (Bailez, 2016). Os objetivos desse trabalho foram determinar a duração dos estádios do ciclo biológico e estimar sobre a fecundidade das fêmeas de *E. tonhascai*.

MATERIAL E MÉTODOS

Formigas

Formigas operárias de *A. sexdens* foram coletadas de colônias adultas de criação em laboratório ($25 \pm 1^\circ \text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR e 12 h de fotoperíodo) e alimentadas com folhas de *Ligustrum japonicum*, *Acalypha wilkesiana* e *Rosa* spp.

Forídeos

Fêmeas adultas do parasitoide *E. tonhascai* foram coletadas, entre 5:00 e 9:00 horas, em trilhas de forrageamento de ninhos de *A. sexdens* localizados em área de Mata Atlântica da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba ($21^\circ 23' \text{S}$ e $41^\circ 05' \text{W}$), Rio de Janeiro. Os forídeos foram coletados, com auxílio de aspirador entomológico quando sobrevoavam formigas operárias (Galvão et al., 2019). Em seguida foram armazenados em caixas térmicas ($15\text{-}20^\circ\text{C}$), transportados até a sala de teste e utilizados nos experimentos no mesmo dia da coleta.

Experimento 1: ciclo biológico

Vinte operárias com largura de cápsula cefálica de 3 a 5 mm foram introduzidas em uma arena de ataque fechada (feita em acrílico transparente - $20 \times 20 \times 20 \text{ cm}$) e mantidas em repouso durante dez minutos. Posteriormente, uma fêmea de *E. tonhascai*, coletada no campo, foi liberada no interior da arena e as operárias foram submetidas a uma sessão de ataques de 30 minutos. As sessões

de ataque foram repetidas com fêmeas de *E. tonhascai* e operárias de *A. sexdens* até obter 100 forídeos adultos emergidos das formigas submetidas a ataque do forídeo. A espécie *A. sexdens* foi utilizada como hospedeira por apresentar maior taxa de emergência de adultos em condições de laboratório e o tamanho da operária utilizada foi escolhido por ser o tamanho de hospedeiro preferido por *E. tonhascai* (ver artigo 2).

Ao final de cada sessão de ataque as formigas foram transferidas para um recipiente plástico (9 x 6 x 4 cm), com tampa modificada com malha de organza (100 mesh). Os recipientes foram mantidos em sala climatizada (25 ± 1° C, 80±5% UR e 12 h de fotoperíodo) com dois tubos de 10 mL, um contendo água e o outro uma solução de sacarose a 10 %. As formigas mortas dos recipientes foram individualizadas em tubos de ensaio (5 mL) e examinadas diariamente durante 45 dias para detectar sinais de parasitismo como cabeça da formiga translúcida ao ser observada contra a luz e presença de larva no interior da cabeça (Tonhasca et al., 2001; Bragança, 2011).

As formigas com sinais de parasitismo foram individualizadas em copo plástico (30 mL) com dois centímetros de gesso na base e tampa modificada com malha de organza para evitar o escape do forídeo adulto e permitir a entrada de ar. O gesso foi umedecido a cada dois dias para evitar a dessecação da larva e da pupa. Após a formação do pupário, um algodão umedecido com mel 10 % e outro com água foi introduzido em cada recipiente (Galvão et al., 2019), os quais foram renovados a cada dois dias. As formigas parasitadas foram vistoriadas diariamente durante 25 dias e a duração dos estádios de ovo-larva, pupa e a longevidade do parasitoide adulto foi registrada (n = 100).

O estágio ovo-larva compreendeu o intervalo de tempo entre o dia do ataque do parasitoide e o dia da formação do pupário entre as mandíbulas do hospedeiro conforme descrito por Bragança et al. (2009) para a espécie *Eibesfeldtphora elongata*. Nas espécies do gênero *Eibesfeldtphora*, se desconhece a duração do estágio de ovo porque as fêmeas destas espécies depositam o ovo no interior da cabeça da formiga hospedeira (Silva et al., 2008; Bragança et al., 2009) e isto impossibilita a verificação do momento de eclosão. O estágio de pupa correspondeu ao intervalo entre a formação do pupário e a emergência do adulto. A longevidade do adulto compreendeu o período desde a emergência até a sua morte. A razão sexual da espécie foi determinada com base

na fórmula: razão sexual = n° de fêmeas / n° total de parasitoides × 100 (Galvão et al., 2019).

As fêmeas do parasitoide utilizadas nas sessões de ataque foram sacrificadas em álcool 70 % para confirmar que os indivíduos utilizados nos ataques eram da espécie *E. tonhascai*. Também foram sacrificados os parasitoides recém-emergidos das formigas parasitadas em laboratório para verificar o sexo dos indivíduos e estabelecer a razão sexual. A identificação das espécies e a sexagem foram feitas com auxílio de microscópio estereoscópico e guia de identificação (Uribe et al., 2014).

Experimento 2: fecundidade de fêmeas de *E. tonhascai*

Fêmeas de *E. tonhascai* recém-emergidas da criação no laboratório (n = 20) e fêmeas coletadas no campo de trilhas de forrageamento de *A. sexdens* (n = 50) foram coletadas e sacrificadas em álcool 70 %. As fêmeas do parasitoide criação em laboratório foram obtidas após submeter as operárias de *A. sexdens* a sessões de ataque com o parasitoide *E. tonhascai*, conforme descrito no experimento 1.

Cada fêmea de *E. tonhascai* foi colocada em uma placa de Petri com água destilada e o abdômen foi separado do tórax com dois alfinetes entomológicos (n° 0) e auxílio de microscópio estereoscópico. O abdômen foi aberto com pinças entomológicas ultrafinas (n° 01, Roney®), os ovários separados do ovipositor e suas paredes rasgadas com auxílio dos alfinetes. Com um pincel (cerdas macias, n° 00, Acrilex®, modelo 062) os ovos foram extraídos dos ovários (Figura 1).

O número de ovos contido em cada fêmea recém-emergida em laboratório e nas coletadas no campo foi quantificado com ajuda do programa de análise de imagem NIS Elements D e câmera Lumenera Infinity-1 acoplada ao microscópio estereoscópico (aumento de 240 ×) Nikon SMZ 1000.

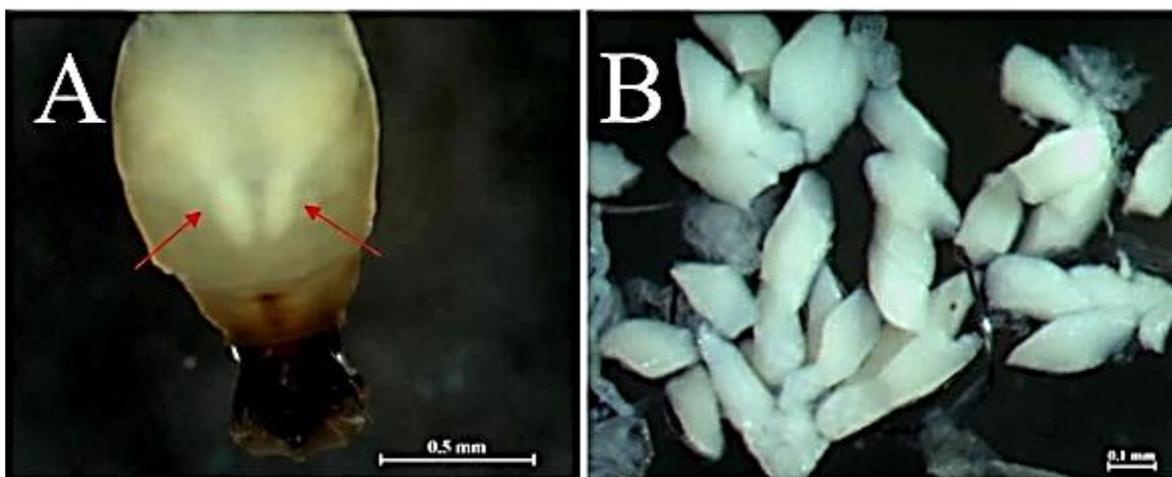


Figura 1: Ovários no interior do abdômen (A) e ovos extraídos dos ovários (B) de fêmeas de *Eibesfeldtphora tonhascai* coletadas em trilhas de ninhos de *Atta sexdens* em área de Mata Atlântica da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro.

RESULTADOS

Experimento 1: ciclo biológico

Uma única larva do forídeo foi produzida por hospedeiro parasitado. Todas as formigas parasitadas ($n = 100$) tiveram os tecidos internos da cabeça consumidos pelas larvas do parasitoide e morreram $7,7 \pm 0,5$ dias após o ataque. O estágio ovo/larva teve duração de $11,7 \pm 0,9$ dias. Após a morte do hospedeiro, a pupa se formou entre as mandíbulas da formiga, com uma parte no interior da cabeça da formiga e aproximadamente um terço do comprimento e os sífões respiratórios expostos ao exterior. O estágio de pupa teve duração de $22,9 \pm 0,1$ dias, desta forma a duração total do ciclo de *E. tonhascai* foi de $34,6 \pm 0,1$ dias (Figura 2).

O parasitoide adulto emergido da formiga parasitada ($n = 100$) teve longevidade de $2,1 \pm 0,1$ dias (amplitude de 1 a 4 dias). Os adultos emergidos foram 53 fêmeas e 47 machos (Figura 3), o que implica uma razão sexual de 53%.

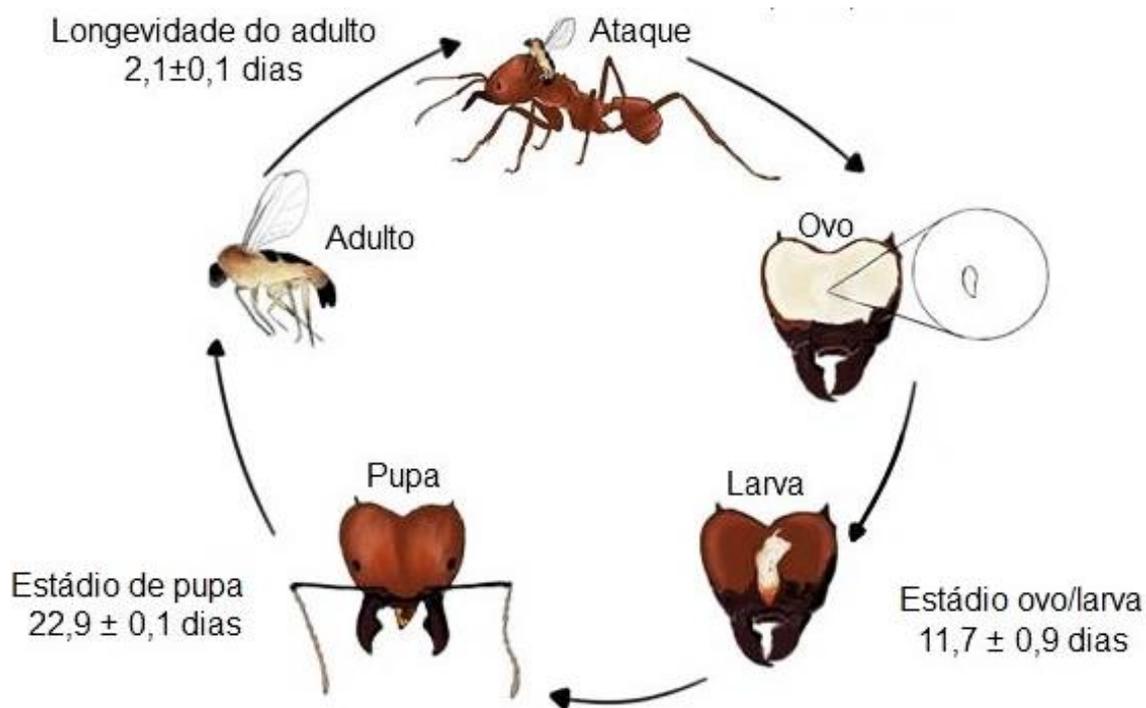


Figura 2. Esquema ilustrativo dos estádios do ciclo de vida (ovo/larva, pupa e adulto) de *Eibesfeldtphora tonhascai* e sua duração no hospedeiro *Atta sexdens*.

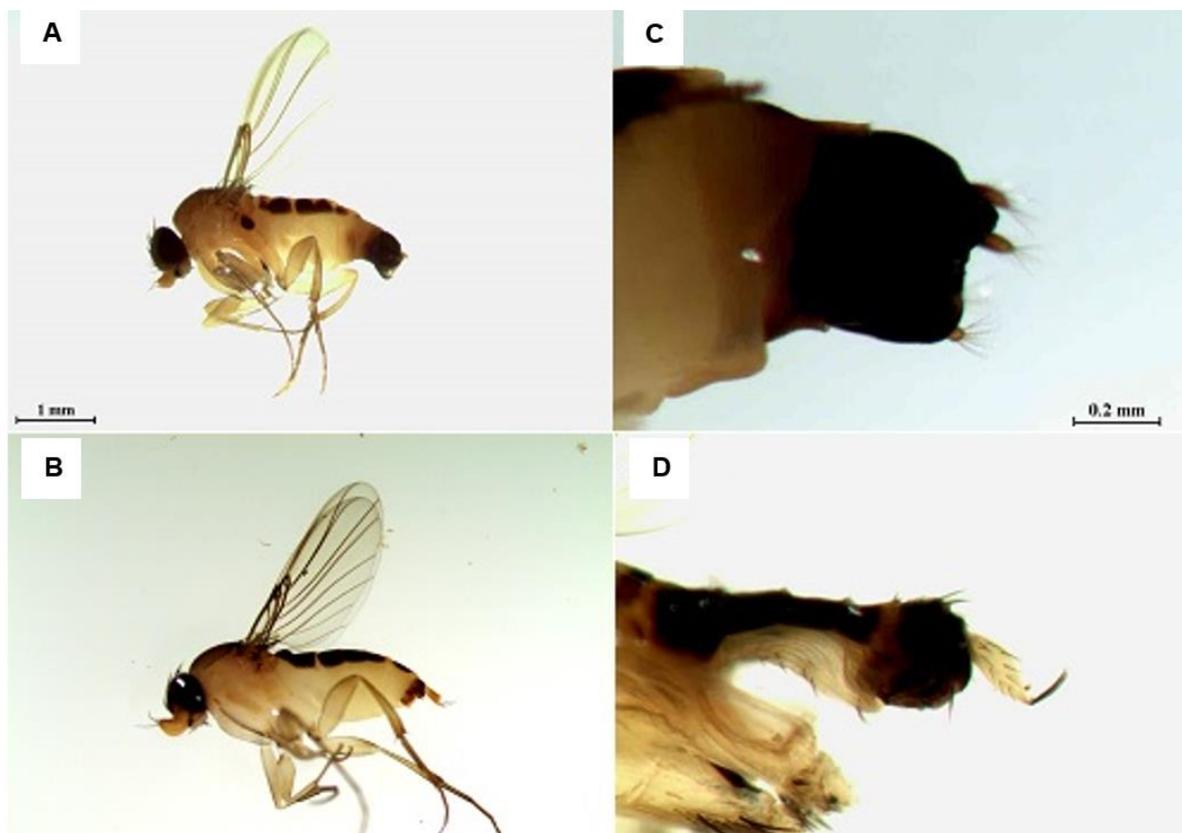


Figura 3: Visão lateral da fêmea (A) e do macho (B) de *Eibesfeldtphora tonhascai* e da morfologia do ovipositor da fêmea (C) e da genitália do macho (D) emergidos, em laboratório, de operárias de *Atta sexdens*.

Experimento 2: fecundidade de fêmeas de *E. tonhascai*

Fêmeas de *E. tonhascai* emergidas no laboratório tiveram $27,8 \pm 1,4$ ovos com uma amplitude de valores que foi de 16 a 35 ovos (Figura 4 A). Fêmeas coletadas no campo tiveram $27,1 \pm 2,4$ ovos em seus ovários com amplitude de 5 a 62 ovos (Figura 4 B). Fêmeas com poucos ovos (5 - 25) apresentaram baixa concentração de corpúsculos gordurosos em comparação com as fêmeas com muitos ovos (46 a 65).

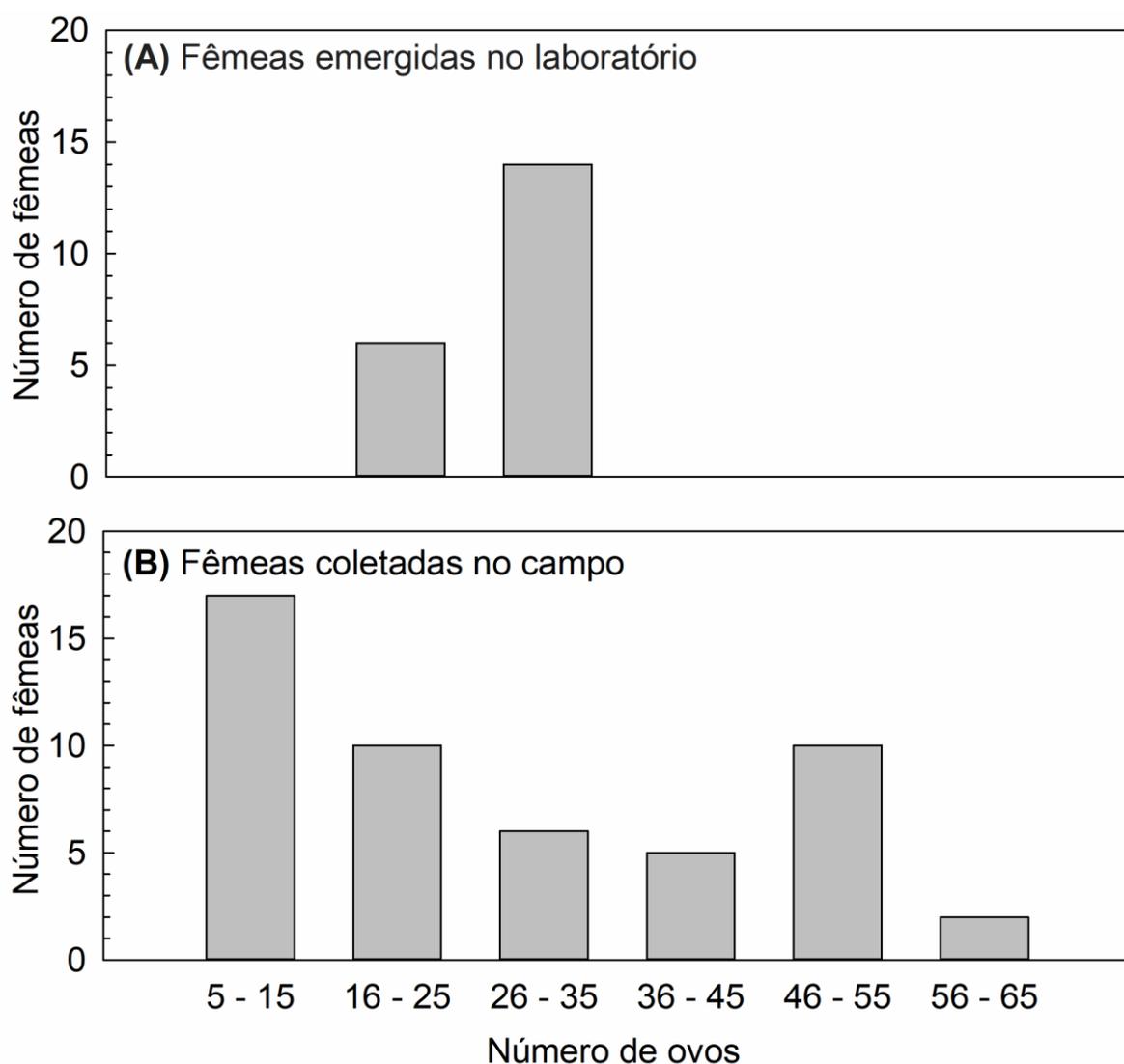


Figura 4: Número de ovos contidos nos ovários de fêmeas de *Eibesfeldtphora tonhascai* recém-emergidas em laboratório (n=20) (A) e coletadas no campo quando atacavam operárias de *Atta sexdens* em trilhas de ninhos localizados em área de Mata Atlântica da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, São Francisco do Itabapoana, Rio de Janeiro (n=50) (B).

DISCUSSÃO

O ciclo biológico da maioria das espécies de forídeos parasitoides compreende quatro estádios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e o indivíduo adulto de vida livre (Disney et al., 1994). A duração média dos estádios ovo/larva, pupa e total do ciclo biológico registrado neste trabalho para *E. tonhascai* (11, 22 e 34 dias, respectivamente) foi similar à verificada por Bragança et al. (2009) para a espécie *Eibesfeldtphora elongata* (9, 24 e 33 dias, respectivamente). A duração do estádio de pupa foi muito próximo ao verificado por Farder-Gomes et al. (2017) também para *E. tonhascai* na espécie *A. sexdens* ($22,1 \pm 2,8$ dias). Por outro lado, a longevidade do adulto, que variou de um a quatro dias, foi inferior aos 10 dias de vida relatados por Bragança et al. (2009) para *E. elongata*. As condições de laboratório podem ter sido a principal causa do curto tempo de vida dos adultos.

O número de ovos registrado nas fêmeas com até um dia após emergidas em laboratório variou de 16 a 35, enquanto as fêmeas coletadas no campo, com tempo de vida adulta desconhecido variou de 5 a 62 ovos. Isto permite afirmar que *E. tonhascai* conta com poucos ovos formados imediatamente após a emergência, mas o valor máximo registrado em indivíduos coletados no campo permite deduzir que a ovogênese destas fêmeas continua durante a vida adulta.

Com base nos dados de número de ovos em fêmeas de criação em laboratório pode-se inferir que as fêmeas adultas coletadas no campo que tiveram de 16 a 35 ovos correspondem a indivíduos de até um dia de vida. Por outro lado, fêmeas com 46 a 65 ovos devem ter emergido dois dias antes da coleta para ser possível a formação desse número adicional de 30 ovos (por exemplo: $65-35=30$ ovos mais que na emergência). As fêmeas com menor número de ovos (5 a 15) deveriam ter emergido há pelo menos três dias para possibilitar que fêmeas com 46 a 65 ovos realizassem as 40 a 50 oviposições e deixar o indivíduo no quarto dia de vida com 5 a 15 ovos em seus ovários.

As fêmeas de *E. tonhascai* coletadas no campo foram capturadas durante o dia, como ocorre na maioria das pesquisas do gênero, devido ao comportamento de ataque ao hospedeiro ser diurno (Tonhasca, 1996; Silva et al., 2007; Bragança et al., 2009; Silva et al., 2008; Galvão et al., 2019). No local de estudo as formigas somente estiveram ativas até, no máximo, às nove horas da manhã. Dessa forma,

o tempo disponível para oviposição foi de no máximo quatro horas. Se considerar que a fêmea de parasitoide gasta em média três minutos para localizar e atacar um hospedeiro e que permanece cinco minutos em repouso entre um e outro ataque (dados não publicados), pode-se presumir que o potencial de oviposição seja de no máximo 30 ovos por dia. Foi sugerido que fêmeas com até 65 ovos estariam no seu terceiro dia de vida, logo necessitariam de pelo menos mais dois dias de vida para esgotar seu estoque de ovos.

Dada estas inferências, sempre que houver hospedeiros disponíveis no campo e condições climáticas adequadas a longevidade da fêmea adulta em condições naturais deveria ser de pelo menos cinco dias. A longevidade poderia ser maior ou menor se essas condições não se cumprem, porque parasitoides sinovigênicos podem reduzir a ovulação e aumentar a longevidade quando impossibilitados de ovipositar (Silva-Torres et al., 2009). Inversamente, uma atividade reprodutiva mais intensa pode reduzir a longevidade do parasitoide, como consequência do balanço energético entre reprodução e sobrevivência (Reznick, 1985; Bell e Koufopanou, 1986).

A alimentação na fase adulta não foi claramente comprovada na maioria das espécies de forídeos. Os forídeos parasitoides têm vida efêmera e provavelmente as reservas energéticas do corpo sejam suficientes para cobrir as necessidades das atividades reprodutivas. A menor concentração de corpúsculos gordurosos nas fêmeas com poucos ovos pode ser consequência dessa reserva energética ter sido utilizada pela fêmea adulta na formação de novos ovos (Farder-Gomes et al., 2019) ou na procura de hospedeiros (Reznick, 1985; Bell e Koufopanou, 1986). Hospedeiros maiores favoreceriam maior concentração de corpúsculos gordurosos na hemolinfa do forídeo adulto. As fêmeas parasitoides de algumas espécies de forídeos manifestam preferência por hospedeiros maiores (ver artigo 2) e esta pode ser considerada uma característica com valor adaptativo porque aumenta as chances de sobrevivência da progênie (Godfray, 1994).

Estes resultados permitiram estabelecer a duração total dos estádios de desenvolvimento de *E. tonhascai* e determinar o número de ovos presentes nos ovários das fêmeas recém-emergidas em laboratório e coletadas no campo, o que permitiu especular sobre a dinâmica do comportamento de oviposição e da fecundidade da espécie.

RESUMO E CONCLUSÕES

Operárias de *A. sexdens* parasitadas por fêmeas de *E. tonhascai* morrem em média oito dias após o ataque. O estágio ovo/larva tem duração aproximada de 12 dias e o de pupa de 23 dias. O ciclo biológico total de *E. tonhascai* é em média de 35 dias e os adultos têm longevidade de um a quatro dias. Fêmeas de *E. tonhascai* coletadas no campo possuem em seus ovários de 5 a 62 ovos e as fêmeas emergidas em laboratório de 16 a 35 ovos. A diferença no número de ovos entre fêmeas coletadas no campo e de criação em laboratório se deve ao processo de ovogênese por sinovigenia na espécie *E. tonhascai*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arruda, F.V., Teresa, F.B., Martins, H.C., Pesquero, M.A., Bragança, M.A.L. (2019) Seasonal and Site Differences in Phorid Parasitoidism Rates of Leaf-Cutting Ants. *Environ. entomol.* 48:61-67.
- Bailez, O. (2016) Estratégias e táticas na interação forídeo-formiga. *Oecol Aust*, 20:322-331.
- Bell, G., Koufopanou, V. (1986) The cost of reproduction. *Oxford Surv. Evol. Biol.* 3:83-131.
- Bragança, M.A., Tonhasca Jr, A., Della Lucia, T. (2009) Características biológicas e comportamentais de *Neodohrniphora elongata* Brown (Diptera, Phoridae), um parasitóide da saúva *Atta sexdens* rubropilosa Forel (Hymenoptera, Formicidae). *Rev. bras. entomol.* 53:600-606.
- Bragança, M.A.L. (2011) Parasitoides de formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C. (org) *Formigas cortadeiras: da Bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, p. 321-343.
- Bragança, M.A.L., Tonhasca, A.J., Moreira, D.D.O. (2002) Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol.* 31:241-244.

- Bragança, M.A.L., Tonhasca, Jr., A., Della Lucia, T.M.C. (1998) Reduction in the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora*. *Entomol. Exp. App.*, 89:305-311.
- Chen, L., Fadamiro, H.Y. (2017) *Pseudacteon* phorid flies: host specificity and impacts on *Solenopsis* fire ants. *Annu. Rev. Entomol.* 63:47-67.
- Disney, R.H.L. (1994) Scuttle flies: The Phoridae. London: Chapman and Hall: p.467.
- Fadamiro, H.Y., Chen, L. (2005) Utilization of aphid honeydew and floral nectar by *Pseudacteon tricuspis* (Diptera: Phoridae), a parasitoid of imported fire ants, *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Biol. Control* 34:73-82.
- Farder-Gomes, C.F., Oliveira, M.A., Gonçalves, L., Gontijo, L.M., Zanuncio, J.C., Bragança, M.A.L., Pires, E.M. (2017) Reproductive ecology of phorid parasitoids in relation to the head size of leaf-cutting ants *Atta sexdens* Forel. *Bull. Forestry Forest Prod. Res.* 107:487-492.
- Farder-Gomes, C.F., Santos, H.C., Oliveira, M.A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., (2019) Morphology of ovary and spermathecae of the parasitoid *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae). *Protoplasma* 256:3-11.
- Flanders, S.E., 1950. Regulation of ovulation and egg disposal in the parasitic Hymenoptera. *Can. Entomol.* 82:134-140.
- Galvão, A.R.A., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Abib, P.N., Pimentel, F.A., Pereira, T.P. (2019) Parasitism by phorids on leaf cutter ants *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) in natural and agricultural environments. *Zool. Sci.* 01:01-09.
- Godfray, H.C.J. (1994) *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. 1^a Ed. Princeton University Press, New Jersey.
- Heimpel, G.E., Mangel, M., Rosenheim, J.A. (1998) Effects of time limitation and egg limitation on lifetime reproductive success of a parasitoid in the field. *Am Nat.* 152:273-89.
- Reznick D (1985) Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos* 44:257-267.
- Silva, S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca Jr, A., Della Lucia, T.M.C. (2008) Survey of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae) at colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) and specificity of attack behaviour in relation to their hosts. *Bull. Entomol. Res.* 98:203-206.

- Silva, V.S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca Jr., A. (2007) Effect of the size of workers of *Atta sexdens rubropilosa* on the attack behavior of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae). *Sociobiology* 50:35-44.
- Silva-Torres, C.S.A.; Barros R., Torres, J.B. (2009) Efeito da idade, fotoperíodo e disponibilidade de hospedeiro no comportamento de parasitismo de *Oomyzus sokolowskii* Kurdjumov (Hymenoptera: Eulophidae). *Neotrop. Entomol.* 4:512-519.
- Tonhasca Jr. A., Braganca, M.A.L., Erthal, Jr., M. (2001) Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relation to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Soc.* 48:154-158.
- Tonhasca, A.J. (1996) Interactions between a parasitic fly, *Neodohrniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropica* 2:157-164.
- Uribe, S., Brown, B., Bragança, M.A.L., Queiroz, J.M., Nogueira, C.A. (2014) New species of *Eibesfeldtphora* Disney (Diptera: Phoridae) and a new key to the genus. *Zootaxa* 3814:443-450.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A taxa média do parasitismo causada por forídeos parasitoides na formiga-cortadeira *Atta sexdens* é de 5,8 % em período de dois anos. *Apocephalus attophilus* causou 4,2 % desse parasitismo e *Eibesfeldtphora* spp 1,4 %. *A. attophilus* e *Eibesfeldtphora* spp. apresentam variação sazonal e a temperatura tem efeito negativo sobre o parasitismo destas espécies. *Myrmosicarius grandicornis* causou 0,2 % do parasitismo e a umidade e a precipitação têm efeito positivo sobre o parasitismo desta espécie. A fêmea *E. tonhascai* manifesta preferência por hospedeiros de tamanho maior, não discrimina espécies hospedeiras, mas a taxa de emergência é maior em *A. sexdens*. O ciclo biológico de *E. tonhascai* é em média de 35 dias, com 18 dias do estágio ovo/larva e 22 dias de pupa. Fêmeas emergidas em laboratório possuem entre 5 e 39 ovos, enquanto as fêmeas coletadas no campo chegam a 63 ovos, o que comprova que *E. tonhascai* é uma espécie sinovigênica. A comprovação da influência de fatores climáticos sobre o parasitismo, da preferência por tamanho de hospedeiro, da duração do ciclo biológico e da fecundidade das fêmeas de *E. tonhascai* são informações essenciais para desenvolver metodologias de criação de forídeos e estabelecer programas de manejo da formiga-cortadeira *A. sexdens* que contemplem o uso destes parasitoides como agentes de controle biológico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adán, Á., Viñuela, E., Bengochea, P., Budia, F., Del Estal, P., Aguado, P., Medina, P. (2011) Lethal and sublethal toxicity of fipronil and imidacloprid on *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 104:1541-1549.
- Almeida, W.R., Wirth, R., Leal, I.R. (2008) Edge-mediated reduction of phorid parasitism on leaf-cutting ants in a Brazilian Atlantic forest. *Entomol. Exp. Appl.* 129:251-257.
- Alves, S.B., Sosa-Gomez, D.R. (1983) Virulência do *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para castas de *Atta sexdens* rubropilosa (Forel, 1908). *Poliagro*, 5:1-9.
- Araújo, M.S., Rodrigues, C.A., Oliveira, M.A. Jesus, F.G. (2015) Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. *Rev. Agric. Neotrop.* 2:8-12.
- Arruda, F.V., Teresa, F.B., Martins, H.C., Pesquero, M.A., Bragança, M.A.L. (2019) Seasonal and Site Differences in Phorid Parasitoidism Rates of Leaf-Cutting Ants. *Environ. entomol.* 48:61-67.
- Bailez, O. (2016) Estratégias e táticas na interação forídeo-formiga. *Oecol. Aust.* 20:1-10.
- Barron, A.B. (2001) The life and death of Hopkins' host selection principle. *J. Insect Behav.* 14:725-737.
- Borgmeier, T. (1928) Nota previa sobre alguns phorideos que parasitam formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. *Bol. Biol.* 14:119-126.

- Borgmeier, T. (1931) Sobre alguns phorideos que parasitam a saúva e outras formigas cortadeiras (Diptera: Phoridae). *Arch. Inst. Biol.* 4:209-228.
- Bragança, M.A., Della Lucia, T., Tonhasca Jr, A. (2003) First record of phorid parasitoids (Diptera: Phoridae) of the leaf-cutting ant *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop. Entomol.* 32:169-171.
- Bragança, M.A., Medeiros, Z.C. (2006) Ocorrência e características biológicas de forídeos parasitoides (Diptera: Phoridae) da saúva *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) em Porto Nacional, TO. *Neotrop. Entomol.* 35:408-411.
- Bragança, M.A., Tonhasca Jr, A., Della Lucia, T. (2009) Características biológicas e comportamentais de *Neodohniphora elongata* Brown (Diptera, Phoridae), um parasitóide da saúva *Atta sexdens* rubropilosa Forel (Hymenoptera, Formicidae). *Rev. bras. entomol.* 53:600-606.
- Bragança, M.A.L. (2011) Parasitoides de formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C. (org) *Formigas cortadeiras: da Bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, p. 321-343.
- Bragança, M.A.L., Arruda, F.V., Souza, L.R.R., Martins, H.C., Della Lucia, T.M.C. (2016) Phorid flies parasitizing leaf-cutting ants: their occurrence, parasitism rates, biology and the first account of multiparasitism. *Sociobiology*, 63:1015-1021.
- Bragança, M.A.L., Tonhasca Jr, A., Della Lucia, T.M. (1998) Reduction in the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohniphora* sp. *Entomol. Exp. Appl.* 89:305-311.
- Bragança, M.A.L., Tonhasca, A.J., Moreira, D.D.O. (2002) Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop. Entomol.* 31:241-244.
- Broggio, I.S. (2018) *Dinâmica da biomassa arbórea em fragmentos de floresta estacional do Norte Fluminense, RJ*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 93p.
- Brown, B.V. (1992) Generic revision of Phoridae of the Nearctic region and phylogenetic classification of Phoridae, Sciadoceridae, and Ironomyiidae (Diptera: Phoridae). *Mem. Ent. Soc. Can.* 164:1-144.

- Brown, B.V. (1999) Differential host use by Neotropical phorid flies (Diptera: Phoridae) that are parasitoids of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 33:95-103.
- Brown, B.V. (2001) Taxonomy revision of *Neodohrniphora*, subgenus *Eibesfeldtphora* (Diptera: Phoridae). *Insect Syst. Evol.* 32: 393-409.
- Brown, B.V. (2009) Three new species of parasitoid Phoridae (Diptera) from the Neotropical Region. *Sociobiology*, 54:715.
- Brown, B.V., Disney, R.H.L., Elizalde, L., Folgarait, P.J. (2010) New species and new records of *Apocephalus Coquillett* (Diptera: Phoridae) that parasitize ants (Hymenoptera: Formicidae) in America. *Sociobiology*, 55:165-190.
- Canale, A., Geri, S., Benelli, G., (2014) Associative learning for host-induced fruit volatiles in *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), a koinobiont parasitoid of tephritid flies. *Bull. Entomol. Res.*, 104:774-780.
- Chen, L., Fadamiro, H.Y. (2017) *Pseudacteon* phorid flies: host specificity and impacts on *Solenopsis* fire ants. *Annu. Rev. Entomol.*, 63:47-67.
- Della Lucia, T.M., Gandra, L.C., Guedes, R.N. (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag. Sci.* 70:14-23.
- Della Lucia, T.M.C. (2011) *Formigas-cortadeiras: da biocologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 91p.
- Della Lucia, T.M.C., Souza, D.J. (2011) *Importância e história de vida das formigas-cortadeiras*. In: Della Lúcia, T.M.C. *Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, p.13-26.
- Disney, R.H.L. (1990) Some myths and the reality of scuttle fly biology. *Antenna*, 14:64-67.
- Disney, R.H.L. (1994) *Scuttle flies: the Phoridae*. London: Ed. Springer Science & Business Media, 467 p.
- Disney, R.H.L., Elizalde, L., Folgarait, P.J. (2006) New species and revision of *Myrmosicarius* (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 47:771-809.
- Disney, R.H.L., Elizalde, L., Folgarait, P.J. (2009) New species and new records of scuttle flies (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter and army ants (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 54:601-632.

- Elizalde, L., Folgarait, P.J. (2011) Biological attributes of argentinian phorid parasitoids (Insecta: Diptera: Phoridae) of leaf-cutting ants. *J Nat Hist*, 45:2701-2723.
- Elizalde, L., Folgarait, P.J. (2012) Behavioral strategies of phorid parasitoids and responses of their hosts, the leaf-cutting ants. *J. Insect Sci.*, 135:1-26.
- Elizalde, L., Patrock, R.J.W., Disney, R.H.L., Folgarait, P.J. (2017) Spatial and temporal variation in host-parasitoid interactions: leafcutter ant hosts and their phorid parasitoids. *Ecological Entomology*. 1:114-125.
- Elizalde, L., Treanor, D., Pamminer, T., Hughes, W.O. (2019) Immunity of leaf-cutting ants and its role in host-parasitoid relationships. *J. Insect Physiol.*, 116:49-56.
- Erthal Junior, M., Tonhasca Junior, A. (2000) Biology and oviposition behavior of the phorid *Apocephalus attophilus* and the response of its host, the leafcutting ant *Atta laevigata*. *Entomol Exp Appl*. 95:71-75.
- Fadamiro, H.Y., Chen, L. (2005) Utilization of aphid honeydew and floral nectar by *Pseudacteon tricuspis* (Diptera: Phoridae), a parasitoid of imported fire ants, *Solenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Biol. Control* 34:73-82.
- Farder-Gomes, C.F., Oliveira, M.A., Gonçalves, L., Gontijo, L.M., Zanuncio, J.C., Bragança, M.A.L., Pires, E.M. (2017) Reproductive ecology of phorid parasitoids in relation to the head size of leaf-cutting ants *Atta sexdens* Forel. *Bull. Entomol. Res.* 107:487-492.
- Farder-Gomes, C.F., Santos, H.C., Oliveira, M.A., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., (2019) Morphology of ovary and spermathecae of the parasitoid *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae). *Protoplasma* 256:3-11.
- Feener Jr., D.H. (1987) Size-selective oviposition in *Pseudacteon crawfordi* (Diptera: Phoridae), a parasite of fire ants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 80:148-51.
- Feener Jr., D.H., Brown, B. (1997) Diptera as parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 42:73-97.
- Feener, D.H., Brown, B.V. (1993) Oviposition behavior of an ant-parasitizing fly, *Neodohrniphora curvinervis* (Diptera: Phoridae), and defense behavior by its leaf-cutting ant host *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Insect Behav.* 6:675-688.
- Flanders, S.E. (1950) Regulation of ovulation and egg disposal in the parasitic Hymenoptera. *Can. Entomol.* 82:134-140.

- Folgarait, P.J. (2013) Leaf-cutter ant parasitoids: current knowledge. *Psyche J. Entom*, 2013:1-10.
- Folgarait, P.J., Bruzzone, O.A., Gilbert, L.E. (2003) Seasonal patterns of activity among species of black fire ant parasitoid flies (*Pseudacteon*: Phoridae) in Argentina explained by analysis of climatic variables. *Biol. Control* 28:368-378.
- Folgarait, P.J., Chirino, M.G., Patrock, R.J.W., Gilbert, L.E. (2005) Development of *Pseudacteon obtusus* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. entomol.* 34:308-316.
- Folgarait, P.J., Patrock, R.J.W., Gilbert, L.E. (2006) Development of *Pseudacteon nocens* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 99:295-307.
- Forest Stewardship Council (FSC) (2010) Pesticides guidance addendum: list of approved derogations for use of 'highly hazardous' pesticides: <https://pt.fsc.org/download.fsc-gui-30-001a-v1-0-EN.pdf> em 22/04/2019.
- Forti, L.C., De Andrade, M.L., Andrade, A.P.P., Lopes, J.F.S., Ramos, V.M. (2006) Bionomics and identification of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) Through an Illustrated Key. *Sociobiology* 48:1-18.
- Fowler, H.G., Robinson, S.W. (1979) Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. *Ecological Entomol.* 4:239-247.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira-Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. (2002) *Entomologia Agrícola*. São Paulo: FEALQ, 920p.
- Galvão, A.R.A., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Abib, P.N., Pimentel, F.A., Pereira, T.P. (2019) Parasitism by phorids on leaf cutter ants *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) in natural and agricultural environments. *Zool. Sci.* 01:01-09.
- Gandon, S., Rivero, A., Veraldi, J. (2006) Superparasitism evolution: adaptation or manipulation? *Am Nat.* 167:1-22.
- Gazal, V., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M. (2009) Mechanism of host recognition in *Neodohrniphora elongata* (Brown) (Diptera: Phoridae). *Anim. Behav.* 78:1177-1182.
- Gilljam, J.L., Leonel, J., Cousins, I.T., Benskin, J.P. (2015) Is ongoing sulfluramid use in South America a significant source of perfluorooctanesulfonate (PFOS)?

- Production inventories, environmental fate, and local occurrence. *Environ. Sci. Technol.* 50:653-659.
- Godfray, H.C.J. (1994) *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. 1^a Ed. Princeton University Press, New Jersey.
- Goffré, D., Folgarait, P.J. (2015) *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 130:107-115.
- Graham, J.H., Hughie, H.H., Jones, S., Wrinn, K., Krzysik, A.J., Duda, J.J. (2004) Habitat disturbance and the diversity and abundance of ants (Formicidae) in the southeastern fall-line sandhills. *J. Insect Sci.* 4:1–15.
- Griffiths, H.M., Ashton, L.A., Walker, A.E., Hasan, F., Evans, T.A., Eggleton, P., Parr, C.L. (2018) Ants are the major agents of resource removal from tropical rainforests. *J. Animal Ecol.* 87:293-300.
- Guillade, A.C., Folgarait, P.J. (2011) Life-history traits and parasitism rates of four phorid species (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Atta vollenweideri* (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. *J. Econ. Entomol.* 104:32-40.
- Guillade, A.C., Folgarait, P.J. (2014) Natural enemies of *Atta vollenweideri* (Hymenoptera: Formicidae) leaf-cutter ants negatively affected by synthetic pesticides, chlorpyrifos and fipronil. *J. Econ. Entomol.* 107:105-114.
- Guillade, A.C., Folgarait, P.J. (2014) Optimal Conditions to Rear Phorid Parasitoids (Diptera: Phoridae) of *Atta vollenweideri* and *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). *Physiological Ecology*, 43:458-466.
- Guillade, A.C., Folgarait, P.J. (2015) Effect of phorid fly density on the foraging of *Atta vollenweideri* leafcutter ants in the field. *Entomol. Exp. Appl.* 154:53-61.
- Heimpel, G.E., Mangel, M., Rosenheim, J.A. (1998) Effects of time limitation and egg limitation on lifetime reproductive success of a parasitoid in the field. *Am Nat.* 152:273-89.
- Holldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The ants*. Springer, Berlin, 732p.
- Instituto Estadual do Ambiente (INEA), 2013. Plano de Manejo da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba (EEEG): <http://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/01/EEEG-RE-1.pdf> em: 12/03/2019.
- Khan, M.A., Khan A. (2015) Lethal and parasitism effects of fipronil on *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Int. J. Hort. Sci.* 16:1-6.

- Li, C.C. (1975) *Path analysis - a primer*. 3 ed. Pacific Grove, The Boxwood. 347p.
- Machado, L.A., Silva, V.B., Oliveira, M.M. (2007) Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. *Biológico* 69:103-106.
- Martins, H.C. (2015) *Bioecologia de três espécies de forídeos parasitoides da saúva Atta bisphaerica*. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Universidade Federal de Viçosa-UFV, 67p.
- Medina, P., Morales, J.J., Budia, F., Adan, A., Del Estal, P., Vinuela, E. (2007) Compatibility of endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) protected stages with five selected insecticides. *J. Econ. Entomol.* 100:1789-1796.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z. (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int. Pest Manag. Sci.* 58:225-247.
- Morales, J., Budia, F., Viuela, E. (2004) Side effects of five insecticides on different stages of development to the parasitoid *Hyposoter didymator* (Thunberg) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Bol. San. Veg. Plagas* 30:773-782.
- Morrison, L.W. (2000) Mechanisms of *Pseudacteon* parasitoid (Diptera: Phoridae) effects on exploitative and interference competition in host *Solenopsis* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93:841-849.
- Oliveira, M.A., Araújo, M.S., Marinho, C.G.S., Ribeiro, M.R., Della Lucia, T.M.C. (2011) Manejo de formigas cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C. (org) *Formigas cortadeiras: da Bioecologia ao manejo*. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, p.400-419.
- Pesquero, M.A., Bessa, L.A., Silva, H.C.M., Silvia, L.C., Arruda, F.V. (2010) Influência ambiental na taxa de parasitismo (Diptera: Phoridae) de *Atta laevigata* e *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Biol. Trop.* 7:25-38.
- Pimentel, F.A. (2017) Forídeos parasitoides de *Atta laevigata* (Smith, 1958) (Hymenoptera: Formicidae), em Mata Atlântica: Ocorrência, taxa de parasitismo e tamanho de hospedeiro. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 51p.
- RadamBrasil, (1983) Levantamento de recursos naturais. V.32, folha S/F. 23/24. Rio de Janeiro/ Vitória. Ministério das Minas e Energia, Rio de Janeiro.
- SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas (1997) Universidade Federal de Viçosa, UFV. Versão 7.1. Viçosa, MG. 150p.

- Silva, G. C., Nascimento, M. T. (2001). Fitossociologia de um remanescente de mata sobre tabuleiros no norte do estado do Rio de Janeiro (Mata do Carvão). *Braz. J. Bot.* 24:51-62.
- Silva, S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca Jr, A., Della Lucia, T.M.C. (2008) Survey of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae) at colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) and specificity of attack behaviour in relation to their hosts. *Bull. Entomol. Res.* 98:203-206.
- Silva, V.S.G., Bailez, O., Viana-Bailez, A.M., Tonhasca Jr., A. (2007) Effect of the size of workers of *Atta sexdens rubropilosa* on the attack behavior of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae). *Sociobiology* 50:35-44.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3ª Ed. W. H. Freeman, New York, New York, USA.
- Souza, L.R.R. (2013) Influência do tamanho das operárias e da sazonalidade no parasitismo das saúvas *Atta sexdens* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) por moscas da família Phoridae. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecótonos) Universidade Federal do Tocantins-UFT, 43 p.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2009). Draft text for amendments to Annexes A, B and/or C to the Stockholm Convention: UNEP/POPS/COP.4/18.<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/COP4/UNEP-POPS-COP.4-18.English.PDF>. em 08/11/2019.
- Tonhasca Jr, A. (1996) Interactions between a parasitic fly, *Neodohrniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropica* 2:157-164.
- Tonhasca Jr, A., Bragança, M.A.L., Erthal Jr, M. (2001) Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Soc.* 48:154-158.
- Tonhasca Jr, A.; Bragança, M.A.L. (2000) Forager size of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) in a mature eucalyptus forest in Brazil. *Rev. Biol. Trop.* 48:983-988.
- Uribe, S., Brown, B.V., Bragança, M.A.L., Queiroz, J.M., Nogueira, C.A. (2014) New species of *Eibesfeldtphora* Disney (Diptera: Phoridae) and a new key to the genus. *Zootaxa* 3814:443–450.

- Villela, D.M., Nascimento, M.T., Aragão, L.E.O.C., Gama, D.M. (2006) Effect of selective logging on forest structure and nutrient cycling in a seasonally dry Brazilian Atlantic forest. *J Biogeogr.* 33:506-516.
- Weber, N. A. 1972. Gardening ants: the Attines. Philadelphia: American Philosophical Society 146 p.
- Zanetti, R., Zanuncio, J. C., Santos, J. C., Da Silva, W. L. P., Ribeiro, G.T., Lemes, P.G. (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests* 5:439-454.
- Zanuncio, J.C., Lemes, P.G., Antunes, L.R., Maia, J.L.S., Mendes, J.E.P., Tanganelli, K. M., Serrão, J.E. (2016) The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. *Ann. For. Sci.*, 73:205-214.