



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA  
DA REDE BIONORTE**

**PARASITISMO POR MOSCAS PHORIDAE ENTRE CASTAS E ENTRE COLÔNIAS DA  
SAÚVA *ATTA LAEVIGATA* (SMITH, 1858) (FORMICIDAE) E A FIDELIDADE ESPACIAL  
DAS OPERÁRIAS ÀS ENTRADAS DE NINHOS**

**MARIA LUCIMAR DE OLIVEIRA SOUZA**

**Palmas, TO**

**2021**

**MARIA LUCIMAR DE OLIVEIRA SOUZA**

**PARASITISMO POR MOSCAS PHORIDAE ENTRE CASTAS E ENTRE COLÔNIAS DA  
SAÚVA *ATTA LAEVIGATA* (SMITH, 1858) (FORMICIDAE) E A FIDELIDADE ESPACIAL  
DAS OPERÁRIAS ÀS ENTRADAS DE NINHOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Lima Bragança

Co-orientador: Prof. Dr. Danival José de Souza

**Palmas - TO**

**MAIO/2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

S729p Souza, Maria Lucimar de Oliveira.  
Parasitismo por moscas Phoridae entre castas e entre colônias da saúva *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Formicidae) e a fidelidade espacial das operárias às entradas de ninhos. / Maria Lucimar de Oliveira Souza. – Palmas, TO, 2021.  
94 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Marcos Antônio Lima Bragança

Coorientador: Danival José de Souza

1. Parasitoide. 2. *Atta laevigata*. 3. Castas operárias. 4. Fidelidade espacial. I. Título

**CDD 660.6**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

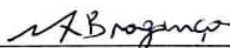
**MARIA LUCIMAR DE OLIVEIRA SOUZA**

**PARASITISMO POR MOSCAS PHORIDAE ENTRE CASTAS E ENTRE COLÔNIAS DA  
SAÚVA ATTA LAEVIGATA (SMITH, 1858) (FORMICIDAE) E A FIDELIDADE ESPACIAL  
DAS OPERÁRIAS ÀS ENTRADAS DE NINHOS**

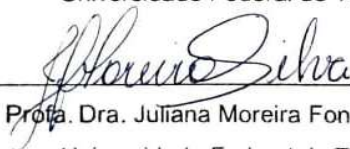
Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 21/05/2021

**Banca examinadora**



Prof. Dr. Marcos Antônio Lima Bragança (Orientador)  
Universidade Federal do Tocantins



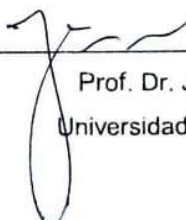
Prof. Dra. Juliana Moreira Fonseca da Silva  
Universidade Federal do Tocantins



Dr. Filipe Viegas de Arruda  
Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal



Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar  
Universidade Federal do Tocantins



Prof. Dr. Joênes Mucci Peluzio  
Universidade Federal do Tocantins

*Dedico esta tese aos meus pais, Francisco das Chagas e Maria de Oliveira, pelo amor e exemplo de vida. Aos meus irmãos pelo incentivo. Aos meus amados filhos, Carol e Miguel. Ao meu esposo, Evaldo Gomes, meu amor e parceiro, pelo grande apoio.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a Nossa Senhora, por sempre fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Marcos Antônio Lima Bragança, pela excelente orientação, incentivo, amizade e por compartilhar seus conhecimentos durante o período do doutorado.

Ao meu co-orientador, Dr. Danival José de Souza, pela colaboração e sugestões durante a pesquisa.

Aos professores, Dra. Juliana Fonseca, Dr. Filipe Viegas, Dr. Raimundo Wagner, Dr. Joênes Peluzio, por aceitar o convite para participar da banca de defesa e pelas contribuições dadas a este trabalho.

Ao professor Rafael José de Oliveira, pelos ensinamentos e apoio nas análises estatísticas dos artigos.

Ao professor Richard Samuels, da UENF, Universidade Estadual do Norte Fluminense, pela contribuição nas discussões do Capítulo 1.

À professora Dra. Adriana Malvásio, pela indicação dos alunos que ajudaram nas coletas em campo.

À Universidade Federal do Tocantins (UFT) e ao Programa de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, pela oportunidade concedida.

À Embrapa Pesca e Aquicultura-TO, pela permissão para realização de parte do estudo em uma área de reserva na sua sede.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Tocantins (IFTO), por todo apoio dedicado durante todas as etapas da pesquisa.

A Marcelo Souza, pela confecção das figuras cartográficas das áreas de estudos.

Às alunas Caroline Suyeni e Barbara Vieira, pela ajuda durante as coletas em campo.

Enfim, são inúmeras as pessoas que, de algum modo contribuíram para a realização desta obra. A todas que tornaram esta trajetória possível, minha eterna gratidão.

SOUZA, Maria Lucimar de Oliveira, **Parasitismo por moscas Phoridae entre castas e entre colônias da saúva *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Formicidae) e a fidelidade espacial das operárias às entradas de ninhos**. 2021. 94f. Tese (Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2021.

## RESUMO

A formiga-cortadeira *Atta laevigata* (Smith, 1858) é considerada uma das principais pragas de grande importância econômica em muitos habitats neotropicais. Esta espécie se especializou em forragear monocotiledôneas e dicotiledôneas nativas e cultivadas de diferentes biomas em toda a América do Sul, resultando em perdas significativas devido às atividades de corte de folhas. Devido ao polimorfismo acentuado entre as operárias e uma complexa organização social, as colônias dessas formigas desenvolveram mecanismos físicos, simbióticos e comportamentais que lhes permitem superar as ações dos diversos métodos usados para manejar suas populações, tornando seu controle difícil e oneroso. Como método alternativo, uma importante estratégia é o uso das pequenas moscas parasitoides da família Phoridae (Diptera). Os forídeos usam as formigas-cortadeiras *Atta* spp. como hospedeiros parasitando as operárias adultas, e com isso, possuem potencial para serem usadas em programas de controle biológico dessas espécies. O presente estudo foi realizado para determinar o parasitismo de castas operárias de *A. laevigata* por moscas Phoridae entre castas operárias e entre colônias, além de verificar a fidelidade espacial das operárias às entradas de ninhos. Foram coletadas formigas de quatro castas nas trilhas e nas entradas dos ninhos de 18 colônias maduras no campo. Um total de 21.254 formigas foram coletadas nas trilhas e 14.649 coletadas nos montes de terra. O parasitismo das trilhas foi de 5,23% (1.102 forrageadoras e 10 soldados) e nos montes foi de apenas 0,18% (25 escavadoras e 2 soldados). Nas trilhas, 46,2% foram atacados por *Apocephalus attophilus* Borgmeier, 1928, 22,6% por *Myrmosicarius grandicornis* Borgmeier, 1928, 16,6% por *Eibesfeldtphora erthali* (Brown, 2001) e 14,6% por *Apocephalus vicosae*, Disney 2000. Apenas duas espécies de forídeo, *M. grandicornis* e *E. erthali*, foram observadas parasitando escavadoras, enquanto apenas *E. erthali* parasitou soldados. Esta é a primeira vez que *Atta* spp. escavadores e soldados mostraram estar parasitados por forídeos. Ao avaliar o parasitismo entre as áreas, *A. attophilus* foi responsável pela maior proporção do parasitismo das operárias coletadas em PAL (74,44%) e EMB (77,24%), seguido por *E. erthali* nas mesmas áreas. Por outro lado, *M. grandicornis* e *A. vicosae* foram as espécies com a maior proporção do parasitismo na área UFT, com 55,4% e 30,63%, respectivamente. Entre as colônias, o parasitismo de *A. laevigata* pelas espécies de forídeos em geral foi alternado. Ao considerar a preferência do parasitismo com relação ao tamanho das operárias, *M. grandicornis* (98,41%) e *A. vicosae* (94,44%)

preferiram parasitar as operárias menores, enquanto *A. attophilus* (61,52%) preferiu parasitar as operárias maiores, já o parasitismo por *E. erthali* quase não variou na preferência do tamanho das operárias entre as colônias. As operárias mostraram fidelidade as trilhas e aos montes no mesmo ninho. E não foi observada nenhuma operária marcada transitando de trilhas para monte e vice-versa em nenhum dos dois bioensaios.

**Palavras-chave:** Parasitóide, *Atta laevigata*, castas operárias, ninhos, fidelidade espacial



SOUZA, Maria Lucimar de Oliveira, **Parasitism by Phoridae flies between castes and between colonies of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Formicidae) and the spatial fidelity of workers to nest entrances**. 2021. 94f. Thesis (Post Graduation in Biodiversity and Biotechnology at Rede Bionorte) - Federal University of Tocantins, Palmas, 2021.

## ABSTRACT

The leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith, 1858) is considered a major pest of major economic importance in many Neotropical habitats. This species specializes in foraging on monocot and dicot native and cultivated plants of different biomes throughout South America, resulting in significant losses due to leaf-cutting activities. Due to the marked polymorphism among workers and a complex social organization, the colonies of these ants have developed physical, symbiotic and behavioral mechanisms that allow them to overcome the actions of the various methods used to manage their populations, making their control difficult and costly. As an alternative method, an important strategy is the use of the small parasitoid flies of the family Phoridae (Diptera). The phorids use the leaf-cutting ants *Atta* spp. as hosts, parasitizing the adult workers, and thus have the potential to be used in biological control programs of these species. The present study was conducted to determine the parasitism of *A. laevigata* worker castes by phoridae flies between worker castes and between colonies, and to verify the spatial fidelity of workers to nest entrances. Ants of four castes were collected from the trails and nest entrances of 18 mature colonies in the field. A total of 21,254 ants were collected on the trails and 14,649 collected on the mounds. Parasitism on the trails was 5.23% (1,102 foragers and 10 soldiers) and on the mounds was only 0.18% (25 diggers and 2 soldiers). On the trails, 46.2% were attacked by *Apocephalus attophilus* Borgmeier, 1928, 22.6% by *Myrmosicarius grandicornis* Borgmeier, 1928, 16.6% by *Eibesfeldtphora erthali* (Brown, 2001) and 14.6% by *Apocephalus vicosae*, Disney 2000. Only two phorid species, *M. grandicornis* and *E. erthali*, were observed parasitizing burrowers, while only *E. erthali* parasitized soldiers. This is the first time that *Atta* spp. excavators and soldiers have been shown to be parasitized by phorids. When evaluating parasitism among areas, *A. attophilus* accounted for the highest proportion of parasitism of workers collected in PAL (74.44%) and EMB (77.24%), followed by *E. erthali* in the same areas. On the other hand, *M. grandicornis* and *A. vicosae* were the species with the highest proportion of parasitism in the UFT area, with 55.4% and 30.63%, respectively. Among the colonies, parasitism of *A. laevigata* by phorid species was generally alternating. When considering parasitism preference with respect to worker size, *M. grandicornis* (98.41%) and *A. vicosae* (94.44%) preferred to parasitize smaller workers, while *A. attophilus* (61.52%)

preferred to parasitize larger workers, whereas parasitism by *E. erthali* hardly varied in worker size preference among colonies. The workers showed fidelity to the trails and to the mounds in the same nest. And no marked worker was observed transitioning from trails to mound and vice versa in either of the two bioassays.

Keywords: Parasitoid, *Atta laevigata*, worker castes, nests, spatial fidelity.

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 Formigas cortadeiras .....	16
2.2 Organização social das formigas: polimorfismo e divisão de trabalho .....	17
2.3 Forídeos parasitoides de formigas-cortadeiras .....	19
2.4 Fidelidade espacial em colônias de formigas-cortadeiras.....	21
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>

### CAPÍTULO 1

<b>ARTIGO 1. Differential parasitism by four species of phorid flies when attacking three worker castes of the leaf-cutting ant <i>Atta laevigata</i> (Smith, 1858).....</b>	<b>30</b>
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Materials and Methods.....	36
Results.....	40
Discussion.....	45
References.....	50

### CAPÍTULO 2

<b>Parasitismo intercolonial da formiga-cortadeira <i>Atta laevigata</i> (Smith, 1858) por moscas Phoridae em função do tamanho do hospedeiro.....</b>	<b>57</b>
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Materiais e Métodos.....	62
Resultados.....	67
Discussão.....	71
Referências.....	73

### CAPÍTULO 3

#### Fidelidade espacial de operárias às entradas de ninhos da formiga-cortadeira

<b><i>Atta laevigata</i> (Smith, 1858) (Formicidae).....</b>	<b>77</b>
Resumo.....	78
Abstract.....	79
Introdução.....	80
Materiais e Métodos.....	82
Resultados.....	85
Discussão.....	87
Referências.....	88
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>5. APÊNDICE.....</b>	<b>94</b>

## APRESENTAÇÃO

Tendo em vista que a formiga-cortadeira *Atta laevigata* (Smith, 1858) é uma das espécies mais nocivas e de grande importância no Brasil, provocando sérios danos por cortarem grandes quantidades de folhas frescas e por serem de difícil controle, que o método mais utilizado para controlar é o químico, que são altamente contaminantes e tóxicos, que pela necessidade de redução de agroquímicos no ambiente e supressão das populações de formigas-cortadeiras, o uso do inimigo naturais, forídeos parasitoides, como o principal agente de controle biológico das formigas-cortadeiras, que parasitam as operárias adultas, é necessário. O estudo teve como objetivo relatar algumas características biológicas e ecológicas das interações entre a formiga-cortadeira *Atta laevigata* por quatro espécies forídeos de parasitoides.

Esta tese foi formatada segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte (PPG-BIONORTE) e está estruturada da seguinte forma:

- Introdução
- Revisão Bibliográfica
- Divisão em três capítulos, onde cada capítulo tem o formato de um artigo, e estão compostos de Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão
- Conclusão.

**Capítulo 1 (Artigo Publicado) - DIFFERENTIAL PARASITISM BY FOUR SPECIES OF PHORID FLIES WHEN ATTACKING THREE WORKER CASTES OF THE LEAF-CUTTING ANT *ATTA LAEVIGATA* (Smith, 1858)** PLoS One. 16(5): e0250973, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250973>

**Capítulo 2 - PARASITISMO INTERCOLONIAL DA FORMIGA-CORTADEIRA *ATTA LAEVIGATA* (Smith, 1858) POR MOSCAS PHORIDAE EM FUNÇÃO DO TAMANHO DO HOSPEDEIRO.**

**Capítulo 3 - FIDELIDADE ESPACIAL DE OPERÁRIAS ÀS ENTRADAS DE NINHOS DA FORMIGA-CORTADEIRA *Atta laevigata* (Smith, 1858).**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As formigas-cortadeiras, em especial as do gênero *Atta* Fabricius são importantes agentes modificadores da região Neotropical, sejam em virtude de sua ampla área de distribuição, ou pela capacidade de colonizar os mais diversos habitats (Hölldobler & Wilson 2010, Della Lucia et al. 2014). Cortam uma variedade de material vegetal fresco para o cultivo de fungos simbióticos dos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* (Agaricaceae: Leucocoprinae) que crescem em seus ninhos e atuam como principal fonte de alimento para as colônias (Mueller et al. 1998, Forti 2011).

Devido aos efeitos das atividades de desfolhamento, e por dominarem os ambientes naturais e afetados pelo homem (Fowler 1989), são considerados organismos-chave na maioria dos ecossistemas (Hölldobler & Wilson 2010). Em ambientes naturais, *Atta* spp. causam importantes efeitos sobre o solo e a vegetação (Sternberg et al. 2007), melhorando as propriedades físicas e químicas do solo (Farji-Brener & Ghermandi 2008), modificando a sucessão de espécies através da alteração dos substratos e afetando os padrões de dispersão de sementes (Farji-Brener & Medina 2000). No entanto, em ambientes simplificados como nos agroecossistemas, com lavouras agrícolas e florestais, essas formigas-cortadeiras são consideradas importantes pragas, ocasionando perdas significativas pelos danos causados com o corte de enormes quantidades de biomassa vegetal (Hernández et al. 1999, Montoya-Lerma et al. 2012).

A formiga-cortadeira *Atta laevigata* é uma das espécies de grande importância econômica no Brasil (Fowler et al. 1989, Forti 2011). Devido ao polimorfismo acentuado entre as operárias e uma complexa organização social, as colônias dessas formigas desenvolveram mecanismos físicos, simbióticos e comportamentais que lhes permitem superar as ações dos diversos métodos usados (mecânico, cultural e químico) para manejar suas populações, tornando seu controle difícil e oneroso (Montoya-Lerma et al. 2012, Della Lucia et al. 2014). O método químico sob a forma de iscas granuladas é o mais empregado, sendo restringidos principalmente a sulfluramida e fipronil (Oliveira et al. 2011, Montoya-Lerma et al. 2012). Por causa da alta toxicidade e por não serem seletivos, a maioria dos inseticidas foram proibidos (Montoya-Lerma et al. 2012).

As cortadeiras são importantes componentes na cadeia alimentar, podendo servir como hospedeiros para diferentes inimigos naturais, como as pequenas moscas parasitoides da família Phoridae (Diptera) (Bragança et al. 1998, Elizalde & Folgarait 2011). Os forídeos poderiam ser úteis em programas de controle biológico de cortadeiras, visando diminuir as populações dessas formigas (Bragança et al. 1998, Tonhasca & Bragança 2000). Como parasitoides, os forídeos utilizam as formigas como seus hospedeiros, ovipositando em partes

específicas do corpo das operárias para completar seu ciclo de vida. O resultado do parasitoidismo se dá com a morte da operária e a emergência do parasitoide adulto (Erthal & Tonhasca 2000, Bragança & Medeiros 2006).

Os ataques de forídeos também podem ocasionar impactos no comportamento de forrageamento de *Atta* spp., podendo causar redução na quantidade de fragmentos vegetais transportados pelas operárias, além de reduzir o número de operárias presentes nas trilhas (Bragança et al. 1998, Tonhasca et al. 2001). Se considerarmos que em ecossistemas naturais os forídeos causam tanto efeitos diretos como indiretos em populações de formigas, podemos pensar na hipótese de que esses parasitoides poderiam ser eficazes no controle das saúvas em ecossistemas implantados.

A divisão do trabalho é a marca registrada do sucesso de muitos animais sociais (Waddington & Hughes 2010). Nas formigas-cortadeiras a organização social é caracterizada por grupos de indivíduos morfologicamente distintos (polimorfismo), de acordo com o trabalho ou funções exercidas (polietismo), o que permite a realização de várias tarefas em cooperação, como a manutenção e reprodução da colônia e a própria manutenção da integração social (Della Lucia et al. 1993, Souza et al. 2011). Neste sentido, o sucesso da colônia é aprimorado pelo aumento da eficiência dos indivíduos no desempenho de tarefas por meio da especialização funcional (Leighton et al. 2017, Lagrure et al. 2018). A atribuição das operárias às suas respectivas funções raramente é regulamentada pela rainha ou outros membros do grupo dominante (Kohlmeier et al. 2018). Pelo contrário, a divisão de trabalho entre as diferentes castas nas cortadeiras é auto-organizada, podendo ser afetada pelo tamanho e idade das operárias, experiências e características genéticas (Hölldobler & Wilson 1990, Waddington & Hughes 2010, Parmentier et al. 2015), além de sofrer adaptações em respostas a ameaças externas por estratégias especializadas de defesa, que são cruciais para sobreviver aos ataques de inimigos naturais (Parmentier et al. 2015, Lagrure et al. 2018).

Na organização do trabalho das formigas-cortadeiras, um fator importante é a localização das inúmeras tarefas específicas realizadas pelas operárias no ninho (Wilson 1980, Forti 2011). A fidelidade espacial já foi relatada em vários locais em ninhos de formigas (Richardson et al. 2017). Apesar das operárias serem flexíveis na realização das tarefas, podendo ser realocadas para diferentes tarefas, de acordo com as necessidades da colônia (Wilson 1985), a conexão entre as tarefas realizadas pelas operárias e sua organização espacial ainda é pouco estudada.

Nas relações entre hospedeiros e parasitoides, o conhecimento a respeito do parasitismo de moscas Phoridae, do comportamento das operárias de *A. laevigata* na presença do parasitoide servirão de subsídio para gerar suporte para a elaboração e

condução de novos projetos voltados ao controle das formigas-cortadeiras. Neste contexto, esta tese tem como objetivos:

1. Investigar as taxas diferenciais do parasitismo de castas operárias de *Atta laevigata* por espécies de forídeos;
2. Comparar a taxa de parasitismo do total de operárias coletadas entre as espécies de forídeos;
3. Comparar a taxa de parasitismo pelo conjunto de parasitoides entre colônias de cada uma de três áreas de coleta;
4. Comparar o número de formigas parasitadas por cada um dos parasitoides entre os hospedeiros potenciais (operárias das trilhas) de duas classes de tamanho;
5. Verificar a fidelidade espacial de operárias em colônias de *A. laevigata*, ou seja, se as operárias que realizam tarefas nas regiões das trilhas de forrageamento, também realizam tarefas no monte de terra do mesmo ninho, e vice-versa.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Formigas-cortadeiras

Entre os insetos eussociais, as formigas (Hymenoptera: Formicidae) representam o grupo animal mais abundante e diverso do ecossistema tropical, com mais de 17.000 espécies descritas (Agosti & Johnson 2003). A herbivoria é representada pelas formigas cultivadoras de fungos, tribo Attini (subfamília Myrmicinae). Os gêneros inferiores dessa tribo usam substratos variados, como partes mortas de plantas, cadáveres de invertebrados e fezes de insetos, para esse cultivo; enquanto os gêneros superiores, as verdadeiras formiga-cortadeiras dos gêneros *Atta* Fabricius, 1804 e *Acromyrmex* Mayr, 1865, possuem o hábito de recortar e transportar material vegetal fresco de plantas para o interior de seus ninhos onde será usado como substrato para o crescimento e desenvolvimento do fungo simbiótico basidiomicetos (gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocuprinus*) que elas cultivam para sua alimentação (Mueller et al. 1998, Hölldobler & Wilson 2010, Forti 2011).

As formigas-cortadeiras são nativas do Novo Mundo, apresentando ampla distribuição na região Neotropical, e estão disseminadas em todo o território nacional atacando praticamente todas as plantas cultivadas (Della Lucia et al. 2014). As espécies do gênero *Atta* (saúvas), estão entre as mais investigadas dentre os insetos tropicais. O Brasil abriga o maior número de espécies, sendo, provavelmente, a região amazônica o centro de origem e irradiação (Schoereder & Coutinho 1990, Sales 1998).

As saúvas desempenham papéis fundamentais no funcionamento dos ecossistemas, os quais podemos ressaltar que o corte da vegetação fresca influencia a sobrevivência, crescimento e reprodução de plantas atacadas, como também a dispersão e germinação de sementes, e conseqüentemente, influenciar na distribuição de espécies de plantas, contribuindo para a heterogeneidade espacial da vegetação (Farji-Brener & Werenkraut 2015, Costa & Vieira-Neto 2016). A construção dos ninhos e galerias profundas altera as propriedades físicas e químicas do solo, criando micro-habitats ricos em nutrientes e favorecendo absorção direta de nutrientes pelas plantas vizinhas aos ninhos (Meyer et al. 2011, Sosa & Brazeiro 2012). Em ambientes naturais, como o Cerrado, a abundância de saúvas parece ser maior do que em florestas tropicais. Estima-se que estas formigas consumam entre 13 a 17% da biomassa foliar produzida anualmente pelas espécies arbóreas. Por estas razões, são frequentemente referidas como espécies-chaves e engenheiros de ecossistemas em vários ambientes (Saha et al. 2012, Farji-Brener & Werenkraut 2015).

Em áreas antropogênicas, devido aos prejuízos causados pelas atividades de desfolha, algumas espécies tornaram-se as pragas mais problemáticas à agrossilvicultura e

às pastagens, ocasionando danos significativos (Della Lucia & Souza 2011). Em plantios de eucalipto, na região de Mata Atlântica, as cortadeiras reduziram a produção de madeira entre 0,04 e 0,13 m<sup>3</sup> por hectare, resultando em um nível de dano econômico entre 13,4 e 39,2 m<sup>2</sup> por hectare nesta região (Mundim et al. 2012). Uma densidade maior que 80 saúveiros por hectare pode reduzir mais de 50% da produção de madeira de *Eucalyptus* spp. na idade de corte (84 meses) (Zanetti et al. 2003). Já em plantações de cana-de-açúcar, apenas um formigueiro de *Atta bisphaerica* Forel por hectare, causou uma perda de 450 kg de açúcar, o equivalente a 300 litros de álcool (Della Lucia & Souza 2011). Estima-se que somente as espécies de *Atta* são responsáveis pelo corte de aproximadamente 15% das folhas produzidas nas florestas tropicais da América (Hölldobler & Wilson 1990).

No Brasil são conhecidas onze espécies de *Atta*, sendo a espécie *Atta laevigata* uma das mais conhecidas, e considerada praga de grande importância econômica (Fowler et al. 1989). A saúva *A. laevigata* é encontrada em toda a América do Sul e é amplamente distribuída no Brasil (Viana et al. 2004, Forti 2011). Esta espécie se especializou em forragear gramíneas e dicotiledôneas nativas e cultivadas de diferentes biomas, porém prefere estas últimas. A formiga-cortadeira *A. laevigata* é facilmente reconhecida com base na cabeça muito grande e brilhante dos soldados, uma característica que levou ao nome popular "saúva-cabeça-de-vidro" (Viana et al. 2004).

## 2.2. Organização social das formigas: polimorfismo e divisão de trabalho

As formigas-cortadeiras são consideradas insetos eusociais, pois apresentam características como: cuidado e cooperação entre companheiras de ninho, sendo seus indivíduos considerados altruístas, sobreposição de duas ou mais gerações de adultos dentro de um mesmo grupo e divisão de trabalho (Wilson 1971).

Esses insetos possuem uma organização social entre as mais complexas, sendo baseada na divisão do trabalho (Hölldobler & Wilson 1990, Souza et al. 2011). Na divisão do trabalho os indivíduos se desenvolvem em fenótipos distintos (castas) que são morfológicamente adaptados para papéis específicos, como reprodução, coleta de alimentos ou defesa (Oster & Wilson 1978, Hölldobler & Wilson 1990). Isso permite uma maior eficiência na execução das tarefas especializadas na colônia, fundamental para o sucesso ecológico de insetos eusociais como formigas, abelhas, vespas e cupins (Oster & Wilson 1978, Hölldobler & Wilson 1990, Fjerdingstad & Crozier 2006).

As tarefas nas colônias de insetos sociais são executadas em grandes ninhos conspícuos que abrigam milhões de operárias, atingindo maior complexidade estrutural em

*Atta* spp. (Forti 2011). Um ninho de das espécies de *Atta* se constitui da parte externa, monte de terra solta, que se caracteriza por possuir grandes quantidades de orifícios que leva à parte interna, sendo esta formada por túneis de diversos diâmetros e formas, que permitem o trânsito das formigas e interligam os orifícios com as câmaras (Forti 2011). A área que rodeia os ninhos é formada por caminhos bem definidos, livre de vegetação e obstáculos e são conhecidos como trilhas de forrageamento. As trilhas saem dos orifícios de abastecimento até as plantas exploradas e são utilizadas para recrutamento de operárias do mesmo ninho e também para exploração das espécies vegetais (Cedeño-León 1984).

A população de um formigueiro de cortadeira é composta por indivíduos que se diferenciam morfológicamente (polimorfismo), de acordo como o trabalho ou as funções que desempenham na colônia (polietismo) (Della Lucia et al 1993). O polietismo pode ser classificado em temporal e morfológico (Oster & Wilson 1978). No polietismo temporal, as tarefas em uma colônia são alocadas entre as operárias com base em sua idade. Operárias jovens realizam tarefas nas regiões internas do ninho, como abertura limpeza das câmaras, cuidado com as pupas, cultivo do fungo e assistência à rainha, e as mais velhas realizam tarefas foras do ninho, como forrageamento e defesa (Oster & Wilson 1978, Sturgis & Gordon 2012). Neste caso, as mudanças de comportamento acontecem independentes de qualquer alteração morfológica. No polietismo morfológico, o tamanho e ou a forma das operárias estão relacionados ao desempenho das tarefas (Hölldobler & Wilson 2010, Mersch et al. 2013).

Em *Atta* spp., a diferenciação morfológica entre as operárias é mais visível (Souza et al. 2011, Wilson 1980), podendo-se exercer funções específicas de acordo com a casta:

- a) Jardineiras e “babás”, operárias menores, possuem cápsula cefálica com largura média de 1,0 mm de largura. São responsáveis por cuidar das hifas, da prole e do tratamento final do substrato;
- b) Generalistas dentro do ninho, operárias de tamanho intermediário, com aproximadamente 1,4 mm de largura da cápsula cefálica, desenvolvem atividades de degradação da vegetação antes de incorporar ao jardim de fungo, transporte de outras operárias, assistência à prole durante a ecdise, cuidados com a rainha, descarte do lixo e reconstrução das esponjas de fungo;
- c) Forrageadoras e escavadoras, com largura média da cápsula cefálica de 2,2 mm, são operárias que exploram, coletam a vegetação nova, cortam e recuperam a vegetação, escavam o ninho;
- d) Defensoras ou soldados, operárias maiores com cápsula cefálica acima de 3,0 mm de largura, cuja cabeça cordiforme em razão do alargamento dos músculos adutores, conferem às mandíbulas capacidade de corte.

A rainha é a casta reprodutiva do formigueiro, sendo, por tanto, a maior formiga da colônia, geralmente mede uma polegada e pode viver até 20 anos em laboratório (Fowler & Robinson 1979, Wilson & Hölldobler 1994).

A divisão do trabalho entre as operárias de formigas-cortadeiras pode sofrer adaptações por meio de sinais ambientais emitidos, como nutrição, temperatura e feromônios (Passera et al. 1996, Hölldobler & Wilson 1990), indicando as necessidades temporais dessa colônia, ou ainda em resposta a ameaças externas por estratégias de defesa, pela presença de seres indesejáveis nas colônias, como as moscas Phoridae parasitoides (Bragança 2011, Lagrure et al. 2018).

### 2.3. Forídeos parasitoides de formigas-cortadeiras

Parasitoides são organismos que se desenvolvem em outro organismo único (hospedeiro), extrai nutrição dele e o mata como um resultado direto ou indireto desse desenvolvimento (Eggleton & Gaston 1990). Os parasitoides são organismos importantes em ambientes naturais e modificados pelo homem, atuando como componentes importantes nas cadeias alimentares e podem ser usados como agentes de controle biológico contra uma série de pragas de importância econômica (Benelli et al. 2017). Eles ocorrem em cinco ordens de insetos holometábolos: Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Neuroptera e Diptera. Os da ordem Diptera inclui cerca de 16.000 espécies descritas, ou cerca de 20% das espécies conhecidas com este estilo de vida (Eggleton & Belshaw 1992). Os forídeos parasitoides, espécies da família Phoridae (Diptera), são considerados organismos importantes como inimigos naturais das formigas-cortadeiras (Disney 1994, Bragança 2011).

Os forídeos são moscas de pequeno tamanho, encontrados em todas as regiões biogeográficas e com maior diversidade de espécies nos trópicos (Disney 1994). Esses parasitoides exploram uma grande variedade de hospedeiros, como formigas (Formicidae), abelhas (principalmente Apidae), milípedes (Diplopoda) e cupins (Isoptera) (Disney 1986, Disney 1994, Brown 2006). O maior número de casos de parasitismo por forídeos foi registrado em formigas. Entre os gêneros com espécies parasitadas por forídeos estão *Camponotus*, *Cephalotes*, *Crematogaster*, *Dinoponera*, *Paraponera*, *Atta*, *Acromyrmex* e *Solenopsis*. Sendo os estudos sobre as interações entre formigas e forídeos parasitoides mais intensificados entre as espécies de *Solenopsis* (Disney 1994).

Os forídeos utilizam as formigas-cortadeiras como hospedeiros para completar seu ciclo de vida. As fêmeas dos forídeos atacam as operárias quando estas saem do ninho, ovipositando em partes específicas do corpo do hospedeiro (endoparasitoidismo), onde ocorre

o desenvolvimento larval. O local de oviposição varia entre as espécies de forídeos, podendo ocorrer no gáster, na parte posterior ou direita da cabeça ou entre as mandíbulas (Tonhasca et. al. 2001, Bragança 2011). Nestes locais, as formas imaturas do parasitoide alimentam-se do conteúdo interno das operárias. No final do desenvolvimento larval, ocorre a morte do hospedeiro e a larva se transforma em pupa, 24 horas após a morte da formiga. A pupa pode ser formada no interior da cápsula cefálica ou tórax, entre as mandíbulas ou até mesmo fora do corpo do hospedeiro. São destes locais que os parasitoides adultos emergem (Erthal & Tonhasca 2000, Bragança & Medeiros 2006).

Os forídeos podem ser espécie-específicos ou ter mais de um hospedeiro; e cada espécie de *Atta* ou *Acromyrmex* pode ser atacada por mais de uma espécie de forídeo. A maioria desses forídeos parasita apenas uma espécie de formiga (Bragança 2011). As espécies de forídeos que usam *Atta* como hospedeiros não usam formigas *Acromyrmex* (Elizalde & Folgarait 2011). Bragança (2011) cita 30 espécies de forídeos dentro de oito gêneros associados a formigas *Acromyrmex*, enquanto que 39 espécies em cinco gêneros em *Atta* (Folgarait 2013). As moscas forídeos são os insetos que tem a maior gama de hospedeiros parasitados (Eggleton & Belshaw 1992), e que constituem o único grupo conhecido que ataca formigas adultas (Disney 1994). As espécies de forídeos que parasitam com maior frequência as formigas *Atta* spp. pertencem principalmente aos gêneros *Apocephalus* Coquillett, *Eibesfeldtphora* Disney e *Myrmosicarius* Borgmeier (Bragança 2011, Uribe et al. 2014). Recentemente *Eibesfeldtphora* foi elevado ao estado de gênero (Disney et al. 2009). *Myrmosicarius* é o gênero com a maior distribuição geográfica variando de 35°N para 41°S (Folgarait 2013). No entanto, *Eibesfeldtphora* está presente em um maior número de países (Bragança 2011). Os gêneros mais importantes que atacam *Atta*, pela sua variedade de hospedeiros, potencial de controle biológico e maior distribuição geográfica são, *Apocephalus* (Brown 1997) *Eibesfeldtphora* (Disney et al. 2009, Brown 2001), *Myrmosicarius* (Disney et al. 2006).

A mortalidade de operárias de saúvas devido ao parasitismo natural (efeito direto) de forídeos é considerada baixo, variando de cerca de 2,0 a 20% (Bragança & Medeiros 2006, Elizalde & Folgarait 2011). Contudo, os forídeos também podem ocasionar impacto negativo no comportamento de forrageamento das saúvas (efeito indireto) (Tonhasca 1996, Bragança et al. 1998). As tentativas de ataques contra as saúvas ocasionam redução do número e tamanho das operárias que transitam nas trilhas, a diminuição da massa dos fragmentos vegetais (cargas) e o aumento do número de fragmentos vegetais abandonados nas trilhas. Induz a alteração do local de forrageamento e do tempo que elas gastariam na coleta de material vegetal para o ninho (Bragança et al. 1998, Folgarait 2013). Além disso, ele pode

estimular a implantação de proteção de posturas defensivas com o corpo e a associação com pequenas operárias que impedem o ataque dos forídeos (Elizalde & Folgarait 2011).

#### **2.4. Fidelidade espacial em colônias de formigas-cortadeiras**

As formigas-cortadeiras são bons modelos para examinar a fidelidade aos locais de trabalho (Elizalde & Farji-Brener 2012). Suas colônias são compostas por milhares de operárias que realizam tarefas específicas em cooperação e coordenação intimamente ligadas à distribuição espacial (Hölldobler & Wilson 2010, Heyman et al. 2017).

A distribuição espacial das tarefas entre várias castas no formigueiro não é aleatória (Mersch et al. 2013), podendo ser alocadas conforme a idade do indivíduo (polietismo etário) e a morfologia (polietismo morfológico) (Oster & Wilson 1978, Hölldobler & Wilson 1990). À medida que as operárias envelhecem, elas desempenham certos tipos de tarefas mais frequentemente. O “hormônio juvenil” muda com a idade e está associado a mudanças no papel de um indivíduo no ninho (Wilson 1971, Sullivan et al. 2000). Em geral, as operárias mais jovens na colônia permanecem confinadas no ninho, onde cultivam o fungo, cuidam da ninhada e da rainha, enquanto os indivíduos mais velhos realizam tarefas fora do ninho, realizando tarefas de forrageamento e defesa (Hölldobler & Wilson 1990). Características morfológicas associadas à idade podem determinar o local das tarefas (Robinson 1992, Hölldobler & Wilson 2010). Por exemplo, em ninhos naturais de *Pogonomyrmex badius* (Latreille), a maioria das enfermeiras é encontrada no fundo do ninho, enquanto as forrageadoras tendem a estar próximas à superfície (Tschinkel 2004). A ordem também é mantida em ninhos de laboratório bidimensionais artificiais. Nesse local, diferentes operárias passam grande parte do tempo em áreas específicas de ninhos, apropriadamente denominadas como “zonas de fidelidade espacial” (Sendova-Franks & Franks 1995, Mersch et al. 2013).

Durante as atividades, para se orientarem e reconhecerem o ponto de origem, as operárias utilizam um conjunto de informações individuais (contato físico, memória visual e experiência) (Farji-Brener et al. 2010) e sociais (trilhas químicas) (Hölldobler & Wilson 1990) não apenas para forragearem, mas também durante a formação da colônia (Banks & Srygley 2003). Ao se deslocarem nas trilhas na busca de folhas frescas (Hölldobler & Wilson 1990), as operárias das formigas-cortadeiras deixam trilhas químicas ao longo das quais os indivíduos se orientam, indo e voltando entre os orifícios do ninho às fontes de alimento (Hölldobler & Wilson 1990, Lopes et al. 2016). As trilhas emergem de uma sucessão de depósitos de feromônios que são depositados pelos batedores que descobriram a fonte de

alimento e que voltam ao ninho, e depois pelas operárias que são recrutadas por esses batedores de dentro do ninho. No entanto, as trilhas não são apenas caminhos definidos por feromônios sobre substratos existentes, elas podem ser formadas de corredores físicos feitos pelas formigas por meio de cortes da vegetação e limpeza de detritos ao longo dos caminhos até seus locais de forrageamento (Howard 2001). Como as trilhas persistem no ambiente por certos períodos de tempo, as formigas forrageiras fazem visitas repetidas a essas fontes de alimento, sendo, portanto, fieis a esses locais (Lopes et al. 2016).

Outro aspecto importante é capacidade de discriminar os membros de sua própria colônia (companheiras de ninhos) (Hölldobler & Wilson 1990). Na sociedade de formigas, a discriminação entre as companheiras de ninho depende do olfato e é baseada em misturas de componentes químicos de baixa volatilidade no exoesqueleto (hidrocarbonetos cuticulares: CHCs) (Lahav et al. 1999). Para cada tarefa desempenhada, por exemplo, construção de ninhos, cuidado da ninhada ou forrageamento, as operárias têm influências de perfis de CHC (Wagner et al. 1998). Com base nessas diferenças sistemáticas nos perfis de CHC, as operárias são capazes de discriminar entre companheiras de ninho que executam tarefas diferentes (Greene & Gordon 2003). Tanto nas trilhas como nos montes de terra, as operárias podem ser diferenciadas, pois nestes locais, a mistura de CHCs entre os indivíduos da colônia não é completa porque os trabalhadores em um grupo-tarefa se encontram e interagem uns com os outros com mais frequência do que entre os grupos-tarefa (Pamminger et al. 2014, Tschinkel & Hanley 2017).

Além dos sinais químicos para se orientarem, as operárias de formigas utilizam orientação visual por meio de pistas ou marcas visuais que possibilitam a formação da memória, pois depois que o caminho é percorrido repetidas vezes, as marcas visuais acabam sendo memorizadas (Collett & Collett 2002). A informação individual deriva de contato físicos (Hölldobler & Wilson 1990), podendo usar pistas visuais ou arranjo espacial da trilha e do campo magnético da terra para se orientar quando estão forrageando (Riveros & Srygley 2008). Também, são capazes de diferenciarem trilhas específicas. As forrageadoras de *A. laevigata* usam informações da geometria das bifurcações da trilha para se reorientarem de forma adaptativa se caminharem na direção errada (Jackson et al. 2004).

Na atividade de forrageamento, a forma como os organismos exploram o espaço para monitorar, descobrir, e recuperar recursos é de extrema importância para o sucesso reprodutivo e demografia populacional (Krebs & Davies 1993). O ajuste à variabilidade espaço-temporal dos recursos dos ambientes, a alocação de tarefas, é, portanto, um princípio fundamental do forrageamento (Pyke et al. 1977). A fidelidade aos locais de forrageamento acarreta benefícios e custos. A experiência de uma formiga forrageadora é importante na decisão da rota de forrageamento (Elizalde & Farji-Brener 2012). O retorno para os locais com

recursos de qualidade conhecida reduz o tempo de busca e aumenta a probabilidade de adquirir alimentos, aumentando a eficiência da tarefa (Janmaat et al. 2009). No entanto, a fidelidade aos locais de forrageamento pode reduzir a chance de encontrar novos recursos (Fewell 1990), sendo, portanto, mais ou menos flexível (Elizalde & Farji-Brener 2012), e permitindo que os organismos se adaptem rapidamente a situações de mudança (Dussutour et al. 2009).

A flexibilidade aos locais de atividade pode, portanto, aumentar a resiliência da colônia em face a ameaças imediatas e mudanças de longo prazo nas condições externas (Lagrué et al. 2018). Como por exemplo, defesa contra os forídeos parasitoides (Orr 1992, Bragança 2011). Os forídeos parasitam as formigas-cortadeiras adultas para completar seu ciclo de vida, e, portanto, segundo Souza et al. (2021) uma consequência importante da especificidade desses parasitoides para diferentes castas ou classes de tamanho, é o aumento das taxas gerais de parasitismo, causando provavelmente, um efeito combinado na interrupção das atividades normais da colônia, aumentando a mortalidade de *A. laevigata*. A familiaridade ao local, por intermédio da divisão de trabalho, pode fazer com que as formigas sofram adaptações comportamentais, por estratégias especializadas de defesa e reduzir o risco de ataques de inimigos naturais (Lagrué et al. 2018).

### 3. REFERÊNCIAS

AGOSTI, D.; JOHNSON, N. F. **La nueva taxonomía de hormigas**. In: Fernández, F. (ed.). Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, p. 45-48, 2003.

BANKS, N. A.; SRYGLEY, R. B. Orientation by magnetic field in leaf-cutter ants, *Atta colombica* (Hymenoptera: Formicidae). **Ethology**, n. 109, p. 835-846, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.0179-1613.2003.00927.x>

BENELLI, G.; GIUNTI, G.; TENA, A.; DESNEUX, N.; CASELLI, A.; CANALE, A. The impact of adult diet on parasitoid reproductive performance. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 807-823, 2017, <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0835-2>.

BRAGANÇA, M. A. L.; TONHASCA, A.; LUCIA, T. Reduction in the foraging activity of the leaf cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora* sp. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 89, n. 3, p. 305-311, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00413.x>



BRAGANÇA, M. A. L.; MEDEIROS, Z. C. S. Ocorrência e características biológicas de forídeos parasitoides (Diptera: Phoridae) da saúva *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) em Porto Nacional, TO. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 3, p. 408-411, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000300018>

BRAGANÇA, M. A. L. **Parasitoides de formigas-cortadeiras**. In: DELLA LUCIA, T. M. C., editor. *Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV, p. 321-43, 2011.

BROWN, B. V. Revision of the *Apocephalus attophilus*-group of ant-decapitating flies (Diptera: Phoridae). **Contribution in Science**, v. 468, p. 1-60, 1997.

BROWN, B. V. Taxonomic revision of *Neodohrniphora*, subgenus *Eibesfeldtphora* (Diptera: Phoridae). **Insect Systematics and Evolution**, v. 32, n. 4, p. 393-409, 2001. <https://doi.org/10.1163/187631201X00272>

BROWN, B. V. Revision of the untreated taxa of *Melaloncha* s. s. bee-killing flies (Diptera: Phoridae). **Zootaxa**. v. 1280, p. 1-68, 2006.

CEDEÑO-LEÓN, A. **Los bachacos** - aspectos de su ecología. *Acta Científica*, p. 73, 1984.

COLLETT, T. S.; COLLETT, M. Memory use in insect visual navigation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 542-552, 2002.

COSTA, A. N.; VIEIRA-NETO, H. M. Species turnover regulates leaf-cutter ant densities in environmental gradients across the Brazilian Cerrado. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 6, p. 474-478, 2016. <https://doi.org/10.1111/jen.12277>

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOLWER, C. H. G.; ARAÚJO, M. S. Castas de formigas cortadeiras. In: **As formigas cortadeiras**. DELLA LUCIA, T. M. C. Editora Folha Nova de Viçosa. Brasil, p. 43-50, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: **Formigas-cortadeiras – da biologia ao manejo**, v. 1, ed. by DELLA LUCIA, T. M. C. Editora UFV, Brasil, p. 13-26, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GRANDRAL, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ant peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, p. 14-23, 2014. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>

DISNEY, R. H. L. Two remarkable new species of scuttle-fly (Diptera: Phoridae) that parasitize termites (Isoptera) in Sulawesi. **Systematic Entomology**, v. 11, p. 413-422, 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1986.tb00531.x>

DISNEY, R. H. L. **Scuttle Flies: The Phoridae**, Chapman and Hall, London, p. 467, 1994.

DISNEY, R. H. L.; ELIZALDE, L.; FOLGARAIT, P. J. New species and revision of *Myrmosicarius* (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 47, n. 3, p. 771-810, 2006.

DISNEY, R. H. L.; ELIZALDE, L.; FOLGARAIT, P. J. New species and new records of scuttle flies (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter and army ants (Hymenoptera: Formicidae), **Sociobiology**, v. 54, n. 2, p. 601-631, 2009.

DUSSUTOUR, A.; DENEUBOURG, J-L.; BESHES, S.; FOURCASSE, V. Individual and collective problem-solving in a foraging context in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Animal Cognition**, v. 12, p. 21-30, 2009.

EGGLETON, P.; GASTON, K. J. Parasitoid species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises? **Oikos**, v. 59, p. 417-421, 1990.

EGGLETON, P; BELSHAW, R. Insect parasitoids: an evolutionary overview. **Biological Sciences**, v. 337, p. 1-20, 1992. <https://doi.org/10.1098/rstb.1992.0079>

ELIZALDE, L.; FOLGARAIT, P. J. Biological attributes of Argentinian phorid parasitoids (Insecta: Diptera: Phoridae) of leaf-cutting ants, *Acromyrmex* and *Atta*. **Journal of Natural History**, v. 45, p. 43-44, 2011. <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.602478>

ELIZALDE, L.; FARJI-BRENER, A. G. To be or not to be faithful: flexible fidelity to foraging trails in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*. **Ecological Entomology**, v. 37, p. 370-376, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2012.01368.x>

ERTHAL, J. M.; TONHASCA, A. JR. Biology and oviposition behavior of the phorid *Apocephalus atrophilus* and the response of its host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 95, p. 71-75, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00643.x>

FARJI-BRENER, A. G.; MEDINA, C. A. The importance of where to dump the refuse: seed banks and fine roots in nests of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* and *A. colombica*. **Biotropica**, v. 32, p. 120-126, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00454.x>

FARJI-BRENER, A. G.; GHERMANDI, L. Leaf-cutting ant nests near roads increase fitness of exotic plant species in natural protected areas. **Biological Sciences**, v. 275, p.1431-1440, 2008.

FARJI-BRENER, A. G., AMADOR-VARGAS, S.; CHINCHILLA, F.; ESCOBAR, S.; CABRERA, S.; HERRERA, M. I.; SANDOVAL, C. Information transfer in head-on encounters between leaf-cutting ant workers: food, trail condition or orientation cues? **Animal Behaviour**, v. 79, n. 2, p. 343-349, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.11.009>

FARJI-BRENER, A.G.; WERENKAUT, V. A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. **Ecological Entomology**, v. 40, n. 2, p. 150-158, 2015. <https://doi.org/10.1111/een.12169>

FEWELL, J. H. Directional delity as a foraging constraint in the Western harvester ant, *Pogonmyrmex occidentalis*. **Oecologia**, v. 82, p. 45-51, 1990.

FJERDINGSTAD, E. J.; CROZIER, R. H. The evolution of worker caste diversity in social insects. **The American Naturalist**, v. 167, p. 390-400, 2006. <https://doi.org/10.1086/499545pmid:16673347>

FOLGARAIT, P. J. Leaf-cutter ant parasitoids: Current knowledge. **Psyche**, v. 2013, p. 1-10, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/539780>

FORTI, L. C. Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, UFV, p. 102-125, 2011.

FOWLER H. G.; ROBISON. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste, and efficiency. **Ecological Entomology**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 1979.

FOWLER, H. G.; PAGANI, M. I.; SILVA, A. O.; FORTI, L. C.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; VASCONCELOS, H. L. A pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**, v. 13, p. 671-675, 1989.

GREENE, M. J.; GORDON, D. M. Social insects: cuticular hydrocarbons inform task decisions. **Nature**, v. 423, p. 32, 2003. <https://doi.org/10.1038/423032a>

HERNÁNDEZ, J. V.; RAMOS C., BORGAS, M.; JAFFÉ, K. Growth of *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) nests in pine plantations. **The Florida Entomologist**, v. 82, p. 97-103, 1999. <https://doi.org/10.2307/3495840>

HEYMAN, Y.; SHENTAL, N.; BRANDIS, A.; HEFETZ, A.; FEINERMAN, O. Ants regulate colony spatial organization using multiple chemical road-signs. **Nature Communications**, v. 8, n. 15414, 2017.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1990.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Leafcutter Ants**. W. W. Norton & Company, Inc.: New York, NY, USA; London, UK, p. 1-160, 2010.

HOWARD, J. J. Costs of trail construction and maintenance in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, p. 348-356, 2001.

JACKSON, D. E.; HOLCOMBE, M.; RATNIEKS, F. L. W. Trail geometry gives polarity to ant foraging networks. **Nature**, v. 432, p. 907-909, 2004.

JANMAAT, K. R. L.; OLUPOT, W.; CHANCELLOR, R. L.; ARLET, M. E.; WASER, P. M. Long-term site fidelity and individual home range shifts in *Lophocebus albigena*. **International Journal of Primatology**, v. 30, p. 443-466, 2009.

KOHLMEIER, P.; FELDMEYER, B.; FOITZIK, S. Vitellogenin-like A-associated shifts in social cue responsiveness regulate behavioral task specialization in an ant. **PLoS Biology**, v 16, n. 6, e2005747, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005747>

KREBS, J. R.; DAVIES, N. B. **An introduction to behavioural ecology**. Blackwell Scientific Publications. Oxford, p. 292, 1993.

LAGRURE, C.; MACLEOD, C. D.; KELLER, L.; POULIN, R. Caste ratio adjustments in response to perceived and realised competition in parasites with division of labour. **Journal of Animal Ecology**, v.87, n. 5, p. 1429-1439, 2018.

LAHAV, S.; SOROKER, V.; HEFETZ, A. Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. **Naturwissenschaften**, v. 86, p. 246-249, 1999. <https://doi.org/10.1007/s001140050609>

LEIGHTON, G. M.; CHARBONNEAU, D.; DORNHAUS, A. Task switching is associated with temporal delays in *Temnothorax rugatulus* ants. **Behavioral Ecology**, v. 28, p. 319-327, 2017. <https://doi.org/10.1093/beheco/arw162>

LOPES, J. F. S.; BRUGGER, M. S.; MENEZES, R. B.; CAMARGO, R. S.; FORTI, L. C.; FOURCASSIE, V. Spatio-temporal dynamics of foraging networks in the grass-cutting ant *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Formicidae, Attini). **PLoS One**, v. 11, n. 1, e0146613, 2016.

MERSCH, D. P.; CRESPI, A.; KELLER, L. Tracking individuals shows spatial fidelity is a key regulator of ant social organization. **Science**, v. 340, n. 6136, p. 1090-1093, 2013.

MEYER, S. T.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; WIRTH, R. Ecosystem engineering by leaf-cutting ants nests of *Atta Cephalotes* drastically alter forest structure and microclimate. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 1, p. 14-24, 2011.

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, v. 58, p. 225-247, 2012. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>

MÜELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHLUTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science** v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2034>

MUNDIM, F. M.; BRUNA, E. M.; VIERA-NETO, E. H. M.; VASCONCELOS, H. L. Attack frequency and the tolerance to herbivory of Neotropical savanna trees. **Oecologia**, v. 168, n. 2, p. 405-414, 2012.

OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Manejo de formigas-cortadeiras**. In: Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo. Della Lucia, T.M.C. Editora UFV, Brazil. 400-419, 2011.

ORR, M. R. Parasitic flies (Diptera: Phoridae) influence foraging rhythms and caste division of labor in the leaf-cutter ant, *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). **Behavioral Ecology Sociobiology**, v. 30, n. 6, p. 395-402, 1992.

OSTER, G. F.; WILSON, E. O. **Caste and ecology in social insects**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, p. 352, 1978.

PAMMINGER, T.; FOITZIK, S.; KAUFMANN, K. C.; SCHÜTZLER, N.; MENZEL, F. Worker personality and its association with spatially structured division of labor. **PLoS One**, 9:e79616, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079616>

PARMENTIER, T; DEKONINCK, W; WENSELEERS, T. Context-dependent specialization in colony defence in the red wood ant *Formica rufa*. **Animal Behaviour**, v. 103, p. 161-167, 2015.

PASSERA L., RONCIN E., KAUFMANN B., KELLER L. Increased soldier production in ant colonies exposed to intraspecific competition. **Nature**, v. 37, p. 630-631, 1996. <https://doi.org/10.1038/379630a>

PYKE, G.; PULLIAM, H. R.; CHARNOV, G. L. Optimal foraging: a selective review of theory and tests. **Quarterly Review of Biology**, v. 52, p. 137-154, 1977.

RICHARDSON, T. O.; GIUGGIOLI, L.; FRANKS, N. R.; SENDOVA-FRANKS, A. B. Measuring site fidelity and spatial segregation within animal societies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 965-975, 2017. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12751>

- RIVEROS, A. J.; SRYGLEY, R. B. Do leafcutter ants, *Atta colombica*, orient their path-integrated home vector with a magnetic compass? **Animal Behaviour**, v. 75, p. 1273-1281, 2008.
- ROBINSON, G. E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 637-665, 1992. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Ento.37.1.637>
- SAHA, A. K.; CARVALHO, K. S.; STERNBERG, L. D. S. L, MOUTINHO, P. Effect of leaf-cutting ant nests on plant growth in an oligotrophic Amazon rain forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 28, p. 263-270, 2012.
- SALES, F. J. M. **Saúvas: comportamento, domesticação e aleloquímicos**. Fortaleza, p. 326, 1998.
- SCHOEREDER, J. H.; COUTINHO, L. M. Fauna and zoosociological study of sauba ants (Formicidae, Attini) of two "cerrado" regions in Sao Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 3, p. 561-568, 1990.
- SENDOVA-FRANKS, A. B.; FRANKS, N. R. Spatial relationships within nests of the ant *Leptothorax unifasciatus* (Latr.) and their implications for the division of labour. **Animal Behaviour**, v. 50, p. 121-136, 1995.
- SOSA, B.; BRAZEIRO, A. Local and landscape-scale effects of an ant nest construction in an open dry forest of Uruguay. **Ecological Entomology**, v. 37, p. 252-255, 2012.
- SOUZA, D. J.; SANTOS, J. F. L.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Organização social das formigas cortadeiras**. In: Della Lucia T. M. C., (Ed.), *Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV, p. 126-140, 2011.
- SOUZA, M. L. O.; OLIVEIRA, R. J.; BRAGANÇA, M. A. L.; SOUZA, D. J.; SAMUELS, R. I. Differential parasitism by four species of phorid flies when attacking three worker castes of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith, 1858). **PLoS One**. 16(5): e0250973, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250973>
- STERNBERG, L. S. L.; PINZON, M. C.; MOREIRA, M. Z.; MOUTINHO, P.; ROJAS, E. I.; HERRE, E. A. Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. **Biological Sciences**, v. 274, p. 315-321, 2007. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3746>
- STURGIS, S.; GORDON, D. M. Nestmate recognition in ants (Hymenoptera, Formicidae): a review. **Myrmecological News**, v. 16, p. 101-110, 2012.
- SULLIVAN, J. P.; JASSIM, O.; FAHRBACH, S. E.; ROBINSON, G. E. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. **Hormones and Behavior**, v. 37, p. 1-14, 2000.
- TONHASCA A. JR. Interactions between a parasitic fly, *Neodohrniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropica**, v. 2, p. 157-164, 1996.
- TONHASCA, A. JR.; BRAGANCA, M. A. L. Effect of leaf toughness on the susceptibility of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* to attacks of a phorid parasitoid. **Insectes Sociaux**, v. 47, p. 220-2, 2000.

TONHASCA, A. JR.; BRAGANÇA, M. A. L.; ERTHAL, JR. M. Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 48, p. 154-158, 2001.

TSCHINKEL, W. R. The nest architecture of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. **Journal of Insect Science**, v. 4, 21, 2004. <https://doi.org/10.1093/jis/4.1.21>

TSCHINKEL, W. R.; HANLEY N. Vertical organization of the division of labor within nests of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. **PLoS One**, v. 12, e0188630, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188630>

URIBE, S.; BROWN, B. V.; BRAGANÇA, M. A. L.; QUEIROZ, J. M.; NOGUEIRA, C. A. New species of *Eibesfeldtphora* Disney (Diptera: Phoridae) and a new key to the genus. **Zootaxa**, 3814: 443-450, 2014. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3814.3.11>

VIANA, L. R.; SANTOS, J. C.; ARRUDA, L. J.; SANTOS, G. P.; FERNANDES, G. W. Foraging patterns of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith) (Myrmicinae: Attini) in an area of cerrado vegetation. **Neotropical Entomology**, v.33, p. 391-393, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000300019>

WADDINGTON, S. J.; HUGHES, W. O. H. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*: the role of worker size, age and plasticity. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 64, p. 1219-1228, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-0936-x>

WAGNER, D.; BROWN, M. J. F.; BROUN, P.; CUEVAS, W.; MOSES, L. E.; CHAO, D. L.; GORDON, D. M. Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 2021-2037, 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1020781508889>

WILSON, E. O. **The insect societies**. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1971.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 7, p. 143-156, 1980.

WILSON, E. O. Between-caste aversion as a basis for division of labor in the ant *Pheidole pubiventris* (Hymenoptera, Formicidae). **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 17, p. 3537, 1985. <https://doi.org/10.1007/Bf00299425>

WILSON, E. O.; HOLLDOBLER, B. **Journey to the ants**. Cambridge, Massachusetts. Kelknap Press of Harvard University Press, 1994.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; VILELA, E. F.; LEITE, H. G.; JAFFE, K. OLIVEIRA, A. C. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* plantations in Brasil. **Sociobiology**, v. 42, n. 2, p. 433-442, 2003.

## CAPÍTULO 1

PARASITISMO DIFERENCIAL POR QUATRO ESPÉCIES DE MOSCAS  
PHORIDAE EM TRÊS CASTAS OPERÁRIAS DA FORMIGA-CORTADEIRA *ATTA*  
*LAEVIGATA* (SMITH, 1858)

## CAPÍTULO 1

(Artigo publicado na revista Plos One - Formatação da revista)

### **Differential parasitism by four species of phorid flies when attacking three worker castes of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith, 1858)**

Maria Lucimar O. Souza<sup>1</sup>, Rafael J. Oliveira<sup>2</sup>, Danival J. Souza<sup>3</sup>, Richard I. Samuels<sup>4\*</sup> Marcos A. L. Bragança<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Tocantins, Curso de Gestão em Agronegócio, 77021-090, Palmas, TO, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Tocantins, Curso de Ciências Biológicas, 77500-000, Porto Nacional, TO, Brazil.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Tocantins, Curso de Engenharia Florestal, 77410-530, Gurupi, TO, Brazil.

<sup>4</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 28013-602, RJ, Brazil.

\*Joint corresponding authors: E-mail: [marcosbr@uft.edu.br](mailto:marcosbr@uft.edu.br); richardiansamuels@gmail.com



## Abstract

Certain species of parasitic flies belonging to the Phoridae are known to attack *Atta* spp. workers foraging along trails, near nest openings used by the ants to supply the colony with plant material, and in the areas where the ants are actively cutting plant material. However, there have been no previous studies of phorid parasitism of non-foraging worker ants, for example excavators and soldiers. Excavators can be found on the surface around specialized nest openings, carrying and dumping soil on characteristic mounds. Soldiers can be found on the trails protecting foragers or guarding the different types of nest openings. The current study was performed to investigate the differential parasitism rates of *Atta laevigata* (Smith, 1858) worker castes by four species of phorids. Ants of all castes on trails and at nest entrances were collected from 18 mature colonies in the field. A total of 21,254 ants were collected from trails and 14,649 collected from the mounds of loose soil near nest openings. The captured workers were maintained under controlled laboratory conditions to evaluate the rate of parasitism. Of the ants collected from trails, 1,112 (5.23%) were found to have been parasitized, of which 1,102 were foragers and only 10 were soldiers. Of the ants collected from the soil mounds near the nest openings, only 27 (0.18%) were found to have been parasitized, of those 25 were excavators and 2 were soldiers. When evaluating parasitism of ants on the trails, 46.2% were attacked by *Apocephalus attophilus* Borgmeier, 1928, 22.6% by *Myrmosicarius grandicornis* Borgmeier, 1928, 16.6% by *Eibesfeldtphora erthali* (Brown, 2001) and 14.6% by *Apocephalus vicosae* Disney, 2000. Only two species of phorid, *M. grandicornis* and *E. erthali*, were observed parasitizing excavators, whilst only *E. erthali* parasitized soldiers. This is the first time that *Atta* spp. excavators and soldiers have been shown to be parasitized by phorids. The low rates of parasitism and specificity of certain phorid species for excavators and soldiers is discussed in relation to the behavioral interactions of hosts and their parasitoids, as well as the relationship between host and parasitoid size.

Keywords: Parasitoid, *Atta laevigata*, forager, excavator, soldier.

## Introduction

Leaf-cutting ants of the genera *Atta* Fabricius, 1804 and *Acromyrmex* Mayr, 1865 are the dominant herbivores in many Neotropical habitats, forming a monophyletic group [1-3]. They specialize in cutting and collecting fresh plant material that is used to cultivate a symbiotic fungus inside their nests. The symbiotic fungus provides the sole nutrient source for ant larvae and queens [4-5], as well as supplementing the diet of worker ants [6]. The habit of building large underground nests results in the excavation of large volumes of soil and the movement of large quantities of plant material from the surface to the underground fungus garden chambers. These ants play several important roles in natural ecosystems, such nutrient recycling, seed dispersal, as well as improving the physical and chemical properties of the soil [7-9].

*Atta laevigata* (Smith, 1858) and *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) have a wide ranging distribution in Brazil and are the main pests of a large number of economically important plant species. They cause damage in agricultural, forestry and urban areas, resulting in significant losses due to their leaf-cutting activities [3,10]. The most commonly used method to control these two species is the application of insecticidal granulated baits. These insecticides are, in general, highly polluting for the soil and unspecific, that is, they have the potential to kill several non-target species [11-13]. In the search for alternative methods of control, it is of great interest to investigate the potential of natural enemies to regulate leaf-cutting ant populations [3,14]. In that respect, small parasitic flies of the family Phoridae may have potential for use in biological control programs against leaf-cutting ants.

The Phoridae consists of thousands of different species, with a wide range of larval habits. The larval stages of some species are saprophytic or herbivorous, but the majority are predatory or specialized parasitoids [15]. In many cases, phorids parasitize social insects, especially ants [15-16]. The interaction between *Pseudacteon* spp. Coquillett, 1907 and fire ants of the genus *Solenopsis* Westwood, 1840 has been extensively studied in recent decades [17-20], and currently these flies are produced in the laboratory and released in the field for the classical biological control of *Solenopsis invicta* Buren, 1972 [21]. In recent decades, studies of the biological and behavioral characteristics of parasitic phorids of the genera *Eibesfeldtphora* Disney, 1996, *Myrmosicarius* Borgmeier, 1928 and *Apocephalus* Coquillett, 1901 which attack leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex*, have intensified [22-26]. The presence of phorid flies on the trails have also been observed to decrease the foraging rates of two species of leaf-cutting ants, *A. sexdens* and *Atta vollenweideri* Forel, 1893 [27-29].

Studies have shown that female phorids parasitize foraging *Atta* spp. workers [23,27,30-31]. The phorids attack these ants on the trails, whilst they are cutting plant material or transporting the leaves back to the nest. Foragers are responsible for locating, cutting and transporting plant material to the interior of the nests [1,32]. The phorids land on a preferred host ant and lay their eggs in specific regions of the head or abdomen [33-35]. During the attacks, which usually only last for about one or two seconds, the females of most phorid species lay a single egg inside the host's body (endoparasitoidism), with a single larva developing inside the host, normally resulting in host death [36-39]. Studies have shown that phorid parasitism of foraging *Atta* spp. workers on trails ranged from less than 1% to over 30% [23,33,35,40-41], with parasitism of *A. laevigata* ranged from 2.8% to 5.3% [33,35,42].

In addition to trails and foraging areas, phorid attacks can occur close to the nest openings through which foragers enter the nest carrying fresh plant material [28]. These openings can be distributed at different distances around the nest. *Atta laevigata* foraging trails are, in general, physically well defined, leading from the principal nest supply orifices to the areas where the ants are cutting leaves [43-44].

Typically, the externally visible part of an *A. laevigata* nest consists of a large mound of loose soil with several entrance holes leading to subterranean underground chambers connected by tunnels. The symbiotic fungus is cultivated in some of these underground chambers, whilst other chambers are used to deposit unwanted residues. The characteristic mound of loose soil around *Atta* spp. nests is formed by the soil excavated following the construction of tunnels and chambers, which is transported to the surface [44]. The soil is excavated by the so called "excavator" worker caste, which Wilson [1] defined as "forager-excavators" in *A. sexdens* colonies. The excavated material consists of agglomerates of a mixture of soil, humus and litter, which is carried between the jaws of the ants in the form of pellets and deposited externally near the exit holes, forming a pile of loose material. Each *A. laevigata* nest orifice used by the excavators is normally located in the center of a crater or at the bottom of a small flattened funnel or so called "volcano" [32,43]. Although a study of *A. vollenweideri* divided tunnel workers into two types: "excavators" which are directly involved in excavation activities and "loaders" that transport the pellets to the surface [45], in the current study, the *A. laevigata* workers that carried the material to the surface and were observed on the soil mounds were denominated as "excavators".

Wilson [1] defined four castes of *A. sexdens* workers according to their role in the colony: gardener-nurses, within-nest generalists, forager-excavators, and defenders. Although in *A. sexdens*, foraging workers and the excavator-workers were both included in a single size group by Wilson [1], with a mean cephalic capsule width of 2.2 mm, in the present study preliminary observations indicated that in *A. laevigata*, the foragers have larger head capsule

widths than excavators. Therefore, different castes could be based not only on the different tasks performed in the colony but also on worker mean size.

On occasions, the orifices which lead from the nest chambers to the soil mound can be used by ants to carry plant material into the nests and foraging *A. laevigata* workers that transit through these opening and at this time can also be attacked by phorids [22,34,42]. However, there are no reports in the literature of phorids attacking the excavator caste of any *Atta* species. Likewise, phorid parasitism of the worker caste denominated as “soldiers” has not been documented [23-24]. *Atta* soldiers commonly transit through the opening on the loose soil mound, through the main nest supply openings and along trails, protecting the ants from enemies. The soldiers are the largest workers in *Atta* spp. colonies [46]. Furthermore, as *Atta* workers are highly polymorphic [47], certain species of phorids have evolved host size preferences and it is possible to observe distinct host species-parasitoid species interactions [26,28,34,41,48-49]. Therefore, worker castes of different sizes, for example, foragers, excavators and soldiers, could be parasitized by different sets of phorid species with different parasitism rates.

Larger (non-parasitized) *Atta* workers typically survive for longer in the laboratory than smaller workers (MALB, personal observation). However, due to the detrimental effects on host physiology, parasitized individuals of all size groups survive for less time than their non-parasitized counterparts and the survival time of parasitized worker ants can depend on the species of phorid with which they have been parasitized [22,35]. Therefore, it is logical to assume that the life span of an individual host ant will determine whether or not the parasitoid will have sufficient time to develop inside that host.

In the present study we investigated whether *A. laevigata* excavator and soldier ants were parasitized by phorid flies and if there was a distinct set of species attacking these castes when compared to foragers. We also investigated the survival of different worker castes when parasitized by different phorid flies. Further studies were also carried out to investigate the interactions in relation to host size and parasitoid size. This information may be useful for the planning of biological control strategies and aid the further understanding of the biodiversity and biology of phorids associated with leaf-cutting ants.

## Materials and Methods

### Study area

This study was carried out in the municipality of Palmas (10°14'56"S; 48°19'29"W), in the state of Tocantins, Brazil, between 2018 and 2019. Palmas is located in a tropical climate region, with a well-defined dry season in the winter. The rainy season extends from October to April, while the dry season occurs from May to September. The temperature of the region has an isothermal characteristic, with differences in the average temperatures between the warmest month and the coldest month being less than 5°C [50]. The predominant vegetation cover in Palmas is "Cerrado *stricto sensu*", being a region characteristic of open savannas with patches of gallery forests.

Eighteen *A. laevigata* nests located in public and private sites in an urban region of Palmas were studied. Seven nests were located at the Palacinho sample site (PAL), six at the EMBRAPA site (EMB) and five at the University of Tocantins (UFT) site. The distance between PAL and EMB sites was approximately 4 km, whilst the distance between the UFT and EMB sites and between the UFT and PAL sites was approximately 6 km. The EMB site was located in an area composed of a vegetation structure characteristic of Cerrado *stricto sensu*, with small trees, with twisted stems. The grass stratum is discontinuous and small (30 cm), with several regenerating species, herbs and small shrubs that intertwine with the trees and shrubs of the woody stratum. The PAL site was located in an area occupied mainly by tree species exotic to the Cerrado, which are widely used in the urban forestation in Palmas. However, species native to the region's Cerrado, including some fruit trees, were also present. The UFT site had a predominance of species that are exotic to the Cerrado, originating from other regions in Brazil or other countries.

The vegetation of this biome undergoes direct changes as a result of the climatic variations that occur during the different months of the year, presenting desert characteristics during the dry period and rapid vegetative growth during the rainy period [51].

### Collection of *A. laevigata* workers

Six collections of *A. laevigata* workers were carried out from the seven nests located at the PAL site at intervals of approximately 15 days between February and May 2018. Between June and September 2018, five collections were carried out every 15 days from the six nests selected at the EMB site. Then, between October 2018 and January 2019, four more

collections, at 25-day intervals, were carried out from the five nests selected at the UFT site. The collections were nocturnal and started between 18:00h and 19:00h, with the ant collection sessions from each colony lasting approximately 20-25 min. During this period, foraging worker ants found on one or two trails of 2 to 5 m in length originating from each nest (Fig. 1 A-B) were randomly captured with the aid of flexible metal tweezers and placed in a plastic pot (9 x 14 cm). Likewise, soldiers on the trails were captured and placed in a separate pot. During the same 20-25 min period, excavator workers and soldier ants passing through the openings in two craters on the loose soil mounds (Fig. 1 C-D) were captured and placed separately in two other pots. Not all of the colonies were sampled during the collections at the same site, as sometimes there was no flow of ants on the trails or over the soil mounds. Inert non-toxic talc was placed around the edges of each pot to prevent ants from escaping during collection. Lids were then placed on the pots, which were taken to the Entomology Laboratory, Biological Collections Building at the Federal University of Tocantins, Palmas University Campus, Tocantins, Brazil. The field work had permission by Ministry of the Environment – IBAMA (Licence number: 12433-3).

### **Ant maintenance and obtaining parasitoids**

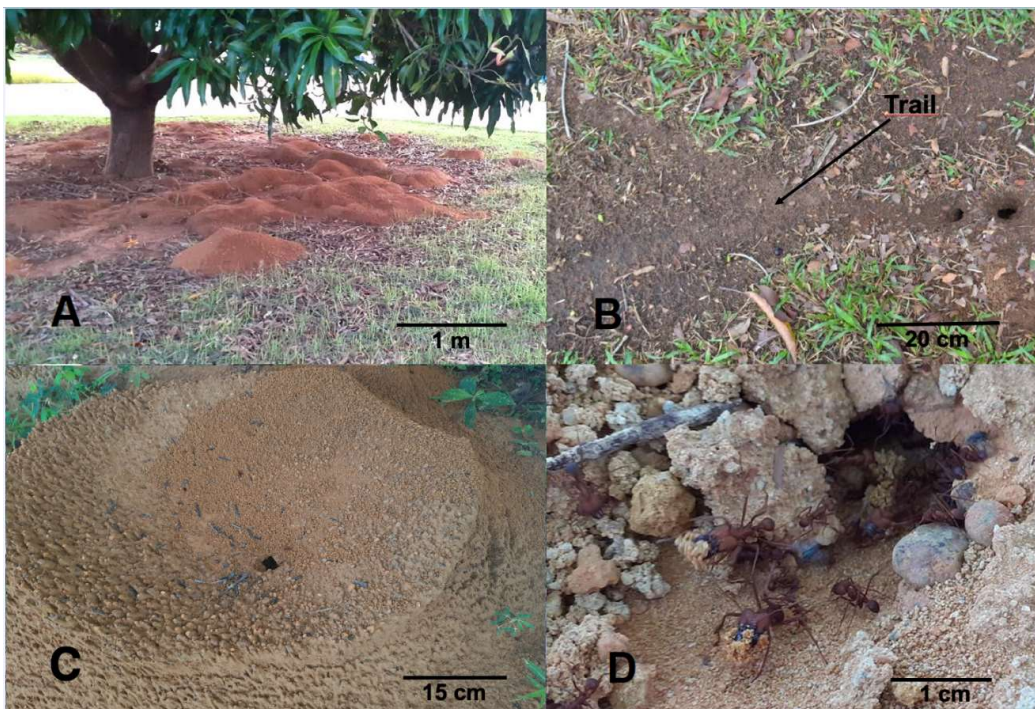
Ants were placed in four plastic trays (55 x 34 x 9.5 cm) in which talc had been applied to the inner edges of the trays to prevent escape and covered with perforated lids to allow air circulation. The trays were placed in an incubator ( $26 \pm 1^\circ \text{C}$ ,  $85 \pm 5\% \text{RH}$ ) and the ants were offered a 50% honey solution soaked in cotton swabs, which were changed every two days [22,35]. During the next 15 days, each tray was inspected daily and dead workers were removed. Dead ants were transferred to individual glass tubes (12 x 75 mm) plugged with cottonwool and maintained in an incubator as stated above. A 15 day period was chosen as this was the maximum time for phorids to kill their hosts [28,33,37]. On the 15th day, any individuals (non-parasitized) that were still alive were placed in 70% alcohol. The number of surviving ants (non-parasitized) and those which had died up to day fifteen (parasitized and non-parasitized individuals) was used to determine the total number of workers collected from the mounds and trails for each collection.

The number of workers from trails per collection at the PAL site ranged from 102 to 739, while between 81 to 531 ants were collected from the mounds at the same site. The number of workers per collection on the trails at the EMB site ranged from 37 to 718, whilst 37 to 290 ants were collected from mounds. At the UFT site, these numbers ranged from 335 to 739 on the trails and from 216 to 820 on the mounds. The fluctuation in the numbers of workers

captured on trails and mounds during the 15 collections was due to the natural variation in the activity of workers when comparing colonies and collection days.

Dead individuals were maintained in an incubator for 24 h in order to differentiate between parasitized and non-parasitized ants. It was possible to observe phorid larvae or pupae developing inside the hosts bodies [28,35,52]. Parasitized ants were kept in the tubes in the incubator until the flies emerged from the hosts. After emergence, the flies were maintained in the chamber for another 24 hours to allow for sclerotization of the recently formed phorid integument.

The flies were then individualized in Eppendorf tubes containing 70% alcohol and labeled with the host collection site (soil mound or trail) and worker caste host (excavator, forager or soldier). The parasitized worker ants from which flies had emerged and those from which no parasitoids had successfully emerged, were stored individually in paper envelopes. A similar same procedure was also performed for workers that died without any signs of parasitism, except that they were stored in envelopes in cohorts relative to the day of death. The taxonomic identification of the phorids was performed according to the keys published [53-57]. The flies and their host ants were deposited in the insect collection of the UFT Entomology Laboratory.



**Fig 1.** **A:** *Atta laevigata* nest; **B:** supply orifice with foraging trail; **C:** a crater with an orifice in the center; **D:** details of excavator workers carrying pellets (mixture of soil, humus and litter) with their mandibles. Photos: M.L.O. Souza.

## Measurements of ants and phorids

The size of ants collected from random samples of parasitized and non-parasitized workers (excavators, foragers, soldiers on mounds or on trails) was measured. The head capsule width (mm) at the widest point was determined [1]. Adult phorid size was estimated by measuring the length (mm) of one of the wings from each individual [58]. All measurements were performed using a stereomicroscope with a calibrated (millimeter) graticulated eyepiece.

## Ant survival time

The average survival time of parasitized worker ants (foragers, excavators and soldiers) was calculated from the day of collection until the day of death. Based on literature no parasitized ants could survive for more than 15 days after collection. End point mean survival times of non-parasitized workers was calculated over the first 15 days following collection as the aim of this experiment was not to evaluate total survival times of these ants in the laboratory. For parasitized insects, the phorid species which emerged from each host was recorded to correlate this data with ant survival time.

## Data analysis

The parasitism frequency of worker of ants collected on trails or from soil mounds were calculated as a percentage of the total number ants collected in relation to the number which were subsequently observed to have been parasitized. The proportional parasitism rate (%) was calculated considering the percentage with which each species of parasitoid contributed to the parasitism of *A. laevigata* workers on the trails and mounds. This rate was also calculated when considering the species of parasitoid that emerged from workers of different castes.

Despite transforming the original data using  $\arcsin\sqrt{(\%/100)}$  the mean parasitism rates of foragers did not follow a normal distribution and, therefore, the Kruskal-Wallis (H) test was applied, followed by Dunn's multiple comparison test to assess the statistical differences in the parasitism rates between different phorid species. Although there was a large variation in the number of workers collected from trails and mounds when considering collection days and different sites, statistical analysis comparing parasitism rates between worker castes and



between parasitoid species was possible because percentage parasitism was used and not numerical values.

The average survival times of non-parasitized foragers, excavators and soldiers (from mounds and trails) and the effect of parasitism on survival time of workers when parasitized by different phorid species was analysed using the Kruskal-Wallis (H) test, followed by the Dunn's multiple comparison test. The H test was used to compare survival times because this data did not fit a normal distribution despite transformation of the data.

ANOVA and the Tukey test for the separation of means were performed to compare the head capsule width (mm) of the following groups of workers: (i) excavators, foragers, soldiers on trails and soldiers on mounds without parasitism; (ii) comparing the set of excavators and foragers with and without parasitism; (iii) parasitized foragers and excavators; (iv) to compare ants parasitized by different species of phorid flies. ANOVA and Tukey's test were also applied to compare phorid adult wing length (mm). Assuming homogeneity of variances and to adjust the data to a normal distribution for the validation of ANOVA, the original data for the measurements of the ant head capsule width and phorid fly wing length were transformed using box-cox. This procedure can be used to estimate the best transformation to achieve normality (59).

The means are shown with their respective standard deviations or confidence intervals. All analyzes were conducted using the R package [60], with the null hypotheses tested at the 5% probability level.

## Results

A total of 35,903 *A. laevigata* worker ants were collected during the study period from the three sample sites (PAL, EMB and UFT). Worker ants from all three sites were found to have been parasitized by four species of Phoridae. One thousand one hundred and forty-one ants (3.17 % of the total number collected) were observed to have been parasitized. Of those, 1.43 % were parasitized by *Apocephalus attophilus* Borgmeier, 1928 (n = 514), 0.74 % by *Myrmosicarius grandicornis* Borgmeier, 1928 (n = 266), 0.55 % by *Eibesfeldtphora erthali* Brown, 2001 (n = 197) and 0.45 % parasitized by *Apocephalus vicosae* Disney, 2000 (n = 162) (Table 1). Only one phorid fly emerged from each of the worker ants parasitized by *M. grandicornis*, *A. vicosae* and *E. erthali*. However, for ants parasitized by *A. attophilus*, one to fourteen flies emerged from individual hosts, with the mean number of parasitoids per host being 3.1 ( $\pm$  2.74 SD).

**Table 1 Total and proportional parasitism rates of four species of phorid flies attacking *Atta laevigata* workers (foragers, excavators and soldiers) collected on trails or from soil mounds**

LOCAL Worker caste	Number of workers collected	Number of parasitized workers	Parasitism rate (%)	Number of parasitized workers (n) and proportional rate of parasitism (%)							
				<i>Apocephalus attophilus</i>		<i>Myrmosicarius grandicornis</i>		<i>Eibesfeldtphora erthali</i>		<i>Apocephalus vicosae</i>	
				n	%	n	%	n	%	n	%
<b>TRAIL: TOTAL</b>	21,254	1,112	5.23	514	<b>46.22</b>	251	<b>22.58</b>	185	<b>16.63</b>	162	<b>14.57</b>
Foragers	15,757	1,102	7.00	514	<i>100</i>	251	<i>100</i>	175	<i>94.60</i>	162	<i>100</i>
Soldiers	5,497	10	0,18	0	<i>0</i>	0	<i>0</i>	10	<i>5.40</i>	0	<i>0</i>
<b>MOUND: TOTAL</b>	14,649	27	0.18	0	<i>0</i>	15	<b>55.55</b>	12	<b>44.45</b>	0	<i>0</i>
Excavators	10,631	25	0.23	0	<i>0</i>	15	<i>100</i>	10	<i>83.33</i>	0	<i>0</i>
Soldiers	4,018	2	0.05	0	<i>0</i>	0	<i>0</i>	2	<i>16.67</i>	0	<i>0</i>

A total of eighteen colonies were sampled. The proportional rates of parasitism were calculated as a ratio of the number of parasitized ants (n) when comparing different species of phorids (% bold type) on trails and mounds, or for each phorid species when comparing different worker castes on trails or on mounds (% italics).

The total number of workers which had been parasitized on the trails (foragers + soldiers) was 1,112, with only 27 excavators and soldiers collected from the mounds found to have been parasitized. The separation of the results into workers on trails versus workers on mounds showed that the parasitism rate, when only considering the total number of ants on the trails, increased to 5.23%, which was much higher than seen for the ants collected only from the mounds (0.18%) (Table 1). Ten of the soldiers captured on the trails and two on the mounds had been parasitized by *E. erthali*, which was the only parasitoid associated with this caste. Foraging workers were parasitized by all four species of phorids identified in this study, with the highest proportional rate of parasitism seen for *A. attophilus* (46.22%), followed by *M. grandicornis* (22.58%). For *E. erthali* and *A. vicosae*, lower rates of 16.63% and 14.57% were observed, respectively (Table 1). When considering parasitism of the excavator caste, only fifteen individuals had been parasitized by *M. grandicornis* and ten by *E. erthali*. There was a significant difference in the average rates of parasitism of foragers by the four species of parasitoids ( $H = 44.29$ ;  $n = 272$ ;  $p < 0.001$ ). These rates were similar and not significantly different using Dunn's multiple separation test ( $p > 0.05$ ) when comparing *A. attophilus* and *E. erthali*, but the rates for both of these species were significantly higher ( $p < 0.001$ ) than those for *A. vicosae* and *M. grandicornis*. There was no significant difference between the parasitism rates of the later two species of phorids.

Parasitized ants survived for a maximum of 10 days (Table 2). Non-parasitized worker ant survival was only evaluated over a 15 day period in the laboratory after collection

in the field. There was no significant difference in the mean survival of non-parasitized excavators and foragers (5 days), however, on average these ants survived three days less than soldiers collected on mounds or on the trails, which had an average life-span of 8 days following collection (Table 2). There was no significant difference in the survival times of non-parasitized soldiers collected on trails or mounds. When considering the survival of parasitized workers (of all castes and from all locations), those that had been parasitized by *A. attophilus* survived for significantly less time (2.8 days) than the workers parasitized by the other three phorids, while the workers parasitized by *M. grandicornis* survived the longest after collection (6 days) (Table 2).

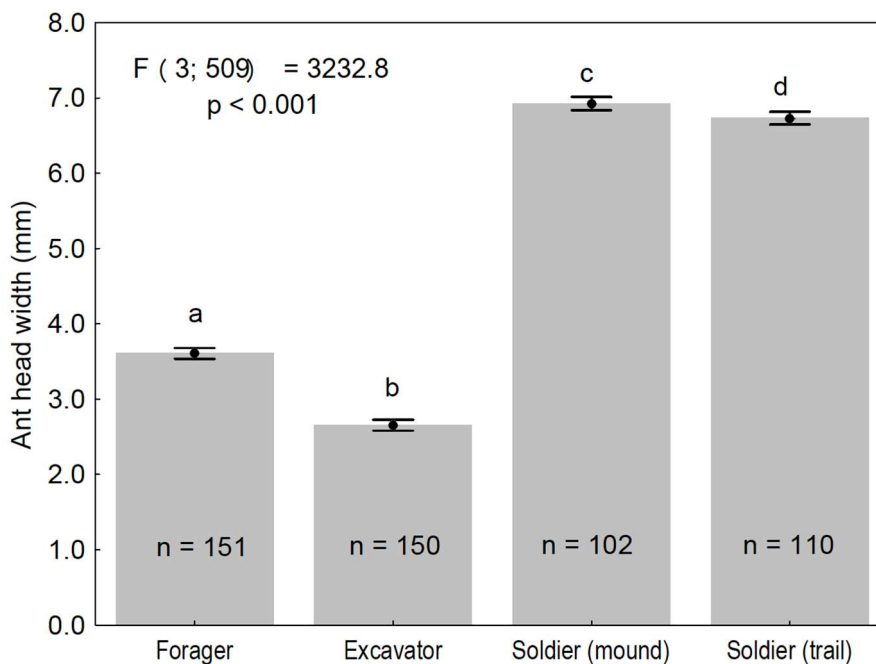
**Table 2 Mean survival times of parasitized and non-parasitized *A. laevigata* workers, survival times of different non-parasitized castes and worker survival time in relation to phorid species**

Workers	Survival (days)				
	Mean $\pm$ SD	Number of workers	Range (minimum to maximum)	Kruskal-Wallis test (H)	p-value
Parasitized	4.0 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	1137	1 to 10	497.50	< 0.001
Non-parasitized	6.7 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>	1783	1 to 14		
<b>Non parasitized:</b>					
Excavators	5.6 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	487	1 to 14	287.69	< 0.001
Foragers	5.4 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	454	1 to 14		
Soldiers (mound)	8.1 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	389	1 to 14		
Soldiers (trail)	8.2 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	453	1 to 14		
<b>All castes parasitized by:</b>					
<i>Apocephalus attophilus</i>	2.8 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	512	1 to 7	411.35	< 0.001
<i>Apocephalus vicosae</i>	4.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	162	1 to 9		
<i>Eibesfeldtphora erthali</i>	4.1 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>	197	1 to 9		
<i>Myrmosicarius grandicornis</i>	6.1 $\pm$ 1.9 <sup>d</sup>	266	2 to 10		

Note: Different letters indicate significant differences using Dunn's multiple comparison test at the 5% level.

The data showed that the largest workers collected from *A. laevigata* colonies were of the soldier caste. Soldiers on mounds were significantly larger than on trails (Fig. 2). On average, soldiers were more than twice the size of the foragers and excavators (Fig. 2). Foragers collected from trails were significantly larger than the excavators (Fig. 2). The average size of non-parasitized foragers and excavators when considered together ( $3.13 \pm$

0.69 mm;  $n = 301$ ) was greater ( $F_{1; 952} = 17.48$ ;  $p < 0.001$ ) than parasitized workers ( $2.92 \pm 0.73$  mm;  $n = 653$ ). When considering parasitized ants, the size of foragers ( $2.94 \pm 0.73$  mm;  $n = 628$ ) was significantly larger ( $F_{1; 651} = 11.35$ ;  $p = 0.001$ ) than excavators ( $2.44 \pm 0.76$  mm;  $n = 25$ ).

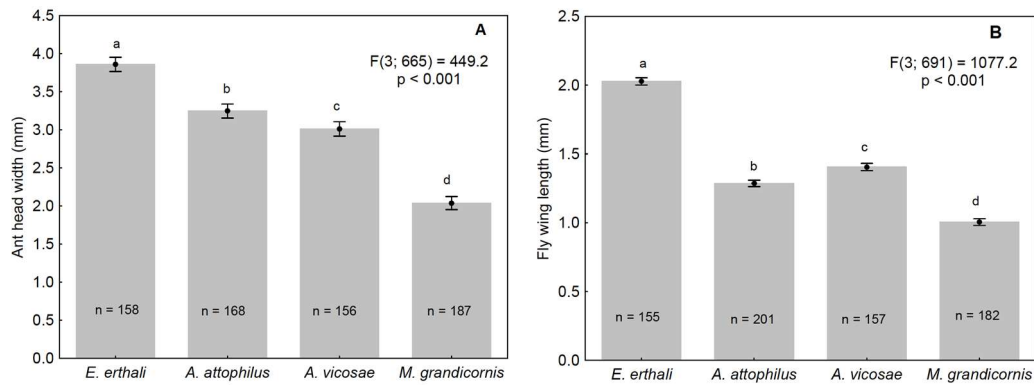


**Fig. 2 Comparison of head capsule width of non-parasitized *Atta laevigata* workers collected from mounds (excavators and soldiers) or from trails (foragers and soldiers).**

Note: Vertical bars indicate 95% confidence intervals, and different letters indicate significant differences between mean head capsule widths (one-way ANOVA and Tukey's test at 5% level). The original data was transformed using box-cox ( $\lambda = 1.35$ ).

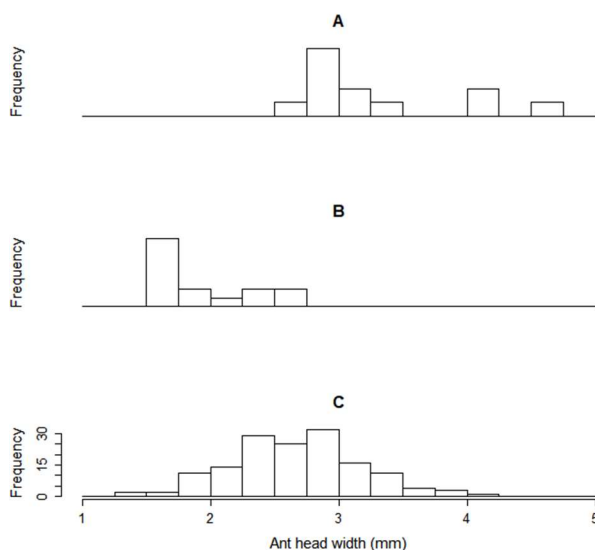
When considering parasitized *A. laevigata* worker ants in general, those with the largest average head capsule widths were observed to have been preferentially parasitized by *E. erthali*. Slightly smaller workers were parasitized by *A. attophilus* and the smallest ants were parasitized by *M. grandicornis* (Fig. 3A). The phorids that emerged from the largest and smallest hosts, that is, *E. erthali* and *M. grandicornis* respectively, were also the largest and smallest flies when considering average wing length as a parameter (Fig. 3B). However, there was an inversion in the order of parasitoid size (wing length) when considering *A. vicosae* and *A. attophilus* in relation to the size of their hosts (Figs. 3A and 3B). Although *A. attophilus* flies are smaller than those of *A. vicosae*, they emerged from larger hosts than those of *A. vicosae*. The results in Figure 4 demonstrate the relationship between size of the excavators and the

frequency which the two parasitoid species which specifically attack excavators. *Eibesfeldtphora erthali* was observed to prefer larger excavators (Fig. 4A), whilst *M. grandicornis* parasitized smaller ants of this caste (Fig. 4B).



**Fig 3 (A) Relationship between *Atta laevigata* worker size and the phorid species parasitizing these ants; (B) Size (wing length) of the four species of phorids**

Note: Vertical bars indicate 95% confidence intervals and different letters indicate significant differences in ant cephalic capsule width and phorid wing length. A one-way ANOVA and the Tukey test at the 5% level were used for comparisons. Data was transformed using box-cox:  $\lambda = -0.30$  (A);  $\lambda = -0.55$  (B).



**Fig 4. *Atta laevigata* excavator workers size (head capsule width) in relation to frequency of two species of phorids parasitizing this caste**

**A:** *Eibesfeldtphora erthali* (n = 10); **B:** *Myrmosicarius grandicornis* (n = 15); **C:** Size range of excavators (n = 150) collected on the mounds of loose soil near the nests.

## DISCUSSION

Four species of parasitic phorids were observed parasitizing *A. laevigata* in this study, in which the rate of total parasitism of this host was similar to that of other studies of *Atta*. Foraging workers and soldiers on trails had parasitism rates that were much higher than excavator workers and soldiers from mounds. Foragers were seen to be hosts to all four species of parasitoid, while excavators were parasitized by two species (*E. erthali* and *M. grandicornis*) and the soldiers were only parasitized by *E. erthali*. The hypothesis that parasitism of excavators was low or absent when compared to foragers workers because the excavator's life span is too short for the development of the parasitoids within this host was rejected. However, the low rates of parasitism of excavators and soldiers by *E. erthali* and *M. grandicornis*, and the fact that these castes were not parasitized by *A. attophilus* and *A. vicosae* were justified based on the results for the relationship between parasitoid and host size and on other studies which observed the attack behavior of phorid flies in relation to the different tasks performed by the ants.

Among the three genera of Phoridae studied here, *Eibesfeldtphora* is considered to be a specialist parasitoid of the genus *Atta*, with fewer species found parasitizing *Acromyrmex* [22,24,61]. On the other hand, species of *Myrmosicarius* can also parasitize other ant genera, such as *Solenopsis* and *Labidus* Jurine, 1807 [55]. *Apocephalus* is the most diverse of the three genera, mainly parasitizing *Acromyrmex* spp., but also *Atta*, *Pheidole* Westwood, 1839, *Camponotus* Mayr, 1861, *Pachycondyla* Smith, F., 1858, *Ectatomma* Smith, F., 1858, *Paraponera* Smith, F., 1858 among others [62-64].

The four species of phorids that parasitized *A. laevigata* described in the current study were also found in another region of the Cerrado biome parasitizing *A. laevigata* and *A. sexdens* [22]. In the Atlantic Forest biome in Brazil, *A. laevigata* and *A. sexdens* are also hosts to all four parasitoids described in the present study [28,33,61,65], whilst *Atta bisphaerica* Forel, 1908 is parasitized by *M. grandicornis* and *A. attophilus* [55,66-67]. The total parasitism rate of *A. laevigata* by phorids seen here (3.17%) was higher than that recorded for the same host (2.8%) by Bragança & Medeiros [35], but lower than the rates (4.0%) recorded in the studies by Erthal & Tonhasca [33] or by Bragança et al. [22] (5.36%). The current results for *A. laevigata* parasitism rates by phorids are within the range commonly found for *Atta* spp., of which the lowest documented was <1% and the highest approximately 6%. In *A. sexdens*, for example, four different studies reported rates of 0.8% [42], 1.57% [22], 2.94% [49] and 2.6% [68]. The parasitism rates by phorids recorded in two studies of *A. bisphaerica* were 1% and 4.4%, respectively [66,69].

In the aforementioned studies, the evaluation of *Atta* spp. parasitism rates by phorids was carried out by sampling only foraging workers transiting along the trails or foragers that were collected from the nest supply orifices. No previous studies have evaluated the parasitism of *Atta* spp. excavators observed on the mounds of loose soil around the specialized nest orifices through which these excavator ants carry material to the surface. In the current study 18 colonies were sampled in order to collect not only the foragers on the trails but also the excavators (from mounds) and soldier ants (from mounds and trails). Interestingly, the parasitism rate of the excavators was 30 times lower than that seen for the foragers. Phorid parasitism of *A. laevigata* soldiers was also documented here for the first time, although similarly to the excavators, the parasitism rates were very low when compared to foragers. In fact, the number of soldiers that were parasitized was half that of the excavators. Furthermore, the number of soldier ants collected from mounds which had been parasitized was even lower than the number of parasitized soldier ants collected on trails. The information available from previous studies on *A. vollenweideri* [23-24], *A. laevigata* and *A. sexdens* (MALB, personal observation) indicated that phorid flies do not parasitize the soldier caste.

The distribution of phorid parasitism, when considering the four parasitoid species studied here, showed that attacks by *A. attophilus* were the most frequent (46%). This result was similar to that seen in previous studies of *A. laevigata* and also for other species of leaf-cutting ants such as *A. sexdens* and *A. bisphaerica* [22,66,68-69]. In fact, the ability of *A. attophilus* to cause high levels of mortality differentiated it from other species of parasitoids. Biological characteristics such as a highly successful emergence rate (93%) from hosts and the production, on average, of 2.5 individuals per host ant has been observed when *A. attophilus* attacked *A. bisphaerica* (66). *Eibesfeldtphora bragancai* (Brown, 2001) and *M. grandicornis* parasitizing *A. bisphaerica* showed emergence rates of 41 and 57%, respectively, with production of a single parasitoid per host [66].

In the current study, an average of three *A. attophilus* (ranging from one to fourteen parasitoids) emerged from each host forager ant, whilst the other three species of phorids had a solitary habit, laying only one egg in each host insect. These characteristics highlight the potential of *A. attophilus* as a biological control agent against leaf-cutting ants [66,68]. Also in the current study, foragers that had been parasitized by *A. attophilus* had the shortest survival time (2.8 days) following collection in the field. This was probably due to the rapid development of this parasitoid within the host forager. On the other hand, *A. attophilus* did not parasitize excavators. Here we observed that only *M. grandicornis* and *E. erthali* parasitized the excavator caste.

The reduced lifespan of parasitized ants was not unexpected as the development of parasitoid larvae would have a detrimental effect on the hosts. A similar result has been

observed for phorids attacking *A. laevigata* [35]. However, the similar survival times of non-parasitized ants from the trails (foragers and soldiers) and earth mounds (excavators and soldiers) is not related to the high parasitism rates of foragers and trail soldiers compared to excavators and soldiers from mounds.

In the leaf-cutting ants it has been observed that the younger workers tend to perform tasks in the fungus gardens, while the older workers perform tasks outside the nest, precisely those that represent higher risks of mortality [70-71]. It is thought that excavators maybe older than foragers and, therefore, their remaining life span, from time of parasitoid oviposition, could be less than the time necessary for the parasitoid to complete its development in the host's body. Thus, even if the attack and oviposition behaviors against excavators were the same as those performed against foragers, excavator parasitism rates would therefore be lower or the parasitism would not be successful as the hosts would die before the parasitoids completed larval and pupal development.

In addition, even considering that the workers' life span was recorded for only 14 days, as on the 15<sup>th</sup> day those that remained alive were sacrificed, the average survival of the non-parasitized excavator workers (mean 5.6 days; range: 1-14) and the mound soldiers (mean 8.1 days; range: 1-14) when compared to the survival of ants parasitized by *A. attophilus* (mean 2.8 days; range: 1-7) and *A. vicosae* (mean 4.2 days; range: 1-9), indicate that the life span of ants from mounds was not an impediment to *Apocephalus* spp. parasitism. Therefore, the almost exclusive parasitism of foragers (6.98%) in relation to excavators (0.25%) and also the much higher parasitism (five times) of soldiers collected on the trails compared to parasitism of mound soldiers was unlikely to have been related to host age.

Only two phorid species (*M. grandicornis* and *E. erthali*) parasitized excavators, whilst all four species studied here attacked the foragers. Furthermore, only *E. erthali* was found parasitizing soldier ants. The host preferences of the phorids and the differences in parasitism rates could be due to the relationship between host size and parasitoid size. In fact, there would appear to be a correlation between host size and phorid size, with the larger species of phorids parasitizing larger worker ants. As leaf-cutting ants display morphological polyethism, a division of labor in the colony, when specific tasks are performed by specific sizes of ants [47], phorids preferences could also be correlated to castes. However, as foragers are only slightly larger than excavators, this does not explain why *A. attophilus* or *A. vicosae* do not parasitize excavators. Therefore, other factors such as oviposition behavior of the different species could explain why these phorids do not parasitize excavators.

*A. attophilus* exhibits pre-oviposition behavior that involves walking amongst *A. laevigata* workers in the foraging area using a highly cautious approach, which apparently helps the phorids avoid detection by the host. When the phorid is very close to the host, it



inserts the ovipositor into the ant's mouthparts, apparently in the basal region of the mandibles, whilst the ant is in the process of cutting the plant material [33]. *Apocephalus vicosae* attacks against *A. laevigata* and *A. sexdens* occur during the transport of leaf fragments by workers along the foraging trails [22,65]. Female *A. vicosae* walk amongst the foraging workers transporting plant fragments and then the phorids jump onto the leaf fragment whilst it is being transported. The fly then walks around the fragment for a few seconds before inserting its ovipositor into the host's oral cavity [22]. As the excavator caste ants do not cut or carry leaves and probably do not leave the soil mounds, it is unlikely that *A. attophilus* and *A. vicosae* would be attracted to parasitize them.

Based on knowledge of the attack and oviposition behaviors of *M. grandicornis* and *Eibesfeldtphora* spp. against foraging *Atta* spp. workers, and the data available showing the relationship between the size of these parasitoids and their hosts [28,34,52], the parasitism of *M. grandicornis* and *E. erthali* in *A. laevigata* excavators is justifiable. To attack *Atta* spp. foragers, female *Eibesfeldtphora* spp. and *M. grandicornis* usually perch on small sticks or leaves in the vicinity of the foraging trails or near the colony supply holes for a few seconds to a few minutes. They then initiate flight behaviors when they identify suitable individuals to be attacked. It is assumed that at least two of the criteria for the phorids to select the worker to be attacked are the size and mobility of the host.

Low rates of excavator parasitism may be the result of certain difficulties which phorids could face when they attack ants on soil mounds. Firstly, there is a lack of adequate landing sites (such as leaves or plant shoots) for the flies around the craters which form the soil mounds of the *A. laevigata* nests [32,44; MALB personal observation; Fig. 1C], necessary for the phorids to observe their hosts prior to attack. Secondly, the soil mounds are agglomerates of loose particles that could make locomotion difficult for the excavators. As mentioned above, the phorid attack sequence is initiated following observation of the host in motion. Furthermore, the excavators spend only part of their time on the surface, and the other part underground, reducing the chances of them being parasitized. Finally, the fact that only two species of phorids (*E. erthali* and *M. grandicornis*) parasitize excavators, this could be related to the host-parasitoid size relationship as stated previously. In this case, larger (*E. erthali*) and smaller (*M. grandicornis*) phorids having a preference for larger and smaller leaf-cutting ant excavator workers, respectively.

Interestingly, the size of foraging workers parasitism was greater than the size of non-parasitized excavator workers (Figure 2). This result shows that *A. laevigata* foragers transiting on the trails during the period of this study were larger than the excavator ants on the earth mounds. This is probably the reason why among the parasitized workers, the average size of the excavators was smaller than the average size of the foragers. This means that *E.*

*erthali* and *M. grandicornis* had smaller hosts available during attacks on excavators than when carrying out attacks on foragers. Even so, the parasitism of the excavators by the two parasitoids (*E. erthali* and *M. grandicornis*) was viable because the limits of the size distribution of these ants on the mounds comprised individuals with adequate sizes to be parasitized by the two flies (Figure 4).

*Eibesfeldtphora erthali* adults that emerged from the host ants were twice the average size of *M. grandicornis*. Similarly, the average size of *A. laevigata* workers attacked by *E. erthali* was almost twice that of workers parasitized by *M. grandicornis*. The size of the other species of *Apocephalus* parasitoids in comparison to the size of their hosts were intermediate between *E. erthali* and *M. grandicornis*. However, although *A. attophilus* individuals are smaller than those of *A. vicosae*, *A. attophilus* hosts were larger on average than *A. vicosae* hosts but smaller than those of *E. erthali*. Despite being smaller, *A. attophilus* had a preference for larger ants. This preference may have evolved to accommodate the development of more than one larva within the host. Furthermore, considering the relationship between host size and parasitoid size, only *E. erthali* was identified parasitizing soldiers, correlating the largest of the parasitoid species studied here with the largest ant caste. The lack of parasitism of soldier ants by *A. attophilus* and *A. vicosae* could be related to the behavior of soldier ants, that do not cut or transport leaves [72; MALB and DJS, personal observations], which as described above, could also reduce the attraction of the excavator caste for the these two phorids.

*M. grandicornis*, the smallest phorid species studied here, attacks smaller foragers when compared to those parasitized by *E. erthali*. Although soldiers are likely to have a more sclerotized integument than foragers, *E. erthali* females are still able to penetrate the integument of this caste, whereas it is unlikely that the structure of the *M. grandicornis* ovipositor is capable of performing this task. The dorsal and ventral lobes of the *E. erthali* ovipositor are characteristically wide, indicating a greater robustness of this structure [73] when compared to the tubular morphology of the *Myrmosicarius* spp. ovipositor [55]. Although *M. grandicornis* has a tubular ovipositor, this fly is half the size of *E. erthali* (Fig. 3B) and therefore could not oviposit in soldier ants, which are twice the size of excavators (Fig. 2), and soldier ant integument is more robust than that of the excavators. Another possible reason for the lack of *M. grandicornis* parasitism in soldier ants is the relationship between the size of this parasitoid and the size of the soldier's head capsule. According to Elizalde & Folgarait [23], the larval development site in a host ant needs to be large enough for the adequate formation of the phorid larvae, but if too large, then putrefaction could start before the larvae completes development, which would obviously be a disadvantage.

An important consequence of the coexistence of four species of phorids parasitizing workers of different sizes and different castes is that the parasitoids probably have a combined effect on disrupting normal colony activities and increased the mortality of *A. laevigata*. The specificity of these parasitoids for different castes or size classes increases the overall parasitism rates and shows that it is important to maintain the natural biodiversity, as each phorid species will have an influence on colony health.

Two recent studies indicated that *A. attophilus* is one of the most promising species for use in biological control programs for leaf-cutting ants [66,74]. However, it is also important to consider the array of phorid species which taken as a whole, exert a greater effect on leaf-cutting ant populations and disruption of normal foraging behavior. Therefore, it is of interest to consider using more than one species of phorid to control leaf-cutters.

## Acknowledgments

This work was developed as part of the requirements for M.L.O. Souza's doctorate degree. We would like to thank the BIONORTE Network's Doctorate Program in Biodiversity and Biotechnology at the Federal University of Tocantins (UFT) and the Federal Institute of Education, Science and Technology of Tocantins (IFTO), for the logistical support to carry out this work. We wish to thank Embrapa Pesca e Aquicultura-TO, for permission to carry out part of the study in an environmental reserve area at its headquarters. RIS is a CNPq research fellow.

## References

1. Wilson EO. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. Behav Ecol Sociobiol. 1980;7:143-156.
2. Schultz TR, Brady SG. Major evolutionary transitions in ant agriculture. Proc Natl Acad Sci. 2008;105:5435-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711024105>
3. Della Lucia TMC, Gandra LC, Guedes RNC. Managing leaf-cutting ant peculiarities, trends and challenges. Pest Manag Sci. 2014;70:14-23. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>

4. Littleddyke M, Cherrett M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). Bull Entomol Res. 1976;66:205-17. <https://doi.org/10.1017/S0007485300006647>
5. Quinlan RJ, Cherret JM. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). Ecol Entomol. 1979;4:151-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-23111979.tb00570.x>
6. Shik JZ, Rytter W, Arnan X, Michelsen A. Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using stable isotopes. Ecology. 2018;99:1999-2009.
7. Hudson TM, Turner BL, Herz H, Robinson JS. Temporal patterns of nutrient availability around nests of leaf-cutting ants (*Atta colombica*) in secondary moist tropical forest. Soil Biol Biochem. 2009;41:1088-1093. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.02.014>
8. Meyer ST, Leal IR, Tabarelli M, Wirth R. Ecosystem engineering by leaf-cutting ants: nests of *Atta cephalotes* drastically alter forest structure and microclimate. Ecol Entomol. 2011;36:14-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01241.x>
9. Farji-Brener AG, Werenkaut VA. Meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. Ecol Entomol. 2015;40:150-8. <https://doi.org/10.1111/een12169>
10. Oliveira MA, Araújo MS, Marinho CGS, Ribeiro MMR, Della Lucia TMC. Manejo de formigas-cortadeiras. In: Della Lucia TMC, editor. Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo. Viçosa: Editora UFV; 2011. pp. 400-19.
11. Pimentel D, McLaughlin L, Zepp A, Lakitan B, Kraus T, Kleinman P, et al. Environmental and economic effects of reducing pesticide use: a substantial reduction in pesticides might increase food costs only slightly. Bioscience. 1991;41:402-9. <https://doi.org/10.2307/1311747>
12. Zanetti R, Zanuncio JC, Souza-Silva A, Abreu LG de. Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Rev Árvore. 2003;27:407-10. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622003000300019>
13. Zanetti R, Dias N, Reis M, Souza-Silva A, Moura MA. Eficiência de iscas granuladas (sulfloramida 0,3%) no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). Ciência e Agrotecnologia. 2004;28:878-82. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000400021>
14. Travaglini RV, Vieira AS, Arnosti A, Silva-Camargo R da, Stefanelli LEP, Forti LC, et al. Leaf-cutter ants and microbial control. In: Schields VDC, editor. The complex world of ants. India: IntechOpen; 2018. pp. 71-84. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75134>
15. Disney RHL. Scuttle Flies: The Phoridae, Chapman and Hall, London.1994, p. 467.
16. Disney RHL. Some myths and the reality of scuttle fly biology. Antenna. 1990;14:64-67.

17. Feener DH, Brown BV. Reduced foraging of *Solenopsis geminate* (Hymenoptera: Formicidae) in the presence of parasitic *Pseudacteon* spp. (Diptera: Phoridae). *Ann Entomol Soc Am.* 1992;85:80-4.
18. Porter SD, Pesquero MA, Campiolo S, Fowler HG. Growth and development of *Pseudacteon* phorid fly maggots (Diptera: Phoridae) in the heads of *Solenopsis* fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae). *Environ Entomol.* 1995;24:475-9.
19. Folgarait PJ, Patrock RJW, Gilbert LE. Associations of fire ant phorids and microhabitats. *Environ Entomol.* 2007;36:731-42.
20. Chen L, Fadamiro HY. *Pseudacteon* phorid flies: host specificity and impacts on *Solenopsis* fire ants. *Annu Rev Entomol.* 2018;63:47-67.
21. Folgarait PJ, Plowes RM, Gomila C, Gilbert LE. A small parasitoid of fire ants, *Pseudacteon obtusitus* (Diptera: Phoridae): native range ecology and laboratory rearing. *Fla Entomol.* 2020;103:9-15.
22. Bragança MAL. Parasitoides de formigas-cortadeiras. In: Della Lucia TMC, editor. *Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV; 2011. pp. 321-43.
23. Elizalde L, Folgarait PJ. Biological attributes of Argentinian phorid parasitoids (Insecta: Diptera: Phoridae) of leaf-cutting ants, *Acromyrmex* and *Atta*. *J Nat Hist.* 2011;45: 2701-2723. <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.602478>
24. Folgarait PJ. Leaf-cutter ant parasitoids: current knowledge. *Psyche.* 2013;2013:539780. <https://doi.org/10.1155/2013/539780>
25. Bragança MAL, Arruda FV, Souza LRR, Martins HC, Della Lucia TMC. Phorid flies parasitizing leaf-cutting ants: their occurrence, parasitism rates, biology and the first account of multiparasitism. *Sociobiol.* 2016;63:1015-21. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v63i4.1077>
26. Bragança, MAL, Martins, HC, Oliveira, RJ, Della Lucia, TMC. Parasitism of the leaf-cutting ant *Atta bisphaerica* by phorid flies: biology, seasonal and inter-colonial parasitism rates. *Entomol Exp Appl.* Forthcoming 2020.
27. Bragança MAL, Tonhasca A Jr, Della Lucia TMC. Reduction in the foraging activity of the leaf cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohniphora* sp. *Entomol Exp Appl.* 1998;89:305-11. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00413.x>
28. Tonhasca AJr, Bragança MAL, Erthal MJr. Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Soc.* 2001;48:154-8.
29. Guillade AC, Folgarait P. Effect of phorid fly density on the foraging of *Atta vollenweideri* leaf cutter ants in the field. *Entomol Exp Appl* 2015;154:53-61. <https://doi.org/10.1111/eea.12255>

30. Orr MR. Parasitic flies (Diptera: Phoridae) influence foraging rhythms and caste division of labor in the leaf-cutter ant, *Atta Cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). Behav Ecol Sociobiol. 1992;30:395-402. <https://doi.org/10.1007/BF00176174>
31. Tonhasca AJr. Interactions between a parasitic fly, *Neodohniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Ecotropica. 1996;2:157-64.
32. Anjos N, Della Lucia TMC, Mayhe-Nunes J. Guia prático sobre formigas-cortadeiras em reflorestamentos. 1st ed. Ponte Nova: Graff Cor Ltda; 1998.
33. Erthal JM, Tonhasca AJr. Biology and oviposition behavior of the phorid *Apocephalus attophilus* and the response of its host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. Entomol Exp Appl. 2000;95:71-5. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00643.x>
34. Bragança MAL, Tonhasca A Jr, Moreira DDO. Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). Neotrop Entomol. 2002;31:241-4. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000200010>
35. Bragança MAL, Medeiros ZCS. Ocorrência e características biológicas de forídeos parasitoides (Diptera: Phoridae) da saúva *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) em Porto Nacional, TO. Neotrop Entomol. 2006;35(3):408-11. Portuguese. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000300018>
36. Feener DH, Brown BV. Oviposition behavior of an ant-parasitizing fly, *Neodohniphora curvinervis* (Diptera, Phoridae) and defense behavior by its leaf-cutting ant host *Atta cephalotes* (Hymenoptera, Formicidae). J Insect Behav. 1993;6:675-88.
37. Tonhasca AJr. Interactions between a parasitic fly, *Neodohniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Ecotropica. 1996;2:157-64.
38. Bragança MAL, Tonhasca AJr, Della Lucia TMC. Reduction in the foraging activity of the leaf cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohniphora* sp. Entomol Exp Appl. 1998;89:305-11. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00413.x>
39. Guillade AC, Folgarait PJ. Optimal conditions to rear phorid parasitoids (Diptera: Phoridae) of *Atta vollenweideri* and *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). Environ Entomol. 2014;43:458-66. <https://doi.org/10.1603/EN13172>
40. Pesquero MA, Bessa LA, Silva HCM, Silva LC, Arruda FV. Environmental influence on parasitism rate (Diptera: Phoridae) of *Atta laevigata* and *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). Rev Biol Neotrop. 2010;7:45-8. <https://doi.org/10.5216/rbn.v7i2.15459>

41. Guillade AC, Folgarait PJ. Life-history traits and parasitism rates of four phorid species (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Atta vollenweideri* (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. *J Econ Entomol.* 2011;104:32-40. <http://doi.org/10.1603/EC10173>
42. Arruda FV, Teresa FB, Martins HC, Pesquero MA, Bragança MAL. Seasonal and site differences in phorid parasitoidism rates of leaf-cutting ants. *Environ Entomol.* 2019;48:61-7. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy166>
43. Della Lucia TMC, Moreira DDO. Caracterização dos ninhos. In: Della Lucia TMC, editor. *As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa; 1993. pp. 32-42.
44. Forti LC, Moreira AA, Andrade APP, Castellani MA, Cadalto N. Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas-cortadeiras. In: Della Lucia TMC, editor. *Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV; 2011. pp. 102-125.
45. Pielström S, Roces F. Sequential soil transport and its influence on the spatial organisation of collective digging in leaf-cutting ants. *Plos one.* 2013;8(2):e57040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057040>
46. Souza DJ de, Santos JFL, Della Lucia TMC. Organização social das formigas-cortadeiras. In: Della Lucia TMC, editor. *Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV; 2011. pp. 126-40.
47. Hölldobler B, Wilson EO. *The Ants*. 1<sup>st</sup> ed. Cambridge: Belknap Press; 1990.
48. Silva VSG, Bailez O, Viana-Bailez AM, Tonhasca AJr. Effect of the size of workers of *Atta sexdens rubropilosa* on the attack behavior of *Neodohrniphora* spp. (Diptera: Phoridae). *Sociobiol.* 2007;50:35-44.
49. Farder-Gomes CF, Oliveira MA, Gonçalves PL, Gontijo LM, Zanuncio JC, Bragança MAL, Pires EM. Reproductive ecology of phorid parasitoids in relation to the head size of leaf-cutting ants *Atta sexdens* Forel. *Bull Entomol Res.* 2017;107:487-92. <https://doi.org/10.1017/S0007485316001073>
50. INMET-Instituto Nacional de Meteorologia. Boletim agroclimatológico mensal. Brasília: pp. 20; 2015. Available from: <https://ptdocz.com/doc/1461923/boletim-agroclimatol%C3%B3gico-mensal-de-agosto---2015>
51. Ferreira IM. Bioma Cerrado: caracterização do Subsistema de Vereda. Observatório Geográfico de Goiás. Goiânia: 2005; 1-15. Portuguese. Available from: [https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/215/o/MENDES Idevone bioma cerrado.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/215/o/MENDES%20Idevone%20bioma%20cerrado.pdf)
52. Bragança MAL, Tonhasca AJr, Della Lucia TMC. Características biológicas e comportamentais de *Neodohrniphora elongata* Brown (Diptera, Phoridae), um parasitoide da saúva *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). *Rev Bras Entomol.* 2009;53(4):600-6. Portuguese. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262009000400009>

53. Disney RHL. A key to *Neodohrniphora* (Diptera: Phoridae), parasites of leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae). J Nat Hist. 1996;30:1377-89. <https://doi.org/10.1080/00222939600771281>
54. Brown BV. Revision of the *Apocephalus attophilus*-group of ant-decapitating flies (Diptera: Phoridae). Contrib Sci. 1997;468:1-60.
55. Disney RHL, Elizalde L, Folgarait PJ. New species and revision of *Myrmosicarius* (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiol. 2006;47:771-809.
56. Disney RHL, Elizalde L, Folgarait PJ. New species and new records of scuttle flies (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter and army ants (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiol. 2009;54:601-31.
57. Brown BV, Disney RHL, Elizalde L, Folgarait PJ. New species and new records of *Apocephalus* Coquillett (Diptera: Phoridae) that parasitize ants (Hymenoptera: Formicidae) in America. Sociobiol. 2010;55:165-90.
58. Morrison LW, Dall'Aglio-Holvorcem CG, Gilbert LE. Oviposition behavior and development of *Pseudacteon* flies (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). Environ Entomol. 1997;26:716-24. <https://doi.org/10.1093/ee/26.3.716>
59. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd ed. USA: Freeman; 1997.
60. R Core Team. A language and environment for statistical computing [software]. R Foundation for statistical computing. Vienna, 2020. Available from <https://www.R-project.org/>
61. Uribe S, Brown BV, Bragança MAL, Queiroz JM, Nogueira CA. New species of *Eibesfeldtphora* Disney (Diptera: Phoridae) and a new key to the genus. Zootaxa 2014;3814:443-50. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3814.3.11>
62. Brown BV. Revision of the *Apocephalus miricauda*-group of ant-parasitizing flies (Diptera: Phoridae). Contrib Sci. 2000;482:1-62.
63. Brown BV. Revision of the *Apocephalus pergandei*-group of ant-decapitating flies (Diptera: Phoridae). Contrib Sci. 2002;495:1-58.
64. Disney RHL, Elizalde L, Folgarait PJ. New species and new records of *Apocephalus* Coquillett (Diptera: Phoridae) that parasitize ants (Hymenoptera: Formicidae) in America. Sociobiol. 2010;55:165-90.
65. Disney RHL, Bragança MAL. Two new species of Phoridae (Diptera) associated with leaf cutter ants (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiol. 2000;36:33-9.



66. Bragança MAL, Martins HC, Oliveira RJ, Della Lucia TMC. Parasitism of the leaf-cutting ant *Atta bisphaerica* by phorid flies: biology and seasonal and inter-colonial parasitism rates. *Entomol Exp Appl.* 2021;169:338-349. <https://doi.org/10.1111/eea.13020>.
67. Bragança, MAL, Della Lucia TMC, Tonhasca AJr. First record of Phorid Parasitoids (Diptera: Phoridae) of the leaf-cutting ant *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol.* 2003;32:169-71.
68. Galvão ARA, Bailez O, Viana-Bailez AM, Abib PH, Pimentel FA, Pereira TPL. Parasitism by phorids on leaf cutter ants *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae) in natural and agricultural environments. *Zool Science.* 2019;36:357-64. <https://doi.org/10.2108/zs180190>
69. Farder-Gomes CF, da Silva VP, Pereira TPL, Serrão JE, Pires EM, Oliveira MA. Parasitism, sexual dimorphism and effect of host size on *Apocephalus attophilus* offspring, a parasitoid of the leaf-cutting ant *Atta bisphaerica*. *Plos one.* 2018;13(12):e0208253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208253>
70. Camargo RS, Forti LC, Lopes JFS, Andrade APP, Ottati ALT. Age polyethism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hymenoptera: Formicidae). *J Appl Entomol.* 2007;131:139-45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01129.x>
71. Lacerda FG, Della Lucia TMC, DeSouza O, Souza LM de, Souza DJ de. Task performance of midden workers of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *J Insect Behav.* 2013;26:873-80. <https://doi.org/10.1007/s10905-013-9403-7>
72. Pereira-da-Silva V. Contribuição ao estudo das populações de *Atta sexdens rubropilosa* Forel e *Atta laevigata* Fr. Smith no Estado de São Paulo (Hym: Formicidae). *Studia Entomol.* 1975;18:201-50.
73. Brown BV. Taxonomic revision of *Neodohrniphora*, subgenus *Eibesfeldtphora* (Diptera: Phoridae). *Insect Syst Evol.* 2001;32:393-409.
74. Farder-Gomes CF, Oliveira MA, Oliveira ACR, Gonçalves PL, Pires EM, Zanuncio AJV, Serrão JE, Zanuncio JC. Seasonal parasitism of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus (Hymenoptera: Formicidae) by phorid flies (Diptera: Phoridae) in a Brazilian Cerrado-Atlantic Forest ecotone. *Fla Entomol.* 2020;103:112-5. <https://doi.org/10.1653/024.103.0418>

## **CAPÍTULO 2**

**PARASITISMO INTERCOLONIAL DA FORMIGA-CORTADEIRA *ATTA  
LAEVIGATA* (SMITH, 1858) POR MOSCAS PHORIDAE EM FUNÇÃO DO  
TAMANHO DO HOSPEDEIRO**

## Resumo

As moscas parasitas da família Phoridae compõem o principal grupo de agentes de controle biológico que usam as formigas cortadeiras *Atta* spp. como hospedeiros parasitando as operárias adultas. As fêmeas ovipositam dentro do corpo de seus hospedeiros e as formas imaturas do parasitoide alimentam-se do conteúdo interno das operárias, ocorrendo, no final do desenvolvimento larval, a morte da formiga. A variação nas taxas de parasitismo por diferentes espécies de forídeos por hospedeiros de *Atta* spp. entre colônias são discutidas em relação ao tamanho dos hospedeiros potenciais que transitam nas trilhas das diferentes colônias. O parasitismo por quatro espécies de forídeos em operárias de *Atta laevigata* (Smith, 1858) foi comparado em 18 colônias no campo. As formigas coletadas (21.254) nas três áreas foram mantidas em condições laboratoriais controladas para avaliação da taxa de parasitismo. Destas formigas, 1.112 (5,23%) estavam parasitadas pelos forídeos *Apocephalus attophilus* Borgmeier, 1928 (46,22%), *Myrmosicarius grandicornis* Borgmeier, 1928 (22,57%), *Eibesfeldtphora erthali* (Brown, 2001) (16,64%) e *Apocephalus vicosae* Disney, 2000 (14,57%). Nas três áreas, *A. attophilus* foi responsável pela maior proporção do parasitismo em PAL (74,44%) e EMB (77,24%). As espécies *M. grandicornis* e *A. vicosae* foram os parasitoides com a maior proporção do parasitismo observado na área UFT, com 55,4% e 30,63%, respectivamente. As maiores taxas de parasitismo foram por *A. attophilus* e *E. erthali*. Entre as colônias, o parasitismo por forídeos em geral foi alternado. *M. grandicornis* (98,41%) e *A. vicosae* (94,44%) preferiram parasitar as operárias menores, enquanto *A. attophilus* (61,52%) preferiu parasitar as operárias maiores, já o parasitismo por *E. erthali* quase não variou na preferência do tamanho das operárias entre as colônias. O parasitismo por *A. attophilus* foi mais frequente em quase todas as colônias das áreas PAL e EMB, e a mosca *E. erthali* foi a segunda espécie mais frequente na maioria das colônias das mesmas áreas. A área UFT apresentou a maior frequência total de parasitismo por *M. grandicornis* e *A. vicosae* em relação ao parasitismo pelos parasitoides *A. attophilus* e *E. erthali*. A frequência do tamanho de maior parte das operárias estava compreendida entre 1,5 e 3,0 mm na área EMB, entre 1,5 e quase 4,0 mm em PAL. As menores operárias transitavam nas trilhas das colônias da área UFT.

**Palavras-chave:** Parasitismo, Phoridae, *Atta laevigata*, colônias.

**INTERCOLONIAL PARASITISM OF THE LEAF-CUTTER ANT *ATTA LAEVIGATA* (SMITH, 1858) BY PHORIDAE FLIES AS A FUNCTION OF HOST SIZE**

**Abstract**

Parasitic flies of the family Phoridae are the main group of biological control agents that use the leaf-cutting ant *Atta* spp. as hosts by parasitizing the adult workers. The females oviposit inside the body of their hosts and the immature forms of the parasitoid feed on the internal contents of the workers, with the ant dying at the end of larval development. The variation in parasitism rates by different species of phorids by *Atta* spp. hosts between colonies are discussed in relation to the size of potential hosts that transit the tracks of different colonies. Parasitism by four species of phorids on workers of *Atta laevigata* (Smith, 1858) was compared in 18 colonies in the field. The ants collected (21,254) in the three areas were kept under controlled laboratory conditions to evaluate the parasitism rate. Of these ants, 1,112 (5.23%) were parasitized by the phorids *Apocephalus attophilus* Borgmeier, 1928 (46.22%), *Myrmosicarius grandicornis* Borgmeier, 1928 (22.57%), *Eibesfeldtphora erthali* (Brown, 2001) (16.64%), and *Apocephalus vicosae* Disney, 2000 (14.57%). In all three areas, *A. attophilus* accounted for the highest proportion of parasitism in PAL (74.44%) and EMB (77.24%). The species *M. grandicornis* and *A. vicosae* were the parasitoids with the highest proportion of parasitism observed at the UFT area, with 55.4% and 30.63%, respectively. The highest parasitism rates were by *A. attophilus* and *E. erthali*. Among colonies, parasitism by phorids was generally alternating. *M. grandicornis* (98.41%) and *A. vicosae* (94.44%) preferred to parasitize smaller workers, while *A. attophilus* (61.52%) preferred to parasitize larger workers, whereas parasitism by *E. erthali* hardly varied in worker size preference among colonies. Parasitism by *A. attophilus* was most frequent in almost all colonies of the PAL and EMB sites, and the fly *E. erthali* was the second most frequent species in most colonies of the same areas. The UFT area showed the highest total frequency of parasitism by *M. grandicornis* and *A. vicosae* relative to parasitism by the parasitoids *A. attophilus* and *E. erthali*. The frequency of the largest worker size was between 1.5 and 3.0 mm in the EMB area, between 1.5 and almost 4.0 mm in PAL. The smallest workers transited in the colony trails in the UFT area.

**Keywords:** Parasitism, Phoridae, *Atta laevigata*, colonies.

## Introdução

As formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* Fabricius, 1804 e *Acromyrmex* Mayr, 1865 são insetos eussociais e estão entre os principais herbívoros dominantes nas regiões neotropicais (Della Lucia & Souza 2011, Della Lucia et al. 2014). Como forrageiras, por cortarem grandes quantidades de folhas frescas, estão entre os insetos mais polípagos e vorazes (Fowler et al. 1989). Do ponto de vista ecológico, essas formigas contribuem amplamente para a diversidade ambiental, a produtividade e o fluxo de nutrientes e energia nos ambientes naturais (Fowler et al. 1989, Sternberg et al. 2007), a ponto de serem consideradas engenheiros do ecossistema (Farji-Brener & Werenkraut 2015). No entanto, em ambientes agrícolas e florestais, as cortadeiras são reconhecidas como pragas de grande importância econômica pelo nível de dano que provocam e por serem de difícil controle (Della Lucia et al. 2014, Farder-Gomes et al. 2016).

Para se protegerem dos inimigos naturais e dos fatores ambientais desfavoráveis, elas, adquiriram mecanismos de defesa e várias adaptações, como organização social com a divisão do trabalho, formados por indivíduos com alto grau de polimorfismo, com variação morfológica e uma complexa estrutura de ninhos que abrigam milhões de operárias (Wilson 1971, Hölldobler & Wilson 1990). Os ninhos das formigas-cortadeiras são constituídos por redes de trilhas, que se irradiam dos orifícios (entradas) para as fontes de alimento, movimentando grandes quantidades de material vegetal fresco para o cultivo do fungo simbiótico usados para alimentar a colônia (Forti 2011, Shik et al. 2018). Tais adaptações são atributos responsáveis pelo sucesso ecológico que dificulta o seu manejo (Gordon & Traniello 2018).

Tradicionalmente o método mais utilizado para controlar as cortadeiras é o químico, por meio de iscas a base de sulfluramida e fipronil (Oliveira et al. 2011, Montoya-Lerma et al. 2012). Entretanto, a maioria dos pesticidas químicos são altamente contaminantes e tóxicos para os seres humanos e o meio ambiente (Zanetti et al. 2014). Para isso, pela necessidade de redução de agroquímicos no ambiente e supressão das populações de formigas-cortadeiras, uma importante estratégia como método alternativo é o uso do controle biológico através da liberação e conservação de inimigos naturais (Howarth 1991, Bigler et al. 2006). As moscas parasitoides da família Phoridae possuem potencial para serem usadas em programas de controle biológico de formigas-cortadeiras (Bragança et al. 1998, Tonhasca et al. 2001). As espécies de forídeos que frequentemente parasitam as formigas *Atta* spp. pertencem principalmente aos gêneros *Apocephalus* Coquillett 1901, *Eibesfeldtphora* Disney 1996 e *Myrmosicarius* Borgmeier 1928 (Bragança 2011).

As fêmeas dos forídeos atacam as operárias que estão envolvidas em tarefas de corte e transporte de vegetais fora do ninho (Bragança 2011, Elizalde & Folgarait 2011). Para isso, as fêmeas da maioria dos forídeos usam seus ovipositores para inserir um ovo dentro do corpo de seus hospedeiros (endoparasitoidismo), durante um ataque aéreo rápido (Bragança & Medeiros 2006, Farder-Gomes et al. 2016). Dentro do corpo dos hospedeiros, as formas imaturas do parasitoide se alimentam do conteúdo interno das operárias, e ao final do desenvolvimento larval, no momento da pupação, ocorre a morte da formiga (Elizalde & Folgarait 2011).

Entre os efeitos do ataque dos forídeos, está a alteração no comportamento das formigas de forma individuais e em nível de colônia (Tonhasca & Bragança 2000, Guillade & Folgarait 2015). Tais efeitos podem fazer com que os parasitoides usem diferentes colônias da mesma espécie hospedeira para segregar os recursos (Folgarait et al. 2007). Isto ocorre porque forídeos de diferentes espécies e tamanhos parasitam as operárias de acordo com o tamanho das formigas (Bragança et al. 1998, Tonhasca & Bragança 2000). Como as formigas-cortadeiras apresentam polietismo morfológico, uma divisão do trabalho com tarefas específicas realizadas por tamanhos específicos de formigas na colônia (Hölldobler & Wilson 1990), parece haver uma correlação entre o tamanho das operárias hospedeiras e o tamanho dos diferentes forídeos (Souza et al. 2021).

A saúva *Atta laevigata* (Smith, 1858) é uma das muitas espécies de formigas-cortadeiras mais difundidas em toda a América do Sul e está entre a que causa maiores danos econômicos do Brasil (Fowler et al. 1989). Encontradas principalmente em áreas abertas e perturbadas, esta espécie corta plantas nativas e cultivadas de diferentes biomas (Viana et al. 2004, Forti 2011). No presente trabalho investigamos o parasitismo por quatro espécies de forídeos em operárias forrageadoras de *A. laevigata*, encontradas em estudo anterior realizado em região de cerrado (Souza et al. 2021). As operárias do presente estudo foram coletadas em 18 colônias para testar a hipótese de ocorrência de variação nas taxas de parasitismo pelos quatro parasitoides entre colônias. No caso de confirmação desta hipótese, o resultado poderia ser explicado pelo tamanho dos hospedeiros que transitam nas trilhas das diferentes colônias, ou seja, os hospedeiros potenciais.

Este estudo foi realizado com os seguintes objetivos: (i) comparar a taxa de parasitismo do total de operárias coletadas entre as quatro espécies de forídeos; (ii) comparar a taxa de parasitismo pelo conjunto de parasitoides entre colônias de cada uma de três áreas de coleta; (iii) comparar o número de formigas parasitadas por cada um dos parasitoides entre os hospedeiros potenciais (operárias das trilhas) de duas classes de tamanho. Relacionou-se também as taxas de parasitismo das colônias pelas diferentes espécies de forídeos com o tamanho das operárias que transitavam nas trilhas das colônias das três áreas. Calculou-se

também as taxas de parasitismo total de *A. laevigata* por moscas Phoridae para o conjunto das três áreas de coleta e para cada área separadamente. Além disso, foi calculada a participação proporcional das quatro espécies de forídeos no parasitismo total e em cada área de coleta.

## Materiais e Métodos

### Área de estudo

Este estudo foi realizado no município de Palmas (10°11'03''S e 48°19'46''W), Estado do Tocantins (TO), Brasil, entre os anos de 2018 e 2019 (Figura 1). O clima característico da região segundo a classificação de Köppen é do tipo Aw, com uma estação seca bem definida no inverno que vai de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril (Alvares et al. 2013). A cobertura vegetal predominante em Palmas é de Cerrado, sendo uma região com características de savanas abertas com manchas de florestas de galeria. A vegetação deste bioma sofre alterações diretas das modificações climáticas que ocorrem durante os meses do ano, apresentando no período seco características desérticas e no período chuvoso rápido processo vegetativo (Ferreira 2005).

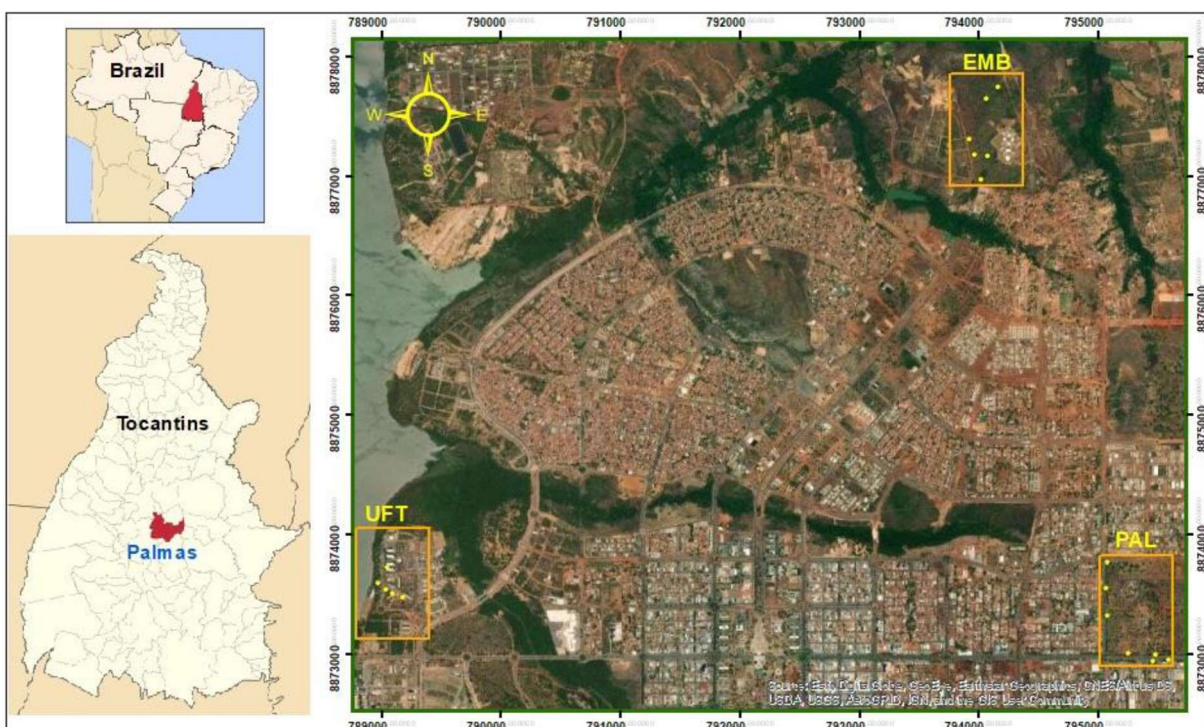
Dezoito colônias de *A. laevigata* localizadas em três áreas na zona urbana de Palmas foram usadas para este estudo. Sete colônias (C1-C7) foram selecionadas na área da Quadra do Palacinho (PAL), seis colônias (C8-C13) na área da sede da EMBRAPA Pesca e Aquicultura (EMB), e cinco colônias (C14-C18) na área do *Campus* da Universidade Federal do Tocantins (UFT) (Figuras 1 e 2).

A área PAL está ocupada principalmente por espécies arbóreas exóticas ao Cerrado como *Licania tomentosa* (Benth.) e *Syzygium cumini* (L.) Skeels, que são amplamente utilizadas na arborização urbana de Palmas. Porém, espécies nativas do Cerrado da região em estudo como *Bowdichia virgilioides* Kunth. e *Plathymentia reticulata* Benth. estavam presentes. Encontravam-se também nessa área algumas frutíferas nativas como *Caryocar brasiliense* Camb. e *Anacardium occidentale* L., além de um variado estrato herbáceo-arbustivo.

EMB é uma área composta por uma estrutura de vegetação característica de Cerrado *stricto sensu*, com árvores de pequeno porte, de caules suberosos e retorcidos. O estrato graminóide é descontínuo e de baixo porte (30 cm), com várias espécies regenerantes, ervas e subarbustos que se entremeiam com as árvores e arbustos do estrato lenhoso. O

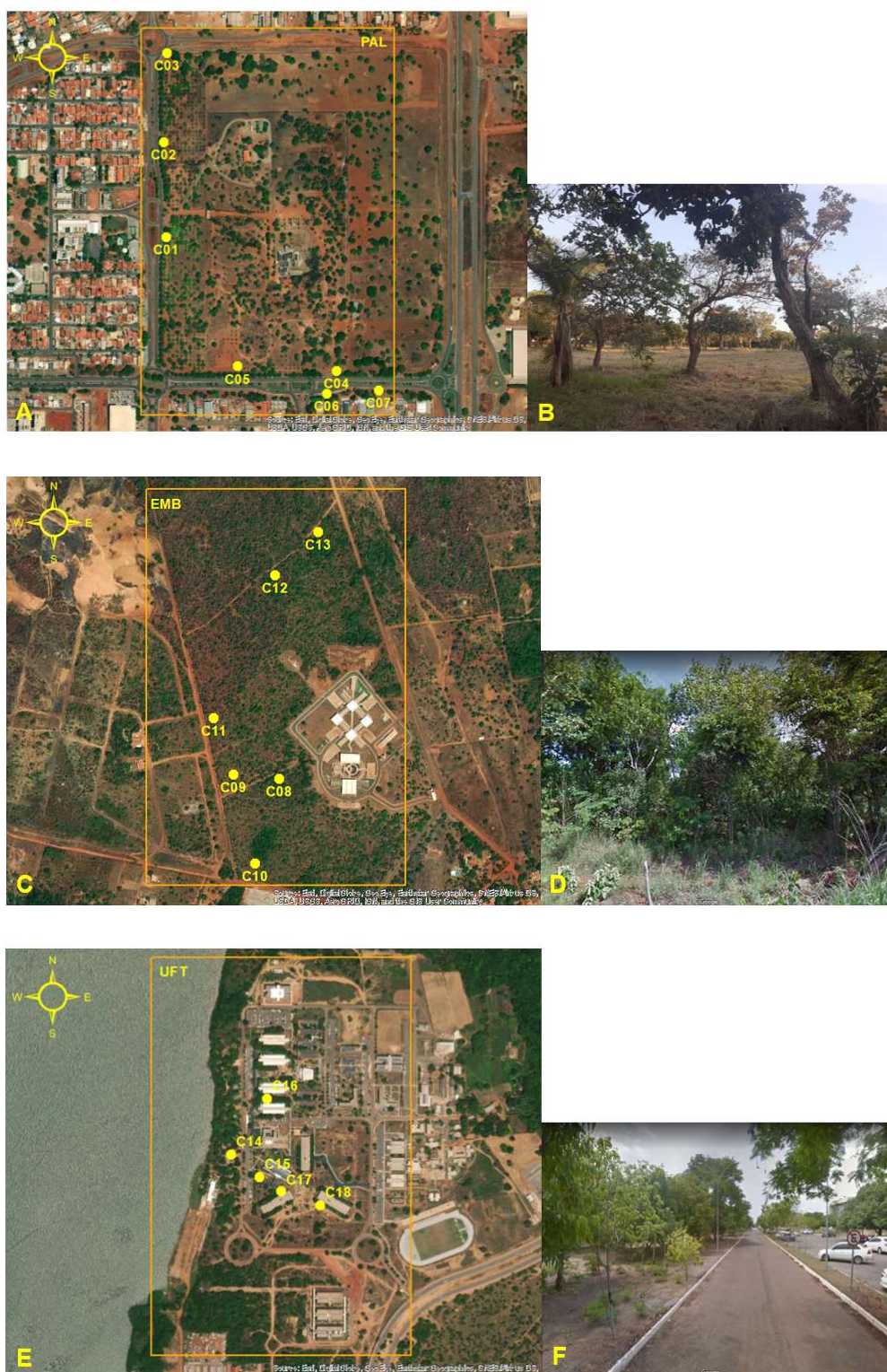
estrato lenhoso é descontínuo, predominando *Qualea parviflora* Mart. e *Tachigali subvelutinum* (Benth).

A área UFT tem predominância de espécies exóticas ao Cerrado, provenientes de outras regiões brasileiras e de outros países, com predominância de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, *Tabebuia* sp. e *Anacardium occidentale* L. A estrutura vegetal arbustiva é rala. A distância aproximada entre PAL e EMB é de 4 km, enquanto entre UFT e EMB e entre UFT e PAL é a mesma distância, cerca de 6 km.



**Figura 1.** Localização de 18 ninhos de *Atta laevigata* em três áreas (PAL, EMB e UFT) na zona urbana do Município de Palmas, Estado do Tocantins, Brasil. Cada retângulo de cor laranja equivalia a uma área de 932 m X 610 m e os pontos amarelos mostram a localização de cada ninho. Adaptado da Internet, Esri, DigitalGlobe, GeoEye, Earthstar Geographics, CNES / Airbus DS, USDA, USGS, AeroGRID, IGN e a comunidade de usuários GIS.





**Figura 2.** Localização de 18 colônias de *Atta laevigata*. **A:** sete colônias (C1 a C7) na área PAL; **B:** estrutura da vegetação típica na área PAL. A distância entre as colônias variou de 60 a 900 m; **C:** seis colônias (C8 a C13) na área EMB; **D:** estrutura da vegetação típica do cerrado *stricto sensu* na área EMB. A distância entre as colônias variou de 100 a 800 m; **E:** cinco colônias (C14 a C18) na área UFT; **F:** estrutura da vegetação típica na área UFT. A distância entre as colônias variou de 97 a 280 m. Fontes: (A, C e E) Google Earth, 2020; (B) Foto: M.L.O. Souza; (D e F) Google Maps, 2020.

### **Coleta das operárias de *A. laevigata***

As coletas das formigas foram realizadas em intervalos de aproximadamente 15 dias nas áreas PAL e UFT, e 25 dias na área EMB. Entre fevereiro e maio de 2018 foram realizadas seis coletas nas 7 colônias do sítio amostral PAL. Entre junho e setembro de 2018, foram realizadas quatro coletas nas 5 colônias do sítio amostral UFT. Entre outubro de 2018 e janeiro de 2019, foram realizadas 4 coletas nas seis colônias da área EMB.

Todas as coletas foram realizadas no período noturno e tinham início entre 18 e 19:00h, quando visualmente se confirmava um fluxo de formigas em pelo menos uma ou duas trilhas de cada colônia. Grande parte das operárias que transitavam ao longo de um trecho de 2 a 5 m da trilha era capturada aleatoriamente com auxílio de pinça metálica flexível, durante aproximadamente 15-20 min. As operárias coletadas de trilhas de cada colônia foram colocadas em um pote plástico (9 x 14 cm), com talco inerte atóxico colocado previamente nas bordas para evitar fugas durante a coleta. Os potes foram tampados e levados ao Laboratório de Entomologia, Prédio de Coleções Biológicas da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Palmas, Tocantins, Brasil.

### **Obtenção dos forídeos**

No laboratório de Entomologia, as operárias de cada colônia foram acondicionadas em bandejas plásticas (55 x 34 x 9,5 cm) contendo talco nas bordas internas para evitar fugas. As bandejas foram cobertas com tampas perfuradas para permitir a circulação de ar e mantidas em incubadora ( $26 \pm 1^\circ \text{C}$ ,  $85 \pm 5\% \text{UR}$ ). A cada dois dias, as formigas eram alimentadas com solução de mel a 50% embebida em chumaços de algodão (Bragança & Medeiros 2006, Bragança et al. 2016). Nos 15 dias seguintes, cada bandeja foi inspecionada diariamente e as operárias mortas foram removidas e transferidas individualmente para tubos de vidro (12 x 75mm), cobertos com algodão, e mantidos na incubadora. A remoção das formigas mortas ao longo de um período de 15 dias foi por ser este o tempo máximo necessário conhecido para que morram pelo parasitismo por forídeos (Tonhasca 1996, Erthal & Tonhasca 2000, Tonhasca et al. 2001). No 15º dia após a coleta, as formigas ainda vivas foram sacrificadas em álcool 70%. O somatório dos indivíduos mortos a cada dia com aqueles que estavam vivos em cada bandeja 15 dias após a coleta determinou o número total de formigas coletadas por colônia. O número de operárias coletadas nas colônias dos sítios PAL, EMB e UFT variou de 102 a 739, de 37 a 718 e de 335 a 739, respectivamente.

Os indivíduos mortos foram mantidos em incubadora por 24 horas para a diferenciação entre formigas parasitadas e não parasitadas. As operárias parasitadas eram identificadas pela presença de larvas e pupas nos corpos dos hospedeiros ou próximo a ele (Tonhasca et al. 2001, Bragança & Medeiros 2006, Bragança et al. 2016). As formigas parasitadas foram mantidas nos tubos e na incubadora até que as moscas emergissem dos hospedeiros e a esclerotização do tegumento dos forídeos se completasse. Em seguida, as moscas foram armazenadas individualmente em tubos tipo Eppendorf contendo álcool 70% e identificados com os dados de coleta do hospedeiro. Os corpos das formigas operárias parasitadas com ou sem emergência de forídeos adultos foram armazenados individualmente em envelopes de papel identificados com dados de coleta do hospedeiro e parasitismo. Este mesmo procedimento foi realizado para grupos de operárias (considerando os dados de coleta) mortas sem qualquer sinal de parasitismo. A identificação taxonômica dos forídeos foi realizada de acordo com as chaves publicadas por Disney (1996), Disney et al. (2009) e Brown et al. (2010). As moscas e suas formigas hospedeiras foram depositadas na coleção de insetos do Laboratório de Entomologia da UFT.

### **Medida do tamanho de formigas**

A largura da cápsula cefálica (mm), definida como o ponto mais largo da cabeça da formiga, foi usada como medida do tamanho das operárias (Wilson 1980). As medidas foram tomadas de amostras aleatórias de operárias não parasitadas das coletas realizadas em todas as 18 colônias. As medidas foram obtidas usando uma ocular milimetrada acoplada à estereomicroscópio.

### **Análise de dados**

A taxa de parasitismo de operárias de formigas coletadas foi calculada como uma porcentagem do número total de formigas coletadas em relação ao número que posteriormente se observou como parasitadas. A taxa de parasitismo proporcional (%) foi calculada considerando a porcentagem com que cada espécie de parasitoide contribuiu para o parasitismo de operárias de *A. laevigata*.

Foram comparadas as taxas médias de parasitismo pelos diferentes parasitoides ao longo do período de estudo nas 18 colônias. Apesar da transformação dos dados originais usando  $\arcsin\sqrt{(\%/100)}$ , as taxas médias de parasitismo das espécies de forídeos não

seguiram os pressupostos para análise paramétrica e, portanto, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (H), seguido do teste de comparação múltipla de Dunn.

Análise de variância e o teste de Tukey, para discriminação das médias foram realizados para comparar a largura da cápsula cefálica (mm) das operárias: (i) comparar o conjunto das operárias com e sem parasitismo; (ii) comparar as formigas parasitadas por diferentes espécies de moscas forídeos. Buscando homogeneidade de variâncias e ajuste dos dados à uma distribuição normal, para a validação da ANOVA, as medidas da largura da cápsula da cabeça da formiga foram transformadas usando a família de transformação de Box-Cox. Esse procedimento pode ser usado para estimar a melhor transformação para atingir a normalidade (Sokal & Rohlf 1997).

Foi aplicado o teste do qui quadrado de Pearson, ao nível de 5% de probabilidade, para verificar a relação de dependência entre categorias de comprimento da cápsula cefálica (valores abaixo e acima do valor mediano) e o ataque por espécie de forídeo. Contou-se, para cada espécie de forídeo, o número de formigas atacadas em cada uma das duas classes.

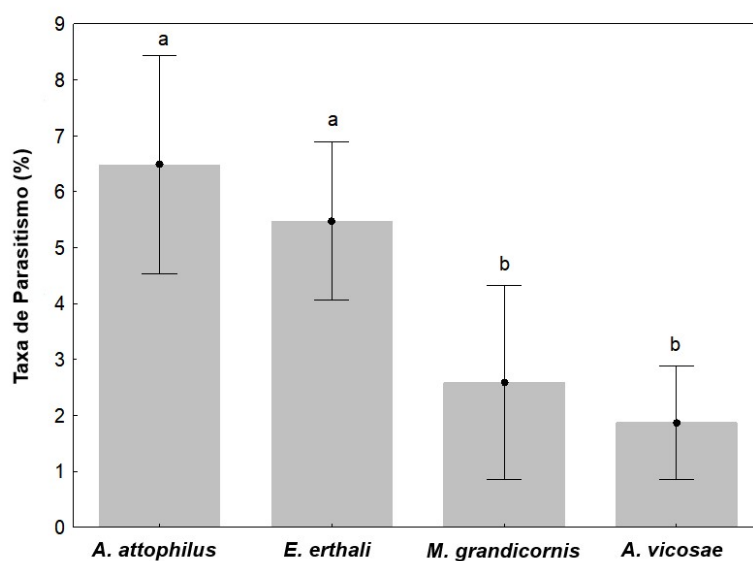
As médias são apresentadas com seus respectivos desvios padrão ou intervalos de confiança. Todas as análises foram conduzidas usando o pacote R (R Core Team 2020) com as hipóteses nulas testadas no nível de 5% de probabilidade.

## Resultados

Um total de 21.254 operárias da formiga-cortadeira *A. laevigata* foram coletadas nas três áreas, das quais 1.112 (5,23%) estavam parasitadas pelos forídeos *Apocephalus attophilus* Borgmeier (46,22%), *Myrmosicarius grandicornis* Borgmeier (22,57%), *Eibesfeldtphora erthali* (Brown) (16,64%) e *Apocephalus vicosae* Disney (14,57%). As taxas de parasitismo foram aproximadamente nas áreas PAL (4,0%), bem (4,4%) e UFT (8,5%) (Tabela 1). Considerando as quatro espécies de forídeos, *A. attophilus* foi responsável pela maior proporção do parasitismo das operárias coletadas nas áreas PAL (74,44%) e EMB (77,24%), seguido por *E. erthali* nos mesmos sítios. Por outro lado, *M. grandicornis* e *A. vicosae* foram os parasitoides com a maior proporção do parasitismo observado na área UFT, com taxas de 55,40 e 30,63%, respectivamente (Tabela 1). A comparação das taxas de parasitismo de formigas parasitadas pelas quatro espécies de forídeos foram verificadas as maiores taxas por *A. attophilus* e *E. erthali* (Figura 3).

**Tabela 1.** Taxas de parasitismo por moscas Phoridae em operárias da saúva *A. laevigata* coletadas em três áreas da zona urbana do município de Palmas, estado do Tocantins, Brasil. Um total de dezoito colônias foram amostradas.

Área de coleta	Número de formigas coletadas	Número de formigas parasitadas	Taxa de parasitismo (%)	Número de formigas parasitadas (n) e proporção de parasitismo (%)							
				<i>A. attophilus</i>		<i>M. grandicornis</i>		<i>E. erthali</i>		<i>A. vicosae</i>	
				n	%	n	%	n	%	n	%
PAL	8.969	356	<b>3,97</b>	265	74,44	2	0,56	88	24,72	1	0,28
EMB	7.080	312	<b>4,40</b>	241	77,24	3	0,97	43	13,78	25	8,01
UFT	5.205	444	<b>8,53</b>	8	1,80	246	55,40	54	12,17	136	30,63
Total	21.254	1.112	5,23	514	46,22	251	22,57	185	16,64	162	14,57



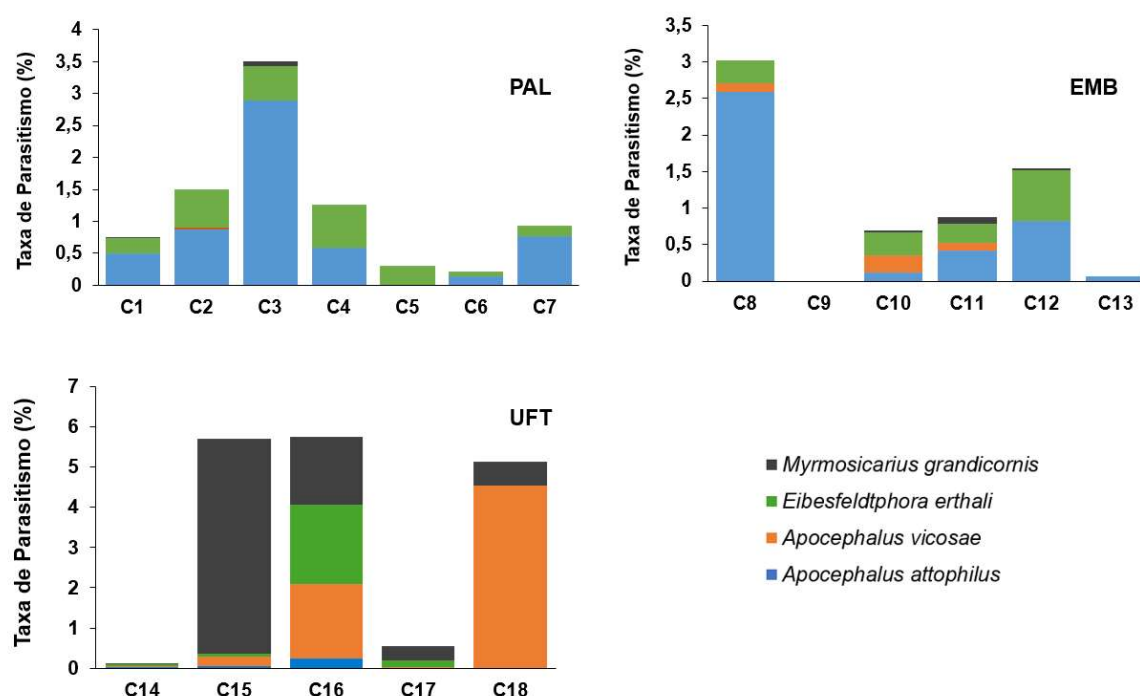
**Figura 3.** Taxas médias de parasitismo de forrageadoras *A. laevigata* ao comparar quatro espécies de forídeos. As forrageadoras foram coletadas em trilhas de um total de 18 ninhos.

Observação: Barras verticais indicam intervalos de confiança de 95% e letras diferentes indicam diferenças significativas entre as taxas de parasitismo. As comparações das taxas foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis ( $H = 44,29$ ;  $n = 272$ ;  $P < 0,001$ ), seguido pelo teste de separação múltipla de Dunn ( $P < 0,001$ ).

Entre as dezoito colônias amostradas, o parasitismo por *A. attophilus* foi mais frequente em quase todas as colônias das áreas PAL e EMB do que *M. grandicornis* e de *A. vicosae*. A mosca *E. erthali* foi a segunda espécie mais frequente na maioria das colônias de PAL e EMB (Figura 4). O parasitismo de *M. grandicornis* e de *A. vicosae* foi menos frequente



na área PAL do que em EMB. Na área PAL, das sete colônias amostradas, *M. grandicornis* esteve presente somente em duas colônias, e a mosca *A. vicosae* esteve presente somente em uma colônia. Em EMB, *M. grandicornis* e *A. vicosae* estiveram presentes somente em três das seis colônias estudadas (Figura 4). Por outro lado, a área UFT apresentou a maior frequência total de parasitismo por *M. grandicornis* e *A. vicosae* em relação ao parasitismo pelos parasitoides *A. attophilus* e *E. erthali*. Em UFT, *A. attophilus* esteve presente somente em duas colônias (Figura 4).



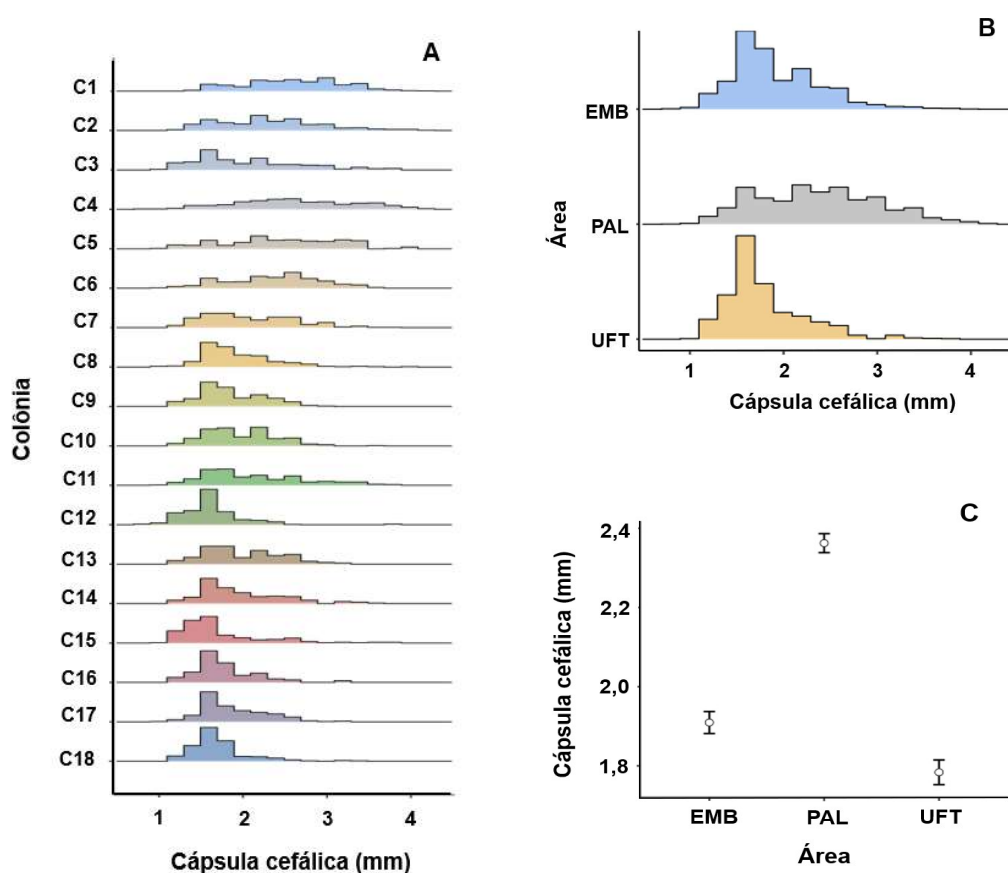
**Figura 4.** Taxa de parasitismo total de operárias *A. laevigata* por quatro espécies de moscas Phoridae em diferentes colônias (C1-C18) do hospedeiro, localizadas em três áreas (PAL, EMB e UFT) na zona urbana do município de Palmas, estado do Tocantins, Brasil.

A preferência de ataque da espécie de forídeo depende do tamanho da largura da cápsula cefálica das operárias ( $\chi^2 = 342,03$ , gl = 3,  $P < 0,0001$ ). *M. grandicornis* (n=251) 98,41% e *A. vicosae* (n=162) 94,44% parasitaram os indivíduos menores, enquanto *A. attophilus* (n= 512) 61,52% preferiu parasitar as operárias maiores. Já *E. erthali* quase não variou sua preferência em relação ao tamanho das operárias (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número e porcentagem de operárias forrageadoras de *A. laevigata* parasitadas por quatro moscas Phoridae em função da distribuição do tamanho das formigas que transitavam nas trilhas das colônias durante as coletas. Estas formigas foram separadas em dois grupos de acordo com o tamanho (classes de tamanho), as menores e as maiores que a mediana (1,968 mm).

Classe de tamanho das operárias	<i>A. attophilus</i>		<i>E. erthali</i>		<i>A. vicosae</i>		<i>M. grandicornis</i>		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
< Mediana	197	38,48	93	53,14	153	94,44	247	98,41	690	62,73
> Mediana	315	61,52	82	46,86	9	5,56	4	1,59	410	37,27
Total	512		175		162		251		1.100	

Considerando o tamanho das operárias não parasitadas que transitavam nas trilhas das diferentes colônias nas três áreas foram observadas diferenças na frequência da distribuição desse tamanho das formigas (Figura 5A). As formigas com tamanho da cápsula cefálica entre 1 e 2 mm foram mais frequentes nas colônias C12, C14-C18. As maiores operárias encontradas, aquelas com tamanho de cápsula cefálica entre 2 e 4 mm foram mais frequentes de C1 a C9 (Figura 5A). As formigas com cápsula cefálica de tamanho intermediário entre 1,5 e 3 mm foram mais frequentes nas colônias C10, C11 e C13. Os dados de tamanho mostraram que maior número de operárias com tamanho entre 1 e 2 mm foram encontravam nas trilhas das colônias da área UFT (Figura 5B). Na área EMB, o tamanho de maior parte das operárias estava compreendido entre 1,5 e 3,0 mm, enquanto em PAL a frequência do número de operárias estava mais uniformemente distribuída entre 1,5 e quase 4,0 mm (Figura 5B). As menores operárias transitavam nas trilhas das colônias da área UFT (Figura 5B e C).



**Figura 5.** Distribuição da frequência dos tamanhos (largura da cápsula cefálica) de operárias não parasitadas de *A. laevigata* em relação às colônias C1 a C18 ( $n = 4.737$ ) (A), e em relação às três áreas (PAL, EMB e UFT) (B e C) na zona urbana do município de Palmas, estado do Tocantins, Brasil.

## Discussão

A taxa de parasitismo de operárias de *A. laevigata* por forídeos encontrada neste estudo (5,23%) foi superior àquela registrada para o mesmo hospedeiro por Bragança & Medeiros (2006) (2,8%) e Erthal & Tonhasca (2000) (4,0%), e semelhante aos estudos realizados por Bragança et al. (2016) (5,36%), corroborando com as taxas encontradas em estudos com espécies de saúvas em geral, que normalmente ficam abaixo de 6%. O resultado observado neste estudo é consistente com outros estudos no Brasil que enfocaram os hospedeiros *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (1,57%) (Bragança et al. 2016) e (2,94%) (Fardes-Gomes et al. 2016).

Considerando o parasitismo pelas quatro espécies de forídeos nas três áreas em conjunto, a maior proporção de parasitismo observada por *A. attophilus* (46,22%) em



comparação com outras espécies corrobora com Bragança & Medeiros (2006), Bragança et al. (2016) e Arruda et al. (2019). A justificativa pode ser pelo fato de que entre as quatro espécies de forídeos analisadas, *A. attophilus* é a única que produz mais de um indivíduo por hospedeiro (Erthal & Tonhasca 2000, Farder-Gomes et al. 2018, Souza et al. 2021). Em estudos com as saúvas *A. laevigata* e *A. sexdens*, a mosca *A. attophilus* produziu de 1 a 14 (Souza et al. 2021) e de 1 a 16 pupas por formigas (Farder-Gomes et al. 2016). Isso nos leva a crer que *A. attophilus* é a espécie mais abundante nos ambientes, o que por sua vez, pode permitir mais gerações e parasitando, portanto, uma proporção maior de formigas do que seus concorrentes. De modo similar, mas considerando agora o parasitismo por forídeo em cada área, *A. attophilus* parasitou a maior proporção de formigas em duas das três áreas estudadas, PAL (74,44%) e EMB (77,24%) (Tabela 1).

A variação nas taxas de parasitismo pelas espécies de forídeos nas diferentes colônias, poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela relação entre o tamanho dos parasitoides e o tamanho das formigas que eles parasitaram (Bragança et al. 2021). No presente estudo, o maior parasitismo proporcional por *A. attophilus* e *E. erthali* ocorreram nas colônias das áreas PAL e EMB, onde havia operárias de maior cápsula cefálica. O contrário verificou-se com o parasitismo por *M. grandicornis* e *A. vicosae*, as quais parasitaram formigas de menor tamanho, que foram mais frequentes nas colônias coletadas na área UFT. As diferenças nos tamanhos das operárias presentes nas trilhas das colônias nos três sítios, podem ter sido fator para variação da taxa de parasitismo pelas espécies de forídeos, que possuem diferentes tamanhos (Bragança et al. 1998, Tonhasca & Bragança 2000).

Como muitas espécies de forídeos podem coexistir no mesmo ambiente (Folgarait et al. 2006), o parasitoide pode se aproveitar do polimorfismo com a divisão de tarefas entre as operárias para segregar recursos e diminuir a concorrência (Hölldobler & Wilson 1990, Elizalde et al. 2018). Para isso, os parasitoides de diferentes espécies e tamanhos podem atacar as operárias de acordo com o tamanho das formigas presentes nas trilhas (Bragança et al. 1998, Tonhasca & Bragança 2000). A preferências por hospedeiros de tamanhos diferentes pode ser explicada pelo tipo de comportamento de oviposição e o local de desenvolvimento da pupa de cada espécie de forídeo (Bragança 2011, Farder-Gomes et al. 2016).

Dependendo da espécie de parasitoide, a pupa pode ser formada no interior da cápsula cefálica, na espécie *M. grandicornis*; entre as mandíbulas, em *Eibesfeldtphora* spp. (Tonhasca et al. 2001, Bragança & Medeiros 2006), dentro do protórax, em *A. vicosae* Disney; ou até mesmo fora do corpo do hospedeiro, em *A. attophilus* (Erthal & Tonhasca 2000). São destes locais que os parasitoides adultos emergem (Bragança 2011). Como as formas imaturas da maior parte dos parasitoides se desenvolvem na cabeça da formiga, alimentam-

se do conteúdo cefálico, o tamanho da formiga pode estar correlacionado com o desenvolvimento larval de forídeos de tamanhos variados (Bragança et al. 1998, Brown 2012, Farder-Gomes et al. 2016, Tonhasca & Bragança 2000). As diferentes espécies de forídeos buscam por hospedeiros que possam suprir as necessidades da sua prole (Bragança et al. 1998, Farder-Gomes et al. 2016). Por meio de uma correlação positiva, podemos supor que os menores forídeos tendem a parasitarem formigas menores e assim também ocorrer com os maiores (Farder-Gomes et al. 2018, Souza et al. 2021).

Este estudo confirmou que as taxas de parasitismo total diferiram entre as quatro espécies de forídeos, e entre as colônias de cada uma das três áreas amostradas. A variação nas taxas de parasitismo pelas quatro espécies de parasitoides entre colônias provavelmente é explicado pelo tamanho dos hospedeiros que transitam nas trilhas das diferentes colônias, ou seja, os hospedeiros potenciais.

## Referências

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's Climate Classification Map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-28, 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.

ARRUDA, F. V.; TERESA, F. B.; MARTINS, H. C.; PESQUERO, M. A., BRAGANÇA M. A. L. Seasonal and site differences in phorid parasitoidism rates of leaf-cutting ants, **Environmental Entomology**, v. 48, p. 61-67, 2019. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy166>

BIGLER, F.; BABENDREIER, D.; KUHLMANN, U. **Environmental impact of invertebrates for biological control of arthropods: methods and risk assessment**. CAB Int, Wallingford, 2006.

BRAGANÇA, M. A. L.; TONHASCA, A.; LUCIA, T. Reduction in the foraging activity of the leaf cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora* sp. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 89, n. 3, p. 305-311, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00413.x>

BRAGANÇA, M. A. L.; MEDEIROS, Z. C. S. Ocorrência e características biológicas de forídeos parasitoides (Diptera: Phoridae) da saúva *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) em Porto Nacional, TO. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 3, p. 408-411, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000300018>

BRAGANÇA, M. A. L. **Parasitoides de formigas-cortadeiras**. In: DELLA LUCIA, T. M. C., editor. *Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV, p. 321-43, 2011.

BRAGANÇA, M. A. L.; ARRUDA, F. V.; SOUZA, L. R. R.; MARTINS, H. C.; DELLA LUCIA T. M. C. Phorid Flies Parasitizing Leaf-Cutting Ants: Their Occurrence, Parasitism Rates, Biology and the First Account of Multiparasitism. **Sociobiology**, v. 63, p. 1015-1021, 2016. <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v63i4.1077>

BRAGANÇA, M. A. L.; MARTINS, H. C.; OLIVEIRA, R. J.; DELLA LUCIA, T. M.C. Parasitism of the leaf-cutting ant *Atta bisphaerica* by phorid flies: biology and seasonal and inter-colonial parasitism rates. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1111/eea.13020>

BROWN, B. V.; DISNEY, R. H. L.; ELIZALDE, L.; FOLGARAIT, P. J. New species and new records of *Apocephalus* Coquillett (Diptera: Phoridae) that parasitize ants (Hymenoptera: Formicidae) in America. **Sociobiology**, v. 55, p. 165-90, 2010.

BROWN, B. V. Small size no protection for acrobat ants: world's smallest fly is a parasitic phorid (Diptera: Phoridae) **Annals of the Entomological Society of America**, v. 105, p. 550-554, 2012. <https://doi.org/10.1603/AN12011>

DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: **Formigas-cortadeiras – da biologia ao manejo**, v. 1, ed. by DELLA LUCIA, T. M. C. Editora UFV, Brasil, p. 13-26, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GRANDRAL, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ant peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, p. 14-23, 2014. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>

DISNEY, R. H. L. A key to *Neodohrniphora* (Diptera: Phoridae), parasites of leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Natural History**, v. 30, p. 1377-89, 1996. <https://doi.org/10.1080/00222939600771281>

DISNEY, R. H. L.; ELIZALDE, L.; FOLGARAIT, P. J. New species and new records of scuttle flies (Diptera: Phoridae) that parasitize leaf-cutter and army ants (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 54, p. 601-31, 2009.

ELIZALDE, L.; FOLGARAIT, P. J. Biological attributes of Argentinian phorid parasitoids (Insecta: Diptera: Phoridae) of leaf-cutting ants, *Acromyrmex* and *Atta*. **Journal of Natural History**, v. 45, p. 43-44, 2011. <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.602478>

ELIZALDE, L.; GUILLADE, A. C.; FOLGARAIT, P. J. No evidence of strong host resource segregation by phorid parasitoids of leaf-cutting ants. **Acta Oecologica**, v. 93, p. 21-29, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2018.10.005>

ERTHAL, J. M.; TONHASCA, A. JR. Biology and oviposition behavior of the phorid *Apocephalus attophilus* and the response of its host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 95, p. 71-75, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00643.x>

FARDER-GOMES, C. F.; OLIVEIRA, M. A.; GONÇALVES, P. L.; GONTIJO, L. M.; ZANUNCIO, J. C.; BRAGANÇA, M. A. L.; PIRES, E. M. Reproductive ecology of phorid parasitoids in relation to the head size of leaf-cutting ants *Atta sexdens* Forel. **Bulletin of Entomological Research**, v. 107, p. 487-92, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0007485316001073>

FARDER-GOMES, C. F.; DA SILVA, V. P.; PEREIRA, T. P. L.; SERRÃO, J. E.; PIRES, E. M.; OLIVEIRA, M. A. Parasitism, sexual dimorphism and effect of host size on *Apocephalus atrophilus* offspring, a parasitoid of the leaf-cutting ant *Atta bisphaerica*. **Plos One**, v. 13, n. 12, e0208253, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208253>

FARJI-BRENER, A.G.; WERENKAUT, V. A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. **Ecological Entomology**, v. 40, n. 2, p. 150-158, 2015. <https://doi.org/10.1111/een.12169>

FERREIRA, I. M. **Bioma Cerrado: caracterização do Subsistema de Vereda**. Observatório Geográfico de Goiás, v.1, n. 1, p. 1-13, 2005.

FOLGARAIT, P. J.; PATROCK, R. J. W.; GILBERT, L. E. Development of *Pseudacteon nocens* (Diptera: Phoridae) on *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 295-307, 2006. <https://doi.org/10.1093/jee/99.2.295>

FOLGARAIT, P. J.; PATROCK, R. J. W.; GILBERT, L. E. Associations of fire ant phorids and microhabitats. **Environmental Entomology**, v. 36, p. 731-742, 2007. <https://doi.org/10.1093/ee/36.4.731>

FORTI, L. C. Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, UFV, p. 102-125, 2011.

FOWLER, H. G.; PAGANI, M. I.; SILVA, A. O.; FORTI, L. C.; PEREIRA-DA-SILVA, V.; VASCONCELOS, H. L. A pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**, v. 13, p. 671-675, 1989.

GORDON, D. G.; TRANIELLO, J. F. A. Synaptic organization and division of labor in the exceptionally polymorphic ant *Pheidolerhea*. **Neuroscience Letters**, v. 676, p. 46-50, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.001>

GUILLADE, A. C.; FOLGARAIT PJ. Effect of phorid fly density on the foraging of *Atta vollenweideri* leaf cutter ants in the field. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 154, p. 53-61, 2015. <https://doi.org/10.1111/eea.12255>

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1990.

HOWARTH, F. G. Environmental impacts of classical biological control. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 485-509, 1991. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002413>

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, v. 58, p. 225-247, 2012. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>

OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Manejo de formigas-cortadeiras**. In: Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo. DELLA LUCIA, T. M. C. Editora UFV, Brazil, p. 400-419, 2011.

R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing [software]. R Foundation for statistical computing.** Vienna, 2020. Available from <https://www.R-project.org/>

SHIK, J. Z.; RYTTER, W.; ARNAN, X.; MICHELSEN, A. Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using stable isotopes. **Ecology**, v. 99, p. 1999-2009, 2018.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.** 3rd ed. USA: Freeman; 1997.

SOUZA, M. L. O.; OLIVEIRA, R. J.; BRAGANÇA, M. A. L.; SOUZA, D. J.; SAMUELS, R. I. Differential parasitism by four species of phorid flies when attacking three worker castes of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith, 1858). **PLoS One**. 16(5): e0250973, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250973>

STERNBERG, L. S. L.; PINZON, M. C.; MOREIRA, M. Z.; MOUTINHO, P.; ROJAS, E. I.; HERRE, E. A. Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. **Biological Sciences**, v. 274, p. 315-321, 2007. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3746>

TONHASCA A. JR. Interactions between a parasitic fly, *Neodohrniphora declinata* (Diptera: Phoridae), and its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropica**, v. 2, p. 157-164, 1996.

TONHASCA, A. JR.; BRAGANCA, M. A. L. Effect of leaf toughness on the susceptibility of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* to attacks of a phorid parasitoid. **Insectes Sociaux**, v. 47, p. 220-2, 2000.

TONHASCA, A. JR.; BRAGANÇA, M. A. L.; ERTHAL, JR. M. Parasitism and biology of *Myrmosciarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 48, p. 154-158, 2001.

VIANA, L. R.; SANTOS, J. C.; ARRUDA, L. J.; SANTOS, G. P.; FERNANDES, G. W. Foraging patterns of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith) (Myrmicinae: Attini) in an area of cerrado vegetation. **Neotropical Entomology**, v.33, p. 391-393, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000300019>

WILSON, E. O. **The insect societies.** Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1971.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 7, p. 143-156, 1980.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.; SANTOS, J.; DA SILVA, W.; RIBEIRO, G.; LEMES, P. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v. 5, p. 439-454, 2014. <https://doi.org/10.3390/f5030439>

## **CAPÍTULO 3**

**FIDELIDADE ESPACIAL DE OPERÁRIAS ÀS ENTRADAS DE NINHOS DA  
FORMIGA-CORTADEIRA *ATTA LAEVIGATA* (Smith, 1858)**

## Resumo

A fidelidade espacial é o movimento recursivo ao local de tarefa visitado anteriormente. Em particular, em insetos sociais, como as formigas-cortadeiras, um aspecto importante da organização do trabalho é o local de realização das tarefas na colônia. Inúmeras tarefas essenciais para a sobrevivência da colônia, são realizadas em locais específicos do ninho. A conexão entre as tarefas realizadas pelas operárias e sua organização espacial ainda é pouco estudada. Não está claro se as operárias são fiéis às atividades realizadas nas áreas de forrageamento e nas regiões dos montes de terra na mesma colônia. Em colônias de formigas-cortadeiras, as pesquisas sobre fidelidade espacial têm sido relatadas mais especificamente em atividades realizadas nas trilhas de forrageamento. No entanto, não há relatos na literatura de estudos sobre a fidelidade nos montes de terra. O presente estudo foi realizado para verificar a fidelidade espacial em colônias da formiga-cortadeira *Atta laevigata* (Smith, 1858), ou seja, se as operárias que realizam tarefas nas regiões das trilhas de forrageamento também realizam tarefas nos montes de terra do mesmo ninho, e vice-versa. Mais especificamente, se existe fluxo de operárias entre as trilhas ou entre os montes; ou se existe fluxo trilha-monte, e vice-versa. Com base em experimentos em campo, usamos um sistema de marcação das operárias com diferentes cores para observações das tarefas nas entradas dos ninhos, nas trilhas de forrageamento e nos montes de terra de quatro colônias. Dois bioensaios foram realizados: 1- operárias marcadas foram devolvidas para os mesmos locais de origem (monte de terra e trilhas); 2- operárias marcadas foram devolvidas para locais de origem invertidos. As operárias marcadas foram fiéis às trilhas e aos montes no mesmo ninho. Não foi observada nenhuma operária marcada transitando de trilhas para monte e vice-versa em nenhum dos dois bioensaios.

**Palavras-chave:** Fidelidade espacial, *Atta laevigata*, colônias.

**SPATIAL FIDELITY OF WORKERS TO NEST ENTRANCES OF THE LEAF-CUTTER ANT  
*ATTA LAEVIGATA* (Smith, 1858)**

**Abstract**

Spatial fidelity is the recursive movement to the previously visited task site. In particular, in social insects such as leaf-cutter ants, an important aspect of work organization is the location of tasks in the colony. Numerous tasks that are essential for the survival of the colony are performed at specific locations in the nest. The connection between the tasks performed by the workers and their spatial organization is still poorly studied. It is unclear whether workers are faithful to the activities performed in foraging areas and mound regions in the same colony. In leaf-cutter ant colonies, research on spatial fidelity has been reported more specifically on activities performed on foraging trails. However, there are no reports in the literature of studies on fidelity in earth mounds. The present study was conducted to verify spatial fidelity in colonies of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith, 1858), i.e., if workers that perform tasks in the regions of the foraging trails also perform tasks on the mounds of the same nest, and vice versa. More specifically, whether there is worker flow between trails or between mounds; or whether there is trail-mound flow, and vice versa. Based on field experiments, we used a system of marking the workers with different colors for observations of tasks at nest entrances, foraging trails and mounds in four colonies. Two bioassays were conducted: 1- marked workers were returned to the same source sites (mound and trails); 2- marked workers were returned to inverted source sites. Marked workers were faithful to the trails and mounds in the same nest. No marked worker was observed transitioning from trails to mound and vice versa in either bioassay.

**Keywords:** spatial fidelity, *Atta laevigata*, colonies.



## Introdução

Uma colônia de insetos sociais é representada por grupo de indivíduos intimamente relacionados, vivendo e se reproduzindo como uma unidade, a qual possui morfologia, comportamento e organização interna próprias (Weeler 1928, Wilson 1971). A divisão de trabalho em colônias de insetos sociais permite maior eficiência na execução das tarefas (Hölldobler & Wilson 1990), sendo, portanto, fundamental para o sucesso ecológico e evolutivo de insetos como formigas, abelhas, vespas e cupins (Hölldobler & Wilson 1990, Fjerdingstad & Crozier 2006). A divisão de tarefas confere muitas vantagens como defesa contra predação e maior sucesso na alimentação (Plowes 2010).

Quanto às formigas, um aspecto marcante da organização do trabalho é o local de realização das tarefas na colônia (Pamminger et al. 2014). Mais especificamente em formigas-cortadeiras, inúmeras tarefas essenciais para a sobrevivência da colônia, como a coleta, degradação e implantação do substrato, cuidado com o fungo e a prole, e a escavação das câmaras subterrâneas, são realizadas em locais específicos do ninho (Wilson 1980, Forti 2011). Por exemplo, as larvas recebem cuidados apenas dentro das câmaras de cria no interior do ninho, e os recursos alimentares só podem ser detectados e coletados fora do ninho. Portanto, a organização espacial é um aspecto integrante da divisão do trabalho, pois, além de especializados em realizar uma tarefa essencial, os indivíduos também têm posição espacial específica para realização de uma tarefa (Wilson 1971, Hölldobler & Wilson 1990, Pamminger et al. 2014).

O movimento recorrente ao local de tarefa é frequentemente referido como fidelidade ao local (Quinet & Pasteels 1996, Richardson et al. 2017). Isso é frequentemente observado nas formigas, tanto dentro como fora do ninho (Jeanson 2012, Richardson et al. 2017). Este comportamento é ainda mais importante nas formigas-cortadeiras, cujas sociedades são consideradas entre as mais complexas, isto é, seus membros são intimamente relacionados e o sucesso da colônia depende da divisão do trabalho e da forte cooperação eles (Hölldobler & Wilson 1990, Brandão et al. 2011, Della Lucia et al. 2014).

As colônias de formigas-cortadeiras são formadas por indivíduos com alto grau de polimorfismo, em especial as do gênero *Atta*, cujas operárias exibem variação morfológica muito distinta e se especializam em várias tarefas não reprodutivas (Hölldobler & Wilson 1990, Robinson 1992, Souza et al. 2011). De modo geral, as tarefas internas das colônias de *Atta* spp. são realizadas em uma complexa estrutura subterrânea do ninho, composta por câmaras (painéis) e túneis (canais) escavados no solo pelas operárias. O exterior do ninho apresenta montes de terra solta, que resultam da escavação de grandes volumes de solo. Apresenta

ainda uma rede de trilhas fisicamente definida no solo, conhecidas como trilhas de forrageamento (Della Lucia & Moreira 1993, Della Lucia et al. 2014). Os montes de terra e as trilhas se comunicam com a parte interna do ninho por meio de diversos orifícios que permitem o trânsito das operárias (Della Lucia & Moreira 1993). Por meio das trilhas, as operárias acessam e transportam para o interior do ninho grande quantidade de material vegetal fresco para o cultivo do fungo simbiótico usado para alimentar a colônia (Shepherd 1982, Forti 2011, Shik et al. 2018).

De acordo com as necessidades e recursos disponíveis, cada casta pode responder de forma distinta às mudanças nas condições e necessidades da colônia (Wilson 1985). Por exemplo, o forrageamento depende da disponibilidade de operárias para executá-lo (Huang et al. 1994), da disponibilidade de materiais que serão forrageados (Jeanne 1986) e do número de operárias ativas em outra tarefa (Gordon 1987). Logo, a tarefa executada por um indivíduo na colônia não é definida apenas pelas características intrínsecas desse indivíduo, como idade e tamanho (Waddington & Hughes 2010), experiência individual (Ravary et al. 2007), fisiologia (Norman & Hughes 2016) e fatores genéticos (Smith et al. 2008), mas por um conjunto variável de interações entre os indivíduos e seus ambientes (Calabi 1988, Gordon 1989).

A divisão de trabalho nas colônias de insetos sociais também pode sofrer adaptações comportamentais como estratégias especializadas contra inimigos naturais (Oster & Wilson 1978, Parmentier et al. 2015, Lagrure et al. 2018), como as moscas Phoridae parasitoides. Várias espécies de moscas dessa família usam operárias adultas de formigas-cortadeiras como hospedeiros para completar o ciclo de vida (Disney 1994, Bragança 2011). Os ataques dos forídeos podem ocasionar adaptações comportamentais às colônias de formigas-cortadeiras, podendo ocasionar redução no número de operárias presentes nas trilhas de forrageamento, aumentando o tempo de corte e diminuindo a quantidade de material vegetal recortado (Bragança et al. 1998, Tonhasca et al. 2001).

A influência de forídeos parasitoides sobre as populações de formigas-cortadeiras discutidas por Souza et al. (2021) foi a principal motivação para este estudo. Nesse trabalho, foi verificado que as operárias coletadas nas trilhas de forrageamento (forrageadoras) são frequentemente mais parasitadas por forídeos em comparação com as operárias escavadoras, definidas como aquelas que transitam pelos orifícios dos montes de terra solta. No estudo do capítulo 1 as baixas taxas de parasitismo das escavadoras e ausência de parasitismo nessas operárias por certas espécies de forídeos foram discutidas em relação às interações comportamentais entre as operárias hospedeiras e seus parasitoides, bem como a correlação entre os hospedeiros e o tamanho dos parasitoides.

Estudos sobre fidelidade espacial em colônias de formigas-cortadeiras focaram apenas em atividades realizadas nas trilhas de forrageamento (Elizalde & Farji-Brener 2012, Cibils-Martina et al. 2017), não sendo relatados nos montes de terra solta dos ninhos. Os estudos sugerem que os indivíduos dentro de uma colônia tendem a retornar a áreas específicas no ninho (Sendova-Franks & Franks 1995) e que a fidelidade da trilha permite que as operárias transitem com mais eficiência pela trilha (Cosens & Toussaint 1985). Ao permanecerem em áreas não aleatórias do ninho, as operárias minimizam a distância percorrida entre as tarefas, aumentando assim a eficiência geral da colônia (Sendova-Franks & Franks 1995). Da mesma forma, espera-se que as operárias que realizam tarefas nos montes de terra apresentem os mesmos padrões de organização e sejam fieis à execução de tarefa as naquele espaço. Por exemplo, se a organização espacial surge em função da orientação dos indivíduos a tarefas especializadas (Hölldobler & Wilson 1990, Pamminer et al. 2014), pode-se as operárias apresentem tanto fidelidade espacial às trilhas quanto fidelidade às tarefas nos montes de terra.

Nossa pesquisa se concentra na formiga-cortadeira *Atta laevigata* (Smith, 1858), uma praga chave de várias culturas no Brasil e outros países da América do Sul (Oliveira et al. 2011, Della Lucia et al. 2014). Para o estudo, usamos um sistema de rastreamento com código de cores, por meio da marcação individual de formigas, para observação da presença das operárias enquanto realizavam tarefas nas trilhas de forrageamento e nos montes de terra. O presente trabalho teve como objetivo verificar a fidelidade espacial de operárias em colônias de *A. laevigata*, ou seja, se as operárias que realizam tarefas nas regiões das trilhas de forrageamento, também realizam tarefas no monte de terra do mesmo ninho, e vice-versa.

## **Materiais e Métodos**

### **Área de estudo**

O estudo foi realizado em quatro ninhos adultos da saúva *Atta laevigata* localizados na área urbana do município de Palmas (10°14'56''S e 48°19'29''W), estado do Tocantins, Brasil, entre os meses de julho e novembro de 2018. A cobertura vegetal da área consistia de cerrado *stricto sensu*, caracterizada por savanas abertas com manchas de matas de galeria (Ferreira 2005). O clima característico da região segundo a classificação de Köppen é do tipo Aw, com uma estação seca bem definida no inverno que vai de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril (Alvares et al. 2013).

Para avaliar a fidelidade espacial, as operárias foram coletadas nas regiões dos montes de terra e nas trilhas de forrageamento de cada um dos formigueiros.

## **Bioensaio 1 - Operárias marcadas devolvidas para os mesmos locais de onde foram coletadas**

### **Coleta de operárias**

Este bioensaio foi realizado entre os meses de julho a setembro de 2018. Em cada um dos quatro ninhos, as coletas das operárias foram realizadas nas entradas de dois montes de terra solta e de duas trilhas de forrageamento de forma arbitrária, escolhendo-se os pontos bem delimitados e de maior atividade das operárias, totalizando dezesseis locais de coleta. A cada vez e em cada um dos locais, foram coletados aproximadamente 160 indivíduos (Figuras 1). As coletas foram realizadas no período noturno, iniciadas por volta das 19:00h. Nos montes de terra, foram coletadas operárias que estavam transportando solo escavado nos olheiros de escavação, e nas trilhas, foram coletadas as operárias que estavam transitando a uma distância máxima aproximada de 12 metros a partir de cada olheiro. As formigas foram coletadas aleatoriamente com auxílio de pinça de metal flexível e armazenadas em pote plástico (9 x 14 cm) e transportadas imediatamente para o Laboratório de Entomologia, Edifício de Coleções Biológicas da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Palmas, Tocantins, Brasil. No laboratório, na mesma noite de coleta, todas as formigas coletadas foram marcadas individualmente com um pequeno ponto com tinta atóxica de cores diferentes na região do tórax com um palito, de modo que as formigas coletadas em cada local, tivesse seu próprio código de cor. Todas as formigas marcadas foram contadas e devolvidas para os mesmos locais de onde foram coletadas (Figura 1A). O número de operárias coletadas e marcadas nos montes de terra variou de 82 a 193, e nas trilhas variou de 126 a 230.

### **Observação da presença das operárias marcadas e liberadas**

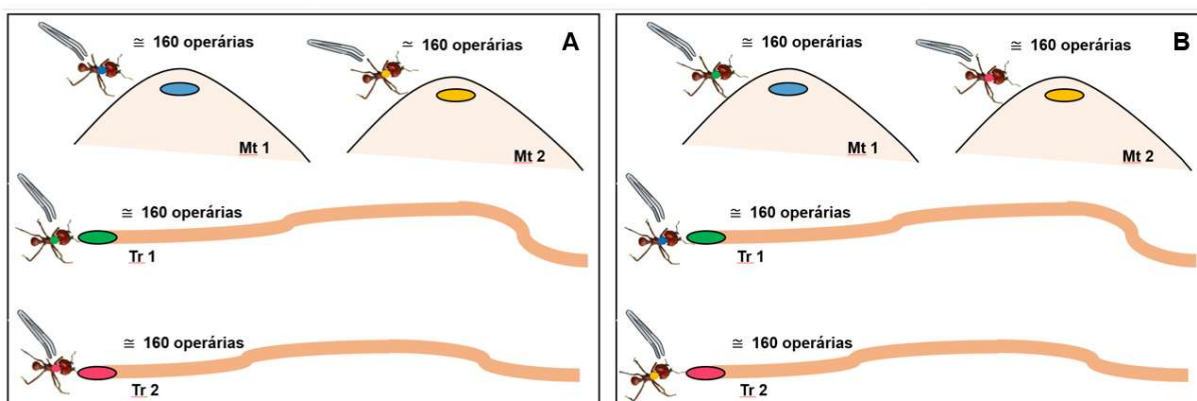
A observação das operárias marcadas ocorreu nos mesmos horários em que foram coletadas (~ 19 h), em diferentes tempos após suas devoluções à colônia de origem (24, 48 e 72 h). Em cada dia de observação, foram contabilizadas todas as operárias marcadas que estavam presentes nos dois montes de terra e transitando nas duas trilhas de

cada ninho. Em cada dia de observação, e em cada local, contamos o número de operárias marcadas, três vezes em intervalos de 10 minutos entre cada contagem somando 20 minutos de observação.

### Bioensaio 2 - Operárias marcadas liberadas em locais contrários de onde foram coletadas

Este bioensaio foi realizado nos meses de setembro a novembro de 2018. O número de operárias coletas e marcadas nos montes de terra variou de 101 a 152, e nas trilhas variou de 152 a 290.

No bioensaio 2, os procedimentos de coleta, marcação e contagem das operárias foram similares aos realizados no bioensaio 1. No entanto, as operárias marcadas foram liberadas em locais contrários de onde foram coletadas, ou seja, operárias coletadas nos montes de terra foram realocadas para as trilhas do mesmo ninho, e vice-versa (Figura 1B). A observação da presença das operárias marcadas e liberadas neste bioensaio foi igual à descrita para o bioensaio 1, com a diferença que foi observado se as operárias liberadas em local diferente retornaram aos seus locais de coleta.



**Figura 1. Representação esquemática dos ninhos de *A. laevigata* durante os bioensaios 1 e 2.** Dois orifícios (cores azul e amarelo) nos montes de terra solta (Mt1 e Mt2) e dois orifícios de abastecimento (cores verde e vermelho) nas trilhas de forrageamento (Tr1 e Tr2). **A:** coleta e liberação das formigas marcadas aos mesmos locais de coleta; **B:** coleta e liberação das formigas marcadas em locais contrários de onde foram coletadas.

## Resultados

### Bioensaio 1

O número médio de operárias marcadas que permaneceram no mesmo local onde foram liberadas foi maior em comparação às observadas transitando entre trilhas ou monte, tanto nas trilhas quanto nos montes de terra (Tabela 1). Entre a média das formigas liberadas nas trilhas (184,4) o número médio de operárias que permaneceram no mesmo local onde foram liberadas foi semelhante durante os três dias de observação. Entre a média das operárias liberadas nos de terra solta (134,3) e que permaneceram no mesmo local de onde foram liberadas, o número médio de operárias nos três dias de observações após a liberação também foram quase os mesmos. Não foi observada nenhuma operária marcada transitando de trilhas para monte e vice-versa (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de operárias (média  $\pm$  desvio padrão) de *A. laevigata* coletadas, marcadas e liberadas nos mesmos locais da coleta.

Observação das operárias	Formigas nas trilhas (dia após liberação)			Formigas nos montes (dia após liberação)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
<b>Permaneceram no local de liberação</b>	25,96 $\pm$ 6,93	20,88 $\pm$ 6,27	20 $\pm$ 6,53	7,12 $\pm$ 2,62	7,08 $\pm$ 5,4	5,5 $\pm$ 5,41
<b>Transitaram entre trilhas ou montes</b>	0,17 $\pm$ 0,82	2,88 $\pm$ 7,3	2,58 $\pm$ 5,7	0	1,67 $\pm$ 2,44	0,625 $\pm$ 1,64
<b>Transitaram de trilha para monte e vice-versa</b>	0	0	0	0	0	0

## Bioensaio 2

No bioensaio 2, tanto nas trilhas como nos montes de terra solta, o número médio de operárias marcadas que retornaram ao local de coleta foi maior em comparação às que permaneceram no local de liberação (Tabela 2). Entre a média das operárias liberadas nas trilhas (118,13) e que retornaram ao local de coleta, o número médio de formigas observadas ao longo dos três dias foi semelhante. Entre a média das liberadas nos montes (201,3) que retornaram ao local da coleta, o número médio das operárias observados em três dias após a liberação também foi semelhante. Das que permaneceram no local de liberação, somente foram vistas transitando no primeiro dia de observação após a liberação, tanto nas trilhas como nos montes, não sendo mais observadas nos dias seguintes. Não foi observada nenhuma operária marcada transitando entre trilha ou monte diferente nem de trilhas para monte ou vice-versa (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de operárias (média  $\pm$  desvio padrão) de *A. laevigata* coletadas, marcadas e liberadas nos locais diferentes da coleta.

Observação das operárias	Formigas nas trilhas (dia após liberação)			Formigas nos montes (dia após liberação)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
Retornaram ao local de coleta	16,5 $\pm$ 7,64	17,88 $\pm$ 5,23	15,62 $\pm$ 4,84	7,54 $\pm$ 4,41	5,87 $\pm$ 2,77	4,04 $\pm$ 2,47
Permaneceram no local de liberação	0,58 $\pm$ 0,97	0	0	0,29 $\pm$ 0,55	0	0
Transitaram entre trilhas ou montes	0	0	0	0	0	0
Transitaram de trilha para monte e vice-versa	0	0	0	0	0	0

## Discussão

Nossos resultados fornecem evidências claras de padrões de distribuição espacial das operárias em colônias da formiga-cortadeira *A. laevigata*. Nas entradas dos ninhos das quatro colônias examinadas e durante o período de observação, as operárias se restringiram aos locais de coletas, demonstrando fidelidade espacial na realização dessas tarefas. Ao retornar a áreas específicas do ninho (zona de fidelidade espacial), os indivíduos de uma colônia podem minimizar a distância percorrida entre as tarefas, aumentando assim a eficiência geral no nível da colônia (Sendova-Franks & Franks 1995). Esta habilidade foi observada em muitas espécies de formigas como *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Kitayama et al. 2002), *Camponotus modoc* (Wheeler) (Tilles & Wood 1986) e *Lasius fuliginosus* Latr.) (Quinet & Pasteels 1996).

Em nosso estudo observamos que as operárias são fieis a entradas dos ninhos, tanto durante as atividades de forrageamento nas trilhas, como durante as atividades de escavação nos montes de terra. Das operárias marcadas e devolvidas para os mesmos locais onde foram coletadas (Bioensaio 1), nos três dias de observações, o número médio de operárias marcadas que permaneceram nos locais de liberação foi maior do que às observadas transitando entre trilhas ou montes. Esse resultado corrobora estudos sobre a organização espacial das colônias, em que todas as operárias marcadas individualmente não se movem para todos os lugares do ninho, mas sim têm zonas de fidelidade espacial (Sendova-Franks & Franks 1995, Jandt & Dornhaus 2009). Do mesmo modo, as operárias marcadas devolvidas para locais contrários de onde foram coletadas (Bioensaio 2), tanto nas trilhas como nos montes de terra, o número médio de operárias marcadas que retornaram ao local de coleta foi maior em comparação com as que permaneceram no local de liberação. De modo semelhante, em estudos de fidelidade à trilha, Elizalde & Farji-Brener (2012) concluíram que as formigas movidas das trilhas de origem para outras trilhas, retornaram às trilhas de origem em 24 horas dentro da colônia, sugerindo que algum tipo de pista, seja visual, olfativo ou outro, orienta os trabalhadores para uma trilha específica (Elizalde & Farji-Brener 2012). Em estudo recente, Lehue et al. (2020) verificaram alta fidelidade espacial de *Myrmica rubra* (L.) nas entradas originais dos ninhos. Em formiga-cortadeira *Acromyrmex lobicornis* Emery, segundo estudos de Elizalde & Farji-Brener (2012), em 62% das trilhas analisadas, as formigas mostraram uma preferência significativa pela trilha que usavam anteriormente. Demonstrando que a fidelidade das formigas foi relativamente importante, sugerindo a importância da experiência anterior.



Embora a fidelidade espacial nas trilhas de forrageamento seja bem documentada em várias espécies de insetos sociais (Cibils-Martina et al. 2017, Elizalde & Farji-Brener 2012, Lehue et al. 2020), até onde se conhece não há estudos sobre fidelidade em orifícios dos montes de terra. Nosso trabalho fornece a primeira evidência de fidelidade de operárias de formigas-cortadeiras *A. laevigata* em orifícios dos montes de terra. Este estudo mostra que as operárias possuem fidelidade espacial tanto as atividades realizadas nas trilhas, como as realizadas nos montes de terra. E as operárias que realizam tarefas nas regiões das trilhas de forrageamento, não realizam tarefas no monte de terra do mesmo ninho e vice-versa. Também verificamos que não existe fluxo de operárias entre as trilhas ou entre os montes; e de trilha para monte, e vice-versa. Além disso, mesmo quando as formigas foram realocadas aos locais diferentes aos quais foram coletadas, sempre voltavam aos locais de coleta, demonstrando fidelidade espacial das operárias.

## Referências

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's Climate Classification Map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

BRAGANÇA, M. A. L.; TONHASCA, A.; LUCIA, T. Reduction in the foraging activity of the leaf cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora* sp. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 89, n. 3, p. 305-311, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00413.x>

BRAGANÇA, M. A. L. Parasitoides de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA T. M. C., editor. **Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, p. 321-43, 2011.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. Editor. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, p. 27-48, 2011.

CALABI, P. **Behavioral flexibility in Hymenoptera: a re-examination of the concept of caste**. In: TRAGER, J. C., (ed). *Advances in Myrmecology*. ed J C Trager. Brill., p. 237-245, 1988.

CIBILS-MARTINA, L.; ELIZALDE, L.; FARJI-BRENER, A. G. Traffic rules around the corner: walking of leaf-cutting ants at branching points in trunk trails. **Insectes Sociaux**, v. 64, p. 549-555, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0576-5>

COSENS, D.; TOUSSAINT, N. An experimental study on the foraging strategy of the wood ant *Formica aquilonia*. **Animal Behaviour**, v. 33, p. 541-552, 1985.

DELLA LUCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O. Caracterização dos ninhos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. editor. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, p. 32-42, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GRANDRAL, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ant peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, p. 14-23, 2014. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>

DISNEY, R. H. L. **Scuttle flies: the Phoridae**. Chapman and Hall, London. 1994.

ELIZALDE, L; FARJI-BRENER, A. G. To be or not to be faithful: flexible fidelity to foraging trails in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*. **Ecological Entomology**, v. 37, p. 370-376, 2012.

FERREIRA, I. M. **Bioma Cerrado: caracterização do Subsistema de Vereda**. Observatório Geográfico de Goiás, v.1, n. 1, p. 1-13, 2005.

FJERDINGSTAD, E. J.; CROZIER, R. H. The evolution of worker caste diversity in social insects. **The American Naturalist**, v. 167, p. 390-400, 2006. <https://doi.org/10.1086/499545pmid:16673347>

FORTI, L. C. Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, UFV, p. 102-125, 2011.

GORDON, D. M. Group-level dynamics in harvester ants: young colonies and the role of patrolling. **Animal Behaviour**, v. 35, p. 833-843, 1987.

GORDON, D. M. **Caste and change in social insects**. In: HARVEY, P.; PARTRIDGE, L. (eds) Oxford Surveys in Evolutionary Biology, vol 6. Oxford University Press, Oxford, p. 56-72, 1989.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Harvard University Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts. 732 p. 1990.

HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E.; BORST, D. W. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 174, p. 731-739, 1994.

JANDT, J. M.; DORNHAUS, A. Spatial organization and division of labour in the bumblebee *Bombus impatiens*. **Animal Behaviour**, v. 77, p. 641-651, 2009.

JEANNE, R. L. The evolution of the organization of work in social insects. **Monitore Zoologico Italiano - Italian Journal of Zoology**, v. 20, p. 119-133, 1986. <https://doi.org/10.1080/00269786.1986.10736494>

JEANSON, R. Long-term dynamics in proximity networks in ants. **Animal Behaviour**, v. 83, p. 915-923, 2012.

KITAYAMA, K.; GRAMACHO, M.G.; HAY, J. D.; PIC, M. Foraging site fidelity of *Atta sexdens* (Hymenoptera-Formicidae) in a laboratory colony. **Sociobiology**, v. 39, p. 423-428, 2002.

LAGRUE, C.; MACLEOD, C. D.; KELLER, L.; POULIN, R. Caste ratio adjustments in response to perceived and realised competition in parasites with division of labour. **Journal of Animal**, v. 87, p. 1429-39, 2018.

LEHUE, M.; DETRAIN, C.; COLLIGNON, B. Nest entrances, spatial fidelity, and foraging patterns in the red ant *Myrmica rubra*: a field and theoretical study. **Insects**, v. 11, p. 317, 2020. <https://doi.org/10.3390/insects11050317>

NORMAN, V.C.; HUGHES, W. O. H. Behavioural effects of juvenile hormone and their influence on division of labour in leaf-cutting ant societies. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 8-11, 2016. <https://doi.org/10.1242/jeb.132803>

OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA T. M. C., editor. **Formigas cortadeiras**: da biologia ao manejo. Viçosa: Editora UFV. p. 400-19, 2011.

OSTER, G. F.; WILSON, E. O. **Caste and Ecology in Social Insects**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, p. 352, 1978.

PAMMINGER, T.; FOITZIK, S.; KAUFMANN, K. C.; SCHÜTZLER, N.; MENZEL, F. Worker personality and its association with spatially structured division of labor. **PLoS One**, v. 9:e79616, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079616>

PARMENTIER, T; DEKONINCK, W.; WENSELEERS, T. Context-dependent specialization in colony defence in the red wood ant *Formica rufa*. **Animal Behaviour**, v.; 103, p. 161-167, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.02.023>

PLOWES, N. An Introduction to Eusociality. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 7, 2010.

QUINET, Y.; PASTEELS, J. M. Spatial specialization of the foragers and foraging strategy in *Lasius fuliginosus* (Latreille) (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 43, p. 333-346, 1996.

RAVARY, F; LECOUTEY, E.; KAMINSKI G.; CHFÂLINE, N. JAISSON, P. Individual experience alone can generate lasting division of labor in ants. **Current Biology**, v. 17, p. 1308-1312, 2007.

RICHARDSON, T. O.; GIUGGIOLI, L.; FRANKS, N. R.; SENDOVA-FRANKS, A. B. Measuring site fidelity and spatial segregation within animal societies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 965-975, 2017. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12751>

ROBINSON, G. E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review Entomology**, v. 37, p. 637-665, 1992. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Ento.37.1.637>

SENDOVA-FRANKS, A. B.; FRANKS, N. R. Spatial relationships within nests of the ant *Leptothorax unifasciatus* (Latr.) and their implications for the division of labour. **Animal Behaviour**, v. 50, p. 121-136, 1995.

SHEPHERD, J. D. Trunk trails and the searching strategy of a leaf-cutter ant, *Atta colombica*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 11, p. 77-84, 1982.

SHIK, J. Z.; RYTTER, W.; ARNAN, X.; MICHELSEN, A. Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using stable isotopes. **Ecology**, v. 99, p. 1999-2009, 2018.

SMITH, C. R.; TOTH AL, SUAREZ, A. V.; ROBINSON, G. E. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 735-748, 2008.

SOUZA, D. J.; SANTOS, J. F. L.; DELLA LUCIA, T. M. C. Organização social das formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C., (Ed.), **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, p. 126-140, 2011.

SOUZA, M. L. O.; OLIVEIRA, R. J.; BRAGANÇA, M. A. L.; SOUZA, D. J.; SAMUELS, R. I. Differential parasitism by four species of phorid flies when attacking three worker castes of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith, 1858). **PLoS One**. 16(5): e0250973, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250973>.

TILLES, D. A.; WOOD, D. L. Foraging behaviour of the carpenter ant, *Camponotus modoc* (Hymenoptera: Formicidae), in a giant sequoia forest. **The Canadian Entomologist**, v. 118, p. 861-867, 1986.

TONHASCA, A. JR.; BRAGANÇA, M. A. L.; ERTHAL, JR. M. Parasitism and biology of *Myrmomicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 48, p. 154-158, 2001.

WADDINGTON, S. J.; HUGHES, W. O. H. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*: the role of worker size, age and plasticity. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 64, p. 1219-1228, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-0936-x>

WEELER, W. M. **The social insects: their origin and evolution**. London Kegan Paul, Thench, Trubner and Co. Ltd, p. 378, 1928.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1971.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in *Atta sexdens*. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 7, p. 143-156, 1980.

WILSON, E. O. Between-caste aversion as a basis for division of labor in the ant *Pheidole pubiventris* (Hymenoptera, Formicidae). **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 17, p. 3537, 1985. <https://doi.org/10.1007/Bf00299425>

## CONCLUSÃO

Esse estudo proporciona informações novas e relevantes sobre o conhecimento das relações entre as formiga-cortadeira *Atta laevigata* e moscas Phoridae, evidenciando o potencial desses parasitoides para o biocontrole dessas formigas. Além disso, neste estudo, são relatadas observações acerca da fidelidade espacial de operárias às entradas de ninhos.

Quatro espécies de forídeos foram observadas parasitando *A. laevigata* nas dezoito colônias dos três locais estudados, com taxa de parasitismo total de 3,17%. Destes, 1,43% estavam parasitados por *A. attophilus*, 0,74% por *M. grandicornis*, 0,55% por *E. erthali* e 0,45% por *A. vicosae*.

A taxa de parasitismo das operárias nas trilhas (forrageadores + soldados) (5,23%) foi maior do que o parasitismo das operárias dos montes de terra (escavadoras + soldados) (0,18%).

Entre as castas operárias, o parasitismo das forrageadoras foi 30 vezes maior do que o observado para as escavadoras.

As forrageiras foram parasitadas pelas quatro espécies de forídeos, com a maior proporção de parasitismo observada para *A. attophilus*, seguido por *M. grandicornis*.

Esta é a primeira vez que soldados e escavadoras de *A. laevigata* mostraram estar parasitados por forídeos. A espécie *E. erthali* foi o único parasitoide associado aos soldados, com apenas dez que haviam parasitados as operárias das trilhas e dois as nos montes de terra. Apenas por duas espécies de forídeos parasitaram as escavadoras (*M. grandicornis* e *E. erthali*). Com apenas quinze indivíduos parasitados por *M. grandicornis* e dez por *E. erthali*.

As maiores operárias coletadas nas colônias de *A. laevigata* foram da casta de soldados, sendo os soldados dos montes de terra maiores do que os das trilhas, as operárias forrageadoras maiores do que as escavadoras.

As operárias com maiores larguras de cápsula cefálica foram preferencialmente parasitadas por *E. erthali*; as operárias ligeiramente menores foram parasitadas por *A. attophilus* e as menores formigas foram parasitadas por *M. grandicornis*.

Os forídeos que emergiram dos maiores e menores hospedeiros, ou seja, *E. erthali* e *M. grandicornis* respectivamente, também foram as maiores e menores moscas ao considerar o comprimento médio das asas como parâmetro.

As operárias de *A. laevigata* mostraram serem fiéis às trilhas e aos montes no mesmo ninho.

Nas relações entre hospedeiros e parasitoides, o conhecimento a respeito do parasitismo de moscas Phoridae, do comportamento das operárias de *A. laevigata* na presença do parasitoide servirão de subsídio para gerar suporte para a elaboração e

condução de novos projetos voltados ao controle das formigas-cortadeiras. A coexistência das quatro espécies de forídeos parasitando diferentes castas, de diferentes tamanhos, poderá impactar, de maneira negativa, as atividades normais da colônia, podendo aumentar a mortalidade de *A. laevigata*. É importante manter a biodiversidade natural nos ambientes, pois cada espécie de forídeo terá uma influência nas colônias.

A espécie *A. attophilus* é uma das espécies mais promissoras para uso em programas de controle biológico de formigas-cortadeiras. No entanto, também é importante considerar a variedade de espécies de forídeos que, como um todo, exercem um maior efeito sobre as populações de formigas-cortadeiras e perturbam o comportamento normal de forrageamento.

## APÊNDICE

(Artigo publicado)

SOUZA, M. L. O.; OLIVEIRA, R. J.; BRAGANÇA, M. A. L.; SOUZA, D. J.; SAMUELS, R. I. Differential parasitism by four species of phorid flies when attacking three worker castes of the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith, 1858). **PLoS One**. 16(5): e0250973, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250973>.