

ILKA MARIA FERNANDES SOARES

**BIOLOGIA E PARASITISMO SOCIAL EM *Acromyrmex*
subterraneus subterraneus Forel, 1893 E *Acromyrmex ameliae*
Souza et al., 2007**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2007

ILKA MARIA FERNANDES SOARES

**BIOLOGIA E PARASITISMO SOCIAL EM *Acromyrmex*
subterraneus subterraneus Forel, 1893 E *Acromyrmex ameliae* Souza et
al., 2007**

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

APROVADA: 15 de junho de 2007.

**Prof. Jacques Hubert
Charles Delabie
(Co-orientador)**

**Prof. Lúcio Antônio de Oliveira
Campos
(Co-orientador)**

Prof. José Eduardo Serrão

Dr^a. Riviane Rodrigues da Hora

**Prof^a. Terezinha Maria Castro Della Lucia
(Orientadora)**

Aos meus queridos pais, Ordálio e Inácia pelo
apoio em todos os momentos
DEDICO

A Deus, pela vida e iluminação.
AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Animal pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade do Estado da Bahia pela liberação e concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Terezinha M. C. Della Lucia, não apenas pela orientação, mas também por compartilhar dores e alegrias profissionais e pessoais.

Ao Dr. Jacques H. C. Delabie por ser sempre o meu “orientador” no mundo da Mirmecologia.

Ao Prof. Lúcio Campos por sua amizade, paciência e acima de tudo por acreditar no trabalho e em mim.

Ao Danival J. de Souza pelas sugestões ao longo do trabalho.

À Alice Pereira não apenas por sua ajuda e sugestões na realização dos trabalhos, mas por desfrutar comigo das alegrias e dificuldades de cada experimento.

Ao Sr. Manoel pela amizade e fundamental colaboração nas coletas e viabilização de alguns experimentos.

Aos Professores Eduardo Serrão e Lino Neto que não apenas disponibilizaram seus laboratórios, mas também por suas sugestões e ensinamentos.

Ao Ronaldo R. Júnior, Ana Paula Albano, Leandro Souto, Hamilton e ao Prof. Raul N. C. Guedes pela ajuda na parte estatística.

Aos Professores Ricardo Della Lucia e Mara Garcia Tavares e seus estagiários e ao Dr. Sérgio Tinoco pela cooperação na realização de experimentos.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Entomologia, pela contribuição à minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de curso pela convivência e amizade.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Entomologia (UFV), Maria Paula A. da Costa, pela paciência, compreensão, ajuda e amizade durante todos estes anos.

Aos amigos Gabriela e Fadini por me acolherem quando aqui cheguei.

Aos amigos Ethel, Fabrícia, Marcy, Marquinho e Zé Milton que tornaram mais fáceis a vida fora da minha cidade.

Ao pessoal do Insetário, Ênio, Lucas, Márcio, Marluce, Myriam, Robson, Wesley, Sr. Antônio, Lélis e Sr. José Cláudio pelo companheirismo e colaboração.

A Paulo Roberto D. Lopes cuja palavra “obrigada” é insuficiente para expressar meus sinceros agradecimentos.

Aos meus irmãos Ilma e Júnior e meus sobrinhos Vitória, Henrique e Júlia pelo carinho.

Aos amigos e colegas da Bahia, especialmente: Valéria, Carlos Alberto, Adriana Anadir, Josilda, Joselma, Edílson, Fátima Lúcia, Wbaneide e Janete Jane que mesmo distante tornaram-se presentes em minha vida, pelas palavras de incentivo, apoio e orações.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram não apenas para a realização deste trabalho, mas para o meu crescimento pessoal.

BIOGRAFIA

ILKA MARIA FERNANDES SOARES, filha de Ordálio Fernandes da Silva e Inácia Soares do Nascimento Silva, nasceu em Macururé-BA , em 30 de agosto de 1972.

Em 1995, concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Feira de Santana (BA).

Em 1993 ingressou, através de concurso público como Professora da Rede Estadual de Ensino (BA), onde trabalhou até 2003.

Em 1996, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia na Universidade Federal da Bahia, defendendo tese em novembro de 1998.

De abril de 1996 até abril de 1997 foi Professora Substituta da Universidade Estadual de Feira de Santana (BA), lecionando, para a graduação, a disciplina Zoologia de Invertebrados II.

Em agosto de 1998 foi aprovada no concurso público para Biólogo da Universidade Estadual de Feira de Santana (BA), onde trabalhou até agosto de 1999 no Laboratório de Entomologia, quando foi aprovada no concurso público para Professor Assistente da Universidade do Estado da Bahia (campus de Paulo Afonso), para lecionar Zoologia, onde trabalha até o momento.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
CAPÍTULO 1: Metapleural glands of the social parasite <i>Acromyrmex meliae</i> and of its host <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> (Hymenoptera: Formicidae: Attini).....	28
Summary.....	29
Introduction.....	30
Materials and Methods.....	30
Results.....	32
Discussion.....	33
References.....	34
CAPÍTULO 2: Biologia reprodutiva comparada da parasita social <i>Acromyrmex meliae</i> e de sua hospedeira <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> (Hymenoptera: Formicidae: Attini).....	41
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	45
Discussão.....	47
Referências bibliográficas.....	50
CAPÍTULO 3: Structure of the Spermatozoa of <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> and of its social parasite <i>Acromyrmex meliae</i> (Hymenoptera:Formicidae:Attini).....	57

Summary.....	58
Introduction.....	59
Material and Methods.....	59
Results.....	60
Discussion.....	60
References.....	62
 CAPÍTULO 4: Aceitação de rainhas da parasita social <i>Acromyrmex meliaie</i> por colônias hospedeiras de <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> (Hymenoptera: Formicidae) e discriminação da prole em colônia parasitadas.....	 67
Introdução.....	67
Material e Métodos.....	69
Resultados.....	74
Discussão.....	78
Referências bibliográficas.....	82
3. DISCUSSÃO GERAL.....	91
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	94

RESUMO

SOARES, Ilka Maria Fernandes, D. Sc. Universidade Federal de Viçosa, junho de 2007. **Biologia e parasitismo social em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 e *Acromyrmex ameliae* Souza et al, 2007.** Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-orientadores: Jacques Hubert Charles Delabie e Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

Parasitismo social é a coexistência, em um mesmo ninho, de duas espécies de insetos sociais, uma das quais é parasiticamente dependente da outra. Existem vários tipos de parasitismo social, sendo o inquilinismo o mais derivado. Nesse tipo de relação, as espécies parasitas dependem inteiramente da espécie hospedeira. Operárias podem estar presentes, mas normalmente, em pequeno número e não desempenham todas as funções necessárias para a manutenção da colônia. *Acromyrmex ameliae*, uma parasita social de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e de *Acromyrmex subterraneus brunneus*, foi descoberta em 2003 em áreas de eucalipto na Fazenda Itapoã (V & M Florestal Ltda) em Paraopeba-MG. Estudos posteriores sobre essa espécie parasita estão descritos neste trabalho que visou compreender aspectos biológicos e comportamentais entre a hospedeira e a parasita de modo a contribuir para o conhecimento e a compreensão da evolução do comportamento e parasitismo sociais. *A. ameliae* é uma inquilina que apresenta a casta das operárias menores que diferem das operárias hospedeiras da mesma casta por apresentarem corpo rugoso e mais piloso, olhos proeminentes, além de terem a distância da bulla até o espiráculo maior que a das operárias hospedeiras. Com glândulas metapleurais menores que as operárias hospedeiras, é possível que, as operárias parasitas sejam mais susceptíveis a patógenos. As rainhas parasitas são menores que as operárias maiores da hospedeira e a presença delas, assim como das suas operárias, não interferem de modo significativo na produção de ovos, mas inibem a produção de sexuais da subespécie hospedeira. Espermatozoides são diferentes nas duas espécies. *Acromyrmex subterraneus subterraneus* possui espermatozoides e núcleos espermáticos mais longos (105 μm e 9,5 μm , respectivamente) que *A. ameliae* (91,3 μm e 7 μm , respectivamente).

O diâmetro do espermatozóide da subespécie hospedeira é constante, exceto no final quando afila abruptamente. Já na espécie parasita o núcleo afila abruptamente a partir do terço anterior. Tanto as operárias hospedeiras quanto as operárias parasitas atendem aos imaturos das duas espécies. A espécie hospedeira tem acentuada preferência por imaturos coespecíficos companheiros de ninho. Mas não há preferência da operária por uma larva companheira de ninho parasita e outra coespecífica, não companheira. Quanto às operárias parasitas, estas têm nítida atratividade por larvas coespecíficas em relação às hospedeiras quando estas não são oriundas do mesmo ninho. No entanto, quando as larvas são provenientes da mesma colônia, elas não apresentaram discriminação. A entrada e permanência da rainha parasita no ninho estão relacionadas à fecundidade e ao tempo de invasão da colônia. A glândula de Dufour está associada a este processo, uma vez que secreções de fêmeas parasitas virgens não exercem nenhum efeito atrativo sobre operárias, porém as de fêmeas fecundadas são atrativas às operárias das duas espécies. Essas secreções também devem ser importantes na manutenção do parasitismo, uma vez que as da rainha parasita são atrativas às operárias das duas espécies e as da rainha hospedeira só atraem as operárias coespecíficas. Rainhas hospedeiras provenientes de colônias não parasitadas são mais agressivas com rainhas de *A. ameliae* do que rainhas oriundas de colônias parasitadas. Rainhas hospedeiras apresentaram mais hidrocarbonetos cuticulares que rainhas parasitas, no entanto, resultados contrários foram encontrados nas operárias e larvas, implicando em maiores investigações para esclarecimentos sobre o assunto.

ABSTRACT

SOARES, Ilka Maria Fernandes, D. Sc. Universidade Federal de Viçosa, June, 2007. **Biology and social parasitism in *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 and *Acromyrmex ameliae* Souza et al, 2007.** Adviser: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-Advisers: Jacques Hubert Charles Delabie and Lúcio Antônio de Oliveira Campos.

Social parasitism is the coexistence in the same nest of two species of social insects, one of which is parasitically dependent on the other. There are several types of social parasitism, the inquilinism being the most derived. In this relationship, the parasitic species depend entirely on the host. Workers may be present but usually in small numbers, and do not perform all the tasks necessary for colony maintenance. *Acromyrmex ameliae*, a social parasite of *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, and of *Acromyrmex subterraneus brunneus*, was discovered in 2003 in eucalypt plantations located in the Itapoã (V&M Florestal Ltda.) Farm, in Paraopeba, MG. Further studies of this parasite are described in this work, dealing with biological and behavioral aspects of the association host-inquiline and its evolution. *Acromyrmex ameliae* is an inquiline that has minor workers, differing from the host workers by having a rugous, hairy body, prominent eyes and a bulla-spiracle distance that is larger than that of the host workers. Having also smaller metapleural glands, it is possible that they are more susceptible to pathogens than host workers. The parasite queens are smaller than the host workers and their presence, as well as of their workers, do not interfere significantly in the egg production but inhibit the production of sexuals of the host subspecies. Spermatozoa are different in both species. *Acromyrmex subterraneus subterraneus* has spermatozoa and spermatid nuclei longer (105 μm and 9.5 μm respectively) than *A. ameliae* (91.3 μm and 7 μm , respectively). Spermatozoa diameter of the host is constant, except at its end, when it tapers abruptly. In the parasite, the nuclei thins abruptly from the anterior third. Both host and parasite workers tend to the immatures of both species although the host workers do prefer co-specific immature nestmates. Larvae from the same nest are not discriminated. Host workers are attracted by larvae of their species, if they are not from the same nest. However, if larvae are from the same colony, there is no preference. The entrance and permanence of a parasite queen in a host nest are related to its

fecundity and to the lapse of time since colony invasion. The secretions of the Dufour gland seem to be associated to the invasion and acceptance process, because secretions from virgin females do not have an attractive effect of workers but those of fertilized queens are attractive to workers of both species. These secretions must be important for maintenance of parasitism; those of the parasite attract both species while those of the host queen attract only host workers. Host queens taken from non-parasitized colonies are more aggressive toward queens of *A. ameliae* than to queens from parasitized nests. Host queens showed larger quantities of cuticular hydrocarbons than parasite queens; however, opposite results were found for workers and larvae. This deserves further investigation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As formigas, com aproximadamente 11.000 espécies descritas em uma única família (Formicidae), são de grande importância ecológica e econômica, especialmente as formigas cortadeiras (Hölldobler & Wilson, 1990; Bolton, 1995). Estas pertencem à subfamília Myrmicinae e estão classificadas dentro da tribo Attini que comporta os seguintes gêneros: *Acromyrmex*, *Atta*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Mycetarotes*, *Mycetasoritis*, *Mycetophylax* e *Mycetagroicus* (Bolton, 1994; Brandão & Mayhé-Nunes, 2001).

As formigas são insetos eusociais por apresentarem divisão em castas, cuidados cooperativos com a prole e sobreposição de gerações (Wilson, 1971). São os insetos mais abundantes em regiões intertropicais, mantendo estreitas relações com o ambiente. Algumas formigas se alimentam de sementes, e outras ajudam na dispersão de espécies vegetais (Handel & Beattie, 1990), outras predam outros insetos, inclusive outras espécies de formigas, ajudando no controle populacional; há ainda aquelas que são necrófagas (Hölldobler & Wilson, 1990). Algumas espécies protegem plantas, se alimentando nos nectários extraflorais ou usam espaços nos troncos de galhos ou folhas para a construção dos seus ninhos e há ainda aquelas que necessitam de plantas indiretamente para o cultivo de fungo, do qual se alimentam (Rico-Gray et al., 2004). Entre estas podem-se destacar as espécies cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Hölldobler & Wilson, 1990).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são os herbívoros dominantes na região neotropical, consumindo muito mais plantas do que outros grupos com diversidade taxonômica comparável (Hölldobler & Wilson, 1990). Eles são os grupos mais importantes economicamente por utilizarem folhas, caules e flores frescas de uma ampla variedade de espécies vegetais utilizadas pelo homem para o cultivo do fungo (Fowler et al., 1991), trazendo grandes danos econômicos desde o século XVI no Brasil (Mariconi, 1970).

As formigas cortadeiras possuem um sistema de castas com milhares de indivíduos com divisão de trabalho (polietismo), acompanhado por um polimorfismo. As fêmeas e machos alados diferem quanto ao tamanho, sendo

aquelas maiores especialmente na cabeça e no gáster. A rainha tem o abdome mais volumoso que o das operárias e também não tem asas. Um ninho de *Acromyrmex*, por exemplo, pode ter uma ou várias rainhas. As operárias apresentam tamanhos variados e desempenham diferentes funções. Não há uma nomenclatura própria para os inúmeros machos e fêmeas alados que constituem a casta temporária nas colônias de *Acromyrmex* spp. (Della Lucia & Araújo, 1993; Diehl-Fleig, 1995).

Entretanto, algumas espécies de formigas, incluindo algumas do gênero *Acromyrmex*, não apresentam todas as características de um inseto social, bem como não têm todas as castas, nem condições de fundar uma colônia independentemente; são as parasitas sociais em que se situa *Acromyrmex ameliae*, o foco deste trabalho.

Esta tese está dividida em: uma introdução geral, uma revisão de literatura e quatro capítulos.

- O primeiro capítulo objetivou testar se a distância bulla-espiráculo é um caráter que permite distinguir as operárias de *A. ameliae* das operárias mínimas de *A. subterraneus subterraneus*; descrever a glândula metapleural da espécie parasita e testar a sobrevivência das duas espécies quando contaminadas por fungo. Testou-se a distância bulla-espiráculo porque em outra espécie parasita social do mesmo gênero *Acromyrmex insinuator* foram observadas diferenças neste parâmetro em relação às operárias hospedeiras *Acromyrmex echinator* (Sumner et al., 2003a). Este capítulo foi submetido à revista *Insectes Sociaux*.

- No segundo capítulo comparou-se alguns caracteres reprodutivos entre a espécie parasita e hospedeira, como: tamanho dos sexuais, morfologia do aparelho reprodutor feminino, taxa de oviposição e interferência das operárias e rainhas parasitas sobre a oviposição da rainha hospedeira.

A comparação do tamanho dos sexuais em relação ao tamanho da operária maior da hospedeira teve como objetivo testar a Hipótese da Miniaturização, segundo a qual os sexuais de espécies parasitas são menores do que a casta da operária maior (quando ocorre diferenciação de castas) da espécie hospedeira (Nonacs & Tobin, 1992).

A descrição do aparelho reprodutor feminino e a comparação da oviposição entre as rainhas das espécies parasita e hospedeira visaram saber se a

morfologia básica reprodutiva se conserva na espécie parasita e se alguma característica morfológica pode influenciar sua postura.

Colônias parasitadas em laboratório não produzem sexuais e, de modo geral, as rainhas parasitas se mantêm distantes da hospedeira no jardim de fungo. Testes feitos sobre a adaptabilidade de operárias de *A. insinator* mostraram que elas contribuíram para o aumento da oviposição da rainha de sua espécie, ao mesmo tempo em que diminuíram a oviposição da hospedeira (Sumner et al, 2003b). Diante disso, optou-se por testar se, além das operárias, as rainhas de *A. meliae*, através de estímulos químicos, diminuem a quantidade de ovos postos além de inibir a produção de sexuais por *A. subterraneus subterraneus*.

- O terceiro capítulo comparou características morfológicas e ultraestruturais dos espermatozoides entre as duas espécies, a parasita e a hospedeira. Esta comparação teve por objetivo descobrir diferenças em um caráter mais conservativo que os caracteres externos, de modo que possam ser utilizados para a separação das duas espécies e, posteriormente, na construção de filogenias de parasitas sociais, ou do gênero, o que já é utilizado para outros Hymenoptera como abelhas. Este capítulo foi submetido à revista *Insectes Sociaux*.

- No último capítulo alguns dados comportamentais como: capacidade de discriminação das operárias hospedeiras e parasitas quanto à prole e rainhas; influência da maturidade reprodutiva e fecundação no processo de aceitação das rainhas parasitas e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das diferentes castas das espécies, bem como da condição morfofisiológica reprodutiva, foram analisados.

Tentou-se com esses experimentos, responder algumas perguntas:

1) São as operárias hospedeiras de colônias parasitadas (ou não) capazes de discriminar entre sua prole e a da parasita?

2) As operárias de *A. meliae* têm capacidade de discriminar sua própria prole?

3) É a rainha parasita mais atrativa do que a rainha hospedeira para as operárias da subespécie hospedeira?

4) A fecundação e/ou a maturidade reprodutiva facilitam a aceitação de rainhas parasitas em colônias não-parasitadas? Essas características promovem uma mudança nos perfis de hidrocarbonetos cuticulares?

5) Há diferenças entre os perfis de hidrocarbonetos cuticulares entre as fêmeas parasitas (aladas e operárias) e fêmeas hospedeiras (operárias) de mesma colônia ?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Conceito e distribuição do parasitismo social

Parasitismo social é a coexistência no mesmo ninho de duas espécies de insetos sociais, uma das quais é parasiticamente dependente da outra (Hölldobler & Wilson, 1990).

O parasitismo social, no sentido estrito, ocorre somente nos himenópteros, mas não em todas as famílias. O parasitismo social no sentido estrito está limitado a dois grupos em Apoidea: um incluído na subfamília Xylocopinae (tribo Ceratini) e o outro pertencente à subfamília Bombinae, concretamente nos gêneros *Bombus* e *Psithyrus*. Na maior parte dos casos, o parasitismo é temporal ou inquilinista. Em *Psithyrus* até as operárias desapareceram (Tinaut & Ruano, 1999). O número de espécies parasitas sociais em Vespoidea é o maior entre os insetos sociais. Das 225 espécies de *Myschocittarus* 10% são parasitas sociais permanentes e, possivelmente mais de 3 das 130 espécies de *Polistes*.

O número de parasitas formigas parasitas sociais vem aumentando nos últimos anos com a descoberta de novas espécies em *Acromyrmex*, como *A. insinuator* (Schultz et al., 1998) e *A. ameliae* (Souza et al., 2007).

A seguir serão abordados os tipos de associações existentes nas parasitas sociais.

2.2. Associações

Diferentes autores têm definido várias formas de associação entre espécies de insetos sociais, desde um aumento progressivo em graus de interação, de coabitação sem contato direto entre as espécies até a completa integração da parasita dentro da colônia hospedeira (Buschinger, 1986; Hölldobler & Wilson, 1990). O primeiro caso dessas associações foi denominado de ninhos compostos (Wasmann em 1891 *apud* Hölldobler & Wilson, 1990) e divide-se em:

Plesiobiose: refere-se à duas espécies que partilham o mesmo microhabitat sem qualquer interação. Acredita-se que estão juntas de modo accidental (Lenoir et al., 2001)

Cleptobiose: algumas formigas menores constroem ninhos próximos de espécies maiores e alimentam-se de restos de sua hospedeira, roubando alimento durante a trofalaxia entre as espécies hospedeiras, ou quando estas retornam para os seus ninhos. Exemplos são as cleptobióticas *Crematogaster* spp. que roubam as sementes de sua hospedeira *Holcomyrme* na Índia (Lenoir et al., 2001).

Lestobiose: assemelha-se à cleptobiose, mas, nesse caso, a formiga ladra (lestobiótica) rouba o alimento sorrateiramente de colônias vizinhas e preda seus imaturos. Colônias das “formigas ladras” do subgênero *Solenopsis* (*Diplorhoptum*), incluindo *S. fugax* e *S. molesta* entram sorrateiramente nos ninhos das espécies maiores e predam os imaturos.

Parabiose: duas ou mais espécies compartilham o mesmo ninho e algumas vezes o mesmo odor de trilhas, mas mantêm separado o alimento e a prole. *Crematogaster limata parabiótica* e *Monacis debilis*, que compartilham os mesmos afídeos na alimentação, constituem exemplos desse tipo de associação.

Xenobiose: é a mais integrada associação, uma verdadeira colônia mista. Uma espécie mora nas paredes das câmaras dos ninhos de outras e se move livremente entre suas hospedeiras, obtendo alimento delas, usualmente solicitado por regurgitação. Os jovens são mantidos separados. É uma relação verdadeiramente parasita.

Colônias mistas: Assemelham-se aos ninhos compostos, no entanto a espécie parasita é mais dependente da hospedeira, a qual cria a descendência da parasita e, além disso, proporciona alimento para toda a colônia. Essas colônias mistas podem apresentar-se como:

Parasitismo social temporário: foi primeiramente reconhecido por Wheeler em 1904 quando estudava o ciclo de vida dos membros do grupo *Formica microgyna*, especialmente *F. difficilis*.

Ocorre quando uma espécie (a parasita) necessita da hospedeira só para iniciar a formação de sua colônia. A rainha parasita invade a colônia da hospedeira, matando-a ou expulsando-a e a descendência da fêmea parasita é criada e mantida pelas operárias da espécie hospedeira (Tinaut & Ruano, 1999). A colônia, deste modo, desenvolve vagarosamente de uma colônia mista parasita-hospedeira para uma sociedade pura que não necessita da hospedeira (Hölldobler & Wilson, 1990; Lenoir et al., 2001). A dependência da espécie parasita restringe-

se apenas à fase inicial da colônia, visto que a rainha parasita não tem capacidade de fundar sua própria colônia, nem de cuidar da sua prole inicial.

O parasitismo social temporário é geralmente considerado um precedente na evolução pela readoção de rainhas de suas próprias espécies pelas colônias em seguida ao vôo nupcial. Essa condição foi denominada por Bolton *apud* Hölldobler & Wilson (1990) de autoparasitismo.

Dulose: nesse caso, certas espécies de formigas têm-se tornado dependentes de operárias de outras espécies às quais elas mantêm como escravas (Hölldobler & Wilson, 1990). Há um contínuo ataque a certos ninhos para renovar operárias jovens e força de trabalho, roubando-lhes as pupas de operárias. As operárias de muitas espécies dulóticas raramente se juntam para efetuar a manutenção do ninho pelo forrageamento, construção do ninho, cuidado com a prole etc. Todas essas tarefas são executadas pelas escravas. A dulose pode ser tanto inter com intraespecífica e apenas 50 espécies das aproximadamente 10.000 espécies de formigas são dulóticas ativas. Um exemplo de espécie dulótica é *Harpagoxenus sublaevis* que pode ser encontrada na colônia de uma espécie hospedeira como *Leptothorax acervorum*. As operárias dulóticas atacam ou expulsam os adultos residentes, e com o passar do tempo, as operárias hospedeiras que eclodiram cuidam de sua geração e da geração parasita, visto que as operárias parasitas são ineficientes nas tarefas diárias de manutenção da colônia. Novos roubos a outras colônias são feitos pelas operárias parasitas para substituir a força de trabalho.

Inquilinismo ou parasitismo permanente: O uso do termo “inquilinismo” em vez de “parasitismo permanente” foi sugerido por Wilson (1971) visto que muitas espécies dulóticas também são parasitas permanentes. Neste tipo de associação as parasitas apresentam estágios degenerados, dependendo inteiramente, no seu ciclo de vida, do ninho das espécies hospedeiras. A casta das operárias pode estar presente, mas, usualmente, em número reduzido e exibe comportamentos limitados. Em algumas espécies como *Teleutomyrmex schneideri*, a casta de operárias foi perdida completamente. As rainhas parasitas penetram no formigueiro hospedeiro, adotando atitudes agonísticas e evitam agredir as hospedeiras. Quando localizam a rainha hospedeira, sobem nela, sem matá-la e permanecem, toda a sua vida, sobre elas. Nessa posição são cuidadas e alimentadas como autênticas rainhas, e seus ovos são tratados como os da rainha

hospedeira. Estes ovos eclodem, originando exclusivamente machos e fêmeas da espécie parasita.

É nos Formicidae que estão a maioria dos casos de inquilinismo e as relações mais complexas, o que, conforme Hölldobler & Wilson (1990), acontece devido aos diferentes caminhos evolutivos que culminaram com a existência de espécies cujas operárias estão ausentes e por não haver duas espécies que tenham evoluído de modo semelhante nos detalhes de sua adaptação parasita. O número de parasitas é pequeno e, além disso, o mais avançado estágio de parasitismo (ausência de operárias) é o mais raro. Embora Nonacs & Tobin (1992) acreditem que esse estágio de parasitismo seja raro, Buschinger (1986) sugeriu que o número de espécies parasitas pode ser muito alto, visto que colônias de algumas espécies hospedeiras não são fáceis de serem encontradas. Na Suíça $\frac{1}{3}$ das aproximadamente 110 espécies de formigas é parasita. Esse mesmo autor supõe que o número de espécies parasitas conhecidas aumentará especialmente nos trópicos, à medida que aumentar o conhecimento das espécies.

As espécies parasitas inquilinas adquiriram algumas características, as quais Wilson (1971) chamou de “síndrome da inquilina”, encontradas em combinações variadas em parasitas especializadas. A seguir estão descritas algumas delas:

(1) Perda da casta operária: Ausência da casta operária é encontrada nas inquilinas mais avançadas como *Teleutomyrmex schneideri* (Formicidae) (Wilson, 1971).

Segundo Heinze & Keller (2000), a perda da casta operária nas inquilinas pode ser um resultado posterior ao da redução do tamanho. Bourke & Franks (1991) foram os primeiros a sugerirem que tamanho reduzido pode ter evoluído como um meio da espécie levar vantagem no sistema de determinação de casta da hospedeira (Hipótese da miniaturização), uma vez que as larvas das parasitas se desenvolvem em sexuais com menor quantidade de alimento do que requerido para produzir operárias. A redução de tamanho é evidenciada em algumas espécies como, por exemplo, *Plagiolepis xene* cujas pupas de machos e fêmeas são significativamente menores que as pupas sexuais da hospedeira *Pl. pygmaea*. A média de tamanho das pupas machos e fêmeas parasitas foi muito similar e não diferiu significativamente da pupa operária da sua hospedeira. A redução de tamanho é importante para essa espécie, sobretudo a redução no tamanho do

macho, porque operárias da hospedeira identificam e destroem todos os imaturos machos da sua espécie quando estes são produzidos em excesso. No entanto, não foi observada a destruição de machos das parasitas pelas operárias hospedeiras (Aron et al., 1999).

Como sugerido por Wilson (1971), as operárias inquilinas exibem comportamentos limitados. Sumner et al. (2003a) observaram que as operárias parasitas *Acromyrmex insinuator* apresentaram maior taxa de mortalidade que a sua hospedeira *Acromyrmex echinator*. Isso ocorre devido ao menor tamanho da glândula metapleurial observada naquela espécie. Por esse motivo, os autores sugeriram que a espécie compense a perda de defesa individual pela exploração do sistema imunológico coletivo da sua hospedeira. Sumner et al. (2003b) observaram que a casta operária da parasita *A. insinuator* é essencial para a produção de parasitas sexuais e é capaz de discriminar sua prole além de suprimir a reprodução da rainha hospedeira.

(2) A rainha é substituída por uma ergatógina ou ergatóginas. A presença de ginomorfos aladas e dealadas e ergatomorfos, as quais parecem operárias, é encontrada na inquilina *Polyrhachis lama* (Formicinae), inquilina obrigatória de *Diacamma* sp. (Ponerinae) (Maschwitz et al., 2000).

(3) Há uma tendência em ter muitas rainhas ovipositando num mesmo ninho hospedeiro.

(4) A rainha e o macho são reduzidos em tamanho, sendo menores que as operárias hospedeiras, ou o macho é pupóide. Machos pupóides são observados em *Pheidole acutidens*, *T. schneideri* e *Anergates atratulus* (Formicidae), com acasalamento ocorrendo dentro do ninho (Wilson, 1971 e 1984).

(5) Há uma tendência de que o vôo nupcial seja mais curto e substituído por acasalamento entre companheiras de ninho (“adelfogamia”) dentro ou próximo do ninho hospedeiro. A dispersão da rainha é muito limitada. Os casos de acasalamento dentro do ninho são mais documentados em espécies inquilinas altamente derivadas dos gêneros *Teleutomyrmex* e *Anergates*, mas espécies dulóticas do gênero *Epimyrma* como *E. algeriana*, *E. corsica*, *E. krausseii*, *E. adlerzi* e *E. bernardi* também apresentam este tipo de comportamento (Dumpert, 1981; Buschinger, 1989).

Em algumas espécies a pista usada para identificação de imaturos é o tamanho; entretanto, para *Pl. pygmaea* é a “dica” química, ou seja,

hidrocarbonetos usados na discriminação da prole. Portanto, a habilidade de machos *Pl. xene* em escapar do reconhecimento seria explicada pela evolução da habilidade de mimetizar o odor de fêmeas jovens *Pl. pygmaea*, como tem sido mostrado em outras espécies (Aron et al., 2004). Conforme esses mesmos autores a evolução do comportamento ocorreu da seguinte maneira: uma vez que a parasita tinha sido hábil em submeter o sistema químico de reconhecimento de casta, operárias hospedeiras podem ter respondido pelo uso do tamanho como uma “dica”, matando os machos da parasita, o que teria levado à seleção sobre machos *Pl. xene* para reduzir o seu tamanho até o das operárias hospedeiras para escapar da detecção. Essa hipótese de unir mimetismo químico e de tamanho é uma extensão da Hipótese da miniaturização.

(6) Provavelmente como uma conseqüência da diminuição do vôo nupcial, as populações das espécies inquilinas são normalmente muito fragmentadas e limitadas na sua distribuição geográfica. Por exemplo, *Pseudoatta* sp. é encontrada apenas em restingas de Ilhéus (BA). Associada à limitação geográfica a taxa de parasitismo também é baixa nas espécies inquilinas. Menos que 1% das colônias coletadas de *Pl. pygamea* por Passera em 30 anos estavam parasitadas. Em populações infestadas esse percentual era de 30-50% das colônias (Passera et al., 2001).

(7) Peças bucais são reduzidas, levando à perda da habilidade de alimentar-se sozinhas e podendo obter alimento líquido regurgitado pelas operárias hospedeiras. Essa característica foi observada em *Po. lama*. Esta espécie toca com as antenas as peças bucais e antenas da hospedeira *Diacamma* sp. que regurgita o alimento (Maschwitz et al, 2000).

(8) A escultura cuticular é reduzida ou perdida completamente em muitas partes do corpo; nos casos mais extremos a superfície do corpo torna-se brilhante. Essa última característica é encontrada em *Pseudoatta* sp. (Delabie, comunicação pessoal) e espécies parasitas do gênero *Pheidole* (Wilson, 1984).

(9) A rainha torna-se altamente atrativa às operárias hospedeiras, que a lambem freqüentemente.

(10) Rainhas dimórficas: em formigas as rainhas são freqüentemente dimórficas quanto ao tamanho, sendo referidas como macroginas ou α e microginas ou β . Acredita-se que o dimorfismo de rainhas tenha contribuído para o desenvolvimento do parasitismo social, naquelas espécies onde elas são

toleradas, pois as rainhas pequenas podem ser mais eficientes na procura de colônias não relacionadas para viverem sem ter as reservas corporais necessárias para a fundação da colônia independente.

Em *Myrmica* as microginas de *M. rubra* parecem parasitar a força de trabalho produzida pelas macroginas (Ruppel & Heinze, 1999). As microginas co-ocorrem com macroginas e especializaram-se na produção de sexuais. Em *Ectatomma tuberculatum*, as microginas, são de fato, parasitas sociais, pois só produzem microginas e machos e, raramente operárias (Hora et al., 2003; (Hora et al., 2005).

Conforme Ruppel & Heinze (1999), as microginas empregam formas de fundação da colônia dependente e as macroginas fundam suas colônias independentemente, pois têm melhores condições morfofisiológicas para tal (gordura, músculos, tecidos para histólise etc.). Logo, as microginas estão mais adaptadas ao parasitismo social.

Além de aspectos morfofisiológicos, também substâncias químicas estão envolvidas nas relações parasitas sociais-hospedeira. Esses aspectos são mostrados a seguir.

2.2.1. Aspectos químicos envolvidos no parasitismo social

Reconhecimento de companheiras

Um dos principais elementos na organização dos insetos sociais é a habilidade de discriminar as companheiras de não-companheiras (D' Ettore & Heinze, 2001) o que se torna indubitavelmente, uma das forças seletivas na evolução social (Lenoir et al., 1999).

O reconhecimento de companheiras de ninho não é o mesmo que reconhecimento de parentes. O reconhecimento de companheiras é tipicamente manifestado pela rejeição de intrusas principalmente se estas estiverem transportando jovens companheiras. Discriminação de parentes, por outro lado, é definido como um tratamento diferencial relativo aos aparentados de acordo com o grau de relacionamento, tanto que aumenta o seu fitness (nepotismo).

Em abelhas, há indício de reconhecimento familiar, mas o grau de preferência mostrado pelas operárias para as abelhas relacionadas é pouco e, se tem impacto sobre o fitness da larva é ainda incerto (Lenoir et al., 1999). Em

formigas poucos estudos foram conduzidos nesse sentido; há indícios de nepotismo em operárias de *Formica fusca* de colônias poligínicas (Hannonen & Sundström, 2003).

Acredita-se que o reconhecimento de companheiras de ninho se dá através de um “rótulo” específico comum denominado “odor gestalt” ou “odor da colônia” que cada membro possui (Crozier & Dix, 1979). Esses rótulos são usados por um indivíduo para diferenciar-se de outros pela comparação com ele próprio: o ‘rótulo’ (Lenoir et al., 2001). O rótulo é dado pelos hidrocarbonetos presentes na cutícula dos membros da colônia. Muitas observações etológicas têm mostrado a existência de um período de aprendizado para a aquisição do rótulo. Esse período pode começar cedo, logo após a eclosão. Ao encontrar outra formiga, ela compara o seu próprio rótulo com as dicas recebidas e escolhe entre reações amigáveis ou agressivas.

Em insetos sociais os hidrocarbonetos cuticulares podem ter papel determinante no reconhecimento de companheiras, além do seu papel primário que é a proteção contra microrganismos ou toxinas e dessecação. Os hidrocarbonetos estão armazenados na glândula pós-faríngeal (PPG) e são trocados entre os membros por trofalaxia, “allogrooming” (lambadura de companheiras de ninho) e contato físico (Lenoir et al., 2001).

Trabalhos demonstram que os hidrocarbonetos da PPG são congruentes com HCs cuticulares.

Segundo Lenoir et al. (1999), o uso da PPG como um recurso para o reconhecimento de companheiras é muito adaptativo, pois ao abrir a boca a secreção pode facilmente ser aplicada sobre a superfície do corpo por “autogrooming” (auto lambadura). A posição da glândula também facilita a troca de substâncias entre membros do ninho, promovendo a rápida distribuição do cheiro no interior da colônia. Além disso, quando uma nova substância é introduzida na colônia pode ser facilmente incorporada e distribuída entre os membros do ninho e assim torna-se parte do sistema de reconhecimento. Assim, a PPG pode ser vista como um perfeito “órgão gestalt”.

Apesar da uniformidade, o odor da colônia é dinâmico e muda ao longo do tempo conforme a estação, composição do grupo e do alimento (Dahbi & Lenoir, 1998; Lenoir et al., 2001). Em *Cataglyphis iberica* as jovens operárias possuem, após a hibernação, uma composição da PPG que diverge do odor colonial. Essa

diferença aparentemente é reconhecida pelas operárias mais velhas, visto que as operárias jovens são transportadas preferencialmente para outros locais do ninho, mas essa diferença não leva à agressão. Em formigas, têm-se ao menos, três níveis de discriminação com uma gradação paralela de não similaridade nos hidrocarbonetos cuticulares: 1) estranhas ou intrusas (resposta comportamental expressa como agressão); 2) jovens (adultos transportam-nos); 3) velhas (vários comportamentos amigáveis como trofalaxia, “allogrooming” etc.).

Alternativamente ao modelo gestalt, Crozier & Dix (1979) propuseram o modelo individualista para colônias pequenas. Nestes casos, os rótulos individuais não são misturados e quando ocorre transferência é em níveis mediados por umas poucas incidências de “allogrooming” e contato físico. Por exemplo, a Ponerinae *Pachycondyla apicalis* não usa a trofalaxia e tem pequena taxa de “allogrooming”; conseqüentemente, a eficiência de transferência de HCCs é muito fraca quando comparada com outras espécies de Formicinae e Myrmicinae (Lenoir et al., 2001).

Tem sido sugerido que um aprendizado precoce do odor do ninho favoreceu a evolução repetida de espécies dulóticas e parasitismo social em formigas (Hölldobler & Wilson, 1990).

Insignificância química

Logo após a eclosão, os imaturos são destituídos de substâncias químicas cuticulares. Isto foi denominado por Lenoir et al. (1999) “insignificância química”. Este curto estágio no início da vida adulta é seguido por um período de “integração química” quando os imaturos sintetizam hidrocarbonetos cuticulares próprios e adsorvem compostos químicos de suas companheiras ou de material do ninho para integrar ao odor gestalt da colônia (Lenoir et al., 1999).

Em *C. iberica*, por exemplo, a quantidade de hidrocarbonetos aumenta de 0,06µg / glândula durante a eclosão para 1,3 a 1,6µg / glândula em operárias jovens. Um aumento similar progressivo na quantidade de hidrocarbonetos ocorre na cutícula e na PPG de *Aphaenogaster senilis* e *Myrmecaria luminoides*. Lenoir et al. (2001) concluíram que a quantidade de hidrocarbonetos cuticulares aumenta com o passar dos dias após a eclosão até sua estabilidade. O fraco sinal que operárias jovens possuem na sua cutícula, provavelmente, explica porque elas são mais facilmente aceitas em colônias estranhas do que operárias com uma semana

de vida, explicando o “período de aceitação” de Stuart, citado por Lenoir et al. (2001).

A falta de especificidade da colônia na composição de hidrocarbonetos cuticulares de operárias de colônias jovens tem sido observada em abelhas melíferas e vespas que podem ser adotadas em uma colônia da mesma espécie.

Morel & Vander Meer (1988) afirmam que há duas hipóteses sobre a existência de feromônios de reconhecimento de prole. A primeira hipótese diz que há substâncias envolvidas na integração prole/operária como pistas para o reconhecimento das companheiras. A segunda considera que ocorre aprendizagem das características morfológicas, comportamentais ou químicas da prole.

A hipótese de que insignificância química pode explicar cleptobiose intraespecífica ou roubo de alimentos entre colônias vizinhas em algumas espécies é evidenciada, em particular, em *Ectatomma ruidum*, cujas operárias cleptobióticas têm reduzidas quantidades de compostos cuticulares (Breed et al. e Jeral et al. *apud* Lenoir et al., 2001). Essas operárias aparentemente carregam um odor igual ao dos imaturos e, portanto poderiam estar parcialmente ‘invisíveis’ quimicamente e, dessa maneira, enganar as companheiras (Lenoir et al., 2001).

Rainhas de *Polyergus rufescens*, uma espécie dulótica, usam duas estratégias químicas para invadir as colônias: a secreção de um repelente para evitar interações agressivas com as operárias hospedeiras (D’Ettorre et al., 2002) e a insignificância química para enganar o sistema de reconhecimento da hospedeira e facilmente adquirir o padrão da rainha hospedeira, provavelmente por camuflagem química (Lenoir et al., 2001) que foi observada em *P. breviceps* (Topoff & Zimmerli, 1993).

Produção de substâncias que facilitam o parasitismo

Há, sem dúvida, um componente químico envolvido na aceitação da parasita pelas hospedeiras. Acredita-se também que as hospedeiras produzam substâncias que favoreçam o parasitismo. Uma hipótese diz que ataques às rainhas obtêm estímulos químicos apropriados diretamente das formigas hospedeiras. Por exemplo, rainhas invasoras de *Lasius umbratus* agarram e mastigam operárias de suas hospedeiras *L. niger*. Esses dados reforçam a hipótese de transferência química entre hospedeira e parasita (Buschinger, 1986).

O sucesso do parasitismo depende tanto da habilidade da rainha parasita entrar quanto de permanecer no ninho. Para isso a síntese de substâncias químicas por algumas glândulas exerce um papel fundamental. Em *Polyergus breviceps* foi sugerida a existência de um feromônio de apaziguamento produzido na glândula de Dufour para reduzir a agressão das operárias quando elas atacam a rainha hospedeira do gênero *Formica*. Conseqüentemente, a glândula de Dufour diminui em tamanho depois que ela é adotada pelas operárias hospedeiras (Mori et al., 2000). Observou-se, no mesmo gênero, que imediatamente após a morte da rainha hospedeira suas operárias iniciam um “grooming” (constante lambedura) na rainha parasita. As mandíbulas da rainha *Formica* são separadas e continuamente a rainha de *Polyergus* toca a hipofaringe exposta da rainha morta. Talvez seja o meio mais eficiente de ser aceita pela colônia, pois na condição sem rainha, as agressões das operárias hospedeiras resultam na morte da rainha parasita. Isso sugere que durante o ato de morder a rainha hospedeira, a rainha parasita adquire um ou mais substâncias. As substâncias químicas da rainha morta podem ficar ativas até uma semana aproximadamente após sua morte. Acredita-se que substâncias ingeridas por *Polyergus* podem estar envolvidas na síntese rápida de um feromônio de superfície, devido ao “grooming” rápido pelas operárias *Formica* (Topoff & Zimmerli, 1993).

A glândula de Dufour é hipertrofiada nas espécies parasitas (Hölldobler & Wilson, 1990). Os acetatos liberados têm uma importante função nos ataques dos ninhos, atuando como um persistente sinal de alarme que atrai as dulóticas, mas causa pânico e dispersa as defensoras. Esse comportamento foi denominado de “propaganda”.

Rainhas da parasita social temporária *Bothriomyrmex syrius* usam tanto estímulos visuais quanto olfativos. Diferentes das operárias que são de cor marrom-claro, as rainhas dessa espécie são escuras e se parecem com a rainha hospedeira. Elas exudam pelas glândulas anais uma substância que tem o mesmo cheiro exalado por operárias de *Tapinoma*. Elas acumulam essa secreção e, se perturbadas, giram seu abdome em todas as direções e, do mesmo modo que *Tapinoma* descarregam uma espuma de pouco odor, branca e tóxica para outras formigas (Lloyd et al., 1986).

Para sobreviver na colônia hospedeira, a parasita deve em algum nível ser considerada como uma companheira e pode harmonizar-se com a colônia pelo

alcance de algum nível de congruência química com a hospedeira. Há duas possibilidades de obter essa congruência (Lenoir et al., 2001):

Mímica química por biossíntese: a parasita mimetiza substâncias químicas ativamente do rótulo hospedeiro.

Mímica química por camuflagem: a parasita obtém os traços da hospedeira pela aquisição passiva, por exemplo, “allogrooming” e trofalaxia. Esta parece ser a estratégia mais comum; tem sido bem estudada na formiga xenobiótica *Formicoxenus provancheri* e sua hospedeira *Myrmica incompleta*. Há uma similaridade de hidrocarbonetos cuticulares entre elas. Experimentos de adoção revelaram que o odor hospedeiro é adquirido durante os primeiros dias de vida da parasita adulta e mantido mais tarde pelo intenso “grooming” da hospedeira (forrageadoras *Formicoxenus* gastam mais ou menos 45% do tempo no ninho lambendo as operárias hospedeiras, do qual 40% desse tempo é destinado à cabeça). Esse comportamento está relacionado, não apenas à obtenção de alimento, mas também pode ser uma tentativa de obter secreções da PPG. Em *P. rufescens*, por exemplo, as rainhas virgens ou recém-fecundadas têm poucos hidrocarbonetos cuticulares e fazem uso dessa insignificância para invadir as colônias. *Polyergus* spp. espalham o odor de *Formica* pelo corpo por autogrooming (autolambedura) (Lenoir et al., 2001). A mímica e a camuflagem não são mutuamente exclusivas e podem coexistir em algumas espécies.

2.3. Evolução do parasitismo social

Hölldobler & Wilson (1990) resumizam alguns fatores que levam ao parasitismo social os quais podem explicar porque ele ocorre em algumas espécies e gêneros e em outros não.

1) Viver em ambiente frio ou árido: maior quantidade de espécies parasitas é encontrada em regiões temperadas, pois a temperatura mais baixa facilita a introdução de rainhas parasitas mais cedo na evolução do parasitismo pela demora na resposta das colônias hospedeiras. Algumas espécies são conhecidas na região tropical, três espécies de *Acromyrmex* parasitas foram descritas (Delabie et al., 1993, Schultz et al, 1998; Souza et al. 2007). O parasitismo em formigas cortadeiras é um fato raro.

2) Poligia, como resultado da readoção de rainhas. O sucesso da fundação solitária da colônia em formigas é pequeno. O índice de mortalidade de rainhas é alto devido à limitação do próprio local do ninho, das condições climáticas e da predação. Frequentemente pouco mais do que uma rainha em mil sobrevive (Hölldobler & Wilson, 1990).

As rainhas de colônias monogínicas têm mais gordura do que as adotadas. Os recursos são formados entre o tempo de emergência da pupa até o vôo, para que eles sirvam tanto para ela quanto para a primeira geração de que ela cuida. No entanto, em algumas espécies, a rainha precisa forragear durante a fase de fundação da colônia, aumentando o risco de mortalidade. Em colônias monogínicas o tempo médio de desenvolvimento da primeira geração de operárias é muito longo, em média 206 dias, ao passo que em colônias poligínicas esse tempo é muito menor (Bourke & Franks, 1995). Percebe-se, desse modo, que a monoginia é um investimento alto e o sucesso de fundação é muito menor (Hölldobler & Wilson, 1990).

Mas, ao mesmo tempo em que garante o sucesso da colônia a poliginia facilita o uso dos recursos por espécies parasitas, pois, espécies poligínicas frequentemente não defendem um território e não reconhecem membros de outros ninhos como diferentes. Isso é porque há um fluxo livre de odores derivados do ambiente de uma grande área, maior do que o esperado em colônias monogínicas e com fluxo livre de operárias filhas de diferentes rainhas fecundadas por diferentes machos, conseqüentemente as operárias experimentam uma grande quantidade de “dicas” hereditárias (Vander Meer & Morel, 1998). Uma vez que as formigas estão em contato com uma grande mistura de odores, torna-se mais fácil para as colônias poligínicas aceitarem indivíduos que não são companheiras de ninho.

Para Buschinger (1986) a poliginia facilitaria o parasitismo. Após a ocorrência de mutações, encontros sexuais levam à formação de uma subpopulação de indivíduos geneticamente isolados das formas originais, mas ainda morando em um ninho poligínico. Uma vez completado esse isolamento, o desenvolvimento para o inquilinismo ou dulose dependerá da habilidade da rainha da “nova” espécie em produzir operárias. Evoluindo para a monoginia, a seleção favoreceria as rainhas parasitas capazes de repor as operárias da colônia

hospedeira pela força, como ocorre nas espécies dulóticas e espécies parasitas temporárias.

Uma explicação química que reforça essa teoria é que nas colônias altamente poligínicas, as formigas geralmente aceitam os estranhos quando introduzidos; o que é possível que essas operárias estejam habituadas a serem confrontadas com vários odores. Heinze & Keller (2000) acreditam que um número grande de rainhas está associado com baixa taxa de relacionamento entre os membros da colônia.

Estudos feitos com membros do grupo *Formica rufa* reforçam a tese de que a poliginia leva ao parasitismo social temporário. Neste grupo, muitas colônias novas são formadas pela divisão do ninho após o retorno das novas rainhas fecundadas para o ninho original quando estas levam algumas operárias. No entanto, em algumas ocasiões rainhas jovens não acham o caminho de volta após o vôo nupcial e podem ser adotadas por uma colônia do grupo de *F. fusca*, após eliminação da rainha hospedeira (Hölldobler & Wilson, 1990).

Schultz et al. (1998) reforçam a hipótese de que a poliginia pode favorecer o parasitismo social, visto que em *A. insinator* parasita da hospedeira poligínica facultativa *A. echinator*, o parasitismo foi maior em colônias poligínicas do que nas monogínicas. A poliginia, nessa espécie, acontece por múltiplas invasões ou, ao menos, facultativamente pela adoção de rainhas irmãs.

Poliginia primária é encontrada em *A. subterraneus subterraneus*. Há relatos de até sete rainhas em uma colônia jovem desta subespécie (Della Lucia et al., 1991).

3) Ocupar múltiplos ninhos (polidomia), alguns dos quais são menores e temporariamente sem rainha residente;

4) Viver em densas populações: isso acontece com muitas espécies de clima frio. Entretanto, nos climas quentes as áreas apresentam alta diversidade de espécies combinadas freqüentemente com espécies raras e grande dispersão de ninhos de alguns grupos, dificultando a localização da hospedeira por parte da parasita (Tinaut & Ruano, 1999).

5) Aprender precocemente o odor da colônia: o ideal é que o indivíduo aprenda gradativamente o odor da colônia, pois as espécies que aprendem cedo podem tanto aprender o seu rótulo quanto o da parasita.

Algumas hipóteses do ponto de vista biológico são propostas para explicar o surgimento de espécies parasitas sociais. São elas: territorialidade intraespecífica, predação e poliginia. Tais hipóteses não são excludentes e muitas vezes estão relacionadas a outros fatores tais como, fatores ecológicos (saturação ambiental) e geográficos (barreiras).

A territorialidade intraespecífica como origem do parasitismo social é apoiada por alguns autores, como Wilson (1971). A evidência para essa hipótese é baseada na observação de que algumas espécies predadoras como *Myrmecocystus mimicus* de colônias maiores organizam ataques às colônias menores, matando a rainha e transportando para o ninho os imaturos e operárias ‘honeypots’ que se convertem em escravas para a colônia (Hölldobler, *apud* Hölldobler & Wilson 1990). Essa hipótese, no entanto, não é aceita por vários autores, pois as lutas e ataques observados são considerados artefatos de laboratório, visto que no campo, algumas espécies consideradas, até então, territorialistas, apenas retiram intrusos que estão muito próximos dos ninhos (Foitzik & Heinze, 1998).

A hipótese da predação foi proposta inicialmente por Darwin em 1859 para explicar a dulose em algumas espécies de *Polyergus*. Ele hipotetizou que o objetivo inicial dos ataques utilizados por essas espécies era a captura de imaturos que seriam levados para o ninho para serem usados na alimentação; ao acaso, alguns imaturos emergiram e aceitaram a espécie parasita com sendo a sua, ou seja, executando as tarefas, como se estivessem na colônia-mãe. Entretanto, poucas evidências há para suportar tal hipótese e a ausência de espécies dulóticas em grupos predadores especializados e a presença de dulóticas em não predadoras como Formicoxeni são fatores que permitem refutar a idéia (Hölldobler & Wilson 1990).

As duas primeiras hipóteses, já mencionadas, não conseguem explicar o surgimento de parasitas sociais, sendo desse modo, a poliginia a mais aceita entre todas. Entende-se como poliginia a participação conjunta de várias fêmeas fecundadas na construção de uma colônia (Tinaut & Ruano, 1999); isso é o que se denomina poliginia primária e esse tipo de fundação, pleometrose. Essas são características que ocorrem em um número razoável de formicídeos.

A taxa de mortalidade de rainhas durante a fundação solitária é alta por causa da falta de locais adequados para nidificação, condições climáticas adversas ou predação. Frequentemente, apenas uma rainha em 1000 sobrevive durante essa

fase (Heinze & Keller, 2000). Associação pleométrica confere mais vantagens para as rainhas associadas do que a fundação de colônia independente. Diehl-Fleig (1995) observou que em *Acromyrmex striatus* as fêmeas que fundaram colônias juntas, obtiveram mais sucesso, porque não necessitaram sair para forragear, diminuindo o risco de predação e porque economizaram reservas corporais para a maior produção de ovos tróficos. Superada a fase inicial, muitas colônias, inicialmente poligínicas, tornam-se monogínicas pela morte de algumas rainhas.

No entanto, não é a poliginia primária apenas, a característica defendida por uma série de autores que pode levar ao parasitismo, mas especialmente a poliginia secundária, que ocorre pela readoção de fêmeas fecundadas pela colônia.

Se a poliginia deixa a colônia mais vulnerável ao parasitismo, por que algumas espécies aceitam novas rainhas? Nonacs (1998) *apud* Keller (1995) diz que há dois fatores que favorecem para a aceitação de rainhas: 1) a alta probabilidade que têm os ninhos de perder sua rainha e 2) a vida curta da rainha comparada à expectativa de vida da colônia. Em outras palavras, membros de uma colônia beneficiam-se por aceitarem novas rainhas porque, com o aumento da sobrevivência da colônia, será compensada a diminuição do seu fitness inclusivo, uma vez que é adotada uma rainha aparentada (Heinze & Keller, 2000). No entanto, a readoção de fêmeas não aparentadas também ocorre, e segundo Heinze & Keller (2000) essa aceitação apenas acontece quando a presença da nova rainha aumenta a sobrevivência dos imaturos sexuais já presentes na colônia, pois as operárias nunca se beneficiam da substituição de sua mãe por uma rainha não relacionada. Quando isso ocorre leva ao parasitismo social intraespecífico.

Outro fator importante que seleciona a poliginia é a baixa taxa de sucesso, na fundação de colônias independentemente por jovens rainhas. Desse modo, se a rainha tem sucesso na tomada de uma colônia ela aumenta sua chance de reproduzir, entretanto, a rainha primeiro tem que ser aceita e isso depende do comportamento das operárias residentes (Heinze & Keller, 2000). Alguns autores propõem que as operárias aceitam novas rainhas quando essas têm uma baixa taxa de sucesso na fundação independente, em virtude, por exemplo, de fatores ecológicos como saturação do habitat. Embora seja bem vista tal hipótese, poucos estudos a testaram. Entre eles o de Bourke & Heinze *apud* D' Ettore & Heinze (2001) mostraram que poucos locais de nidificação, além do clima frio aumentam os custos da dispersão, levando à aceitação das jovens rainhas.

Uma característica notável de espécies com alto número de rainhas é que, com frequência, a habilidade de estabelecer novas colônias de modo independente tem sido perdida parcial ou completamente. A fundação independente requer algumas características da rainha fundadora, tais como asas, ocelos, volumoso tórax com músculos alares bem desenvolvidos e fisiogastria (Diehl-Fleig, 1995). Em algumas espécies poligínicas observa-se que determinadas fêmeas perderam algumas dessas características, levando à formação de fêmeas diferentes dentro das colônias: as macroginas e as microginas. As primeiras têm capacidade de fundar colônias sozinhas e as microginas, de menor tamanho e com menos reservas corporais, são dependentes da associação com as macroginas para se reproduzirem. Acredita-se que a perda da capacidade de rainhas em iniciarem novas colônias sozinhas provavelmente se originou do sucesso extremamente baixo de fundação independente, sugerindo que a poliginia está associada com riscos extremos de dispersão (Keller, 1995). *Lasius longispinosus* ilustra bem essa idéia: os indivíduos foram selecionados para permanecer no ninho devido ao alto risco de dispersão e são aceitos porque proporcionam algum benefício indireto (Herbers *apud* por D' Ettore & Heinze, 2001).

Em *Ectatomma tuberculatum* foram encontradas diferenças entre as microginas e macroginas. As microginas só produzem microginas e machos e raramente operárias; as macroginas nunca produzem microginas e vice-versa, sugerindo que as microginas representariam um caso de parasitismo social (intra ou interespecífico) (Hora *et al.*, 2003).

A poliginia pode também ser precursora da dulose. Buschinger *apud* D' Ettore & Heinze (2001) acredita que espécies dulóticas evoluíram de ancestrais de colônias poligínicas que em algum momento habitavam diversos locais dos ninhos (polidomia). Fundações parasitas originaram da volta das rainhas à sua colônia materna e ataques escravos desenvolveram do transporte dos jovens entre ninhos diferentes de colônias polidômicas. A polidomia e poliginia são realmente comuns em Formicini e Formicoxenini, mas não são encontradas em outras espécies como *Leptothorax* que é monodômica e monogínica.

Unindo as hipóteses de polidomia-poliginia e territorialidade, Alloway e Stuart & Alloway *apud* Tinaut & Ruano (1990) propuseram que formigas dulóticas se originaram de disputas territoriais e roubo de jovens de espécies

poligínicas e polidômicas nas quais novas colônias foram fundadas pela readoção de jovens rainhas.

Em *Myrmica* spp., Savolainen & Vespsälänen (2003) sugeriram especiação simpátrica para inquilinas, com a poliginia como pré-requisito para a evolução do parasitismo intraespecífico.

A especiação simpátrica ocorreu também no parasita social incipiente *A. insinuator* que é a espécie-irmã da sua hospedeira *A. echinator* (espécie facultativamente poligínica) como predito pela forma restrita da regra de Emery (Sumner et al., 2004). Um problema do modelo de especiação simpátrica para parasitismo social é como explicar que um parasita incipiente torna-se reprodutivamente isolado da sua hospedeira. Buschinger *apud* Sumner et al. (2004) sugeriu que o parasita evoluiu intraespecificamente de sua hospedeira através de algum mutante ‘deficiente’, como, por exemplo, produzindo uma proporção de casta baseada em rainha.

Entretanto, algumas espécies de parasitas estão filogeneticamente distantes de suas hospedeiras como é o caso de *Pseudoatta* sp. que parasita *A. rugosus rugosus*. Uma explicação é que elas tenham evoluído alopatriicamente (Sumner et al., 2004).

Apesar da predação e territorialidade terem sido propostas e estarem presentes em alguns casos de parasitismo, conclui-se que a poliginia é, sem dúvida, o fator mais preponderante para o surgimento desse tipo de relação, visto que, está presente em todos os níveis de parasitismo social.

Em formigas o inquilinismo pode ter evoluído por três rotas, conforme Wilson (1971) e Hölldobler & Wilson (1990): 1) via agressão territorial e escravização de operárias da mesma espécie ou de espécies diferentes levando à dulose, 2) via adoção de rainhas jovens, poliginia e “budding” (divisão da colônia em subcolônias), levando ao parasitismo social temporário e 3) via plesiobiose. As três rotas culminaram no inquilinismo.

Conforme Hölldobler & Wilson (1990), *Epimyrma* spp. apresentam uma série de passos do comportamento dulótico até o inquilinismo sem operárias, ou talvez mais precisamente dulose degenerada. Por exemplo, em *E. krausse* o número de operárias é muito pequeno, cinco ou menos. As operárias podem ainda atacar, mas seus esforços não são efetivos e *Epimyrma corsica* não tem operárias e seu acasalamento ocorre dentro do ninho. *Strongylognathus* proporciona um

segundo possível exemplo da transição dulose para inquilinismo. *Strongylognathus testaceus* que apresenta poucas operárias não mata a rainha hospedeira *Tetramorium*; nunca foram observados ataques porque elas dependem da hospedeira (Hölldobler & Wilson, 1990).

A transição de parasitismo social temporário para completo inquilinismo foi demonstrada em *Formica talbotae*, uma espécie sem operárias, que vive com *F. obscuripes* e *F. duski* (Hölldobler & Wilson, 1990). A xenobiose levando ao inquilinismo é demonstrada pela coexistência no mesmo gênero de espécies xenobióticas e espécies inquilinas verdadeiras, ambas parasitas de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero (Hölldobler & Wilson, 1990). Os mesmos autores sugerem que *Kyidris* e *Formicoxenus* tiveram origem xenobiótica. Entretanto, Buschinger *apud* Maschwitz et al. (2000) sugere uma origem separada de inquilinismo, parasitismo temporário e dulose, todas evoluindo de um estado “pré-parasita” de poliginia facultativa.

Para alguns autores como Bourke & Franks (1991) o inquilinismo não evoluiu de outras formas de parasitismo social. Há evidências de que as espécies inquilinas tenham surgido (1) de uma espécie de vida livre (Hipótese interespecífica) (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990) ou (2) por especiação intraespecífica a partir da sua própria hospedeira (Hipótese intraespecífica). Esta última é aceita por diversos autores como Wheeler, Buschinger, entre outros (Bourke & Franks, 1991). O primeiro caso seria para espécies que estão pouco relacionadas com as suas hospedeiras e a segunda hipótese para as outras que estão muito relacionadas às hospedeiras. Estas teriam sido originadas por especiação simpátrica de inquilinas intraespecíficas. Nesses casos, isolamento reprodutivo em simpatria tem sido promovido por uma divergência associada ao tamanho no comportamento de produção de descendentes das formas parasitas de não parasitas.

Referências Bibliográficas

Aron, S., Passera, L. & Keller, L. 1999. Evolution of social parasitism in ants: size of sexuals, sex ratio and mechanisms of caste determination. **Proceedings of the Royal Society of London B. 266:** 173-177 p.

- Aron, S., Passera, L. & Keller, L. 2004. Evolution of miniaturization in inquiline parasitic ants: timing of male elimination in *Plagiolepis pygmaea*, the host of *Plagiolepis xene*. **Insectes Sociaux**. **51**: 395-399 p.
- Bolton, B. 1994. **Identification guide to the ant genera of the world**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 222 p.
- Bolton, B. 1995. **A new general catalogue of the ants of the world**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 504 p.
- Bourke, A.F.G, Franks, N.R. 1991. Alternative adaptations, sympatric speciation and the evolution of parasitic, inquiline ants. **Biological Journal of the Linnean Society**. **43**: 157-178 p.
- Bourke, A.F.G. & Franks, N.R. 1995. **Social evolution in ants**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 529 p.
- Brandão, C.R.F. & Mayhé-Nunes, A.J. 2001. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen.n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, **38**: 639-665p.
- Buschinger, A. 1986. Evolution of social parasitism in ants. **TREE**. **17**: 155-160p.
- Buschinger, A. 1989. Evolution, speciation, and inbreeding in the parasitic ant genus *Epimyrma* (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Evolution Biology**. **2**: 265-283 p.
- Crozier, R. H. & Dix, M. W. 1979. Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. **Behavior Ecology and Sociobiology**. **4**: 217-224 p.
- Dahbi, A., Cerdá, X & Lenoir, A. 1998. Ontogeny of colonial hydrocarbon label in callow workers of the ant *Cataglyphis iberica*. **Animal Physiology**. **321**: 395-402 p.
- Delabie, J.H.C., Fowler, H.G & Schindwein, M.N. 1993. Ocorrência do parasita social *Pseudoatta* sp. nova em ninhos de *Acromyrmex rugosus* em Ilhéus, Bahia: primeiro registro para os trópicos. In.: International Symposium on Pest Ants, 4, e Encontro de Mirmecologia, 11, Belo Horizonte, **Resumos**.
- Della Lucia, T. M. C., Oliveira, M. A., Araújo, M.S., Bento, S. M. S. & Oliveira, M. M. 1991. O comportamento de rainhas em colônia poligínica de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Formicidae: Attini). In.: Congresso Brasileiro de Entomologia, 13, Recife, **Resumos**.

- Della Lucia, T. M. C., Araújo, M.S., 1993. Fundação e estabelecimento de formigueiros. p. 60-83. In: Della Lucia, T. M.C (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Folha de Viçosa, Viçosa-MG.
- D' Ettore, P. & Heinze, J. 2001. Sociobiology of slave making ants. **Acta Ethology. 3:** 67-82 p.
- D' Ettore, P., Mondy, N., Lenoir, A. & Errard, C. 2002. Blending in with the crowd: social parasites integrate into their host colonies using a flexible chemical signature. **Proceedings of the Royal Society of London B. 269:** 1911-1918 p.
- Diehl-Fleig, E. 1995. **Formigas: organização social e ecologia comportamental**. Editora UNISINOS, São Leopoldo, 168 p.
- Dumpert, K. 1981. **The social biology of ants**. Great Britain: The Pitman Press. 298 p.
- Foitzik, S. & Heinze, J. 1998. Nestsite limitation and colony takeover in the ant *Leptothorax nylanderii*. **Behavioral Ecology. 9:** 367-375p.
- Fowler, H.G., Forti, L.C., Brandão, C.R. F., Delabie, J.H.C., Vasconcelos, H. L. 1991. Ecologia nutricional de formigas. p. 131-209. In.: Panizzi, J.R. & Parra, J.R. P. (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo integrado de pragas**. Manole/ CNPq, São Paulo.
- Handel, S. N. & Beattie A. J. 1990. Seed dispersal by ants. **Scientific American, 263 (2):** 76-83 p.
- Hannonen, M. & Sundström, L. 2003. Worker nepotism among polygynous ants. **Nature. 421:** 910 p.
- Heinze, J. & Keller, L. 2000. Alternative reproductive strategies: a queen perspective in ants. **TREE. 15:** 508-512 p.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990. **The ants**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 732 p.
- Hora, R.R., Delabie, J. H.C., Poteaux, C., Fénéron, R., Doums, C. & Fresneau, D. 2003. Primeiro caso de parasitismo social na subfamília Ponerinae. In.: Encontro de Mirmecologia, 16, Florianópolis (SC). **Anais...** p. 243-245 p.
- Hora, R.R., Doums, C., Poteaux, C., Fénéron, R., Valenzuela, J., Heinze, J., Fresneau, D. 2005. Small queens in the ant *Ectatomma tuberculatum*: a new

- case of social parasitism. **Behavior Ecology and Sociobiology**. **159**: 285-292 p.
- Keller, L. 1995. Social life: the paradox of multiple-queen colonies. **TREE**. **10**: 355-360 p.
- Lenoir, A., Fresneau, D. Errard, C & Hefetz, A. 1999. The individuality and the colonial identity in ants; the emergence of the social representation concept. 219-237 p. In.: Detrain, O., Deneubourg, J. L. & Pasteels, J. (Eds) **Information processing in social insects**. Birkhauser, Basel, Switzerland, 432 p.
- Lenoir, A., D' Ettore, P., Errard, C & Hefetz, A. 2001. Chemical ecology and social parasitism in ants. **Annual Review of Entomology**. **46**: 573-599 p.
- Lloyd, H. A., Schmuff, N & Hefetz, A. 1986. Chemistry of the anal glands of *Bothryomyrmex syrius* Forel: olfactory mimetism and temporary social parasitism. **Com. Biochem. Physiol.** **83**: 71-73 p.
- Mariconi, F. A. M. 1970. **As saúvas**. Editora Agronômica "Ceres", São Paulo, 167 p.
- Maschwitz, U., Dorow, W.H.E., Buschinger, A. & Kalytta, G. 2000. Social parasitism involving ants of different subfamilies: *Polyrhachis lama* (Formicinae) an obligatory inquiline of *Diacamma* sp. (Ponerinae) in Java. **Insectes Sociaux**. **47**: 27-35 p.
- Morel, L. & Vander Meer, R.K. 1988. Do ant brood pheromones exist? **Annals of Entomological Society of America**. **81**: 705-710 p.
- Mori, A., Grasso, D., Visicchio, R. & Le Moli, F. 2000. Colony founding in *Polyergus rufescens*: the role of the Dufour's gland. **Insectes Sociaux**. **47**: 7-10 p.
- Nonacs, P. & Tobin, J.E. 1992. Selfish larvae: development and the evolution of parasitic behavior in the Hymenoptera. *Evolution*. **46**:1605-1620p.
- Passera, L. Gilber, N. & Aron, S. 2001. Social parasitism in ants: effects of the inquiline parasite *Plagiolepis xene* St. on queen distribution and worker production of its host *Plagiolepis pygmaea* Latr. **Insectes Sociaux**. **48**: 74-79 p.
- Rico-Gray, V., Moutinho, P. S., Parra-Tabla, V., Cuautle, M. & Díaz-Castelao, C. 2004. Ant-plant interactions: their seasonal variation and effect on plant

- fitness. 221-239 p. In: Martinze, M. E. & Psaty, N. P. (eds.) **Ecological Studies**, v. 171, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Ruppell, O. & Heinze, J. 1999. Alternative reproductive tactic in females: the case of size polymorphism in winged ant queens. **Insectes Sociaux. 40:** p. 6-17.
- Savolainen, R. & Vepsäläinen, K. 2003. Sympatric speciation through intraspecific social parasitism. **PNAS. 100 (12):** 7169-7174 p.
- Schultz, T.R., Bekkevold, D. & Boomsma, J.J. 1998. *Acromyrmex insinuator* new species: an incipient social parasite of fungus-growing ants. **Insectes Sociaux. 45:** 457-471 p.
- Souza D. J. de, Soares, I.M.F. & Della Lucia, T.M.C. 2007. *Acromyrmex ameliae* sp.n. (Hymenoptera: Formicidae): a new social parasite of leaf-cutting ants in Brazil. **Insect Science. 14:** 251-257 p.
- Sumner, S, Hughes, W. O. H. & Boomsma, J.J. 2003a. Evidence for differential selection and potential adaptive evolution in the worker caste of an inquiline social parasite. **Behavior Ecology and Sociobiology. 54:** 256-263 p.
- Sumner, S., Nash, D.R & Boomsma, J.J. 2003b. The adaptive significance of inquiline parasite workers. **Proceedings of the Royal Society of London B. 270:** 1315-1322 p.
- Sumner, S., Anen, D. K., Delabie, J.H.C. & Boomsma, J.J. 2004. The evolution of social parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emerys's rule. **Insectes Sociaux. 51:** 1-6 p.
- Tinaut, A. & Ruano, F. 1999. Parasitismo social. **Bol. S.E.A. 26:** 727-740 p.
- Topoff, H. & Zimmerli, E. 1993. Colony takeover by a socially parasitic ant *Polyergus breviceps*: the role of chemicals obtained during host – queen killing. **Animal Behavior. 46:** 479-486 p.
- Vander Meer, R.K.V. & Morel, L. 1998. Nestmate recognition in ants. 79-103p. In.: Meer, R.K.V, Breed, N.D., Espelie, K.E. & Winston, M.L. **Pheromone communication in social insects**. U.S.A.: Wiestview Press. 368p.
- Wilson, E. O. 1971. **The insects societies**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Masschussets, 548 p.
- Wilson, E. O. 1984. Tropical social parasites in the ant genus *Pheidole*, with an analysis of the anatomical parasitic syndrome (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux. 31:** 316-334 p.

Metapleural glands of the social parasite *Acromyrmex ameliae* and of its host *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini)

***Acromyrmex ameliae* and *A. subterraneus subterraneus*'s metapleural gland**

Key words: *Acromyrmex*, metapleural gland, social parasitism, *Beauveria bassiana*.

I. M. F. Soares^{1,2*}, T. M. C. Della Lucia², A. S. Pereira², J. E. Serrão³, D. J. de Souza⁴ & O. Liparini⁵

¹ Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Educação, Campus VIII. Av. da Gangorra, 503, Bairro: Alves de Sousa, Paulo Afonso -BA 48608-240. ilka_soares@yahoo.com.br; ² Universidade Federal de Viçosa. Av. P. H. Rolfs, Departamento de Biologia Animal, Viçosa -MG. 36570-000. tdlucia@ufv.br; alichinhapereira@yahoo.com.br; ³ Universidade Federal de Viçosa. Av. P. H. Rolfs, Departamento de Biologia Geral Viçosa -MG. 36570-000. jeserrao@ufv.br

⁴ Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, CNRS UMR 6035, Université François Rabelais, 37200, Tours, France; E-mail : danivalbr@yahoo.com.br

⁵ Universidade Federal de Viçosa. Av. P. H. Rolfs, Departamento de Fitopatologia Viçosa -MG. 36570-000; E-mail: oliparini@ufv.br

* Author for correspondence.

Summary. Metapleural gland as a differential character in the social parasite *Acromyrmex ameliae* and its host *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Social parasites depend on their hosts for survival. Some parasitic species are very similar to their hosts, and may even belong to the same genus. *Acromyrmex ameliae* is an inquiline of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *A. subterraneus brunneus*. In parasitized colonies minor workers of darker color, pilosity and ridged tegument can be distinguished. We used the spiracle-bulla distance as well as bulla size of the metapleural gland as a distinguishing character between parasite and host workers. Analyses of the internal anatomy of the metapleural gland of the parasite workers were conducted as well as survivorship tests of both species when exposed to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. We verified that the spiracle-bulla distance is larger and that the reservoir is smaller in the parasite when compared with the host. Consequently *A. ameliae* had higher mortality rate when exposed to *Beauveria basiana* in comparison to its host *A. subterraneus subterraneus*.

Introduction

Social parasites exploit the colonies of free-living social insects and consequently exhibit morphophysiological and behavioral adaptations. Often they are relatives of their host and thus share several characteristics (Bourke & Franks, 1991).

There are several types of associations in social parasitism, but inquilinism is the most derived relationship. In this case, as in dulotic ants, the socially parasitic species depends on the host throughout all of its life cycle and a worker caste may or not exist (Tinaut & Ruano, 1999). When the worker caste occurs, it is produced in small numbers and is not capable of performing all necessary tasks for colony maintenance such as foraging and brood care (Hölldobler & Wilson, 1990), although, Sumner et al. (2003b) reported that the worker caste of the inquiline *Acromyrmex insinuator* is able to perform some tasks.

Among these tasks, suppression of microbial activity by secretions of the metapleural gland is one of the more characteristic. These glands are one pair positioned at the posterior end of the mesosoma (Hölldobler & Wilson, 1990) and are unique to ants. In leaf-cutting ants the antibiotics produced are critical for protecting the ants and the fungus garden against pathogenic bacteria and fungi (North et al., 1997; Bot et al., 2002).

Several studies demonstrate that minor workers have proportionally larger metapleural glands in relation to their body size in comparison to larger workers since the former are primarily responsible for the active cleaning of the fungus garden (Bot & Boomsma, 1996; Bot et al., 2002). However, minor workers of social parasites have smaller metapleural glands and are less efficient in combatting pathogens (Sumner et al., 2003a).

Acromyrmex ameliae an inquiline social parasite of *A. subterraneus subterraneus* and *A. subterraneus brunneus*, produce a few workers of the minor caste (Souza et al., 2007). According to Sumner et al. (2003a) morphological characteristics such as the distance from spiracle to bulla of the metapleural gland and the size of the bulla can be used to separate minor workers of *A. insinuator* from the host worker in *A. echinator*.

Our study aimed at determining if morphological distinctions in the metapleural gland can be observed in *A. ameliae* and may be used to separate them from their host species *A. subterraneus subterraneus*. We also evaluated survival of the minor worker in both species, parasite and host in contact with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, that occurs naturally in *Atta sexdens piriventris* (Diehl-Fleig et al, 1992). In this case, our hypothesis was that *A. ameliae* workers would have higher mortality than the host since they should have smaller metapleural glands and as consequence, lower protection against pathogens.

Material and methods

Parasitized colonies of *A. subterraneus subterraneus* were collected at the Fazenda Itapoã (V & M Florestal Ltda) in Paraopeba-MG (19° 17'S; 44° 29'W) on October 6, 2003 and November 11, 2004 in stands of *Eucalyptus camaldulensis*. These colonies were maintained in the laboratory at 24°C ±

2°C; 68% ± 4% R.H. and 12:12 (L:D) and were supplied with *Ligustrum japonicum* and *Acalypha wilkesiana* leaves.

Identification of the worker caste in A. ameliae and size of the metapleural gland.

A total of 300 minor workers were randomly removed from three parasitized colonies. Legs were removed to facilitate metapleural gland visualization. The bulla was viewed through an Euromex binocular microscope at 100X magnification, a photograph taken with a Nikon Coolpix 4500 digital camera viewed on a computer screen. The following measures were taken using the computer package Image Pro-Express (Media Cybernetics, Inc.): (1) The shortest distance between the bulla and the spiracle (Fig. 1) and (2) the width of the ventral side of the pronotum. Twenty minor workers of *A. subterraneus subterraneus*, and 20 minor workers of *A. ameliae* and 11 gynes of the host species and 19 gynes of the parasite species were measured to determine if there were size differences between them.

Analyses of the distance bulla-spiracle were conducted using generalized linear models (Crawley, 2002), that were processed by the R software (R Development Core Team, 2005). An exponential model was used to analyze the size of the bulla. In all cases the residual analyses were carried out to verify the error distribution and the acceptability of the models used. All these models were simplified to remove the non-significant variables.

In the study of the metapleural gland, 20 minor workers proeminent eyes, rugous body covered by abundant pilosity in addition to the differences in bulla size and distance spiracle-bulla. the parasite were dissected and their metapleural glands were fixed in Bouin's solution for 24 h. This was followed by dehydration using increasing concentrations (70%, 80% and 95%) of ethanol for two minutes in each concentration. After fixation, they were embedded in JB - 4 resin. The histological sections were 5µm thick and were stained with Harri's hematoxilin and eosin. The reservoir and the collecting chamber of the glands were measured to calculate the average size of the reservoir.

Defense against the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana

To examine whether parasite and host workers differed in their resistance to disease, a spore suspension of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* was applied to minor workers of both ant species. The conidia suspension was obtained from the commercial product Bovenat PM[®]. The concentrated conidia suspension was prepared by suspending 50 g of the commercial product in 200 ml distilled water. The suspension was continuously agitated for 5 minutes and let rest for 5 more minutes until precipitation of the inert portion of the product was verified. The supernatant was decanted from the conidial suspension and diluted to 6.0×10^6 , 6.0×10^7 and 6.0×10^8 conidia/ml after adjustment in a Neubauer chamber.

Initially 510 minor workers of *A. subterraneus subterraneus* were removed from their parasitized colonies to evaluate dose-response. Thirty of these workers were used as control so that

they received water on their thoraces. Two hours after ant removal from their colonies they were placed in 90mm Ø Petri-dishes, in groups of 10. One µl of the fungus solution was applied to the thorax of each 160 ants per concentration. They were held at 25°±5C and 75±5% de R.H.

The concentration that inflicted the highest mortality (6.0×10^8) (Fig. 8) was applied on the thorax of 100 minor workers of the parasite species, that were previously identified by their color, pubescence and bulla spiracle separation. Ants were daily monitored until death. Dead ants were removed and transferred to different Petri dishes, since the activity of grooming a dead ant could increase mortality through acquisition of fungus by another ant. Dead ants were monitored for the appearance of spores diagnostic of *B. bassiana*.

The survival distributions were examined by a Weibull analysis (Crawley 2002).

Results

Identification of the worker caste in A. ameliae and size of the metapleural gland.

The distance spiracle-bulla of the minor workers revealed the existence of two species ($F_{1,298} = 551.36$, $P < 0.001$): one, the host, has a distance spiracle-bulla less than 0.02 mm (Figs. 1a and 2) whereas in the other species, the parasite, this distance is approximately 0.07, on average (Figs. 1b and 2). The pronotum size is different between these two species ($F_{1,316} = 408.88$, $P < 0.001$): the host had 0.7 ± 0.1 mm and the parasite $\sim 1.5 \text{ mm} \pm 0.05$ (Fig. 3). Bulla size also significantly differed between them ($F_{1,47} = 89.68$, $P < 0.001$): host has $\sim 0.2 \pm 0.03$ mm and parasite 0.16 ± 0.03 mm (Fig. 4). The same results were obtained with the gynes of both species: the bulla size was statistically different between both species ($F_{1,26} = 2.05$, $P < 0.001$): host gynes has 0.31 ± 0.1 mm and parasite gynes 0.45 ± 0.06 mm (Fig. 5).

Preliminary genetic analyses confirmed that the workers with those characteristics did belong to different species. The parasite *A. ameliae* produced workers with prominent eyes, rugous body covered by abundant pilosity in addition to the differences in bulla size and distance spiracle-bulla.

The internal morphology of the metapleural gland of *A. ameliae* follows the same pattern as observed in other species of Attini. The gland is composed by prismatic secretory cells that are organized in clusters and discharge by small ducts in a chitinous chamber, the collecting chamber that is connected to the gland reservoir. This reservoir is a wide sclerotized cavity (Fig. 6). The small ducts discharge in several sites named crivate plates (Fig. 6). The sizes of the reservoir and of the collecting chamber in the minor workers were $16,658.71 \mu\text{m}^2$ and $4,328.87 \mu\text{m}^2$, respectively. The morphological design of the secretory cells of *A. ameliae* allows its identification in class III of the Noirot & Quennedey (1991) classification. In some secretory cells their nuclei were large with little condensed chromatin (Fig. 6).

Defense against the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana

All concentrations of the fungus were lethal to the minor workers of *A. subterraneus subterraneus* and the highest concentration promoted the most rapid death ($\chi^2_{(3,476)} = 2998.29$, $P < 0.001$) (Fig.7).

Survival time of the parasite species was much shorter (1.4 days) when compared to that of the host species, whose life expectancy was about 6 times longer (8.8 days) ($\chi^2_{(1,246)} = 1124.83$, $P < 0.001$) (Fig.8).

The last worker of the host exposed to the highest dose died within 48 days as opposed to 9 days for the parasite.

Intense grooming was observed in the experiment so that we removed dead ants from the Petri dish. Even though the presence of hyphae on the top of live ants and on the Petri dish was observed, spore development occurred only when the ants were dead and isolated (Fig. 9).

Discussion

The size of the bulla of the parasite species was significantly smaller than that of the host species. In addition, the metapleural gland of *A. ameliae* worker has been shown to have a smaller reservoir (16,658.71 μm^2) than that of *A. subterraneus subterraneus* worker 35,644.02 μm^2 (Souza et al., 2006).

The difference in size of the metapleural gland between the gynes of the parasite and the host was not found by Sumner et al. (2003a) with the parasite *A. insinator*. According to these authors, this can be related to the fact that both gynes are exposed to the same risks of infection at the moment of the search (parasite) or the nest foundation (host). It is likely that in *A. ameliae* infection risks are lower since the nests are all very close together in the field. Furthermore, some queens mate inside the colony and remain there; this was observed sometimes in our laboratory colonies. According to Dumpert (1981) parasite species that mate inside the colony such as *Anergates atratulus* and *Teleutomyrmex schneideri* do not even have these glands.

Internal morphology of *A. ameliae* follows the same pattern observed in other Attini (*Atta bisphaerica*, *A. laevigata* and *A. sexdens* (Schoeters & Billen, 1993), *Acromyrmex octospinosus* (Bot et al., 2001); *A. sexdens rubropilosa*, *A. bisphaerica* and *A. capiguara* (Gusmão et al. 2001)). The presence of type III secretory cells should be emphasized. These cells are usually connected to the exterior via a duct; they are frequently involved in the secretion of defense and pheromone substances (Chapman, 1998).

The presence of cells with large nuclei and little condensed chromatin reinforces the hypothesis that secretory cells conduct intense proteic synthesis since discondensed chromatin is responsible for the active transcription of RNAs, that perform the synthesis of protein along with the help of other molecules (Alberts et al. 2002).

The fact that both bulla and reservoir sizes of the metapleural gland in *A. ameliae* workers are smaller than in the host indicates that the parasite should produce lesser amounts of antibiotic substances and therefore be more susceptible to entomopathogenic fungi. We confirmed this by

demonstrating reduced survival compared to the free living species *A. subterraneus subterraneus*. These data are similar to those of Bot et al. (2001) with the host *Acromyrmex octospinosus*.

The low life expectancy of *A. ameliae* in comparison to its host is also similar to the data reported by Sumner et al. (2003a) in *A. insinator*, a parasite of *A. echinator* when exposed to the fungus *Metarhizium anisopliae*.

More than 20 compounds have already been described in the secretion of substances by the metapleural glands of leaf-cutting ants (Ortius-Lechner et al., 2000); some of them are known for their antibacterial and antifungal activities such as the 3-hydroxidecanoic acid and specially the indolacetic acid (Nascimento et al., 1996, Bot et al., 2002). Although the size of the metapleural gland increases with caste size, the immunological role is more effective when the insects are together. Hughes et al (2002) reported that mortality of *A. echinator* workers treated with *M. anisopliae* was higher than when they were isolated from their nestmates in comparison to their mortality in groups. The number of fungal spores was lower in ants kept in groups as opposed to isolated individuals due to spore removal by the nestmates during grooming. It is known that this activity increases in leaf-cutting ants when they are exposed to pathogens (Currie & Stuart, 2001).

Hughes et al (2002) verified that under high dosages of fungal spores, the benefits from life in group occurred only when all individuals are exposed to the pathogen. This suggested that direct exchanges (grooming between nestmates) by an individual stimulates its defense mechanism to a higher level than indirect changes by an infected nestmate.

Sumner et al. (2003a) suggested that workers of *A. insinator*, although bearing smaller metapleural glands and therefore more susceptible to infections, might invest their energy in other activities as, for example, increasing their queen survival and reproduction (Sumner et al., 2003b). They also explored the immunological collective system of their host. It is likely that this last characteristic occurs with *A. ameliae*, i.e., that it does not benefit only from the immune system of the host but also from its foraging and cutting activity since there is no production of larger workers in this species.

The morphological characters, such as the distance spiracle-bulla, that is highly important for the distinction between *A. insinator* and *A. echinator* (Sumner et al., 2003a), are also very important in the differentiation in *A. ameliae* and its host *A. subterraneus subterraneus*. They will be further used in the selection of individuals to be included in behavioral investigation.

Acknowledgements

We are very grateful to several people who helped us in the experiments and preparation manuscript: Dr. Ricardo M. Della Lucia, Dr. Phil Stansly, Dr. Rosa Muchovej, Dr. Ronaldo Reis Jr., Dr. Mara Garcia, Leandro Souto, Ana Paula, Robson Minateli., Andréia Borges and Daniela Maria Leroy e Vieira. This research was financed by CNPq/PRONEX / FAPESB (n° 158/03).

References

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K and Watson J. D. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publish, New York. 1294 pp.

- Bot A. N. M. and Boomsma J. J. 1996. Variable metapleural gland size-allometries in *Acromyrmex* leafcutter ants (Hymenoptera: Formicidae). *J Kans Entomol Soc.* **69**: 375-383.
- Bot A. N. M., Obermayer M, L., Hölldobler B. and Boomsma J. J. 2001. Functional morphology of the metapleural gland in the leafcutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Insect. Soc.* **48**: 63-66.
- Bot A. N. M., Lechner D. O., Finster K., Maile R. and Boomsma J. J. 2002. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural gland of leaf – cutting ants. *Insect. Soc.* **49**: 363-370.
- Bourke A.F.G. and Franks N.R. 1991 Alternative adaptations, sympatric speciation and the evolution of parasitic, inquiline ants. *Biol. J. Lin. Soc.* **43**: 157-178.
- Chapman R. F. 1998. *The insects: structure and function*. 4 ed. Cambridge University Press, Cambridge. 770 pp.
- Crawley M. J. 2002. *Statistical computing: an introduction to data analysis using S-Plus*. John Wiley & Sons. Chichester. 761pp.
- Currie C. R. and Stuart A. E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **268**: 1033-1039.
- Diehl-Fleig E. 1992. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.). Vuill. no Rio Grande do Sul. *Acta Biol. Leopoldensia.* **14**: 99-104.
- Dumpert, K. 1981. *The social biology of ants*. The Pitman Press. Great Britain . 298 pp.
- Gusmão L. G. de, Caetano F. H. and Nakano O. 2001. Ultramorphology of the metapleural gland in three species of *Atta* (Hymenoptera, Formicidae). *Iheringia.* **91**: 33-36.
- Hölldobler B. and Wilson E. O. 1990. *The Ants*. Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge Massachussets. 732 pp.
- Hughes W. O. H., Eilenberg J. and Boomsma J. J. 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **269**: 1811-1819.
- Nascimento R. R. do, Schoeters E., Morgan E. D., Billen J. and Stradling D. J. 1996. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Chem. Ecol.* **22**: 987-1000.
- Noirot C., Quenedey A. 1991. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Annals. Soc. Ent. Fr.* **27**: 123-128.
- North R. D., Jackson C. W. and Howse P. E. 1997. Evolutionary aspects of ant fungus interactions in leaf cutting ants. *TREE.* **12**: 386-389.
- Ortius-Lechner D., Maile R., Morgan E. D. and Boomsma J. J. 2000. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance. *J. Chem. Ecol.* **26**: 1667-1683.
- Schoeters E. and Billen J. 1993. Anatomy and fine structure of the metapleural gland in *Atta* (Hymenoptera, Formicidae). *Belg. J. Zool.* **123**: 67-75.
- Souza A. B. de, Soares I. M. F., Cyrino L. T. and Serrão J. E. 2006. The metapleural gland in two subspecies of *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae) *Sociobiology.* **47**: 19-25.
- Souza D. J. de, Soares I.M.F. and Della Lucia T.M.C. 2007. *Acromyrmex ameliae* sp.n. (Hymenoptera: Formicidae): a new social parasite of leaf-cutting ants in Brazil. *Insect Science* (in press).
- Sumner S., Hughes W. O. H. and Boomsma J. J. 2003a. Evidence for differential selection and potential adaptive evolution in the worker caste of an inquiline social parasite. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **54**: 256-263.
- Sumner S., Nash D. R. and Boomsma J. J. 2003b. The adaptative significance of inquiline parasite workers. *Proc. R. Soc. London. B.* **270**: 1315-1322.
- Sumner S., Anen D. K., Delabie J. H. C. and Boomsma J. J. 2004. The evolution of social parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emerys's rule. *Insect. Soc.* **51**: 1-6.
- Tinaut A. and Ruano F. 1999. Parasitismo social. *Bol. S.E.A.* **26**: 727-740.

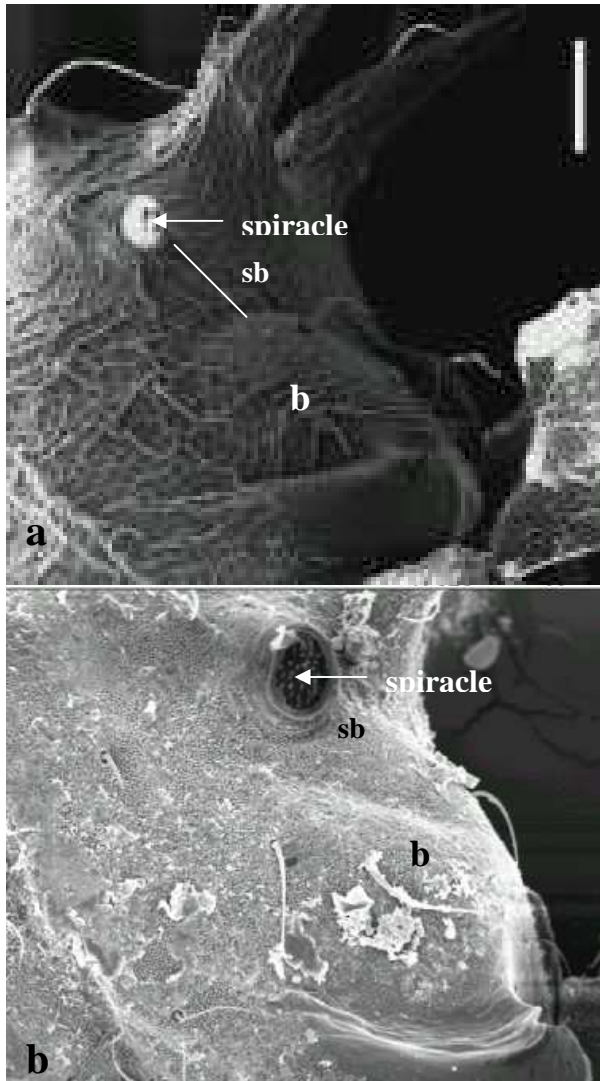


Fig. 1: Metapleural gland of **a** *Acromyrmex ameliae* (120 μm) and **b** *A. subterraneus subterraneus* (100 μm). The bulla is indicated by the letter (b) and the distance spiracle-bulla is indicated by (sb)

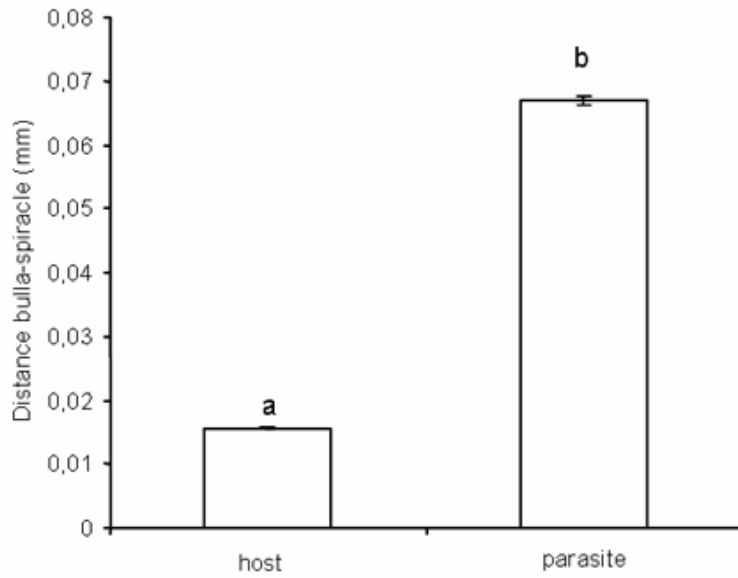


Fig. 2 The distance between the spiracle and the bulla in minor workers of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Acromyrmex ameliae*.

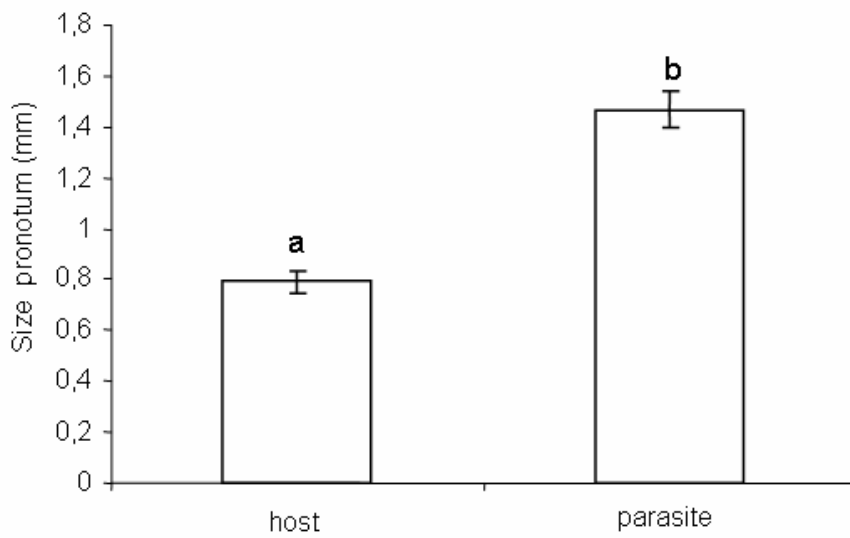


Fig. 3 Pronotum width in minor workers of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Acromyrmex ameliae*

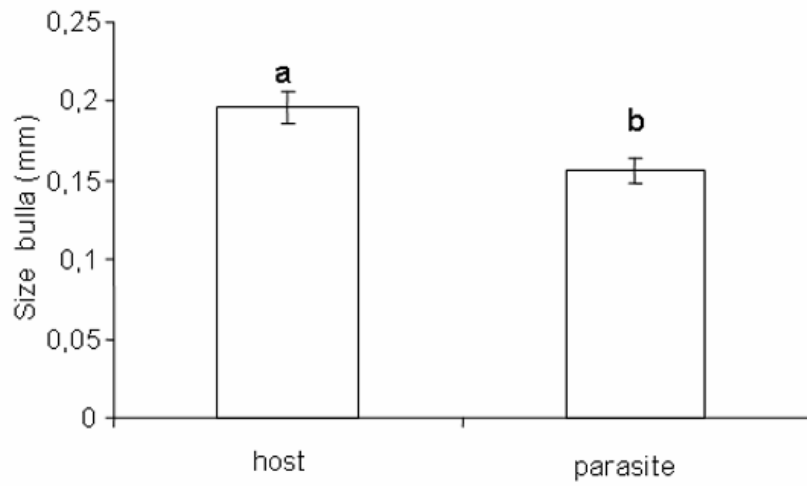


Fig. 4 Bulla size in minor workers of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Acromyrmex ameliae*.

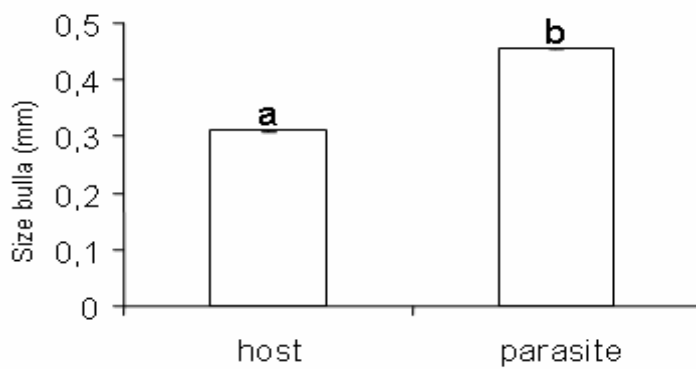


Fig. 5 Bulla size in gynes of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Acromyrmex ameliae*.

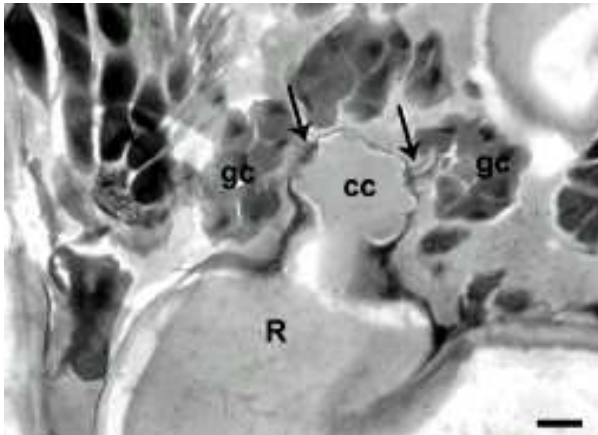


Fig. 6 Cross section of the metapleural gland *Acromyrmex ameliae*, under light microscopy, showing the reservoir (R), the collecting chamber (cc), the glandular cells (seta); cells with the enlarged cell nucleus and little condensed chromatin (square) and the crivate plate (square). Scale: is equivalent to 8 mm.

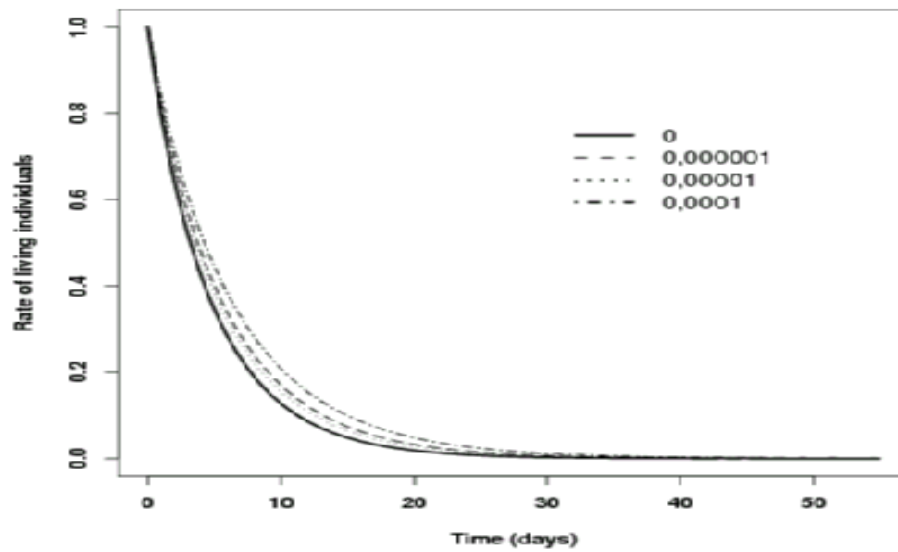


Fig. 7 Survivorship curves of the minor workers of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* in the various concentrations of *Beauveria bassiana*

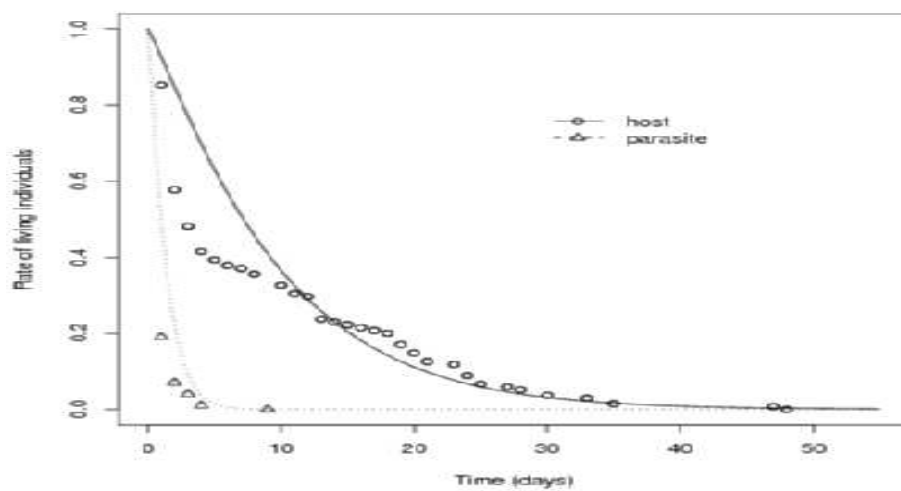


Fig. 8 Survivorship curves of the minor workers of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (circle) and *Acromyrmex ameliae* (triangle) under the highest dosage (0.001) of *Beauveria bassiana*



Fig. 9 *Acromyrmex ameliae* with the fungi *Beauveria bassiana*

**CAPÍTULO 2: BIOLOGIA REPRODUTIVA COMPARADA DA
PARASITA SOCIAL *Acromyrmex ameliae* E DE SUA HOSPEDEIRA
Acromyrmex subterraneus subterraneus (HYMENOPTERA: FORMICIDAE:
ATTINI)**

INTRODUÇÃO

As formigas parasitas sociais, por terem limitações morfofisiológicas e comportamentais, exploram as colônias de outros insetos sociais. Geralmente, elas estão muito relacionadas às suas hospedeiras (Sumner et al., 2004). *Acromyrmex ameliae* é uma parasita social do tipo inquilinista e possui poucas operárias menores muito semelhantes às das suas hospedeiras: *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *A. subterraneus brunneus*.

Sexuados das espécies parasitas são, em geral, menores que as rainhas das espécies hospedeiras. Alguns autores acreditam que a redução do tamanho pode ter evoluído como um meio da espécie levar vantagem no sistema de determinação da casta da hospedeira (hipótese da miniaturização), tanto que larvas das parasitas podem se desenvolver quando a hospedeira não produz sexuados, além das larvas das parasitas desenvolverem em sexuados com menor quantidade de alimento do que a requerida para produzir operárias (Bourke & Franks, 1991; Nonacs & Tobin, 1992). O pequeno tamanho diminui a capacidade das operárias hospedeiras em distinguir entre seus imaturos e os da parasita, como acontece com *Plagiolepis xene*, inquilina parasita de *Plagiolepis pygmaea* (Aron et al., 1999). Além disso, o pequeno tamanho facilita a sujeição da parasita à rainha hospedeira nas inquilinas extremas (espécies sem operárias) como acontece com *Teleutomyrmex* e *Pseudomyrmex* (Hölldobler & Wilson, 1990).

Outros caracteres reprodutivos diferenciam as espécies parasitas sociais das suas hospedeiras. Observa-se a influência da espécie parasita (tanto rainhas quanto operárias) sobre os parâmetros reprodutivos da rainha hospedeira em colônias parasitadas. Sumner et al. (2003) observaram que as operárias de *Acromyrmex insinuator*, inquilina de *Acromyrmex echinaior*, são essenciais para a produção de formas sexuadas da parasita, sugerindo que esse atributo é uma das

principais funções das operárias. Operárias parasitas ainda inibem a reprodução da rainha hospedeira. Em *P. pygmaea* é a rainha parasita de *P.xene* que inibe a produção de ovos, diminuindo significativamente o número de suas operárias em colônias de laboratório (Passera et al., 2001).

Características internas do aparelho reprodutivo também demonstram diferenças entre parasitas sociais e suas hospedeiras. *Ectatomma tuberculatum* é uma Ectatomminae que apresenta dimorfismo no tamanho das rainhas e diferenças no número de ovócitos das mesmas (Hora et al., 2001; Hora et al., 2005). As microginas são especializadas na produção de microginas e machos e, raramente, operárias; as macroginas produzem maior número de operárias, mas nunca produzem microginas e vice-versa (Hora et al., 2003).

Este trabalho objetivou estudar características da reprodução de *A.ameliae*, uma parasita social, recém-descrita de *A. subterraneus subterraneus* e *A. subterraneus brunneus*. Assim, procurou-se determinar o período de revoada em laboratório, a redução no tamanho dos machos e fêmeas. Objetivou-se, ainda, efetuar análises morfológica e histológica do aparelho reprodutor feminino e determinar a produção de ovos de *A. ameliae* e de *A. subterraneus subterraneus* comparando-as na hospedeira e na parasita.

Foram testadas as seguintes hipóteses: 1) Fêmeas de *A. ameliae* sofreram redução de tamanho além do observado nas operárias maiores da hospedeira *A. subterraneus subterraneus*; 2) A produção de ovos na espécie parasita é menor que na subespécie hospedeira; 3) Rainhas e / ou operárias parasitas interferem na produção de ovos da rainha hospedeira.

MATERIAL E MÉTODOS

As colônias parasitadas de *A. subterraneus subterraneus* foram coletadas na Fazenda Itapoã de propriedade da V & M Florestal Ltda, em Paraopeba (MG) (19° 17'S; 44° 29'W) durante o ano de 2003 e novembro de 2004. Todas elas possuíam apenas uma rainha hospedeira, mas números variáveis de rainhas parasitas.

Período de revoada em laboratório e proporção sexual: Dos dez formigueiros que produziram sexuais no laboratório, dois com grande produção de sexuais, foram usados posteriormente para calcular a proporção sexual de *A.*

ameliae. Foi contado o número de sexuais (machos e fêmeas) parasitas em cada formigueiro. O número total de fêmeas foi dividido pelo de machos para se obter a razão sexual.

Redução do tamanho dos sexuais: Para testar se *A. ameliae* possui indivíduos significativamente menores que os da hospedeira *A. subterraneus subterraneus*, foram medidos os comprimentos de 44 machos, 30 fêmeas e 50 operárias maiores da subespécie hospedeira e 150 machos e 151 fêmeas da espécie parasita.

A medida das operárias maiores teve como objetivo verificar se a rainha parasita é menor que as operárias maiores da hospedeira.

Descrição do aparelho reprodutor feminino: Uma vez que a morfologia do aparelho reprodutor de *A. subterraneus subterraneus* já tinha sido descrita por Antunes *et al.* (2002) e como pouco se conhece a respeito do assunto em parasitas sociais, fêmeas de *A. ameliae* foram retiradas de duas colônias e dissecadas para contagem do número de ovários e ovócitos maduros no seu aparelho reprodutor.

Ovários de três fêmeas foram transferidos para Bouin por 24h. Após esse período eles foram desidratados em série crescente de etanol e embebidos em resina JB-4. As secções com 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina (Antunes *et al.*, 2002).

Comparação da oviposição de A. subterraneus subterraneus e de A. ameliae e influência das operárias e rainhas parasitas sobre a postura da rainha hospedeira:

Três colônias de *A. subterraneus subterraneus* foram usadas nesse experimento. A quantidade de fungo foi de 5000, 3100 e 2000 mL. Vinte rainhas parasitas dealadas foram encontradas nas colônias, sendo que, deste total, 14 ovipositaram.

A influência da espécie parasita sobre a oviposição da hospedeira foi testada por meio dos ensaios apresentados na Tabela 1. A oviposição das rainhas hospedeira e parasitas sozinhas foi feita com o objetivo de compará-las posteriormente com aquela na presença de operárias das duas espécies (10 operárias no total), além de verificar se também a rainha parasita interferiria na produção de ovos da rainha hospedeira. Em razão do pequeno número de operárias parasitas e da maior quantidade de rainhas de *A. ameliae* optou-se por utilizar baixo número de operárias desta espécie no experimento 4 (Tabela 1).

Além disso, a proporção de operárias parasitas na colônia foi previamente determinada em aproximadamente 3%.

Em cada experimento, os indivíduos foram isolados em copos plásticos de poliestireno com tampa, por um período de 16h e alimentados com uma dieta de água e mel (Marinho & Della Lucia, 1998). As rainhas eram retiradas às 8:00h do formigueiro e colocadas de volta às 24h. A partir da retirada, eram contados os números de ovos a cada 4 horas (12h, 16h, 20h e 24h). As rainhas que ovipositaram foram marcadas no gáster com tinta atóxica ao final do experimento 3 e usadas posteriormente no experimento 4.

No experimento 5 que objetivou analisar a influência das rainhas parasitas sobre a oviposição da rainha hospedeira, esta ficou isolada fisicamente das rainhas parasitas, mas tubos plásticos foram conectados entre os copos plásticos de poliestireno (Fig. 1), de modo que apenas substâncias voláteis poderiam influenciar na postura dessas rainhas. Considerou-se que se ocorrer interferência da rainha de *A. ameliae* sobre a oviposição da rainha da subespécie hospedeira, esta deve se dar especialmente por meio químico, em razão das rainhas parasitas estarem geralmente distantes fisicamente da hospedeira no jardim de fungo (observação pessoal).

Para verificar se todas as fêmeas da espécie parasita que ovipositaram foram fecundadas, 30 dessas fêmeas foram dissecadas e suas espermatecas examinadas.

TRATAMENTOS

- 1) Rainha hospedeira isolada (n=6)
 - 2) Rainha hospedeira, com 7 operárias hospedeiras e 3 parasitas (n=6)
 - 3) Rainhas parasitas isoladas (n=20)
 - 4) Rainhas parasitas com 8 operárias hospedeiras e 2 parasitas (n=16)
 - 5) Rainha hospedeira (n=5) e rainhas parasitas (n=15): 1x2; 1x2; 1x5: 1x2; 1x4
-

Tabela 1: Tratamentos no estudo comparativo de oviposição das rainhas hospedeira e parasita

RESULTADOS

Período de revoada em laboratório e proporção sexual: Dez colônias de *A. subterraneus subterraneus* produziram sexuais parasitas em abundância, de outubro a fevereiro resultando em drástica diminuição do fungo e até morte de duas dessas colônias. Pequena quantidade desses sexuais ocorreu até maio. Casais em cópula foram observados no laboratório. Acredita-se que algumas dessas fêmeas sejam readotadas por suas colônias, visto que o número observado de fêmeas parasitas no tratamento 4 – que ocorreu algumas semanas após – foi maior, em alguns casos, do que no tratamento 3 que foi realizado semanas antes.

A proporção sexual de fêmeas aladas em relação a de machos foi de 5:1.

Em 2005 não foram observados vôos nupciais no laboratório, fato verificado em 2003 e 2004, entretanto alguns casais foram observados copulando no interior da colônia.

Em novembro de 2006 foi observada grande produção de machos em algumas colônias. Durante esse período também foi observado que as operárias hospedeiras transportavam machos vivos de dentro da esponja de fungo e da arena para o lixo.

Redução do tamanho dos sexuais: O tamanho dos sexuais de *A. ameliae* foi significativamente menor do que da sua hospedeira *A. subterraneus subterraneus*.

O tamanho do macho diferiu entre *A. ameliae* (<7.0 mm) e *A. subterraneus subterraneus* que tem quase 8.0 mm ($F_{1,192}=137.60$, $P < 0.001$) (Fig. 2). As fêmeas parasitas também apresentaram menor tamanho, com cerca de 8.0 mm de comprimento enquanto fêmeas da hospedeira chegaram a aproximadamente 10.0 mm ($F_{1,179}=1071.2$, $P < 0.001$) (Fig. 3). A redução no tamanho corporal das fêmeas de *A. ameliae* é menor que as maiores operárias de *A. subterraneus subterraneus* (~10.0 mm), havendo diferença estatística entre elas ($F_{1,199}=921.07$, $P < 0,001$) (Fig.4)

Descrição do aparelho reprodutor feminino: O arranjo do aparelho reprodutor é característico daqueles observados em outras formigas. É formado por um par de ovários, constituído por treze a quinze ovariolos por ovário. Poucos ovariolos apresentavam ovócitos desenvolvidos. O número de ovócitos maduros

por ovariolo era de apenas um. Oviduto comum, vagina e espermateca foram também visualizados. A volumosa espermateca quando vazia, é transparente, mas quando a fêmea está fecundada ela tem uma coloração perolada. Como em todos os Hymenoptera, os ovários são meroísticos politróficos. No germário, em sua porção apical estão presentes as ovogônias que posteriormente se dividem originando os cistos onde são identificadas, além do ovócito, as células nutridoras com núcleo desenvolvido e cromatina pouco condensada (Fig. 5b 5c). Na região do vitelário já é possível identificar os folículos constituídos pelas câmaras nutridoras e ovocíticas, sendo as primeiras delimitadas por células foliculares achatadas, enquanto na câmara ovocítica estas se mostram colunares.

As paredes dos ovidutos laterais e comum são formadas por uma musculatura bem desenvolvida, revestindo um epitélio simples de células achatadas com núcleo com predomínio de cromatina condensada. Internamente a luz do oviduto é revestida por uma cutícula espessa apresentando projeções em forma de espinhos em direção à luz (Fig. 5a).

Comparação da oviposição de A. subterraneus subterraneus e A. ameliae e influência das operárias parasitas sobre a postura das rainhas hospedeira e parasita:

Fêmeas de *A. subterraneus subterraneus* ovipositaram significativamente mais do que as de *A. ameliae* ($F_{1,41} = 149.04$, $P < 0.001$) (Fig. 6). Enquanto as rainhas da subespécie hospedeira sozinhas, ovipositaram aproximadamente 250 ovos quando isoladas em 16h, as rainhas parasitas ovipositaram, na mesma situação, menos de 100 ovos. Tanto as rainhas quanto as operárias parasitas não interferiram significativamente na oviposição da rainha hospedeira. Do mesmo modo, a presença das operárias de ambas parasita e hospedeira não interferiu na oviposição de *A. ameliae* (Fig. 7).

Das 30 fêmeas dealadas da parasita que ovipositaram, 11 estavam fecundadas, ou seja, com espermateca cheia de espermatozoides enquanto 10, embora tivessem nos ovários características de que tinham ovipositado, tinham espermatecas vazias (Fig. 8). É possível que os ovos que essas fêmeas colocaram, tratavam-se de ovos tróficos, ou poderiam ser ovos que dariam origem a machos. As demais (n=9) não tinham ovários desenvolvidos.

DISCUSSÃO

A produção de sexuais por *A. ameliae* durante alguns meses do ano, especialmente de outubro a fevereiro, leva ao declínio da colônia e em alguns casos à morte da mesma o que é comum em outras Attini (Bekkevold & Boomsma, 2000; Bueno et al 2002). É provável que o comportamento de retirada de machos de dentro da câmara de fungo e arena de forrageamento seja uma estratégia da espécie hospedeira para diminuir a depredação causada por eles ao jardim de fungo uma vez que eles se alimentam muito. Foi observado comportamento semelhante em *A. insinuator* quando os recursos alimentares das colônias hospedeiras estavam em declínio (Bekkevold & Boomsma, 2000).

Algumas fêmeas virgens perderam suas asas e permaneceram na colônia. Isso sugere que essas fêmeas colaboram com a produção de machos da colônia, uma vez que os machos são originados de ovos não fertilizados em espécies haplodiplóides de acordo com (http://en.wikipedia.org/wiki/Johann_Dzierzon. Acesso em 18/02/2007). Fêmeas acasaladas foram readotadas por sua colônia-mãe, justificando o número alto de rainhas em alguns ninhos e a diferença desse número entre os experimentos. Dados semelhantes foram observados na espécie parasita *A. insinuator*. Essa espécie produz de duas a 36 descendências de sexuais por ano e após cessar a produção destes, aparentemente, há declínio dos recursos alimentares na colônia (Bekkevold & Boomsma, 2000). Estes mesmos autores também observaram que ginas dealadas continuaram na sua colônia-mãe.

A mudança no comportamento de cópula (inicialmente apresentavam vôo nupcial e posteriormente acasalamento dentro do ninho) pode promover a endogamia. Acasalamento intranidal é comum em algumas espécies parasitas sociais dos gêneros *Epimyrmica*, *Teleutomyrmex* e *Anergates* sendo que, com exceção de *Epimyrmica* spp., as outras não são endogâmicas. Tais espécies apresentam limitações morfofisiológicas como: asas reduzidas e baixa capacidade de dispersão (Gösswald *apud* Dumpert, 1981; Buschinger, 1989), características que juntamente com a agregação de ninhos são muito comuns em parasitas sociais. Em *A. ameliae*, possivelmente o vôo nupcial continua sendo realizado normalmente no campo e há menor readoção de rainhas, uma vez que os ninhos estão muito próximos.

A proporção sexual baseada em fêmeas, isto é, grande produção de fêmeas aladas quando comparada ao número de machos, como observada em *A. ameliae*, é característica de algumas espécies parasitas sociais, tanto dulóticas quanto inquilinas. Em *Epimyrma krausse* e *Solenopsis daguerrei* o número de rainhas reprodutivas chega a ser três vezes maior que o de machos (Buschinger, 1989; Calcaterra et al, 1999), maior produção de fêmeas também é encontrada em *P. xene* (Aron et al., 1999). O maior número de fêmeas pode levar a uma competição entre machos irmãos (Bourke & Franks, 1995) e talvez ocorra devido à poliandria, pois, conforme Calcaterra et al. (1999) a proporção sexual baseada em fêmeas é uma característica decorrente da poliandria. Essa característica foi observada em *P. xene* (Aron et al., 1999) e acredita-se que ocorra em *S. daguerrei* (Calcaterra et al., 1999). No entanto, a parasita social *A. insinuator*, acasala-se com um só macho não irmão, após deixar o ninho por um curto período de tempo (Sumner et al, 2004). Em *A. ameliae* o macho tem vesículas seminais cerca de quatro vezes o tamanho da espermateca da fêmea, o que do ponto de vista biológico, possibilita um macho não apenas encher a espermateca, mas acasalar-se com mais de uma fêmea (Soares et al. em preparação).

Formas sexuadas de *A. ameliae* são menores que os sexuados da hospedeira *A. subterraneus subterraneus*. É provável, que a redução de tamanho traga algum benefício para a espécie, talvez proporcionando aos imaturos se desenvolverem mais rapidamente e com menos alimento que os imaturos da hospedeira. Em *P. xene*, cujas pupas de machos e fêmeas são significativamente menores que as pupas de sexuados da hospedeira *P. pygmaea*, a redução de tamanho é importante; em especial a redução no tamanho do macho, porque operárias da hospedeira identificam e destróem todos os imaturos machos da sua própria espécie (Aron et al., 2004). Em *A. ameliae* os sexuados são significativamente menores do que as maiores operárias da subespécie hospedeira.

A grande diferença na produção de ovos entre *A. subterraneus subterraneus* e *A. ameliae* está diretamente correlacionada à morfologia do aparelho reprodutor das espécies. Enquanto fêmeas de *A. subterraneus subterraneus* têm aproximadamente 28 ovariólos em cada ovário com cerca de 24 ovócitos maduros em cada ovariolo (Antunes et al., 2002), fêmeas de *A. ameliae* tiveram menores números de ovariólos bem como de ovócitos. Segundo Wilson (1971) em formigas, o número de ovariólos por ovários varia de dois até 1300

ovariolos, enquanto Chapman (1998) sugere um número menor para himenópteros sociais que varia de 30 a 50. Diferenças entre o número de ovariolos de espécies hospedeira e parasita foram verificadas também por Hora et al. (2001). Eles observaram que as microginas de *E. tuberculatum* têm menor número de ovariolos que as macroginas; entretanto, nesse caso, o número de ovócitos não foi diferente entre as fêmeas, sugerindo que ambas tenham fecundidade individual similar (Hora et al., 2005).

É provável que o menor número de ovariolos e ovócitos em *A. ameliae* esteja relacionado ao estilo de vida parasita, em que a espécie necessita da força de trabalho da colônia hospedeira por apresentar número de operárias muito pequeno (aproximadamente 3,3%) e apenas a casta das operárias menores.

O impacto negativo da presença de fêmeas reprodutivas e operárias da espécie parasita sobre a rainha hospedeira está relacionado exclusivamente com a produção dos sexuais; colônias parasitadas por *A. ameliae* em laboratório não produziram nenhum sexual da espécie hospedeira. Ao contrário do que ocorre com *A. insinator*, nesta espécie a casta operária é essencial para a produção de sexuais e suprime a reprodução da rainha hospedeira. Isso significa que as rainhas parasitas que não produzem operárias ou deixam de alcançar certo limiar de produção, terão fitness zero. A proporção mínima de operárias necessárias para a produção de sexuais é menor se há mais do que uma rainha parasita presente (Sumner et al. 2003). Interferência negativa da espécie parasita (*P. xene*) sobre a produção de ovos e de operárias da rainha hospedeira (*P. pygmaea*) também foi observada por Passera et al. (2001). A presença apenas das operárias hospedeiras de *A. subterraneus subterraneus* não interfere na oviposição como já observado por Marinho & Della Lucia (1998), assim como a presença das operárias parasitas não interferiu no número de ovos de *A. ameliae* (Fig. 7).

Em síntese, pode-se concluir que *A. ameliae* possui sexuais significativamente menores do que os de *A. subterraneus subterraneus*, e produz número de ovos significativamente menor que a hospedeira. A presença das rainhas e, ou, operárias parasitas não influencia de modo negativo na produção de ovos das subespécies hospedeiras, mas inibe a produção de sexuais nessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, E.C., Serrão, J.E. & Della Lucia, T.M.C. (2002) Morphology of the reproductive tract of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* queens (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **39**, 269-279.
- Aron, S., Passera L. & Keller, L. (1999) Evolution of social parasitism in ants: size of sexuals, sex ratio and mechanisms of caste determination. *Proceedings of the Royal Society of London B*. **266**, 173-177.
- Aron, S., Passera, L. & Keller, L. (2004) Evolution of miniaturization in inquiline parasitic ants: timing of male elimination in *Plagiolepis pygmaea*, the host of *Plagiolepis xene*. *Insectes Sociaux*. **51**, 395-399.
- Bekkevold, D. & Boomsma, J.J. (2000) Evolutionary transition to a semelparous life history in the socially parasitic ant *Acromyrmex insinuator*. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 616-623.
- Bourke, A.F.G. & Franks, N.R. (1991) Alternative adaptations, sympatric speciation and the evolution of parasitic, inquiline ants. *Biological Journal of the Linnean Society* **43**, 157-178.
- Bourke, A.F.G. & Franks, N.R. (1995) *Social evolution in ants*. **529** pp. Princeton, Princeton University Press.
- Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Schneider, M.O., Pagnocca, F.C. & Bacci Jr., M. (2002) Occurrence of winged forms of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) in laboratory colonies. *Neotropical Entomology* **31**, 469-473.
- Buschinger, A. (1989) Evolution, speciation, and inbreeding in the parasitic ant genus *Epimyrma* (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Evolutionary Biology* **2**, 265-283.
- Calcaterra, L.A., Briano, J.A. & Williams, D.F. (1999) Field studies of the parasitic ant *Solenopsis daguerrei* (Hymenoptera: Formicidae) on fire ants in Argentina. *Environmental Entomology* **28**, 88-95.
- Chapman, R. F. (1998) *The insects: structure and function*. 770pp. Cambridge, Cambridge University Press.
- Dumpert, K. (1981) *The social biology of ants*. 298 pp. Great Britain, The Pitman Press.

- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990) *The ants*. 732 pp. Cambridge, Harvard University Press.
- Hora, R.R., Féneron, R., Valenzuela, J. Favila, M.E. & Fresneau, D. (2001) Queen-size dimorphism in the ant *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology* **38**, 407-420.
- Hora, R. R., Delabie, J. H. C., Poteaux, C., Féneron, R., Doums, C. & Fresneau, D. (2003) Primeiro caso de parasitismo social na subfamília Ponerinae. In.: Encontro de Mirmecologia, 16, Florianópolis (SC). Anais... p. 243-245p.
- Hora, R.R., Doums, C., Poteaux, C., Féneron, R., Valenzuela, J., Heinze, J. & Fresneau, D. (2005) Small queens in the ant *Ectatomma tuberculatum*: a new case of social parasitism. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **159**, 285-292.
- Marinho, C.G.S., Della Lucia, T.M.C. (1998) Egg-laying in *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera: Formicidae) under laboratory conditions. *Biociências* **6**, 71-79.
- Nonacs, P. & Tobin, J. E. (1992) Selfish larvae: Development and the evolution of parasitic behavior in the Hymenoptera. *Evolution* **46**, 1605-1620.
- Passera, L., Gilber, N. & Aron, S. (2001) Social parasitism in ants: effects of the inquiline parasite *Plagiolepis xene* St. on queen distribution and worker production of its host *Plagiolepis pygmaea* Latr. *Insectes Sociaux* **48**, 74-79.
- Sumner, S., Nash, D.R. & Boomsma, J.J. (2003) The adaptative significance of inquiline parasite workers. *Proceedings of the Royal Society of London B*. **270**, 1315-1322.
- Sumner, S., Hughes, W. O., Pedersen, J. S. & Boomsma, J.J. (2004) Ant parasite queens revert to mating singly. *Nature* **428**, 35-36.
- Wilson, E.O. (1971) *The insects societies*. 548 pp. Cambridge, Harvard University Press.

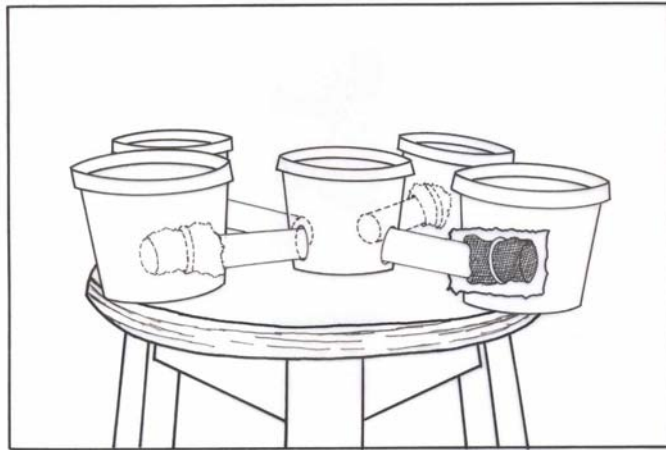


Fig. 1 Metodologia usada para separar fisicamente as rainhas parasitas e hospedeiras, deixando o odor livre entre elas.

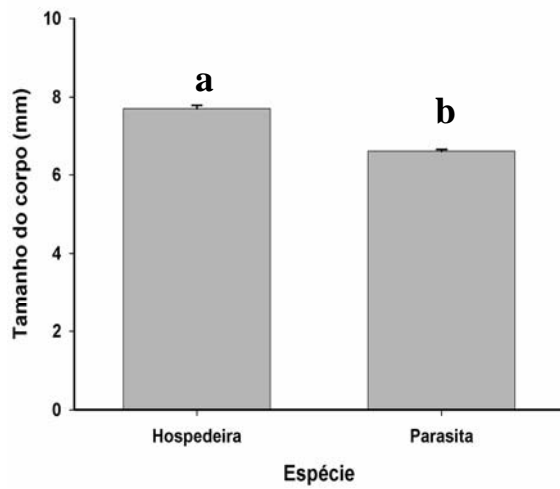


Fig. 2: Comparação do tamanho do corpo do macho de *A. subterraneus subterraneus* (hospedeira) e *A. ameliae* (parasita) ($F_{1,192}=137.60$, $P < 0.001$)

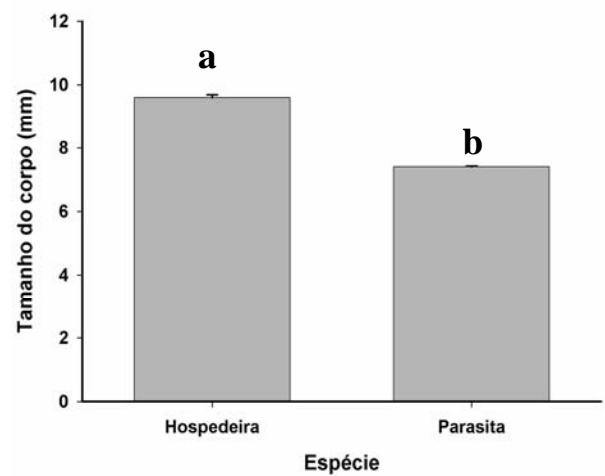


Fig. 3: Comparação do tamanho do corpo da fêmea de *A. subterraneus subterraneus* (hospedeira) e de *A. ameliae* (parasita) ($F_{1,179}=1071.2$, $P < 0.001$).

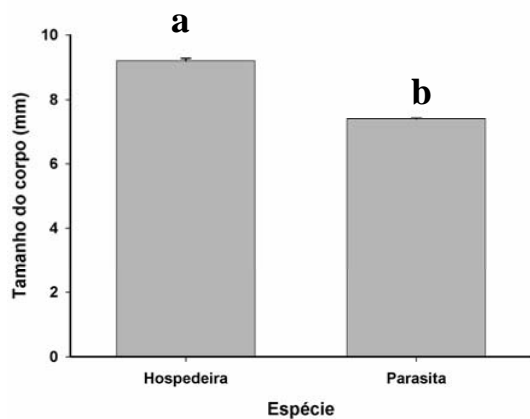


Fig. 4 Comparação do tamanho do corpo das operárias maiores de *A. subterraneus subterraneus* (hospedeira) e de fêmeas de *A. meliae* (parasita) ($F_{1,199} = 921.07$, $P < 0.001$).

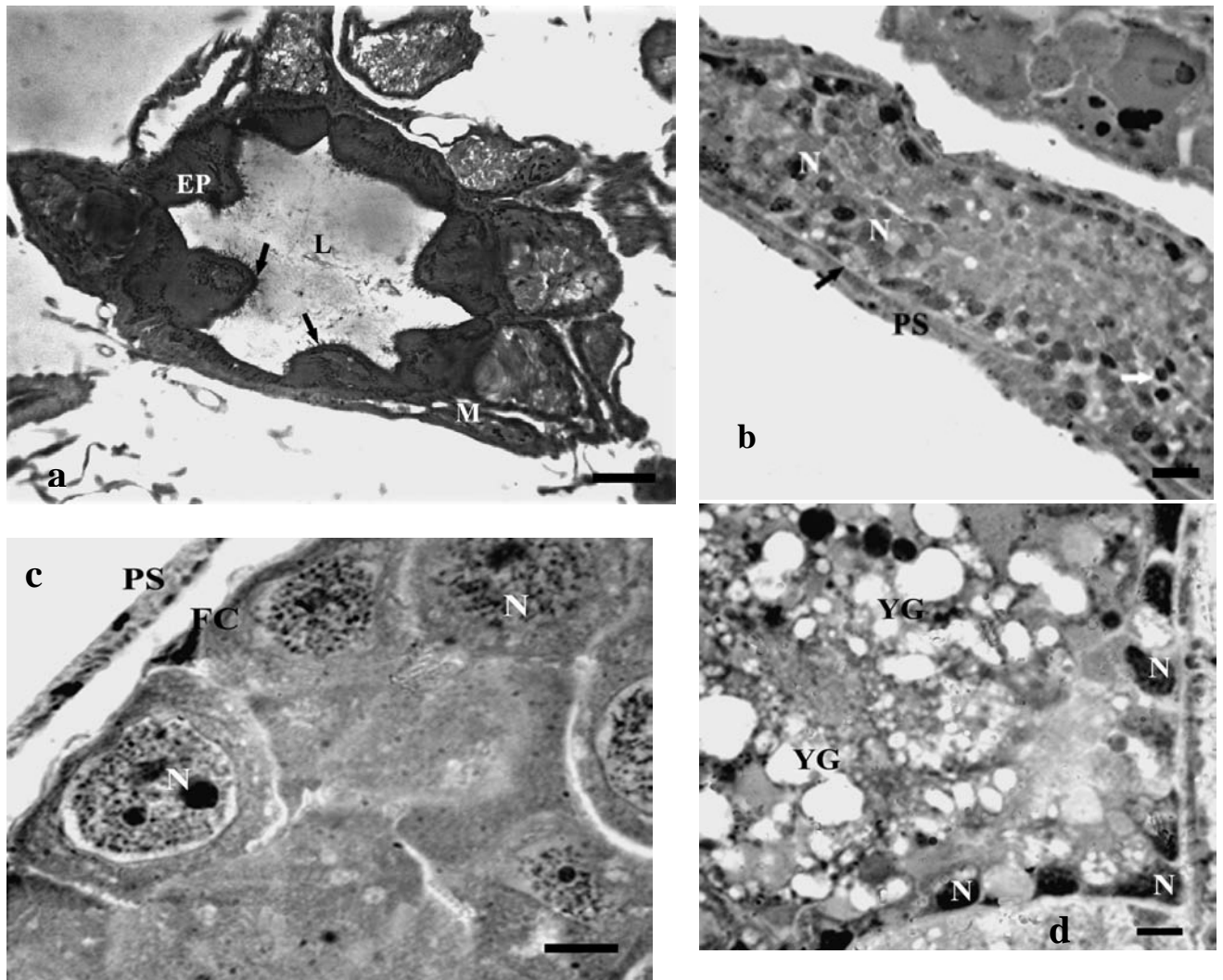


Fig. 5: Aparelho reprodutor feminino de *A. ameliae*. **a)** Oviduto comum: L: lúmen; M: músculo; setas: projeções cuticulares em forma de espinho; EP: epitélio. **b)** Germarium: PS: bainha peritoneal; seta preta: tunica própria; N: núcleo das células germinativas; seta branca: núcleo das células pré-foliculares. **c)** Célula nutridora: PS: bainha peritoneal; FC: células foliculares; N: núcleo das células nutridoras; **d)** Ovócito: N: núcleo das células foliculares; YG: glândulas de vitelo. Escala: todas as figuras com 10 μ m.

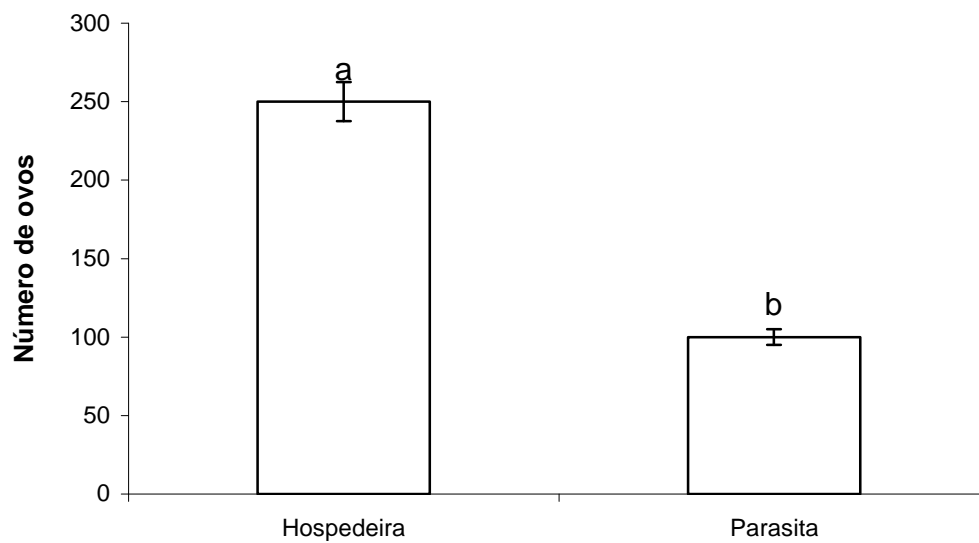


Fig. 6 Número de ovos postos por *A. subterraneus subterraneus* (hospedeira) e *A. ameliae* (parasita) ($F_{1,41}=921.07$, $P < 0.001$).

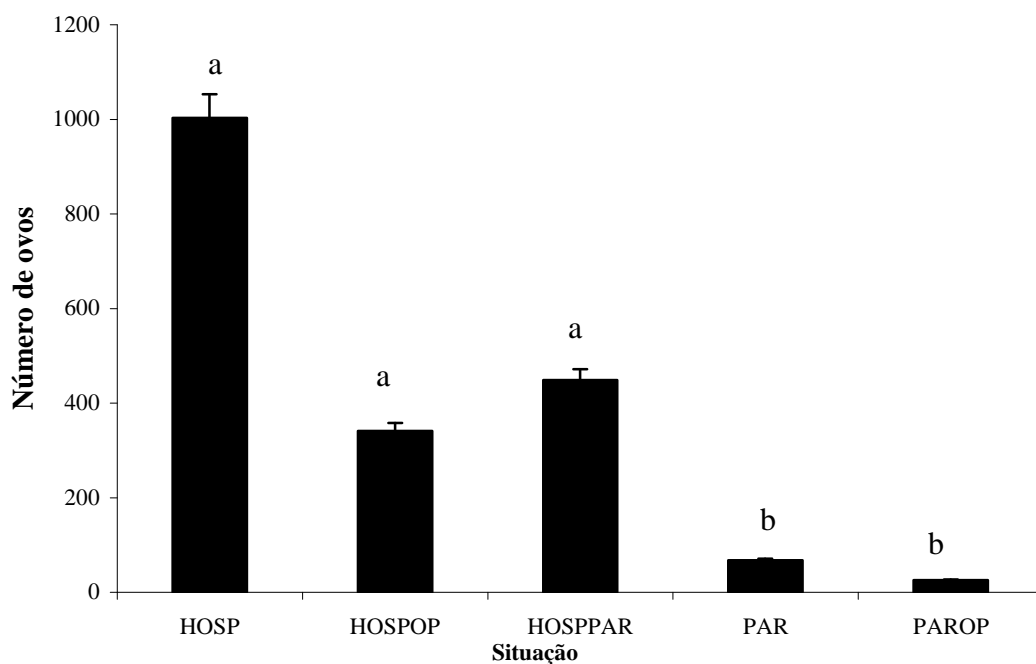


Fig. 7 Número de ovos postos por *A. subterraneus subterraneus* (hospedeira) e *A. ameliae* (parasita) em diferentes situações. (HOSP=rainha hospedeira; HOSPOP=rainha hospedeira + operárias; PARA= rainha parasita; PARAOP= rainha parasita + operárias; HOSPPAR= rainha hospedeira + rainha (s) parasita (s)).

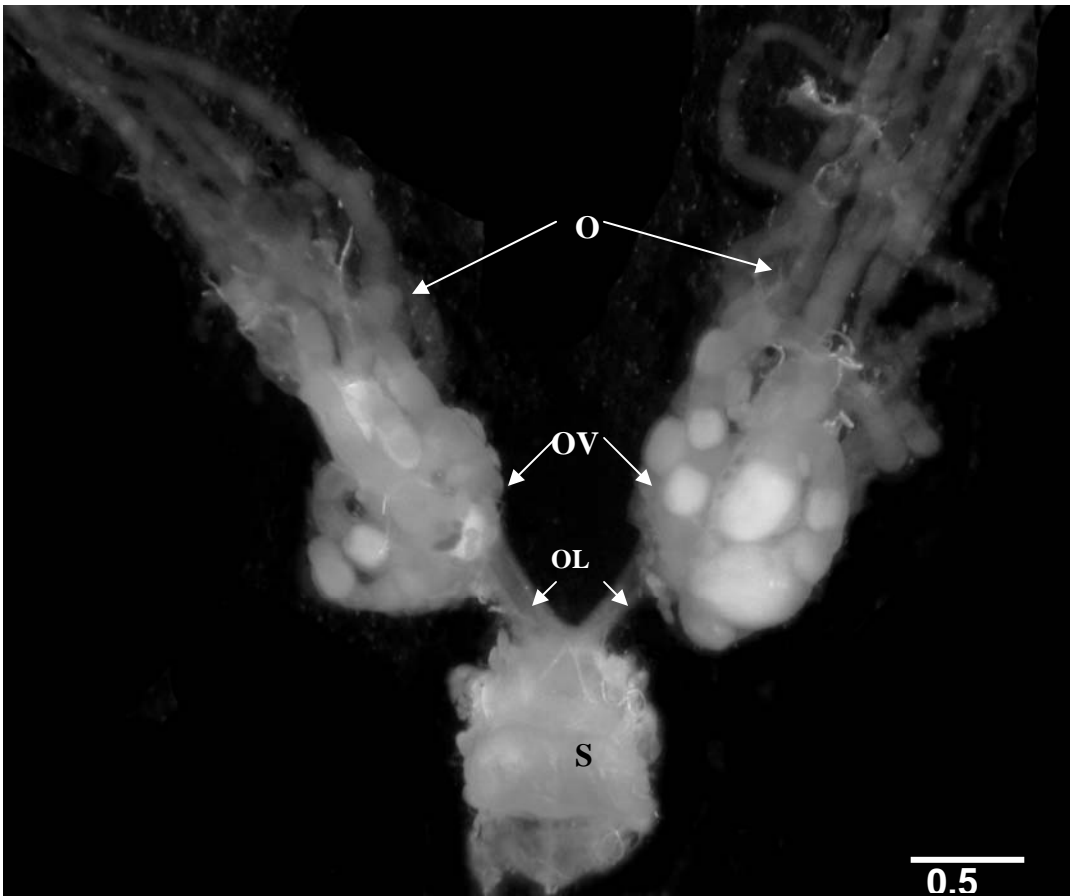


Fig. 8: Estrutura parcial do aparelho reprodutor feminino de *Acromyrmex ameliae*. Onde: S= espermateca; OL= oviduto lateral; OV= ovário; O= ovaríolo. Escala: 0,5 mm .

Structure of the Spermatozoa of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and of its social parasite *Acromyrmex ameliae* (Hymenoptera:Formicidae:Attini)

***Acromyrmex ameliae* and *A. subterraneus subterraneus*'s spermatozoa**

I. M. F. Soares^{1,2}, J. Lino-Neto^{3*} T. M. C. Della Lucia² & A. S. Pereira²

¹ Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Educação, Campus VIII. Av. da Gangorra, 503, Bairro: Alves de Sousa, Paulo Afonso -BA 48608-240. ilka_soares@yahoo.com.br:

²Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa. Av. P. H. Rolfs, Viçosa -MG. 36570-000. idlucia@ufv.br;alicinhapereira@yahoo.com.br

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. Av. P. H. Rolfs, Viçosa -MG. 36570-000. linoeto@ufv.br;

Key words: *Acromyrmex*, spermatozoa, social parasitism.

* Author for correspondence.

Summary. Recent work has shown that the structure and ultrastructure of spermatozoa provide important distinction characters among Hymenoptera species in addition to helping their phylogenies. This can be particularly true in the study of phylogenetic relations of social parasitic ants whose genera are polyphyletic. This work was conducted to analyze spermatozoa morphometry of large and small males of *A. ameliae* and of *A. subterraneus subterraneus* males searching for usable characters for taxonomy and phylogeny purposes. One hundred and eighty-seven spermatozoa of *A. ameliae* and 99 of *A. subterraneus subterraneus* were measured and photographed. The spermatozoa of *A. subterraneus subterraneus* are thin and long, with a total length of 105 μm and nucleus of 9.5 μm . The diameter is constant along the spermatozoon, except at the end portion where it tapers abruptly. The nucleus is very thin and tapers uniformly from the basis. *A. ameliae*, as well as its host, has long and thin spermatozoa, with the head region easily distinguished from the flagellum. The average length of *A. ameliae* spermatozoa was 91.3 μm ; nucleus length was 7 μm . Furthermore, the nucleus had an approximately constant diameter, but tapering abruptly from its anterior third portion.

Introduction

The Formicidae includes approximately 11,000 described species (Bolton, 1994) and is of great economic importance, especially those of the Attini tribe that comprises the leaf-cutting ants.

Social parasitism is the co-existence in the same nest of two species of social insects, one of which is parasitically dependent on the other (Hölldobler & Wilson, 1990). Social parasitism, in *strictu sensu*, occurs only in the Hymenoptera, but not in all families. In leaf-cutting ants, the number of social parasites is small; there are only four reports on the subject: 1. *Pseudoatta argentina* and *P. argentina platensis*, parasites of *Acromyrmex lundii*; 2. *Pseudoatta* sp., parasite of *A. rugosus rugosus* (Delabie et al., 1993); 3. *Acromyrmex insinator*, inquiline of *A. echinator* (Schultz et al., 1998) and 4. *Acromyrmex ameliae*, inquiline of *A. subterraneus subterraneus* and *A. subterraneus brunneus* (Souza et al., 2007).

Acromyrmex ameliae is a social parasite of the inquiline type and has a few minor workers that are very similar to those of its host. The sexuals are smaller than those of the host species; male size of that species ranges from 3.7 to 7.7 mm.

In general, species identification is based on external structural characteristics. However, those can be modified along the time due to environmental conditions and the life history of the individuals. Therefore, internal structures such as the spermatozoa may represent a valuable source of characters for taxonomy, since they provide new, non-traditional data, of a more conservative nature. Recent works have demonstrated that the structure and ultrastructure of the spermatozoa in Hymenoptera are of such nature and can be of help in developing species phylogeny (Lino-Neto & Dolder, 2001; Zama et al., 2005). This is particularly important in those social parasites of polyphyletic genera such as in *Acromyrmex* (Sumner et al., 2004b).

This work had as its objective to analyze the morphometry of spermatozoa of small and large males of *Acromyrmex ameliae* and of males of *A. subterraneus subterraneus*, searching for characters that may be used taxonomically and phylogenetically. The following hypotheses were tested: 1. the range in size of the spermatozoa does not vary within the species although differences may be found among males; 2. there are clear structural differences that allow spermatozoa distinction between host and parasite species.

Material and Methods

Parasitized colonies of *A. subterraneus subterraneus* were collected in Paraopeba (MG, Brazil) (19° 17'S; 44° 29'W) on October 6, 2003 and November 11, 2004.

One hundred and eighty-seven spermatozoa of *A. ameliae* males and ninety-nine of *A. subterraneus subterraneus* were measured. The spermatozoa of small males (5 mm) and of large males (8 mm) of the parasite were used in this experiment. Seminal vesicles were dissected in a solution of sodium phosphate buffer, pH 7.2 and drops of sperm suspension were spread on clean

glass microscope slides and fixed with a solution of 4% paraformaldehyde. After drying at room temperature, the preparations were observed with a photomicroscope (Olympus BX60).

To measure the nuclei, some slides were stained for 15 minutes with 0.2 micrograms/ml of 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in PBS, washed and mounted with a 50% sucrose solution (Lino-Neto et al., 1999). These slides were examined and photographed with an epifluorescence microscope (Olympus BX60), equipped with a BP360-370 nm excitation filter. All the measurements were made using the program ImageProPlus.

Results

The spermatozoon of *A. subterraneus subterraneus* is long and thin, measuring $105 (\pm 2.3) \mu\text{m}$ in total length and the nucleus is $9.5 (\pm 0.7) \mu\text{m}$. It has a uniform diameter along its length, except at the end, when it tapers abruptly (Figs. 1 and 2). The nucleus is very thin and tapers uniformly from its basis (Fig. 3). As with its host, *A. ameliae* has long and thin spermatozoa, with their heads easily distinguished from their flagella (Figs. 4 and 5). Larger males have spermatozoa that are significantly longer ($94 \pm 7.9 \mu\text{m}$) than those of smaller males ($90 \pm 6.2 \mu\text{m}$) ($F_{1,189} = 15.02$, $P < 0.001$). On the average and for the parasite, the total length reached $91.3 \mu\text{m}$. The length of the nucleus did not differ among larger and smaller males, with an average of $7 \pm 0.7 \mu\text{m}$. The nucleus diameter was approximately constant but tapered abruptly beginning at the anterior third (Fig. 6).

Both the entire length of the spermatozoa ($F_{1,284} = 256.39$, $P < 0.001$) (Fig. 7) and the nuclei ($F_{1,606} = 2595.7$, $P < 0.001$) (Fig. 8) of the two species are significantly different.

Discussion

The difference between the general morphology of the spermatozoa, in addition to their different sizes, is very important for the distinction of the two species. The flagella of *A. subterraneus subterraneus* taper in the distal portion; being so thin, they sometimes break apart. Their ends usually wind around themselves. In the parasite species the thickness of the flagella is the same along the whole structure. The nuclei are clearly different and may be used to tell the species apart. The elongate and thin shapes of the spermatozoa of both species are similar to those observed in other Hymenoptera (Lino-Neto et al., 1999; Zama et al., 2005) and especially in other ants (Lino-Neto & Dolder, 2002). The length of the spermatozoa ranges from 40 to 1500 μm in the Hymenoptera. The few studied species of ants had spermatozoa lengths shorter than 200 μm . This has taxonomic value. In *Atta bisphaerica* the nuclear length has the same size as in *A. subterraneus subterraneus*. However, spermatozoa lengths are smaller, measuring about 80 μm . The spermatozoa of *Solenopsis invicta* measure only 70 μm and their nuclei, interestingly, is 13 μm long; they are the longest already reported within the Formicidae (Lino-Neto & Dolder, 2002).

Although the size of the spermatozoa of *A. ameliae* is significantly different between small and large males, from a biological standpoint it is possible that such a difference, being so small (less than 5%) does not imply a competition among these cells, because the size varies in a

single individual. As a result, larger than average spermatozoa may be found in small individuals, as small spermatozoa are common in large individuals. No correlation is found between body size and spermatozoa length.

Most of the works dealing with insects showing spermatozoa size dimorphism (Civetta, 1999; Baer et al., 2003) have shown that only longer spermatozoa are found in female's spermatheca; they are, therefore, those responsible for fertilization of oocytes. The differences in length of spermatozoa in a same individual or in individuals of different species are in general due the flagellum, region where mitochondria are located and whose function is supplying energy, and axoneme, responsible for movement. Therefore, it is thought that longer spermatozoa reach first the spermatheca, filling it, because they are better equipped and produce more energy. The 5% difference in size between spermatozoa of large and small males is not sufficient to produce spermathecal competition in *A. ameliae*. However, the difference in body size of the individuals (larger males with 8 mm and small males with 5 mm), is directly proportional to the size of the organs, including those of the reproductive system, specially testicles, seminal vesicles and accessory glands. There is no doubt that smaller individuals produce less spermatozoa and lesser secretion of accessory glands. It is also known that spermatozoa quantity is very important for an efficient copulation, specially in social insects, in which case females copulate only once and fertilize their oocytes for years from those spermatozoa stored in their spermatheca. It is also well established that the secretion from the glands play several and important roles in the female reproduction. In *A. ameliae* the larger males have seminal vesicles about 4 times the size of the female's spermatheca. From the biological standpoint this allows the male to fill the spermatheca and also to copulate with several females. This copulation behavior has been discussed in some species of ants, including leaf-cutting ants of the genus *Acromyrmex* (Boomsma et al., 1999; Boomsma et al., 2005).

In ants the reduction of the number of matings is very common (Strassmann, 2001). In Attini, however, it can be seen that more derived species copulate more than twice (Boomsma et al., 1999; Villesen et al., 2002). *Acromyrmex echinator*, host of *Acromyrmex insinuator*, mates with approximately 2.23 males (Bekkevold et al., 1999), whereas its parasite copulates with a single unrelated male, after leaving the nest for a short period of time (Sumner et al., 2004a).

From what was seen, it can be concluded that spermatozoon is an additional distinguishing character between *A. subterraneus subterraneus* and *A. ameliae*. The size of the males may be a factor in the choice for a female because it expresses other characteristics, as for instance larger survival opportunities. Small males, however, have the same capacity of fertilization of larger males. Due to the characteristics of its seminal vesicles and spermatheca, it may be thought that *A. ameliae* copulates only once.

References

- Baer B., Schmid-Hempel P., Hoeg J.T., and Boomsma J. J. 2003. Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insec. Soc.* **50**: 101-108.
- Bekkevold D., Frydenberg J. and Boomsma J. J. 1999. Multiple mating and facultative polygyny in the Panamanian leafcutter ant *Acromyrmex echinator*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **46**: 103-109.
- Bolton B. 1994. *Identification guide to the ant genera of the world*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 222 pp.
- Boomsma J. J., Fjerdingstad E. J. and Frydenberg J. 1999. Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leaf-cutter ants *Proc. R. Soc. Lond. B.* **266**: 249-254.
- Boomsma J. J., Baer B. And Heinze J. 2005. The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* **50**: 395-420.
- Civetta A. 1999. Direct visualization of sperm competition and sperm storage in *Drosophila*. *Current Biology.* **9**: 841-844.
- Delabie J.H.C., Fowler H.G and Schlindwein M.N. 1993. Ocorrência do parasita social *Pseudoatta* sp. nova em ninhos de *Acromyrmex rugosus* em Ilhéus, Bahia: primeiro registro para os trópicos. In: *International Symposium on Pest Ants, 4, e Encontro de Mirmecologia*, 11, Belo Horizonte, Resumos.
- Hölldobler B. and Wilson E.O. 1990. *The ants*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 732 pp.
- Lino-Neto J., Bão S. N. and Dolder H. 1999. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int J Insect Morphol Embryol.* **28**: 253-259.
- Lino-Neto J. and Dolder H. 2001. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zoolog Scripta.* **30**: 89-96.
- Lino-Neto J. and Dolder H. 2002. Sperm structure and ultrastructure of the fire ant *Solenopsis invicta* (Buren) (Hymenoptera, Formicidae). *Tissue & Cell.* **34**: 124-128.
- Schultz T.R., Bekkevold D. and Boomsma J.J. 1998. *Acromyrmex insinuator* new species: an incipient social parasite of fungus-growing ants. *Insec. Soc.* **45**: 457-471.
- Souza D. J. de, Soares I.M.F. and Della Lucia T.M.C. 2007. *Acromyrmex ameliae* sp.n. (Hymenoptera: Formicidae): a new social parasite of leaf-cutting ants in Brazil. *Insect Science.* **14**: 251-257.
- Strassmann J. 2001. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insec. Soc.* **48**: 01-13.
- Sumner S., Hughes W. O.Pedersen, J. S. and Boomsma J.J. 2004a. Ant parasite queens revert to mating singly. *Nature.* **428**: 35-36.
- Sumner S., Aanen D.K., Delabie J.H.C. and Boomsma J.J. 2004b. The evolution of parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emery's rule. *Insec. Soc.* **51**: 1-6.

- Villesen P, Murakami T., Schultz T.R. and Boomsma J.J. 2002. Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **269**: 1541-1548.
- Zama U. Lino-Neto J., Mello S. M., Campos L. A. O. and Dolder H. 2005. Ultrastructural characterization of spermatozoa in euglossine bees (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Insec. Soc.* **52**: 122-131.

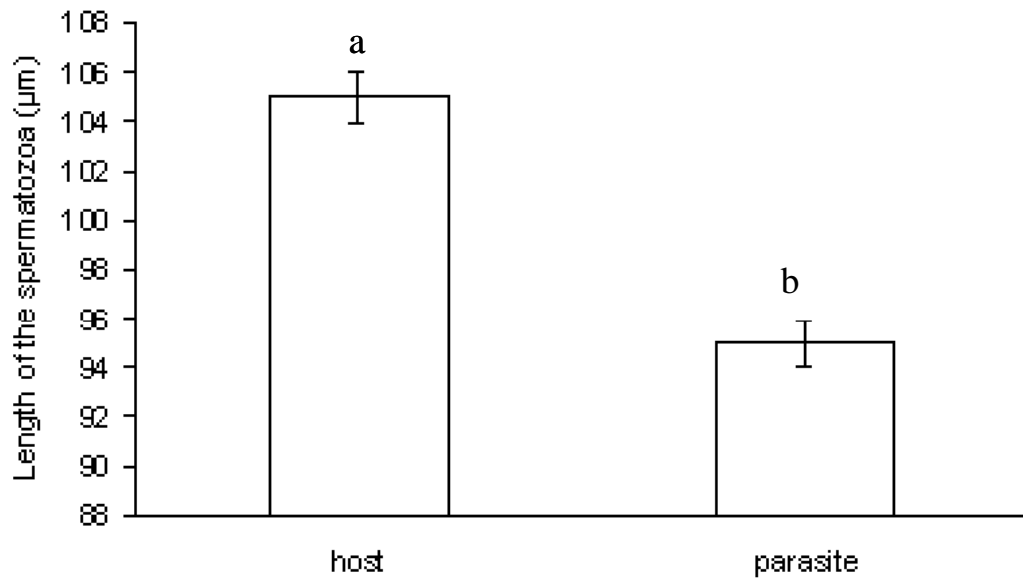


Fig. 1 Length of spermatozoa of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and of *Acromyrmex ameliae*

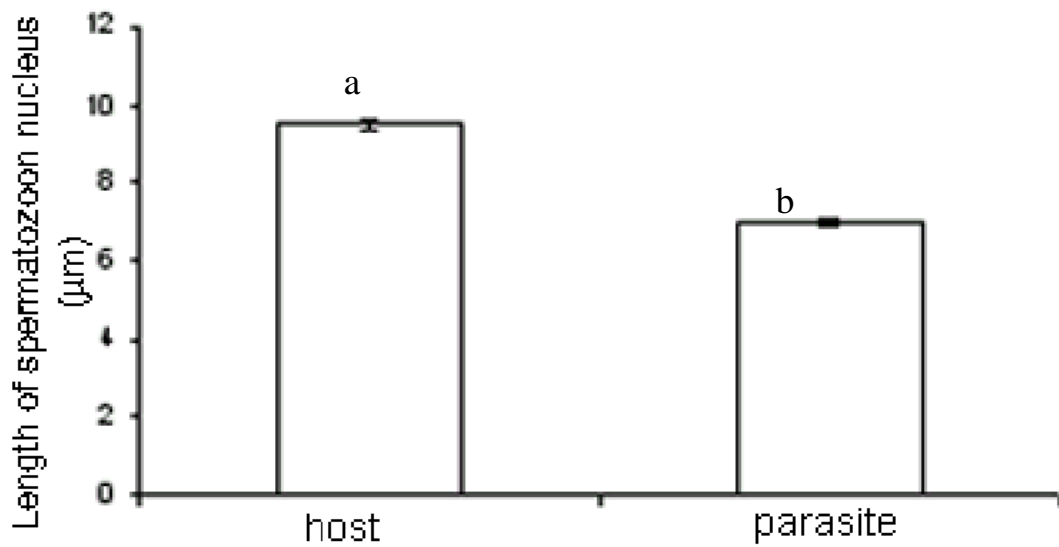


Fig. 2 Length of spermatic nucleus of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and of *Acromyrmex ameliae*

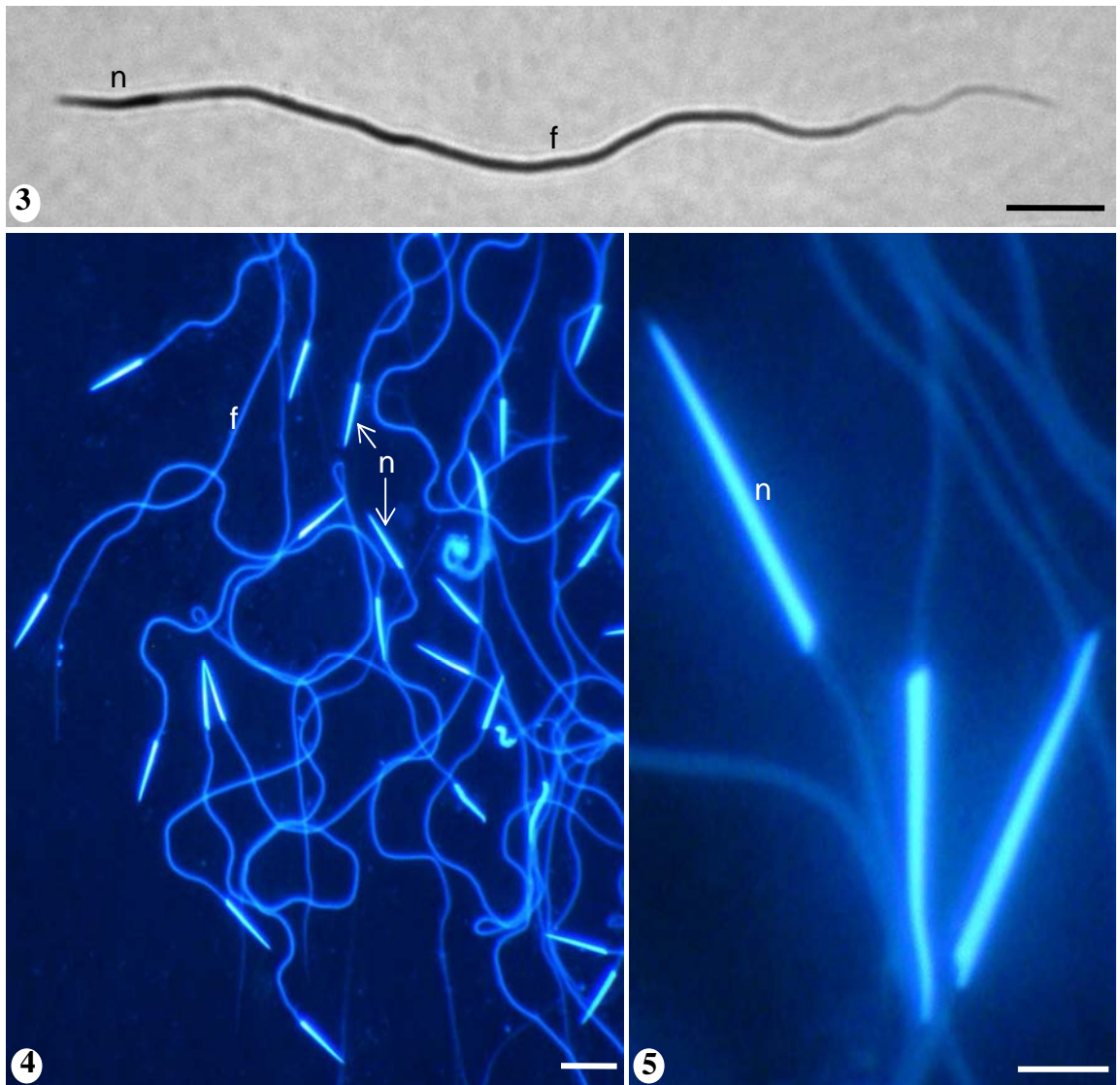


Fig. 3 Phase contrast of the *Acromyrmex subterraneus subterraneus* spermatozoon. Nucleus (n) and flagellum (f). Scale bar: 10 μ m.

Figs. 4 and 5 DAPI staining of the nucleus of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* spermatozoa. Scale bars: 10 μ m and 3 μ m, respectively.

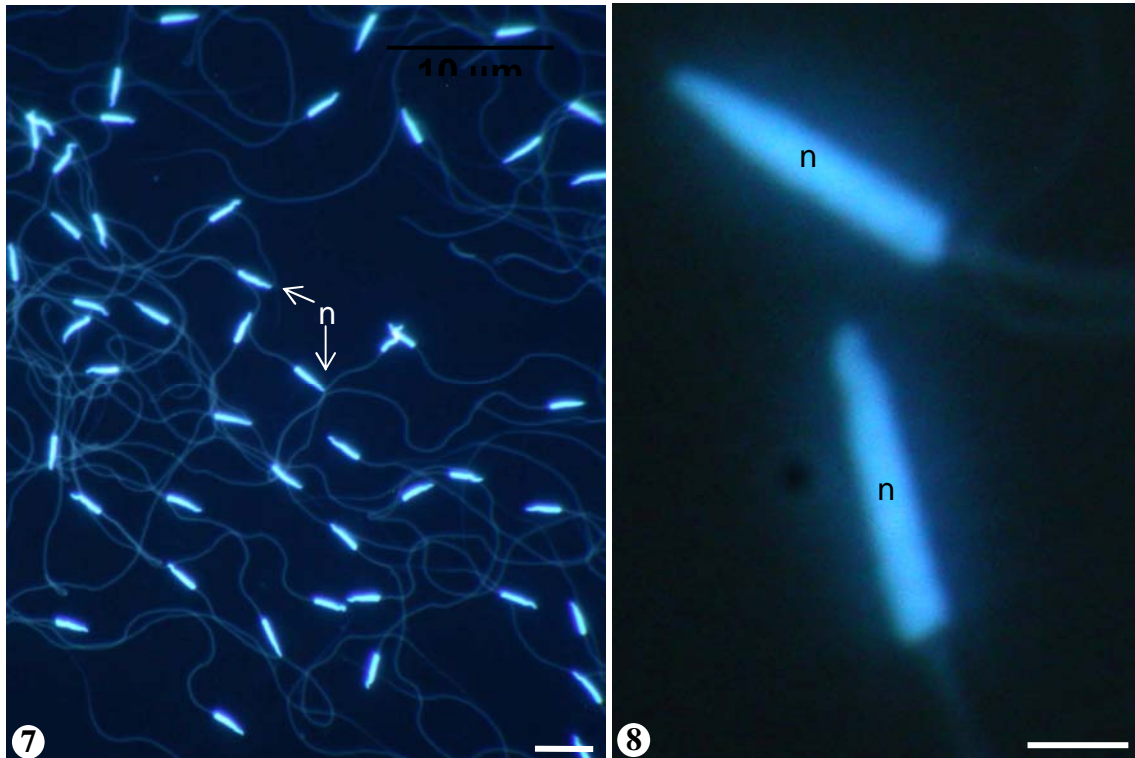
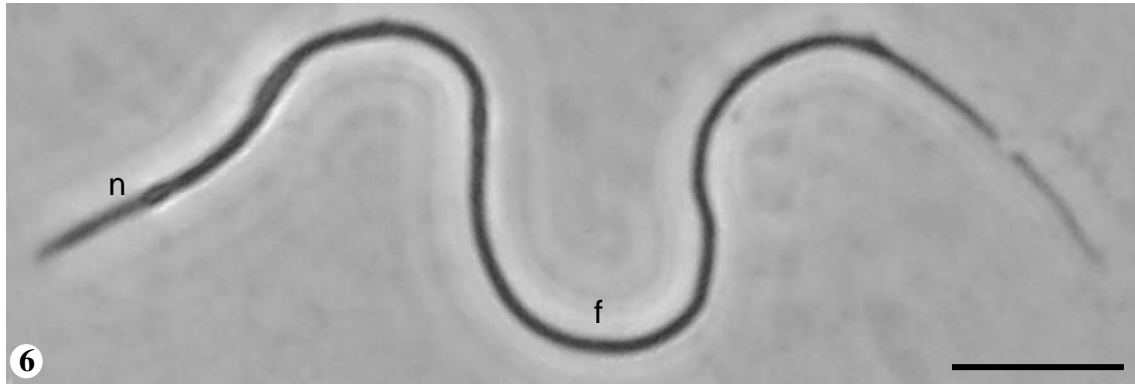


Fig. 6 Phase contrast of the *Acromyrmex ameliae* spermatozoon. Nucleus (n) and flagellum (f). Scale bar: 10 µm.

Fig. 7 and 8 DAPI staining of the nucleus of *Acromyrmex ameliae* spermatozoa. Scale bars: 10 µm and 3 µm, respectively.

**CAPÍTULO 4: ACEITAÇÃO DE RAINHAS DA PARASITA SOCIAL
Acromyrmex ameliae POR COLÔNIAS HOSPEDEIRAS DE *Acromyrmex
subterraneus subterraneus* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E
DISCRIMINAÇÃO DA PROLE EM COLÔNIAS PARASITADAS.**

INTRODUÇÃO

O sucesso do parasitismo depende tanto da habilidade da rainha parasita entrar quanto de permanecer no ninho. Para isso, a síntese de substâncias químicas por algumas glândulas exerce um papel fundamental. Rainhas de *Polyergus* têm um feromônio em sua glândula de Dufour para reduzir a agressão das operárias quando elas atacam a rainha de *Formica*. Imediatamente após a morte da rainha hospedeira suas operárias iniciam “grooming” constante na rainha parasita. As mandíbulas da rainha de *Formica* são separadas e continuamente a rainha de *Polyergus* toca a hipofaringe exposta da rainha morta. Talvez seja o meio mais eficiente de ser aceita pela colônia, pois na condição sem rainha, as agressões das operárias hospedeiras resultam na morte da rainha de *Polyergus*. Isso sugere que durante os atos de lambar e mordiscar a rainha hospedeira, a rainha parasita adquire uma ou mais substâncias que a tornam mais aceitável (Topoff & Zimmerli, 1993).

Uma das glândulas mais estudadas em parasitismo social é a glândula de Dufour, que se apresenta hipertrofiada nas espécies parasitas (Holldöbler & Wilson, 1990). Os acetatos liberados dessa glândula em parasitas têm uma importante função nos ataques dos ninhos, atuando como um persistente sinal de alarme que atrai as dulóticas, mas causa pânico e dispersa as defensoras. Esse comportamento foi denominado de “propaganda”. Essa glândula tem diferentes funções na ordem Hymenoptera. Nas formigas está associada à produção de feromônios de apaziguamento, de alarme, recrutamento, trilha e atração sexual; produção de substância propaganda, atração entre indivíduos, marcação de território, entre outros (Billen, 1993; Brandt et al., 2006). Em abelhas não sociais a glândula de Dufour produz substâncias cimentantes e hidrofóbicas para o ninho, atrativos sexuais, substâncias de reconhecimento, marcadores de ninho, e feromônio de trilha (Abdalla & Cruz-Landim, 2001). Nas espécies sociais as rainhas produzem feromônios de marcação de ovos para prevenir que eles sejam

comidos por operárias durante a inspeção de postura (Martin et al., 2002). Nas vespas as substâncias estão associadas à nutrição larval, defesa de ninho, marcadores de ovos, atração do macho durante o acasalamento, reconhecimento de ninho etc. (Billen, 1986).

Em *Polyergus breviceps* o conteúdo da glândula de Dufour age como um feromônio de apaziguamento, diminuindo a resposta agressiva das operárias hospedeiras. Conseqüentemente, a glândula de Dufour diminui em tamanho depois que a parasita é adotada pelas operárias hospedeiras (Mori et al., 2000).

Rainhas da parasita social temporária *Bothriomyrmex syrius* usam tanto estímulos visuais quanto olfativos. Diferentes das operárias que são de cor marrom – claro, as rainhas dessa espécie são escuras e se assemelham com a rainha hospedeira. Elas exudam pelas glândulas anais uma substância que tem o mesmo cheiro exalado por operárias de *Tapinoma* (Lloyd et al., 1986).

Um dos principais elementos na organização dos insetos sociais é a habilidade de discriminar as companheiras de não-companheiras (D’Ettorre & Heinze, 2001). Reconhecimento de companheira é tipicamente manifestado pela rejeição de intrusos, preferencialmente se estes estão transportando imaturos (Lenoir et al. 1999).

Acredita-se que o reconhecimento se dá através de um “rótulo” específico comum denominado “odor gestalt” ou “odor da colônia” que cada membro possui (Crozier & Dix, 1979). Esses rótulos são usados por um indivíduo para diferenciar-se de outros pela comparação com ele próprio: o ‘gabarito’ (Lenoir et al., 2001). O gabarito é dado pelos hidrocarbonetos presentes na cutícula (HCCs) dos membros da colônia.

Um odor mais ou menos uniforme entre indivíduos de uma mesma colônia é mantida graças aos comportamentos marcantes em insetos sociais, que são a trofalaxia e o ‘grooming’. Esses comportamentos permitem a transferência de hidrocarbonetos cuticulares (HCs) da glândula pós-faringeana (PPG) para a superfície do corpo. Boulay et al. (2004) mostraram que operárias de *Camponotus fellah* isoladas por pouco tempo (3-10 dias) de suas colônias, quando retornavam, apresentam intenso ‘allogrooming’ (lambadura entre diferentes indivíduos) e trofalaxia. Esses comportamentos têm sido interpretados como um modo de readquirir rapidamente o odor da colônia. Nessa mesma espécie o isolamento

afeta o reconhecimento e altera seu perfil de HCCs (Katzav-Gozansky *et al.*, 2004).

Logo após a emergência, os jovens são destituídos de substâncias químicas cuticulares. Esta ausência foi denominada por Lenoir *et al.* (1999) de “insignificância química”. Este curto estágio no início da vida adulta é seguido por um período de “integração química” quando os imaturos sintetizam HCCs próprios e adsorvem compostos químicos de suas companheiras ou de material do ninho para integrar a colônia gestalt (Lenoir *et al.*, 1999).

As interações químicas foram mais estudadas em vespas. Rainhas de *Polistes sulcifer*, parasita de *Polistes dominulus*, são capazes de distinguir entre odores das espécies hospedeiras e não hospedeiras e as “dicas” químicas utilizadas por elas são principalmente cheiros dos imaturos, seguidos de material dos ninhos (Cervo *et al.*, 1996).

Este trabalho objetivou (1) investigar a aceitação de rainhas parasitas por colônias não parasitadas, associando-se a isto o grau de maturidade ovariana e o status reprodutivo (fecundidade) das mesmas; (2) observar quais os possíveis comportamentos das rainhas hospedeira e parasita, quando se encontram pela primeira vez; (3) estudar a morfologia da glândula de Dufour de rainhas parasitas e hospedeiras e a atratividade das secreções dessa glândula, tanto para os membros da própria espécie quanto para heteroespecíficos; (4) investigar os hidrocarbonetos cuticulares na hospedeira e na parasita social; (5) verificar se operárias hospedeiras e parasitas têm capacidade de discriminar sua prole.

MATERIAL E MÉTODOS

Colônias parasitadas e não parasitadas de *A. subterraneus subterraneus* foram coletadas na Fazenda Itapoã de propriedade da V & M Florestal Ltda., em Paraopeba – MG (19° 17'S; 44° 29'W), em 6 de outubro de 2003 e 11 de novembro de 2004. A área era coberta com plantios de *Eucalyptus camaldulensis*.

As colônias foram mantidas em laboratório a 24°C ± 2°C e a 68% ± 4% U.R. e alimentadas com folhas de alfeneiro (*Ligustrum japonicum*) e acalifa (*Acalipha wilkesiana*).

Experimento 1: Aceitação de rainhas parasitas Acromyrmex ameliae em colônias pequenas recém coletadas de Acromyrmex subterraneus subterraneus:

Nesse experimento, hipotetizou-se que o grau de maturidade ovariana bem como a fecundidade da gina parasita influenciam a sua aceitação por operárias de colônias não parasitadas da espécie hospedeira.

Cinco ginas dealadas foram oferecidas a cada uma de cinco colônias de *A. subterraneus subterraneus*. Essas colônias, com 100 a 300mL de jardim de fungo, haviam sido coletadas em Viçosa (MG), três semanas antes dos testes. Após a colocação da gina parasita na arena de forrageamento de cada ninho, a reação das operárias foi observada durante 30 minutos. Vinte e quatro horas após o oferecimento das ginas, estas eram retiradas e dissecadas para verificar o estado da spermateca e o grau de desenvolvimento ovariano.

Experimento 2: Interação entre rainhas hospedeiras e parasitas:

Em experimento subsequente, objetivou-se descrever os possíveis comportamentos exibidos por ambas as rainhas, hospedeiras e parasitas, em seus encontros iniciais. Três testes foram realizados conforme a Tabela 1:

Testes	Encontros de Rainhas
1	Hospedeira e parasita companheiras de ninho (n=1)
2	Hospedeira (colônia parasitada) e parasitas não companheiras de ninho (n=1)
3	Hospedeiras (colônias não parasitadas) e parasitas não companheiras de ninho (n=6)

Tabela 1: Tratamentos realizados para observar as reações de rainhas *A. subterraneus subterraneus* e *A. ameliae* em no primeiro encontro.

As rainhas foram colocadas em placas de Petri (90 mm de diâmetro) e observadas por 1h; durante este período foram catalogados seus atos comportamentais exibidos.

Experimento 3: Estudo da morfologia interna das glândulas de Dufour e esternais de A. ameliae e de A. subterraneus subterraneus:

Este experimento teve o objetivo de descrever a morfologia das glândulas de Dufour e esternais para posterior estudo da atratividade de secreções produzidas por essas glândulas e que poderiam estar mediando a aceitação de

rainhas parasitas, conforme a literatura. Embora os trabalhos não se refiram às glândulas esternais como envolvidas no parasitismo, elas estão intimamente associadas à glândula de Dufour e suas secreções são liberadas para o exterior pelo mesmo orifício (Billen, 1993), fecundadas de *A. ameliae* e duas rainhas fecundadas de *A. subterraneus subterraneus* foram dissecadas e as glândulas de Dufour foram retiradas para o estudo da sua morfologia interna. As glândulas foram fixadas em Bouin, onde permaneceram por 24h. Após esse período, elas foram desidratadas utilizando-se concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 95%) de etanol durante dois minutos em cada concentração. Após a fixação, procedeu-se à embebição em resina JB-4. As secções histológicas foram realizadas com espessura 5µm e foram coradas com hematoxilina e eosina.

Experimento 4: Atratividade das secreções das glândulas de Dufour de rainhas A. ameliae e A. subterraneus subterraneus sobre operárias e rainhas hospedeiras e parasitas:

A hipótese testada neste caso era que as secreções da glândula de Dufour poderiam estar agindo como feromônio de apaziguamento, reduzindo a agressão pelas hospedeiras ou desencadeando comportamento de “propaganda” nas colônias (D’Ettorre et al., 2000; Brandt et al., 2006).

Desse modo, glândulas de Dufour de rainhas virgens e fecundadas da parasita e de rainhas acasaladas da hospedeira foram retiradas e colocadas em tubos eppendorfs com 200 µl (glândulas das parasitas) e 400 µl (glândulas da hospedeira) de água ultrapura para maceração.

Fragmentos de papel filtro com aproximadamente 1cm² foram embebidos em cada extrato para serem usados nos testes. Como controle, utilizou-se o papel filtro do mesmo tamanho embebido apenas em água ultrapura.

Foi realizado um total de vinte repetições em cada uma das situações (1) colônias de *A. subterraneus subterraneus* parasitadas e (2) subcolônias apenas com rainhas parasitas. No primeiro caso, ao menos, uma rainha parasita foi retirada da massa de fungo e colocada na arena de forrageamento.

Os papéis eram mergulhados no macerado e colocados na arena de forrageamento. Os comportamentos foram observados até o momento em que as formigas não eram mais atraídas para eles.

Nos experimentos realizados exclusivamente com rainhas, estas eram colocadas em placas de Petri (90 mm de diâmetro) e observadas por aproximadamente 20min. Neste caso, foram feitas cinco observações.

Experimento 5: Identificação dos componentes cuticulares:

Este experimento objetivou identificar os compostos que estão presentes na cutícula de larvas, operárias e rainhas hospedeiras e parasitas. Hipotetizou-se que nos indivíduos parasitas a quantidade de substâncias deveria ser menor que nas hospedeiras, devido a insignificância química que facilitaria a entrada e permanência da espécie parasita na colônia hospedeira.

Os extratos foram obtidos mergulhando-se os indivíduos em um béquer com hexano, agitando-se, a cada 5min, as operárias e a cada 15min as rainhas, até 1h. As larvas foram mergulhadas por apenas 2min (Tabela 2). O material coletado foi injetado em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG/MS) Shimadzu QP5000, usando uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) contendo um filme de 95% de dimetilsiloxano e 5% de difenil (Equity-5 fase estacionária, Equity). Hélio foi utilizado como gás carreador (fluxo linear de 1,6 mL/min., pressão na coluna de 100 kPa). O espectrômetro de massas foi ajustado para fazer varreduras de massas a partir de m/z 29 até 470 para a análise de hidrocarbonetos e de m/z 29 até 600 para derivados de dimetil disulfeto (DMDS). Em todas as análises a temperatura da interface do CG/EM foi mantida a 270 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60°C por 3,0 min., elevada até 270 °C a uma taxa de 8,0 °C/min., e mantida nesta temperatura por 30 min. Os dados dos derivados de DMDS foram obtidos na mesma coluna Equity-5, sendo a temperatura inicial do forno de 100, elevada até 270 °C a uma taxa de 10,0 °C/min., e mantida por 40 min. Alíquotas de 1µL foram injetadas (modo “splitless”), conforme Attygalle *et al.* (2006), com modificações.

Os derivados de DMDS foram formados conforme previamente descrito (Buser *et al.* 1983; Attygalle *et al.* 1996). Desta forma, foi adicionada ao extrato hexânico de operárias (300 µL), uma solução de iodo em éter dietílico destilado (10 µL; 5%) e dimetil disulfido destilado (200 µL; Aldrich Chemicals). As misturas das reações foram colocadas no escuro e à temperatura ambiente por 18 horas. Em seguida, estas foram descolorizadas com duas a três gotas de uma solução de tiosulfato de sódio (5%), e os produtos da fase orgânica foram extraídos com 200 µL de hexano e repetido mais duas vezes com 300 µL. Este

extrato foi evaporado com N₂ até a completa evaporação do hexano. O resíduo foi redissolvido com 600 µL de hexano.

Indivíduos	Nº de indivíduos / amostra	Quantidade do hexano (µl)	Tempo no hexano
Rainhas hospedeiras	1	500	60 minutos
Rainhas parasitas	5	500	60 minutos
Operárias	80	1000	60 minutos
Larvas	80	1000	2 minutos

Tabela 2: Quantidade de indivíduos e hexano usados para estudo dos componentes cuticulares.

Experimento 6: Capacidade de discriminação da prole:

Neste ensaio, testou-se a hipótese de que as operárias hospedeiras e parasitas são capazes de discriminar suas respectivas proles.

A metodologia usada foi à semelhança de Sumner et al. (2003). Foram usados cinco tratamentos (Tabela 3), com 30 repetições por tratamento. Foram utilizadas operárias de três colônias, sendo que duas estavam parasitadas (colônias 5 e 14) e uma não (colônia 4).

Tratamentos	Origem das operárias	Origem das larvas
1	Hospedeira (colônia 5)	Hospedeira (colônia 5) X Parasita (colônia 5)
2	Hospedeira (colônia 4)	Hospedeira (colônia 4) X Parasita (colônia 5)
3	Parasita (colônia 14)	Hospedeira (colônia 4) X Parasita (colônia 5)
4	Hospedeira (colônia 5)	Hospedeira (colônia 4) X Parasita (colônia 5)
5	Parasita (colônia 14)	Hospedeira (colônia 5) X Parasita (colônia 5)

Tabela 3: Tratamentos realizados para observar a capacidade de discriminação da prole, mostrando as diferentes combinações de operárias e larvas.

As colônias parasitadas foram separadas com, pelo menos, cinco meses de antecedência, em subcolônias contendo somente rainha hospedeira ou rainha (s) parasita (s), para se ter certeza da origem da larva, visto que sob microscopia óptica elas são muito semelhantes.

Béqueres de vidro de 50 mL foram divididos em duas partes por uma tela na posição vertical. Em cada lado foi colocada uma larva da hospedeira ou da parasita. Algodão com água e mel na proporção de 1:1 foi colocado em cada compartimento para alimentação das operárias. Após a colocação da operária, o béquer foi coberto com filme plástico perfurado para manter a umidade proveniente do algodão úmido que foi colocado sobre ele. Os comportamentos das operárias (antenação, lambedura, ficar sobre a larva, aqui denominado cuidado com as larvas) foram observados a cada 4h (9h, 13h, 17h e 21h). Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando teste Binomial a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Experimento 1: Aceitação de rainhas parasitas A. ameliae em colônias pequenas recém coletadas de A. subterraneus subterraneus:

Quatro rainhas das cinco oferecidas foram mutiladas pelas operárias, tendo partes dos apêndices (pernas e antenas) arrancados. Apenas uma rainha com ovário desenvolvido e fecundada não foi mutilada. Esta rainha penetrou no interior da colônia e permaneceu no jardim de fungo por aproximadamente 20 minutos. Após esse tempo, saiu e tentou voltar novamente ao jardim, mas as operárias não mais permitiram sua entrada. Apesar da agressão era permitido às ginas ficarem na arena, mesmo no dia seguinte ao início do experimento, quando foram retiradas. No entanto, a aproximação ou entrada das mesmas na câmara que continha fungo não era aceita.

Após dissecação verificou-se os seguintes estágios de maturidade:

- Duas fêmeas tinham ovários desenvolvidos e estavam copuladas;
- Uma apresentava ovário não desenvolvido e não estava copulada;
- Uma tinha seu ovário desenvolvido, havia efetuado postura e não estava copulada;
- Na última, o ovário estava pouco desenvolvido, ela não tinha copulado e nem apresentava sinal de oviposição.

Nos casos em que ovos são ovipositados por fêmeas não copuladas, possivelmente conforme tem sido observado na literatura (Hölldobler & Wilson, 1990; Gobin et al, 1999) eles se desenvolverão em machos.

Experimento 2: Interação entre rainhas hospedeiras e parasitas:

Foi observado que quando ocorreram os encontros entre rainhas de colônias parasitadas companheiras de ninho, ou não, a seqüência de comportamentos é mais simples, não havendo agressão entre elas (Fig. 1), fato observado em todas as situações no que diz respeito aos encontros de rainhas parasitas com rainhas de colônias não parasitadas. A abertura das mandíbulas, a mordida e, numa única circunstância, a mutilação de apêndices (patas e antenas) revelaram que *A. subterraneus subterraneus* não reconheceu *A. ameliae* como companheira (Fig. 2), nos primeiros minutos das observações, mas ao final de 1h, a rainha hospedeira já aceitava a proximidade com a rainha parasita.

Em todas as observações a aproximação inicial foi sempre feita pela rainha parasita, em poucos minutos (1-3 minutos), e no caso de rainhas de colônias não parasitadas a aproximação ocorreu, em alguns casos (n=3), num tempo superior a 14 minutos. A antenação, comportamento associado ao reconhecimento, é o primeiro ato observado entre as rainhas, independente da situação. O “autogrooming” também foi observado várias vezes, especialmente quando as rainhas entravam em contato direto (antenação).

Em todos os casos, ao final do tempo das observações, as aproximações entre as rainhas ocorreram com estas ficando perpendiculares (n=1), paralelas com cabeças direcionadas para o mesmo lado (n=1), ou opostas (n=2); ou ainda com a rainha parasita sobre a hospedeira (n=1) ou apenas com a hospedeira com a cabeça sobre o tórax da rainha parasita (n=1) (Figs. 1 e 2).

A tentativa de ficar sobre o dorso da rainha hospedeira foi observada várias vezes e, com maior freqüência, nos encontros com rainhas de colônias não parasitadas. Nos casos em que houve maior agressividade por parte da hospedeira, observou-se que quando este comportamento ocorria, as rainhas hospedeiras tornavam-se muito mais agitadas o que levava a queda da rainha parasita; o mesmo não ocorreu quando era *A. subterraneus subterraneus* que permanecia sobre *A. ameliae*. O posicionamento da rainha parasita sobre a rainha hospedeira ou, em alguns casos, o contrário também foi observado em outros experimentos nos quais as rainhas estavam juntas.

Experimento 3: Estudo da morfologia interna das glândulas de Dufour e esternais de A. ameliae e A. subterraneus subterraneus:

Não foram observadas diferenças entre as glândulas de Dufour de *A. ameliae* e *A. subterraneus subterraneus*; também não foram verificadas diferenças destas glândulas entre fêmeas virgens e acasaladas.

As glândulas de Dufour têm formato de pêra e apresentam epitélio simples de células cúbicas revestidas por cutícula fina; o núcleo ativo se apresentou bem desenvolvido com cromatina descondensada. O citoplasma acidófilo tinha aspecto homogêneo.

As glândulas esternais apresentaram o mesmo aspecto entre as espécies estudadas, mas nas ginas fecundadas havia acúmulo de material no citoplasma, o que não se observou em ginas virgens.

Experimento 4: Atratividade das secreções das glândulas de Dufour de rainhas A. ameliae e A. subterraneus subterraneus sobre operárias e rainhas hospedeiras e parasitas:

Foi observado que apenas as secreções da glândula de Dufour de fêmeas acasaladas têm efeito atrativo, sendo que essa atratividade foi exercida especialmente sobre as operárias. Quando o experimento foi realizado exclusivamente com as rainhas, estas não foram atraídas para o papel filtro impregnado com o extrato. No entanto, observou-se que as rainhas parasitas apresentaram comportamento de repelência (elas tornavam-se agitadas e iam em direção oposta ao papel) em relação ao odor liberado pelo macerado da glândula de Dufour da hospedeira. Quanto à rainha hospedeira, esta não foi atraída pelo extrato, exibindo comportamento de imobilidade. Comportamento semelhante foi verificado nos experimentos feitos na arena de forrageamento. Nesse caso, após o contato das operárias com o papel filtro que continha as secreções da hospedeira, ao encontrarem de imediato a rainha parasita, elas apresentaram comportamento agressivo, de abertura de mandíbulas e, em algumas vezes, mordiam as pernas da rainha parasita. Esses comportamentos agressivos duraram cerca de 2 a 3 segundos.

Quanto à reação das operárias na arena de forrageamento, observou-se que os compostos da glândula de Dufour da rainha hospedeira foram mais atrativos às operárias hospedeiras que os compostos da rainha parasita. As operárias parasitas foram atraídas exclusivamente para o papel filtro impregnado com extratos da glândula de *A. ameliae*.

Em subcolônias em que existiam apenas as rainhas parasitas, observou-se o transporte do papel filtro que continha as secreções da glândula de Dufour de *A. subterraneus subterraneus* para a massa de fungo, pelas operárias hospedeiras.

Experimento 5: Identificação dos componentes cuticulares:

Foram identificados os seguintes vários hidrocarbonetos saturados (C13, C15, C16, C17, C18, C22, C23, C25, C26, C28) nas espécies estudadas. No entanto, as rainhas hospedeiras apresentaram maior número e quantidade de hidrocarbonetos (C13, C15, C16, C17, C18, C22, C23, C25, C26, C28) do que as rainhas parasitas (C15, C18, C22) de mesma colônia (Fig. 3a). Destacando-se o C16 nas fêmeas hospedeiras e o C18 em *A. ameliae*.

Todos os hidrocarbonetos saturados encontrados nas rainhas parasitas estavam presentes nas hospedeiras.

Resultado diferente foi observado em relação à casta das operárias e larvas. Nesses casos, a parasita teve maior número e quantidade de hidrocarbonetos saturados, com destaque para o C28 que apresentou quantidade expressiva em relação aos demais (Figs. 3b e 3c).

Experimento 6: Capacidade de discriminação da prole:

Os dados demonstraram que tanto as operárias hospedeiras quanto às operárias parasitas atendem aos imaturos das duas espécies (Fig. 4). Na espécie hospedeira, houve acentuada preferência ($P < 0.05$) por imaturos coespecíficos companheiros de ninho (Figs. 4a e b). Quando foi permitida a escolha entre uma larva companheira de ninho parasita e outra não companheira, mas coespecífica foi verificada acentuada preferência por operárias parasitas oriundas da mesma colônia (Fig. 4c).

No que se refere às operárias parasitas, observa-se que elas têm nítida preferência ($P < 0.05$) por larvas coespecíficas em relação às hospedeiras quando estas não são oriundas do mesmo ninho (Fig. 4d), mas quando as larvas são provenientes da mesma colônia, não há diferença significativa (Fig. 4e), revelando, desse modo, baixa capacidade de discriminação.

Na figura 4a observa-se que a preferência pela larva parasita vai diminuindo à medida que aumenta o tempo de isolamento. Resultado semelhante é observado na figura 4d. Neste caso, observa-se nítida preferência das operárias parasitas por larvas coespecíficas nos primeiros horários de observação (100% às

9h e 13h do tratamento 3). Esta preferência diminui com o aumento do tempo de isolamento.

DISCUSSÃO

A defesa da colônia é claramente efetuada pelas operárias e a aceitação ou não da rainha parasita é determinada por esta casta. Independente da origem da rainha, a agressividade foi muito baixa, mas no experimento de aceitação de rainhas o comportamento agressivo das operárias foi muito acentuado, com mutilação das fêmeas independente do seu estado de maturidade sexual. É provável que a alta agressividade das operárias esteja relacionada ao tempo de fecundação das rainhas fertilizadas, uma vez que foi permitida a uma delas entrar no jardim de fungo por quase 20 min. A casta operária e o tempo de invasão de ninho são fatores importantes e já conhecidos em alguns insetos. As operárias de *Polistes dominulus* aceitam a nova rainha parasita *Polistes nimphus* quando esta chega seis dias após a emergência das operárias (Cervo et al., 2004). Lenoir et al. (2001) demonstraram que rainhas de *P. rufescens* passam por um período de insignificância química após a fecundação o que facilita a tomada do ninho. Algumas horas após a fecundação essa característica é perdida e a rainha dulótica é agredida.

Na interação entre rainhas a aproximação foi sempre efetuada pela parasita e alguns comportamentos essenciais de reconhecimento foram observados: a antenação e o “autogrooming”. Conforme Della Lucia et al (2001) a intensidade da inspeção depende obviamente da familiaridade dos sinais detectados. Se, por exemplo, se tratar de uma formiga intrusa ela poderá ser violentamente atacada.

O “allogrooming”, considerado essencial na aceitação de rainhas parasitas como já verificado nas espécies dulóticas, (Lenoir et al, 1999; Lenoir et al., 2001; D’Etorre et al, 2000; D’Etorre & Heinze, 2001) não foi observado durante os experimentos, provavelmente porque o tempo foi curto e, talvez por estarem as rainhas isoladas das operárias. O “autogrooming” está mais associado à limpeza, mas também tem seu papel no reconhecimento quando, após a trofalaxia, os hidrocarbonetos da glândula pós faringiana são aplicados na cutícula (Lenoir et al, 1999). Conforme esses mesmos autores, quando duas formigas se encontram elas podem já se reconhecer a uma distância muito curta (1-2 cm), mas geralmente

contatos físicos são necessários; logo, a antenação tende a ser o contato primário. O tempo de antenação também é maior quando os indivíduos não são do mesmo ninho ou estão separados por longos períodos (Dahbi & Lenoir, 1998). A hostilidade obedecerá a um gradiente de resposta que pode ir da aceitação a ataques de extrema violência (Vilela & Della Lucia, 1993).

O comportamento de subida ao dorso da hospedeira por rainhas parasitas e a maior rejeição dele em rainhas de colônias não parasitadas, especialmente as mais agressivas, pode estar relacionado a um comportamento inicial de a rainha parasita sujeitar a rainha hospedeira. Alternativamente, pode representar um comportamento precursor do já observado em inquilinas mais derivadas de tamanho reduzido e sem casta operária, como *Teleutomyrmex schneideri* que permanece todo o tempo sobre a hospedeira *Tetramorium caespitum*, ou ainda, um comportamento de proteção da rainha parasita que facilita ter acesso a articulação cabeça-tórax e cortá-la como visto em espécies dulóticas (Hölldobler & Wilson, 1990; Toppoff & Zimmerli, 1993).

A posição invertida das rainhas em alguns casos, aqui encontrada, tanto quando uma estava sobre a outra ou na placa, talvez seja importante no momento da invasão da colônia, pela liberação de compostos oriundos das glândulas abdominais (Dufour, esternais, de veneno), independentes ou mais provavelmente associados, importantes no apaziguamento da rainha hospedeira. Não se conhece trabalhos que tenham analisados os efeitos dos compostos dessas glândulas sobre rainhas. No experimento de atratividade dos compostos das glândulas de Dufour, em que os testes foram realizados exclusivamente com rainhas não se observou qualquer reação da hospedeira. Isto pode acontecer porque os compostos não tiveram efeito, ou por eles funcionarem como um meio de acalmar a rainha hospedeira. Isso foi reforçado, quando ao final das observações das interações entre rainhas, todas elas permaneceram próximas em colônias já parasitadas e 50% se afastaram quando os encontros se deram com hospedeiras de colônias não parasitadas. Estes resultados talvez expressem o que pode ocorrer naturalmente em campo no que diz respeito às taxas de parasitismo. Em inquilinas, esta taxa é muito baixa: menos de 1% das colônias coletadas por Passera em 30 anos estavam parasitadas; em populações infestadas, essa era de 30-50% das colônias (Passera et al., 2001). Sumner et al. (2004) também obtiveram valores parecidos: 44% de colônias parasitadas em campo por *A. insinuator*. Menor ainda é a taxa de

parasitismo de *Polyrhachis lama* sobre *Diacamma* sp.: menos de 9% (Maschwitz et al., 2004).

As glândulas de Dufour das espécies estudadas têm características comuns às de outras formigas. A presença da cutícula fina mostra-se como resultado da sua origem ectodérmica (Billen et al., 1984). O núcleo com cromatina descondensada revela que havia produção de substâncias, o que pode ser confirmado com os resultados dos testes de comportamento feitos no experimento de atratividade das secreções das glândulas de Dufour.

Apesar de não terem sido observadas diferenças nas glândulas de Dufour entre ginas virgens e acasaladas no que diz respeito ao tamanho e à morfologia interna, ao contrário do apresentado em espécies parasitas sociais, como *Polyergus rufescens*, (Mori et al, 2000; Grasso et al, 2005) e *Apis mellifera capensis* (Sole et al., 2002), foram observadas diferenças de comportamento das espécies, quando em contato com os compostos de tais glândulas, dependendo do estágio reprodutivo das fêmeas.

Operárias de *A. subterraneus subterraneus* são atraídas pela rainha parasita *A. ameliae* e é provável que compostos da glândula de Dufour tenham algum papel nesta atratividade. Sabe-se que operárias de *Formica* aceitam a rainha intrusa devido ao feromônio de apaziguamento produzido pela glândula de Dufour (Mori et al., 2000). Não apenas substâncias químicas são responsáveis pela atração de operárias hospedeiras por rainhas parasitas, mas também características morfológicas. É provável que o tamanho de *A. ameliae*, um pouco menor que as operárias maiores da hospedeira, facilite a sua aceitação, pois na massa fúngica a distinção das duas é dificultada. As rainhas de *Bothriomyrmex sirius*, além de apresentarem a mesma substância de alarme das operárias hospedeiras do gênero *Tapinoma*, também são da mesma cor destas operárias (Lloyd et al., 1986).

Foi observado que a maior atratividade dos compostos da glândula de Dufour é exercida dentro da própria espécie, confirmando que a composição é espécie específica como já observado em outras formigas (Billen et al, 1983; Billen, 1993). Também se observou neste trabalho que a glândula de Dufour está realmente associada ao parasitismo social, uma vez que as operárias parasitas são atraídas exclusivamente para os compostos de *A. ameliae*, enquanto os de ambas as rainhas atraem as operárias hospedeiras mesmo em colônias órfãs. O

comportamento de repelência apresentado por *A. ameliae* quando exposta ao odor da hospedeira, talvez seja um indício de que esta glândula tenha um papel importante no reconhecimento entre os membros da colônia na espécie hospedeira, pois a atratividade entre indivíduos é uma das funções dos compostos da glândula de Dufour (Billen, 1993).

É provável que, além dos compostos eliminados por glândulas para facilitar a invasão da colônia pela rainha parasita e sua posterior permanência, menor quantidade de compostos cuticulares tenham importância nesses processos, como evidenciado no experimento de identificação de compostos cuticulares de rainhas hospedeiras e parasitas companheiras de ninho. Menor quantidade de hidrocarbonetos cuticulares já foram observados em espécies parasitas dulóticas (D'Ettore et al., 2002) e recentemente na inquilina *A. insinator* (Lambardi et al., 2007).

Maior quantidade de compostos cuticulares em operárias e larvas de *A. ameliae* é muito diferente do que se esperava encontrar. Pode ser que a cutícula mais rugosa e pilosa das operárias parasitas facilite a maior retenção dos hidrocarbonetos cuticulares do que a cutícula lisa das operárias hospedeiras. No que diz respeito às larvas maiores investigações se fazem necessárias, uma vez que Lambardi et al. (2007) observaram que as rainhas e operárias de *A. insinator* têm menores quantidades de hidrocarbonetos cuticulares, além de apresentarem alcenos de maior peso molecular diferentes da hospedeira *A. echinator*.

Operárias hospedeiras e parasitas são aptas a discriminar sua prole, sendo que esta capacidade é maior em *A. subterraneus subterraneus*, porque estas preferem nitidamente larvas coespecíficas companheiras de ninho às larvas parasitas. Já as operárias de *A. ameliae* discriminam bem as larvas coespecíficas das larvas hospedeiras apenas quando estas são oriundas de ninhos diferentes. Este resultado é semelhante ao observado em *A. insinator* inquilina de *A. echinator* (Sumner et al., 2003) quando em contato com larvas hospedeiras e parasitas provenientes de diferentes colônias.

A clara preferência da operária hospedeira de colônia não parasitada por larvas da sua própria colônia (Fig. 4b) e não preferência (Fig. 4c) leva a crer que, a maior aceitação dos imaturos parasitas esteja mais relacionada à questão do companheirismo de ninho do que da atratividade das larvas. Embora as análises químicas preliminares tenham mostrado maior número e quantidade de

hidrocarbonetos nas larvas parasitas, estes não parecem ser suficientes para torná-las mais atrativas. Outros trabalhos realizados sobre aceitação de prole tiveram resultados semelhantes. Araújo et al (1996) observaram que larvas e pupas de *Atta sexdens rubropilosa* não companheiras de ninho eram rejeitadas e que quanto maior o tempo de isolamento dos imaturos homocoloniais maior era a rejeição. Também Johnson et al (2005) verificaram que maior número de ovos foi cuidado por operárias heteroespecíficas de *Formica* que ovos da espécie escravagista *P. breviceps*. Entretanto, Souza et al (2006) verificaram que *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* não discriminam a prole concolonial de prole estranha.

Os resultados deste trabalho evidenciaram que, embora o número de operárias parasitas seja reduzido e apresente uma só casta, as operárias parasitas têm capacidade de distinção da sua prole e de sua rainha, enquanto as operárias hospedeiras, embora tenham preferência por sua rainha e prole, aceitam a espécie parasita. Esta característica, associada ao comportamento passivo das rainhas hospedeiras em relação às rainhas parasitas, demonstra que substâncias não definidas no trabalho e oriundas da glândula de Dufour estão associadas à aceitação da rainha parasita no ninho hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadalla, F.C. & Cruz-Landin, C da. 2001. Dufour glands in the hymenopterans (Apidae, Formicidae, Vespidae): a review. **Rev. Brasil. Biol.** **61**: 95-106 p.
- Araújo, M. S., Della Lucia, T. M. C., Araújo, F S. & Bento, J. M. S. 1996. Discriminação da prole por operárias companheiras e não companheiras de ninho em *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). **Revta. Bras. Ent.** **40**: 101-104 p.
- Attygalle, A. B., Jham, G. N., Svatos, A., Frighetto, R. T., Meinwald, J., Vilela, E. F., Ferrara, F. A. (1996). (3E, 8Z, 11Z)-3,8,11-Tetradecatrienyl acetato: A major component of sex pheromone of tomato pest *Scrobipalpuloidea absoluta*. **Bioorg. Med. Chem.** **4**: 305-314 p.

- Attygalle, A. B., Gulab, N. J., Morgan, E. D. (2006). Contents of the hypertrophied postpharyngeal gland of workers and soldiers of the fire ant *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Myrmicinae). **Sociobiol.** **47**: 471-482 p.
- Billen, J. P. J., Boven, J. K. A. Van, Evershed, R. P. & Morgan, E. D. 1983. The chemical composition of the Dufour gland contents of workers of the ant *Formica cunicularia*: a test for recognition of the species. **Annls Soc. r zool. Belg**: **113**: 283-289 p.
- Billen, J. P. J., Evershed, R. P. & Morgan, E. D. 1984. Morphological comparison of Dufour glands in workers of *Acromyrmex octospinosus* and *Myrmica rubra*. **Entomol. Exp. Appl.** **35**: 205-213 p.
- Billen, J. 1986. Comparative morphology and ultrastructure of the Dufour gland in ants (Hymenoptera: Formicidae). **Entomol. Gener.** **11**: 165-181 p.
- Billen, J. 1993. Morphology of the exocrine system in ants. Proceedings of the Colloquia on Social Insects. **In.:** KIPYATKOV V.E. (Ed.). Socium, St. Petersburg, vol. 2., 1-15 p.
- Boulay, R., Katzav-Gozansky, T., Hefetz, A. & Lenoir, A. 2004. Odour convergence and tolerance between nestmates through trophallaxis and grooming in the ant *Camponotus fellah* (Dalla Torre). **Insect. Soc.** **51**: 55-61 p.
- Brandt, M., Heinze, J., Schmitt, T. & Foitzik, S. 2006. Convergent evolution of the Dufour's gland secretion as a propaganda substance in the slave-making ant genera *Protomognathus* and *Harpagoxenus*. **Insect. Soc.** **53**: 291-299 p.
- Buser, H. R., Arn, H., Guerin, P. A., Rauscher, S. (1983). Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. **Anal. Chem.** **55**: 818-822 p.
- Dahbi, A. & Lenoir, A. 1998. Nest separation and the dynamics of the Gestalt odor in the polydomous ant *Cataglyphis iberica* (Hymenoptera: Formicidae). **Behav. Ecol. Sociobiol.** **42**: 349-355 p.
- Cervo, R., Bertocci, F & Turillazi, S. 1996. Olfactory cues in host nest detection by the social parasite *Polistes sulcifer* (Hymenoptera, Vespidae). **Behav. Proc.** **36**: p. 213-218 p.

- Cervo, R., Stemmer, C., Castle, W., Queller, D. & Strassmann, J.E. 2004. Social parasitism of *Polistes dominulus* by *Polistes nimphus* (Hymenoptera, Vespidae). **Insect. Soc.** **51**: 101-108 p.
- Crozier, R. H. & Dix, M. W. 1979. Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. **Behav. Ecol. Sociobiol.** **4**: 217-224 p.
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E. F. & Moreira, D. D.O. 2001. Feromônios de formigas pragas. 73-82 p. **In.:** Vilela, E. F. & Della Lucia, T.M.C. (Eds.) Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora. 206 pp.
- D’Ettorre, P., Errard, C. , Ibarra, F., Francke, W. & Hefetz, A. 2000. Sneak in or repel your enemy: Dufour’s gland repellent as a strategy for successful usurpation in the slave-maker *Polyergus rufescens*. **Chemoecol.** **10**: 135-142 p.
- D’Ettorre, P. & Heinze, J. 2001. Sociobiology of slave making ants. **Acta Ethol.** v. 3, p. 67-82.
- D’Ettorre, P., Mondy, N., Lenoir, A. & Errard, C. 2002. Blending in with the crowd: social parasites integrate into their host colonies using a flexible chemical signature. **Proc. R. Soc. Lond. B.** **269**: 1911-1918 p.
- Gobin, B., Billen, J. & Peeters, C. 1999. Policing behaviour towards virgin egg layers in a polygynous ponerinae ant. **Anim. Behav.** **58**: 1117-1122 p.
- Grasso, D. A., Mori, A., Le Moli, F. & Billen, J. 2005. Morpho-funtional comparison of the Dufour gland in the female castes of the Amazon ant *Polyergus rufescens* (Hymenoptera, Formicidae). **Zoomorphol.** **124**: 149-153 p.
- Holldöbler, B. & Wilson, E.O. 1990. **The ants**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachussets, 732 p.
- Johnson, C. A., Topoff, H., Vander Meer, R.K. & Lavine, B. 2005. Do these eggs smell funny to you? An experimental study of egg discrimination by hosts of the social parasite. **Behav. Ecol. Sociobiol.** **57**: 245-255 p.
- Katzav-Gozansky, T., Boulay, R., Vander Meer, R. & Hefetz, A. 2004. In-nest environment modulates nestmate recognition in the ant *Camponotus fellah*. **Naturwissenschaften.** **91**: 186-190 p.

- Lambardi, D., Dani, F. R., Turillazzi, S. & Boomsma, J.J. 2007. Chemical mimicry in an incipient leaf-cutting ant social parasite. **Behav. Ecol. Sociobiol.** **61**: 843-851 p.
- Lenoir, A., Fresneau, D. Errard, C & Hefetz, A. 1999. The individuality and the colonial identity in ants; the emergence of the social representation concept. 219-237 p. **In.:** Detrain, O., Deneubourg, J. L. & Pasteels, J. (Eds) **Information processing in social insects**. Birkhauser, Basel, Switzerland, 432 p.
- Lenoir, A., D'ettore, P., Errard, C. & Hefetz, A. 2001. Chemical ecology and social parasitism in ants. **Ann. Rev. Entomol.** **46**: 573-599 p.
- Lloyd, H. A., Schmuff, N & Hefetz, A. 1986. Chemistry of the anal glands of *Bothriomyrmex syrius* Forel: olfactory mimetism and temporary social parasitism. **Com. Biochem. Physiol.** **1**: 71-73 p.
- Martin, S. J., Jones, G.R., Châline, N., Middleton, H. & Ratnieks, F. L.W. 2002. Reassessing the role of the honeybee (*Apis mellifera*) Dufour's gland in egg marking. **Naturwissenschaften**, **89**: 528-532 p.
- Maschwitz, U., Go, C, Kaufmann, E. & Buschinger, A. 2004. A unique strategy of host colony exploitation in a parasitic ant: workers of *Polyrhachis lama* rear their brood in neighbouring host nests. **Naturwissenschaften**, **91**: 40-43 p.
- Mori, A., Grasso, D. A., Visicchio & Le Moli, F. 2000. Colony founding in *Polyergus rufescens*: the role of the Dufour' gland. **Insec. Soc.** **47**: 07-10 p.
- Passera, L., Gilber, N. & Aron, S. 2001. Social parasitism in ants: effects of the inquiline parasite *Plagiolepis xene* St. on queen distribution and worker production of its host *Plagiolepis pygmaea* Latr. **Insec. Soc.** **48**: 74-79 p.
- Sole, C.L., Kryger, P., Hefetz, A., Katzak-Gozansky & Crewe, R.M. 2002. Mimicry of queen Dufour's gland secretions by workers of *Apis mellifera scutellata* and *A. m. capensis*. **Naturwissenschaften**. **89**: 561-564 p.
- Souza, D. J., Della Lucia, T. M., Errard, C., Richard, F-J. & Lima, E. R. 2006. Behavioural and chemical studies of discrimination processes in the leaf-cutting ant *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* (Forel, 1908). **Braz. J. Biol.** **66**: 29-41 p.
- Sumner, S., Nash, D.R & Boomsma, J.J. 2003. The adaptative significance of inquiline parasite workers. **Proc. R. Soc. London. B.** **270**: 1315-1322 p.

- Sumner, S., Anen, D. K., Delabie, J.H.C. & Boomsma, J.J. 2004. The evolution of social parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emerys's rule. **Insect. Soc.** **51**: 1-6 p.
- Topoff, H. & Zimmerli, E. 1993. Colony takeover by a socially parasitic ant *Polyergus breviceps*: the role of chemicals obtained during host – queen killing. **Anim. Behav.** **46**: 479-486 p.
- Vander Meer, R.K., Saliwanchik, D. & Lavine, B. 1989. Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*: implication for nestmate recognition. **J. Chem. Ecol.**, **15**, n. 1: 2115-2125 p.
- Vilela, E. F. & Della Lucia, T.M.C. 1993 **Comunicação química**. 106-130 p. **In.:** Della Lucia, T.M.C. (Ed.). As formigas cortadeiras. Folha de Viçosa, Viçosa, 262 pp.

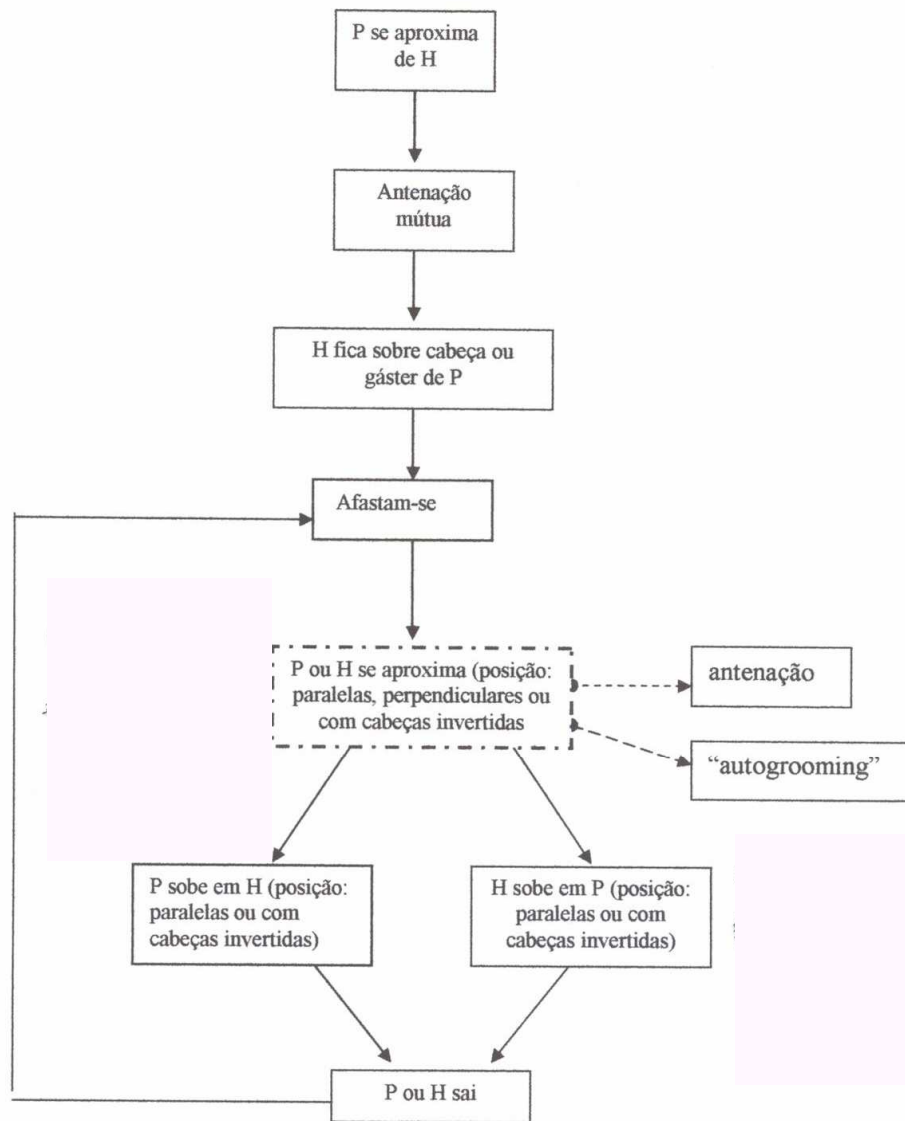


Figura 1: Fluxograma dos encontros entre rainhas de colônias já parasitadas. O quadrado com linhas e pontos refere-se ao último comportamento observado; os quadrados que estão sendo indicados por setas tracejadas referem-se aos contatos diretos observados (H= rainha hospedeira e P= rainha parasita).

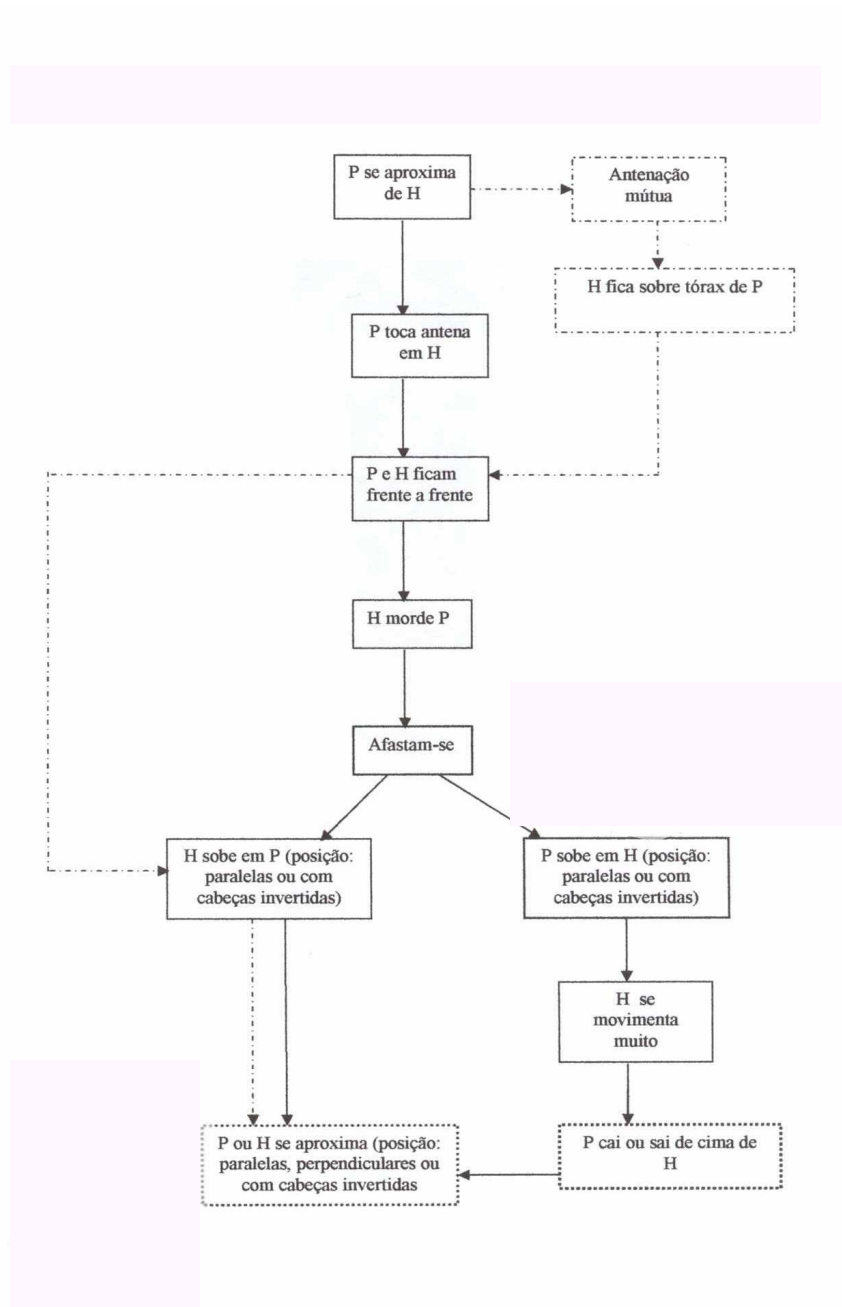


Figura 2: Fluxograma dos encontros entre rainhas hospedeiras de colônias não parasitadas com rainhas parasitas. As duas séries de comportamentos observadas estão expressas por setas contínuas e setas tracejadas; Os quadrados de linhas pontilhadas referem-se aos comportamentos observados ao término do experimento (H= rainha hospedeira e P= rainha parasita).

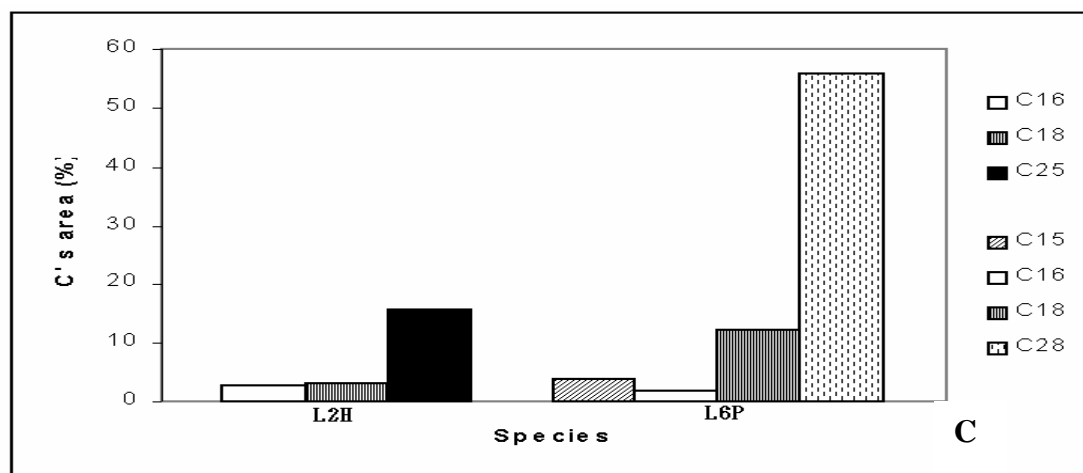
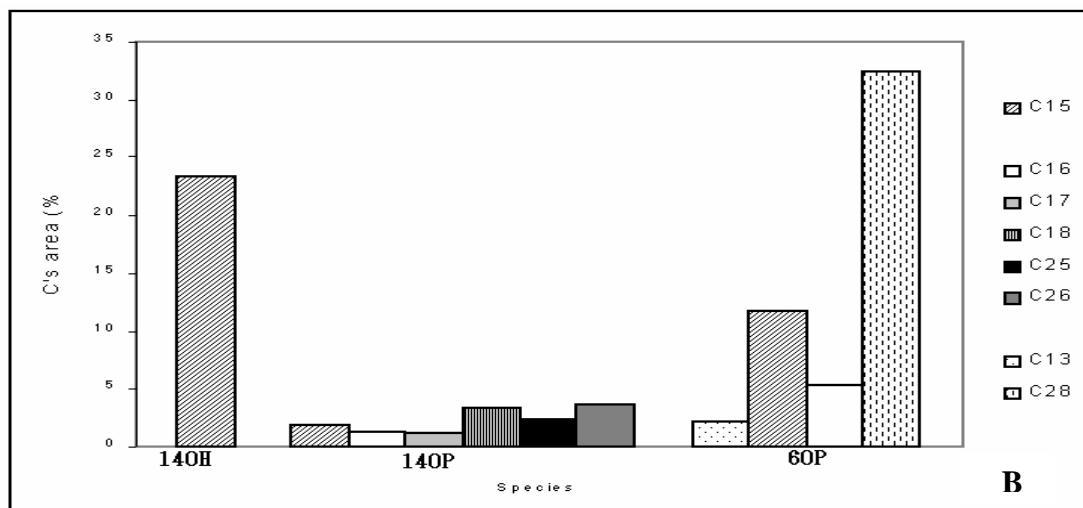
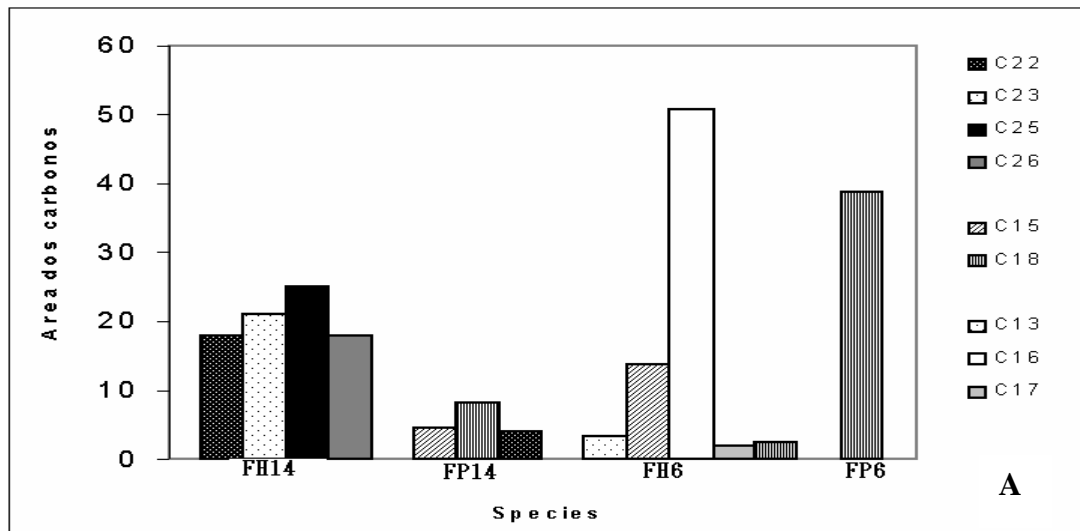


Figura 3: Quantidade de carbonos encontrados nas castas de Rainhas, operárias minor e larvas de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex ameliae*. **A:** FH14 (fêmea hospedeira da colônia 14); FP14 (fêmea parasita da colônia 14); FH6 (fêmea hospedeira da colônia 6); FP6 (fêmea parasita da colônia 6). **B:** 140H (operária hospedeira da colônia 14); 140P (operária parasita da colônia 14); 60P (operária parasita da colônia 6). **C:** L2H (larva hospedeira da colônia 2); L6P (larva parasita da colônia 6).

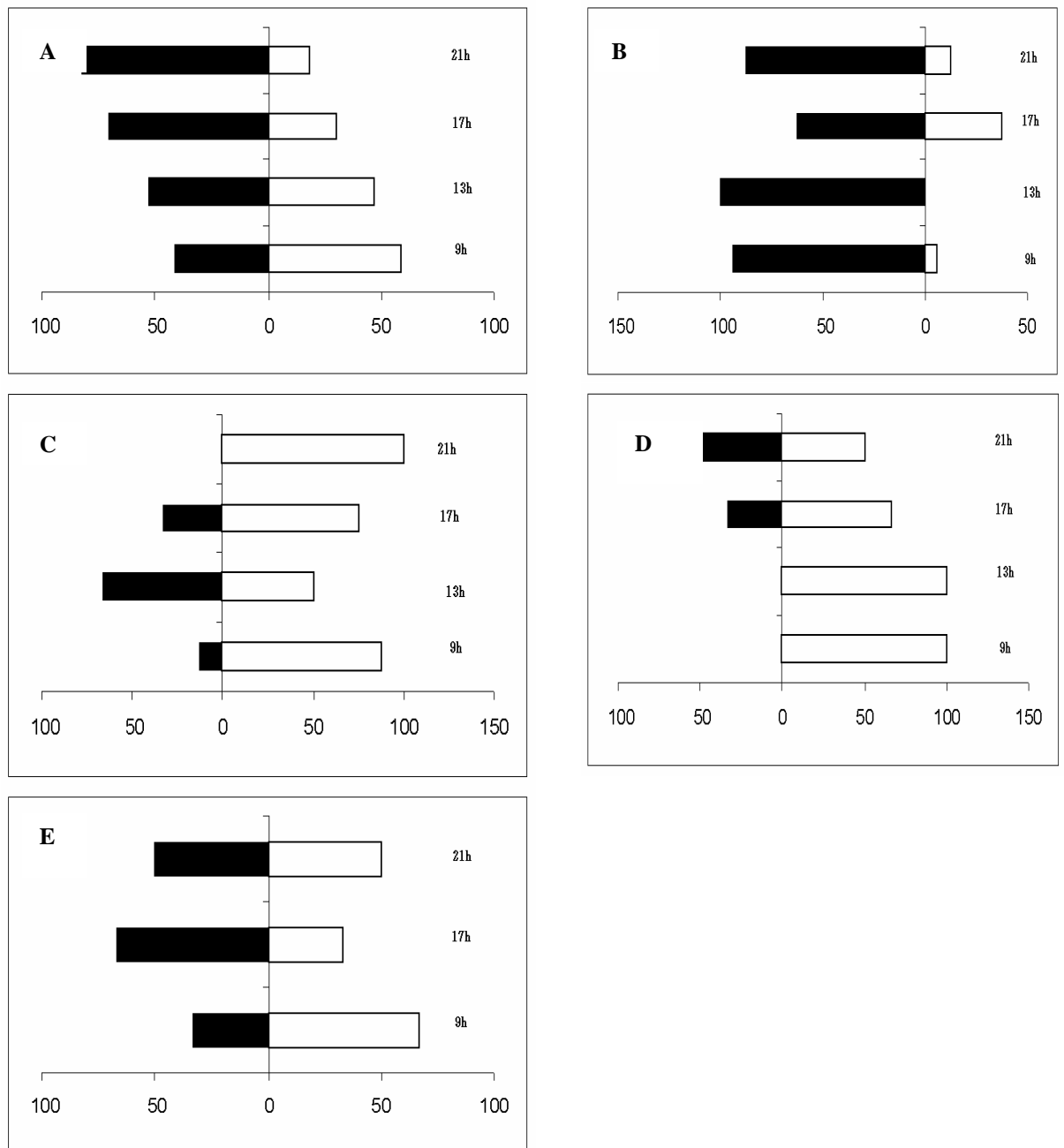


Fig. 4: Escolha por operárias (*Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex ameliae*) de larvas hospedeiras (barras escuras) e parasitas (barras claras). Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando Teste Binomial a 5% de probabilidade. Na figura **A**: Operárias hospedeiras (colônia 5) que escolheram entre larvas hospedeira (colônia 5) e parasita (colônia 5) ($P < 0.05$); **B**: Operárias hospedeiras (colônia 4) que escolheram entre larvas hospedeira (colônia 4) e parasita (colônia 5) ($P < 0.05$); **C**: Operárias hospedeiras (colônia 5) que escolheram entre larvas hospedeira (colônia 4) e parasita (colônia 5) ($P = 0.059$); **D**: Operárias parasitas (colônia 14) que escolheram entre larvas hospedeira (colônia 4) e parasita (colônia 5) ($P < 0.05$); e **E**: Operárias parasitas (colônia 14) que escolheram entre larvas hospedeira (colônia 5) e parasita (colônia 5) ($P=0.089$).

3. DISCUSSÃO GERAL

A espécie *Acromyrmex ameliae* é, de fato, inquilina de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e de *A. subterraneus brunneus*. É uma parasita social que apresenta a casta das operárias menores e que se diferencia das operárias hospedeiras da mesma casta, por apresentarem, além da coloração mais escura e corpo mais piloso e rugoso, a distância bulla-espíáculo da glândula metapleurá maior que a de *A. subterraneus subterraneus*.

Em *A. ameliae* foi reforçada a possibilidade de se usar a glândula metapleurá como caráter de diferenciação entre operárias parasitas e hospedeiras, como ocorreu em *A. insinator* e *A. echinator* (Sumner et al. 2003).

A glândula metapleurá é menor nas operárias parasitas do que nas hospedeiras. Assim, é provável que seja o maior risco de infecções na parasita o que a leva a usar a colônia hospedeira.

Rainhas de *A. ameliae* são significativamente menores que as operárias maiores da subespécie hospedeira *A. subterraneus subterraneus*, mas ao contrário das operárias parasitas, as rainhas apresentam glândulas metapleurais maiores que as das rainhas hospedeiras. Na verdade, o reservatório dessas glândulas nas rainhas parasitas leva a crer que elas produzam mais antibióticos contra patógenos. É possível que essas rainhas fiquem mais tempo expostas quando procuram ninhos das hospedeiras, daí esse maior tamanho da glândula metapleurá. No entanto, resta saber se um grande reservatório implica em maior produção de antibióticos.

Neste trabalho foi observado que tanto as rainhas quanto as operárias de *A. ameliae*, ao contrário, de outras inquilinas como *A. insinator* (Sumner et al. 2003) e *P. pygmaea* (Passera et al., 2001) não interferem de modo significativo na produção de ovos, mas inibem a produção de sexuais da espécie hospedeira. A inibição de sexuais causa impacto extremamente negativo sobre a colônia, pois impede que a hospedeira se reproduza. Este fator é muito interessante e abre uma perspectiva de controle biológico, como já vem acontecendo com *Solenopsis daguerrei* que tem sido considerada potencial candidata para controle biológico das formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) nos Estados Unidos (Calcaterra et al., 1999).

Além disso, a espécie parasita produz tamanha quantidade de sexuados que leva ao declínio e algumas vezes à morte da colônia. Observou-se que a espécie hospedeira tenta diminuir o impacto negativo da produção em massa de sexuados parasitas ao retirar machos da massa de fungo e arena de forrageamento.

A postura de ovos por *A. ameliae* é feita tanto por fêmeas fecundadas quanto não fecundadas e provavelmente, estes sejam ovos que darão origem a machos, porque investir em reprodutivos é mais proveitoso em termos biológicos para a espécie do que produzir ovos tróficos.

Quanto maior a quantidade de caracteres de diferenciação entre espécies hospedeiras e parasitas, mais parcimoniosa se torna a filogenia do grupo. Desse modo, a clara diferença na morfologia dos espermatozoides de *A. subterraneus subterraneus* que possui espermatozoides mais longos (105 μm) que *A. ameliae* (91,3 μm) representa um dado a mais para separar as duas espécies. Além do tamanho total de tais células, foram observadas diferenças no núcleo dos espermatozoides dos machos hospedeiros. Estes mediram 9,5 μm ; são muito finos e afilam uniformemente desde a base. Já na espécie parasita, o núcleo apresentou comprimento médio de 7 μm e um diâmetro aproximadamente constante, mas afilando abruptamente a partir do terço anterior desse núcleo.

Rainhas *A. ameliae* tomaram a iniciativa de aproximação quando em primeiro contato com a rainha hospedeira. Rainhas de colônias parasitadas aceitam a presença de outra rainha parasita sem exibição de comportamentos agressivos. Já rainhas de *A. subterraneus subterraneus* de colônias não parasitadas foram mais agressivas quando encontraram rainhas parasitas; após algumas interações, esta agressividade diminuiu e a aproximação foi aceita na metade dos encontros. É provável que estes testes revelem o que acontece normalmente em condições naturais: a tolerância de colônias parasitas às novas rainhas parasitas e a não aceitação de algumas colônias ao parasitismo.

A entrada e posterior permanência na colônia pela espécie parasita devem ser mediadas por caracteres morfológicos (menor tamanho), mas especialmente por caracteres químicos, que devem atuar especialmente sobre as operárias, uma vez que é esta a casta responsável pela invasão e sobrevivência da colônia.

Rainhas *A. ameliae* apresentaram menor quantidade e diversidade de hidrocarbonetos cuticulares do que as rainhas *A. subterraneus subterraneus*

companheiras de ninho. É provável que esta característica assim como o tempo de invasão da colônia após o acasalamento tenham importância no sucesso da aceitação da rainha parasita. Secreções das glândulas de Dufour de fêmeas virgens não exerceram atração sobre operárias hospedeiras, mas estas foram atraídas para secreções de fêmeas parasitas acasaladas.

As secreções das glândulas de Dufour são importantes no parasitismo social de *A. ameliae*, uma vez que as operárias parasitas não foram atraídas por compostos dessas glândulas da espécie hospedeira, mas operárias hospedeiras foram atraídas tanto para as secreções de *A. subterraneus subterraneus* quanto para as de *A. ameliae*; a atração maior se deu pelas secreções das rainhas coespecíficas.

As operárias hospedeiras foram capazes de discriminar a prole, preferindo seus próprios imaturos; no entanto, a preferência está mais relacionada às companheiras de ninho, do que exatamente aos imaturos coespecíficos.

As operárias parasitas tiveram baixa taxa de discriminação de prole coespecífica. Isso só aconteceu quando os imaturos eram oriundos de diferentes colônias.

Além destes pontos foi reforçado o quanto a poliginia torna as espécies vulneráveis. *Acromyrmex subterraneus subterraneus* tem poliginia primária. Há relatos de até sete rainhas em uma colônia jovem desta subespécie (Della Lucia et al., 1991). Embora seja a readoção de rainhas o fator mais acentuado que leva ao parasitismo social, não se deve descartar a poliginia primária, pois colônias de espécies de *Atta*, fundadas por haplometrose são mais resistentes à aceitação de indivíduos de outras colônias, e até o momento, nenhum caso de parasitismo social foi registrado neste gênero.

Este trabalho contribuiu com o aumento da compreensão dos estudos de comportamento e parasitismo social, mostrando que espécies parasitas têm biologias diferentes, além de se comportarem de maneiras distintas mesmo dentro de um mesmo gênero, como acontece com *A. ameliae* e *A. insinuator*, sugerindo desse modo, como já evidenciado pelo estudo da filogenia das parasitas sociais *Pseudoatta* sp. e *A. insinuator* (Sumner et al., 2004) que o parasitismo pode ter evoluído independentemente.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Acromyrmex ameliae é inquilina de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e de *A.subterraneus brunneus* e possui a casta das operárias menores.

As operárias da parasita apresentam, além da coloração mais escura e corpo mais piloso e rugoso, a distância bulla-espíáculo da glândula metapleurá maior que a de *A. subterraneus subterraneus*. O tamanho da glândula metapleurá é menor nas operárias da espécie parasita que nas da espécie hospedeira.

A morfologia dos espermatozóides é caráter de distinção entre as espécies hospedeira e parasita.

A entrada e posterior permanência na colônia pela parasita devem ser mediadas por caracteres morfológico (menor tamanho) e químicos.

A fecundação, assim como o tempo de invasão da colônia após o acasalamento, têm importância no sucesso da aceitação da rainha parasita.

É provável que as secreções das glândulas de Dufour tenham importância no parasitismo social de *A. ameliae*.

A espécie parasita inibe a produção de sexuais de *A. subterraneus subterraneus*.

A produção excessiva de sexuais parasitas leva ao declínio e algumas vezes à morte da colônia hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Calcaterra, L. A., Bhiano, J. A. & Williams, D.F. 1999. Field studies of the parasitic ant *Solenopsis daguerrei* (Hymenoptera: Formicidae) on fire ants in Argentina. **Environmental Entomology**. **28**: 88-95 p.
- Della Lucia, T. M. C., Oliveira, M. A., Araújo, M.S., Bento, S. M. S. & Oliveira, M. M. 1991. O comportamento de rainhas em colônia poligínica de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Formicidae: Attini). In.: Congresso Brasileiro de Entomologia, 13, Recife, **Resumos**.
- Passera, L., Gilber, N. & Aron, S. (2001) Social parasitism in ants: effects of the inquiline parasite *Plagiolepis xene* St. on queen distribution and worker production of its host *Plagiolepis pygmaea* Latr. **Insectes Sociaux**. **48**: 74-79 p.
- Sumner, S., Nash, D.R. & Boomsma, J.J. (2003) The adaptative significance of inquiline parasite workers. **Proceedings of the Royal Society of London B**. **270**:1315-1322. p.
- Sumner, S., Anen, D. K., Delabie, J.H.C. & Boomsma, J.J. 2004. The evolution of social parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emerys's rule. **Insectes Sociaux**. **51**: 1-6 p.