

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CHRISTIANE G. DALL’AGLIO-HOLVORCEM

**“ESTUDOS POPULACIONAIS E TAXONÔMICOS DE
FORMIGAS LAVA-PÉS, *Solenopsis invicta*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE), E DA FENOLOGIA
DE SEUS PARASITÓIDES DO GÊNERO *Pseudacteon*
(DIPTERA: PHORIDAE)”**

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Doutor em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Woodruff W. Benson
Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

Campinas, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Campinas, 27 de abril de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Woodruff W. Benson (Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado

Assinatura

Prof. Dr. Bráulio Ferreira de Souza Dias

Assinatura

Profª. Dra. Helena Castanheira de Moraes

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Inácio Prado

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Fernando S. Andrade

Assinatura

Prof. Dr. João Vasconcelos Neto

Assinatura

Prof. Dr. Thomas Michael Lewinsohn

Assinatura

A meu pai, Ivo (*in memoriam*)

Agradecimentos

Esta tese contém os resultados das pesquisas em que estive envolvida durante o meu doutorado e que sobreviveram às “intrusões demoníacas” descritas por Hurlburt (*Ecological Monographs*, 1988): queimadas acidentais nas minhas parcelas, duas inundações em duas estações de chuva consecutivas, entre tantas outras intrusões.

Ao longo destes anos, foram muitas as pessoas com as quais fiz amizades, tanto no âmbito profissional quanto pessoal. Seria impossível mencionar todas elas aqui, mas gostaria de expressar minha profunda gratidão às seguintes pessoas:

Woodruff Benson, pela orientação, aprendizado e amizade destes anos.

Lloyd W. Morrison (Department of Biology, Southwest Missouri State University), que esteve presente em cada etapa do meu doutorado, sempre atento e disposto a dar sua contribuição e incentivo, mesmo quando tudo parecia perdido. Ao Lloyd, agradeço por compartilhar comigo seu conhecimento e sua grande amizade, por ter me encorajado quando o projeto original foi abandonado, e a ele devo as discussões e o desenho experimental dos projetos que se tornaram o capítulo 3.

José Roberto Trigo (Laboratório de Ecologia Química, Depto Zoologia, UNICAMP), por me oferecer a possibilidade de colaborar com ele, pelas discussões proveitosas que tivemos ao longo destes anos, e, principalmente, por acreditar em minhas idéias e me oferecer condições de trabalho para desenvolvê-las.

Larry Gilbert (University of Austin, Texas), por ter financiado o trabalho de campo, pelo apoio e amizade.

Don Feener (University of Utah, Salt Lake City), por ter financiado minha visita à USDA em Gainesville, a qual foi muito proveitosa para este trabalho.

Bob Vander Meer, *Sanford Porter* e *Daniel Wojcik* (USDA-CMAVE, Gainesville FL), pela discussão proveitosa e orientação durante minha visita em 2000, e pelos comentários sobre os manuscritos;

Carlos R. Brandão (Museu de Zoologia da USP), pela permissão para examinar os espécimes de *Solenopsis invicta* e *S. saevissima* pertencentes à coleção do museu.

Luis Alexandre Nogueira de Sá (Laboratório de Quarentena, EMBRAPA, Jaguariúna, SP), pela permissão para realizar as amostragens do capítulo 3 dentro da área da EMBRAPA/Jaguariúna.

José Carlos (tecnico do Depto. Zoologia-IB-UNICAMP), que com muita paciência, fez meus tubinhos de coleta, e que me acompanhou e me ajudou em várias saídas de campo.

Aos membros da pré-banca (*Ângelo Prado*, *Helena Moraes* e *Paulo Inácio Prado*) pelas sugestões.

Também agradeço...

A *Augusto H. A. Portugal* pelo companheirismo e incentivo constante, pela enorme paciência com minhas limitações dentro do laboratório de ecologia química, e pelas discussões valiosas ao longo destes anos.

A *Karina Mancini*, que teve toda a paciência e habilidade para preparar as formigas para a microscopia de varredura, que foram essenciais para encontrar o carácter morfológico descrito no Capítulo 4.

Aos amigos que tornaram estes anos mais amenos: *Flávia*, *Lidiamar*, *Mayra*, *Marcinha*, *Karina* e *Marcelo*, *Paiva*, *Gigi*, *Mara*, *Arlindo*, *Luciana* (*Mamilu*).

A *Léo* e *Alberto*, que me ensinaram a ver a força que existe dentro de mim.

A minha mãe *Nadyr* e meu irmão *Ivo*, por entenderem o meu modo de viver e minha ausência durante as reuniões de Natal e Ano Novo nos anos em que tentei salvar meus experimentos após as inundações.

A *Carmem* e *José Paulo Holvorcem*, pelo apoio e incentivo constantes.

A *Paulo Holvorcem* – quem, com muito carinho e paciência, nunca deixou que eu desistisse ou me perdesse ao longo destes anos.

A *Bopp* e *Chufy*, meus queridos companheiros caninos, pelo seu amor incondicional e por me ensinarem algumas lições sobre a vida.

Finalmente, agradeço ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Conteúdo

Agradecimentos.....	vii
Conteúdo.....	ix
• Resumo.....	xi
• Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Relações alométricas em colônias de <i>Solenopsis invicta</i>	17
• Anexo: Allometric relationships between biomass, volume, and population size in colonies of <i>Solenopsis invicta</i> in southeast Brazil.....	21
3. Aspectos de fenologia de forídeos e colônias de <i>S. invicta</i>	43
• Anexo: Seasonal fluctuations in abundance of <i>Pseudacteon</i> flies (Diptera: Phoridae), parasitoids of <i>Solenopsis invicta</i> fire ants (Hymenoptera: Formicidae), in Southeast Brazil.....	47
4. Utilização de caracteres químicos para identificar populações de <i>Solenopsis invicta</i> e <i>S. saevissima</i>	75
• Anexo: Chemical and morphological tools to distinguish the fire ant species <i>Solenopsis saevissima</i> and <i>S. invicta</i>	85
5. Considerações finais.....	117
6. Referências bibliográficas.....	123

Este trabalho discute alguns aspectos da ecologia da formiga lava-pés *Solenopsis invicta* e seus parasitóides, as moscas do gênero *Pseudacteon* (família Phoridae), e da taxonomia de *S. invicta* e *S. saevissima*, ambas nativas da América do Sul.

A alometria de colônias de *S. invicta* no sudeste do Brasil foi estudada através de medições das dimensões do ninho acima do solo, seguidas por escavação e medida da profundidade, biomassa e número de operárias da colônia, assim como da largura média da cabeça das operárias. Análise de regressão dos dados para 28 colônias forneceu novas relações alométricas que podem ser usadas para estimar o volume do ninho (acima e abaixo da superfície do solo), a biomassa de formigas, e o número de operárias a partir do volume do ninho acima do solo. A biomassa de formigas por unidade de volume do ninho, o número de operárias por unidade de volume do ninho, o peso médio por operária, e a largura média da cabeça das operárias foram essencialmente independentes do tamanho da colônia. Em contraste, estas quatro quantidades aumentam com o tamanho da colônia entre colônias de *S. invicta* na América do Norte.

O ciclo sazonal e abundância de moscas parasitóides do gênero *Pseudacteon* na vizinhança de colônias de *S. invicta* no sudeste do Brasil foi observado ao longo de um período de 3 anos em 11 áreas de gramíneas nos arredores de Campinas. O número médio N de forídeos atraídos para um ninho de formigas lava-pés ao longo de um período padrão de observação (15 min) foi usado como uma medida da abundância de forídeos. As dimensões do ninho e algumas variáveis meteorológicas foram também registradas em cada ninho de formigas lava-pés. *Pseudacteon tricuspis* foi a espécie mais comum (70.4%), seguido por *P. curvatus* (23.8%), *P. obtusus* (1.9%) e *P. litoralis* (3.9%). As características mais notáveis das flutuações sazonais da abundância de *Pseudacteon* são picos abruptos com duração aproximada de um mês (valores máximos de N entre 4 e 10 forídeos/ninho), que ocorreram em abril e junho de alguns anos; para comparação, valores típicos de N estavam entre 0.2 e 2 forídeos/ninho. As populações de forídeos parecem ser destruídas por incêndios e inundações, mas recuperam-se em uma escala de tempo da ordem de meses. Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a abundância de *Pseudacteon* e variáveis meteorológicas, densidade,

ou volume de ninhos de *S. invicta*, sugerindo que a abundância de *Pseudacteon* não está diretamente ligada a abundância de *S. invicta*. Flutuações quase idênticas em abundância de *Pseudacteon* foram observadas ao longo de um período de 6 meses em duas áreas de estudo separadas por cerca de 3 km, o que pode ser causado por dispersão de forídeos e conseqüente uniformização de densidades sobre áreas de vários quilômetros quadrados. Os números de forídeos atraídos pelos vários ninhos de *S. invicta* incluídos neste estudo seguiram uma distribuição de Poisson em baixas abundâncias de *Pseudacteon* ($N < 0,5$ forídeos/ninho); a distribuição tornava-se mais e mais contagiosa com o aumento da abundância de *Pseudacteon* (até o máximo observado, de $N = 10$ forídeos/ninho). Esta observação sugere que a atratividade de um ninho de formigas lava-pés aos parasitóides aumenta com o número de forídeos que foram previamente atraídos para o ninho.

Critérios quantitativos eficientes foram desenvolvidos para distinguir entre *S. invicta* e *S. saevissima*, que são morfológicamente muito similares e cujas distribuições geográficas na América do Sul se sobrepõe significativamente. Estes critérios resultaram da análise de 68 amostras de formigas lava-pés de 9 localidades espalhadas pelo estado de São Paulo (sudeste do Brasil) através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa. 22 hidrocarbonetos cuticulares e 18 alcalóides piperidínicos foram identificados nas amostras estudadas, e suas abundâncias relativas foram analisadas utilizando análises de componentes principais e de funções discriminantes. Estas análises mostraram uma separação nítida entre as duas espécies em um plano com certas coordenadas (P, Q), que são funções das abundâncias relativas dos hidrocarbonetos cuticulares. As amostras provenientes de uma das localidades (São José do Rio Preto) têm uma composição de hidrocarbonetos que é claramente diferente de todas as outras amostras consideradas neste estudo, mas também apresentam algumas características em comum com cada uma das duas espécies. Uma possibilidade é que esta população constitua um híbrido de *S. invicta* e *S. saevissima*. As duas espécies também exibem uma separação razoavelmente nítida em um plano com coordenadas (R, S), que são funções das abundâncias relativas de alcalóides piperidínicos. Os resultados das identificações de espécies baseados nestes critérios de separação química concordam com os resultados baseados em um critério morfológico, a presença ou ausência do dente clipeal mediano. A população "anômala" de São José do Rio Preto é morfológicamente classificada como *S. invicta*.

ABSTRACT

This work discusses some aspects of the ecology of the fire ant species *Solenopsis invicta* and its phorid parasitoid flies of the genus *Pseudacteon*, and of the taxonomy of *S. invicta* and *S. saevissima*, both of which are native to South America.

The allometry of *S. invicta* colonies in southeast Brazil was studied by measurement of mound (aboveground) dimensions, followed by excavation and measurement of the colony depth, biomass, number of workers, and mean worker head width. Regression analysis of data for 28 colonies yielded new allometric relationships which can be used to estimate nest volume (above and below ground), ant biomass, and number of workers from mound (aboveground) volume. Ant biomass per unit nest volume, number of workers per unit nest volume, mean worker weight, and mean worker head width were nearly independent of colony size. In contrast, these four quantities increase with colony size among *S. invicta* colonies in North America.

The seasonal cycle of abundance of *Pseudacteon* phorid flies in the vicinity of *S. invicta* colonies in southeast Brazil was observed over a 3-year period in 11 grass-covered areas in the outskirts of Campinas. The average number N of phorids attracted to a fire ant nest over a standard observation period (15 min) was used as a measure of phorid abundance. Mound dimensions and meteorological variables were also recorded at each fire ant nest. *Pseudacteon tricuspis* was the most common species (84.2%), followed by *P. curvatus* (12.6%), *P. obtusus* (2.7%) e *P. litoralis* (0.5%). The most remarkable features of the seasonal fluctuations of *Pseudacteon* abundance are sharp month-long peaks (peak N values between 4 and 10 phorids/nest) which occurred in April and June of some years; for comparison, at other times N was typically between 0.2 and 2 phorids/nest. Phorid populations seem to be destroyed by fires and floods, but recover on a time scale of months. No significant correlation was found between *Pseudacteon* abundance and meteorological variables, density, or volume of *S. invicta* nests, suggesting that *Pseudacteon* abundance is not determined by, and does not determine, the abundance of *S. invicta*. Almost identical fluctuations in *Pseudacteon* abundance were observed over a 6-month period in two study areas separated by about 3 km, which may be due to phorid dispersal and consequent density uniformization over areas of

several square kilometers. The numbers of phorids attracted by the various *S. invicta* nests included in this study followed a Poisson distribution at low *Pseudacteon* abundances ($N < 0.5$ phorids/nest), becoming more and more contagious at high *Pseudacteon* abundances (up to $N = 10$ phorids/nest). This observation suggests that the attractiveness of fire ant nests to phorid parasitoids increase with the number of phorids which have been previously attracted to the nest.

Efficient quantitative criteria were developed for distinguishing between *S. invicta* and *S. saevissima*, which are morphologically very similar and whose geographical ranges in South America significantly overlap. These criteria resulted from the analysis of 68 fire ant samples from 9 localities across São Paulo state (southeast Brazil) via gas chromatography/mass spectrometry. 22 cuticular hydrocarbons and 18 piperidine alkaloids were identified in the studied samples, and their relative abundances were analyzed using principal component and discriminant function analyses. These analyses showed a sharp separation between the two species in a plane with certain coordinates (P, Q), which are functions of the relative abundances of cuticular hydrocarbons. The fire ant samples from one of the localities (São José do Rio Preto) had a hydrocarbon composition which was markedly different from all other samples considered in this study, but had some features in common with each of the two species. One possibility is that this population constitutes a hybrid of *S. invicta* and *S. saevissima*. The two species also show a reasonably sharp separation in a plane with coordinates (R, S), which are functions of the relative abundances of piperidine alkaloids. The species identification results based on these chemical separation criteria agree with those based on a morphological criterion, the presence or absence of the median clypeal tooth. The "anomalous" population from São José do Rio Preto is morphologically classified as *S. invicta*.

Capítulo 1. Introdução

As formigas (família Formicidae) constituem uma linhagem ecologicamente diversa, cuja sistemática possui dificuldades principalmente em definição de espécies (Ross & Trager, 1990). Um grupo problemático para a sistemática é o complexo de espécies *Solenopsis saevissima* (Myrmicinae), conhecidas em inglês por *fire ants* e em português por formigas lava-pés (Trager, 1991). Este complexo consiste de espécies de porte relativamente grande, com operárias polimórficas e uma ampla distribuição geográfica na América do Sul. Uma espécie pertencente a este complexo foi introduzida acidentalmente na região de Alabama, em 1918, espalhando-se amplamente pelo sul e sudeste dos Estados Unidos (Ross & Trager, 1990, Wojcik, 1983, Porter & Savignano, 1990, Porter et al., 1997).

A sistemática do grupo tem uma longa história de confusões sobre o número de espécies válidas (Buren, 1972), até que Trager (1991) fez uma extensa revisão do grupo baseada em operárias maiores, aqui definidas como $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{4}$ da distribuição do diâmetro da cabeça da maioria das colônias estudadas. O estudo aponta a ocorrência, para América do Norte, de 4 espécies nativas (*Solenopsis aurea* Wheeler, *S. amblychila* Wheeler, *S. geminata* Fabricius e *S. xyloni* MacCook), 2 espécies introduzidas (*S. invicta* Buren e *S. richteri* Forel) e 2 formas híbridas (*S. xyloni* × *S. geminata* e *S. invicta* ×

richteri) enquanto que, para América do Sul, são indicadas 17 espécies (*S. bruesi* Creighton, *S. gayi* Spinola, *S. geminata* Fabricius, *S. weyrauchi* Trager, *S. electra* Forel, *S. interrupta* Santschi, *S. invicta*, *S. macdonaghi* Santschi, *S. megergates* Trager, *S. pusillignis* Trager, *S. pythia* Santschi, *S. quinquecuspis* Forel, *S. richteri*, *S. saevissima* F. Smith, *S. substituta* Santschi, *S. tridens* Forel, *S. virulens* F. Smith).

História natural

A colônia de *Solenopsis invicta* ocorre nos Estados Unidos, de duas formas distintas: colônias monogínicas (possuem uma única rainha) ou colônias poligínicas (colônias com várias rainhas). As populações na América do Sul são predominantemente monogínicas assim como as populações iniciais de *S. invicta* nos Estados Unidos (S. Porter, comunicação pessoal), porém no início da década de 70 colônias poligínicas de *S. invicta* foram relatadas pela primeira vez na América do Norte (Macom & Porter, 1996). Estas colônias foram descritas pela primeira vez no estado de Mississippi, e posteriormente, para diferentes locais nos Estados Unidos (Porter & Savignano, 1990), principalmente no Texas, aonde vem substituindo as colônias monogínicas (Gilbert, com. pessoal).

A colônia de *Solenopsis invicta* é iniciada por uma única rainha, porém em áreas altamente infestada dos Estados Unidos, um pequeno número de rainhas (2-5) pode se agrupar e iniciar a colônia (Lofgren et al., 1975, Trager, 1991).

Em laboratório, as rainhas de *S. invicta* colocam de 15 a 20 ovos nos primeiros 3 dias; as larvas eclodem na forma nanítica, como ocorrem em formigas de maneira geral (Tschinkel, 1988). Essa primeira geração de operárias possui, em média, 0,5 mm de diâmetro cefálico e são responsáveis por criarem as próximas gerações, sendo substituídas por operárias com diâmetro médio de cabeça maior, com o passar das semanas (Tschinkel, 1988). O primeiro grupo de operárias que emerge dos ovos passa a cuidar da rainha, o que permite que a colônia se desenvolva (Vinson, 1997). A ausência de operárias grandes nas colônias recém estabelecidas é um caráter adaptativo importante, pois estas colônias são mais bem sucedidas quando produzem muitos indivíduos naníticos do que aquelas com alguns indivíduos grandes (Porter & Tschinkel, 1985b).

Colônias consideradas maduras (> 3 anos) podem conter entre 200.000 a 400.000 operárias e a rainha chega a colocar, em média, 800 ovos por dia (Vinson,

1997). Tschinkel (1988) demonstrou que as colônias de *Solenopsis invicta*, em condições naturais, crescem de acordo com uma curva logística atingindo um platô com uma média de 220.000 operárias entre o 4º. e o 6º. ano.

As operárias de *Solenopsis invicta* apresentam um sistema de castas polimórfico, classificada como alometria monofásica (Hölldobler & Wilson, 1990), caracterizada por uma distribuição bimodal de tamanho de operárias. A distribuição de tamanho entre as operárias de uma colônia varia muito, porém colônias poligínicas produzem operárias menores do que as monogínicas (Porter & Tschinkel, 1985b).

Estudando 34 colônias maduras (2-3 anos), Porter & Tschinkel (1985b) demonstraram que a maioria das partes do corpo das operárias aumenta de maneira proporcional (isométrica) enquanto que poucas partes crescem de maneira diferente (alométrica). O tamanho das operárias (comprimento total) da mesma colônia varia por um fator de 3 e a biomassa (úmida), por um fator de 15 (Porter & Tschinkel, 1985a). As operárias de tamanho pequeno (0.68 ± 0.02 mm) são importantes para cuidar dos ovos e larvas, mas podem também desenvolver várias outras atividades na colônia. Já as operárias maiores (2.21 ± 0.41 mm) não apresentam funções muito claras, aparentemente sendo mais importantes na construção dos ninhos, na defesa de território e no forrageamento por alimento. Além disso, operárias maiores possuem menor capacidade de cuidar da prole por serem menos atentas e por serem menos eficientes para realizar tarefas de limpeza (Porter & Tschinkel 1985b).

As formigas lava-pés são consideradas onívoras e oportunistas, alimentando-se primariamente de insetos, aranhas, minhocas e outros pequenos invertebrados vivos ou mortos (Lofgren et al., 1975). As operárias maiores passam pouco tempo forrageando, porém emergem rapidamente quando os ninhos são perturbados. Operárias menores forrageiam utilizando-se de túneis subterrâneos ou pela superfície (Lofgren et al., 1975, Trager, 1991, Vinson, 1997), e podem enterrar itens alimentares grandes demais para serem transportados rapidamente ao ninho.

Comunicação química

Estudos sobre comunicação em formigas demonstraram que os modos de comunicação são muito diversos, mas podem ser agrupados em *comunicação mecânica* (incluindo “batidinhas” (“tappings”), estridulações, “estocadas” (“stroking”), “pegadas” (“graspings”), empurrões (“nudgings”), antenações e provação (“tasting”)) e

comunicação química, que provoca várias respostas, desde o simples reconhecimento entre os indivíduos até o recrutamento e o alarme (Hölldobler & Wilson, 1990). As formigas, de um modo geral, possuem uma grande quantidade de glândulas exócrinas, variando em forma e distribuição entre os grupos, porém a maioria produzindo semioquímicos.¹

Os ferormônios podem atuar através de *efeitos liberadores* (o estímulo-resposta é mediado pelo sistema nervoso, como nos ferormônios de alarme), e através de *efeitos preparadores* (“primer pheromones”), nos quais o sistema endócrino e reprodutivo são fisiologicamente alterados, levando à alteração do comportamento (um exemplo é o ferormônio de inibição da perda das asas de rainhas virgens) (Hölldobler e Wilson, 1990).

Aparentemente, uma colônia utiliza cerca de 10 a 20 tipos de sinais, a maioria de natureza química. Isto indica que os ferormônios desempenham um papel central na organização social das formigas. Por exemplo, dentre as 13 categorias de comunicação numa colônia de formigas lava-pés (*Solenopsis invicta*), que incluem comunicação entre operárias (odores de cada casta, emissão de substâncias durante um ataque), entre operária e rainha (odor da colônia), rainha e operária (reconhecimento da rainha), entre rainhas (inibição da perda das asas), entre operárias e larvas (regurgitação), entre larvas e operárias (odor da colônia), apenas uma ou duas categorias não envolvem comunicação química (antenação casual, que resulta na intensificação do movimento em uma dada direção). (Hölldobler e Wilson, 1990).

Uma formiga operária típica contém muitas glândulas exócrinas bem desenvolvidas que variam em formato e distribuição entre os grupos de formigas. Seis glândulas exócrinas que ocorrem amplamente nas formigas e realizam diversas funções: 1) Glândula de Dufour 2) Glândula de veneno 3) Glândula pigidial 4) Glândula do esterno 5) Glândula mandibular 6) Glândula metapleurar.

A *glândula de Dufour* é uma glândula pequena que se abre na base do ferrão perto da saída da glândula de veneno. Em Myrmicinae produz apenas hidrocarbonetos

¹ Semioquímicos: qualquer substância usada em comunicação, tanto entre espécies ou entre membros da mesma espécie (ex: feromônio, alomônio e cariomônio). Podem ser classificados como olfatório ou oral, de acordo com o local de recepção (Hölldobler & Wilson, 1990). Dicke e Sabelis (1992) propuseram o termo *infoquímico* para designar substâncias deste último tipo, isto é, que transportam informação durante a interação entre dois indivíduos, provocando no receptor uma resposta comportamental ou fisiológica. Infoquímicos podem mediar interações entre indivíduos da mesma espécie (*ferormônios*) ou de espécies diferentes (*aleloquímicos*).

alifáticos, variando muito entre as espécies, incluindo componentes como metilundecano, tridecano, hexadecano, hexadeceno e uma variedade de farnesenos.

Glândulas de veneno são glândulas filamentosas que convergem para uma única glândula, que está ligada a um reservatório de paredes finas (saco de veneno). As Formicinae apresentam o aparato mais evoluído. A função primária desta glândula é a produção de ácido fórmico (em Formicinae) e de veneno usado para predação nas demais formigas. Os compostos produzidos são proteináceos em todos os himenópteros aculeados, e em formigas são também neurotóxicos, histolíticos ou ambos, debilitando pequenos invertebrados e causando dor ao homem. A sensação de queimadura causada pela picada de formigas lava-pés (*Solenopsis invicta*) é causada pela piperidina, que pertence a uma classe não usual de alcalóides, cujo componente principal é a 2,6-dialquil-piperidina. Em algumas espécies de Myrmicinae e Formicinae, alguns componentes da glândula de veneno servem como substâncias de alarme e recrutamento. Em *Monomorium* e *Solenopsis*, estas substâncias são efetivas para repelir formigas inimigas e outros artrópodes.

A *glândula pigidial* é um agrupamento de células abaixo do sexto tergito abdominal, com dutos que se abrem entre o sexto e sétimo tergitos (este último também chamado de *pigídio*). *Aphenogaster* (= *Novomessor*) *albisetosus* e *A. (N.) cockerelly* liberam substâncias que funcionam como alarme de pânico, o qual serve para organizar a evacuação rápida na presença de um inimigo. Em *Pheidole embolopyx* as operárias maiores liberam ferormônios de alarme produzidos na glândula pigidial.

Uma gama variada de *glândulas esternais* com diferentes origens evolutivas, foram descobertas em formigas:

a) A *glândula de Pavan*, uma glândula bem desenvolvida localizada abaixo do sétimo esternito, é a fonte do ferormônio de trilha em Aneuretinae e Dolichoderinae. Esta glândula consiste de um saco medioventral entre o sexto e o sétimo esternitos abdominais, que serve como reservatório.

b) Várias espécies de Myrmicinae possuem agrupamentos de células pareadas abaixo do sétimo esternito, tendo anatomia bem diferente da glândula de Pavan, sugerindo que não são homólogas com esta. Nada se sabe a respeito de sua função, mas acredita-se que em *Myrmica* sp., a secreção do sétimo esternito abdominal serve como ferormônio de trilha auxiliar.

c) Uma grande variedade de glândulas do esterno são encontradas em *Ponerinae*. Em *Paltothyreus tarsatus*, estas produzem um ferormônio de recrutamento e de orientação em trilha.

d) As glândulas do esterno encontradas em algumas espécies de Formicinae são únicas. Em *Oecophylla* sp. (Formicinae) esta glândula ocorre abaixo do sétimo esternito e consiste de células isoladas que formam canais curtos que desembocam em receptáculos cuticulares do lado externo do esternito. A sua função principal deve ser secretar substâncias para a lubrificação do sétimo segmento abdominal, o qual sofre rotação quando a formiga eleva o abdomen para secretar veneno através do acidoporo.

e) A “glândula cloacal” de várias espécies de *Camponotus* (Formicinae) consiste de agrupamentos de células glandulares localizadas na base do sétimo esternito abdominal. Cada agrupamento é associado com um duto maior formado pela invaginação do canal cloacal. Os canais das células glandulares de cada agrupamento se abrem em feixes densos dentro destes dois dutos maiores. Experimentos sugerem que secreções das glândulas cloacais servem como ferormônios de recrutamento.

Glândulas mandibulares são pares de sacos de paredes finas, preenchidos com uma mistura de álcoois, aldeídos e cetonas. Cada estrutura consiste de uma massa glandular achatada, na superfície do reservatório. Os dutos de saída são sempre conectados à região mediana da mandíbula e abrem-se perto do limite anterior da cavidade pré-oral. Estas glândulas são pequenas em *Ponerinae* e maiores em Formicinae. No caso de *Camponotus saundersi* e seu grupo, as glândulas mandibulares estendem-se posteriormente até o final do abdômen. Estas glândulas são as mais bem estudadas, porque, quando as mandíbulas são separadas da cabeça, as glândulas geralmente podem ser extraídas facilmente. As secreções são diversas: em *Ponerinae*, encontramos sulfetos orgânicos, cetonas, pirazinas e éster salicilato; em Myrmicinae, cetonas etílicas e carbinóis; em Formicinae, terpenóides. As secreções aparentemente funcionam não exclusivamente na defesa e em comunicação de alarme. Na maioria das espécies, as duas funções são combinadas, mas sua importância relativa varia de espécie para espécie.

Glândulas metapleurais (também chamadas de glândulas metaesternais ou metatorácicas) são estruturas complexas localizadas nos cantos posterolaterais do mesossoma. Cada estrutura consiste de um agrupamento de células glandulares em que cada célula se comunica através de um ducto num saco coletor. Este saco coletor é ligado diretamente a um reservatório que é apenas uma cavidade esclerotizada. Há

controvérsia sobre a função das substâncias produzidas por estas glândulas. Em *Atta sexdens* as glândulas metapleurais produzem ácido fenilacético, um potente antibiótico, e cada formiga carrega 1,4 mg num dado momento (Hölldobler & Wilson, 1990).

Wilson (1959, 1962 a,b,c), estudando *Solenopsis invicta*, elaborou o primeiro método de bioensaio para testar o comportamento de formação de trilhas. Estes trabalhos tornaram-se clássicos, e serviram de base para muitos trabalhos sobre ferormônios demonstrando que, o número de operárias ao redor de alimentos tende a se estabilizar em função da área coberta pelo alimento (Wilson, 1962a, c). Demonstrou também que várias categorias de comportamento social de operárias de lava-pés são mediados por substâncias químicas. Estas incluem recrutamento em forrageamento de massa, recrutamento em mudança de colônia de lugar, comportamento de alarme, e comportamentos elementares de aglomeração.

No trabalho de 1959, Wilson pincelou trilhas artificiais que se afastavam da entrada do ninho com secreções das diferentes glândulas abdominais, identificando as secreções da glândula de Dufour como sendo a responsável pelo recrutamento em trilhas em *S. invicta*.

Os resultados obtidos por Wilson (1962 a) revelaram pela primeira vez a existência de comunicação química em massa em formigas, uma forma complexa de comportamento social. A trilha de odor de *Solenopsis invicta* é secretada pela glândula de Dufour, e liberado pelo ferrão em intervalos constantes. Wilson (1962a) demonstrou em laboratório que esta secreção funciona tanto como substância de atração, induzindo as operárias a saírem do ninho e iniciarem o comportamento de caça, como também funciona como uma substância de orientação, guiando as operárias em direção à fonte de alimento. A concentração inicial de operárias em porções de alimentos encontrados, cresce exponencialmente e vai diminuindo em direção a um limite de acordo com a aglomeração de operárias ao redor do alimento. Este comportamento é devido às operárias que não conseguiram chegar ao alimento, retornarem sem deixar trilha, e a deposição do odor evapora em poucos minutos. Assim, Wilson (1962a) demonstrou que, o número de operárias ao redor de alimentos encontrados tende a se estabilizar em função da área do alimento encontrado.

O ferormônio chave para o recrutamento em *S. invicta* é um alfa-farneseno, com efeito sinérgico adicionado por dois homofarnesenos (n-heptadecano e um componente ainda não identificado da glândula de Dufour). Cada operária possui menos de 1 nanograma em um dado momento). Testes artificiais utilizando a secreção de uma

única glândula de Dufour induzem o recrutamento de dezenas de indivíduos ao longo de uma distância de pelo menos 1 m (Hölldobler & Wilson, 1990).

Wilson (1962b) demonstrou que as trilhas individuais possuem informações sobre a localização do alimento, mas não sobre a qualidade do mesmo e que a trilha não contém informação direcional, devendo também haver orientação visual.

O ponto mais importante dos experimentos de Wilson com *Solenopsis invicta* envolve o modo pelo qual a comunicação em massa é conseguida. Wilson (1962c) definiu comunicação em massa como sendo uma informação que pode ser transmitida de um grupo de indivíduos para outro, ou seja, informações do grupo de indivíduos fora do ninho para o grupo dentro do ninho. No caso de *Solenopsis*, o número de operárias que deixam o ninho é controlado pela quantidade de ferormônio de trilha emitido pelas operárias forrageando fora do ninho, isto é, a intensidade da resposta da formiga é proporcional à quantidade de ferormônio emitido.

A evacuação do ninho também ocorre por meio de comunicação em massa (Wilson, 1962c). O novo local do ninho é escolhido por algumas operárias, que retornam ao local do ninho antigo, deixando uma trilha de ferormônio. Novas operárias seguem a trilha até o novo local, investigam, e, se satisfeitas, reforçam a trilha. Assim, o maior número de operárias percorrendo a trilha aumenta a concentração de ferormônios exponencialmente, até que as larvas sejam retiradas e a rainha mude-se para o novo ninho.

Aspectos Populacionais

Desde a sua introdução no sul dos Estados Unidos em 1940 (Buren, 1972), as formigas lava-pés têm sido consideradas como uma praga naquele país, criando uma gama de problemas, desde picadas doloridas em pessoas e no gado, até efeitos sobre a biodiversidade (Lofgren et al., 1975).

Um censo realizado em 700 locais ao longo de rodovias, no estado do Texas, mapeou a distribuição e a densidade de colônias poligínicas e monogínicas naquele estado (Porter et al., 1991). O estudo indicou que colônias poligínicas ocupavam 54% dos pontos amostrados, com densidade 2 vezes maior que os locais com colônias monogínicas (680 ninhos/ha e 295 ninhos/ha respectivamente). O estudo sugere que as duas formas de colônias são incompatíveis, pois as supercolônias poligínicas absorvem ou matam as rainhas de colônias monogínicas. O estudo indicou também que colônias

poligínicas produzem menor número de sexuais aladas provavelmente porque o maior número de rainhas férteis suprimem o desenvolvimento sexual de sua prole (Vargo & Fletcher, 1986).

Na Flórida a densidade de ninhos por hectare foi três vezes maior em áreas com colônias poliginicas (470 colônias por hectare) do que em áreas com colônias monogínicas (155 colônias por hectare). Na mesma área a população de operárias em colônias poligínicas é duas vezes maior (35 milhões de operárias por hectare) do que em colônias monogínicas (18 milhões de operárias por hectare) (Macom & Porter, 1996).

Estes estudos sugerem que a coexistência em alta densidade populacional em áreas com colônias poligínicas de *Solenopsis invicta* nos Estados Unidos é uma consequência do desaparecimento dos limites dos territórios entre as colônias (Hölldobler & Wilson, 1990) e da redução de competição intra-específica (Macom & Porter, 1996).

Impactos de formigas lava-pés sobre a comunidade de artrópodes

Wojcik (1993) documentou através do monitoramento de 100 estações permanentes de iscas, ao longo de 21 anos, 55 espécies de formigas, em 22 gêneros, ao longo de estradas da Flórida. As três espécies mais coletadas foram *Solenopsis invicta*, *S. geminata* e *Pheidole dentata*. Houve um aumento significativo de *S. invicta* ao longo dos anos, interpretado pelo autor como sendo devido ao processo de manutenção das rodovias, que consiste na retirada de vegetação nativa. Além disso, a ausência da utilização de pesticidas para controlar a infestação de lava-pés no estado permitiu o estudo da supressão gradual de outras espécies de formigas por *S. invicta*. A dificuldade da população de *S. invicta* em atingir um pico e estabilizar, como em outras regiões dos Estados Unidos, foi considerada pelo autor como uma consequência do fato de pesticidas não serem usados na região.

Porter *et al.* (1997) realizaram um intenso levantamento de campo com o objetivo de comparar a densidade de *S. invicta* em 12 áreas nos Estados Unidos e 13 áreas na América do Sul, ao longo de rodovias, em gramados e áreas de pastagem de gado. Os resultados indicaram que a densidade de *S. invicta* é entre 4 e 7 vezes maior nas áreas amostradas nos Estados Unidos (215 ninhos/ha) do que nas áreas na América do Sul (58 ninhos/ha). Esta alta densidade não foi explicada por condições de amostragem, variação sazonal, diferença de habitats ou frequência de poliginia, levando

a conclusão de que, além da competição com outras espécies de formigas na América do Sul, a ausência de inimigos naturais como patógenos ou parasitóides poderia explicar a alta densidade de formigas lava-pés nas áreas infectadas nos Estados Unidos.

O impacto de colônias poligínicas de *Solenopsis invicta* foi estudada na região central do Texas (Austin, TX) referente a comunidade de formigas e de outros artrópodes (Porter & Savignano, 1990). A comparação entre áreas com infestação e áreas não infestadas mostrou um efeito dramático sobre a abundância, diversidade e riqueza de espécies de formigas nativas e de outras espécies de artrópodes na presença de lava-pés. O impacto sobre a comunidade de formigas neste caso foi explicado devido a exclusão competitiva de lava pés sobre as outras espécies de formigas considerando que *S. invicta*, raramente mata ou se alimenta de outras formigas, a não ser quando ataca ninhos específicos ou as rainhas recém-acasaladas.

Um estudo realizado no mesmo local doze anos depois (Morrison, 2002) indicou que, apesar de *S. invicta* ainda ser a espécie de formiga mais abundante, a densidade desta espécie foi reduzida por uma ordem de grandeza e a diversidade total de artrópodes havia retornado a níveis semelhantes ao do período anterior a invasão.

Através da amostragem de 45 locais de habitat similar na região central da Flórida, Morrison e Porter (2003) encontraram 37 espécies de formigas pertencentes a 16 gêneros coexistindo com *S. invicta*. Encontraram também uma correlação positiva moderada entre a densidade de *S. invicta* e riqueza de espécies tanto de formigas ($r = 0.345$, $p < 0.05$) quanto de outros artrópodes ($r = 0.406$, $p < 0.01$). Essa associação positiva sugere que qualquer que seja o fator que regule a diversidade total de espécies de artrópodes afeta a densidade de *S. invicta*, pelo menos nestes locais onde ocorrem colônias monogínicas.

Interação forídeos × formigas lava-pés

Solenopsis invicta possui uma gama de inimigos naturais na América do Sul: 18 espécies de moscas parasitóides (Disney, 1994), 10 ou mais microorganismos, 3 espécies de nematóides, uma vespa parasitóide, uma formiga parasítica (Porter et al. 1997). Uma vasta literatura considera que a ausência de inimigos naturais pode ser a explicação para que a introdução de uma espécie exótica possa atingir densidades muito maiores do que em áreas de habitats nativos (Porter et al., 1997).

A família de moscas Phoridae é uma das mais diversas, e o hábito parasitóide de formigas é o mais comum (Disney, 1994). O gênero *Pseudacteon* tem sido bastante estudado desde 1992 por ser parasitóide de formigas lava-pés, podendo ser um candidato ao controle biológico destas formigas (Orr et al., 1995, Porter et al. 1995 a, b, c, Morrison et al., 1997). Estas espécies de forídeos são relativamente pequenas (0,9-1,5 mm de diâmetro de tórax) e são notadas apenas quando ninhos de formigas são perturbados (Williams, 1980).

As fêmeas de várias espécies de *Pseudacteon* podem ser identificadas pela anatomia do seu ovipositor externo (Porter & Pesquero, 2001). Os ovipositores das quatro espécies de *Pseudacteon* observadas durante o presente estudo (*P. tricuspis*, *P. curvatus*, *P. obtusus* e *P. litoralis*) são descritos na Tabela 1.1. Os machos das diferentes espécies de *Pseudacteon* são bastante similares entre si, e os machos da maioria das espécies não foram descritos ou são desconhecidos. Isto se deve em grande parte ao fato de que os machos de várias espécies de *Pseudacteon* não são atraídos por ninhos de formigas lava-pés, onde as fêmeas são encontradas. Uma exceção é *P. tricuspis*, que é freqüentemente encontrado em ninhos de *Solenopsis* na América do Sul. Além disso, os hábitos dos machos de várias espécies de *Pseudacteon* são desconhecidos. Apesar destas dificuldades, a ausência do ovipositor pode ser usada para determinar se um dado indivíduo de *Pseudacteon* é um macho ou não (a espécie não é determinada).

Tabela 1.1. Ovipositores das quatro espécies de *Pseudacteon* observadas durante o presente estudo (Porter & Pesquero, 2001).

Espécie	Descrição do ovipositor
<i>P. tricuspis</i>	Lobos laterais e lobo central pontiagudos, em forma de tridente; filamento membranoso perto de cada lobo lateral.
<i>P. curvatus</i>	Ovipositor longo, curvado para baixo, com um grande dente ventral perto da base; pêlos no último segmento abdominal não muito longos.
<i>P. obtusus</i>	Lobos laterais largos e arredondados, cada um com uma extensão membranosa saindo de sua borda interna, na direção medial; esta extensão membranosa tem a forma de uma meia.
<i>P. litoralis</i>	Lobos laterais arredondados e dirigidos diagonalmente; extensão central cilíndrica.

a) Especificidade de hospedeiros

Todas as espécies do gênero *Pseudacteon* são parasitóides de formigas (Disney, 1994). São considerados parasitóides altamente especializados por possuírem

ovipositor elaborado e, pelo menos, 11 espécies empupam na cápsula cefálica de operárias de formigas (Porter, 1998).

Testes no campo nas proximidades de Rio Claro (SP) e Viçosa (MG), compararam a especificidade de ataques a operárias de 13 espécies de formigas (*Atta sexdens*, *Monomorium pharaonis*, *Camponotus rufipes*, *Paratrechina* sp., *Odontomachus minutus*, *Myrmelachista autori*, *Ectatomma quadridens*, *Pachycondyla striata*, *Pheidole* sp2., *Crematogaster* sp., *Pheidole oxyopus*, *Camponotus abdominalis*, *Camponotus blandus*) utilizando diferentes espécies de *Pseudacteon* (*P. litoralis*, *P. tricuspis*, *P. wasmanni*, *P. curvatus*, *P. pradei* e *P. borgmeieri*). Nenhuma das espécies de formigas atraiu os forídeos exceto *Solenopsis saevissima* e *S. geminata*, indicando que estas espécies de mosca não atacam formigas de outros gêneros (Porter et al., 1995b).

Testes sequenciais utilizando-se colônias de *Solenopsis invicta* e *S. geminata* e 4 espécies de *Pseudacteon* provenientes de Campinas (SP) que normalmente atacam *S. invicta* no Brasil (*P. litoralis*, *P. wasmanni*, *P. tricuspis* e *P. curvatus*) além de 2 espécies de *Pseudacteon* comuns na área de Austin (TX) que normalmente atacam *S. geminata* (*P. browni* e *P. crawfordi*) demonstraram além da preferência por *S. invicta*, que as espécies maiores de *Pseudacteon* preferiam operárias maiores. Aparentemente fêmeas de *Pseudacteon* são capazes de discriminar tamanho de hospedeiro mais adequado para o desenvolvimento larval (Morrison et al., 1997, Gilbert & Morrison, 1997).

Testes comparando as preferências de oviposição entre espécies de *Pseudacteon* nos dois tipos de colônia de *Solenopsis invicta* indicaram que o tamanho médio de operárias atacadas por *P. tricuspis* (largura de mesonoto 0.50 ± 0.04 mm) foi essencialmente o mesmo para colônias monogínicas (largura média de cabeça de operárias 0.93 mm) e poligínicas (largura média de cabeça de operárias 0.92 mm). *Pseudacteon curvatus* (largura de mesonoto 0.33 ± 0.04 mm) atacou preferencialmente operárias menores tanto em colônias monogínicas (largura média de cabeça de operárias 0.71 mm) quanto poligínicas (0.66 mm) (Morrison & Gilbert, 1998). Este estudo sugere que diferentes espécies de *Pseudacteon* que parasitam a mesma espécie de formiga podem coexistir por preferirem operárias de diferentes tamanhos, sendo que forídeos maiores tendem a preferir operárias maiores.

Outros estudos em laboratório indicaram um padrão de variação de razão sexual como função do tamanho do hospedeiro, sendo que um maior número de fêmeas tanto

de *P. litoralis* quanto *P. tricuspis* emergiram de operárias maiores (Morrison et al., 1999a).

b) Comportamento de oviposição

As fêmeas e machos de *Pseudacteon* são atraídos para os ninhos poucos minutos após serem perturbados. Também são atraídos para trilhas de forrageamento (Orr et al., 1995, 1997) ou qualquer outra aglomeração de formigas lava-pés (Morrison et al., 1997). Eles voam não mais do que a 0,5 cm acima dos hospedeiros (observação pessoal) enquanto que as formigas tentam escapar do ataque através de elevação do abdômen.

Cada espécie de *Pseudacteon* possui um ovipositor distinto (Porter, 1998). O ovo é injetado na membrana intersegmental da primeira ou segunda perna da operária escolhida, a qual fica paralisada enquanto outras operárias, após a mosca se afastar, se agrupam em torno da operária atacada (Wuellner et al., 2002).

A operária parasitada apresenta comportamento aparentemente normal até o momento em que o terceiro instar da larva do parasitóide começa a secretar uma enzima ou hormônio que causa a degeneração da membrana intercircular, levando a queda da cabeça da formiga (Porter et al., 1995c, Porter, 1998). A larva passa a se alimentar de todo o tecido restante da cabeça da formiga, quando então as mandíbulas da formiga caem, sinalizando o início do período de pupa, e o adulto emerge através da abertura da boca (Porter et al., 1995c, Porter, 1998).

Estudos em laboratório indicam que o desenvolvimento larval varia com a temperatura, sendo que temperaturas mais altas resultam em desenvolvimento mais rápido. Além disso, o tempo de desenvolvimento de larva e de pupa variam de acordo com a espécie. Um estudo comparando 6 espécies de *Pseudacteon* (*P. litoralis*, *P. tricuspis*, *P. wasmanni*, *P. curvatus*, *P. browni* e *P. crawfordi*) indicou que o tempo de desenvolvimento aumenta com o tamanho do forídeo (Morrison et al., 1997). A duração da fase de larva (definida como o período entre a oviposição e a decaptação da cabeça da operária parasitada) variou de 13 a 18 dias enquanto que a duração da fase de pupa (definida como o período entre a decaptação da cabeça da operária até a emergência do adulto) variou entre 15 e 19 dias (Morrison et al., 1997). Não se conhece o tempo de duração da fase de adulto na natureza, porém, em laboratório, os adultos vivem até 7 dias (Porter, 1998, Morrison, 2000).

c) Efeitos sobre as operárias

Ataques de *Pseudacteon* sp. não causam altos níveis de mortalidade na colônia parasitada. O único estudo quantitativo realizado indica que menos de 3% das operárias de *S. geminata* no Texas foram parasitadas (Morrison et al., 1997).

A primeira evidência de que *Pseudacteon* teria um efeito indireto sobre as operárias de *Solenopsis* foi descrito por Feener & Brown (1992) demonstrando que lava-pés (*S. geminata*) da Costa Rica removiam menos alimento (iscas) e forrageavam menos quando as moscas *Pseudacteon* spp. estavam presentes. Outros estudos documentaram que a presença de forídeos pode reduzir a taxa de utilização de recursos pelas formigas, tanto pela contagem de partículas retiradas (Feener & Brown, 1992) quanto número de operárias nas iscas (Orr et al., 1995, 1997, Porter et al., 1995a).

Morrison (1999) comparou a eficiência de *S. geminata* na competição por alimento com outras espécies de formigas, na presença e ausência de forídeos. O estudo indicou uma redução de 50% na taxa de aquisição de alimento na presença de forídeos. O estudo demonstra, de forma quantitativa, os efeitos indiretos de moscas parasitóides no mecanismo de competição interespecífica de formigas. Assim, a pressão de parasitismo do forídeo sobre a espécie de formiga hospedeira modifica a competição entre as formigas, favorecendo indiretamente a espécie de formiga não hospedeira.

Aspectos tratados no presente trabalho

No capítulo 2 é apresentado um estudo das relações alométricas entre biomassa, volume e população de colônias de *Solenopsis invicta* em área rural no Distrito de Barão Geraldo, Campinas. O capítulo 3 trata do monitoramento ao longo de três anos da abundância de forídeos e de colônias de *Solenopsis invicta* em 11 estações de coleta, na região de Campinas. O capítulo 4 consiste na utilização de técnica de cromatografia gasosa para distinguir entre *Solenopsis invicta* e *S. saevissima*, espécies crípticas, cuja identificação com base em caracteres morfológicos é sutil. Para o mesmo trabalho, foi utilizado um caráter morfológico de grande utilidade na distinção entre as espécies.

Como a maioria dos resultados está em vias de publicação, cada capítulo possui uma seção introdutória seguida do artigo submetido à publicação. Na introdução de cada capítulo é feita uma revisão da literatura relevante, descrição geral dos objetivos da

pesquisa e dos procedimentos utilizados, assim como discussão dos resultados obtidos, deixando detalhes para serem consultados diretamente nos artigos. Finalmente, o capítulo 5 consiste na discussão geral e perspectivas futuras.

Capítulo 2. Relações alométricas² em colônias de *Solenopsis invicta*

A organização social das colônias de formigas geralmente aumenta a eficiência e sobrevivência das mesmas. Além disso, a alocação de indivíduos entre vários tamanhos e idades determina a eficiência da divisão de tarefas, e pode ser adaptativa do ponto de vista de toda a colônia (Holldobler & Wilson, 1990)

Uma colônia de *Solenopsis invicta* é formada por milhares de operárias estéreis. A colônia vive em um ninho parcialmente acima do solo com altura variável, construído com o solo proveniente da escavação de túneis e galerias. O ninho não possui aberturas na superfície e as operárias entram e saem através de aberturas ao longo dos túneis um pouco abaixo da superfície do solo (Wojcik, 1986, Vinson, 1997).

Tschinkel (1988) estudou o crescimento de colônias com diferentes idades (as colônias de 1 semana e de 6 meses foram criadas em laboratório provenientes de rainhas recém-fecundadas; colônias de 3 a 6 meses foram mantidas no campo e coletadas como uma checagem das colônias de laboratório; colônias 20 meses, 43 meses, 55 meses, além de colônias de 12 a 14 anos foram todas mantidas no campo). O estudo indicou que as colônias crescem logisticamente, tendo o máximo de tamanho populacional entre 4 e 6 anos, e que o tamanho das colônias variou sazonalmente, provavelmente devido à

variação na disponibilidade de alimento. O estudo também demonstrou que o crescimento da população de operárias grandes (“majors”) é logístico, porém mais rápido do que da colônia como um todo, causando o aumento na proporção destas operárias à medida que a colônia cresce. Quando o tamanho da colônia se estabiliza, a proporção de operárias grandes também se mantém estável, indicando que as operárias maiores têm um papel importante para o sucesso da colônia.

Estudando colônias de *Solenopsis invicta* ao longo de um ano, Tschinkel (1993) demonstrou que colônias grandes possuem um custo de manutenção proporcionalmente menor do que colônias pequenas. Isso permite que colônias grandes suportem maior biomassa por unidade de área quando comparada com colônias pequenas. Neste estudo foram identificados também vários atributos que aumentam de maneira não linear com o crescimento da colônia, sugerindo que colônias grandes devem diferir das colônias menores quanto à exploração de recursos.

Porter & Tschinkel (1985b) estudaram o polimorfismo das operárias em relação a produção de larvas e ovos em 34 colônias adultas (2 a 3 anos), mantidas em laboratório. Os resultados indicam que as operárias grandes (“majors”) contribuem significativamente para a biomassa da colônia. Operárias das duas classes maiores (1,19 e 1,35 mm de diâmetro médio de cabeça) representam 19 % (desvio padrão = 5%) da biomassa das operárias, porém apenas 6% (desvio padrão = 2%) do número de operárias. Já as operárias das duas classes menores (0,63 e 0,73 mm de diâmetro médio de cabeça) representam 53% (desvio padrão = 7%) da biomassa da colônia e 76% (desvio padrão = 5) do número de operárias.

Em estudos da ecologia de colônias de formigas, é essencial dispor de métodos que permitam avaliar quantitativamente variações em propriedades da colônia tais como a biomassa, o número de operárias, e o volume do ninho. Métodos não-destrutivos para estimar estas quantidades são evidentemente preferíveis, e assumem a forma de relações matemáticas (frequentemente de forma alométrica) entre os parâmetros mencionados e quantidades que podem ser medidas sem perturbar as colônias. Uma escolha natural para estas quantidades seriam as dimensões do ninho acima do solo. Empregando esta escolha de variáveis independentes, algumas relações alométricas para ninhos de formigas lava-pés na Flórida foram determinadas por Tschinkel (1993) e Macom e Porter (1996).

² Uma relação alométrica entre duas variáveis x e y tem a forma $y=kx^a$, onde k e a são constantes. Se $a=1$ a relação é dita isométrica (Hölldobler & Wilson, 1990)

Realizamos um estudo das relações entre biomassa, volume (total e acima do solo) e número de operárias em 28 colônias de *Solenopsis invicta*, provenientes de uma área rural de Barão Geraldo, Campinas. As amostras foram obtidas durante duas estações chuvosas sucessivas, incluindo colônias com tamanhos bastante diferentes. Também foram investigadas as relações entre tamanho do ninho (medido pelo volume acima do nível do solo) e (a) biomassa por unidade de volume, (b) peso médio das operárias, e (c) tamanho da operária (medido pelo diâmetro da cabeça). As relações obtidas foram comparadas com relações análogas obtidas em outros estudos utilizando populações de *S. invicta* na Flórida.

No estudo aqui apresentado, a estimativa do volume do ninho de *S. invicta* (V) levou em consideração as dimensões do ninho acima e abaixo do solo, ou seja, foi necessária a escavação de cada ninho. Para cada ninho, foram medidos o comprimento (maior dimensão horizontal do ninho), a largura (dimensão medida ao longo de uma reta que bissecciona o comprimento, sendo perpendicular a este), a altura (elevação máxima do ninho acima do nível do solo) e a profundidade (Fig. 2.1). O volume do ninho acima do solo (v) foi aproximado pelo volume de um semi-elipsóide com semi-eixos principais iguais à metade do comprimento, à metade da largura, e à altura do ninho. O volume do ninho abaixo do solo foi aproximado pelo volume de um semi-elipsóide com semi-eixos principais iguais à metade do comprimento, à metade da largura, e à profundidade do ninho. O volume do ninho (V) foi aproximado pela soma dos volumes acima e abaixo do solo.

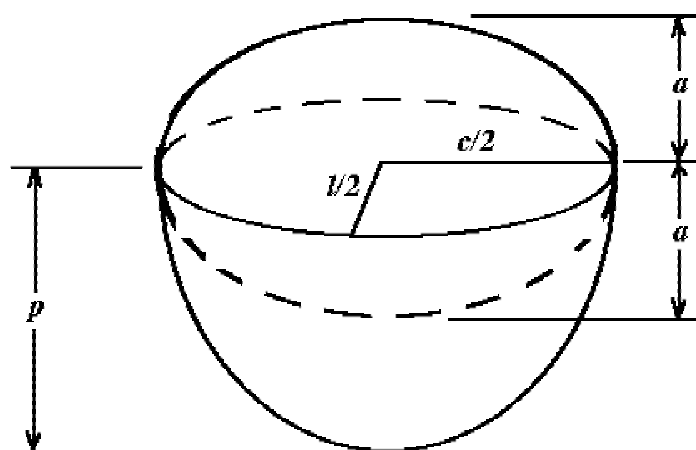


Fig. 2.1. Diagrama do modelo geométrico usado no cálculo aproximado do volume dos ninhos de *Solenopsis invicta*: c = comprimento, l = largura, a = altura, p = profundidade.

Encontramos uma relação não-linear entre o volume acima do solo (v) e o volume total do ninho (V),

$$V = 3.87 v^{0.86} (R^2 = 0.93),$$

que permite o cálculo de V (volume total) a partir do valor de v (volume acima do solo), que pode ser determinado sem perturbar o ninho. Neste estudo, a relação não linear (com expoente menor do que 1) indica que colônias grandes são proporcionalmente mais rasas, possivelmente por não precisarem cavar além de uma certa profundidade para obter uma termorregulação adequada (S.D. Porter, comunicação pessoal). Por outro lado, deveria haver um limite mínimo para a profundidade dos ninhos de formigas lavapés que asseguraria uma proteção mínima contra danos físicos.

Neste estudo, tanto a biomassa de formigas por unidade de volume do ninho (M/V) e o número de operárias por unidade de volume do ninho (N/V) não têm correlação com o volume do ninho, e variam de colônia para colônia. Em outras palavras, a eficiência do uso do espaço é independente do tamanho físico do ninho e da quantidade de formigas presentes. Esta ausência de relação entre biomassa de formigas e volume do ninho encontrada em nosso estudo foi similar à encontrada por Tschinkel (1998).

A biomassa média por operária ($m = M/N$) não é correlacionada com o tamanho da colônia ($m = 0.84-7.40 \times 10^{-7} M$; $R^2 = 0.008$), e varia de colônia para colônia. De maneira similar, o diâmetro médio da cabeça (H) parece ser independente do tamanho da colônia ($H = 0.678v^{0.05}$; $R^2 = 0.20$). Os resultados sugerem que, na população estudada, o tamanho das formigas não aumenta com o tamanho do ninho, pelo menos na faixa de tamanhos de colônias que foram amostradas. Isto contrasta com resultados análogos encontrados por Tschinkel (1998) para colônias de *S. invicta* na Flórida, onde a biomassa por operária aumenta com o tamanho da colônia.

ANEXO

Allometric relationships between biomass, volume, and population size in colonies of *Solenopsis invicta* in southeast Brazil

CHRISTIANE G. DALL'AGLIO-HOLVORCEM and WOODRUFF W. BENSON
Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Correspondence: Christiane G. Dall'Aglío-Holvorcem, Graduate Program in Ecology, Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil. E-mail: chrisholvorcem@mpc.com.br

Running head: Allometry of *Solenopsis invicta* colonies

Abstract

1. In population studies of the fire ant *Solenopsis invicta* it is important to be able to estimate ant biomass, nest volumes, and population sizes of given ant colonies from nest dimensions (height above ground level, h , length, l , and width, w), that can be easily measured without disturbing the ants.
2. We measured the above ground mound dimensions of 28 undisturbed *S. invicta* colonies from Campinas, Brazil (22°47' S, 47°05' W) and, after excavation, determined their volumes (V , in liters), ant biomass (M , in grams) and worker numbers (N).
3. The quantities h , l , and w were used to compute the mound (above ground) volume $v = \frac{2}{3}\pi h(\frac{1}{2}l)(\frac{1}{2}w)$ (expressed in liters), and relationships between v , V , M , N sought in pair-wise regressions.
4. The main quantitative results are $V = 3.87 v^{0.86}$ ($R^2 = 0.93$), $M = 9.73 v^{0.82}$ ($R^2 = 0.59$), $N = 1.33 \times 10^4 v^{0.79}$ ($R^2 = 0.47$), $N = 1.11 \times 10^3 M^{1.05}$ ($R^2 = 0.95$), suggesting that good to excellent estimates of *S. invicta* colony parameters can be obtained from simple non-destructive nest measurements.
5. Ant biomass per unit nest volume (M/V) and the number of workers per unit nest volume (N/V) are essentially independent of the size of the colony. Mean worker weight was also independent of colony size; in contrast, a previous study showed that in North America mean *S. invicta* worker weight increases with colony size.

Key Words: *Solenopsis invicta*, fire ant, colony size, population size.

Introduction

The fire ant *Solenopsis invicta* Buren is a very aggressive species which is common in disturbed habitats that are associated to human activity, including highways, urban and cultivated areas (Tschinkel, 1988; Wojcik, 1983, 1986). The distribution of this species in South America ranges from northern Argentina and Paraguay to southeast and central Brazil. *Solenopsis invicta* was accidentally introduced into the United States sometime before 1940 and now occupies most of the southeastern region (Buren et al., 1974).

Fire ants build large nests with many galleries, forage by underground tunnels and strongly defend their territory (Tschinkel, 1988) both in South America and in the United States. Fire ant mounds are conspicuous and easily found during the rainy season, although they may be absent in certain types of soil (Wojcik, 1983, 1986).

Porter et al. (1997) compared fire ant densities along roadsides in different areas throughout the fire ant distribution range, and found that North America has 4 to 7 times higher population density and 4 times higher mound density when compared to South America. Mound sizes were also larger in North America.

Allometric relationships (power-law relationships between morphometric variables) have important consequences for the understanding of ant colonies. Once such relationships are established, non-destructive measurements of mound dimensions may be used to estimate nest volume, biomass, and population size. In North America, the relationship between the size of a fire ant mound and the population of the colony has been studied in some detail (Tschinkel 1993, Macom and Porter 1996), and it has been found that quantities such as worker number, worker biomass and colony biomass explain most of the variation in territory area (Tschinkel et al., 1995). In this paper we present results on the relationships between mound (above ground) volume, nest volume, worker biomass, and worker number for colonies of *Solenopsis invicta* from

South America, which to our knowledge have not been previously determined (Porter et al., 1997). In this study we also introduce a method to estimate fire ant nest volumes, taking the nest's depth into account. Previous studies adopted mound volume as a measure, so that nest depth was ignored. We show that the use of the nest and mound volume estimates may lead to significantly different allometric relationships between volume and other quantities such as biomass and worker number.

Methods

We analyzed 28 fire ant colonies of various sizes, collected in the district of Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil (22°47' S, 47°05' W, altitude 580 m) during the 1996-1997 and 1997-1998 rainy seasons. The colonies collected in 1996-1997 season came from a pasture area (Sítio Bela Vista); collection dates were Dec. 12, 1996 (5 colonies), Jan. 2, 1997 (1 colony), Jan. 16, 1997 (5 colonies) and Jan. 23, 1997 (3 colonies). The colonies collected in 1997-1998 season came from a suburban pasture area; collection dates were Jan. 10, 1998 (3 colonies), March 4, 1998 (8 colonies) and March 24, 1998 (3 colonies). Each collection date was chosen as the day following a heavy rain, and colonies were excavated around local noon.

We tried to obtain a sample which is representative of the wide range of naturally occurring colony sizes. Each colony was excavated as quickly as possible (excavation usually took between 1 and 3 min) and placed in 20-liter plastic buckets, whose interior surfaces were covered with talc to prevent the ants from escaping. Before the excavation, we performed non-destructive measurements of each mound's length (l , the mound's longest horizontal dimension), width (w , horizontal dimension measured along a straight line which bisects the length, oriented at right angles to it), and height above ground (h). These measurements were combined into an estimate of the mound volume,

$$v = \frac{2}{3} \pi h (\frac{1}{2} l) (\frac{1}{2} w) \quad (1)$$

(expressed in liters), which assumes that the mound has the shape of half of a triaxial ellipsoid with semi-axes h , $\frac{1}{2} l$, and $\frac{1}{2} w$. After the excavation, we measured the colony depth, d , which allowed us to compute an estimate of the nest volume,

$$V = \frac{4}{3} \pi [\frac{1}{2} (h + d)] (\frac{1}{2} l) (\frac{1}{2} w) \quad (2)$$

(also expressed in liters). This expression assumes that the nest's shape above and below the ground may be modeled by two ellipsoids with semi-axes $(h, \frac{1}{2} l, \frac{1}{2} w)$ and $(d, \frac{1}{2} l, \frac{1}{2} w)$, respectively. The upper half of the first ellipsoid represents the nest volume above the ground (that is, the mound volume), and the lower half of the second ellipsoid represents the nest volume below the ground.

In the laboratory, the ants from each colony were separated from the soil using a flotation technique, in which the buckets are slowly filled with water along a period of about 10 hours. At the end of this process, the floating ants were transferred to $60 \times 40 \times 10$ -cm plastic trays whose internal walls were covered with fluon. In each tray, we placed two Petri dishes covered with odontologic plaster (Durone), a test tube containing water and another test tube containing a 1 M sucrose solution. The ants were fed every day with living earthworms.

Five days after being collected, all ants of each colony were collectively weighted, so as to determine the living biomass (M , in grams). Next, 5 samples of workers were randomly drawn from each colony and weighed with an analytical balance. After weighing, the ants in each sample were killed in alcohol and counted. The average number of workers per gram thus determined was multiplied by the total biomass, yielding an estimate of the population (N) of each colony. A limitation of this estimation method is that it does not take into account those ants which were foraging outside the colony when the colony was excavated.

It is interesting to determine if the average biomass per worker and the average worker size vary with colony size (Tschinkel, 1993). By dividing the living biomass M of a given colony by its population N , we obtain an estimate of the average biomass per worker for that colony. In order to estimate the average worker size for each colony, we measured the head widths (H , expressed in mm) of 30 workers taken at random from

one of the above mentioned samples used to estimate biomass. We assume that all relevant worker dimensions, including body length, are proportional to H .

We used pairwise linear regressions to seek relationships of the form $y = ax^b$ between M , N , H , V , and v (as usual, in order to linearize the power-law, we took base-10 logarithms of each variable before performing the regressions). The independent variable in most regressions was the mound volume v , since it is the only variable which can be determined without disturbing the mound.

Results and Discussion

Table 1 summarizes the results of the regressions which were performed on the data obtained in the current study, and also includes some regression equations estimated by Tschinkel (1993) and by Macom and Porter (1996) for fire ant mounds in the southern United States.

The regression of nest volume V (which depends on colony depth) on mound volume v (which is independent of depth) shows that V can be accurately estimated from the value of v (Fig. 1), although the relationship is non-isometric: $V = 3.87 v^{0.86}$ ($R^2 = 0.93$). The exponent in this relationship is significantly different both from zero (t -test, $P < 0.001$) and from unity ($P < 0.01$); 99% confidence limits for the exponent are 0.73 and 0.99. Previous allometric studies of fire ant mounds (Tschinkel, 1993, Macom & Porter, 1996) presented data on mound volume (v), but not on nest volume (V). Since the relationship between these two volume parameters is non-isometric, the exponents in allometric relationships involving volume (or volumetric densities) will depend on which of the two volume measures is being used. From the definitions of V and v (equations 1 and 2), one easily deduces that

$$V/v = 1 + d/h;$$

substituting the relationship between V and v , we obtain

$$d/h = 3.87 v^{-0.14} - 1. \quad (3)$$

The above equation suggests that the depth-to-height ratio d/h decreases slowly with mound volume, or in other words that smaller colonies are proportionally deeper than larger ones. In order to confirm this trend, we regressed $d/h + 1$ on mound volume v , obtaining a relationship which is very similar to (3),

$$d/h = 3.99 v^{-0.16} - 1. \quad (4)$$

Even though the value of R^2 in this regression is quite low (0.33), the exponent (-0.16) is significantly different from zero at $P < 0.01$ (t -test), which confirms that d/h tends to decrease with v . According to this relationship, d/h would decrease from about 3.8 for $V = 1$ liter to about 1.3 for $V = 100$ liters. However, actual values of d/h vary considerably around the values given by (4).

The regression of live biomass M on mound volume v (Fig. 2) yields the relationship $M = 9.73 v^{0.82}$ ($R^2 = 0.59$), where the exponent is significantly different from zero ($P < 0.001$) but not from unity; 95% confidence limits for the exponent are 0.53 and 1.22. Macom and Porter (1996) obtained the relationship $M_d = 4.49 v^{0.82}$ ($R^2 = 0.84$; M_d is the dry biomass) for fire ant mounds in Florida. Although the last two relationships are not directly comparable, they suggest that the M - v relationships are similar in the southern United States and in southeast Brazil. A regression of live biomass per unit volume (M/V) on v yields the relationship $M/V = 2.51 v^{-0.04}$ ($R^2 = 0.004$), where the exponent (-0.04) is not significantly different from zero. In other words, there is no systematic tendency of the live biomass per unit nest volume to increase or decrease with mound volume. The average value of M/V for the mounds sampled in this study was 3.1 g/liter, with a standard deviation of 2.1 g/liter; values of M/V vary considerably from mound to mound. Tschinkel (1993) regressed v on M_d for fire ant mounds in Florida, obtaining the relationship $v \propto M_d^{1.06}$ ($R^2 = 0.85$). Analogous regressions using the data from the present work yielded the equations $v = 2.24 \times 10^{-3} M^{0.72}$ ($R^2 = 0.59$) and $V = 0.0138 M^{0.66}$ ($R^2 = 0.62$).

Colony population (N) was estimated by the relationship (Fig. 3) $N = 1.33 \times 10^4 v^{0.79}$ ($R^2 = 0.47$), where the exponent is significantly different from zero ($P < 0.001$) but not from unity; 95% confidence limits for the exponent are 0.43 and 1.14. This relationship is similar to that found by Macom and Porter (1996), $N = 1.77 \times 10^4 v^{0.75}$

($R^2 = 0.81$). The regression of the number of workers per unit nest volume (N/V) on v yields the relationship $N/V = 3430 v^{-0.07}$ ($R^2 = 0.008$), where the exponent (-0.07) is not significantly different from zero. There is no systematic tendency of the number of workers per unit nest volume to increase or decrease with mound volume. The average value of N/V for the mounds sampled in this study was 4.4×10^3 workers/liter, with a standard deviation of 3.5×10^3 workers/liter; values of N/V vary considerably from mound to mound.

A well-defined relationship was found between the colony population and the live biomass (Fig. 4), $N = 1.11 \times 10^3 M^{1.05}$ ($R^2 = 0.95$), where the exponent is significantly different from zero ($P < 0.001$) but not from unity; 95% confidence limits for the exponent are 0.94 and 1.16. Tschinkel (1993) regressed dry colony biomass, M_d on the number of workers, N , deducing that $M_d \propto N^{1.20}$ ($R^2 = 0.94$). An analogous regression using data from the present study yields the relationship $M = 2.14 N^{0.90}$ ($R^2 = 0.95$), where M is expressed in mg. This suggests that the biomass of fire ant mounds increase more slowly with the number of workers in southeast Brazil than in the southern United States.

The M_d - N relationship found by Tschinkel (1993) suggests that the dry biomass per worker, $m_d = M_d/N$, increases slowly with either colony biomass or number of workers; in other words, large colonies have more massive (and larger) workers. This is confirmed by the slopes of the linear relationships between m_d and M_d determined by Tschinkel for various portions of the seasonal cycle in the southern United States (Table 1). Although the slopes change with the seasons, they are always positive, and the average dry biomass per worker increases by a factor of up to 3 when the colony biomass varies from 0 to 200 g (which corresponds to the range of observed colony biomasses). On the other hand, the N - M relationship found in this work suggests that in

southeast Brazil the live biomass per worker, $m = M/N$, decreases very slowly with either colony biomass or number of workers. The linear regression of m on M yields the relationship $m = 0.84 - 7.40 \times 10^{-7} M$ ($R^2 = 0.008$), where the slope, although negative, is not significantly different from zero. When the live biomass varies over its observed range (0 to 100 g), the last equation predicts that the live biomass per worker decreases by only 10%, which is negligible when compared to the changes predicted (and observed) for North American mounds. Therefore, in the present study there was no trend for the live biomass per worker to increase or decrease with colony biomass; its average value was 0.81 mg/worker, with a standard deviation of 0.34 mg/worker.

The relationship between M/N and M found in this study suggests that in southeast Brazil worker size is nearly independent of colony size. In order to confirm this result, we performed a regression between the logarithms of H (average worker head diameter, in mm) and v (mound volume), which yielded the relationship (Fig. 5) $H = 0.678 v^{0.046}$ ($R^2=0.20$); the exponent in this relationship is significantly different from zero ($P < 0.05$), but the average head diameter actually changes little (from 0.7 to 0.8 mm) across the observed range of mound volumes. This is consistent with the previous result that the live biomass per worker is essentially independent of colony size.

Concluding remarks

We have introduced an estimate (V) of fire ant nest volume, defined by (2), which takes both mound height and nest depth into account. This new estimate is useful in the computation of densities such as the number of workers per unit nest volume or the biomass per unit nest volume. Although the determination of V usually involves the excavation of the fire ant mound, we found a definite non-linear relationship which allows the estimation of V from the value of v (mound volume), which may be determined without disturbing the mound. The non-linearity of this relationship is related to the fact that larger fire ant colonies in southeastern Brazil tend to be proportionally less deep than small colonies. A possible explanation for this may be that fire ants only need to dig up to a certain depth in order to thermoregulate, so large colonies don't need to dig deeper than small colonies. It would be interesting to investigate if (and how) the relationship between V and v varies across the range of *Solenopsis invicta*.

The relationships between colony biomass and mound volume in the southern United States and in southeast Brazil are quite similar. In southeast Brazil, colony biomass per unit nest volume is not correlated with mound volume, and varies considerably from colony to colony. The previous remarks also hold if “colony biomass” is replaced by “number of workers”.

In southeast Brazil, the biomass per worker ($m = M/N$) is not correlated to colony size, and varies considerably from colony to colony. Similarly, mean worker head widths were nearly independent of colony size. In the southern United States, on the other hand, the biomass per worker tends to increase with colony size by a factor of up to 3 over the observed range of colony sizes.

Acknowledgements

We are grateful to J.M. Longo, who assisted with collecting the colonies, to P.B. Candiani, who assisted with laboratory work, and to P.R. Holvorcem for his indispensable help with the analysis and critical reading of the manuscript. We also thank S.D. Porter and L.W. Morrison (USDA-Gainesville) for reading and providing useful suggestions to the manuscript. CGDH was supported by a doctoral fellowship from CAPES and WWB by CNPq.

References

- Buren, W.F., G.E. Allen, W.H. Whitcomb, F.E. Lennartz, and R.N. Williams, 1974. Zoogeography of the imported fire ants. *Journal of the New York Entomological Society*, **82**:113-24.
- Macom, T.E. & S.D. Porter, 1996. Comparison of polygyne and monogyne red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) population densities. *Annals of the Entomological Society of America*, **89**(4):535-543.
- Porter, S.D., D.F. Williams, R.S. Patterson and H.G. Fowler, 1997. Intercontinental differences in the abundance of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae): escape from natural enemies? *Environmental Entomology*, **26**(2): 373-384.
- Tschinkel, W.R. 1988. Distribution of the fire ants *Solenopsis invicta* and *S. geminata* (Hymenoptera: Formicidae) in northern Florida in relation to habitat and disturbance. *Annals of the Entomological Society of America*, **81**(1): 76-81.
- Tschinkel, W.R. 1993. Sociometry and sociogenesis of colonies of the fire ant *Solenopsis invicta* during annual cycle. *Ecological Monographs*, **63**(4): 425-457.

- Tschinkel, W.R., E.S.Adams & T. Macom, 1995. Territory area and colony size in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Journal of Animal Ecology* **64**: 473-480.
- Wojcik, D.P., 1983. Comparison of the ecology of red imported fire ants in North and South America. *The Florida Entomologist*, **66**(1) 101-111.
- Wojcik, D.P., 1986. Observations on the biology and ecology of fire ants in Brazil. pp 88-103. *In*: C.S. Lofgren and R.K. Vander Meer (eds), *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management*. Westview, Boulder, Colorado.

Table 1. Comparison of allometric relationships between volume, biomass, and population of fire ant colonies.

Dependent variable	Independent variable	Equation	R ²	Reference
Nest volume, V (liters)	Mound volume, v (liters)	$V = 3.87v^{0.86}$	0.93	This work
Depth-to-height ratio, d/h	Mound volume, v (liters)	$d/h = 3.99v^{-0.16} - 1$	0.33	This work
Live biomass, M (g)	Mound volume, v (liters)	$M = 9.73v^{0.82}$	0.59	This work
Dry biomass, M_d (g)	Mound volume, v (liters)	$M_d = 4.49v^{0.82}$	0.84	Macom & Porter 1996
Live biomass per unit nest volume, M/V (g/liter)	Mound volume, v (liters)	$M/V = 2.51v^{-0.04}$	0.004	This work
Mound volume, v (liters)	Dry colony biomass, M_d (mg)	$v \propto M_d^{1.06}$	0.85	Tschinkel 1993
Mound volume, v (liters)	Live colony biomass, M (mg)	$v = 2.24 \times 10^{-3} M^{0.72}$	0.59	This work
Nest volume, V (liters)	Live colony biomass, M (mg)	$V = 0.0138 M^{0.66}$	0.62	This work
Number of workers, N	Mound volume, v (liters)	$N = 1.33 \times 10^4 v^{0.79}$	0.47	This work
Number of workers, N	Mound volume, v (liters)	$N = 1.77 \times 10^4 v^{0.75}$	0.81	Macom & Porter 1996
Number of workers per unit nest volume, N/V (workers/liter)	Mound volume, v (liters)	$N/V = 3430v^{-0.07}$	0.008	This work
Number of workers, N	Live colony biomass, M (g)	$N = 1.11 \times 10^3 M^{1.05}$	0.95	This work
Live colony biomass, M (mg)	Number of workers, N	$M = 2.14 N^{0.90}$	0.95	This work
Dry colony biomass, M_d (mg)	Number of workers, N	$M_d \propto N^{1.20}$	0.94	Tschinkel 1993
Live biomass per worker, $m = M/N$ (mg/worker)	Live colony biomass, M (mg)	$m = 0.84 - 7.40 \times 10^{-7} M$	0.008	This work
Dry biomass per worker, $m_d = M_d/N$ (mg/worker)	Dry colony biomass, M_d (mg)	$m_d = 0.32 + 2.34 \times 10^{-6} M_d$ (Oct. to Jan.) $m_d = 0.32 + 6.23 \times 10^{-6} M_d$ (March) $m_d = 0.32 + 3.23 \times 10^{-6} M_d$ (Apr. to Sept.)		Tschinkel 1993
Average worker head width, H (mm)	Mound volume, v (liters)	$H = 0.678v^{0.05}$	0.20	This work

Figure captions

Fig. 1. Regression of nest volume (V , in liters) on mound volume (v , in liters). The variables were transformed using base-10 logarithms before regression. The dash-dotted lines represent 95% confidence limits for the values of V estimated from the regression line. The dashed line has unit slope.

Fig. 2. Regression of live colony biomass (M , in grams) on mound volume (v , in liters). The variables were transformed using base-10 logarithms before regression. The dash-dotted lines represent 95% confidence limits for the values of M estimated from the regression line. The dashed line has unit slope.

Fig. 3. Regression of colony population (N) on mound volume (v , in liters). The variables were transformed using base-10 logarithms before regression. The dash-dotted lines represent 95% confidence limits for the values of N estimated from the regression line. The dashed line has unit slope.

Fig. 4. Regression of colony population (N) on colony live biomass (M , in grams). The variables were transformed using base-10 logarithms before regression. The dash-dotted lines represent 95% confidence limits for the values of N estimated from regression line. The dashed line has unit slope.

Fig. 5. Regression of average worker head width (H , in mm) on mound volume (v , in liters). The variables were transformed using base-10 logarithms before regression. The dash-dotted lines represent 95% confidence limits for the values of H estimated from the regression line.

Fig. 1

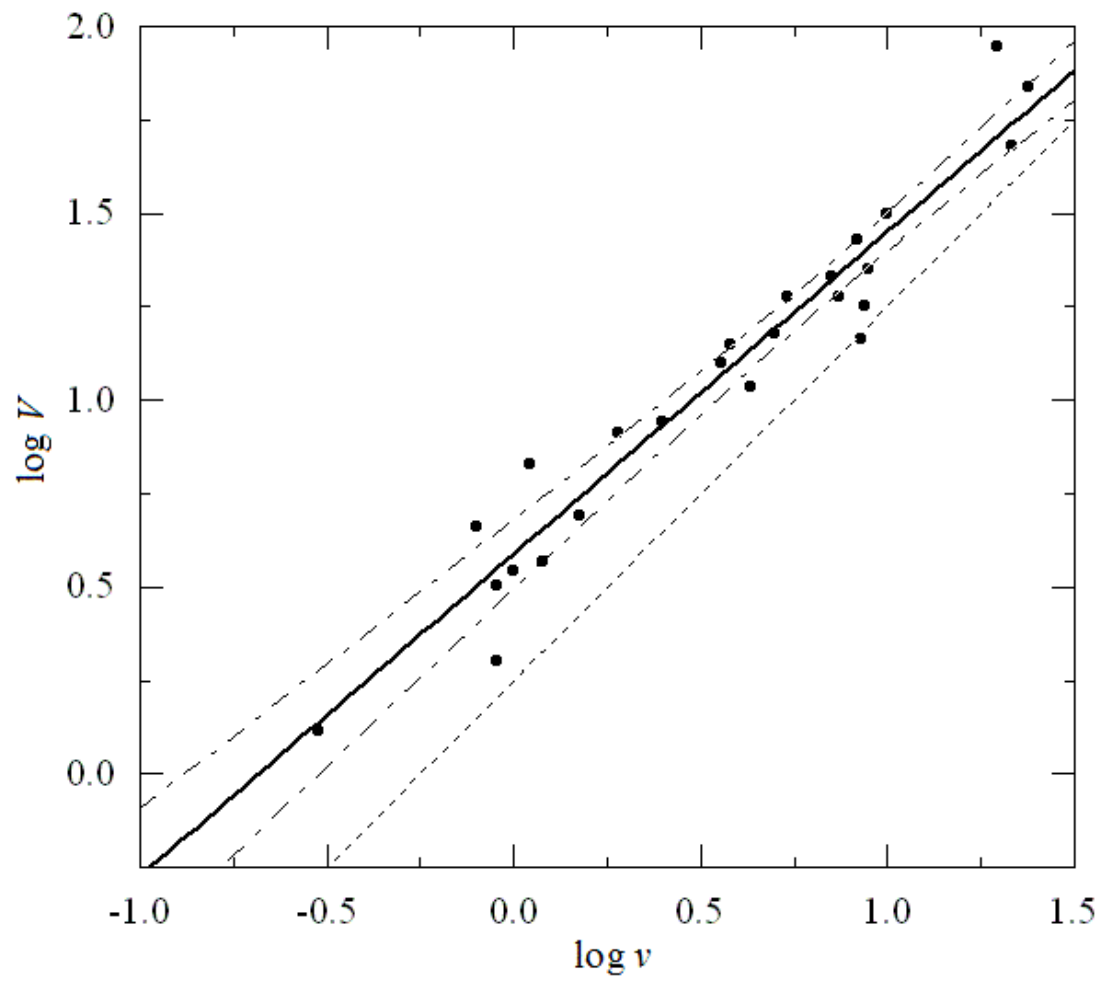


Fig. 2

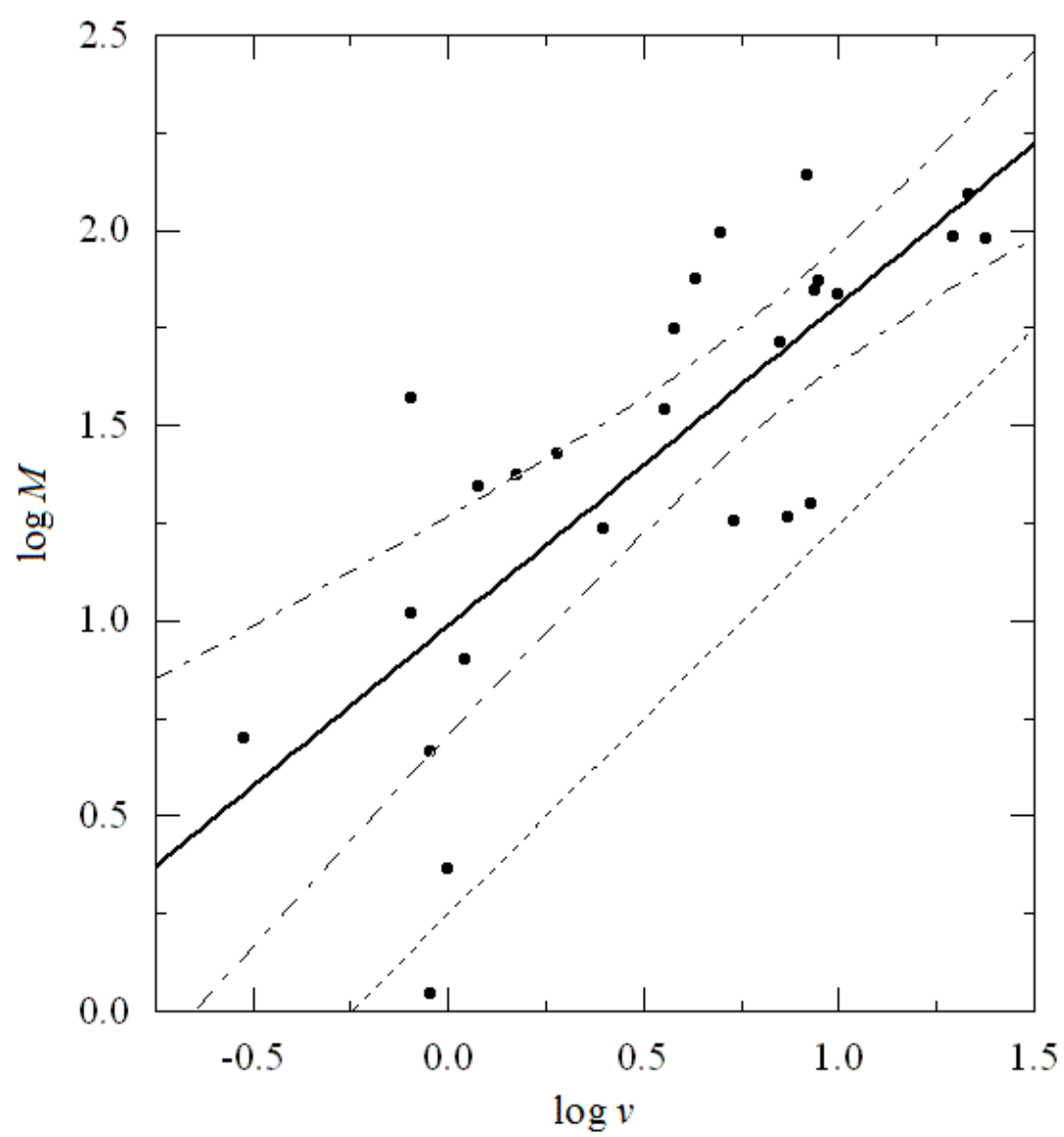


Fig. 3

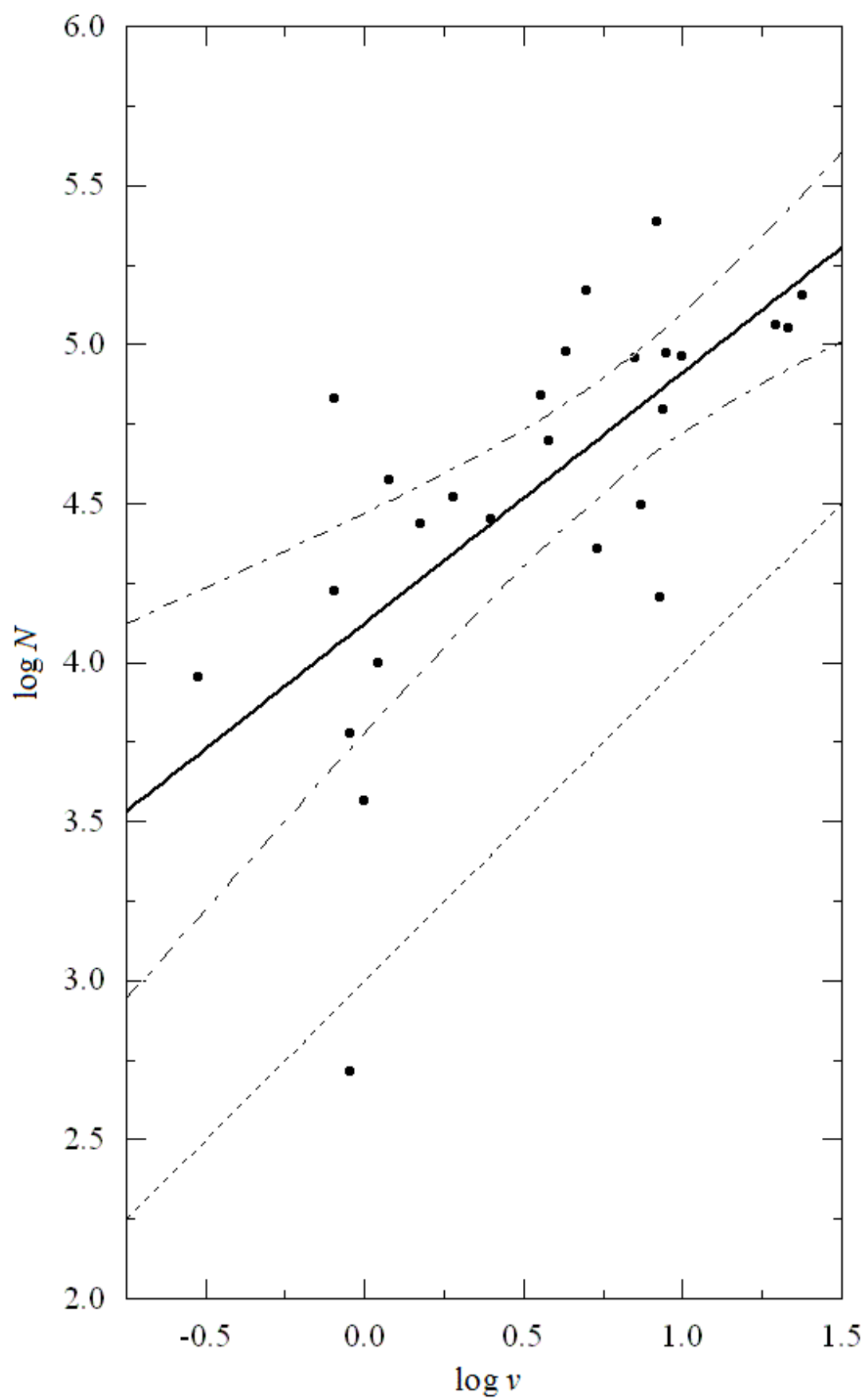


Fig. 4

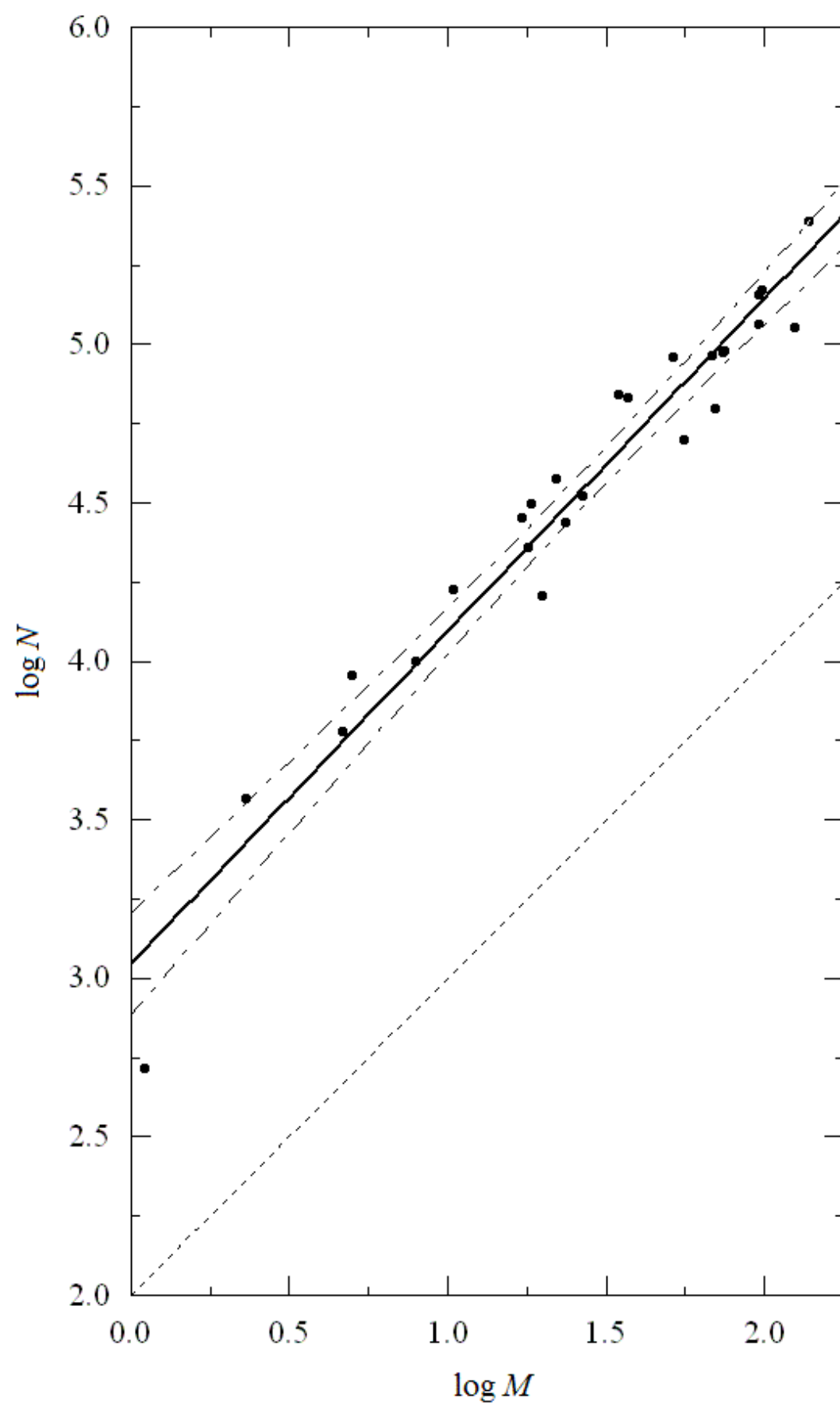
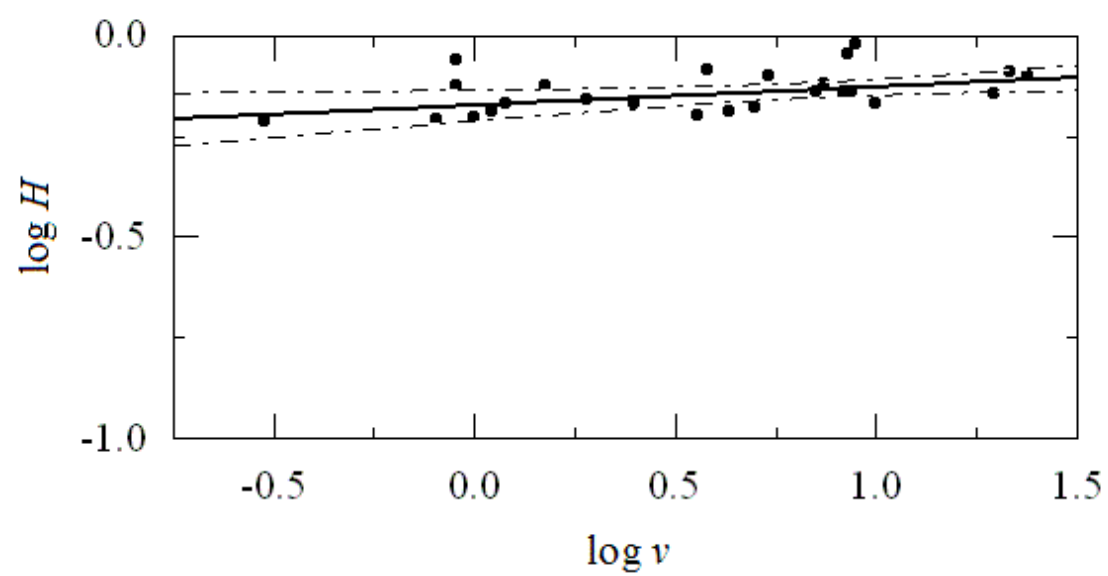


Fig. 5



Capítulo 3. Aspectos de fenologia de forídeos e colônias de *S. invicta*

Pouco se conhece sobre aspectos populacionais de forídeos, provavelmente devido a seu tamanho muito pequeno (Morrison, 2000).

Estudos sobre padrão de atividade ao longo do dia, realizados em Rio Claro SP, demonstraram que *Pseudacteon tricuspidis* foi a espécie mais abundante apresentando picos de atividade entre 6 e 10 horas após o nascer do sol. *P. litoralis*, apesar de menos abundante, apresentou maior atividade entre 3 e 4 horas e entre 11 e 12 horas após o nascer do sol (Pesquero et al., 1996). As demais espécies amostradas (*P. obtusus*, *P. pradei*, *P. adunctus* e *P. wasmanni*) foram bem menos abundantes, o que dificultou a caracterização de um padrão sazonal (Fowler et al., 1995). Porém, para as duas espécies mais representativas, a variação no padrão diário de atividade de oviposição pode indicar limitações fisiológicas destas espécies (Pesquero et al., 1996).

Na região central do Texas, *Pseudacteon browni*, *P. spatulatus* *P. crawfordi* e *P. sp.*³, parasitóides de *Solenopsis geminata*, foram amostrados ao longo de 3 anos (Morrison et al., 1999b), ocorrendo entre os meses de abril a dezembro, não sendo encontrados quando a temperatura máxima diária era menor que 20°C. Estas

³ *Pseudacteon bifidus* Brown & Morrison descrita em Brown & Morrison, 1999.

populações de forídeos apresentaram grande variação de abundância espacial e temporal, além de uma correlação positiva fraca ($r = 0.15$ para a área rural estudada e $r = 0.23$ para a área urbana estudada) com a atividade de forrageamento de *S. geminata* (Morrison *et.al.*, 1999b; Morrison *et al.*, 2000).

Vários fatores parecem afetar o tamanho de população e os padrões de fenologia das espécies de *Pseudacteon*. Em amostragens na região central do Texas, Morrison *et al.* (1999b) encontrou uma correlação positiva entre a abundância média mensal de forídeos e a precipitação mensal total com um atraso de 1-2 meses. Uma correlação positiva mais forte ($r = 0.343$) foi encontrada em uma das áreas de estudo entre a abundância de forídeos em um dia qualquer e a precipitação total na quinta semana anterior ao censo.

No mesmo estudo, a abundância de forídeos foi estimada a diferentes distâncias de uma mancha de ocorrência de *S. geminata*, seu hospedeiro, cercada por *S. invicta* por todos os lados. As 4 espécies de forídeos mencionadas acima (parasitóides de *S. geminata*) foram encontradas a até 650 metros de distância da mancha, em áreas desprovidas de seu hospedeiro, em direções aleatórias. O estudo indica que apesar de as populações de *S. geminata* serem isoladas uma das outras na região central do Texas, *Pseudacteon* pode ser capaz de se dispersar por distâncias maiores do que a distância média entre manchas de seu hospedeiro (Morrison *et al.*, 1999b). Este cenário sugere um tipo de metapopulação conhecida por “população em manchas”, na qual a dispersão ocorre em uma escala espacial maior do que os eventos que causam flutuações da metapopulação (Morrison, 2000).

Os ciclos sazonais de abundância de forídeos do gênero *Pseudacteon* que ocorrem no Brasil são ainda essencialmente desconhecidos. A fim de contribuir para o conhecimento destes ciclos, realizamos um estudo sobre as flutuações na abundância de *Pseudacteon* ao longo de um período de 3 anos em 11 áreas sujeitas a perturbações antrópicas, com cobertura de gramíneas, ao redor de Campinas, investigando a influência de fatores ambientais e da abundância da formiga hospedeira, *Solenopsis invicta*, sobre a abundância de forídeos.

Cada área foi amostrada a intervalos que variaram de 2 semanas a 3 meses. Em cada visita às áreas de estudo, foram amostrados todos os ninhos de *S. invicta* encontrados em uma parcela de 600 m², previamente demarcada. Os ninhos de *S. invicta* eram perturbados de maneira padronizada e observados durante os 15 minutos seguintes. As observações ocorreram entre 9:00 e 15:00 (hora local), e todos os forídeos

atraídos foram coletados, identificados e soltos ao lado do ninho amostrado ao final dos 15 minutos de observação. A média mensal do número de forídeos atraídos para ninhos de formigas lava-pés durante o período de observação (que denotaremos por N) foi adotada como uma medida da abundância de forídeos. Os dados coletados em cada ninho incluíram também as dimensões do ninho (altura, diâmetro maior e diâmetro menor) e variáveis meteorológicas (temperatura do ar e umidade relativa medidas ao nível do solo e velocidade do vento a 20 cm acima do solo).

No decorrer do estudo foram coletados 838 forídeos, 43% dos quais eram do sexo feminino. Dentre estes, a espécie mais frequentemente coletada foi *Pseudacteon tricuspidis* (70.4%), com proporções menores de *P. curvatus* (23.8%), *P. obtusus* (1.9%) e *P. litoralis* (3.9%). As flutuações de abundância de *Pseudacteon* foram caracterizadas pela ocorrência de picos com duração da ordem de um mês em abril e junho de alguns anos, nos quais N atingiu valores de 4-10 forídeos/ninho; em comparação, os valores usuais de N estão entre 0.2 e 2 forídeos/ninho. A duração destes picos é similar ao tempo de desenvolvimento de *P. tricuspidis* em estudos de laboratório. As populações de forídeos parecem ser eliminadas por incêndios e inundações, mas recuperam-se ao longo dos meses seguintes.

Foram observadas flutuações quase idênticas na abundância de forídeos durante um período de 6 meses em duas áreas de estudo separadas por cerca de 3 km. Isto poderia ser explicado de pelo menos duas maneiras: (1) *Pseudacteon* é capaz de se dispersar por distâncias de mais de 1 km, levando à uniformização da densidade populacional em áreas de vários km², ou (2) as populações de *Pseudacteon* respondem de maneira essencialmente determinística às condições ambientais, de modo que as populações das duas áreas responderiam independentemente de maneira muito similar às flutuações climáticas comuns a que estão sujeitas. As observações de dispersão de forídeos por várias centenas de metros na região central do Texas (Morrison et al., 1999b) sugerem que (1) é uma hipótese plausível. A alternativa (2) nos levaria a esperar que existisse alguma correlação entre variáveis meteorológicas e a abundância de forídeos. Entretanto, tal correlação não pôde ser demonstrada.

Também não foram encontradas correlações significativas entre a abundância de forídeos e a densidade de ninhos de *S. invicta*, ou entre a abundância de forídeos e o volume dos ninhos. Estes resultados sugerem que a abundância de *Pseudacteon* não é diretamente determinada pela abundância de seus hospedeiros, e também não determina diretamente a abundância dos mesmos.

Uma análise da distribuição dos números de forídeos atraídos pelos vários ninhos de *S. invicta* mostrou que quando a abundância de *Pseudacteon* é baixa (N menor do que aproximadamente 0.5 forídeos/ninho), os números de forídeos seguem a distribuição de Poisson com boa precisão. À medida que N cresce (até pelo menos o valor máximo observado, $N \approx 10$ forídeos/ninho), a distribuição dos números de forídeos torna-se contagiosa, com um excesso de ninhos que atraem muitos forídeos e também de ninhos que atraem muito poucos forídeos. Duas possíveis explicações para este padrão seriam: (1) ninhos de formigas lava-pés tornam-se mais atraentes para os forídeos à medida que mais moscas são atraídas para os mesmos; em altas densidades de forídeos, flutuações aleatórias de densidade de forídeos sobre certos ninhos permitem que os primeiros forídeos sejam atraídos para estes ninhos, levando a uma “atração em cadeia” de um grande número de forídeos em um curto período de tempo, ou (2) certos ninhos de formigas lava-pés são intrinsecamente mais atraentes aos forídeos do que outros. Em vista das grandes diferenças observadas nos números de forídeos atraídos por diferentes ninhos em condições de alta abundância de *Pseudacteon*, a hipótese (2) nos levaria a esperar que os ninhos amostrados exibissem grandes diferenças em características como tamanho, atividade, e tamanho das operárias, que concebivelmente determinam quão atraente é um ninho de *S. invicta*. Entretanto, tais diferenças não foram observadas.

Anexo

Seasonal fluctuations in abundance of *Pseudacteon* flies (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Solenopsis invicta* fire ants (Hymenoptera: Formicidae), in Southeast Brazil

CHRISTIANE G. DALL'AGLIO-HOLVORCEM and WOODRUFF W. BENSON
Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Correspondence: Christiane G. Dall'Aglío-Holvorcem, Graduate Program in Ecology, Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil. E-mail: chrisholvorcem@mpc.com.br

Running head: Seasonal fluctuations of phorid flies

Abstract

We present the results of a 3-year study of the seasonal fluctuations in abundance of *Pseudacteon* flies (Diptera, Phoridae), parasitoids of the fire ant *Solenopsis invicta*, in grassy areas subject to anthropic perturbations in Campinas, southeast Brazil. Phorid abundance was estimated by the number of phorids attracted to disturbed fire ant mounds over a 15-min period. The most common *Pseudacteon* species found was *P. tricuspis*, with small numbers of *P. curvatus*, *P. obtusus*, and *P. litoralis* also recorded. The abundance of *Pseudacteon* exhibited sharp month-long peaks during the dry season months in some years. Fire and flooding events which occurred during the study had an adverse effect on phorid populations, which recovered more slowly than fire ants. Nearly identical fluctuations in phorid abundance were observed at two study sites separated by about 3 km, suggesting that phorids either respond similarly to environmental conditions, or that phorid populations are linked by dispersal over distances of more than 1 km. However, no relation was found between phorid abundance and locally measured meteorological variables or with fire ant mound volume or number of mounds per unit area. This suggests that phorid abundance is not directly determined by, and does not directly determine, the abundance of their hosts. At low phorid density, the number of phorids attracted to disturbed fire ant mounds follows the Poisson distribution; as the density increases over about an order of magnitude, the distribution becomes more and more contagious, suggesting that the attractiveness of a disturbed fire ant mound increases with the number of phorids which have been previously attracted to it.

Key words: fire ant, *Solenopsis invicta*, phorid, *Pseudacteon*, seasonal abundance fluctuations, southeast Brazil.

Introduction

A number of phorid flies in the genus *Pseudacteon* are parasitoids of fire ants in the *Solenopsis saevissima* complex in North and South America (Disney, 1994). The life cycles of the South American species *P. litoralis* and *P. tricuspis* are among the few which are known in detail (Porter et al., 1995, 1997; Morrison et al., 1997). Females of these diurnal phorid species inject a single egg into the thorax of a *S. invicta* worker; the larva migrates to the worker's head, and at pupation it decapitates the worker, and then consumes the contents of the head capsule over a period of several hours (Porter, 1998). Although the fate of the puparia in nature is not known, laboratory evidence suggests that the parasitized dead worker heads are deposited by other workers on "cemetery piles" on the ground surface, and are presumably dispersed by rain, wind, or other ants (Porter, 1998). Development times (oviposition to emergence of the adult) for studied South American *Pseudacteon* species are between 4 and 6 weeks (Morrison et al., 1997, Porter et al., 1995). Larger *Pseudacteon* species tend to parasitize larger worker ants (Morrison et al., 1997). Sex determination of the emerging adult phorid is influenced by the size of the infected worker, with more female phorids emerging from larger ant workers (Morrison et al., 1999a). Several *Pseudacteon* species are specific parasitoids of fire ants, and some common South American species (*P. tricuspis*, *P. litoralis*, *P. wasmanni*, *P. obtusus*) appear to be specific to *S. invicta* (Porter, 1998, Morrison, 2000). Natural parasitism rates were only estimated for the North American species *P. browni* and *P. crawfordi*, which attack *S. geminata*, and are quite low, between 0 and 2.5% (Morrison et al., 1997).

Laboratory-reared *P. tricuspis* are currently being used as tentative biocontrol agents of the invading *S. invicta* populations in the southern United States (Morrison,

2000; S. Porter, personal communication). One of the strongest arguments in favor of mass phorid releases is the laboratory evidence that *P. tricuspis* females hovering above a *S. invicta* colony can cause a reduction of up to 50% in foraging and recruitment activity, significantly reducing their competitive advantage over native ants (Morrison, 1999). However, the effectiveness of this approach depends on the presence of other ant species which may compete with *S. invicta* for the same food resources (Morrison, 2000). This is not true of many areas in the southern United States, where *S. invicta* has displaced many native ant competitors (Porter and Saviano, 1990; Morrison and Porter, 2003).

Despite a growing interest in phorid flies, their phenology and dispersal ability remain mostly unknown (Disney, 1994). A 10-month study of the oviposition activity patterns of *P. tricuspis* and *P. litoralis* in southeast Brazil (Pesquero et al., 1996) indicated that the activity of *P. tricuspis* peaks about 7 hours after sunrise, while the activity of *P. litoralis* has two peaks (3 and 11 hours after sunrise). In a 3-year study of the seasonal fluctuations in the abundance of four North American phorid species that parasitize *S. geminata* (*P. browni*, *P. spatulatus*, *P. crawfordi*, and another undescribed species) in central Texas, Morrison et al. (1999b) found substantial temporal and spatial fluctuations in phorid abundance and some dependence of phorid activity on temperature and rainfall. However studies to date have not reported clear seasonal patterns or elucidated the causes of the fluctuations in phorid abundance, which may involve a complex interaction of environmental variables with the biology and ecology of *Pseudacteon* and their fire ant hosts.

The present work attempts to extend the knowledge of phorid phenology to some common South American *Pseudacteon* species, parasitoids of *S. invicta* within their native range by documenting the fluctuations in phorid abundance over a 3-year

period, and investigating the influence of variations in environmental factors and host ant abundance on the abundance of *Pseudacteon*.

Methods

Pseudacteon and *S. invicta* abundance were sampled at 11 study areas around Campinas, Brazil (22°47' S, 46°57' W) from December 1997 to September 2000. The location of the various study areas is shown in Fig. 1, and the periods during which each area was sampled are given in Table 1.

Each area was visited at intervals between 2 weeks and 3 months. On each visit, each *S. invicta* mound located inside a pre-defined 20 m x 30 m area was measured (height, width, length), and then disturbed and observed for a period of 15 min, between 09:00 and 15:00 local time. All phorids attracted to the disturbed mound were collected into vials using a simple suction device. After the 15-min observation period, the collected female *Pseudacteon* phorids were identified to species in the field using a 20x magnifier, recorded, and then released near the mound where they were collected. The male *Pseudacteon* were recorded and then released. Due to lack of a detailed taxonomic description of the males, it is not yet possible to identify male *Pseudacteon* to species (Morrison, 2000, Porter, 1998). The release of the collected phorids after each mound is observed attempts to ensure that the number of phorids collected at a given mound is not reduced because of a possible depletion effect caused by the collection of phorids on previously observed mounds.

Air temperature and relative humidity were measured on the ground near each observed mound using a digital hygrometer/thermometer (Sper Scientific, Scottsdale, AZ). Wind speed was averaged over the 15-min observation period using a Kestrel anemometer (Nielsen-Kellerman, Chester, PA) held 20 cm above the ground.

The climate at the study areas is of type Cwa (humid summers, dry winters) in Köppen's classification (CEPAGRI/UNICAMP, unpublished data). Fig. 2 summarizes

the fluctuations of basic meteorological variables in the region comprising our study areas in 1997-2000 (FEAGRI/UNICAMP and CEPAGRI/UNICAMP, unpublished data). One outstanding precipitation fluctuation in Fig. 2(a) is an unusually dry period in April-June 2000; the dry season started and ended about 2 months earlier than usual in 2000.

Results and discussion

A total of 763 observations of disturbed fire ant mounds (each observation lasting 15 min) were carried out in the course of this study, resulting in the recording of 838 phorids (362 females, 481 males). Females from four *Pseudacteon* species were observed: *P. tricuspis* (70.4% of all females), *P. curvatus* (23.8%), *P. obtusus* (1.9%), and *P. litoralis* (3.9%). *P. tricuspis* was found throughout the whole year; due to the small number of recorded individuals belonging to the other three species, it was not possible to determine if they also occurred during the whole year. Since different phorid species have different periods of activity, the relative proportions of the various species resulting from our data may be quite different from the true proportions between their population densities. *P. tricuspis*, which is active in the hours around noon should have been well sampled in this study, but *P. litoralis*, which is active in the early morning may have been undersampled in this study (Pesquero et al, 1996).

The proportion of males in our sample (57%) was lower than that found by Morrison et al. (1999) in a study of *Pseudacteon* phenology in central Texas (about 85%). It should be noted that the *Pseudacteon* species found in this last study (*P. browni*, *P. spatulatus*) are not the same found in southeast Brazil, and that they are parasitoids of another fire ant species, *S. geminata*.

Due to the large sampling effort which is required to observe a reasonable number of phorids, only a relatively crude picture of the seasonal cycle of *Pseudacteon* could be obtained from the data collected in this study. Fig. 3 shows the fluctuations in the monthly mean number of attracted phorids per fire ant mound (per 15-min observation period) over the duration of the present study. This monthly mean number includes data from all 11 study areas, except the observations made in October 1998 at

BG4, which showed by far the greatest abundance of *Pseudacteon* over the study. This high abundance was not observed at other study sites, and appears to be result of peculiar local conditions. Note that our phorid abundance data essentially reflect the fluctuations in *P. tricuspis*, which was by far the most frequently collected species during the whole year.

The monthly mean number of attracted phorids per mound (which we will denote by N) varies by roughly an order of magnitude along the seasonal cycle. The most remarkable features of Fig. 3 are the abrupt peaks in March-April 1998, April 2000, and June 2000. The June peak seen in 2000 ($N \sim 10$) did not occur in 1998; it is not known if it occurred in June 1999 due to lack of data for that month. Precipitation in the two months preceding the June 2000 peak was unusually low (Fig. 2a), and may have contributed to the peak's occurrence. A smaller April peak seen in 1998 ($N \sim 4$) was also observed in 2000, but did not occur in 1999. A peak might have occurred in either March or May 1999, but we have not obtained data for those months.

It is also interesting to notice that the duration of the observed peaks (about 1 month) is similar to the development time (about 33 ± 2 days from egg to adult) of *P. tricuspis* in the laboratory (Morrison et al, 1997). *Pseudacteon* eggs laid in May 2000, when phorid abundance was relatively low, appear to have developed under very favorable conditions, producing the large number of adults observed in June 2000. Although the life span of adult phorids in nature is unknown, laboratory studies suggest that it is of the order of one week (Morrison, 2000). If this is true, the adult phorids living in June 2000 were all dead in July 2000 and were not replaced by new adults emerging from eggs laid in June 2000, resulting in the observed sharp drop in N .

The presence or absence of such sharp peaks may depend on the particular circumstances of each study area. For example, the June 1998 data point in Fig. 3 comes

solely from observations at area BG1, which burned on June 6, 1998. A sampling made 2 days before the fire yielded $N \approx 0.8$ phorids/mound. Ten days after the fire, no phorids were found at BG1, even though most of the fire ant colonies had survived the fire. Fires could reduce phorid populations by destroying adults and pupae, and possibly also by destroying plants which may serve as food resources or shelter for the adult phorids.

Outside the observed sharp peaks, the values of N typically ranged from 0.2 to 2 phorids/mound. These were quite consistent from year to year, and usually varied in a gradual fashion from month to month. However, an abrupt drop in N between December 1999 and January 2000 followed a period of steady increase between September and December 1999. It would be interesting to investigate if this increase in the last four months of the year (which coincides with a period of increasing precipitation as the rainy season intensifies in September-October and then moves toward its peak in January-February) is present in a typical year.

Values of N were consistently low (between 0.3-0.7) in January-February of the three study years. A tentative explanation for the abrupt drop in N between December 1999 and January 2000 would be that the very heavy rains between December and February (by far the rainiest months), which led to drenched soils and periodic brief flooding episodes, have an adverse effect on the survival of phorid pupae contained in dead worker head. Torrential rains might carry away most heads containing puparia before the emergence of the adults. This would lead to very few emerging adults on the next month, as was observed in January 2000.

Another instance of an abrupt drop in *Pseudacteon* abundance was observed on the weeks following very strong rains at area BG1 on December 25, 1997. This rain, which was the heaviest in the area between 1997 and 2000, flooded BG1 for several hours before the level of the nearby stream returned to normal. Monitoring of phorid

abundance at BG1 at intervals of 1-2 days during January 1998 yielded no record of phorids over the first week after the flooding rain and low values of N over the next two months.

Fig. 4 shows the seasonal fluctuations in N at the two areas BG2 and BG3, which share some common characteristics (relatively frequent perturbations, proximity to water bodies and urban areas, similar fire ant mound densities) and are separated by approximately 3 km. Interestingly, the fluctuations in N were nearly identical between February and July 2000, a time interval spanning two major peaks in phorid abundance. The only published field study of dispersal of *Pseudacteon* was carried out in central Texas (Morrison et al., 1999b), and suggests that *P. browni* and *P. spatulatus* can disperse over distances of at least 650 m from mounds of their host *S. geminata*. Assuming that *P. tricuspis* is able to disperse over similar or somewhat greater distances, the similar fluctuations in phorid abundance (N) seen at BG2 and BG3 could be the result of a uniformity in phorid density over several square kilometers, brought about by phorid dispersal over several kilometers. An alternative explanation would be that similar fluctuations in local conditions (microclimate, vegetation, water abundance, mound density, etc.) at BG2 and BG3 would lead to similar fluctuations in phorid abundances at both sites, even if dispersal only occurs over distances much shorter than their separation. In this view, the fluctuations in phorid abundance would be essentially deterministic.

To investigate the plausibility of this last explanation, we have tried to correlate the number of phorids recorded at each mound observation with meteorological conditions (temperature, humidity, and wind speed averaged over the 15-min observation period) at each mound, but found no significant correlation ($P < 0.05$). The correlation coefficients between number of phorids and these meteorological variables

measured at each mound were all between -0.028 and 0.037 (d.f. = 516 for temperature and humidity; d.f. = 299 for wind speed).

In North America, *Pseudacteon browni* and *P. spatulatus* become inactive when the temperature drops below 20°C (Morrison et al., 1999); however, in our study temperatures at the mounds were always between 20 and 45°C; temperature changes in this range had no statistically significant effect on phorid abundance.

A moderate correlation ($r = 0.343$) between phorid abundance and rainfall in the 5th week before the phorid sampling was reported at a rural area in central Texas (Morrison et al., 1999). We have computed lagged correlations between phorid abundance in areas BG2 and BG3 (computed as the mean number of attracted phorids per mound on each visit to each study area) and weekly total rainfall for time lags between zero and 60 days. BG2 and BG3 were sampled every 15-30 days between July 1999 and September 2000. Correlation coefficients varied from -0.237 to 0.124, and were never statistically significant ($P < 0.05$; d.f. = 34-36).

It is reasonable to ask whether the abundance of phorids is correlated with the density of fire ant mounds, or, in other words, if phorid density increases or decreases with the density of their host's mounds. Average mound density (Table 2) was between 5 and 9 mounds per 600 m² for all study areas, except CP2, which had a much higher density; observed mound densities ranged from 1 to 30 mounds per 600 m². The correlation coefficient between phorid abundance (computed as the mean number of attracted phorids per mound on each visit to each study area) and the fire ant mound density observed at each visit to each study area was -0.097 ($P < 0.05$; d.f.= 94). This suggests that phorid abundance is not determined by, and also does not determine, fire ant mound density. This is consistent with previous studies (Morrison et al., 1997)

which showed that the rate of infection by *Pseudacteon* in *Solenopsis* colonies is of the order of a few percent, too small to have an important effect on population densities.

We have also tried to correlate the number of phorids recorded at each mound observation with the aboveground mound volume, which was estimated using the expression for the volume of half a triaxial ellipsoid (Dall'Aglio-Holvorcem and Benson, in preparation). The correlation coefficient (0.084) was also not significant ($P < 0.05$; d.f. = 494).

Of the 761 observations of fire ant mounds, only a modest proportion (25%) resulted in the detection of *Pseudacteon* flies. The attraction of *Pseudacteon* to a disturbed fire ant mound is therefore a relatively rare event; one may ask whether or not the number of phorids attracted to each mound follows a Poisson distribution (Sokal and Rohlf, 1995). This would be the case if the probability of a phorid being attracted to a fire ant mound during the 15-min observation period is independent of the numbers of phorids which have been previously attracted to the observed mound and to nearby mounds. We tested this hypothesis using the data from study areas BG2 and BG3, which were observed at intervals between 2 weeks and one month between July 1999 and September 2000. Since the abundance of *Pseudacteon* varied greatly along the year, we restricted our analysis to periods of time when phorid abundance was relatively constant. These selected periods (Table 3) had widely different phorid abundances, ranging from very low to very high. For each period, we compared the distribution of numbers of phorids attracted to fire ant mounds with that expected from a Poisson distribution whose mean is equal to the observed mean number of attracted phorids per fire ant mound (Fig. 5). The goodness of fit to a Poisson distribution was evaluated with the *G*-test (Sokal and Rohlf, 1995). At low mean phorid densities (Fig. 5a), the observed distribution of attracted phorids matches a Poisson distribution rather closely ($P < 0.05$).

At intermediate phorid densities (Fig. 5b), there was a noticeable excess of mounds which attracted no phorids and also of mounds which attracted four or more phorids; the observed distribution is significantly different from the Poisson distribution ($P < 0.005$). This shows that phorids become more concentrated at certain mounds as density increases. At very high phorid densities (Figs. 5c, 5d), the distribution is also contagious, and significantly deviates from the Poisson distribution ($P < 0.005$). This lends support to the idea that the attractiveness of a disturbed fire ant mound to *Pseudacteon* flies increases with the number of flies which have already been attracted to it (possibly due to the release of alarm pheromones by the attacked ants). At sufficiently high phorid densities, after the first phorid is attracted, more and more phorids flying in the neighborhood would be attracted in a "runaway effect". This mechanism would not work well at low phorid densities, because of the lower probability that a second phorid will fly by a disturbed mound during the 15-min observation period. Under these conditions, everything would happen as if the first attracted phorid didn't make the mound appear more attractive to other phorids, and the distribution matches Poisson very closely.

Another hypothesis to explain the observed distributions of numbers of attracted phorids would be that some disturbed fire ant mounds are intrinsically more attractive to phorids than others. In the course of our regular sampling of areas BG2 and BG3, many of the fire ant mounds were followed for about 1.3 years. In each successive visit to these areas (every 15-30 days), different fire ant mounds attracted the largest numbers of phorids. Also, almost every mound attracted one or more phorids on at least one visit in the course of the study. According to the above "runaway effect" hypothesis, one would expect that random small-scale fluctuations in phorid density would occur over different mounds at different times, triggering the attraction of many phorids to those

mounds where positive density fluctuations take place during their observation periods (provided that the current mean phorid density is sufficiently high), leading to the observed pattern. Alternatively, the same pattern could be produced if we assume that the attractiveness of any given fire ant mound varies in time, with different mounds becoming the most attractive at different times. The large differences in numbers of attracted phorids which are seen between the various observed mounds (Fig. 5c and 5d) would seem to require correspondingly large differences in mound attractiveness to phorids. However, we have not seen such large differences in obvious mound characteristics such as size, activity and worker size (which would presumably determine mound attractiveness to phorids) between mounds which attracted few phorids and those which attracted many phorids.

Conclusions

The data obtained in this study suggest that *Pseudacteon* population densities in southeast Brazil have a seasonal cycle in which sharp peaks with duration of approximately one month (which is approximately equal to the development time of *P. tricuspis*) may occur in March-April and June. These peaks cannot be easily explained by variations in environmental variables or in the abundance of the phorid's fire ant hosts. On the other hand, perturbations such as dry season fires (May-September) and flooding near the peak of the rainy season (December-January) seem to have a strong negative effect on *Pseudacteon* abundance. The mechanisms behind these seasonal fluctuations in phorid abundances are probably quite complex, involving the interaction between physical factors and the dynamics of *Pseudacteon* and *Solenopsis*. In particular, it is not known how the oviposition efficiency of *Pseudacteon* and the survival rates of eggs, larvae, and pupae depend on environmental factors and on the characteristics of the fire ant host population. Such knowledge would be essential for any predictive modeling of the seasonal fluctuations in phorid abundance.

Synchronous fluctuations in phorid abundance have been observed over a period of several months in two of our study areas, which are separated by about 3 km. This kind of pattern, which was also observed in a rural area in Texas (Morrison et al., 1999), might arise from either phorid dispersal or deterministic fluctuations in phorid abundance, driven by regional weather conditions.

Finally, the analysis of the numbers of phorids attracted to fire ant mounds suggests that the attractiveness of a disturbed fire ant mound (or more generally of a group of fire ants on the ground) to their phorid parasitoids increases with the number of

phorids which have been previously attracted to the mound. This may lead to very high phorid densities around certain mounds, while others attract few phorids.

Acknowledgments

The author would like to express her gratitude to L. W. Morrison and S. D. Porter (USDA-Gainesville,FL) for useful discussions, to P. R. Holvorcem for advice in the analyses involving the Poisson distribution. CGDH had a doctoral fellowship from CAPES

References

- Disney, R.H.L. 1994. Scuttle flies: the Phoridae. Chapman & Hall, London.
- Miranda, E.E. & A.C. Coutinho (coords.), 2004. *Brasil Visto do Espaço*. Embrapa Monitoramento por Satélite, Campinas, Brazil. Available at <http://www.cdbrazil.cnpm.embrapa.br>. Accessed on July 20, 2005.
- Morrison, L.W. 2000. Biology of *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) ant parasitoids and their potential to control imported *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Recent Res. Devel. Entomol.* 3: 1-13.
- Morrison, L.W. 1999. Indirect effects of phorid fly parasitoids on the mechanisms of interspecific competition among ants. *Oecologia* 121: 113-122.
- Morrison, L.W. & S.D. Porter, 2003. Positive association between densities of the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), and generalized ant and arthropod diversity. *Environ. Entomol.* 32(3): 548-554.
- Morrison, L.W., S.D. Porter & L.E. Gilbert. 1999a. Sex ratio variation as a function of host size in *Pseudacteon* flies (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 66:257-267.

- Morrison, L.W., E.A. Kawazoe, R. Guerra & L.E. Gilbert, 1999b. Phenology and dispersal in *Pseudacteon* flies (Díptera: Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92(2): 198-207.
- Morrison, L.W., C.G. Dall'Aglia-Holvorcem & L.E. Gilbert. 1997. oviposition behavior and development of *Pseudacteon* flies (Diptera:Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 26: 716-724.
- Pesquero, M.A., S. Campiolo, H.G. Fowler & S.D. Porter. 1996. Diurnal patterns of ovipositional activity in two *Pseudacteon* parasitoids (Díptera: Phoridae) of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomol.* 79(3) 455-457.
- Porter, S.D. 1998. Biology and behavior of *Pseudacteon* decapitating flies (Diptera: Phoridae) that parasitize *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomol* 81(3) 292-309.
- Porter, S.D. & D.A. Savignano. 1990. Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community. *Ecology*, 71(6): 2095-2106.
- Porter, S.D., D.F. Williams & R.S. Patterson. 1997. Rearing the decapitating fly *Pseudacteon tricuspidis* (Diptera: Phoridae) in Imported Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae) from the United States. *J. Econ. Entomol.* 90(1): 135-138.
- Porter, S.D., M.A. Pesquero, S. Campiolo & H.G. Fowler. 1995. Growth and development of *Pseudacteon* phorid fly maggots (Díptera: Phoridae) in the heads of *Solenopsis* fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 24(2): 475-479.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf, 1995. *Biometry*. 3. ed. W.H. Freeman, New York. 887 p.

Tables

Table 1. Description and periods when data were collected at each of the study areas discussed in the text.

Area code	Area description	Data collection period
BG1	Frequently mowed grass, near the banks of a small stream; adjacent to urban area	Dec. 1997 to Apr. 1999
BG2	Grass pasture grazed by horses, near a marsh; adjacent; adjacent to urban area	July 1999 to Sept. 2000
BG3	Frequently mowed grass lawn, near the banks of a small stream; adjacent of a urban area	July 1999 to Sept. 2000
BG4	Trail at the edge of a forest preserve (semi-deciduous tropical forest); far from water bodies	Oct. 1998 to Apr. 1999
BG5	Cultivated herb stands; far from water bodies	Jan. 1999 to July 1999
BG6	Grass pasture grazed by horses; rural area, far from water bodies	Oct. 1998 to Apr.1999
BG7	Grass pasture grazed by horses; rural area, far from water bodies	Oct. 1998 to Apr. 1999
BG8	Grass lawn using as a parking lot; far from water bodies	Oct. 1998 to July 1999
CP1	Grass lawn; far from water bodies	Jan. 1999 to July 1999
CP2	Grass pasture grazed by horses and cows; rural area; far from water bodies	Oct. 1998 to Jan. 1999
JGR	Frequently mowed grass lawn; far from water bodies; adjacent to urban area	Oct. 1998 to Aug. 1999

Table 2. Total number of mound observations, average, mound density, and total number of recorded phorids recorded at disturbed mounds in the course of this study.

Area	Total mound observations	Number of mounds/600m ²			Total attracted phorids
		Average	Max.	Min.	
BG1	236	6.7	20	1	245
BG2	154	8.6	12	4	301
BG3	165	8.3	16	2	193
BG4	16	8.0	10	6	7
BG5	25	8.3	9	7	14
BG6	15	5.0	6	4	6
BG7	19	6.3	11	1	3
BG8	34	8.5	13	4	34
CP1	21	7.0	13	3	0
CP2	47	23.5	30	17	23
JGR	29	7.3	12	5	17

Table 3. Selected time periods for the comparison between the observed phorid distribution and the Poisson distribution in areas BG2 and BG3.

Area code	Period	Total mound observations	Total attracted phorids	Mean number of attracted phorids per mound
BG3	July 1999-Feb. 2000	90	30	0.33
BG2	July-Nov. 1999	62	60	0.97
BG2+BG3	Apr. 2000	23	85	3.70
BG2+BG3	June 2000	18	175	9.72

Figure captions

Fig. 1. Location of the study areas near Campinas, Brazil. Area codes are the same as in Table 1. This Landsat-TM/ETM image (bands 5, 4, 3) taken in May 3, 2001 (Miranda & Coutinho, 2004) shows an area of 17.4×23.4 km centered at $47^{\circ}05'15''\text{W}$, $22^{\circ}49'19''\text{S}$. Forest areas appear in darker green, open vegetation areas in lighter green, burned grasses in dark violet, and urban areas and other land not covered by vegetation in different tones of pink.

Fig. 2. Fluctuations of meteorological variables during the course of this study: (a) total monthly rainfall, (b) monthly average of daily maximum temperature, (c) monthly average of relative humidity. The actual values of the meteorological variables are given by the solid lines, while the 1988-2003 climatological averages are given by the dotted lines.

Fig. 3. (a) Fluctuations in monthly mean (thick line) and maximum (thin line) numbers of attracted *Pseudacteon* flies per disturbed fire ant mound over the duration of this study. (b) Number of monthly fire ant mound observations over the duration of this study.

Fig. 4. Fluctuations in monthly mean (thick lines) and maximum (thin lines) numbers of attracted *Pseudacteon* flies per disturbed fire ant mound during 1999-2000 at study areas BG2 (thick black line, thin solid line) and BG3 (thick gray line, thin dashed line).

Fig. 5. Comparison between the observed distribution of *Pseudacteon* flies attracted to fire ant mounds (circles and solid lines) and a Poisson distribution (squares and dashed lines) on areas BG2 and BG3 at four time periods: (a) BG3, July 1999-Feb. 2000; (b) BG2, July-Nov. 1999; (c) BG2+BG3, Apr. 2000; (d) BG2+BG3, June 2000.

Fig. 1

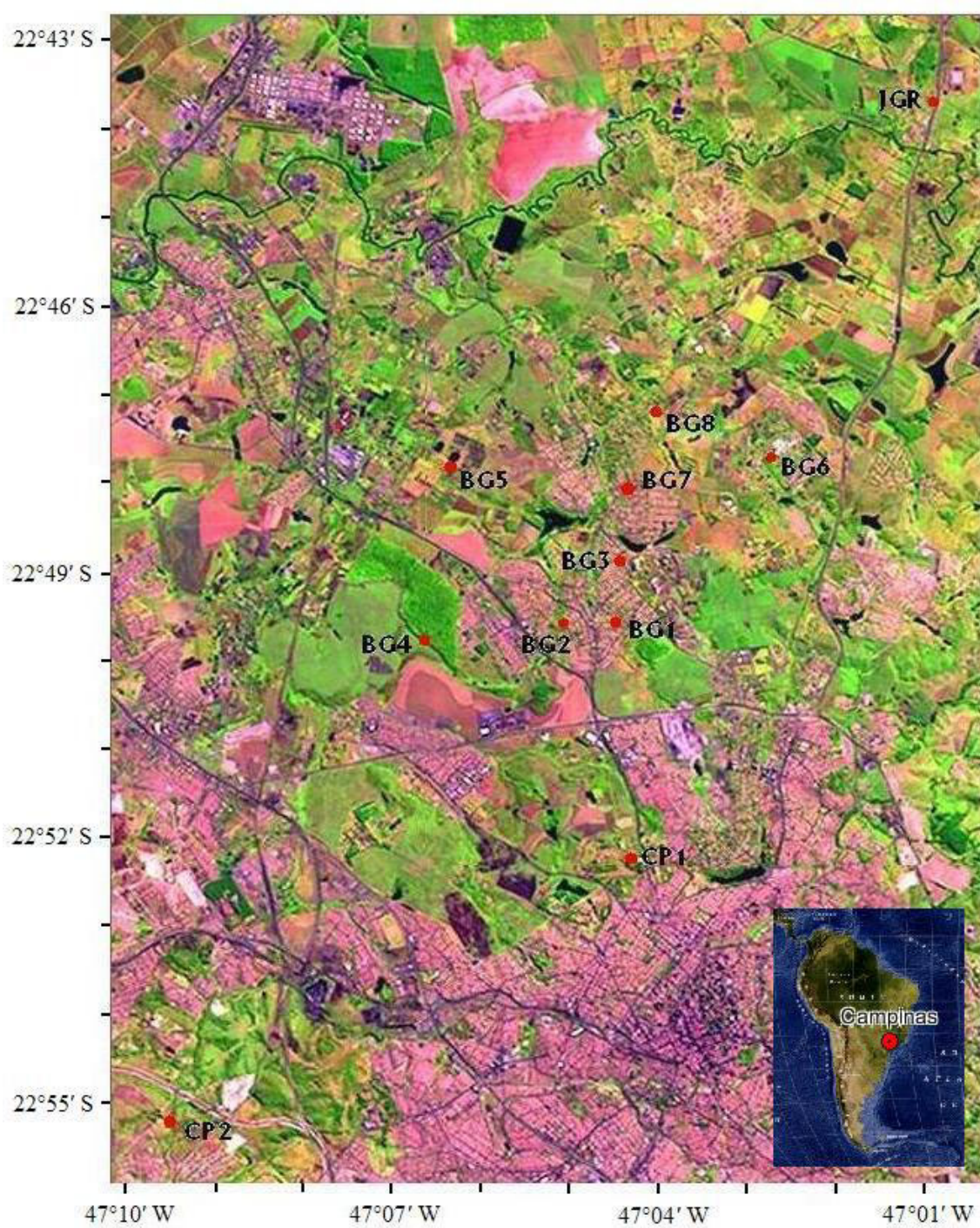


Fig. 2

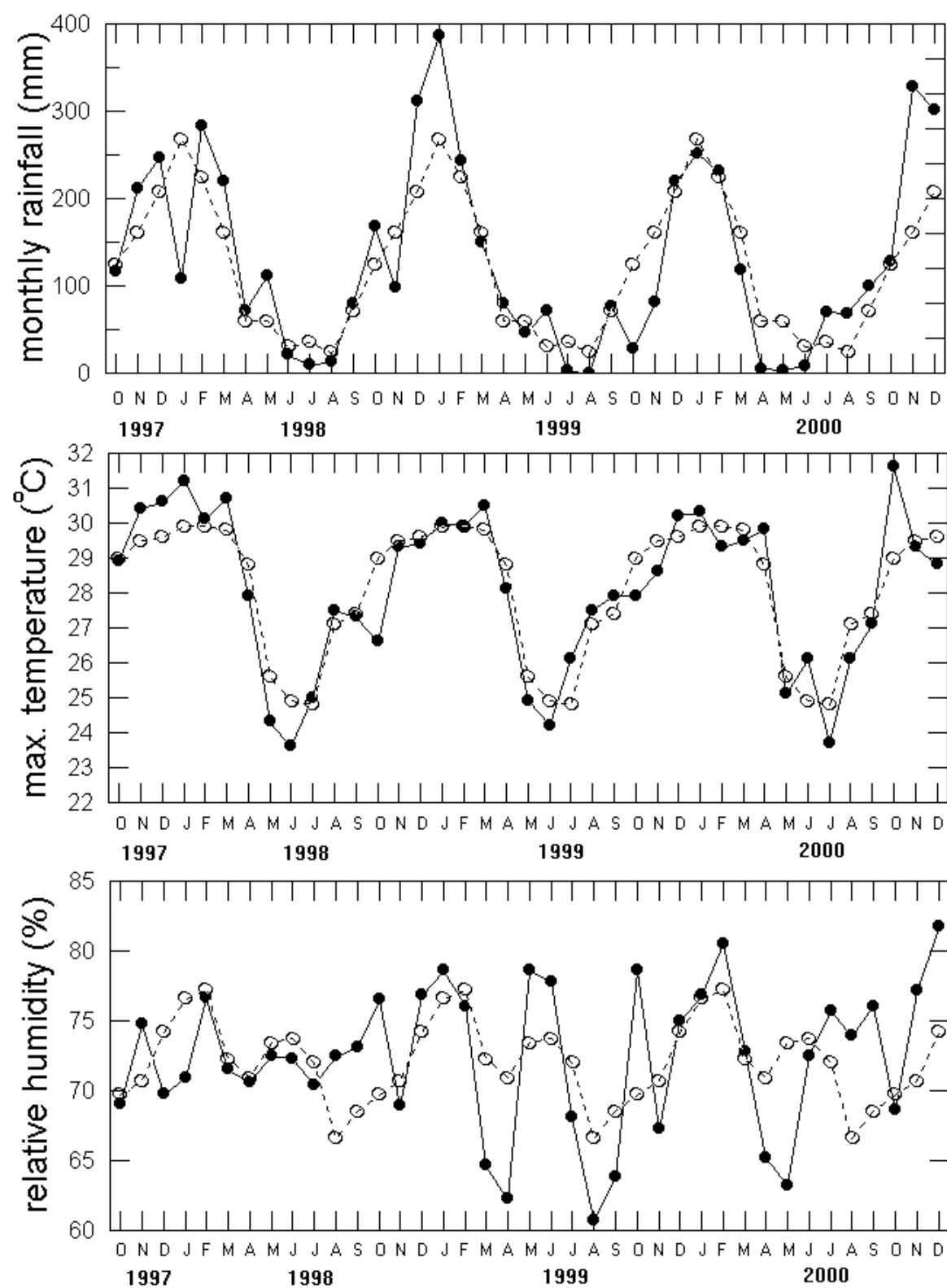


Fig. 3(a)

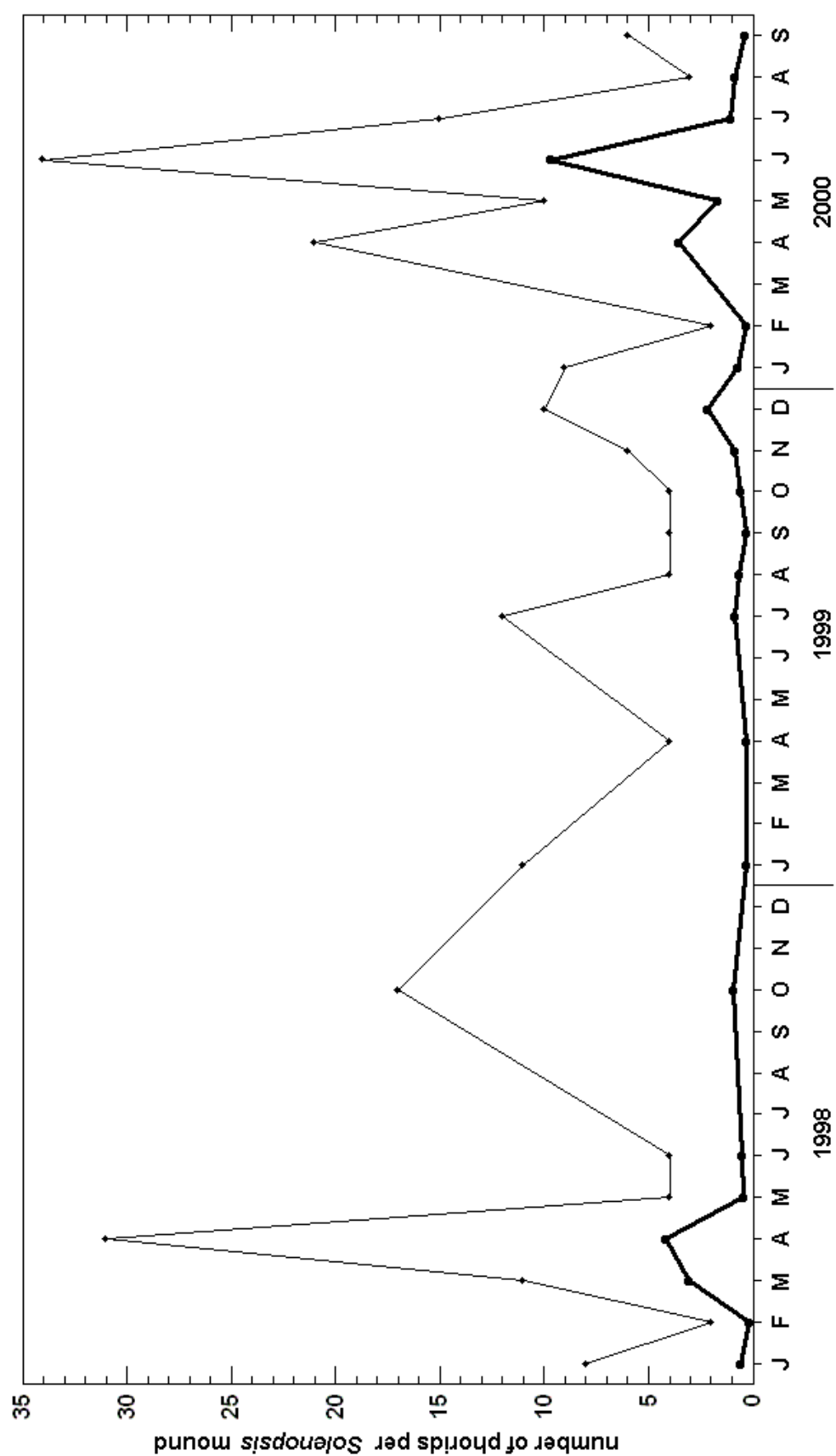


Fig. 3(b)

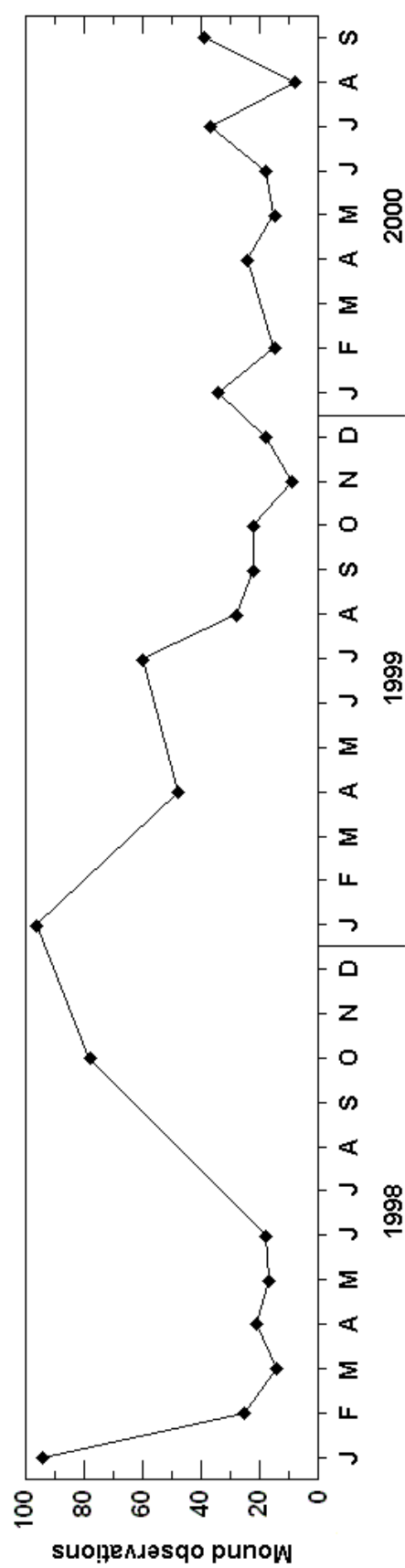


Fig. 4

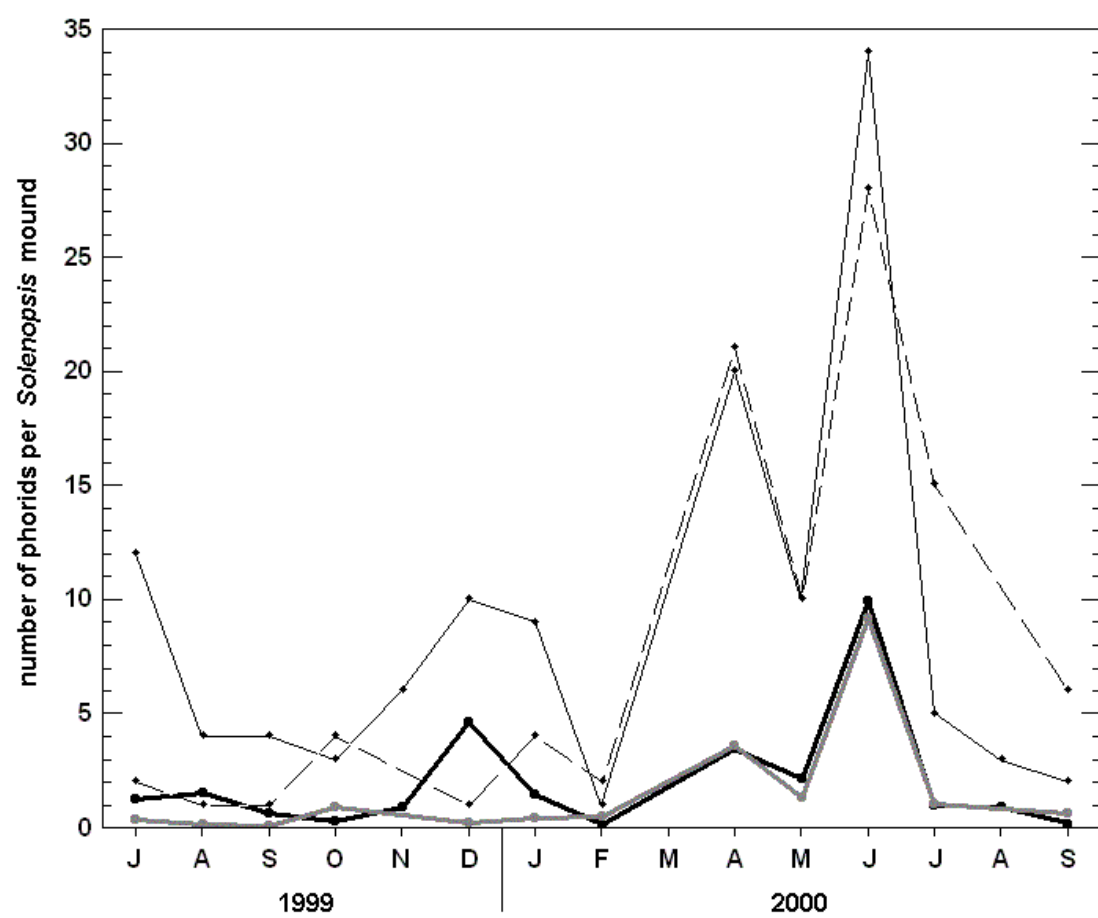
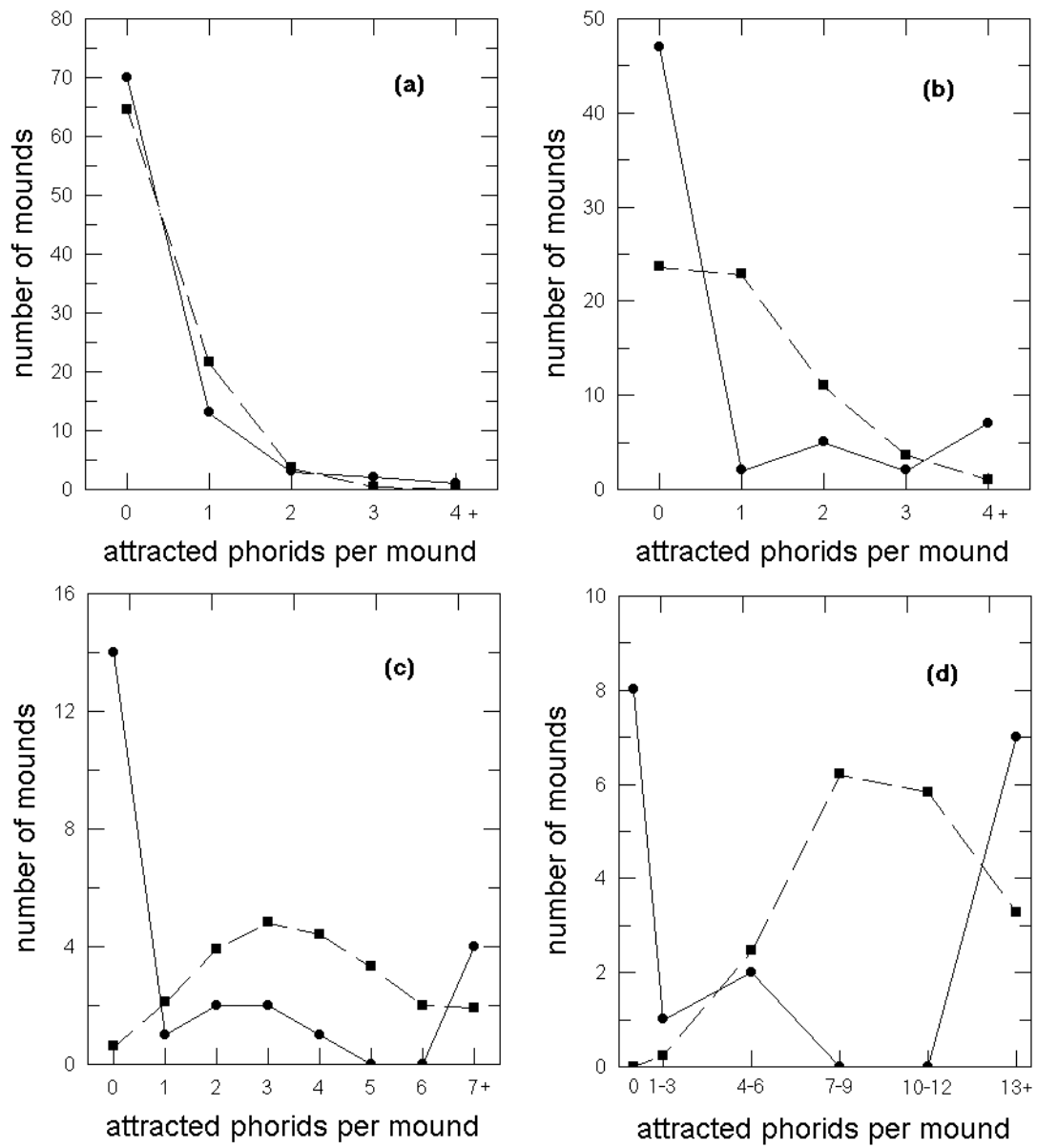


Fig. 5



Capítulo 4. Utilização de caracteres químicos para identificar populações de *Solenopsis invicta* e *S. saevissima*

a) Sistemática

Com base na sua morfologia, o gênero *Solenopsis* é separado em vários complexos de espécies, sendo que o complexo *saevissima* engloba o maior número de espécies.

O gênero *Solenopsis* passou por uma série de revisões iniciando em 1930, quando Creighton dividiu em vários subgêneros que foram posteriormente sinonimizados por Ettershank em 1966 (Vander Meer & Lofgren, 1990). Nesta primeira revisão, Creighton considerou 16 espécies com 8 subespécies ou variedades (Vander Meer & Lofgren, 1990).

Em 1952, Wilson propôs que o complexo *saevissima* deveria ser composto por duas espécies, *Solenopsis interrupta* e *S. saevissima*, além de uma subespécie, *S. saevissima* var. *richteri*. Buren (1972) reconheceu *S. saevissima* e *S. interrupta* proposta por Ettershank como espécies válidas, validou 2 outras espécies, *S. richteri* e *S. quinquecupis*, e descreveu 2 outras novas espécies, *S. invicta* and *S. blumi*.

Trager (1991) fez uma grande revisão baseada primariamente em operárias grandes, definidas como aquelas que ocupam $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{4}$ da distribuição de tamanho da maioria das colônias. Neste trabalho o autor propõe que o grupo *Solenopsis geminata* seja separado em quatro complexos de espécies (*virulens*, *tridens*, *geminata* e *saevissima*), totalizando 20 espécies. Destas, 10 espécies são nativas da América do Sul e 7 delas pertencentes ao complexo *saevissima* são listadas para o Brasil (*S. invicta*, *S. megergates*, *S. pythia*, *S. quinquecupis*, *S. richteri*, *S. saevissima*, *S. pusillignis*).

O caracter diagnóstico desta revisão é a cabeça das operárias maiores já que o formato da cabeça das operárias menores é bem uniforme nas espécies de *Solenopsis*. O autor chama a atenção de que a diferença entre o formato das cabeças de espécies muito próximas pode ter diferenças sutis e que ao utilizar a sua revisão, as pessoas devem ter claro que nem todos os indivíduos analisados poderão ser considerados “típicos” e que algumas populações isoladas não poderão ser identificadas por este tipo de caracter sutil. O autor tem expectativas de que caracterizações genéticas ou químicas poderão ajudar a superar tais dificuldades (Trager, 1991).

b) Alcalóides

MacConnel et al. (1970) identificaram a composição da glândula de veneno de operárias do complexo *S. saevissima* sendo constituído por 2-metil-6-alquilpiperidina, e que, dependendo da espécie, o grupo metil ou alquil pode ocorrer em configuração cis- ou trans- com relação ao anel piperidinico. A síntese deste alcalóide foi realizada pelo mesmo grupo (MacConnel et al. 1971). Desde então, análises comparativas da composição dos alcalóides têm sido utilizadas em vários trabalhos como instrumento de separação de espécies (Brand et al., 1972, Brand et al., 1973, Brand, 1978; MacConnel et al., 1976; Vander Meer, 1986; Vander Meeer & Lofgren 1988; Vander Meer & Lofgren, 1990).

Brand et al. (1972) compararam a presença de alcalóides piperidínicos entre 4 espécies de *Solenopsis* pertencentes ao complexo *saevissima* que ocorrem na América do Norte (*S. geminata*, *S. xyloni*, *S. saevissima*⁴ forma preta e vermelha) e encontraram que *S. geminata* tem a forma mais simples, contendo ambos cis- e trans-2-metil-6-n-undecilpiperidina (cis C11 e trans C11) como componentes principais. *S. xyloni* possui além de cis- e trans- C11 possui uma pequena porção de 2-metil-6-n-undecil-delta-1,2-piperidina. O veneno das duas outras formas de *Solenopsis* possuem cadeias com 11, 13 ou 15 átomos de carbono substituídas na posição 6 do anel de piperidina. A forma mais abundante destes alcalóides possui a configuração trans-.

Brand et al (1973) sugeriram que esta gradação na complexidade do veneno destas 4 espécies poderia refletir uma seqüência evolutiva com *S. geminata* e *S. xyloni* (as duas possuem forma cis- e trans-C11) estando mais próxima da forma ancestral, *S. richteri* (trans-C11 mais abundante e trans-C13 e trans-C13:1) a uma distância intermediária e *S. invicta* (trans-C11, trans-C13 e trans-C13:1, trans-C15 e trans-C15:1) mais distante da forma ancestral. Alternativamente, a evolução poderia ter ocorrido na seqüência inversa (Brand, 1978).

MacConnel et. al. (1976) confirmaram as diferenças de composição de alcalóides descritas acima através da análise de 29 populações pertencentes a 13 espécies de *Solenopsis* (*S. xyloni*, *S. aurea*, *S. geminata*, *S. eduardi*⁵, *S. richteri*, *S. invicta*, *S. saevissima*, e mais 6 espécies diferentes propostas com base em suas peculiaridades químicas) tanto da América do Norte quanto do Sul.

c) Hidrocarbonetos cuticulares

Hidrocarbonetos cuticulares são utilizados como ferramentas de separação entre espécies de artrópodes por serem produtos metabolicamente estáveis de uma síntese

⁴ *S. richteri* e *S. invicta*, respectivamente (Trager, 1991).

⁵ *S. eduardi* sinonimizada a *S. geminata* (Trager, 1991).

geneticamente controlada (Carlson, 1988, Kraib et al., 1991, Lockey 1991, Haverty et al., 1996). A composição dos hidrocarbonetos varia entre espécies e entre machos, fêmeas e diferentes instars de uma dada espécie, o que a torna uma ferramenta confiável (Lockey, 1991).

Lok et al. (1975) estudaram a composição de hidrocarbonetos de *S. invicta* e *S. richteri*, e notaram a presença de dois grupos de hidrocarbonetos, cada um característico de uma das espécies. Os dois grupos de hidrocarbonetos estão presentes no híbrido entre *S. invicta* e *S. richteri* (Vander Meer et al., 1985; Vander Meer & Lofgren, 1990). Nelson et al. (1980) estudaram mais detalhadamente a composição de hidrocarbonetos destas duas espécies e corrigiram alguns erros de identificação de compostos no trabalho de Lok et al. (1975). Os hidrocarbonetos presentes em *S. invicta* possuem cadeias de 23 a 29 carbonos, com 0 a 3 radicais metil. Várias séries de hidrocarbonetos foram identificadas em *S. invicta*:

- 3- e 4-metil-alcanos com números pares e ímpares de carbonos;
- metil-alcanos com radical metil em uma posição interna (carbonos 5 a 15);
- 12, 14- e 13, 15-dimetil-alcanos com 26 a 29 carbonos;
- 3,x-dimetil-alcanos com números ímpares de carbonos, onde x = 7, 9 ou 11;
- 4,x-dimetil-alcanos com números pares de carbonos, onde x = 8, 10 ou 12;
- 3, 7, 11-trimetil-alcanos com 25 e 27 carbonos.

Os hidrocarbonetos mais abundantes encontrados por Nelson et al (1980) em *S. invicta* foram 3-, 5-, 7-, 9-, e 13-metil-heptacosano, 3,7-, 3,9-, 3,11-, 13,15-dimetil-heptacosano. A composição de hidrocarbonetos de *S. richteri* é muito mais simples do que a de *S. invicta*, tendo uma menor variedade de dimetil-alcanos, ausência de trimetil-alcanos, e uma predominância de compostos com 23, 25 e 27 carbonos.

d) Este trabalho

Utilizamos a técnica de cromatografia gasosa e espectro de massa (GC-MS) para investigar as diferenças entre as composições de hidrocarbonetos cuticulares e alcalóides piperidínicos entre *Solenopsis invicta* e *S. saevissima*, duas espécies difíceis de separar com base em caracteres morfológicos.

Exemplares coletados na Mata de Santa Genebra (Campinas, SP), área rural de Jundiaí (SP) e Serra do Japi (Jundiaí, SP) foram enviadas a James Trager (Missouri Botanical Garden, Gray Summit, Missouri), que os separou em *S. invicta* e *S. saevissima* respectivamente, apenas com base em caracteres morfológicos. A técnica de GC-MS foi utilizada para caracterizar a composição de hidrocarbonetos cuticulares e alcalóides piperidínicos das duas espécies. Os cromatogramas de 15 colônias de *S. invicta* e 9 colônias de *S. saevissima* (as mesmas colônias que forneceram os exemplares enviados a James Trager) foram analisados visualmente, atribuindo-se os mesmos códigos provisórios a picos com tempos de retenção similares, que provavelmente representavam a mesma substância em diferentes cromatogramas. Esta análise preliminar mostrava algumas diferenças razoavelmente óbvias entre as composições de hidrocarbonetos e alcalóides das duas espécies (Figs. 1 e 2).

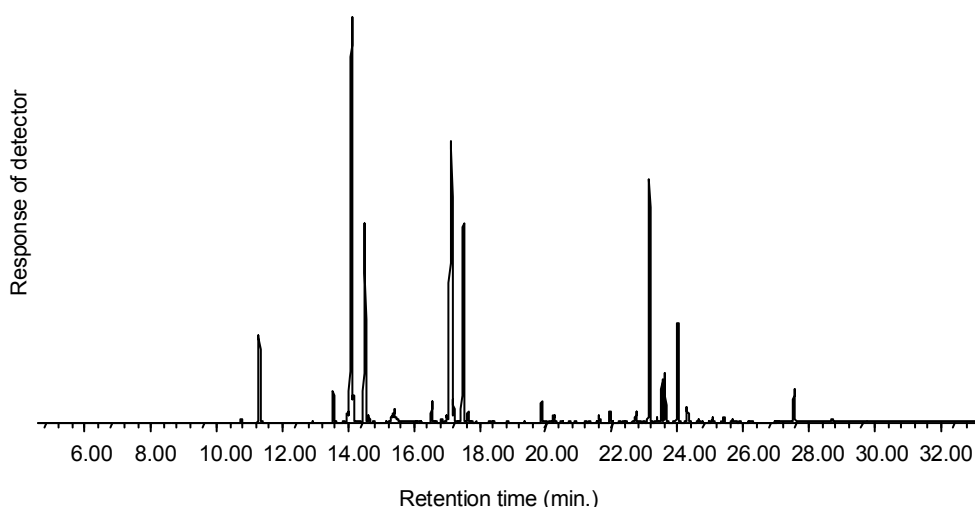


Fig.1. Cromatograma de *Solenopsis invicta*.

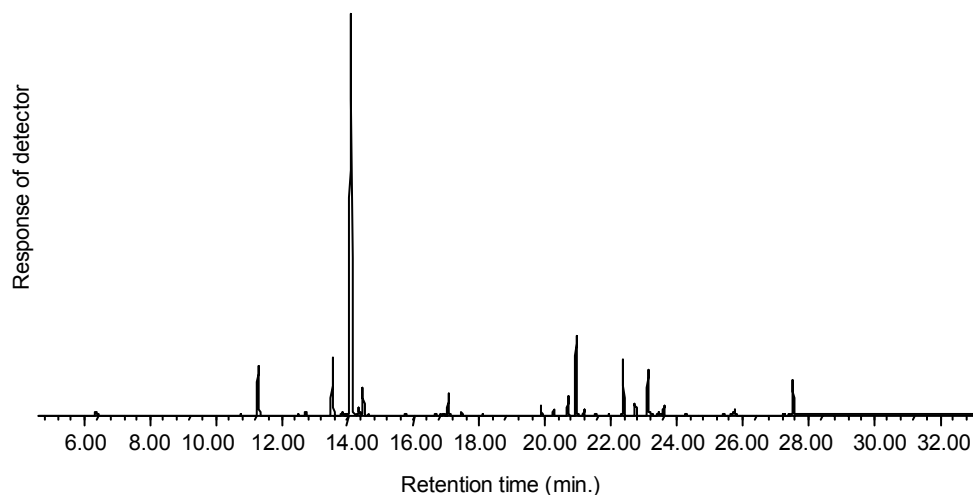


Fig. 2. Cromatograma de *Solenopsis saevissima*.

Em discussões com D.P. Wojcik, S. Porter e R. Vander Meer, foi sugerido que se procurasse um caráter morfológico que permitisse distinguir entre as duas espécies, de modo a confirmar ou não eventuais critérios de separação baseados em análises químicas. Com esse fim, alguns indivíduos das duas espécies, pertencentes às amostras mencionadas no parágrafo anterior, foram fotografadas de vários ângulos em um microscópio eletrônico de varredura. Examinando cuidadosamente estas fotografias, percebeu-se que o dente clipeal mediano (presente em *S. invicta* e ausente em *S. saevissima*) parecia distinguir eficientemente entre as duas espécies nas amostras mencionadas no parágrafo anterior. Este dente havia sido citado por Trager (1991) como um caráter presente em *S. invicta*. Em uma visita ao Museu de Zoologia da USP, foi verificado que o holótipo de *S. invicta*, coletado em Cuiabá, e 21 parátipos de *S. invicta*, apresentavam um dente clipeal mediano bem desenvolvido, enquanto que 120 indivíduos identificados na coleção do museu como *S. saevissima*, coletados em diversas localidades do Brasil, não possuíam o dente.

A fim de obter dados com maior representatividade geográfica, amostras de 44 colônias de *Solenopsis* foram coletadas de outras 6 localidades do estado de São Paulo.

Foram coletadas cerca de 30 operárias maiores de cada colônia para análise morfológica e outras 30 operárias para análise por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. A análise morfológica mostrou que as colônias de cada uma das 6 localidades podem ser atribuídas a uma das duas espécies com base na presença ou ausência do dente clipeal mediano. Os cromatogramas destas novas amostras foram analisados visualmente como descrito anteriormente, produzindo identificações de grande parte dos picos presentes em termos de códigos provisórios. A seguir, uma amostra de cada localidade foi re-injetada no cromatógrafo juntamente com n-alcanos padrões, com cadeias de 18 a 28 carbonos, que servem como marcadores. Isto permitiu calcular o índice de retenção de cada pico em cada um dos 68 cromatogramas incluídos neste estudo, e em seguida confirmar as atribuições de códigos de identificação provisórios aos vários picos e atribuir novos códigos provisórios a picos que não tinham sido previamente reconhecidos. Finalmente, os códigos provisórios dos vários picos detectados foram tentativamente associados a substâncias conhecidas através da comparação de seus índices de retenção e espectros de massa com valores publicados.

Para cada amostra, a abundância relativa de todos os hidrocarbonetos cuticulares e alcalóides piperidínicos foram separadamente normalizados para 100%. As abundâncias relativas normalizadas foram transformadas através da função arco-seno e submetidas a uma análise de componentes principais para hidrocarbonetos e outra para alcalóides, na tentativa de identificar o cluster de amostras com composição química similar. Uma análise de função discriminante das abundâncias relativas normalizadas de hidrocarbonetos e alcalóides foi usada para determinar critérios quantitativos para distinguir entre *S. invicta* e *S. saevissima*.

A análise de componentes principais da composição de hidrocarbonetos separou as 68 amostras incluídas neste estudo em três grupos claramente definidos:

1. um grupo incluindo 5 localidades onde as amostras foram morfologicamente identificadas como *S. invicta* com base na presença do dente clipeal mediano;
2. um grupo incluindo as 3 localidades onde as amostras foram morfologicamente identificadas como *S. saevissima* com base na ausência do dente clipeal mediano;
3. um grupo incluindo as amostras coletadas em São José do Rio Preto, que foram morfologicamente identificadas como *S. invicta*, com base na presença do dente clipeal mediano.

As principais diferenças em composição de hidrocarbonetos entre as amostras “típicas” de *S. invicta* e *S. saevissima* (grupos 1 e 2) foram:

- 3,7-DiMe C25 e 3,7-DiMe C27 têm abundâncias relativamente altas em *S. invicta*, mas estão ausentes em *S. saevissima*;
- 13,17-DiMe C27 é moderadamente abundante em *S. saevissima*, mas está ausente em *S. invicta*;
- 3-Me C25 e 11-Me C25 são muito mais abundantes em *S. saevissima* do que em *S. invicta*.

As amostras coletadas em São José do Rio Preto (grupo 3) diferem qualitativamente de todas as demais amostras incluídas neste estudo. As principais diferenças são:

- Os alcanos mais abundantes nas amostras do grupo 3 (C25, C27, C29, 11,19-DiMe C29) têm abundâncias muito baixas nas amostras de todas as outras localidades;
- 3-Me C27 e 13-Me C27 têm baixas abundâncias nas amostras do grupo 3, mas são relativamente abundantes nas amostras de todas as outras localidades.

Foram também notadas semelhanças em composição de hidrocarbonetos entre as amostras do grupo 3 e as amostras “típicas” de *S. invicta* (grupo 1), e entre as amostras do grupo 3 e as amostras “típicas” de *S. saevissima* (grupo 2).

A análise de componentes principais da composição de alcalóides separou as 68 amostras deste estudo nos mesmos três grupos mencionados acima, ainda que a separação seja um pouco menos nítida. As diferenças mais importantes entre as composições de alcalóides das amostras “típicas” de *S. invicta* e *S. saevissima* (grupos 1 e 2) foram:

- 2-metil-6-(cis-4'-n-tridecenil)-piperidina é mais abundante em *S. saevissima* do que em *S. invicta*;
- 2-metil-6-(6'-trans-n-pentadecenil)-piperidina, 2-metil-6-n-tridecil-piperidina e 2-metil-6-pentadecil-piperidina são muito mais abundantes em *S. invicta* do que em *S. saevissima*.

As amostras coletadas em São José do Rio Preto exibiram algumas semelhanças em composição de alcalóides com as amostras “típicas” de *S. invicta* (grupo 1), e com as amostras “típicas” de *S. saevissima* (grupo 2).

As abundâncias de hidrocarbonetos para 59 das 68 amostras incluídas neste estudo foram submetidas a uma análise de função discriminante (Legendre e Legendre, 1998), que produziu expressões para duas quantidades P e Q em função das abundâncias normalizadas dos vários hidrocarbonetos identificados nas várias amostras. Quando os valores de P e Q são calculados para as várias amostras e plotados em um gráfico, as amostras pertencentes aos três grupos discutidos acima são nitidamente separadas (as expressões para as funções P e Q são otimizadas pela análise de função discriminante de forma a maximizar a separação entre os grupos em um diagrama P vs. Q). Isto permite atribuir uma amostra qualquer (que se saiba pertencer a uma das duas espécies

consideradas aqui) a um dos três grupos, efetivamente identificando-a, com base nos valores de P e Q calculados para a amostra em questão. Um critério quantitativo deste tipo foi proposto para distinguir entre *S. invicta*, *S. saevissima* e a população de *Solenopsis* encontrada em São José do Rio Preto. Este critério foi aplicado às 9 amostras (uma de cada localidade) que foram excluídas da análise de função discriminante, e produziu a identificação correta em todos os casos. Uma análise similar foi realizada para as abundâncias de alcalóides, produzindo um segundo critério quantitativo, que também funcionou perfeitamente nas 9 amostras de teste, mas que deveria ser um pouco menos eficiente do que o critério baseado em alcalóide. Tomados em conjunto, estes dois critérios químicos e o critério da presença/ausência do dente clípeal mediano deveriam permitir uma identificação clara da grande maioria das amostras encontradas na prática.

Anexo

**CHEMICAL AND MORPHOLOGICAL TOOLS TO DISTINGUISH THE FIRE
ANT SPECIES *Solenopsis saevissima* AND *S. invicta***

Christiane Gonçalves Dall’Aglio-Holvorcem¹, Woodruff Whitman Benson², Larry E
Gilbert³, José Roberto Trigo^{2,*}

¹*Graduate Program in Ecology, Departamento de Zoologia, UNICAMP, Caixa Postal
6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil*

²*Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6109,
Campinas, SP 13083-970, Brazil*

³*Zoology Department and Brackenridge Field Laboratory, The University of Texas,
Austin TX, 78712, USA*

Running head: *Solenopsis* chemotaxonomy

*Corresponding author: Tel.: +55 19 37886321; fax: +55 19 337886306

E-mail address: trigo@unicamp.br (J.R. Trigo)

Abstract

We used gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) to investigate the differences in cuticular hydrocarbon and piperidine alkaloid composition between *Solenopsis invicta* and *S. saevissima*, two sympatric species which are very difficult to distinguish on the basis of morphological characters. Multivariate analyses of the GC-MS profiles of 68 fire ant samples from nine localities in southeast Brazil showed that the two species may be clearly distinguished by their alkane profiles (and, to a lesser extent, by their alkaloid profiles). We present mathematical criteria for distinguishing between the two fire ant species based on their alkane and alkaloid GC-MS profiles. The fire ant samples from one of the studied localities (São José do Rio Preto) have alkane and alkaloid profiles which significantly differ from all other *S. invicta* and *S. saevissima* samples included in this study, while exhibiting several features in common with either species; this population may constitute a hybrid of the two fire ant species. Examination of the *S. invicta* and *S. saevissima* worker samples collected for this study, and of museum samples from widely scattered localities, indicated that the presence or absence of a previously known character, the medial clypeal tooth, is a reliable morphological criterion for distinguishing between the two species; this criterion agreed with our chemical separation criteria for all samples included in this study.

Keywords: chemotaxonomy, clypeal tooth, cuticular hydrocarbons, Formicidae, methyl-branched alkanes, piperidine alkaloids, *Solenopsis*, venom.

1. Introduction

The genus *Solenopsis* has been under taxonomic revision since 1930, when Creighton divided it into several subgenera, synonymized by Ettershank in 1966 (see Vander Meer and Lofgren, 1990). Based on morphology, the genus *Solenopsis* was separated in several species complexes with *saevissima* being the largest one (Trager, 1991). In 1952, Wilson proposed that the *saevissima* complex would be formed by two species, *Solenopsis interrupta* and *S. saevissima*, and one subspecies, *S. saevissima* var. *richteri*. Buren (1972) recognized that *S. saevissima* and *S. interrupta* proposed by Wilson (1952) were valid species, validated two other species, *S. richteri* and *S. quinquecuspis*, and described two other new, *S. invicta* and *S. blumi*. Trager (1991) revised the subgenera and satellite genera of *Solenopsis*, based primarily on the major workers' morphology, and proposed that the *Solenopsis geminata* group be separated into four complexes of species (*virulens*, *tridens*, *geminata* and *saevissima*), including a total of 20 species. According to this revision Trager has listed 10 species belonging to these four complexes, which are native to South America, 7 of which belong to the *saevissima* complex and were listed for Brazil. The *saevissima* complex is characterized by polymorphic workers, minors with long scapes, weak sculpture and a small or absent ventral process on the petiolar pedicel (Trager, 1991).

The morphological distinctions between some *Solenopsis* species are extremely subtle, making it difficult even for the few existing taxonomic specialists to identify specimens collected in the field. The existence of hybrids which have the appearance of one of the two species which combine to produce it (Vander Meer et al., 1985) creates an additional complication for the identification of fire ants to

species. An important tool to overcome these difficulties is provided by the gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analysis of the piperidine alkaloids and cuticular hydrocarbons produced by fire ants (MacConnel et al, 1971; Vander Meer, 1988; Vander Meer and Lofgren, 1988). Most insect cuticular hydrocarbons belong to three major classes (n-alkanes, methyl-branched alkanes and alkenes), and their composition reflects the insect's genotype, which makes it a valuable taxonomic character (Carlson, 1988; Lockey, 1991; Kaib et al., 1991; Fröhlich et al, 2000). Vander Meer (1988) found evidence that hydrocarbon composition in *Solenopsis* is species-specific. In a detailed study of the hydrocarbon composition of *S. invicta* and *S. richteri*, Nelson et al. (1980) identified two new series of dimethylalkanes, with chain lengths ranging from 22 to 29, whose abundance patterns are markedly different in the two species. Different fire ant species also have characteristic piperidine alkaloid composition patterns (MacConell et al, 1976; Brand, 1973). In particular, chromatograms of *S. invicta* exhibit prominent peaks corresponding to 13- and 15-carbon piperidine alkaloids, while *S. richteri* exhibits peaks corresponding to 11- and 13-carbon piperidine alkaloids; hybrids of the two species have chromatograms with alkaloid patterns which are intermediate between those of *S. invicta* and *S. richteri* (Vander Meer et al., 1985). Despite the good discriminating ability of hydrocarbon and alkaloid composition, it is always advisable to also employ morphological characters in the identification of fire ants to species (Vander Meer and Lofgren, 1988).

S. invicta and *S. saevissima*, two sympatric species occurring on southeast Brazil, have extremely similar morphologies, which makes their identification a non-trivial problem, especially for the non-specialist. In a study of the reactions of these two species of ants to attacks by parasitoid phorid flies, Porter et al. (1995) used a GC-

MS analysis of cuticular hydrocarbons and venom alkaloids and Trager's (1991) key to identify 11 fire ant colonies as either *S. saevissima* or *S. invicta*. Interestingly, 4 of the 11 colonies used in that study could not definitely be assigned to either species on the basis of morphological evidence; three of them had chemical characteristics which were different from both *S. saevissima* and *S. invicta*. In the present study, we investigate in more detail the chemical (cuticular hydrocarbons and piperidine alkaloids) and morphological differences (presence/absence of the medial clypeal tooth) between these two species, including a much larger sample of specimens collected over an area of roughly 300 x 300 km in southeast Brazil.

2. Material and methods

2.1. Collection of fire ant samples in the field

Fire ant workers were collected from mounds in nine localities in southeast Brazil between 1998 and 2001 (see Table 1). Each mound was disturbed with a wood stick, and fire ant workers were allowed to crawl over the surface of a test tube placed on it; the workers were then transferred to a white plastic tray whose edges were coated with fluon to prevent the ants from escaping. In the fire ant collections made at Mata de Santa Genebra, Jundiaí, and Serra do Japi in 1998 and 1999, all workers collected in the tray were transferred to a glass container (with separate containers being used for each mound), and rapidly carried to the laboratory in Campinas, where they were killed by putting them on a freezer for a few hours. In the fire ant collections made in 2000 and 2001, most of which were at locations considerably farther from the laboratory, the ant collections followed a modified procedure: after transferring the workers to the plastic tray, the 30 largest workers

were selected and kept on a smaller glass container filled with 2 ml of dichloromethane. In order to verify that this change in collection methodology did not introduce any systematic biases in the results of the chemical analyses, we collected workers belonging to three *S. invicta* colonies from Mata de Santa Genebra in April 2000, using the two above described collection procedures at each colony. The resulting pairs of worker samples were analyzed by gas chromatography using the procedures described in the next subsection, with virtually indistinguishable results within each pair.

2.2. Morphological analyses

Five workers from each fire ant mound sampled in 1998 and 1999 were sent to James Trager (Missouri Botanical Garden, Gray Summit, Missouri), who identified them as either *S. saevissima* or *S. invicta*, as indicated in the first column of Table 1. Three *S. saevissima* workers from Serra do Japi and three *S. invicta* workers from Mata de Santa Genebra were examined with a scanning electron microscope (Fig. 1) in an attempt to detect previously described morphological differences between the two species. We confirmed that, as described in the literature, the medial clypeal tooth was well developed in *S. invicta* (Wojcik et al., 1976; Trager, 1991) and poorly developed in *S. saevissima* (Trager, 1991).

Further confirmation of the usefulness of the median clypeal tooth to distinguish between the two species was obtained by examining many specimens kept at the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brazil) with a stereo microscope. A well-developed median clypeal tooth was found in the *S. invicta* holotype and 13 paratypes, all from Cuiabá, Brazil, in 8 paratypes from Mobile, USA, and in tens of *S. invicta* workers from 30 widely scattered localities within

Brazil. In contrast, ten of *S. saevissima* specimens from six widely scattered localities within Brazil lacked a well-developed median clypeal tooth.

In view of these consistent results, we adopted the presence or absence of a well-developed median clypeal tooth as the basic morphological criterion for identifying the fire ant specimens collected in the present study. The probability of mistakenly identifying a third fire ant species as either *S. saevissima* or *S. invicta* seems to be very small, since these two species are the only fire ant species known to occur at our study sites in southeastern Brazil (Trager, 1991).

Thirty workers from each fire ant mound sampled in the present study were examined with a stereo microscope for the presence or absence of the median clypeal tooth. For all mounds, all examined workers either had a well-developed tooth, or lacked it. This provided the species identifications given in the first column of Table 1.

2.3. Chemical analyses

The fire ant samples were manually homogenated for 10 min on a test tube containing pure sea-sand and 2 ml of dichloromethane (residual pesticide grade, Carlo Erba[®]). Each test tube was centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes, and the resulting solution was filtered. The volume of each sample was then reduced to about 1 ml under a gentle stream of nitrogen prior to injection in the GC-MS. The resulting dichloromethanic extract was analyzed by Electron Impact on a Hewlett Packard-6890 GC system with a fused capillary column (30m x 0.25mm x 0.25µm, HP-5MS, Crossbond 5%-phenyl-95%-dimethylpolysiloxane) directly coupled to a selective mass detector Hewlett Packard 5973. Conditions of injection: injector temperature 275°C; oven temperature program 60°C-320°C, 2°C/min; split ratio 10:1;

carrier gas He: 1ml/min, constant flow; sample volume 1 μ l. For Positive Chemical Ionization analysis methane was used as ionization gas. Retention indices (RIs) were calculated according to van den Dool and Kratz (1963). The cuticular hydrocarbons and piperidine alkaloids were tentatively identified comparing the RIs and mass fragmentation patterns with literature values.

For each fire ant sample, the relative abundances of all cuticular hydrocarbons and piperidine alkaloids were separately normalized to 100%. The normalized abundances were arcsin-transformed and subject to a principal-component analysis (PCA; Legendre and Legendre, 1998), in an attempt to identify clusters of samples with similar chemical compositions. Two separate PCA analyses were performed, one for hydrocarbons and one for alkaloids. Discriminant function analysis (DFA; Legendre and Legendre, 1998) of the normalized relative abundances of hydrocarbons and alkaloids was then used to determine mathematical criteria to distinguish between *S. invicta* and *S. saevissima*.

3. Results

3.1 Alkane Composition

Twenty-two tentatively identified C25 to C31 alkanes, with zero to three branched methyl radicals, could be identified in the 68 samples collected in this study (Table 2). The most prominent alkanes in the fire ant samples from localities AS, BT, JDi, MA, and SG (morphologically identified as *S. invicta*) were C25, 3,7-DiMe C25, C27, 13-Me C27, 3-Me C27, and 3,7-DiMe C27. Ten of the methyl-branched alkanes found by Nelson et al. (1980) in *S. invicta* were also found in our samples: 3-Me C25, 3,7-DiMe C25, 13-Me C27, 13,15-DiMe C27, 3-Me C27, 3,7-DiMe C27, 3,7,11-TriMe C27, 13,15-DiMe C28, 13,15-DiMe C29, and 3-Me C29. The

most prominent alkanes in the fire ant samples from localities JDs, IN, and CJ (morphologically identified as *S. saevissima*) were C25, 11-Me C25, 3-Me C25, C27, 13-Me C27, 13,17-DiMe C27, 3-Me C27, and 13,15-DiMe C29. The most obvious qualitative differences in hydrocarbon composition between the two species are (1) the absence of 3,7-DiMe C25 and 3,7-DiMe C27 in the *S. saevissima* samples and its high relative abundance (2-11% and 20-27%, respectively) in the *S. invicta* samples, (2) the absence of 13,17-DiMe C27 in the *S. invicta* samples and its moderate abundance (2-10%) in the *S. saevissima* samples, and (3) the much greater abundance of 11-Me C25 and 3-Me C25 in *S. saevissima* when compared to *S. invicta*.

The alkane profiles of fire ants from locality RP (morphologically identified as *S. invicta*) exhibited several important qualitative differences with respect to the profiles from all other localities, and also some interesting similarities. The most abundant alkanes found in the RP samples (C25, C27, C29, and 11,19-DiMe C29) had much lower abundances in the samples from all other localities. The abundance of 13-Me C27 in the RP samples (about 5%) was much lower than in all other samples (where its abundance was 20-40%); analogously, the abundance of 3-Me C27 in RP samples (about 2%) was much lower than in all other samples (where its abundance was 6-17%). C31 was moderately abundant (4%) in the RP samples, and absent in all other samples. The common features between the RP samples and the *S. invicta* samples (AS, BT, JDi, MA, SG) were the low abundance of 11-Me C25 and 3-Me C25, and the absence or very low abundance of 13,17-DiMe C27 and 13,19-DiMe C29. The common features between the RP samples and the *S. saevissima* samples (JDs, CJ, IN) were the absences of 3,7-DiMe C25, and 3,7-DiMe C27.

In the output of the PCA (Fig. 1), the samples appear clearly grouped in three clusters which correspond to the above three groups of localities: a cluster containing the samples from AS, BT, JDi, MA, SG, which were all morphologically classified as *S. invicta*; we will refer to this cluster as “I”; a cluster containing the samples from CJ, IN, JDs, which were all morphologically classified as *S. saevissima*; we will refer to this cluster as “S”; and a cluster containing the samples from RP, which were morphologically classified as *S. invicta*; we will refer to this cluster as “RP”.

3.2 Alkaloid Composition

Eighteen alkaloids could be identified in the 68 samples collected in this study (Table 3). The most prominent alkaloids from localities AS, BT, JDi, MA, and SG (morphologically identified as *S. invicta*) were 2-methyl-6-(*trans*-4'-n-tridecenyl)-piperidine (RI 2052; 36-57%), 2-methyl-6-n-tridecyl-piperidine (RI 2083; 9-12%), 2-methyl-6-(6'-*trans*-n-pentadecenyl)-piperidine (RI 2266; 19-24%), and 2-methyl-6-pentadecyl-piperidine (RI 2298; 7-12%). The most prominent alkaloids from localities JDs, IN, and CJ (morphologically identified as *S. saevissima*) were 2-methyl-6-(*cis*-4'-n-tridecenyl)-piperidine (RI 2009; 12-29%) and 2-methyl-6-(*trans*-4'-n-tridecenyl)-piperidine (RI 2052; 25-73%). The samples from IN also had large abundances (about 24%) of 2-methyl-6-n-*cis*-undecyl-piperidine (RI 1838) and 2-methyl-6-*trans*-n-undecyl-piperidine (RI 1869). All other alkaloids detected in the JDs, IN, and CJ samples had abundances lower than 4%. The most obvious qualitative differences in alkaloid composition between the two species are (1) the greater abundance of 2-methyl-6-(*cis*-4'-n-tridecenyl)-piperidine (RI 2009; 12-29%) in *S. saevissima* when compared to *S. invicta* (0.5-7%), and (2) the greater

abundance of 2-methyl-6-(6'-*trans*-n-pentadecenyl)-piperidine (RI 2266), 2-methyl-6-n-tridecyl-piperidine (RI 2083), and 2-methyl-6-pentadecyl-piperidine (RI 2298) in *S. invicta* (19-24%, 9-12%, 7-12%, respectively) when compared to *S. saevissima* (1-4%, 2-4%, 0.1-0.4%, respectively).

The alkaloid profiles of fire ant samples from locality RP (morphologically identified as *S. invicta*) exhibited some features in common with the profiles of samples from other localities. The abundance of 2-methyl-6-(*cis*-4'-n-tridecenyl)-piperidine (RI 1869) is low (about 1%), as in the *S. invicta* samples from AS, BT, JDi, MA, and SG. The abundances of 2-methyl-6-n-tridecyl-piperidine (RI 2083), 2-methyl-6-(6'-*trans*-n-pentadecenyl)-piperidine (RI 2266), and 2-methyl-6-pentadecyl-piperidine (RI 2298) are low (about 4%, 3%, and 0.4%, respectively) as in the *S. saevissima* samples from JDs, IN, and CJ. The abundance of 2-methyl-6-(8'-n-hexadecenyl)-piperidine (RI 2458) was much higher (about 6%) than in all other *S. invicta* and *S. saevissima* samples. The output of the PCA for alkaloid composition provided a less sharp distinction between *S. saevissima* and *S. invicta* (Fig. 3).

3.3 Chemical Separation Criteria

In order to determine a quantitative separation criterion between the two species, we have applied DFA to the alkane profiles of 59 of the 68 fire ant samples included in this study (one sample from each locality was excluded from the DFA so that it could be used to test the separation criterion). The results of the alkane DFA (Fig. 4) provide a sharp separation between the I, S, and RP clusters in a plot with coordinates (the so-called canonical scores) P and Q defined by

$$P = \sum_{i=1}^{22} p_i x_i, \quad Q = \sum_{i=1}^{22} q_i x_i \quad (1)$$

where x_i is the abundance of the i th alkane listed in Table 2 (normalized to 100%) and the coefficients p_i and q_i are given in the last two columns of Table 2. We propose to use the equal-frequency ellipses (Sokal and Rohlf, 1995) shown in Fig. 4 as approximate boundaries of the regions of the (P, Q) plane which correspond to the I, S, and RP clusters. To identify a fire ant sample whose alkane profile has been determined by GC-MS, one could follow this procedure:

1. Normalize the abundances x_i of the 22 alkanes listed in Table 2 so that their sum is 100%;
2. Compute P and Q using (1);
3. For each of the three clusters I, S, and RP, compute a quantity

$$V = A(P - P_c)^2 + B(P - P_c)(Q - Q_c) + C(Q - Q_c)^2, \quad (2)$$

where the values of A , B , C , P_c , and Q_c are given in Table 4. Here P_c and Q_c are the coordinates of the cluster's centroid in the (P, Q) plane and the cluster's bounding ellipse is defined by the condition $V = 1$.

4. If the V value computed for one of the clusters is less than 1, the point of the (P, Q) plane corresponding to the sample in question lies inside that cluster's bounding ellipse, and the sample is considered to belong to that cluster. If all three computed V values are greater than or equal to 1, the criterion is inconclusive. Note that the boundary of cluster RP is poorly known, because of the small number of samples collected at RP.

The preceding criterion was applied to the 9 samples (one from each locality) which were excluded from the DFA, and produced the correct identification in all cases.

An analogous DFA was carried out for the alkaloid profiles of our fire ant samples, providing a reasonably good separation between the two species (Fig. 5). The canonical scores R and S for this analysis are defined by

$$R = \sum_{i=1}^{18} r_i y_i, \quad S = \sum_{i=1}^{18} s_i y_i \quad (3)$$

where y_i is the abundance of the i th alkaloid listed in Table 3 (normalized to 100%) and the coefficients r_i and s_i are given in the last two columns of Table 3. Using the ellipses shown in Fig. 5 as approximations to the cluster's boundaries, we propose the following identification criterion for a sample whose alkaloid profile has been determined by GC-MS:

1. Normalize the abundances y_i of the 18 alkaloids listed in Table 3 so that their sum is 100%;
2. Compute R and S using (3);
3. For each of the three clusters I, S, and RP, compute a quantity

$$W = D(R - R_c)^2 + E(R - R_c)(S - S_c) + F(S - S_c)^2, \quad (4)$$

where the values of D , E , F , R_c , and S_c are given in Table 5.

4. If the W value computed for one of the clusters is less than 1, the point of the (R, S) plane corresponding to the sample in question lies inside that cluster's

bounding ellipse, and the sample is considered to belong to that cluster. If all three computed W values are greater than or equal to 1, the criterion is inconclusive.

The preceding criterion was applied to the 9 samples (one from each locality) which were excluded from the DFA, and produced the correct identification in all cases. It should be noted that the above alkaloid-based separation criterion is less sharp than the alkane-based criterion presented earlier. In particular, since the ellipses for the I and S clusters (Fig. 5) have small intersection areas, the alkaloid-based criterion will fail to identify a sample whose R and S values correspond to a point inside those areas. Despite these limitations, the alkaloid-based criterion should provide definite identifications for most *S. invicta* and *S. saevissima* samples, serving as a useful complement to the alkane-based criterion.

4. Discussion

The alkane composition, the alkaloid composition, and the medial clypeal tooth provided three independent, well-defined separation criteria for *S. invicta* and *S. saevissima* across the geographical region sampled in this study. These criteria agreed between themselves and with the identifications made by a recognized specialist in these species, for all but one of the studied localities: RP. For this locality, the morphological criterion classifies the samples as belonging to *S. invicta*, while the chemical criteria indicate that the samples are clearly different from all other *S. invicta* and *S. saevissima* samples included in this study. At present we cannot provide a definite explanation for this anomalous composition of the fire ants from RP. One interesting possibility is that these ants are a hybrid between *S.*

invicta and *S. saevissima*. Some evidence in favor of this hypothesis is found in the several common low abundances and absences of hydrocarbons and alkaloids which appear both in the RP samples and in the *S. invicta* samples from AS, BT, JDi, MA, and SG, but not in the *S. saevissima* samples from JDs, IN, and CJ, and vice-versa. On the other hand, the hydrocarbon composition of the RP samples exhibits several very distinctive features which are not found in any of the other samples considered in this study. The chemical composition and morphology of fire ants in the region around RP certainly deserve further study.

Acknowledgments

The authors would like to thank C.R. Brandão (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) for his permission to examine museum samples of *Solenopsis*, A.H.A.Portugal for assistance and helpful discussions, K. Mancini for her help in preparing the ants samples for scanning microscopy and P.R. Holvorcem for his assistance with the discriminant function analyses. C.G.D.H. has a doctoral fellowship from CAPES, J.R.T. has been supported by CNPq and FAPESP and the identification of the ants was funded by a grant from The Foundren Foundation, Ewing Halsell Foundation and Houston Livestock Show and Rodeo to L.E.G.

References

- Brand, J.M., M.S. Blum, H.M. Fales and J.G. MacConnell, 1972. Fire ant venoms: comparative analyses of alkaloidal components. *Toxicon* **10**:259–271.
- Brand, J.M., M.S. Blum and M.R. Barlin, 1973. Fire ant venoms: intraspecific and interespecific variation among castes and individuals. *Toxicon* **11**:325–331.

- Buren, W.F. 1972. Revisionary studies on the taxonomy of the imported fire ants. *J. Georgia Entomol. Soc.*, **3**(3):91-121.
- Carlson, D.A. 1988. Hydrocarbons for identification and phonetic comparisons: cockroaches, honey bees and tsetse flies. *Fla. Entomologist* **71**(3):333-345.
- Fröhlich, B., J. Tautza & M. Riederer, 2000. Chemometric classification of comb and cuticular waxes of the honeybee *Apis mellifera carnica*. *J. Chem. Ecol.* **26**(1):123-137.
- Kaib, M., R. Brandl & R.K.N. Bagine, 1991. Cuticular hydrocarbon profiles: a valuable tool in termite taxonomy. *Naturwissenschaften* **78**:176-179.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. Numerical ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Lockey, K.H., 1991. Insect hydrocarbon classes: implications for chemotaxonomy. *Insect Biochem.* **21**:91-97.
- MacConnell, J.G., M.S. Blum and H.M. Fales, 1971. The chemistry of fire ant venom. *Tetrahedron* **26**:1129-1139.
- MacConnell, J.G., M.S. Blum, W.F. Buren, R.N. Williams and H.M. Fales, 1976. Fire ant venoms: chemotaxonomic correlations with alkaloidal compositions. *Toxicon* **14**:69-78.
- Nelson, D.R., C.L. Fatland, R.W. Howard, C.A. McDaniel & G.J. Blomquist. 1980. Re-analysis of the cuticular methylalkanes of *Solenopsis invicta* and *S. richteri*. *Insect Biochem.* **10**:409-418.
- Porter, S.D., R.K. Vander Meer, M.A. Pesquero, S. Campiolo & H.G. Fowler. 1995. *Solenopsis* (Hymenoptera: Formicidae) fire ant reactions to attacks of *Pseudacteon* flies (Diptera: Phoridae) in Southeastern Brazil. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **88**(4):570-575.

- Sokal, R.R., and F.J. Rohlf, 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W.H. Freeman, New York. 887 p.
- Trager, J.C., 1991. A revision of the fire ants, *Solenopsis geminata* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). *J. N. Y. Entomol. Soc.* **99**:141–198.
- van den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **11**, 463-471.
- Vander Meer, R.K., 1986. Chemical taxonomy as a tool for separating *Solenopsis* spp. In: *Fire Ants and Leaf Cutting ants: Biology and Management*. (Lofgren C.S. and R.K. Vander Meer, Eds.), Westview Press, Boulder, Colorado. pp. 316-326.
- Vander Meer, R.K. 1988. Behavioral and biochemical variation in the fire ant, *Solenopsis invicta*. In: J.R. Jeanne (Ed). *Interindividual behavioral variability in social insects*. Westview Press, Boulder, Co. pp: 223-255.
- Vander Meer, R.K. and C. S. Lofgren, 1988. Use chemical characters in defining populations of fire ants, *Solenopsis saevissima* complex, (Hymenoptera: Formicidae). *Fla. Entomologist* **71**:323–332.
- Vander Meer, R.K., C.S. Lofgren & F.M. Alvares.1985. Biochemical evidence for hybridization in fire ants. *Fla. Entomologist*. **68**(3):501-506.
- Vander Meer, R.K., D. Saliwanchik and B. Lavine, 1989. Temporal changes in colony cuticular hydrocarbon patterns of *Solenopsis invicta*: implications for nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.* **15**:2115–2125.
- Vander Meer, R.K. and C.S. Lofgren, 1990. Chemotaxonomy applied to fire ant systematics in the United States and South America. In: *Applied Myrmecology –*

A World Perspective (Vander Meer, R.K., K. Jaffe & A. Cedenio, Eds.)

Westview Press, Boulder, Colorado. pp. 75–84.

Wilson, E.O., 1952. O complexo *Solenopsis saevissima* na América do Sul

(Hymenoptera: Formicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **50**:49-68.

Wojcik, D.P., W.F. Buren, E.E. Grissell, and T. Carlyle, 1976. The fire ants

(*Solenopsis*) of Florida (Hymenoptera: Formicidae). *Entomol. Circ.* No. 173.

Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

TABLES

Table 1. Fire ant collection sites, numbers of sampled mounds, and collection dates. The first column lists the morphologically determined fire ant species collected at each site.

Species	Collection site at São Paulo state	Acronym	Position	Number of mounds	Collection date
<i>S. invicta</i>	Mata de Santa Genebra, Campinas	SG	22°49' S, 46°06' W	8	Jan. 27, 1998
<i>S. invicta</i>	Rural area, Jundiáí	JDi	23°17' S, 47°00' W	7	Jan. 27, 1998
<i>S. saevissima</i>	Serra do Japi, Jundiáí	JDs	23°16' S, 47°00' W	9	Jan. 31, 2000
<i>S. invicta</i>	Instituto Agronômico de Assis, Assis	AS	22°37' S, 50°22' W	9	Aug. 11, 2000
<i>S. invicta</i>	Companhia Agrícola Brejo das Almas, Botucatu	BT	22°35' S, 48°09' W	10	July 30, 2000
<i>S. invicta</i>	Fazenda Experimental/UNIMAR, Marília	MA	22°14' S, 49°58' W	5	Aug. 11, 2000
<i>S. invicta</i>	Bosque-Zoológico Municipal, São José do Rio Preto	RP	20°46' S, 49°21' W	6	Aug. 10, 2000
<i>S. saevissima</i>	Parque Estadual Intervales, Capão Bonito	IN	24°16' S, 48°25' W	8	Dec. 16, 2000
<i>S. saevissima</i>	Parque Pedra do Baú, Campos do Jordão	CJ	22°40' S, 45°38' W	6	Jan. 14, 2001

Table 2. Hydrocarbon composition (mean percent and standard deviation) of the fire ant samples analyzed in this study. The first column gives the linear retention index for each compound. Locality acronyms are defined in Table 1. The last two columns give the coefficients of each hydrocarbon in the linear expressions for the scores P and Q defined by (1) and (2).

RI	Compound	CJ	IN	JDs	AS	BT	JDi	MA	RP	SG	p_i	q_i
2500	C25	9.1±1.2	16.4±1.9	7.8±0.6	5.8±1.4	6.7±0.7	2.4±0.3	3.5±0.2	42.4±2.0	1.7±0.4	0.029	0.011
2536	11-Me C25	14.6±1.1	13.7±0.8	14.7±1.0	1.6±0.6	0.8±0.4	0.5±0.1	0.9±0.2	0.1±0.1	-	0.330	-0.639
2573	3-Me C25	9.8±0.8	17.7±1.3	8.2±0.8	2.5±0.9	0.7±0.3	0.3±0.1	1.5±0.2	2.6±1.3	-	0.408	0.197
2600	C26	1.2±0.6	3.0±0.6	2.4±0.4	0.7±0.3	0.5±0.3	0.4±0.3	-	2.3±0.5	-	0.263	-0.081
2608	3,7-DiMe C25 + unknown	-	-	-	7.5±1.0	6.0±0.8	2.0±0.5	11.0±1.7	-	1.8±0.1	0.193	0.466
2634	14-Me C26	1.5±0.5	3.1±0.5	1.6±0.3	4.2±0.4	3.3±0.7	1.5±0.1	-	-	2.0±0.2	0.412	-0.239
2637	unknown	-	-	-	0.4±0.4	0.8±0.6	1.1±0.2	6.1±0.4	0.1±0.1	0.4±0.2	0.483	-0.162
2700	C27	7.8±1.9	10.5±1.7	13.7±2.2	9.9±0.4	13.3±1.4	8.5±3.8	7.5±0.8	17.9±1.0	3.7±0.5	0.323	-0.036
2733	13-Me C27	33.7±2.3	22.6±2.1	31.9±1.3	23.0±0.7	20.9±1.1	33.2±2.4	23.9±0.4	4.6±0.4	38.1±1.3	0.232	0.059
2757	13,17-DiMe C27	6.9±0.4	3.7±0.9	4.8±0.9	-	-	-	-	-	-	0.154	-0.355
2764	13,15-DiMe C27	-	-	0.9±0.3	2.2±0.1	1.2±0.5	5.1±1.2	1.9±0.2	2.0±0.9	10.2±1.2	0.312	0.175
2774	3-Me C27	8.7±0.7	6.4±0.4	10.6±0.4	14.8±0.5	16.9±1.1	15.2±1.1	12.2±0.6	2.0±0.7	12.5±0.5	0.456	0.363
2808	3,7-DiMe C27 + unknown	-	-	-	22.2±2.8	22.4±1.9	20.8±2.9	26.7±0.7	-	22.8±0.9	0.295	-0.032

RI	Compound	CJ	IN	JDs	AS	BT	JD _i	MA	RP	SG	p _i	q _i
2833	3,7,11-TriMe C27	-	0.8±0.3	0.5±0.2	2.6±0.1	1.9±0.4	3.1±0.7	3.4±0.2	0.4±0.3	2.8±0.2	0.237	0.201
2862	13,15-DiMe C28	-	-	-	-	0.1±0.1	0.5±0.1	-	0.5±0.3	-	-0.199	-0.928
2900	C29	-	-	0.1±0.1	1.5±0.2	3.7±0.7	2.1±0.3	1.2±0.5	11.0±0.7	1.6±0.2	0.088	0.310
2932	13,15-DiMe C29	-	0.4±0.2	0.7±0.2	0.5±0.3	0.2±0.2	1.2±0.1	0.2±0.2	3.3±0.3	1.2±0.2	0.163	0.227
2960	11,19-DiMe C29	-	-	-	-	-	0.4±0.1	-	6.3±0.5	-	-2.064	-0.262
2965	13,19-DiMe C29	6.7±0.5	1.7±0.6	2.3±0.5	0.7±0.7	0.4±0.4	0.4±0.1	-	-	0.5±0.3	0.283	0.397
2976	3-Me C29	-	-	-	0.1±0.1	0.1±0.1	1.0±0.1	-	-	0.4±0.1	0.177	0.956
3000	C30	-	-	-	-	-	0.4±0.2	-	0.1±0.1	0.1±0.1	2.886	0.163
3100	C31	-	-	-	-	-	-	-	4.4±0.4	-	-0.099	0.562

Table 3. Alkaloid composition (mean percent and standard deviation) of the fire ant samples analyzed in this study. The first column gives the linear retention index for each compound. Locality acronyms are defined in Table 1. The last two columns give the coefficients of each alkaloid in the linear expressions for the scores R and S defined by (4) and (5).

RI	Compound	CJ	IN	JDs	AS	BT	JDi	MA	RP	SG	r_i	s_i
1838	2-methyl-6-n-cis-undecylpiperidine	1.9±0.4	23.4±2.6	0.6±0.2	<0.1	0.1±0.1	-	-	-	-	0.283	0.520
1869	2-methyl-6-trans-n-undecylpiperidine	2.9±0.3	23.7±3.0	3.0±0.2	2.0±0.3	2.3±0.7	2.2±0.4	0.9±0.2	2.2±0.3	2.7±0.5	0.313	0.467
2009	2-methyl-6-(cis-4'-n-tridecenyl)piperidine	28.7±4.3	19.73±3.14	12.9±3.8	4.45±1.34	6.7±2.8	1.42±0.79	6.9±3.9	1.3±0.1	0.7±0.2	0.315	0.449
2049	2-methyl-6-x-delta-1,2-piperidine	1.4±0.5	0.95±0.28	-	-	-	-	-	-	-	0.402	0.491
2052	2-methyl-6-(trans-4'-n-tridecenyl)piperidine	52.6±5.5	25.54±2.79	73.2±3.7	48.0±4.7	36.5±3.7	56.37±3.77	53.3±4.8	81.5±1.6	56.7±4.8	0.338	0.530
2083	2-methyl-6-n-tridecylpiperidine	3.6±0.4	2.30±0.23	4.0±0.2	9.5±0.9	11.6±1.1	9.89±0.80	9.0±1.6	3.8±0.2	9.5±0.8	0.108	0.506
2086	2-methyl-6-(6'-cis-n-pentadecenyl)piperidine	-	0.05±0.03	-	0.5±0.1	0.2±0.1	0.26±0.10	0.5±0.1	0.7±0.1	0.4±0.1	2.458	3.205
2159	2-methyl-6-tridecyl- δ -1,2-piperidine	<0.1	0.05±0.03	<0.1	-	-	-	-	-	-	0.000	0.000
2221	2-methyl-6-(6'-cis-n-pentadecenyl)piperidine	1.5±0.6	0.68±0.26	0.4±0.2	1.4±0.4	3.3±1.1	0.17±0.11	0.8±0.4	-	0.2±0.1	0.319	0.761
2231	2-methyl-6-x-delta-1,6-piperidine	1.7±0.4	0.25±0.14	0.4±0.4	-	-	-	-	-	-	-0.247	0.113
2248	2-methyl-6-n-cis-pentadecyl-piperidine	0.6±0.2	0.16±0.07	0.3±0.2	-	-	-	-	-	-	1.828	-0.103
	2-methyl-6-cis-pentadecylpiperidine	-	-	-	-	0.4±0.3	-	-	-	-	0.102	0.941
2266	2-methyl-6-(6'-trans-n-	3.5±0.5	0.93±0.22	3.8±0.4	22.6±2.7	24.4±1.9	20.96±2.01	19.2±3.4	3.3±0.2	20.7±1.8	-0.179	0.609

RI	Compound	CJ	IN	JDs	AS	BT	JD _i	MA	RP	SG	r _i	s _i
	pentadecenyl)piperidine											
2298	2-methyl-6-pentadecylpiperidine	0.4±0.1	0.11±0.06	0.2±0.1	9.0±1.3	11.5±1.6	7.87±1.35	7.4±2.3	0.4±0.2	8.3±1.3	0.924	0.434
2303	2-methyl-6-(4',6'-n-pentadidecenyl)piperidine	-	0.05±0.05	-	1.4±0.2	1.4±0.3	0.30±0.11	1.2±0.3	0.9±0.3	0.3±0.1	-0.026	-0.112
2332	98, 108, 123 base, 136, 150, 319 massa	-	-	-	-	<0.1	-	-	-	-	0.000	0.000
2458	2-methyl-6-(8'-n-hexadecenyl)piperidine	1.4±0.2	2.13±0.25	1.2±0.1	1.0±0.2	1.6±0.5	0.57±0.21	0.8±0.3	5.9±1.1	0.6±0.2	0.962	1.273
2496	piperidina?	-	-	-	-	<0.1	-	-	-	-	0.000	0.000

Table 4. Parameters of the ellipses shown in Fig. 4.

Cluster	A	B	C	P_c	Q_c
I	0.10161	-0.02311	0.05241	28.790	9.673
S	0.03123	-0.00092	0.01862	27.654	-3.309
RP	0.00617	0.05683	0.21553	0.297	6.309

Table 5. Parameters of the ellipses shown in Fig. 5.

Cluster	D	E	F	R_c	S_c
I	0.06384	0.02140	0.09688	26.128	54.471
S	0.16283	0.08580	0.08376	31.626	51.724
RP	1.90401	-2.81702	1.10968	36.260	58.543

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Scanning electron microscope photograph of major workers of *S. invicta* (top) and *Solenopsis saevissima* (bottom). The arrow shows the median clypeal tooth (MCT), which is present in *S. invicta* but not in *S. saevissima*.

Fig. 2. Principal component analysis of hydrocarbon composition for all fire ant samples included in this study. Each data point represents a different fire ant colony.

Fig. 3. Principal component analysis of alkaloid composition for all fire ant samples included in this study. Each data point represents a different fire ant colony.

Fig. 4. Discriminant function analysis of hydrocarbon composition for 59 of the 68 fire ant samples included in this study. P and Q are the scores defined by (1) and (2). Samples belonging to the I (morphologically *S. invicta*), S (morphologically *S. saevissima*), and RP (morphologically *S. invicta*) clusters are represented by solid circles, open circles, and open squares, respectively. The 99.99% equal-frequency ellipses are shown around the I and S clusters. The ellipse around the RP cluster has the same shape and orientation as an equal-frequency ellipse around that cluster, but its size has been manually adjusted in an attempt to provide a rough idea of the region of the (P,Q) plane corresponding to the RP cluster. The true size, shape, and orientation of that region is poorly known due to the small number of fire ant colonies sampled at site RP.

Fig. 5. Discriminant function analysis of alkaloid composition for 58 of the 68 fire ant samples included in this study. R and S are the scores defined by (4) and (5). Samples belonging to the I (morphologically *S. invicta*), S (morphologically *S. saevissima*), and RP (morphologically *S. invicta*) clusters are represented by solid circles, open circles, and open squares, respectively. The 99.5% equal-frequency ellipses are shown around the I and S clusters. The ellipse around the RP cluster has the same shape and orientation as an equal-frequency ellipse around that cluster, but its size has been manually adjusted in an attempt to provide a rough idea of the region of the (R,S) plane corresponding to the RP cluster. The true size, shape, and orientation of that region is poorly known due to the small number of fire ant colonies sampled at site RP.

Fig. 1(a)

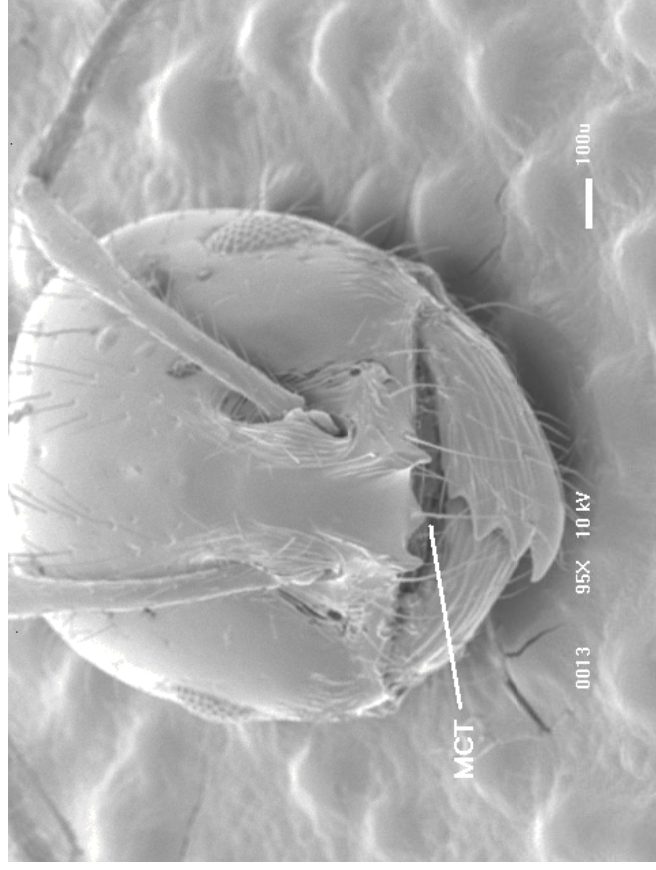
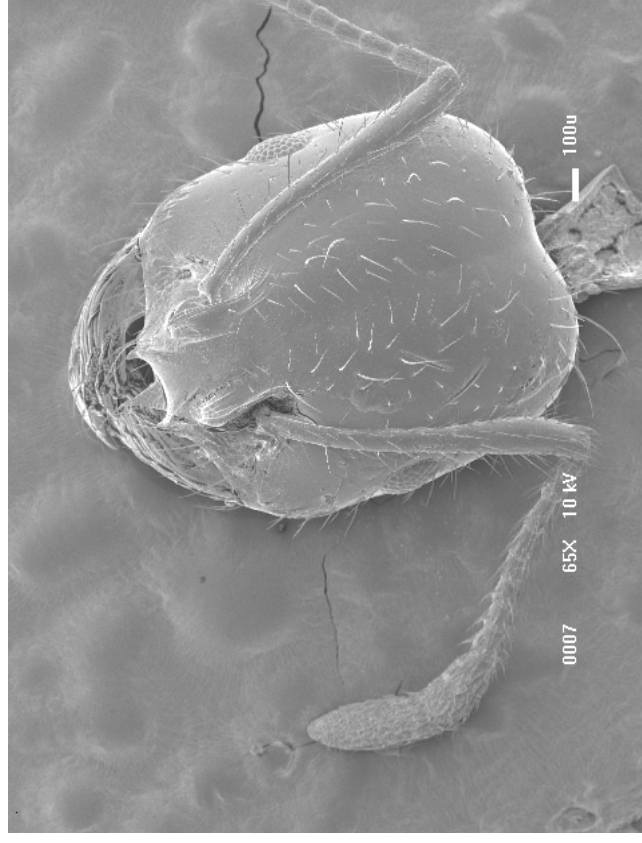


Fig. 1(b)



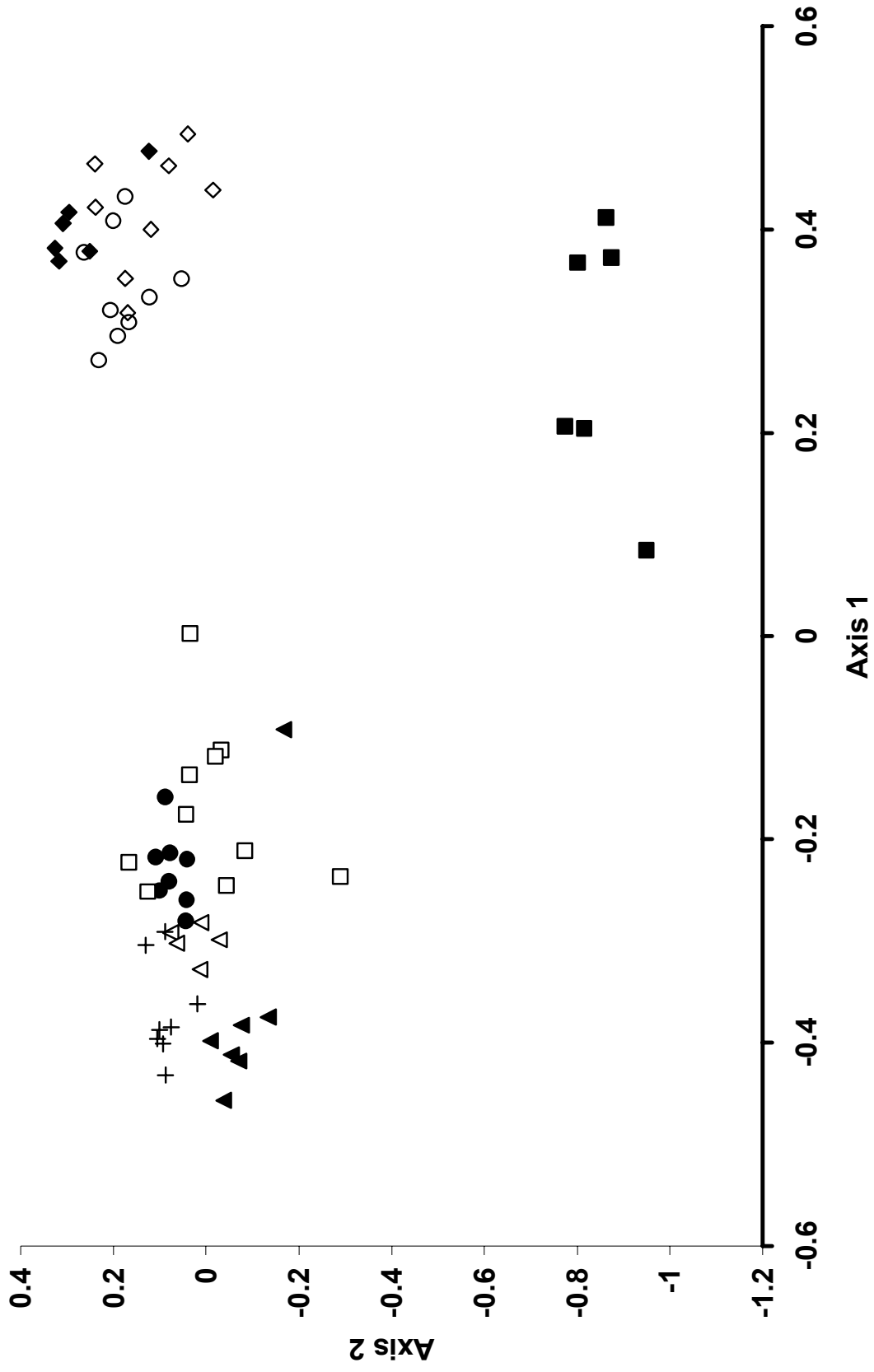


Fig. 2

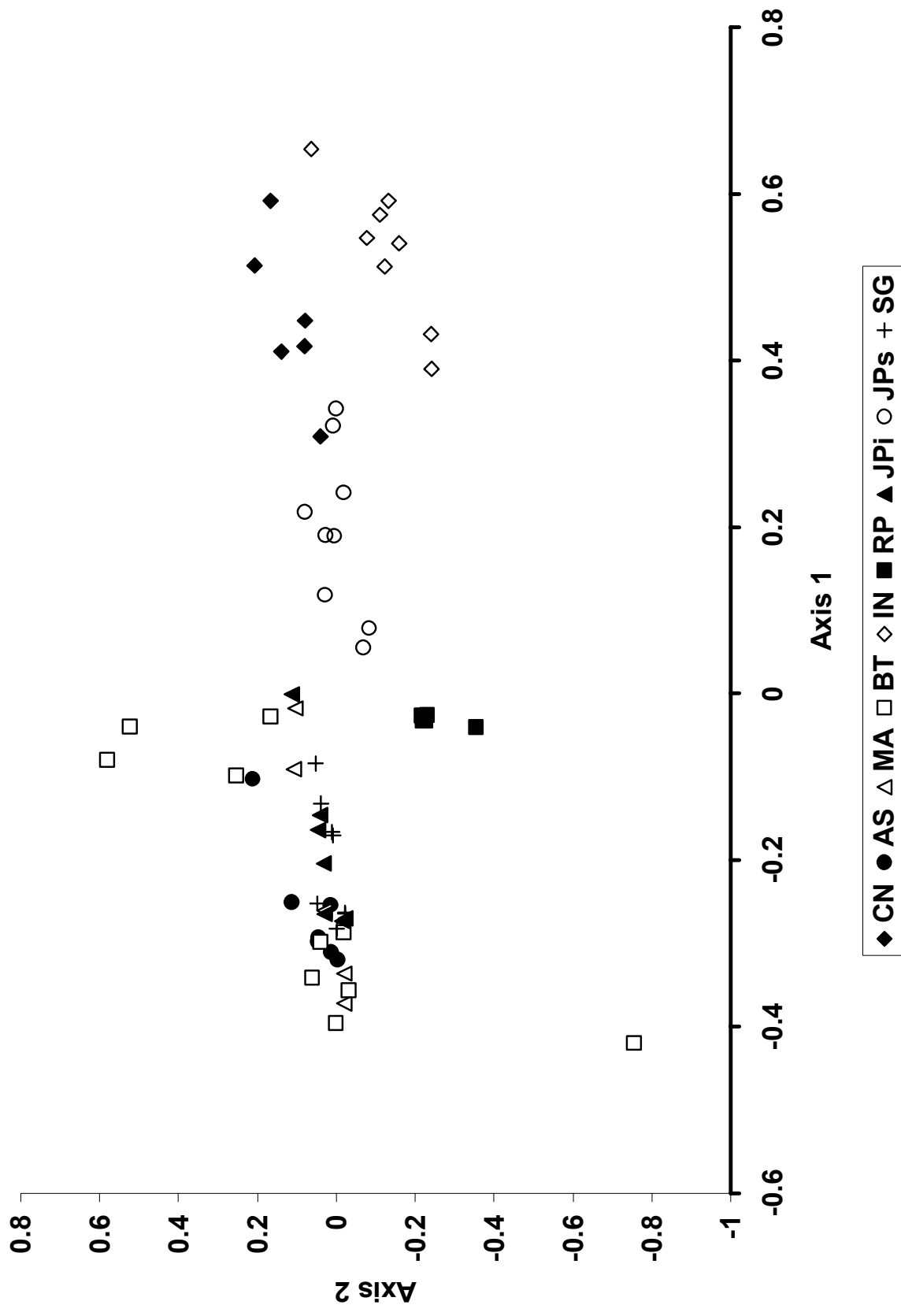


Fig. 3

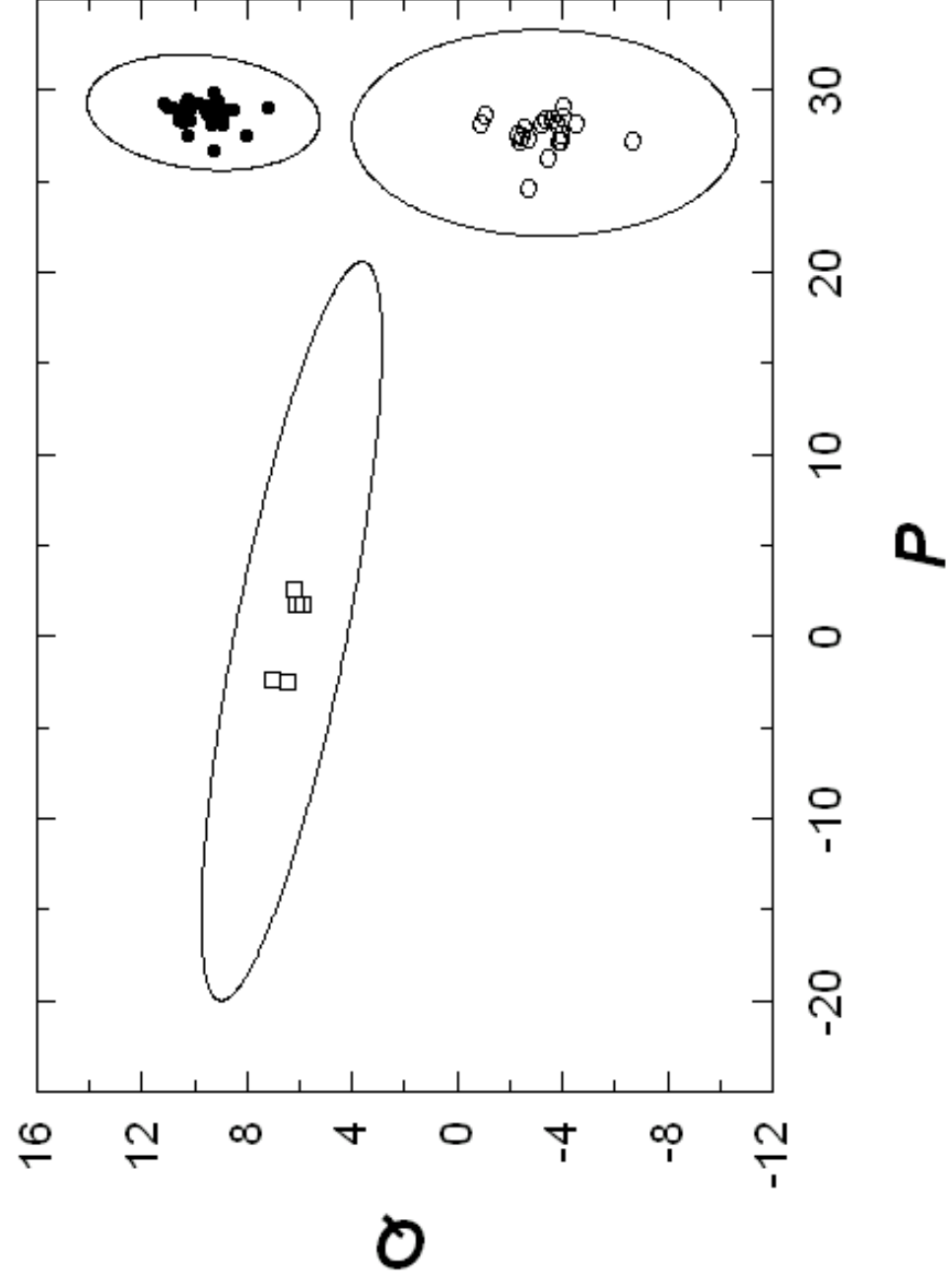


Fig. 4

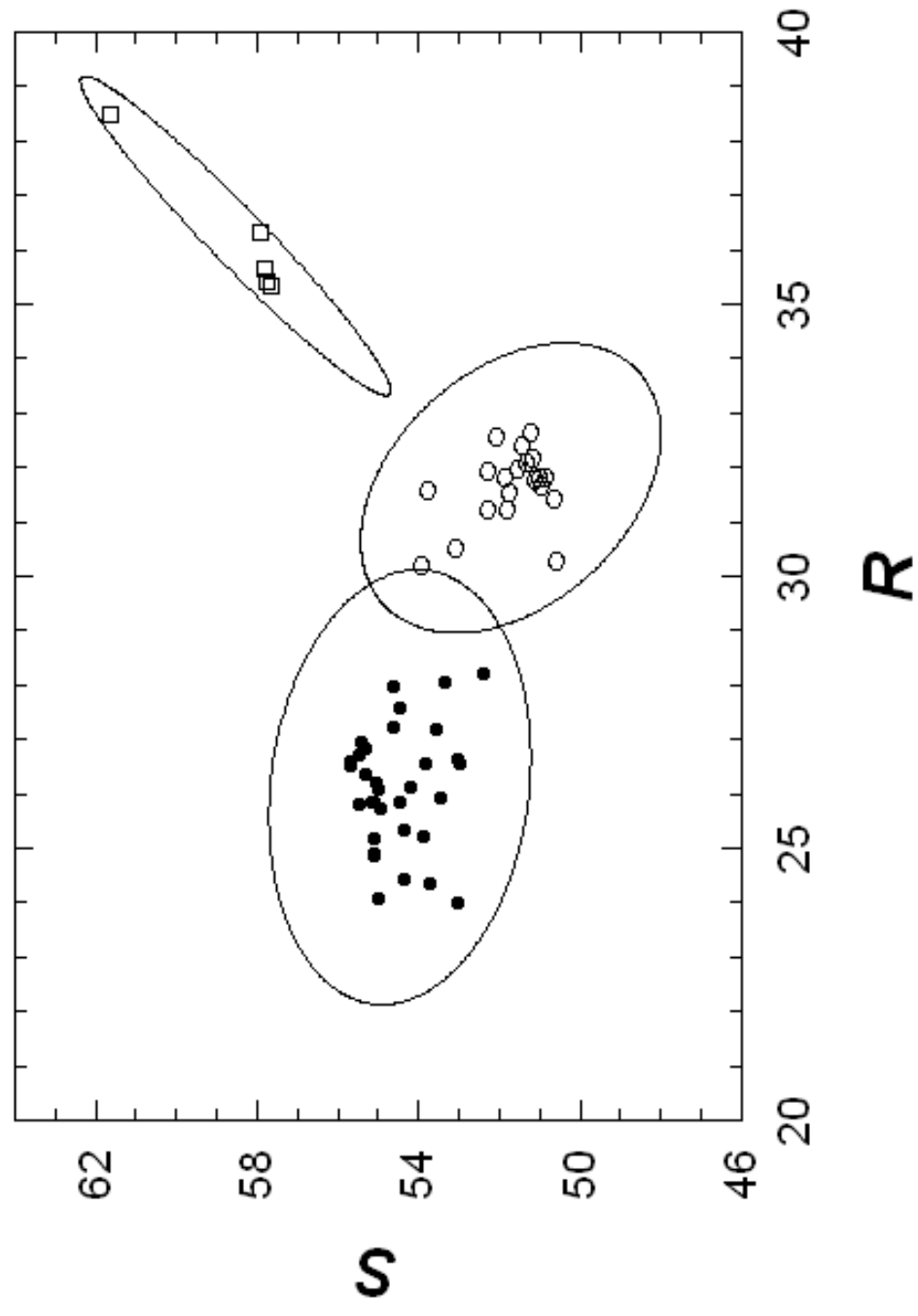


Fig. 5

Capítulo 5. Considerações finais

1. Flutuações populacionais de *Pseudacteon*

Nossas observações de forídeos do gênero *Pseudacteon* atraídos para ninhos de *Solenopsis invicta* ao longo de 3 anos sugeriram a existência de alguns padrões que deveriam ser investigados em maior detalhe. Uma vez que a frequência de visitas de *Pseudacteon* a ninhos de *Solenopsis* é em média muito baixa, e varia de dia para dia de maneira aparentemente aleatória, tais investigações envolveriam necessariamente um esforço amostral bem maior do que foi possível realizar neste trabalho, com amostragens diárias ao longo de vários anos, por uma equipe de várias pessoas. As dificuldades em demonstrar estatisticamente hipóteses sobre a população de *Pseudacteon* e suas relações com a população de *Solenopsis* e fatores ambientais é ilustrada por um levantamento de campo em grande escala, ao longo de vários anos, envolvendo várias dezenas de localidades no norte da Florida (Morrison e Porter, 2005a). Apesar do grande esforço amostral, este estudo não conseguiu demonstrar estatisticamente nenhum efeito da população introduzida de *Pseudacteon tricuspidis* sobre a população de *Solenopsis invicta*.

Tais amostragens mais extensas poderiam confirmar a ocorrência de picos abruptos de abundância de forídeos em certos meses do ano. Seria, então, preciso tentar determinar os mecanismos que levam a ocorrência destes picos. A ocorrência de um pico de abundância de *Pseudacteon* em um dado instante implica em uma grande taxa de eclosão de moscas adultas, e possivelmente uma grande taxa de oviposição ou de sobrevivência de algum dos estágios de desenvolvimento das moscas algum tempo antes do pico de abundância. Infelizmente, na prática é bastante difícil estimar estas taxas em colônias de *Solenopsis* no campo. Por exemplo, as estimativas da taxa de parasitoidismo (realizadas coletando formigas vivas e observando-as no laboratório, registrando o número de formigas que eventualmente morrem infectadas por *Pseudacteon*) podem ser subestimadas devido a mudanças de comportamento das formigas, induzidas pelo parasitóide (Morrison e Porter, 2005b).

Seria também interessante realizar uma campanha de observações simultâneas de forídeos em vários pontos de uma área de vários quilômetros quadrados, a fim de tentar determinar se flutuações em abundância de *Pseudacteon* ocorrem simultaneamente em diferentes áreas, se há evidências de dispersão de forídeos entre áreas vizinhas, etc.

A análise da distribuição dos números de forídeos atraídos para os vários ninhos de *S. invicta* incluídos neste estudo mostrou que esta distribuição torna-se fortemente contagiosa quando a abundância de forídeos é alta, com um excesso de ninhos atraindo muitos forídeos, e um excesso de ninhos atraindo nenhum ou muito poucos forídeos. Este padrão de distribuição também foi observado por Morrison e King (2004) em experimentos sobre o comportamento de localização de hospedeiros por fêmeas de *P. tricuspidis*, na Flórida. Uma possível explicação para o padrão de distribuição que observamos quando a abundância de forídeos é alta, seria que a atratividade de um

ninho perturbado aumenta com o número de forídeos previamente atraídos para o ninho, levando a um rápido aumento do número de forídeos atraídos depois que um primeiro forídeo é atraído. Os experimentos de Morrison e King (2004) sugerem que este é um mecanismo plausível. Nestes experimentos, operárias de outras colônias eram adicionadas a um ninho perturbado, resultando em interações agressivas entre as operárias de diferentes ninhos, e atração de um número maior de parasitóides, aparentemente devido a uma maior liberação de feromônios de alarme por parte das operárias. Em nossas observações de campo, seria concebível que a atração de um primeiro forídeo para um ninho perturbado induzisse a liberação de feromônios de alarme, aumentando a probabilidade de atração de um segundo forídeo, e assim por diante, em uma "reação em cadeia" que não ocorreria naqueles ninhos perturbados aos quais nenhum forídeo fosse atraído durante o período de observação.

2. Critérios para distinguir *Solenopsis invicta* de *S. saevissima*

Neste trabalho introduzimos dois critérios de separação entre *S. invicta* e *S. saevissima*, baseados na composição de hidrocarbonetos cuticulares e alcalóides piperidínicos. Estes critérios foram determinados a partir de análises de amostras coletadas em uma área de cerca de 450 x 350 km no estado de São Paulo. Ainda que esta área represente apenas uma pequena fração da área de ocorrência de *S. invicta* e *S. saevissima*, há evidências na literatura (MacConnell et al, 1976) de que a composição de alcalóides de *S. invicta* é bastante uniforme sobre toda a região de ocorrência desta espécie nas Américas do Norte e do Sul. Esta uniformidade também é observada para outras espécies que ocorrem na América do Norte (*S. xyloni*, *S. geminata* e *S. richteri*). Assim, é plausível esperar que *S. saevissima* exiba a mesma uniformidade de composição, o que tornaria nossos critérios de separação química aplicáveis sobre uma

área geográfica bem mais extensa. Naturalmente, seria importante realizar mais amostragens distribuídas representativamente por toda a extensão das áreas de ocorrência de *S. invicta* e *S. saevissima*, de modo a obter mais dados de composição química, que permitiriam refinar os parâmetros numéricos dos critérios de separação química, assim como verificar ou não a sua aplicabilidade geral.

A população de formigas lava-pés amostrada em São José do Rio Preto exibiu características morfológicas de *S. invicta*, e composição química claramente diferente de todas as outras amostras de *S. invicta* ou *S. saevissima* amostradas em outras localidades. Seria interessante realizar novas amostragens mais detalhadas em um raio de até 100 km centrado em São José do Rio Preto, a fim de verificar se esta composição "anômala" é encontrada em formigas lava-pés sobre uma área mais extensa. Seria também importante tentar elucidar a natureza da população de lava-pés de São José do Rio Preto, que poderia ser uma espécie ainda não descrita, uma variedade química de *S. invicta*, ou talvez um híbrido de *S. invicta* ou *S. saevissima*, através de estudos genéticos e morfológicos mais detalhados.

As amostragens sobre toda a extensão das áreas de ocorrência de *S. invicta* e *S. saevissima*, propostas mais acima, poderiam revelar mais populações de *Solenopsis* com morfologias correspondentes a *S. invicta* ou *S. saevissima* e composições químicas "anômalas". Tais populações poderiam então ser alvo de estudos químicos, morfológicos (e possivelmente genéticos) mais detalhados em áreas mais restritas, contribuindo para o melhor entendimento da taxonomia e biogeografia do gênero *Solenopsis*.

Outra possibilidade de extensão do presente trabalho seria a aplicação da mesma metodologia para a determinação de critérios quantitativos de separação química que se apliquem a outras espécies do gênero *Solenopsis*, cuja taxonomia é bastante complexa e

cheia de distinções sutis entre espécies. Tais critérios teriam grande utilidade prática na identificação de espécimes coletados, especialmente em vista do número reduzido de especialistas taxonômicos que trabalham com o gênero *Solenopsis*.

Capítulo 6. Referências Bibliográficas

- Brand, J.M. 1978. Fire ant venom alkaloids: their contribution to chemosystematics and biochemical evolution. *Biochemical Systematics and Ecology* **6**: 337-340.
- Brand, J.M., M. S. Blum, H. M. Fales and J.G. MacConnell. 1972. Fire ant venoms: comparative analyses of alkaloidal components. *Toxicon* **10**: 259-271.
- Brand, J. M., M. S. Blum and M. R. Barlin. 1973. Fire ant venoms: intraspecific and interspecific variation among castes and individuals. *Toxicon* **11**: 325-331.
- Brand, J. M. , M. S. Blum and H.H. Ross. 1973. Biochemical evolution in fire ante venoms. *Insect Biochem.* **3**: 45-51.
- Buren, W.F. 1972. Revisionary studies on the taxonomy of the red imported fire ants. *J. Georgia Entomol. Soc.* **7**:1-26.
- Brown, B.V & L.W. Morrison. 1999. New *Pseudacteon* (Diptera:Phoridae) from North America that parasitizes native fire ants, *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae). *An. Entomol. Soc. Am.* **92**: 182-187.
- Carlson, D.A. 1988. Hydrocarbons for identificstion and phonetic comparisons: cockroaches, honey bees and tsetse flies. *Florida Entomologist* **71**(3): 333-345.
- Disney, R.H.L. 1994. Scuttle flies: the Phoridae. Chapman & Hall, London.

- Fröhlich, B., J. Tautza & M. Riederer. 2000. Chemometric classification of comb and cuticular waxes of the honeybee *Apis mellifera carnica*. *J. Chem. Ecol.* **26**(1): 123-137.
- Feener, D.H., Jr & B.V. Brown. 1992. Reduced foraging of *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) in the presence of parasitic *Pseudacteon* spp. (Diptera: Phoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 80-84.
- Fowler, H.G., M.A. Pesquero, S. Campiolo & S.D. Porter. 1995. Seasonal activity of species of *Pseudacteon* (Díptera: Phoridae) parasitoids of fire ants (*Solenopsis saevissima*) (Hymenoptera: Formicidae) in Brazil. *Científica, São Paulo.* 23(2): 367-371.
- Gilbert, L.E. & L.W. Morrison. 1997. Patterns of host specificity in *Pseudacteon* parasitoid flies (Diptera: Phoridae) that attack *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 26 (5): 1149-1154.
- Hölldobler, B. & E.O. Wilson, 1990. *The ants*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Ma. 732p.
- Kaib, M., R. Brandl & R.K.N. Bagine. 1991. Cuticular hydrocarbon profiles: a valuable tool in termite taxonomy. *Naturwissenschaften* **78**:176-179.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. Numerical ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Lockey, K.H. 1991. Insect hydrocarbon classes: implications for chemotaxonomy. *Insect Biochem.* **21**: 1129-1139.
- Lofgren C.S., W.A. Banks & B.M. Glancey. 1975. Biology and control of imported fire ants. *Annual Review of Entomology*. Pag 1-30.

- Lok, J.B., E.W. Cupp & G.J. Blomquist. 1975. Cuticular lipids of the imported fire ants, *Solenopsis invicta* and *richteri*. *Insect Biochem.* **5**: 821-829.
- MacConnell, J.G., M. S. Blum and H.M. Fales. 1970. Alkaloid from fire ant venom: Identification and synthesis. *Science* **168**: 840-841.
- MacConnell, J.G., M. S. Blum and H.M. Fales. 1971. The chemistry of fire ant venom. *Tetrahedron* **26**: 1129-1139.
- MacConnel, J.G., M. S. Blum, W.F. Buren, R.N. Williams and H.M. Fales. 1976. Fire ant venoms: chemotaxonomic correlations with alkaloidal compositions. *Toxicon* **14**: 69-78.
- Macom, T.E. & S.D. Porter. 1996. Comparison of polygine and monogyne red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) population densities. *An. Entomol. Soc. Am.* **89**(4): 535-543.
- Morrison, L.W. 2002. Long-term impacts of an arthropod-community invasion by the imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Ecology* **83**: 2337-2345.
- Morrison, L.W. 2000. Biology of *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae) ant parasitoids and their potential to control imported *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Recent Res. Devel. Entomol.* **3**: 1-13.
- Morrison, L.W. 1999. Indirect effects of phorid fly parasitoids on the mechanisms of interspecific competition among ants. *Oecologia* **121**: 113-122.
- Morrison, L. W. & S.D. Porter. 2005a. Testing for Population-Level Impacts of Introduced *Pseudacteon tricuspidis* Flies, Phorid Parasitoids of *Solenopsis invicta* Fire Ants. *Biological Control* **33**: 9-19.

- Morrison, L.W. & S.D. Porter. 2005b. Phenology and parasitism rates in introduced populations of *Pseudacteon tricuspis*, a parasitoid of *Solenopsis invicta*. *Biological Control* 50: 127-141.
- Morrison, L.W. & S.D. Porter. 2003. Positive association between densities of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), and generalized ant and arthropod diversity. *Environ. Entomol.* 32 (3): 548-554.
- Morrison, L.W. & J.R.King. 2004. Host location behavior in a parasitoid of imported fire ants. *Journal of Insect Behavior* 17(3): 367-383.
- Morrison, L.W. & L. E. Gilbert, 1998. Parasitoid-host relationships when host size varies: the case of *Pseudacteon* flies and *Solenopsis* fire ants. *Ecological Entomology* 23: 409-416.
- Morrison, L.W., E.A. Kawazoe, R. Guerra & L.E. Gilbert. 2000. Ecological interactions of *Pseudacteon* parasitoids and *Solenopsis* ant hosts: environmental correlates of activity and effects on competitive hierarchies. *Ecological Entomology* 25: 433-444.
- Morrison, L.W., S.D. Porter & L.E. Gilbert 1999a. Sex ratio variation as a function of host size in *Pseudacteon* flies (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 66: 257-267.
- Morrison, L.W., E.A. Kawazoe, R. Guerra & L.E. Gilbert, 1999b. Phenology and dispersal in *Pseudacteon* flies (Díptera: Phoeiride), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *An. Entomol. Soc. Am.* 92(2): 198-207.
- Morrison, L.W., C.G. Dall'Aglio-Holvorcem & L.E. Gilbert. 1997. Oviposition behavior and development of *Pseudacteon* flies (Diptera:Phoridae), parasitoids of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 26: 716-724.

- Nelson, D.R., C.L. Fatland, R.W. Howard, C.A. MaDaniel & G.J. Blomquist. 1980. Re-analysis of the cuticular methylalcanes of *Solenopsis invicta* and *S. richteri*. *Insect Biochem.* 10: 409-418.
- Orr, M.R., S.H. Seike, W.W. Benson & L.E. Gilbert, 1995. Flies suppress fire ants. *Nature* (Lond.) 373: 292-293.
- Orr, M.R., S.H. Seike & L.E. Gilbert. 1997. Foraging ecology and patterns of diversification in dipteran parasitoids of fire ants in south Brazil. *Ecol. Entomol.* 22: 305-314.
- Pesquero, M.A., S. Campiolo, H.G. Fowler & S.D. Porter. 1996. Diurnal patterns of ovipositional activity in two *Pseudacteon* fly parasitoids (Díptera: Phoridae) of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Fla. Entomol.* 79(3): 455-457.
- Porter, S.D. 1998. Biology and behavior of *Pseudacteon* decapitating flies (Diptera: Phoridae) that parasitize *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Fla. Entomol.* 81(3) 292-309.
- Porter, S.D. & D.A. Savignano. 1990. Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community. *Ecology*, 71(6): 2095-2106.
- Porter, S.D. & W. R. Tschinkel, 1985a. Fire ant polymorphism (Hymenoptera: Formicidae): factors affecting worker size. *An. Entomolt. Soc. Am.* 78(3): 381-386.
- Porter, S.D. & W. R. Tschinkel, 1985b. Fire ant polymorphism: the ergonomics of brood production. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 16: 323-336.
- Porter, S.D., D.F. Williams, R.S. Patterson & H. Fowler. 1997. Intercontinental differences in the abundance of *Solenopsis* fire ants (Hymenoptera: Formicidae): escape from natural enemies? *Environmental Entomology* 26(2): 373-384.

- Porter, S.D., R.K. Vander Meer, M.A. Pesquero, S. Campiolo & H.G. Fowler. 1995a. *Solenopsis* (Hymenoptera: Formicidae) fire ant reactions to attacks of *Pseudacteon* flies (Díptera: Phoridae) in southeastern Brazil. *An. Entomol. Soc. Am.* 88:570-575.
- Porter, S.D., H.G. Fowler, S. Campiolo & M.A. Pesquero. 1995b. Host specificity of several *Pseudacteon* (Díptera: Phoridae) parasites of fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Fla. Entomol.* 78: 70-75.
- Porter, S.D., M.A. Pesquero, S. Campiolo & H.G. Fowler. 1995c. Growth and development of *Pseudacteon* phorid fly maggots (Díptera: Phoridae) in the heads of *Solenopsis* fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 24: 475-479.
- Porter, S.D., A.Bhatkar, R.Mulder, S.B. Vinson & D.J. Clair, 1991. Distribution and density of polygene fire ants (Hymenoptera: Formicidae) in Texas. *J. Econ. Entomol.* 84(3): 866-874.
- Ross, K.G. & J.C. Trager, 1990. Systematics an population genetics of fire ants (*Solenopsis saevissima* complex) from Argentina. *Evolution*, 44(8): 2113-2134.
- Trager, J.C. 1991. A revisison of the fire ants, *Solenopsis geminate* group (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). *J.New York Entomol.Soc.* 99(2): 141-198.
- Tschinkel, W.R. 1993. Sociometry and sociogenesis of colonies of the fire ant *Solenopsis invicta* during one annual cycle. *Ecological Monographs* 63(4): 425-457.
- Tschinkel, W.R. 1988. Colony growth and the ontogeny of worker polymorphism in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 22: 103-115.
- Tschinkel, W.R., E.S. Adams & T. Macom, 1995. Territory area and colony size in the fire ant *Solenopsis invicta*. *J. An. Ecol.* 64: 473-480.

- Vargo, E.L. & D.J.C. Fletcher. 1986. Evidence of pheromonal quenn control over the production of male and females sexuals in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *J. Comp. Physiol. A*. 159: 741-749.
- Vander Meer, R.K. 1986. Chemical taxonomy as a tool for separating *Solenopsis* spp. In *Fire Ants and Leaf Cutting ants: Biology and Management*. (Lofgren C.S. and R.K. Vander Meer, eds), p. 316-326. Westview Press, Boulder, Co .
- Vander Meer, R.K. and C.S. Lofgren. 1988. Use chemical characters in defining populations of fire ants, *Solenopsis saevissima* complex, (Hymenoptera: Formicidae). *Fla. Entomol.* 71(3): 323-332.
- Vander Meer, R.K. and C.S. Lofgren. 1990. Chemotaxonomy applied to fire ant systematics in the United States and South America. In: *Applied Myrmecology – A World Perspective* (Vander Meer, R.K., K. Jaffe & A. Cedeno, eds) pp 75-84. Westview Press, Boulder, CO.
- Vander Meer, R.K., C.S. Lofgren, F.M. Alvarez. 1985. Biochemical evidence for hybridization in fire ants. *Fla. Entomol.* **68**(3): 502-506.
- Vinson, S.B. 1997. Invasion of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) – Spread, biology and impact. *American Entomologist* – Spring 1997: 23-39).
- Wuellner, C.T., C.G. Dall’Aglio-Holvorcem, W.W. Benson & L.E. Gilbert 2002. Phorid fly (Diptera: Phoridae) oviposition behavior and fire ant (Hymenoptera: Formicidae) reaction to attack differ according to phorid specie. *An. Entomol. Soc. Am.* 95(2): 257-266.
- Williams, R.N. 1980. Insect natural enemies of fire ants in South America with several new records. *Proceedings of the Tall Timbers Habitat Management* vol. 7: 123-134

- Wilson, E.O. 1962a. Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima*. 1. The organization of mass-foraging. *Animal Behaviour*, 10 (1-2): 134-146.
- Wilson, E.O. 1962b. Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima*. 1. The organization of mass-foraging. *Animal Behaviour*, 10 (1-2): 148-158.
- Wilson, E.O. 1962c. Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima*. 3. The experimental induction of social responses. *Animal Behaviour*, 10 (1-2): 159-164.
- Wilson, E.O. 1959. Source and possible nature of the odor trail of fire ants. *Science* 129:643-644.
- Wojcik, D.P. 1983. Comparison of the ecology of red imported fire ants in North and South America. *The Florida Entomol.* 66(1): 101-111.
- Wojcik, D.P. 1986. Observations on the biology and ecology of fire ants in Brazil. In: C.S. Lofgren & R.K. Vander Meer (Ed). *Fire ants and leaf-cutting ants – Biology and Management*. Westview Press. Boulder Co. p. 88-103.
- Wojcik, D.P. 1993. Impact of the red imported fire ant on native ant species in Florida. In: D.F. Williams (Ed). *Exotic Ants – Biology, impact and control of introduced species*. Westview Press, Inc, Boulder, CO. pp 269-281.