

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO  
PAULO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA  
ALIMENTAR E SANIDADE NO AGROECOSSISTEMA

Ação do nematoide entomopatogênico, *Steinernema rarum* e sua bactéria simbiote  
sobre formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.)

CAROLINA EGIDIO BABESCO

Dissertação apresentada para a  
obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar  
e Sanidade no Agroecossistema. Área de concentração:  
Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

SÃO PAULO  
2023

**CAROLINA EGIDIO BABESCO**

**AÇÃO DO NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO, *Steinernema rarum* E SUA  
BACTÉRIA SIMBIONTE SOBRE FORMIGAS LAVA-PÉS (*Solenopsis* spp.)**

Dissertação apresentada para a obtenção  
do título de Mestre em Sanidade,  
Segurança Alimentar e Sanidade no  
Agroecossistema.

Área de concentração: Segurança  
Alimentar e Sanidade no  
Agroecossistema.

Orientadora: Professora Dra. Ana Eugênia  
de Carvalho Campos

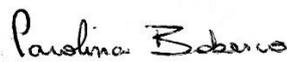
Coorientadora: Dra. Julie Giovanna  
Chacón- Orozco

SÃO PAULO

2023

Eu **Carolina Egidio Babesco**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:



Data 20 /07/2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Babesco, Carolina Egidio.

Ação do nematoide entomopatogênico, *Steinernema rarum* e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.). / Carolina Egidio Babesco. - São Paulo, 2023.

51 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2023D.CBS04

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ana Eugênia de Carvalho Campos

Coorientador: Julie Giovanna Chacón Orozco

Versão do título para o inglês: Action of the entomopathogenic nematode, *Steinernema rarum* and its symbiont bacterium on fire ants (*Solenopsis* spp.).

1. *Steinernema rarum* 2. Controle biológico 3. Inseto praga 4. Formiga de fogo I. Babesco, Carolina Egidio II. Campos, Ana Eugênia de Carvalho III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2023/04

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Carolina Egidio Babesco

Título: Ação do nematoide entomopatogênico, *Steinernema rarum* e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.).

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Aprovado em: 31/05/2023

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ana Eugênia de Carvalho Campos      Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

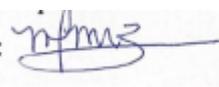
Prof. Dr. Maria Santana de Castro Morini      Instituição: Universidade de Mogi das Cruzes

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

Prof. Dr. Maria Fernanda Miori de Zarzuela      Instituição: Environmental Science do Brasil - Envu

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Dra. Ana Eugênia por confiar em mim todos esses anos e por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora Dra. Julie por sempre estar presente e me auxiliar em todas as etapas do trabalho.

Aos meus amigos do Instituto Biológico, Andréa, Pietra e Ken por me ajudarem nas coletas de solo. A companhia de vocês no dia a dia fez tudo ser menos cansativo.

Ao Fernando, marido da Julie, por sempre nos ajudar com os experimentos e sempre se mostrar disponível para me auxiliar.

Ao professor Dr. Ricardo Harakava e a mestre Juliana M. C. Alves por sempre estarem disponíveis e me auxiliarem nas análises moleculares.

A todos que de alguma forma contribuíram ou torceram por esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Processo nº 2022/14952-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## Resumo

**BABESCO, C. E. Ação do nematoide entomopatogênico, *Steinernema rarum* e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.).** São Paulo- SP, 2023. 51 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

O gênero *Solenopsis* inclui cerca de 191 espécies e são conhecidas como “formigas lava-pés” ou “formigas de fogo”. Essas formigas são altamente agressivas às perturbações da colônia e podem causar acidentes com suas ferroadas. Também podem causar prejuízos econômicos na agricultura por dificultar a colheita manual, se alimentarem de algumas culturas e terem relação mutualística com insetos sugadores de seiva. Por isso, existe um grande interesse na descoberta de novos produtos e métodos que sejam eficientes no controle desses insetos. Os objetivos deste projeto foram avaliar a ação do nematoide entomopatogênico *Steinernema rarum* e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) em condições de laboratório e em campo, avaliar a ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em ninhos de formigas lava-pés antes e após a sua aplicação e identificar molecularmente as espécies de formigas lava-pés para os testes em laboratório e de campo. Para determinar a ação de *S. rarum* e sua bactéria simbiote em laboratório, foi realizado um teste com dez espécimes em placa de Petri, avaliadas separadamente por estágio (larvas, pupas, operárias e aladas). Em seguida, foi realizado um experimento com microcolônias, contendo dez operárias, cinco larvas, cinco pupas e um alado por placa. Para avaliar a ocorrência natural dos NEPs, foram realizadas coletas de solo dos formigueiros antes e após um mês de sua aplicação nos ninhos. Na avaliação de campo foram realizados três experimentos em diferentes períodos, com uma aplicação por mês, durante dois meses dos tratamentos em formulação líquida e aplicação do nematoide em esponjas. As espécies de lava-pés testadas em laboratório e do experimento 3 de campo foram antes identificadas, em nível de espécie, por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os resultados demonstraram que não houve ocorrência natural de nematoides nos ninhos de lava-pés antes e após a sua aplicação. Nos testes de laboratório, os nematoides em concentração de 300JIs/inseto causaram de 70 a 100% de mortalidade das formigas em todos os estágios e as larvas foram mais susceptíveis à bactéria e aos metabólitos secundários quando mantidas separadas em condições de laboratório, comparativamente com o experimento de

microcolônias. Nos experimentos de campo, os tratamentos NEPs (2500Jis/mL) e bactéria, obtiveram mais de 60% dos ninhos desativados após dois meses de observação.

Palavras chave: *Sterneinema rarum*, controle biológico, inseto praga, formiga de fogo.

#### Abstract

BABESCO, C. E. Action of the entomopathogenic nematode, *Steinernema rarum* and its symbiont bacterium on fire ants (*Solenopsis* spp.). São Paulo- SP, 2022. 51 f. Dissertation (Master in sanity, Food and Environmental safety on Agribusiness) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2021.

The genus *Solenopsis* includes about 191 species and are known as "foot washing ants" or "fire ants". These ants are highly aggressive to colony disturbances and can cause accidents with their stings. They can also cause economic losses in agriculture by hindering manual harvesting, feeding on some crops, and having a mutualistic relationship with sap-sucking insects. For this reason, there is great interest in discovering new products and methods that are efficient in controlling these insects. The objectives of this project were to evaluate the action of the entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* and its symbiont bacterium on lava-foot ants (*Solenopsis* spp.) under laboratory and field conditions, to evaluate the natural occurrence of entomopathogenic nematodes (NEPs) in lava-foot ant nests before and after their application, and to molecularly identify the lava-foot ant species for laboratory and field tests. To determine the action of *S. rarum* and its symbiont bacterium in the laboratory, a test was performed with ten specimens in Petri dishes, evaluated separately by stage (larvae, pupae, workers, and winged). Then, a microcolony experiment was conducted, containing ten workers, five larvae, five pupae, and one winged per plate. To evaluate the natural occurrence of NEPs, soil samples were collected from the anthills before and after one month of their application on the nests. In the field evaluation, three experiments were conducted at different periods, with one application per month for two months of the treatments in liquid formulation and application of the nematode on sponges. The wasp species tested in the laboratory and in experiment 3 in the field were first identified to species level by PCR (Polymerase Chain Reaction). The results showed that there was no natural

occurrence of nematodes in the lava-foot nests before and after their application. In laboratory tests, nematodes at a concentration of 300JIs/insect caused 70 to 100% mortality of ants at all stages and larvae were more susceptible to the bacteria and secondary metabolites when kept separate under laboratory conditions compared to the microcolony experiment. In the field experiments, the NEPs (2500Jis/mL) and bacteria treatments obtained more than 60% of deactivated nests after two months of observation.

Key words: *Sterneinema rarum*, biological control, pest insect, fire ant

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Separação das operárias de formigas lava-pés e rainha da terra, por gotejamento. ....	22
Figura 2 Esquema do isolamento da bactéria. ....	23
Figura 3 Esquema de obtenção dos tratamentos “Bactéria” e “Metabólitos Secundários” (M.S). ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 4 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento de ocorrência de nematoides no solo no Instituto Biológico de São Paulo. ....	25
Figura 5 Esquema de avaliação de ocorrência de NEPs no solo de formigueiros de lava-pés. ....	26
Figura 6 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento 1 no Instituto Biológico de São Paulo. ....	27
Figura 7 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento 2 no Instituto Biológico de Campinas. ....	27
Figura 8 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento 3 no Instituto Biológico de São Paulo. ....	28
Figura 9 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento prático com nematoides entomopatogênicos em esponjas no Instituto Biológico de São Paulo. ....	30
Figura 10 NEPs em esponjas em volta dos ninhos no Instituto Biológico de São Paulo. ....	30
Figura 11 Porcentagem de mortalidade em diferentes estágios de lava-pés inoculadas com <i>Sterneinema rarum</i> em condições de laboratório. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%. ....	32
Figura 12 A) larvas de formiga lava-pé sadias, B) Larva parasitada com <i>Sterneinema rarum</i> 4 dias após inoculação C) NEPs emergindo da larva parasitada 5 dias após inoculação. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos ....	33
Figura 13 A) pupa de formiga lava-pé sadia, B) NEPs emergindo da pupa parasitada 5 dias após inoculação C) Pupa seca após a emergência dos NEPs, 7 dias após inoculação. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos ....	34
Figura 14 A) Operárias de <i>Solenopsis</i> sp. parasitadas por <i>Steinernema. rarum</i> na região da cabeça, 4 dias após inoculação, B) NEPs emergindo do abdômen C) NEPs	

emergindo do aparelho bucal, 6 dias após inoculação. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos .....	34
Figura 15 A) Indivíduo alado de <i>Solenopsis</i> sp. morto em posição dorsal invertido B) NEPs emergindo do abdômen. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos .....	34
Figura 16 Porcentagem de mortalidade em diferentes estágios de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria simbiote do nematoide <i>Sterneinema rarum</i> em condições de laboratório. M.S. – Metabólitos secundários. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%.....	35
Figura 17 A) larva de formiga lava-pé 4 dias após da inoculação com metabólitos secundários B) Larva de formiga lava-pé 4 dias após da inoculação com a bactéria simbiote C) Larva de formiga lava-pé 7 dias após da inoculação com os metabólitos secundários da bactéria D) Cristais de Iodina nas colônias da bactéria em meio NBTA. ....	36
Figura 18 Porcentagem de mortalidade sobre microcolônias de lava-pés inoculadas com <i>Sterneinema rarum</i> em condições de laboratório. NEPs- Nematoides Entomopatogênicos. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%.....	37
Figura 19 Porcentagem de mortalidade de microcolônias de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria simbiote do nematoide entomopatogênico em condições de laboratório. Meio bact. – Meio bacteriano, M.S- metabólitos secundários. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%.....	38
Figura 20 Efeito dos tratamentos com NEPs (Nematoides Entomopatogênicos) e bactérias simbiotes de nematoides, sobre ninhos de formigas lava-pés em campo. Experimento 1 - Instituto Biológico em São Paulo .....	41
Figura 21 Efeito dos tratamentos com NEPs (Nematoides Entomopatogênicos) e bactérias simbiotes de nematoides, sobre ninhos de formigas lava-pés em campo. Experimento 2 - Instituto Biológico em Campinas .....	41
Figura 22 Efeito dos tratamentos com NEPs (Nematoides Entomopatogênicos) bactérias simbiotes de nematoides e meio bactéria, sobre ninhos de formigas lava-pés em campo. Experimento 3 - Instituto Biológico em São Paulo .....	42
Figura 23 Atividade dos ninhos de lava-pés aplicados com NEPs em esponjas durante um mês de observação. Legenda. Atividade dos ninhos: 0 (Desativado), 50 (Diminuição de atividade), 75 (Migração) e 100 (Sem alteração). ....	43

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	12
2.	Objetivos.....	14
3.	Revisão bibliográfica.....	15
3.1	Biologia e Ecologia Comportamental.....	15
3.2	Distribuição do gênero <i>Solenopsis</i> pelo mundo.....	16
3.3	Importância econômica e saúde pública.....	17
3.4	Controle de <i>Solenopsis</i> spp.....	18
3.5	Nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbiotes.....	20
4.	Materiais e Métodos.....	21
4.1	Coleta de colônias de formigas lava-pés em campo e manutenção em laboratório.....	21
4.2	Obtenção do nematoide entomopatogênico e sua bactéria simbiote.....	22
4.3	Fermentação líquida da bactéria e extração dos metabólitos secundários.....	23
4.4	Ação de <i>Sterneinema rarum</i> e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés em condições de laboratório.....	24
4.4.1	Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com o nematoide entomopatogênico <i>Sterneinema rarum</i> .....	24
4.4.2	Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> .....	24
4.4.3	Ação de <i>Sterneinema rarum</i> e sua bactéria simbiote sobre microcolônias de formigas lava-pés, em condições de laboratório.....	24
4.5	Avaliação de ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos.....	25
4.6	Ação de <i>Steinernema rarum</i> e sua bactéria simbiote <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> em colônias no campo.....	26
4.6.1	Área de estudo.....	26
4.6.2	Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés aplicados com tratamentos de formulação líquida.....	28
4.6.3	Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés com NEPs em esponjas fenólicas.....	29
4.6.4	Avaliação da ocorrência de <i>Sterneinema rarum</i> no solo um mês após sua aplicação em ninhos de lava-pés.....	30
4.7	Identificação dos espécimes coletados.....	31
5	Análise estatística.....	31
6	Resultados e Discussão.....	32
6.1	Ação de <i>Sterneinema rarum</i> e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés em condições de laboratório.....	32
6.1.1	Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com o nematoide entomopatogênico <i>Sterneinema rarum</i> .....	32
6.1.2	Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> .....	35

6.1.3	Ação de <i>Sterneinema rarum</i> e sua bactéria simbiote sobre microcolônias de formigas lava-pés, em condições de laboratório. ....	37
6.2	Avaliação de ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos.....	39
6.3	Ação de <i>Steinernema rarum</i> e sua bactéria simbiote <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> em colônias no campo.....	40
6.3.1	Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés aplicados com tratamentos em formulação líquida. ....	40
6.3.2	Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés com NEPs em esponjas fenólicas.....	43
6.3.3	Avaliação da ocorrência de <i>Sterneinema rarum</i> no solo um mês após sua aplicação em ninhos de lava-pés. ....	44
6.4	Identificação dos espécimes coletados.....	44
7	Conclusões .....	45
8	Considerações finais.....	46
9	Referências .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas são insetos sociais da família Formicidae e são caracterizadas pela ampla distribuição, abundância e riqueza nos ecossistemas terrestres (DONAT *et al.*, 2000). Todas as espécies conhecidas são “eusociais”, caracterizadas pela sobreposição de gerações, castas estéreis e reprodutivas e cuidado cooperativo com a prole (WILSON, 1971).

Devido a sua alta capacidade adaptativa, as formigas ocorrem em abundância inclusive em ambientes sob ação antrópica (MARTINS, 2010). Uma vez em locais que proporcionam uma interação direta com o homem, algumas espécies de formigas podem se tornar protagonistas de prejuízos econômicos e até mesmo uma ameaça à saúde pública (como vetor de patógenos ou pela ação do veneno por meio de ferroadas infringidas por algumas espécies) (SANTOS, 2017).

O gênero *Solenopsis* tem sua origem na América do Sul, sendo 191 espécies válidas e 22 subespécies (ANTWEB, 2022), das quais 161 ocorrem na Região Neotropical (BACCARO *et al.*, 2015), que incluem as formigas conhecidas no Brasil como “lava-pés” ou “formigas-de-fogo” (em outros países, “Fire ants” ou “Red imported fire ants”). Essas são altamente agressivas às perturbações da colônia e durante o forrageamento, podem causar acidentes com suas ferroadas, ocorrendo desde dor local até choque anafilático em pessoas alérgicas devido ao seu veneno (MARTINS, 2010).

As formigas lava-pés são onívoras e oportunistas, ou seja, alimentam-se de quase todos os tipos de plantas ou animais e de uma variedade de alimentos domésticos (CAMPOS, ZORZENON e JUNIOR, 2017), além de terem o hábito de se alimentar de “honeydew”, um exsudado liberado pelos insetos sugadores de seiva sendo, portanto, um problema, também na área agrícola (MORALES e BEAL, 2006).

Algumas espécies de lava-pés foram acidentalmente transportadas a partir da América do Sul para outras partes do mundo, especialmente nos EUA em navios carregando madeira (PITTS, MCHUGH e ROSS, 2005). Dentre estas, a espécie *Solenopsis invicta* Buren é a que causa mais problemas em todos os países em que se estabeleceu, gerando graves problemas de saúde e prejuízos agrícolas elevados, sendo atualmente um dos insetos invasores mais importantes do mundo (HENSHAW *et al.*, 2005).

Desta maneira existe um grande interesse na descoberta de novos produtos e métodos que sejam eficientes no controle desses insetos. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos

gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, são considerados um dos exemplos mais bem-sucedidos de ferramentas biológicas usadas para controlar pragas do solo. Eles possuem praticamente todos os atributos de um agente de controle biológico ideal. Eles entram no hospedeiro pelas aberturas naturais como boca, ânus ou espiráculos, ou às vezes diretamente rompendo a cutícula do inseto (por exemplo, *Heterorhabditis* spp.) (GREWAL, EHLERS e SHAPIRO-ILAN, 2005), atingem a hemocele e liberam na hemolinfa as células de bactérias simbióticas (*Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente), as quais são as responsáveis por causar virulência nos insetos, provocando a morte por septicemia em até 48 horas.

Estes organismos apresentam uma série de vantagens que fazem deles agentes eficazes como controladores biológicos, destacando-se sua adaptabilidade e capacidade de colonizar o solo como organismos inundativos. Seu comportamento de busca para combater insetos-praga de hábitos terrestres, a alta virulência, por se tratarem de organismos seguros para os vertebrados e plantas, não geram ameaça contra o ambiente, são fáceis de multiplicar em condições de laboratório, são de fácil aplicação por equipamentos convencionais e são compatíveis com defensivos químicos e biológicos (LEITE, 2006).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação do nematoide entomopatogênico *Sterneinema rarum* e sua bactéria simbiote para o controle de formigas lava-pés.

## 2. OBJETIVOS

### **Geral:**

Avaliar a ação de *Sterneinema rarum* e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés.

### **Específicos:**

- Avaliar a ação de *Sterneinema rarum* e sua bactéria simbiote sobre diferentes estágios de formigas-lava-pés em condições de laboratório;
- Avaliar a ação de *Sterneinema rarum* e sua bactéria simbiote sobre ninhos de lava-pés no campo;
- Avaliar a ocorrência de nematoides entomopatogênicos no solo com ninhos de formigas-lava-pés antes e depois da aplicação no campo;
- Identificar molecularmente as espécies de formigas lava-pés para os testes em laboratório e de campo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biologia e Ecologia Comportamental

As formigas lava-pés são onívoras e oportunistas, se alimentam de diversas substâncias oleosas, secreções produzidas por insetos sugadores de seiva, secreções de nectários florais e de invertebrados vivos ou mortos (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999). Os indivíduos adultos se alimentam de líquidos açucarados, enquanto que as proteínas são mais ingeridas na fase larval (WILLIAMS *et al.*, 1980).

As formigas do gênero *Solenopsis* constroem seus ninhos em áreas abertas, gramadas e/ou pavimentadas, como passeios e quintais de casas, canteiros, parques, jardins e praças, formando montículos de terra solta acima da superfície do solo, denominados montes ou murunduns (CAMPOS-FARINHA *et al.*, 1995).

A função principal dos montes é a regulação do microclima o que permite o máximo crescimento da sua prole. As operárias movem a cria no murundu em resposta à temperatura e a umidade (RHOADES e DAVIS, 1967). Em temperaturas mais baixas, as formigas e as crias ficam concentradas no lado ensolarado do murundu, que serve como termorregulador da colônia (BANKS *et al.*, 1990). Os ninhos são formados internamente por labirintos e galerias que se comunicam, e que são utilizados na movimentação das formigas, armazenamento de alimentos, depósito de lixo e criadouro de larvas (HÖLLDOLBLER e WILSON, 1990; ASANO e CASSIL, 2012).

As formigas lava-pés apresentam morfologia do tipo polimórfica, em que as operárias podem ser morfologicamente diferentes de acordo com a sua função na colônia e seu ciclo de desenvolvimento, com metamorfose completa, passando por estágios de ovo, larva (com quatro instares), pupa e adulto. A reprodução acontece durante o voo nupcial, no qual machos e fêmeas copulam no ar, e podem se distanciar do ninho original a um raio de até 2 km e voar a uma altura de cerca de 250 m, dispersando assim, rainhas férteis para várias direções e a longas distâncias. Após a cópula, o macho morre e as rainhas perdem as asas e procuram um local adequado para nidificação, para fundar uma nova colônia (CASSILL, TSCHINKEL e VINSON, 2002). As primeiras operárias surgem cerca de um mês após a primeira oviposição e segundo Vogt *et al.* (2004) uma colônia de lava-pés pode chegar até 250 mil indivíduos num período de 4 a 6 anos e, atingir uma profundidade de 1m a 1,5m abaixo da superfície do solo.

Apresentam agressividade característica na defesa das colônias (LUNZ *et al.*, 2009) e qualquer perturbação no ninho faz com que ataquem rapidamente e em grande número, sendo capazes de ferir até doze vezes (FUNASA, 2001). Rodrigues (2013) verificou que após a perturbação do murundum, as formigas-lava-pés exibem comportamento agressivo por cerca de 2 minutos, podendo alcançar uma distância de 1,5 m ao redor da perturbação. O veneno das formigas lava-pés é produzido por uma glândula conectada ao ferrão, onde cerca de 90% é constituído de alcaloides oleosos e menos de 10% tem constituição proteica, capazes de provocar reações alérgicas em determinados indivíduos (ALLEN *et al.*, 2001).

### 3.2 Distribuição do gênero *Solenopsis* pelo mundo

O gênero *Solenopsis* tem sua origem na América do Sul, sendo esta região seu principal centro de ocorrência e dispersão. As espécies *Solenopsis saevissima* F. Smith. e *Solenopsis invicta* Buren se destacam das demais em relação à extensão da área de ocorrência, tendo sido coletadas em diversos estudos

A formiga lava-pés da espécie *S. invicta* é naturalmente distribuída por toda a Bacia do Rio da Prata, sendo a região mesopotâmica perto de Formosa, Argentina, o lugar mais provável de origem das populações introduzidas nos Estados Unidos por volta de 1933-45 (CALDERA *et al.*, 2008). Wetterer (2013) documenta a propagação de *S. invicta* da América do Sul através do sul dos Estados Unidos e nordeste do México, através das Índias Ocidentais e para a Nova Zelândia, Austrália e partes da Ásia.

Estudos feitos por Lu, Liang e Zeng (2008) sugeriram que a espécie foi introduzida na China continental em meados ou final de 1990, muito provavelmente do sul dos Estados Unidos (ASCUNCE *et al.*, 2011), e que houve mais de uma introdução.

No Brasil, a maior riqueza de espécies está concentrada entre as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Oliveira e Morini (2021) analisando a ocorrência de *Solenopsis* spp. em áreas de cultivos de hortaliças no Alto Tietê, observaram que três morfoespécies de *Solenopsis* foram registradas em todas as áreas estudadas, sugerindo que são ambientes propícios para a nidificação de espécies deste gênero.

*Solenopsis saevissima* possui ampla distribuição ao longo do território nacional, com registros que se estendem desde o norte do Rio Grande do Sul, avançando pela Costa Atlântica até o extremo oeste do estado de Amazonas. É considerada praga por causar muitos acidentes na região Amazônica (LUNZ *et al.*, 2009), mas nunca foi registrada como invasora

em outros países, deixando-a como coadjuvante em estudos sobre a biologia da espécie quando comparada a *S. invicta*.

Em um trabalho realizado em uma vegetação herbácea próxima ao Parque Estadual Botânico do Ceará, ao se avaliar a diversidade de formigas, foi observada a espécie *S. saevissima* com abundância relativa de 63,05%. Azevedo Filho, Saraiva Neto e Morais (2021) também observaram a predominância da espécie *S. saevissima* em três fragmentos de mata atlântica em um estudo para analisar a ocorrência e condição social de espécies de *Solenopsis* spp. em fragmentos deste bioma.

### 3.3 Importância econômica e saúde pública

Os riscos de acidentes com formigas lava-pés estão associados ao seu hábito de nidificarem próximo a habitações humanas, como áreas abertas, gramados, quintais de residência e escolas e passeios públicos (ZERINGÓTA *et al.*, 2014). Os acidentes geralmente ocorrem quando a vítima pisa ou se acomoda sobre o ninho, ocasionando um ataque defensivo e em grande número por parte das formigas. Devido ao fato das colônias serem compostas por muitos indivíduos, acidentes envolvendo múltiplos ataques são comuns, principalmente em crianças e incapacitados (FUNASA, 2001).

Estas formigas são conhecidas por sua agressividade e seu veneno que pode causar reações diversas. Estas reações são geralmente passageiras e se caracterizam por dor no momento da ferroadada, seguida de queimação e intensa coceira local. Entretanto, de acordo com o número de ferroadadas e a sensibilidade da vítima, pode ocorrer inchaço do membro atacado, pustulose, necrose de tecido e, até mesmo, evoluir para quadro sistêmico, desenvolvendo coceira pelo corpo inteiro e choque anafilático seguido de insuficiência respiratória, coma e morte (HADDAD JUNIOR, 2009). Investigações em quatro províncias da China mostraram que mais de um terço das pessoas em áreas infestadas de formigas lava-pés sofreram ferroadadas, e cerca de 10% delas tiveram febre e reações alérgicas (XU *et al.*, 2012).

No sul dos EUA, cerca de 50% da população que vive em áreas infestadas são ferroadadas pelo menos uma vez por ano, e muitas vezes necessitam de cuidados médicos, por consequência de sua agressividade e ferroadadas dolorosas (DELLA LUCIA, 2003), que contribuem para a aversão dos trabalhadores rurais em efetuar colheita e outras práticas culturais em áreas infestadas (HEDGES, 1998).

Lee e Betschel (2013) relataram sobre o primeiro registro de choque anafilático em um paciente de 43 anos, após ser ferroadado por formigas lava-pés no Canadá em 2012, e as

manifestações clínicas imediatas foram inchaço localizado, seguido por prurido generalizado. Segundo Solley, Vanderwoude e Knight (2002), na Carolina do Sul, EUA, onde são bem estabelecidas, estima-se que anualmente mais de 33 mil pessoas busquem consulta médica para as ferroadas e, destas, 660 são tratados para anafilaxia.

A formiga lava-pés pode causar danos diretos às plantas cultivadas, como demonstrado por Banks et al. (1990) em estudo realizado em seis estados dos EUA. Os autores estimaram que *S. invicta* e *Solenopsis richteri* Forel, 1909 poderiam causar perdas de 31,2 a 156,4 milhões de dólares, dependendo da porcentagem da área total dos plantios de soja ocupada pelos ninhos.

No sudoeste do Pará, foi analisado injúrias causadas por *S. saevissima* em plantas jovens de Paricá (*Schizolobium amazonicum*) e a quantidade de plantas desta espécie atacadas por *S. saevissima* variou de 27%, no período seco, a 60%, no período chuvoso, evidenciando o prejuízo agrícola ocasionado (LUNZ et al., 2009). Esta formiga ataca as flores e o fuste, onde são abertos orifícios e galerias, até a região apical da planta. Brotos terminais e novas brotações também são atacados e destruídos, prejudicando a formação de um tronco retilíneo e uniforme para comercialização.

Outro dano causado no sistema agrícola é devido ao mutualismo das formigas lava-pés com cochonilhas (Hemiptera: Pseudococcidae), que causam prejuízos diretos pela contínua sucção de seiva e liberam um excreto açucarado denominado “honeydew” que serve de alimento às formigas. Essa associação apresenta malefícios para o produtor, uma vez que, as formigas protegem as cochonilhas dos seus inimigos naturais e são os agentes responsáveis pela dispersão desses insetos entre as plantas, podendo levá-los para partes da planta onde o controle é dificultado (TORRES, OLIVEIRA e LIMA, 2011)

*Solenopsis invicta* e *Tapinoma melanocephalum* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae) foram registradas em associação com esse pseudococcídeo na China e *Lasius niger* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) no Canadá (ZHOU et al.). Na Índia, Mahimasanthi et al. (2014) identificaram os gêneros *Solenopsis* e *Camponotus* associados à cochonilha *Maconellicoccus hirsutus* Green, 1908 em cultivos de amoreira, constatando que a população da cochonilha foi maior na presença de colônias de formigas do que na sua ausência.

### 3.4 Controle de *Solenopsis* spp.

Devido à rápida disseminação das formigas lava-pés pelo meio ambiente e consequente ameaça a biodiversidade e a saúde pública, diversos métodos de controle têm sido utilizados

na tentativa de controlar essas formigas. O controle por inseticidas químicos ainda é o mais utilizado, porém além de apresentar resultados de curta duração, há a preocupação em atingir outros insetos e contaminar o meio ambiente (DREES *et al.*, 1992). Fernandes *et al.* (2021) analisando o uso do pulverizador fumacê onde se injetou nos ninhos o formicida (Ciperex®) para controlar formigas lava-pés em área urbana, observaram que o método eliminou 45% das colônias registradas para a área de estudo no período de dois anos. Os autores comentam também que como desvantagem, esse método tem a necessidade de aplicações constantes, uma vez que as formigas lava-pés movimentam seus ninhos para regiões próximas quando são perturbadas.

O controle de formigas lava-pés ainda não está estabelecido, no entanto, é possível encontrar facilmente, na internet, diversas recomendações de como controlar estas formigas. Pinto, Fernandes e Prezoto (2019) realizaram um levantamento das informações disponíveis em sites, vídeos e produções bibliográficas do Brasil que indicassem métodos de controle de formigas lava-pés. Dentre as categorias de controle recomendadas, os métodos caseiros foram os mais indicados (65%; n = 39) seguidos pelos métodos químicos (31,67%; n = 19) e controle biológico (3,33%; n = 2).

Em um estudo avaliando extratos aquosos para o controle de *Solenopsis* spp. em laboratório, foi observado que a utilização de extrato de alho e cravo resultaram em uma mortalidade média de 100% das formigas (SIBINEL, 2008). Santos-Prezoto (2019) testou *in vitro*, quatro substâncias de origem vegetal (eugenol P.A., (E)-cinamaldeído P.A., timol P.A. e carvacrol P.A.) em operárias de *S. saevissima*. O timol se mostrou mais eficiente, pois em concentrações baixas de 0,5 mg/mL alcançou mortalidade de 100%, já Eugenol alcançou 100% de letalidade em concentrações a partir de 2,5mg/mL, Carvacrol a partir de 0,75 mg/mL e o (E)-cinamaldeído a partir de 5 mg/mL após 24 horas da aplicação dos compostos.

Em 2014, foi iniciado um projeto para introduzir alguns agentes de controle biológico de formigas lava-pés no Vale Coachella (Califórnia, USA): duas espécies de moscas, *Pseudacteon curvatus* Borgmeier e *Pseudacteon obtusus* Borgmeier (Diptera: Phoridae); *Solenopsis invicta* virus 3 (Picornavirales: Solinviviridae) (SINV-3); e o microsporídeo intracelular *Kneallhazia solenopsae*. Contudo, as populações de lava-pés não foram suprimidas 2 para 3 anos após a introdução dos agentes com base no número e tamanho dos ninhos ainda presentes em locais onde os agentes biocontroladores tinham se estabelecido (OI *et al.*, 2019).

Alguns trabalhos utilizando nematoides para o controle das formigas lava-pés têm sido realizados. Jouvenaz, Lofgren e Miller (1990) fizeram um estudo utilizando o nematoide

*Steinernema feltiae* e puderam observar que, embora o nematoide tenha matado, em condições de laboratório, até 58% das rainhas e cerca de 80% das larvas e operárias, não foi eficaz contra colônias nos testes de campo. Em uma avaliação do nematoide *S. carpocapsae* para controlar formigas lava-pés em viveiros, foi observado que rainhas, imaturos e a maioria das operárias permaneceram em todos os potes tratados com o nematoide e nenhuma delas foi encontrada nos potes de fuga três ou 14 dias após o tratamento (JOUVENAZ e MARTIN, 1992).

Poole (1976) determinou em testes de laboratório que larvas e pupas de formigas lava-pés são relativamente suscetíveis à *S. carpocapsae*, ocorrendo 100% de mortalidade após 24 horas do experimento enquanto as operárias eram bem menos suscetíveis, causando 50% de sua mortalidade após 48 horas. Collins e Lindregren (1990) avaliaram um isolado mexicano de *S. carpocapsae* e notaram que até 15 milhões de nematoides por colônia de formigas lava-pés não resultaram em mortalidade para as operárias, embora a infecção e subseqüente mortalidade dos imaturos tenham sido observadas. Todos os trabalhos encontrados sobre o controle biológico de formigas lava-pés utilizando nematoides foram feitos a cerca de 30 anos, mostrando a necessidade de novas investigações sobre o tema, avaliando outras espécies, ainda não estudadas, com possível potencial de controle.

### 3.5 Nematoides entomopatogênicos e suas bactérias simbiotas

Os NEPs da família Steinernematidae e Heterorhabditidae são vermes comuns do solo, parasitos obrigatórios de insetos (BLAXTER *et al.*, 1998) e encontram-se associados simbioticamente com bactérias do gênero *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente. A fase dos nematoides chamada juvenil infectante (JI) é a única de vida livre (localizada fora do hospedeiro), e mantém as bactérias simbióticas em seu trato intestinal. Os JIs do gênero *Steinernema* levam as bactérias na vesícula intestinal (BIRD e AKHURST, 1983), enquanto os JIs de *Heterorhabditis* estão distribuídos ao longo do intestino (CICHE e ENSIGN, 2003).

Os JIs procuram ou esperam insetos hospedeiros suscetíveis para entrar e invadir sua hemocele através de aberturas naturais como boca, ânus e espiráculos e no caso de *Heterorhabditis* pode também entrar diretamente através do tegumento dos insetos (WANG e GAUGLER, 1998). Assim que chegam à hemocele, os JIs liberam as bactérias simbióticas, *Xenorhabdus* é liberada através da defecação (WOUTS, 1991), enquanto *Photorhabdus* por regurgitação (CICHE e ENSIGN, 2003).

As bactérias simbióticas se multiplicam e colonizam o hospedeiro rapidamente produzindo toxinas e exo-enzimas que levam à septicemia, matando o inseto entre 24 e 72 horas. Estas toxinas induzem apoptose (morte celular programada) de macrófagos, elementos essenciais do sistema imunológico dos insetos, devido a que constituem a primeira linha de defesa celular. (POINAR JR., 1990)

Os JIs alimentam-se de bactérias e tecido do hospedeiro, desenvolvendo-se e dando lugar a uma ou mais gerações, dependendo do tamanho do inseto. Quando os recursos estão esgotados, aparecem JIs novos e, depois de incorporarem as bactérias simbióticas em seu trato digestivo, emergem do cadáver do inseto (ADAMS e NGUYEN, 2002) para encontrar um novo hospedeiro (KAYA e GAUGLER, 1993). Em condições ideais este processo realiza-se entre seis e dez dias para *Steinernema* e entre 12 e 14 dias para *Heterorhabditis*.

Apesar de existir o conhecimento dos nematoides e suas bactérias a nível mundial, não é bem explorado o uso das bactérias e suas toxinas, o qual poderia ser considerado como uma alternativa, não química, para o controle de insetos. Portanto, o conhecimento que se gera ao redor da biodiversidade e fisiologia destas bactérias contribui para seu uso e desenvolvimento em programas de manejo integrado de pragas e sua produção comercial.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1 Coleta de colônias de formigas lava-pés em campo e manutenção em laboratório

Colônias de *Solenopsis* foram coletadas, na área externa do Instituto Biológico de São Paulo, com auxílio de uma pá, dispostas em um balde plástico de 20 L e levadas ao laboratório.

As operárias, juntamente com crias e rainha, foram separadas da terra pingando-se água vagarosamente de forma a forçá-las a subir para a superfície da água (JOUVENAZ, BANKS e ATWOOD, 1980) (Figura 1). Para possibilitar o gotejamento de água, foi providenciado um equipo de soro ligado a uma garrafa plástica de 5 L. Para facilitar a captura das operárias e rainha, foi disposta uma pequena caixa de madeira de 10 cm x 6 cm com tampa e um barbante preso em uma de suas extremidades na caixa e a outra sobre a terra onde estavam as formigas. Com a inundação, as formigas subiam para a superfície da terra e água e adentravam a caixa, facilitando assim a sua coleta.

A criação artificial foi feita em bandejas de polietileno de 33 cm x 30 cm untadas em suas laterais com vaselina sólida e líquida (1:1) para impedir a fuga das formigas. Placas de Petri descartáveis foram forradas com gesso de Paris e suas tampas foram cobertas com celofane vermelho, para impedir a entrada de luz, mas permitir a visualização das formigas. As placas foram dispostas individualmente nas bandejas de criação. Para a manutenção em laboratório, água, solução açucarada e larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) foram oferecidos à vontade.



Figura 1. Separação das operárias de formigas lava-pés e rainha da terra, por gotejamento.

#### 4.2 Obtenção do nematoide entomopatogênico e sua bactéria simbiote

O nematoide *Steinernema rarum* PAM25 e sua bactéria simbiote *Xenorhabdus szentirmaii*, estão depositados na coleção de microrganismos entomopatogênicos do Laboratório de Controle Biológico, do Instituto Biológico e foram selecionados por estarem disponíveis em larga escala (fermentação bifásica: líquida e sólida).

O isolamento das bactérias foi realizado a partir de hemolinfa do hospedeiro infectado conforme Akhurst (1980). Lagartas de *Galleria mellonella* Lineu, 1758 foram inoculadas com 1 mL da suspensão do nematoide *S. rarum* PAM 25. Logo após a morte dos insetos, eles foram desinfetados superficialmente com álcool 90% e flambados. Com auxílio de um alfinete entomológico foi feito um ferimento na parte frontal da lagarta e a hemolinfa extravasada, que foi plaqueada no meio de cultura NBTA (Agar Nutritivo; 25 mg Azul de

Bromotimol; 40 mg Cloreto de Trifenil-Tetrazolio; 1000 ml<sup>-1</sup> água destilada). As placas foram incubadas no escuro durante 72 h à 27 °C (Figura 2).

As colônias bacterianas de cor azul e verde foram replicadas até que todas as colônias apresentassem tamanho, morfologia uniforme e em fase 1 que consiste na forma primária ou ativa da bactéria.

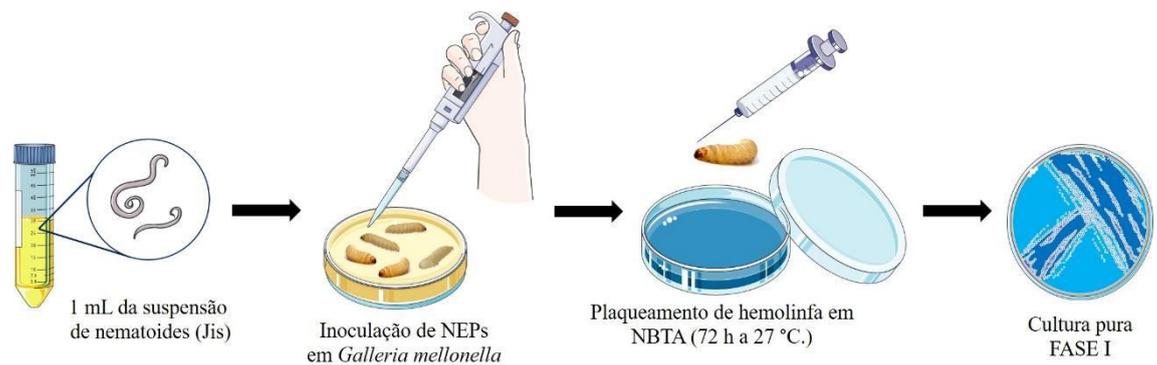


Figura 2 Esquema do isolamento da bactéria.  
Imagem de: Orozco-Chacon J. G.

#### 4.3 Fermentação líquida da bactéria e extração dos metabólitos secundários

Uma colônia da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* foi cultivada em 500 mL de caldo Triptono-Soja (TSB) e mantida sob agitação constante por 144 h (6 dias) à 25 °C (tratamento denominado “Bactéria”). Para o tratamento metabólitos secundários (M.S) livre de células, a suspensão bacteriana foi autoclavada à 121 °C por 15 minutos (Figura 3). Para o controle, foi utilizado o meio bactéria (TSB), sendo o meio de cultura sem a inoculação da bactéria.

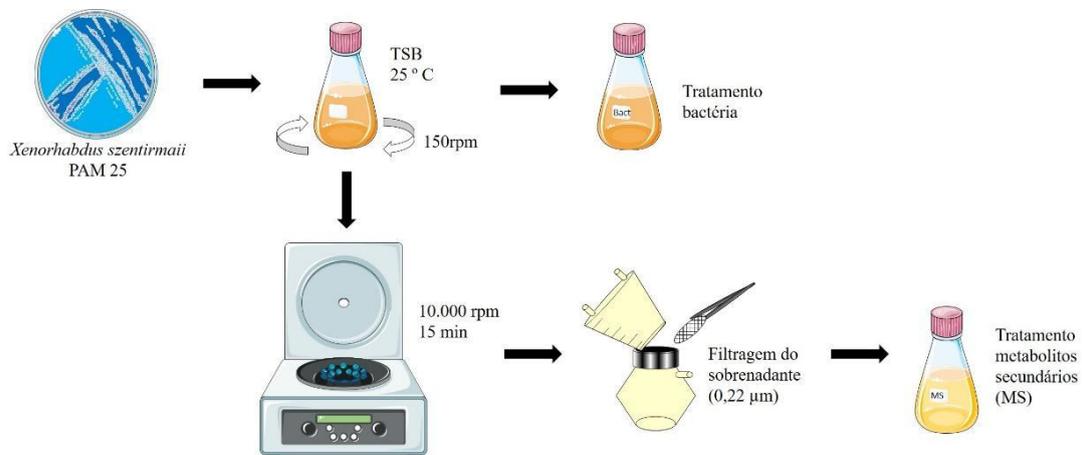


Figura 3 Esquema de obtenção dos tratamentos “Bactéria” e “Metabólitos Secundários” (M.S)

Imagem de: Orozco-Chacon J. G.

4.4 Ação de *Sterneinema rarum* e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés em condições de laboratório.

4.4.1 Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com o nematoide entomopatogênico *Sterneinema rarum*.

Para avaliar a mortalidade das formigas, crias e adultos foram submetidos a tratamentos com NEPs em diferentes concentrações. Cada unidade experimental consistiu numa placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo um papel de filtro (Watman n.1), 1,5 mL do tratamento (5Jis, 50Jis, 150Jis 300Jis por indivíduo), e dez formigas foram avaliadas separadamente por estágio (larvas, pupas, operárias e alados). Cada tratamento foi composto por nove repetições. A avaliação foi realizada, visualmente, pela contagem dos indivíduos mortos até sete dias após inoculação.

4.4.2 Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria *Xenorhabdus szentirmaii*.

Para avaliar a mortalidade das formigas, crias e adultos foram submetidos a tratamentos com a bactéria *X. szentirmaii*, metabólitos secundários (M.S) e meio bactéria. Cada unidade experimental consistiu numa placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo um papel de filtro (Watman n.1), 1,5 mL do tratamento e dez formigas avaliadas separadamente por estágio (larvas, pupas, operarias e aladas). Cada tratamento composto por nove repetições. A avaliação foi realizada visualmente, pela contagem dos indivíduos mortos até 7 dias após inoculação.

4.4.3 Ação de *Sterneinema rarum* e sua bactéria simbiote sobre microcolônias de formigas lava-pés, em condições de laboratório.

Para avaliar a mortalidade das formigas, diferentes estágios foram submetidos a tratamentos com NEPs em diferentes concentrações (5Jis, 50Jis, 150Jis 300Jis por indivíduo), bactéria, metabólitos secundários (M.S) e meio bactéria. Cada unidade experimental consistiu

numa placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo um papel de filtro (Watman n.1), 1,5 mL do tratamento e uma microcolônia composta por dez formigas operárias, cinco pupas, cinco larvas e um alado. Cada tratamento composto por seis repetições. A avaliação foi realizada visualmente, pela contagem dos indivíduos mortos até 7 dias após inoculação.

#### 4.5 Avaliação de ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos

De acordo com o método de Zarzuela *et al.* 2012, para verificar a ocorrência natural de nematoides foram coletadas amostras de solo de cinco formigueiros de *Solenopsis* e realizada duas coletas para cada ninho (Figura 4), sendo uma amostra de solo do próprio formigueiro e outra, denominada amostra controle, do solo a uma distância de 3 m do ninho. As amostras foram retiradas a uma profundidade de 20 centímetros com o auxílio de uma pá e imediatamente colocadas em recipientes e levadas ao laboratório para processamento. Nestas coletas, eventualmente, algumas formigas foram levadas junto com o solo, porém, foram peneiradas e descartadas posteriormente.

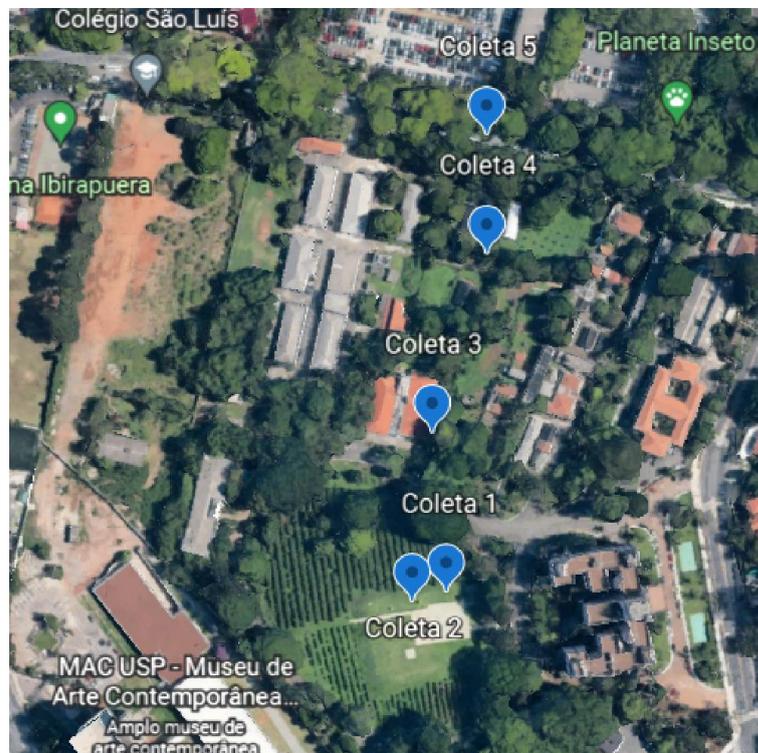


Figura 3 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento de ocorrência de nematoides no solo no Instituto Biológico de São Paulo.

Fonte: Google Earth

As amostras de solo foram distribuídas dentro de recipientes plásticos de 15 cm de diâmetro, sendo um por cada amostra, juntamente com cinco larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), traça das colmeias, obtidas de criação em laboratório, as quais serviram como iscas para nematoides entomopatogênicos, possivelmente presentes no solo (Figura 5). Quando necessário, os solos foram borrifados com água para garantir a umidade. Os recipientes foram tampados e acondicionados em sala com temperatura ambiente e mantidos no escuro. Após dez dias, foram observados os sintomas das larvas mortas para transferência na de White (WHITE, 1927), visando o isolamento e identificação dos nematoides.

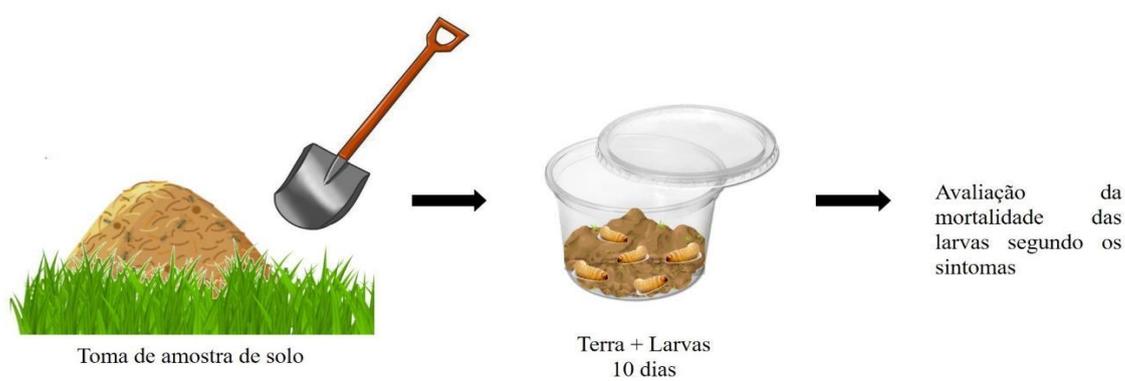


Figura 4 Esquema de avaliação de ocorrência de NEPs no solo de formigueiros de lava-pés.  
Imagem de: Orozco-Chacon J. G.

#### 4.6 Ação de *Steinernema rarum* e sua bactéria simbiote *Xenorhabdus szentirmaii* em colônias no campo.

##### 4.6.1 Área de estudo

Os testes de campo foram realizados no Instituto Biológico de São Paulo (Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 no Bairro da Vila Mariana) e de Campinas (Alameda dos Videiros, 1097 - Sítios de Recreio Gramado). Os experimentos foram conduzidos em períodos diferentes, divididos em experimento 1 (22 ninhos em setembro de 2022 no Instituto Biológico de São Paulo) (Figura 6), experimento 2 (25 ninhos testados em outubro de 2022 no Instituto Biológico de Campinas) (Figura 7) e experimento 3 (25 ninhos em fevereiro de 2023 no Instituto Biológico de São Paulo) (Figura 8).



Figura 5 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento 1 no Instituto Biológico de São Paulo.

Fonte: Google Earth



Figura 6 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento 2 no Instituto Biológico de Campinas.

Fonte: Google Earth



Figura 7 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento 3 no Instituto Biológico de São Paulo.

Fonte: Google Earth

#### 4.6.2 Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés aplicados com tratamentos de formulação líquida.

Após um levantamento prévio da área, foram marcados, com o auxílio de bandeiras e GPS, os ninhos de *Solenopsis* spp. Para determinar a quantidade de produto a ser aplicado, foi realizado um teste simplificado para obtenção da capacidade de campo de acordo com Bernardo, Soares e Mantovani (2008). Uma amostra de solo foi colocada em um refratário de 24 cm x 24 cm x 6 cm e em seguida umedecido até a sua saturação. Com isso, foi estabelecido a quantidade de 300mL a cada 0,003 m<sup>3</sup> de solo. Em seguida, os ninhos foram medidos multiplicando-se a largura, comprimento e altura e foi realizada regra de 3 para obtenção da dosagem de acordo com a área de cada ninho medido.

Os diferentes tratamentos avaliados foram NEPs produzidos em meio sólido (6.000 Jis/mL), NEPs diluídos (2500 Jis/mL), bactéria (com 6 dias de crescimento), meio bactéria e água como controle. Para o experimento 1, foi utilizado uma média de  $7 \times 10^6$  Jis/ninho (NEPs) e  $2,5 \times 10^6$  Jis/ninho (NEPs diluído); o experimento 2, uma média de  $11 \times 10^6$  Jis/ninho (NEPs) e

$3 \times 10^6$  Jis/ninho (NEPs diluído) e o experimento 3, uma média de  $7,2 \times 10^6$  Jis/ninho (NEPs) e  $3 \times 10^6$  Jis/ninho (NEPs diluído). A variação na concentração de NEPs aplicados por ninhos deveu-se aos diferentes tamanhos dos ninhos no campo, pois para cada ninho foi calculado um volume de inóculo diferente, mas sempre mantendo a mesma concentração de Jis/mL.

Após a aplicação dos tratamentos, as colônias de formigas foram monitoradas semanalmente por um período de dois meses. Após um mês de experimento, foi realizada uma segunda aplicação dos tratamentos nos ninhos e por fim, foi realizada a avaliação final observando se houve mudança de local do ninho (migração), ou inativação da colônia que foi avaliada por meio da perturbação manual dos ninhos.

#### 4.6.3 Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés com NEPs em esponjas fenólicas

Com o objetivo de testar outros métodos de aplicação dos nematoides em campo, foi realizada aplicação de nematoides em esponjas. Os nematoides podem ser produzidos e armazenados de diversas formas, uma delas é através de esponjas fenólicas cujas condições de superfície específica e de aeração e umidade podem ampliar o seu tempo de sobrevivência.

Após um levantamento prévio da área, foram marcados com o auxílio de bandeiras e GPS, 5 ninhos de *Solenopsis* sp. (Figura 9). Em seguida, foi adicionado em média dez cubos de esponjas contendo NEPs em volta de cada ninho (Figura 10) e foi aplicado água para manter o solo úmido e propício para a movimentação dos NEPs pelo ninho. Após a aplicação, as colônias de formigas foram monitoradas semanalmente por um período de um mês, para observação de mudança de local do ninho, ou inativação da colônia que foi avaliada por meio da perturbação manual dos ninhos.

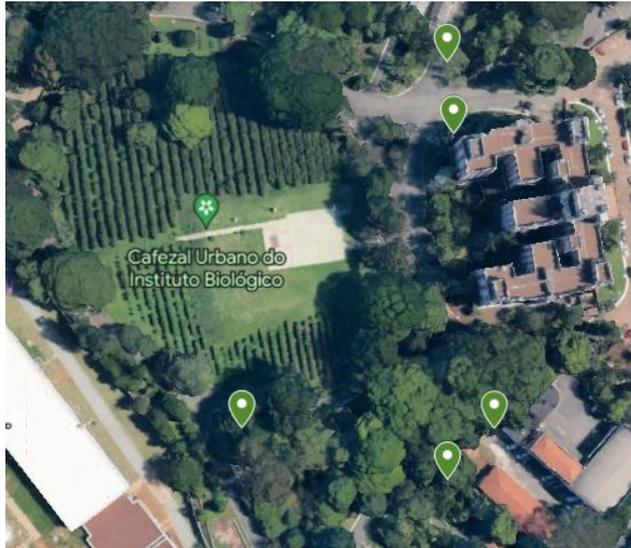


Figura 8 Localização geográfica dos ninhos marcados para a realização do experimento prático com nematoides entomopatogênicos em esponjas no Instituto Biológico de São Paulo.

Fonte: Google Earth



Figura 9 NEPs em esponjas em volta dos ninhos no Instituto Biológico de São Paulo.

Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.6.4 Avaliação da ocorrência de *Sterneinema rarum* no solo um mês após sua aplicação em ninhos de lava-pés.

Após um mês do experimento de campo, foram coletadas amostras de solo em torno de cinco formigueiros de *Solenopsis* sp. os quais foram aplicados *S. rarum*, para observar a permanência ou não do nematoide no solo. A metodologia utilizada foi a mesma do tópico “4.5 Avaliação de ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos”.

#### 4.7 Identificação dos espécimes coletados

A identificação das formigas foi realizada segundo a proposta de Paul D. N. Herbert em utilizar dados do DNA mitocondrial, mais especificamente, da COI (citocromo oxidase I), para identificação de espécies (HEBERT *et al.*, 2003). Portanto, por meio do sequenciamento de parte da COI, foram gerados fragmentos dos exemplares de cada ninho e com o uso do aplicativo Blast do banco NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) foram comparadas com as sequências depositadas no banco gênico (*gene bank*). A confirmação da espécie se dá quando há grande similaridade (acima de 99%) das sequências geradas, com valores de Score altos e E-values com valores 0 ou muito próximo, com aquelas depositadas no banco gênico (BLAST, 2022). As colônias das quais foram retirados espécimes para identificação, foram utilizadas para os experimentos de laboratório e do experimento 3 de campo.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados do percentual de mortalidade comparados ao controle foram transformados pela equação:

$\sqrt{X}/100$ , sendo X o valor de mortalidade das repetições dos tratamentos de cada experimento.

O teste empregado para a comparação das médias dos tratamentos foi o Tukey, empregando com 5% de probabilidade (IBM, 2017).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Ação de *Sterneinema rarum* e sua bactéria simbiote sobre formigas lava-pés em condições de laboratório

#### 6.1.1 Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com o nematoide entomopatogênico *Sterneinema rarum*.

Todos os tratamentos apresentaram alta mortalidade nas crias e alados, exceto o controle. O aumento da mortalidade desses indivíduos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração dos NEPs. Para as operárias foi observada uma oscilação na mortalidade entre 20 e 85% (Figura 11).

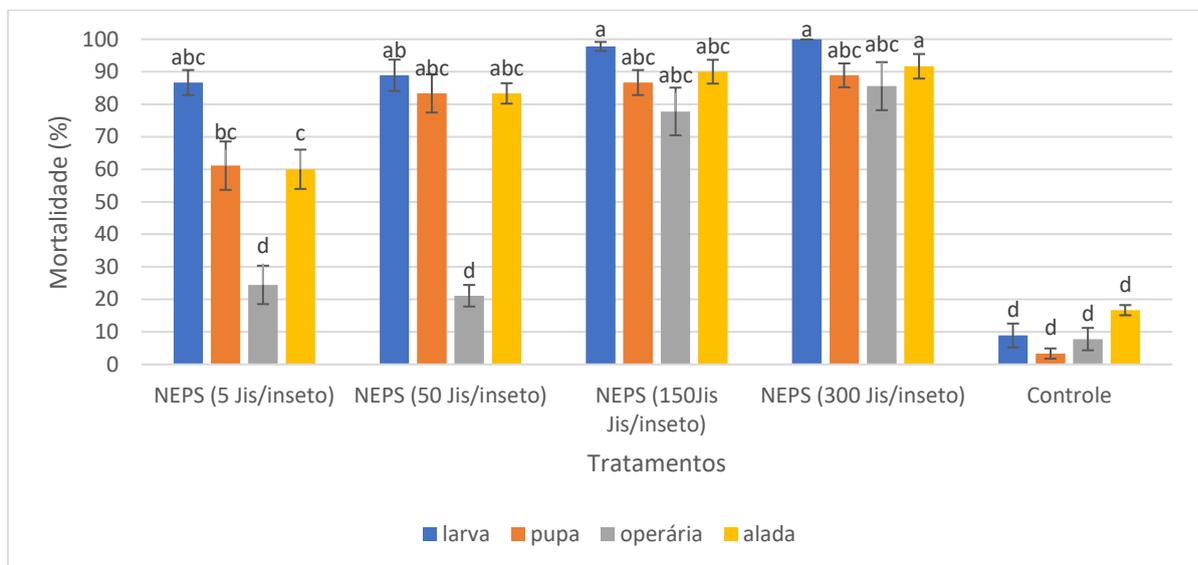


Figura 10 Porcentagem de mortalidade em diferentes estágios de lava-pés inoculadas com *Sterneinema rarum* em condições de laboratório. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%.

Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, os autores realizaram os experimentos com microcolônias de lava-pés, contendo operárias, imaturos e alados, para possivelmente obter um resultado mais próximo do que seria em um ninho no campo. Separadamente, foi possível observar a susceptibilidade das crias e adultos com a ação do nematoide, que apresentaram alta taxa de mortalidade, provavelmente pela ausência das operárias para proteger e limpar as crias.

A partir do terceiro dia, a cor das larvas e pupas foi se tornando de um tom rosa a vermelho, característico da infecção causada por esta espécie de NEP (Figura 12A e B/ Figura 13A e C).

Nas larvas que morreram, e houve emergência dos NEPs, foi observado que apenas o intestino não foi degradado (Figura 12C), provavelmente pela presença de microrganismos antagonistas à bactéria *X. szentirmaii* que impediram a degradação do tecido e digestão por parte dos NEPs que se desenvolveram dentro da larva. Zhukova *et al.* (2017) observaram em formigas *Atta* sp., bactérias Mollicutes nos intestinos das larvas, pupas e operárias adultas. Xiao *et al.* (2023) também identificaram bactérias simbióticas intestinais de *S. invicta*. As proteobactérias foram o grupo mais dominante entre as bactérias simbióticas intestinais. Também foi possível observar os nematoides emergindo de pupas (Figura 13B) e após os sete dias de observação, elas apresentaram aspecto seco (Figura 13C).

As operárias que foram parasitadas por nematoides sempre morriam em posição envergada sendo observada a emergência dos nematoides (Figura 14), porém com menor regularidade que nas crias e alados.

Os alados apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos e, em sua maioria, morriam mais rápido que as operárias, sempre em posição de dorso invertido (Figura 15A). Para essas formigas também foi possível visualizar nematoides emergindo (Figura 15B).



Figura 11 A) larvas de formiga lava-pé sadias, B) Larva parasitada com *Sterneinema rorum* 4 dias após inoculação C) NEPs emergindo da larva parasitada 5 dias após inoculação. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos



Figura 12 A) pupa de formiga lava-pé sadia, B) NEPs emergindo da pupa parasitada 5 dias após inoculação C) Pupa seca após a emergência dos NEPs, 7 dias após inoculação. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos



Figura 13 A) Operárias de *Solenopsis* sp. parasitadas por *Steinernema. rarum* na região da cabeça, 4 dias após inoculação, B) NEPs emergindo do abdômen C) NEPs emergindo do aparelho bucal, 6 dias após inoculação. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos



Figura 14 A) Indivíduo alado de *Solenopsis* sp. morto em posição dorsal invertido B) NEPs emergindo do abdômen. NEPs – Nematoides Entomopatogênicos

Semelhante aos valores obtidos nesse experimento, LiKun *et al.* (2010) analisaram a ação do nematoide *Steinernema carpocapsae* e *S. scapterisci* em rainhas de *S. invicta* e observaram mortalidade acima de 50% após dois dias da aplicação, chegando a 100% de mortalidade no sexto dia após inoculação. Importante salientar que esta dissertação trata do primeiro estudo a avaliar a ação dos NEPs *S. rarum* em formigas lava-pés.

### 6.1.2 Avaliação da mortalidade de crias e adultos de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria *Xenorhabdus szentirmai*.

Foi observada alta mortalidade (acima de 70%) de larvas e operárias com o tratamento bactéria, 4 dias após inoculação e para o tratamento M.S, as larvas mantiveram altas porcentagens de mortalidade (85,5%). O meio bactéria, sendo um tratamento de controle, não deveria causar mais de 20% de mortalidade nos indivíduos, porém foi registrada a mortalidade de 61% das operárias com esse tratamento, provavelmente devido a algum composto no meio de cultura (Figura 16).

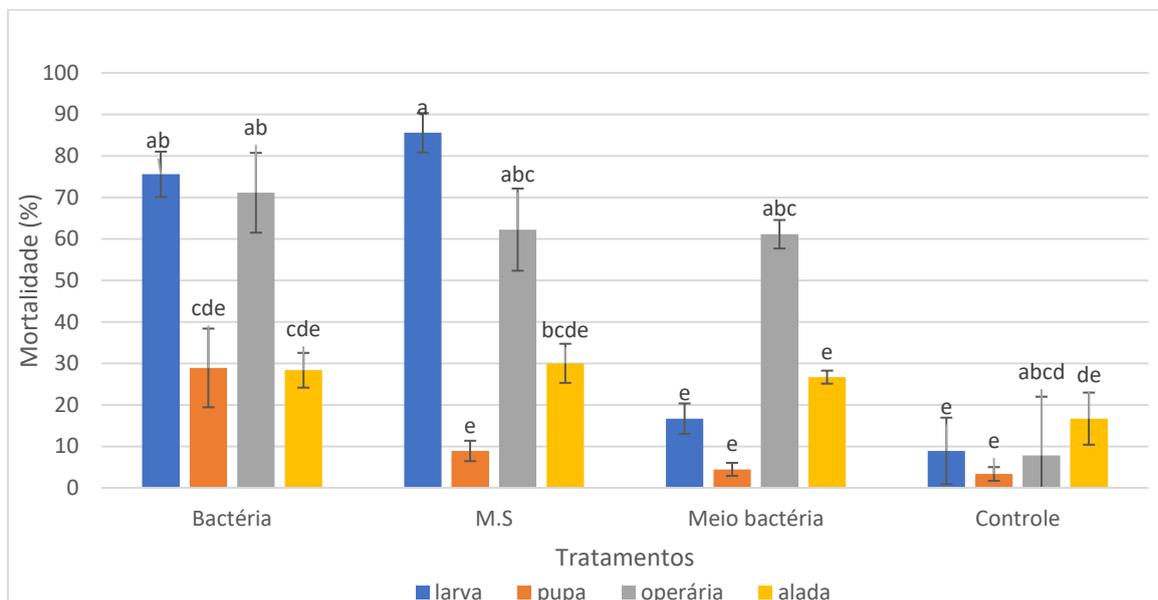


Figura 15 Porcentagem de mortalidade em diferentes estágios de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria simbiote do nematoide *Sterneinema rarum* em condições de laboratório. M.S. – Metabólitos secundários. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%.

Foi possível observar sintomas de infecção pela bactéria e seus metabólitos secundários apenas nas larvas e pupas pela mudança de coloração, apresentando tom rosa a avermelhado, esta característica é única para *S. rarum* e não foi relatada para nenhuma outra espécie de *Steinernema* (Figura 17). Nguyen *et al.* (2006) também observaram a mudança de coloração em lagartas de *Galleria mellonella* inoculadas com *S. rarum* após 3 dias.

Também foi notado a presença de cristais de Poly-Iodina (pequenos pontos roxos), produzido pelas bactérias no interior do corpo do inseto e ao redor deles no papel filtro (FODOR *et al.*, 2008) (Figura 17 B e C). Estes cristais também são produzidos na superfície

das colônias das bactérias quando multiplicadas em meio de cultura NBTA (Figura 17 D). Após 7 dias da inoculação as formigas nestes estágios ficaram desintegradas.

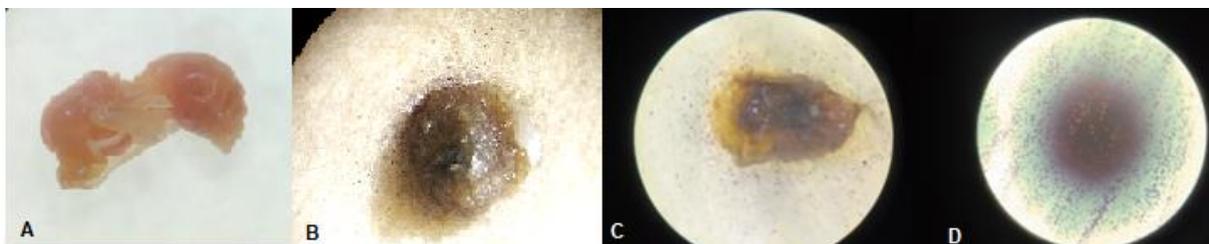


Figura 16 A) larva de formiga lava-pé 4 dias após da inoculação com metabólitos secundários B) Larva de formiga lava-pé 4 dias após da inoculação com a bactéria simbiote C) Larva de formiga lava-pé 7 dias após da inoculação com os metabólitos secundários da bactéria D) Cristais de Iodina nas colônias da bactéria em meio NBTA.

Não foi encontrado trabalhos avaliando a ação a bactéria simbiote de *Sterneinema rarum* sobre formigas, porém Dudney *et al.* (1997) observaram que a bactéria *Xenorhabdus nematophila* inoculada por injeção na hemolinfa é tóxica para *Solenopsis invicta*. Em 2006, DePaula *et al.* avaliaram a patogenicidade da bactéria *Photorhabdus temperata* sobre formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). A bactéria causou alta mortalidade (>80% e 60%, respectivamente), para as duas espécies de formigas após 24h de inoculação.

Uribe-Londoño *et al.* (2019) testaram os extratos das bactérias simbiotes de NEPs contra formigas cortadeiras *Atta cephalotes* e reportaram ação inseticida por ingestão causada por *Photorhabdus* sp. e por contato causada por *X. nematophila*. Além disso, as duas bactérias produziram metabólitos secundários com ação antifúngica contra o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

As bactérias podem ter outros potenciais, como controladoras de fungos para as formigas cortadeiras. Chacon-Orozco *et al.* (2018) testaram os metabólitos secundários da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* para a inibição do fungo simbiote da formiga-cortadeira *Atta sexdens*. Os metabólitos causaram total inibição do desenvolvimento do fungo simbiote das formigas-cortadeiras já nos primeiros dias da condução dos testes. A utilização de bactérias simbiotes de NEPs ainda não é explorada comercialmente, mas existem alguns trabalhos que demonstram o potencial de uso para o controle de insetos praga para o controle de doenças fúngicas e bacterianas em plantas.

### 6.1.3 Ação de *Sterneinema rorum* e sua bactéria simbiote sobre microcolônias de formigas lava-pés, em condições de laboratório.

Foi observada 100% de mortalidade das formigas aladas para todos os tratamentos com NEPs. Alta mortalidade também foi registrada em operárias, quanto maior a concentração de nematoides, chegando a 80% de mortalidade (Figura 18). As larvas e pupas apresentaram uma menor taxa de mortalidade, o que poderia ser explicado pela presença das operárias, que em sua maioria foram observadas protegendo os imaturos.

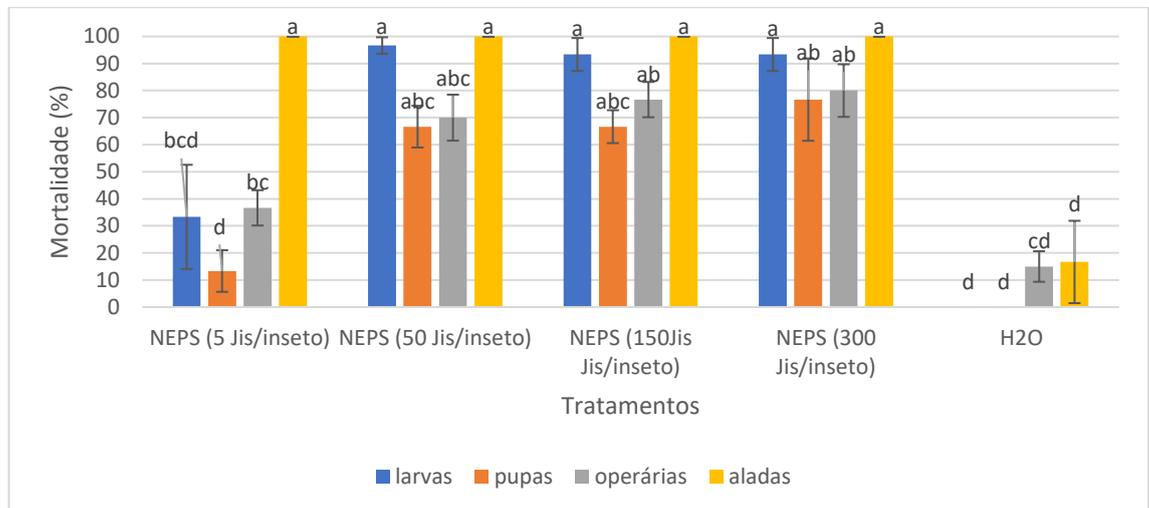


Figura 17 Porcentagem de mortalidade sobre microcolônias de lava-pés inoculadas com *Sterneinema rorum* em condições de laboratório. NEPs- Nematoides Entomopatogênicos. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%.

Altas taxas de mortalidade de alados também foram registradas nos tratamentos com bactéria e metabólitos secundários. Entretanto, a mortalidade também foi expressiva no tratamento meio bactéria, que foi utilizado como controle, ultrapassando mais de 20% de mortalidade dos indivíduos alados, assim como das operárias (Figura 19).

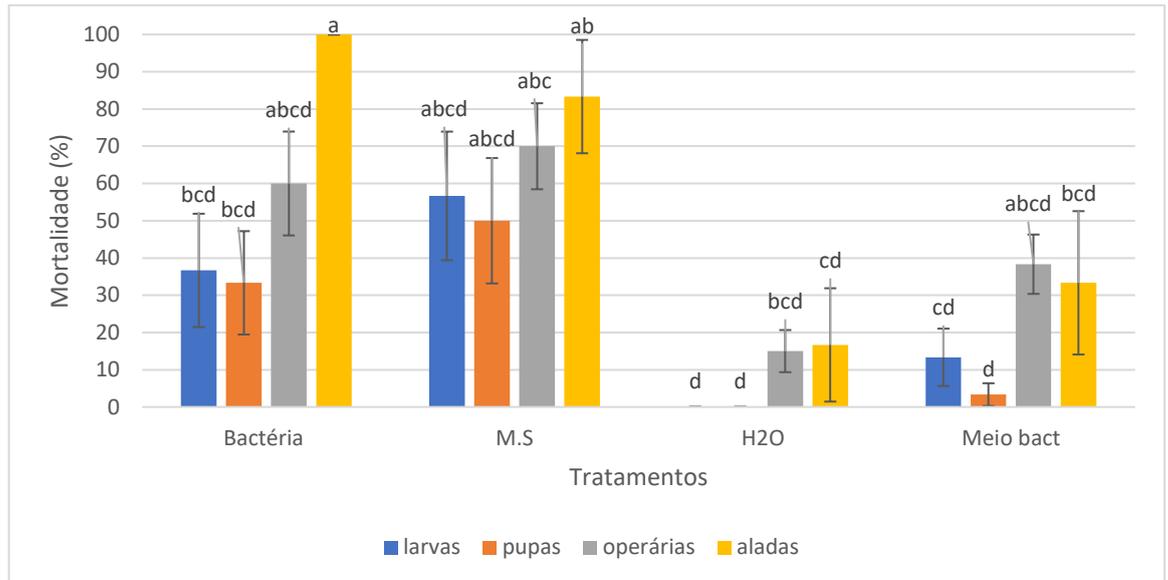


Figura 18 Porcentagem de mortalidade de microcolônias de formigas lava-pés inoculadas com a bactéria simbiote do nematoide entomopatogênico em condições de laboratório. Meio bact. – Meio bacteriano, M.S- metabólitos secundários. Letras diferentes apresentam diferença estatística segundo o Teste de Tukey 5%.

Jouvenaz, Lofgren e Miller (1990) realizaram um experimento com metodologia diferente da utilizada no nosso experimento. Os pesquisadores utilizaram tubos de vidro de 16 x 125 mm para os testes de controle de *Solenopsis* sp. com nematoides da espécie *Sterneinema feltiae*. Nesses tubos foi adicionado solo arenoso umedecido e cerca de 25-30 operárias, algumas larvas e a rainha. Os resultados de mortalidade foram positivos, ocorrendo a morte de até 58% das rainhas e também uma mortalidade muito elevada em operárias e imaturos. Neste experimento foi observado um comportamento de limpeza das formigas operárias assim que o tratamento era aplicado, além de protegerem e limparem os imaturos.

Drees *et al.* (1992) também registraram comportamento de limpeza das formigas lava-pés assim que os nematoides foram aplicados em um experimento de campo. Os autores descreveram que as formigas limpavam vigorosamente os nematoides dos imaturos, dos alados e de si mesmas. Nesse mesmo trabalho, os resultados de controle de *S. invicta* com a aplicação do nematoide *Steinernema carpocapsae* em larvas, pupas e alados em condições de laboratório, a mortalidade variou de 28 a 100% em doses de  $10^3$  e  $10^5$  juvenis infectantes por placa de Petri após 96 horas.

Zhang e Han (2011) também notaram um comportamento de proteção das operárias de formigas lava-pés com as rainhas em experimentos com o nematoide *Sterneinema carpocapse*. Esses autores observaram que quanto maior a quantidade de operárias, menor era a mortalidade das rainhas.

Em um experimento realizado por Zarzuela *et al.* (2012), utilizando os nematoides *Steinernema carpocapse* e *Heterorhabditis* sp. para o controle de formigas da espécie *Monomorium floricola*, foram colocadas cerca de 2-3mil formigas contendo operárias, larvas e rainhas em uma placa de Petri (5 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade) com as tampas pintadas com tinta plástica preta para diminuir a intensidade de luz, tendo sido observada a morte de cerca de 500 operárias com a aplicação dos nematoides. Os autores registraram que, as colônias como um todo, não diminuíram em tamanho, tendo por vezes, um pequeno aumento no número de indivíduos. Esse aumento pode ser explicado como uma tentativa de recuperação da colônia frente a uma forma de controle. Em nenhum tratamento as operárias apresentaram sinais de infecção por nematoides, ao contrário das formas imaturas.

## 6.2 Avaliação de ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos

Após 10 dias, as larvas de *Galleria melonella* permaneceram sem sintomas de infecção por nematoides, tanto no solo de controle como no solo dos formigueiros coletados. A presença dos nematoides no solo, sob condições naturais e sua consequente patogenicidade, podem ser influenciadas por vários fatores ambientais, incluindo a composição do solo, radiação, temperaturas extremas e a microfauna do solo (MOLYNEUX, 1986), o que pode explicar os resultados obtidos.

Zarzuela *et al.* (2012) isolaram nematoides de 36,36% em ninhos de outras espécies de formigas, enquanto nos ninhos de *Solenopsis* sp. avaliados, nenhum nematoide foi encontrado.

Em uma das amostras de solo foram observados sintomas causados possivelmente por fungos nas larvas de *G. melonella*. Zarzuela *et. al* (2012) também registraram fungos nos ninhos de formigas que foram estudados em sua pesquisa, porém estavam mais associados às demais espécies de formigas estudadas, 72,73%, do que em ninhos de *Solenopsis* spp., (27,45%).

6.3 Ação de *Steinernema rarum* e sua bactéria simbiote *Xenorhabdus szentirmaii* em colônias no campo.

6.3.1 Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés aplicados com tratamentos em formulação líquida.

Após dois meses da aplicação, o experimento 2 foi o único que não apresentou ninhos com atividade de migração para nenhum tratamento testado. O tratamento bactéria causou acima de 60% de ninhos desativados nos três experimentos realizados e no experimento 3 foi o único tratamento que não apresentou migração dos ninhos, além do controle (Figuras 20, 21 e 22).

Para os tratamentos NEPs (6000 jis/mL), NEPs (2500 Jis;/mL), o experimento 2, realizado no Instituto Biológico de Campinas, foi o que obteve maiores porcentagens de ninhos desativados (85,7%) (Figura 21).

Para o tratamento meio bactéria, houve desativação de 60% dos ninhos testados e 20% dos ninhos com atividade de migração (Figura 22).

É comum ocorrer a migração dos ninhos após perturbação externa, e após dois meses apenas o experimento 2 não apresentou atividade de migração para nenhum dos ninhos (Figura 21). Para os experimentos 1 e 3, durante as semanas em que foram acompanhados, ocorreram perturbações em alguns ninhos tratados, por parte de funcionários desavisados, que mesmo com as marcações sobre a pesquisa, realizaram limpeza e manutenção da área, sendo assim difícil concluir se a migração ocorreu exclusivamente por conta dos tratamentos aplicados ou devido a tais perturbações.

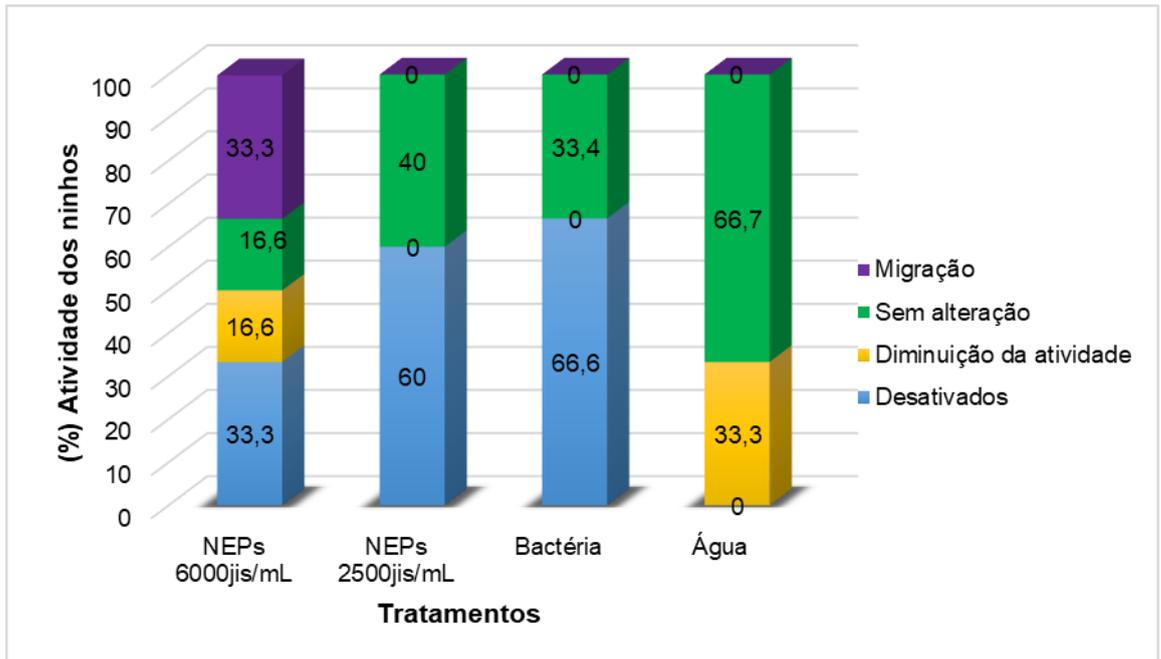


Figura 19 Efeito dos tratamentos com NEPs (Nematoides Entomopatogênicos) e bactérias simbiotes de nematoides, sobre ninhos de formigas lava-pés em campo. Experimento 1 - Instituto Biológico em São Paulo

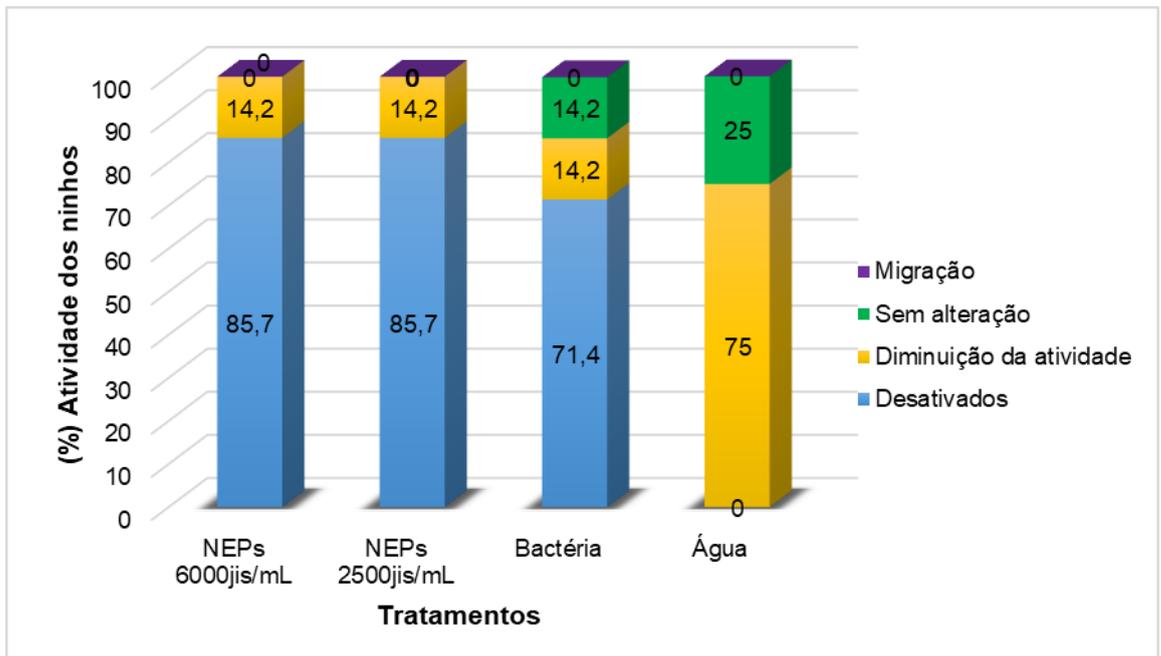


Figura 20 Efeito dos tratamentos com NEPs (Nematoides Entomopatogênicos) e bactérias simbiotes de nematoides, sobre ninhos de formigas lava-pés em campo. Experimento 2 - Instituto Biológico em Campinas

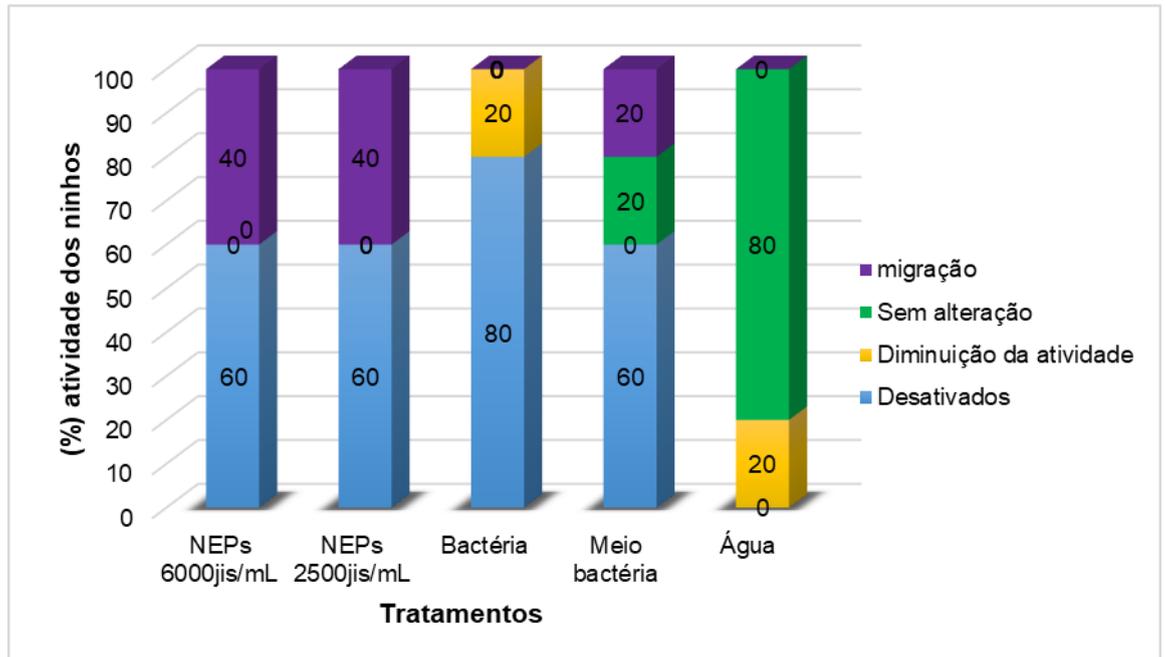


Figura 21 Efeito dos tratamentos com NEPs (Nematoides Entomopatogênicos) bactérias simbiotes de nematoides e meio bactéria, sobre ninhos de formigas lava-pés em campo. Experimento 3 - Instituto Biológico em São Paulo

Quattlebaum (1979) observou mortalidade de 88,2-96,8% nas colônias de lava-pés testadas com *Steinernema carpocapse* e *Heterorhabditis heliothidis* ( $2 \times 10^6$  nematoides/ninho). Morris, Stewart e Hassage (1990) realizaram um experimento para comparar a ação de *S. carpocapsae* e do químico Amidinohidrazona em colônias de *Solenopsis invicta*. Foi registrada uma estimativa de 47% de controle com o nematoide, em comparação com 39% de controle obtido pela Amidinohidrazona após seis semanas de observação. Os autores aplicaram 2 milhões NEPs/3,8 litros de água por ninho

Jouvenaz, Lofgren e Miller (1990) testaram o nematoide *Sterneinema feltiae* em laboratório e posteriormente nos ninhos de formigas lava-pés em campo e, por mais que os testes de laboratório tenham matado até 58% das rainhas e uma porcentagem muito alta de operárias adultas e imaturos, o controle das colônias não foi eficaz nos testes de campo. Os autores ainda destacaram que o solo muito seco do local pode ter influenciado negativamente a ação dos nematoides, fator o qual também foi observado no trabalho desenvolvido nesta dissertação de mestrado.

Em 1976 foi realizado um experimento para o controle de *Solenopsis richteri* Forel, 1909 no Mississippi (EUA) utilizando a concentração de 1 milhão de nematoides *S. carpocapsae* por ninho. Os autores obtiveram 35% das colônias desativadas após 90 dias de observação e também notaram que a aplicação do nematoide, com *spray* pressurizado, foi

mais eficiente quando comparado com a aplicação dos nematoides via cadáveres de *Galleria* sp. (POOLE, 1976).

Os diferentes resultados dos estudos encontrados nos mostram que a ação de nematoides depende da espécie de formiga tratada, espécie de NEPs e fatores do solo como umidade, temperatura, entre outros.

### 6.3.2 Avaliação da mortalidade de ninhos de formigas lava-pés com NEPs em esponjas fenólicas

No momento da aplicação das esponjas, foi observada uma menor agitação das formigas comparativamente com a aplicação dos tratamentos em formulação líquida. Porém, no dia seguinte, as esponjas apresentaram um aspecto seco, o que pode ter dificultado a movimentação dos nematoides pelo ninho. A migração dos ninhos foi observada nos ninhos 1 e 4 na segunda semana de observação enquanto o ninho 2 apresentou diminuição de atividade e foi desativado sem a presença de ninhos pelo entorno (Figura 23).

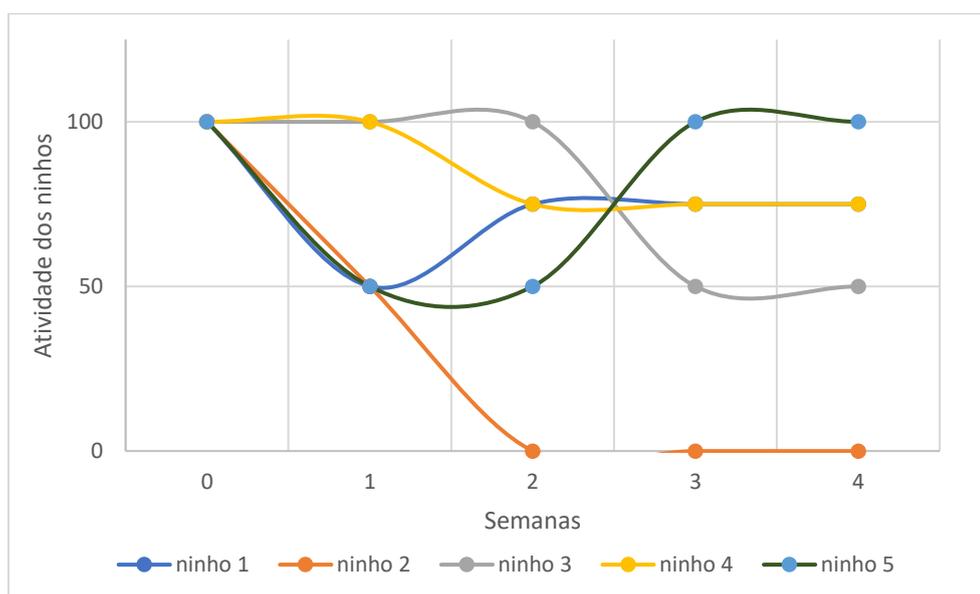


Figura 22 Atividade dos ninhos de lava-pés aplicados com NEPs em esponjas durante um mês de observação. Legenda. Atividade dos ninhos: 0 (Desativado), 50 (Diminuição de atividade), 75 (Migração) e 100 (Sem alteração).

### 6.3.3 Avaliação da ocorrência de *Sterneinema rarum* no solo um mês após sua aplicação em ninhos de lava-pés.

Após 10 dias, as larvas de *Galleria melonella* permaneceram sem sintomas de infecção por nematoides nas amostras de solo coletadas no entorno dos ninhos aplicados com *S. rarum*. Esse resultado nos mostra que os nematoides que foram aplicados nos ninhos, possivelmente, não conseguiram sobreviver no solo após um mês, sendo provavelmente necessário uma regular aplicação de água nos ninhos para que os nematoides consigam sobreviver durante um longo período no solo e assim conseguir infectar um maior número de formigas antes que essas migrem para outro local.

Os NEPs, por serem naturais do solo, sofrem influência de características deste habitat, como tamanho dos poros, umidade, concentração de gás oxigênio, temperatura e pH (Barbercheck, 1992). Jesus (2009) observou que o substrato com 30% de umidade destacou-se como o mais favorável para a sobrevivência dos nematoides ao longo dos 30 dias de observação.

Solos encharcados são também considerados limitantes à sobrevivência de NEPs devido ao preenchimento dos poros com água, o que diminui a aeração e, conseqüentemente, a quantidade de oxigênio disponível. O que foi confirmado pela alta mortalidade, de 88% observada logo nos três primeiros dias do mesmo estudo. Portanto, são necessários mais estudos sobre os valores ideais de pluviosidade para aplicação dos nematoides no solo.

## 6.4 Identificação dos espécimes coletados

A análise das sequências gênicas das amostras coletadas dos ninhos utilizados para os testes em laboratório e do experimento 3 de campo nos mostra uma grande similaridade com a espécie *Solenopsis invicta* (Tabela 1).

Em um estudo realizado no Instituto Biológico, em 2010, foi identificado tanto haplótipos com similaridade das sequências de *S. saevissima* e *S. invicta*, porém a predominância de *S. invicta* no ambiente foi notada em 80% dos ninhos coletados (GUSMÃO, HAKAKAVA e CAMPOS, 2010). No município de Rio Claro, SP, foram identificados ninhos de *S. invicta* com uma abundância de 92,3% do total de ninhos em relação a *S. saevissima* (FOX, SOLIS e BUENO, 2008). Já em um estudo realizado por Campos (1991), foi encontrada uma maior distribuição de *S. saevissima* no estado de São Paulo, e *S. invicta* foi encontrada em apenas um local.

Código das amostras	Espécie	Similaridade (BLAST)	Haplótipo DNA m	Código de acesso no GenBank
V1	<i>Solenopsis invicta</i>	99,27%	H58	AY950752.1
V2	<i>Solenopsis invicta</i>	99,03%	H42	AY950737.1
V3	<i>Solenopsis invicta</i>	99,27%	H58	AY950752.1
L1	<i>Solenopsis invicta</i>	100%	H41	AY950736.1
L2	<i>Solenopsis invicta</i>	99,27%	H58	AY950752.1
L5	<i>Solenopsis invicta</i>	99,03%	H42	AY950737.1
A1	<i>Solenopsis invicta</i>	98,79%	H58	AY950752.1
A2	<i>Solenopsis invicta</i>	98,31%	H42	AY950737.1
A3	<i>Solenopsis invicta</i>	98,55%	H58	AY950752.1
B1	<i>Solenopsis invicta</i>	99,75%	H41	AY950736.1
R2	<i>Solenopsis invicta</i>	98,78%	H58	AY950752.1
NA	<i>Solenopsis invicta</i>	99,51%	H58	AY950752.1

Tabela 1. Identificação dos espécimes coletados para os testes em laboratório e do experimento 3 de campo, os respectivos códigos de acesso no GenBank, haplótipos, a porcentagem de similaridade de acordo com o BOLD Systems e BLAST.

## 7 CONCLUSÕES

Nos testes de laboratório, os nematoides em concentração de 300JIs/inseto causaram de 70 a 100% de mortalidade das formigas em todos os estágios de desenvolvimento das formigas lava-pés (larva, pupa, operárias e alados).

As larvas foram mais suscetíveis a bactéria e aos metabólitos secundários nos testes de laboratório quando foram individualizadas, comparativamente com o experimento de microcolônias.

Nos experimentos de campo, os tratamentos NEPs (2500Jis/mL) e bactéria, obtiveram 60% ou mais dos ninhos desativados após dois meses de observação.

No solo dos ninhos de formigas lava-pés, não foi observada a presença de nematoides antes e um mês após a aplicação dos tratamentos.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de nematoides para o controle de formigas-lava-pés é promissor, entretanto, mais estudos devem ser realizados, por exemplo, o teste com outras concentrações de juvenis infectantes, a investigação da mortalidade de formigas com o tratamento meio bactéria, a umidade de solo ideal para a aplicação, o método e o número de aplicações, assim como o intervalo das aplicações.

## 9 REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and sistematics, New York: CABI. 2002. 1-34.
- AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bactéria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. **Microbiology**, 121, n. 2, 1980. 303-309.
- ALLEN, C. R. *et al.* Effects of fire ant (Hymenoptera: Formicidae) on hatching turtles and prevalence of fire ants on sea turtles nesting beaches in Florida. **Florida Entomologist**, 84, 2001. 250-254.
- ANTWEB , 2022. Disponível em: <<https://www.antweb.org>>. Acesso em: 13 Setembro 2022.
- ASANO, E.; CASSIL, D. L. Modeling temperature-mediated fluctuation in colony size in the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Journal of Theoretical Biology**, 305, 2012. 70-77.
- ASCUNCE, M. S. *et al.* Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Science**, 331, 2011. 1066–1068.
- AZEVEDO FILHO, P. A. D.; SARAIVA NETO, J. D. D. S.; MORAIS, S. M. D. Diversidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) de solo nas vizinhanças do Parque Estadual Botânico do Ceará, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2021. 1-12.
- BACCARO, B. F. *et al.* Guia para os gêneros de formigas do Brasil, Manaus, 2015. 388 p.
- BANKS, W.A. *et al.* Imported fire ant infestation of soybean fields in the southern United States. **Florida Entomologist**, 73, n. 3, 1990. 503-504.
- BARBERCHECK, M. E.; DUNCAN. L. Abiotic factors, p.309-343. In R. Gaugler, A. L Bilgrami (Eds). *Nematode Behavior*. Cabi Publishing, 419p., 2004.
- BARBOSA-NEGRISOLI, CRC; GARCIA, MS; DOLINSKI, CM; NEGRISOLI JÚNIOR, AS; BERNARDI, D.; NAVA, DE Eficiência de nematóides entomopatogênicos indígenas (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), do Rio Grande do Sul, Brasil, contra *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro. **Journal of Invertebrate Pathology** , Nova York, v. 102, p. 6-13, 2009.

BERNARDO, S.; SOARES, A.A.; MANTOVANI, E.C. **Manual de irrigação**, Editora UFV. 8. ed.

BIOLÓGICO. Instituto Biológico do Estado de São Paulo, 2022. Disponível em: <<http://www.biológico.sp.gov.br/page/quem-somos>>. Acesso em: 22 Agosto 2022.

BIRD, A. F.; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal of Parasitology**, 13, 1983. 599-606.

BLAST. Nacional Library of Medicine. **Nacional Center for Biotechnology Information**, 2022. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

BLAXTER, M. L. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, 392, 5 Mar 1998. 71-5.

BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. As formigas domésticas. In: MARICONI, F. A. M. (. **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba, FEALQ, : [s.n.], 1999. p. 135-180.

CALDERA E, J. *et al.* Putative native source of the invasive fire ant *Solenopsis invicta* in the USA. **Biol. Invasions**, 10, 2008. 1457-1479.

CAMPOS, A. E. C. **Relação entre fatores bióticos e abióticos, distribuição e densidade de formigas do gênero Solenopsis (complexo saevissima), nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. [S.l.], p. 108. 1991.

CAMPOS, Ana E. D. C.; ZORZENON, Francisco J.; JUNIOR, João J. Formigas Urbanas. **Instituto Biológico**, 2017. 68.

CAMPOS-FARINHA, A.E.C. *et al.* Formigas Urbanas. **Boletim Técnico Inst. Biológico**, 1995. 5-21.

CASSILL, Deby L.; TSCHINKEL, Walter R.; VINSON, Bradleigh. Nest complexity, group size and brood rearing in the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Insectes Sociaux**, 79, 2002. 158-163.

CASTELIANI, A. *et al.* Behavioral aspects of *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), damage to sugarcane and its natural infection by *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditidae). **Crop Protection**, 2020.

CHACÓN-OROZCO, J. G. C. *et al.* Inhibition of symbiote fungus of the leaf cutter ant *Atta sexdens* by secondary metabolites from the bacterium *Xenorhabdus szentirmaii*

associated with entomopathogenic nematodes. **Arquivos do Instituto Biológico**, 85, n. 0, 2018.

CHACÓN-OROZCO, J. G. *et al.* Antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. against the soybean pathogenic *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientific Reports**, 10, n. 1, 2020.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 2003. 1890–1897.

COLLINS, H. L.; LINDREGREN, J. Laboratory tests with *Steinemema carpocapsae*. **Annual report USDA–APHIS, Imported Fire Ant Station**, Gulfport, MS., 1990.

DELLA LUCIA, T. M. C. Hormigas de importancia económica em la región Neotropical. In: FERNANDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá: Acta Nocturna, 2003. p. 337-349.

DONAT, Agosti *et al.* **Ants**: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Smithsonian Institution Press, Washington, 2000.

DREES, B. M. *et al.* Susceptibility and Behavioral Response of Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) to Selected Entomogenous Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae & Heterorhabditidae). **Journal of Economic Entomology**, 85, n. 2, 1992. 365–370.

FERNANDES, E. F. *et al.* Uso do pulverizador fumacê no controle de formigas de fogo em área urbana. **Brazilian Journal of Development**, 7, n. 1, 2021. p.6554-6565.

FODOR A, FORST S, HAYNES L, HEVESI M, HOGAN J, KLEIN MG, MATHE-FODOR A, STACKEBRNDT E, SZENTIRMAI A, SZTARICKSKAI F. *et al.* 2008. New perspectives of *Xenorhabdus* antibiotics research. In IOBC/WPRS Bulletin: Insect Pathogens Insect Parasitic Nematodes. Edited by Ehlers RU, Enkerli J, Glazer I, Lopez-Ferber M, Tkaczuk C. IOBC/WPRS:157-164

FOX, E. G. P.; SOLIS, D. R.; BUENO, O. C. Espécies de formigas lava-pés (Hymenoptera: Formicidae: Solenopsis) no município de Rio Claro, SP. **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2008.

FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília., 2001.

GREWAL, P., S.; EHLERS, R.; SHAPIRO-ILAN, D., I. **Nematodes as Biocontrol Agents**. CABI Publishing, 2005.

GUSMÃO, F. A.; HARAKAVA, R.; CAMPOS, A. E. D. C. Fire-Ants of the *Solenopsis saevissima* Species-Group (Hymenoptera: Formicidae) Nesting in Parks in the city of Sao Paulo: Identification Based on mtDNA Sequences and Morphological Characters. **Sociobiology**, 56, n. 2, 2010. :353-362.

HADDAD JUNIOR, V. Identificação de enfermidades agudas causadas por animais e plantas em ambientes rurais e litorâneos: auxílio à prática dermatológica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, 84, 2009. 343-348.

HEBERT, P. D. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci.**, 270, February 2003. 313-321.

HEDGES, S. A. **Field guide for the management of the structure-infesting ants**, n. 2, 1998. 304.

HENSHAW, MT *et al.* Genética populacional e história da formiga de fogo introduzida, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), na Austrália. **Australian Journal of Entomology**, 44, 2005. 37-44.

HÖLLDOLBLER, B.; WILSON, E. O. *The ants.*, Cambridge, Harvard University Press, 1990. 732.

IBM., Corp. IBM SPSS Statistics para Windows, Armonk, NY: IBM Corp., 2017.

JESUS, F. K. Efeito da umidade do substrato na sobrevivência e na infectividade de juvenis de vida livre de *Heterorhabditis amazonensis* (Nematoda, Heterorhabditidae). Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juíz de Fora. 2009.

JOUVENAZ, D. P.; LOFGREN, C. S.; MILLER, R. W. Steinernematid Nematode Drenches for Control of Fire Ants, *Solenopsis invicta*, in Florida. **The Florida Entomologist**, 73, n. 1, March 1990. 190-193.

JOUVENAZ, D. P.; MARTIN, W. R. Avaliação do Nematódeo *Steinernema carpocapsae* no controle de formigas-de-fogo em viveiro. **The Florida Entomologist**, 75, n. 1, 1992. 148-151.

JOUVENAZ, D.P.; BANKS, W.A.; ATWOOD, J.D. Incidence of pathogens in fire ants, *Solenopsis* spp. In Brazil. **Florida Entomologist**, 63, 1980. 345-346.

KAYA, H, K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, 38, 1993. 181-206.

LEE, J.K.; BETSCHEL, S.D. A case of the first documented fire ant anaphylaxis in Canadá. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, 9, n. 25, 2013. 1-2.

LEITE, LUÍS G. **Tecnologia Sustentável: Nematóides contra insetos.**

LIKUN, Z. *et al.* Susceptibility of red imported fire ant queens to the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* all and *S. scapterisci*. **Sociobiology**, 55, 2010. 519-526.

LONDOÑO, M. U.; ROMERO-TABAREZ, M.; Ortiz-Reyes, A. Extratos bacterianos para o controle de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) e seu fungo simbiótico *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Agaricaceae) **Revista de Biologia Tropical**, vol. 67, nº. 4 de 2019

LU, Y. Y.; LIANG, G. W.; ZENG, L. Study on expansion pattern of red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren, in South China. **Scientia Agricultura Sinica**, 41, 2008. 1053–1063.

LUNZ, A. M. *et al.* Danos de *Solenopsis saevissima* F Smith (Hymenoptera: Formicidae) em Paricá, *Schizolobium amazonicum*. **Neotropical Entomology**, v.38, n.2, Abril 2009. 285-288.

MAHIMASANTHI, A. *et al.* Association of ants with pink hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) and its influence on predatory fauna in mulberry ecosystem. **J. Biopesticides**, 2014. 47-51.

MARTINS, C. Análises moleculares das formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) e da presença da endobactéria *Wolbachia*, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010. 87.

MOLYNEUX, S. Heterorhabditis spp. And *Steinernema* (= *Neoaplectana*) spp.: temperature, and aspects of behavior and infectivity. **Experimental Parasitology**, 62, 1986. 169-180.

MORALES, M. A.; BEAL, A. L. H. Effects of host plant quality and ant tending for treehopper *Publilia concava*. **Annals of the Entomological Society of America**, 99, 2006. p. 545-552..

MORRIS, J. R.; STEWART, K. W.; HASSAGE, R. L. Use of the Nematode *Steinernema carpocapsae* for Control of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae). **The Florida Entomologist**, 73, n. 4, Dec. 1990. 675-677.

MORRISON, L. W.; PORTER, S. D. Positive Association Between Densities of the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), and Generalized Ant and Arthropod Diversity. **Environmental Entomology**, 32, n. 3, June 2003. 548–554.

NGUYEN K.B.; SHAPIRO-ILAN D.I.; FUXA J.R.; WOOD B.W.; BERTOLOTTI M.A.; ADAMS B.J. Taxonomic and Biological Characterization of *Steinernema rarum* Found in the Southeastern United States. *J Nematol.* 2006;38(1):28-40.

OI, D. *et al.* Introduction of fire ant biological control agents into the Coachella Valley of California. **The Florida Entomologist**, 102, n. 1, 2019. 284-286.

OLIVEIRA, B. V. D. C.; MORINI, M. S. D. C. Ocorrência de *Solenopsis* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) em áreas de cultivos de hortaliças no Alto Tietê. **Revista Científica da UMC**, v.6, n.2, 2021.

OROZCO, J. C. ET AL. Inibição do fungo simbiote da formiga-cortadeira *Atta sexdens* por metabólitos secundários da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* associada a nematoides entomopatogênicos. *Arq. Inst. Biol.*, v.85, 1-6, e0172018, 2018.

PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; STIMAC, J. L. GROWTH OF BEAUVERIA BASSIANA IN FIRE ANT NEST SOIL WITH AMENDMENTS. **JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY**, ORLANDO, 62, 1993. 9-14.

PINTO, L. M. B.; FERNANDES, E. F.; PREZOTO, F. Controle de Formigas Lava-pés: Onde Encontro Informações? **Rev. Bras. Zoociências**, 20, n. 1, 2019. 1-9.

PITTS, J. P.; MCHUGH, JOSEPH V.; ROSS, KENNETH G. Cladistic analysis of the fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group (Hymenoptera: Formicidae). **Zoologica Scripta**, 34, September 2005. p493–505.

POINAR JR., G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae.. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. [S.l.]: Boston: CRC Press, v. 25, 1990. p. 23-62.

POOLE, M. A. Survey and control efficacy of endoparasites of *Solenopsis richteri* Forel and *Solenopsis invicta* Buren in Mississippi., Ph.D. dissertation. Mississippi State University, Mississippi State, 1976.

RHOADES, W. C.; DAVIS, D. R. Effects of meteorological factors on the biology and control of the imported fire ant. **Journal of Economic Entomology**, 60, 1967. 554-558.

RODRIGUES, V. Z. Hábitos de nidificação e resposta de *Solenopsis saevissima* (Smith) (Formicidae, Myrmicinae) à perturbação em ambiente urbano. Dissertação de Mestrado, pós graduação em Comportamento e Biologia Animal, UFJF, 40p, 2013.

SANTOS, L. M. D. Diversidade genética e ocorrência de *Solenopsis* spp. (Formicidae: Myrmicinae) em municípios do Alto Tietê (São Paulo). **Dissertação (Mestrado) programa de Pós Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes**, Mogi das Cruzes, SP, 2017. 62.

SANTOS-PREZOTO, H. H. Eficácia formicida do Timol, Carvacrol, Eugenol e (E)-Cinamaldeído sobre Lava- Pés *Solenopsis saevissima* (SMITH, 1855). **Tese (Doutorado) Programa de Pósgraduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, 2019. 62-88.

SIBINEL, S. Avaliação de extratos aquosos para o controle de *Solenopsis* spp. (Hymenoptera:Formicidae) em condições de laboratório. **Monografia ( Especialista no Curso de Entomologia Urbana)** , Unesp Rio Claro- SP, 2008. p26.

SOLLEY, G.O.; VANDERWOUDE, C.; KNIGHT, G.K. Anaphylaxis due to Red Imported Fire Ant sting. **MJA**, 176, n. 3, 2002. 521-523.

TORRES, J. B.; OLIVEIRA, M. D.; LIMA, M. S. Cochonilhas farinhentas: potenciais problemas para o algodão brasileiro. **Informativo Redalgo 005**, Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2011. 6.

TSCHINKEL, W. R. The Fire Ants. **Harvard Univ. Press**, 2006.

VINSON, S. B.; SORENSON, A. A. **Imported Fire Ants: Life History and Impact**.

VOGT, James *et al.* Prey of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) in Oklahoma peanuts. **Biological Control**, 30, 2001. 123-128.

WANG, Y.; GAUGLER, H. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 72, 1998. 313-318.

WETTERER, J. K. Exotic spread of *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) beyond North America. **Sociobiology**, 60, 2013. 50-55.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, 1927. 302-303.

WILLIAMS, Dave; LOFGREN, Cliff; LEMIRE, Astrid. A simple diet for rearing laboratory colonies of the red imported fire ant. *Journal of Economic Entomology*, v. 73, p. 176-177, 1980.

WILSON, Edward. **The insect societies**. Cambridge, USA: Harvard University Press, 1 ed., 1971.

WOUTS, W. M. Steinernema (Neoaplectana) and Heterorhabditis species. In: NICKLE, W. R. (. **Manual of agricultural agricultural nematology**. [S.l.]: New York: Marcel Dekker, 1991. p. 855-897.

WYLIE, F. R. *et al.* Eradication of two incursions of the red imported fire ant in Queensland, Australia. **Journal of Ecological Management & Restoration**, 17, 2016. 22-32.

XIAO, Q.; WANG, L.; CHEN, S.; ZHENG, C.; LU, Y.; XUA, Y. Gut Microbiome Composition of the Fire Ant *Solenopsis invicta*: an Integrated Analysis of Host Genotype and Geographical Distribution. *Microbiology Spectrum*, 2023.

XU, Y. *et al.* Prevalence of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) Venom Allergic Reactions in Mainland China. **Florida Entomological Society**, 95, n. 4, December 2012. 961-965.

YANG, C. C. *et al.* Propagule pressure and colony social organization are associated with successful invasion and rapid range expansion of fire ants in China. **Molecular Ecology**, 21, 2012. 817–833.

ZARZUELA, M. F. *et al.* Entomopathogens Isolated from Invasive Ants and Tests of their Pathogenicity. **Psyche: A Journal of Entomology**, 2012. 1-9.

ZENG, L. *et al.* Identification of red imported fire ant *Solenopsis invicta* to invade mainland China and infestation in Wuchuan, Guangdong. **Chinese Bulletin of Entomology**, 42, 2005. 144–148.

ZERINGÓTA, V. *et al.* Nesting of the fire ant *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera: Formicidae) in an urban environment. **The Florida Entomologist**, 97, n. 2, 2014. 668- 673.

ZHANG, R. *et al.* An overview of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) in mainland China. **Florida Entomologist**, 90, 2007. 723–731.

ZHANG, L.-K & HAN, R.-C. (2011). Red Imported Fire Ant Workers (Hymenoptera: Formicidae) Protect Their Queens from *Steinernema carpocapsae* All (Nematoda: Steinernematidae). **Sociobiology**. 58. 521-528.

ZHOU, A *et al.* Does mutualism drive the invasion of two alien species? The case of *Solenopsis invicta* and *Phenacoccus solenopsis*. **Plos One**, South China Agricultural University, Guangzhou, China, 2012.

ZHUKOVA, M.; SAPOUNTZIS, P.; SCHIØTT M.; BOOMSMA J. J. Diversity and Transmission of Gut Bacteria in *Atta* and *Acromyrmex* Leaf-Cutting Ants during Development. **Frontiers in Microbiology**, V8, 2017