

LUCIANE KATARINE BECCHI

***Cleruchoides noackae* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE): CONTROLE DE
QUALIDADE, DETECÇÃO DE ENDOSSIMBIOTES E DISPERSÃO EM PLANTIO
DE EUCALIPTO**

Botucatu

2021

LUCIANE KATARINE BECCHI

***Cleruchoides noackae* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE): CONTROLE DE
QUALIDADE, DETECÇÃO DE ENDOSSIMBIOTES E DISPERSÃO EM PLANTIO
DE EUCALIPTO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de doutora
em Agronomia - Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico
Wilcken

Coorientador: Dr. Leonardo Rodrigues
Barbosa

Botucatu

2021

B388c Becchi, Luciane Katarine
Cleruchoides noackae (Hymenoptera: Mymaridae): controle de
qualidade, detecção de endossimbiontes e dispersão em plantio de
eucalipto / Luciane Katarine Becchi. -- Botucatu, 2021
85 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: Carlos Frederico Wilcken
Coorientador: Leonardo Rodrigues Barbosa

1. Controle biológico. 2. Dispersão de parasitoides. 3. Eucalyptus. 4.
Percevejo-bronzeado-do-eucalipto. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



TÍTULO DA TESE: *Cleruchoides noackae* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE): CONTROLE DE QUALIDADE, DETECÇÃO DE ENDOSSIMBIOTES E DISPERSÃO EM PLANTIO DE EUCALIPTO

AUTORA: LUCIANE KATARINE BECCHI

ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

COORIENTADOR: LEONARDO RODRIGUES BARBOSA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP
Pesquisador Dr. EVERTON PIRES SOLIMAN (Participação Virtual)
Tecnologia e Inovação / Suzano S.A.
Prof. Dr. PEDRO JOSÉ FERREIRA FILHO (Participação Virtual)
Ciências Florestais / Universidade Federal de São Carlos
Professor Adjunto MARCUS VINICIUS SAMPAIO (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Agrárias / Universidade Federal de Uberlândia
Pesquisador Dr. MARIO HENRIQUE FERREIRA DO AMARAL DAL POGETTO (Participação Virtual)
Pesquisa e Desenvolvimento / Corteva Agrisciences

Botucatu, 12 de julho de 2021

Aos meus pais pelo suporte emocional, incentivo e amor incondicional.

*A minha irmã, Anne Cristine Becchi Aita, e ao meu sobrinho Theo Becchi Aita pelo carinho e cuidado nesses
anos difíceis.*

A minha família e amigos por tudo e por tanto,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu pai João Batista Becchi, minha mãe Maria de Lurdes Rossetto Becchi e irmã Anne Cristine Becchi Aita pela força e dedicação que sempre tiveram comigo, e por me apoiarem nos meus sonhos pessoais e profissionais. Ao meu sobrinho Theo, que mesmo sem entender ou saber, fez e faz a minha vida e de toda a família ser mais leve, alegre e especial.

Aos meus avós, cunhado, tios, tias, primos e primas pelo incentivo, carinho, respeito e amor. Especialmente a meu cunhado Tiago, Tia Susi e Tia Marli, pela ajuda com as demandas pessoais enquanto eu estava longe de casa.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas), pela oportunidade de aprendizado e ensino.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken, pela confiança, orientação, amizade, paciência, oportunidade de ministrar aula e apoio para a realização e conclusão desta tese.

Ao pesquisador Dr. Leonardo Rodrigues Barbosa, pela amizade, paciência, apoio e coorientação na tese, e ao Prof. Dr. José Cola Zanuncio, pela ajuda, correção e orientação no desenvolvimento dos capítulos.

Aos professores Drs. Edson Luiz Lopes Baldin e Carlos Gilberto Raetano pelas contribuições no exame de qualificação e ensinamentos durante a Pós-Graduação.

À Profa. Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken, por permitir a utilização do Laboratório de Biologia Molecular e demais contribuições profissionais e pessoais.

Ao Programa Cooperativo sobre Proteção Florestal (PROTEF) do Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF) pelo auxílio financeiro e experiência profissional junto às empresas filiadas, especialmente à empresa Bracell por permitir a realização do 3º Capítulo em uma de suas fazendas. Ao coordenador executivo do PROTEF Luiz Renato Junqueira pelas contribuições na tese e suporte nas atividades e eventos técnicos e científicos.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Proteção Vegetal da FCA/UNESP, Câmpus de Botucatu pelos ensinamentos, experiências e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) pela parceria, disciplinas, eventos e confraternizações, especialmente as estagiárias e amigas Thamires e Camila, aos pós-graduando Carolina Jorge e Diego, e as técnicas Claudinéia Fogaça e Lorena Hilário por contribuírem nos trabalhos da tese.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Plantas Inseticidas – (LARESPI), especialmente ao Prof. Baldin e o Rodrigo.

À Juliane pela amizade e suporte junto as demandas de assinaturas, impressões e agendamentos de reuniões com o Prof. Wilcken.

À Vanessa de Carvalho pelas contribuições no desenvolvimento da tese, amizade, suporte emocional e parceria no dia-a-dia, dentro e fora do ambiente acadêmico.

A minha amiga/irmã Tamiris Mariani Pereira Desiderio, pelos 6 anos de convivência com muito respeito, parceria, aventuras culturais e gastronômicas e muita conversa.

Aos amigos Botocudos Maria Carolina, Vanessa, Eduardo, André (Lilis), Macedo, André, Rafael e Maurício, pelas conversas, melhores jantas, shows e carteados.

À minha amiga Jéssica Gorri, pelos pedais mais divertidos e desafiadores de bike, por me receber sempre com as portas literalmente abertas, por me apoiar e se fazer presente todos os dias, principalmente na reta final do doutorado,

As “meninas fitness” da academia e do pilates, Andressa, Rie, Juliana e Helena pelas divertidas e animadas aulas.

As minhas amigas de Maringá, Janaina, Camila, Rafaela e Juliana que mesmo distantes, contribuíram e me apoiaram durante a Pós-graduação.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

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

RESUMO

No Brasil, o predomínio de áreas florestais plantadas com *Eucalyptus*, de 6,9 milhões de ha, é devido a adaptabilidade a diferentes ambientes, ao seu rápido crescimento e elevada produtividade. No entanto, pragas exóticas, como o percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), presente no Brasil desde 2008, vem causando danos significativos na produtividade de madeira nas regiões produtoras de eucalipto. O parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae) foi introduzido no país em 2012, para criação e liberação à campo, e controle biológico clássico da população do percevejo-bronzeado. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade de populações de *C. noackae* com diferentes gerações em laboratório e a presença de endossimbiontes, e estudar a dispersão do parasitoide em plantações de eucalipto, visando otimizar a criação massal do parasitoide em laboratório e eficiência na liberação a campo. No estudo do controle de qualidade foram avaliados parâmetros biológicos de cinco populações com diferentes gerações (F13, F18, F39, F67 e F122) de *C. noackae* em laboratório. O número de ovos parasitados (9,3 a 11,9 ovos/fêmea), parasitoides emergidos (9,26 a 11,46 parasitoides), razão sexual (0,58 a 0,76), e longevidade de fêmeas de *C. noackae* sem experiência de parasitismo não apresentaram diferenças entre as diferentes populações. O período de desenvolvimento ovo-adulto, e a longevidade de fêmeas sem experiência de parasitismo e de machos apresentaram diferenças, e a capacidade de vôo das com mais gerações em laboratório foi menor. Análises moleculares por meio de PCR foram realizadas para a presença de 10 gêneros bacterianos e um microsporídio com a utilização de primers específicos. Oito gêneros de endossimbiontes foram presentes nas populações de *C. noackae* e após o sequenciamento foi possível identificar 99% de identidade com *Wolbachia*, *Rickettsia* e *Serratia*, havendo associação do parasitoide com essas bactérias. Em três talhões com plantios de eucalipto foram marcados dois quadrados concêntricos com distâncias de 25,0 e 50,0 m do ponto central ao ponto médio de cada lado do quadrado, e fixados a cada 25,0 m, armadilhas adesivas amarelas, totalizando 25 pontos e 6 distâncias (0,0; 25,0; 32,35; 50,0; 55,9 e 70,7 m). No ponto central de cada parcela, foram liberados 3.000 adultos de *C. noackae*, e após 72 h os cartões foram coletados e avaliados. O parasitoide *C. noackae* se dispersou até 70,7 m de

distância do ponto central de liberação em 72 h, com maior captura a 25,0 m, 3,66 adultos. Os resultados apresentados neste trabalho podem ser utilizados para o ajuste de técnicas e de controle da criação massal em laboratório deste parasitoide, e representam primeiras detecções de endossimbiontes e determinação da dispersão a campo de *C. noackae*.

Palavras-chave: controle biológico; dispersão; *Eucalyptus*; percevejo-bronzeado.

ABSTRACT

The predominance of planted forests in Brazil with the genera *Eucalyptus* on 6.9 million ha is due to its adaptability to different environments, rapid growth, and high productivity. However, exotic pests such as the bronze-bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), present in Brazil since 2008, has been causing significant damage to wood productivity in several eucalyptus production regions. The egg parasitoid *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) was introduced in Brazil in 2012, for mass-rearing and release for the classic biological control of the population of the bronze-bug. The objective of this study was to evaluate the quality and the presence of endosymbionts of *C. noackae* populations with different generations in the laboratory, and to study the dispersal of the parasitoid in eucalyptus plantations, aiming to optimize parasitoid mass-rearing in the laboratory and efficiency in field release. In the study of quality control, biological parameters of five populations with different generations of *C. noackae* were evaluated. Biological parameters for parasitism, longevity and sex ratio of *C. noackae* did not differ among populations of this natural enemy, but its flight capacity decreased with the number of generations. Molecular analyses were performed by PCR for the presence of 10 bacterial genera and a microsporid with the use of specific primers. Eight genera of endosymbionts were present in the populations of *C. noackae*. After sequencing, it was possible to determine that 99% of identity belonged to the genera *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Serratia*, with an association of the parasitoid with these bacteria. In three eucalyptus plots 100.0 m x 100.0 m, two concentric squares were marked with distances of 25.0 and 50.0 m from the central point to the midpoint on each side of the square, and fixed yellow sticky traps every 25.0 m, in the trunk of the trees at 1.8 m from the ground, totaling 25 points and 6 distances (0.0, 25.0, 32.35, 50.0, 55.9 and 70.7 m). At the central point of each plot, 3,000 adults of newly emerged *C. noackae* were released and after 72 h the cards were removed and evaluated. The parasitoid *C. noackae* dispersed up to 70.7 m away from the central point of release in 72 h, with greater capture at 25.0 m, 3.66 adults. The results presented in this work can be used to improve *C. noackae* mass-rearing techniques, represent the first detections of endosymbionts in *C. noackae*, and determine the field dispersal of *C. noackae*.

Keywords: biological control, bronze-bug, dispersal, *Eucalyptus*, quality control.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1 - CONTROLE DE QUALIDADE DE POPULAÇÕES DE <i>Cleruchoides noackae</i> (HYMENOPTERA: MYMARIDAE) COM DIFERENTES GERAÇÕES CRIADOS EM LABORATÓRIO	19
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1.3 RESULTADOS.....	25
1.4 DISCUSSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 2 - ENDOSSIMBIONTES ASSOCIADOS AO PARASITOIDE DE OVOS <i>Cleruchoides noackae</i> (HYMENOPTERA: MYMARIDAE) ...	38
2.1 INTRODUÇÃO.....	39
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.3 RESULTADOS.....	47
2.4 DISCUSSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	53
CAPÍTULO 3 - DISPERSÃO DE <i>Cleruchoides noackae</i> APÓS LIBERAÇÃO EM PLANTAÇÕES DE EUCALIPTO	59
3.1 INTRODUÇÃO.....	60
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.3 RESULTADOS.....	66
3.4 DISCUSSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO GERAL

Com área plantada de 9 milhões de ha, o setor florestal brasileiro é um dos mais desenvolvidos e competitivos do mundo (SOUZA et al., 2016), sendo o *Eucalyptus* (Myrtaceae), o gênero com maior área plantada, 6,9 milhões de ha e ocupando o 10º lugar no ranking mundial com áreas certificadas (IBÁ, 2020). O predomínio desse gênero, se deve ao seu rápido crescimento, adaptabilidade a diferentes condições climáticas e ambientais e atendimento aos diferentes setores da indústria madeireira (GARNAS et al., 2012).

A expansão e a extensão de áreas plantadas por um longo período e com o mesmo material genético propiciam o desenvolvimento de espécies-praga (GARNAS et al., 2012). Devido ao transporte de insetos em plantas vivas e toras cortadas ser comum e de difícil controle (MUTITU et al., 2020), associados à globalização econômica que favoreceu o transporte de pessoas e mercadorias (WESTPHAL et al., 2008; HURLEY et al., 2016), tem se intensificado a introdução de pragas exóticas em plantação de eucalipto no Brasil, impactando consequentemente a produtividade (BARBOSA et al., 2019).

De origem australiana, o percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), relatado no Brasil em 2008 (WILCKEN et al., 2010), é o mais difundido no mundo, sendo relatado em mais de 20 países fora da Austrália (MACHADO et al., 2020). No Brasil, o percevejo-bronzeado encontrou condições ambientais e espécies favoráveis ao seu desenvolvimento e reprodução incluindo as do gênero *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp. (MACHADO et al., 2020).

Thaumastocoris peregrinus é um inseto fitófago pequeno, de comprimento médio de três milímetros, corpo achatado e coloração marrom claro (CARPINTERO & DELLAPÉ, 2006; SOLIMAN et al., 2012). Fêmeas e machos são diferenciados pela observação ventral do abdômen, onde machos possuem a cápsula genital que se abre para a direita (MARTINEZ & BIANCHINI, 2010; NOACKAE et al., 2011; SOLIMAN et al., 2012). A longevidade de fêmeas e machos é de 34 e 35 dias, respectivamente, e cada fêmea pode ovipositar até 58 ovos a 25°C, com período de pré-oviposição de 6,2 dias (BARBOSA et al., 2019). Os ovos possuem formato arredondado e achatado, de coloração preto brilhante e são colocados únicos ou agrupados sobre as irregularidades das folhas e ramos (JACOBS & NESSER, 2005)

e apresentam período de incubação de 6 dias (NOACK & ROSE, 2007). As ninfas possuem cinco ínstaes e a duração do ciclo desde a eclosão do ovo até a fase adulta, varia de 14 a 20 dias (NOACK & ROSE, 2007; SOLIMAN et al., 2012).

O ciclo biológico de *T. peregrinus* varia conforme a espécie e híbridos de eucalipto (SOLIMAN et al., 2012) e a temperatura reflete na taxa de reprodução líquida do percevejo-bronzeado, maior a 18 e 25°C, e menor a 30°C (BARBOSA et al., 2019).

Devido a sucção do parênquima paliçádico das folhas do eucalipto (SANTADINO et al., 2017), o percevejo-bronzeado causa o prateamento, bronzeamento, e secamento das folhas (JACOBS; NESSER, 2005), redução na fotossíntese, produtividade (WILCKEN et al., 2010) e morte das árvores em altas infestações (MONTAGU et al., 2020).

O manejo integrado de *T. peregrinus* é feito inicialmente com o monitoramento da praga, contando-se ninfas, adultos e/ou ovos de *T. peregrinus* a partir de folhas do terço médio a leste (LIMA et al., 2016). Cartões adesivos amarelos dispostos a 1,80 m do solo, subestimam a abundância de indivíduos, no entanto, devido a logística que impede de colocar a armadilha acima desta altura, é aceitável (MARTINEZ et al., 2010) e tem sido mais utilizado no Brasil. Estudos com sensoriamento remoto, no monitoramento de *T. peregrinus* em plantação de *Eucalyptus* tem sido realizado, com 97,7% de acurácia na detecção de talhões saudáveis e atacados pela praga (SANTOS et al., 2020). O nível de controle para tomada de decisão, ainda não foi determinado para *T. peregrinus*, no entanto, o manejo que vem sendo utilizado é com o controle químico e biológico. Devido à grande variedade de espécies de eucalipto que são hospedeiras da praga, reduz a chance do uso da resistência de plantas (NOACK et al., 2011; SOLIMAN et al., 2012).

O controle químico pode ser realizado com os inseticidas registrados a base de bifentrina (piretróide) e bifentrina (piretróide) + Acetamiprido (neocotinóide), produto comercial Capture® 400 EC e Sperto, respectivamente (AGROFIT, 2021).

O controle biológico é a principal estratégia para reduzir os danos causados por insetos praga exóticos em plantações de eucalipto (WINGFIELD et al., 2013), inclusive para o percevejo-bronzeado (WILCKEN et al., 2015). Epizootias e predadores de ocorrência natural em campo foram relatados causando mortalidade de ninfas e adultos de *T. peregrinus* (MASCARIN et al., 2012; DIAS et al., 2014), no

entanto, em surtos populacionais da praga, estes últimos não são suficientes devido à baixa especificidade hospedeira. Estudos com produtos comerciais a base de *Beauveria bassiana* (Bals-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitacea) e *Metharizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) causaram mortalidade de 100 e 88%, de adultos de *T. peregrinus* (SOLIMAN et al., 2019), indicando potenciais agentes de controle da praga.

O endoparasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae) é o único parasitoide disponível para utilização no controle biológico de *T. peregrinus* (Barbosa et al., 2017). *Cleruchoides noackae* é uma vespa de aproximadamente 0,5 milímetros de comprimento (LIN et al., 2007) e partenogênese arrenótoca (MUTITU, 2013; BECCCHI et al., 2020). A longevidade do adulto varia de 2 a 4 dias sem e com alimento, respectivamente (SOUZA et al., 2016), e o período de desenvolvimento ovo-adulto de *C. noackae* varia de 19 a 27 dias a 22 e 18°C, respectivamente (MARTÍNEZ et al., 2018). A duração da cópula, de *C. noackae*, é em média, 39 segundos (BECCHI et al., 2020) e o parasitismo em ovos de um a três dias de idade de *T. peregrinus* foi maior que 60% (BARBOSA et al., 2018). A razão sexual de *C. noackae* é tendenciosa para fêmeas, como observado em laboratório e campo, de 0,78 (BARBOSA et al., 2018) e 0,69 (BARBOSA et al., 2017), respectivamente.

O sucesso dos inimigos naturais como agentes de controle biológico está intimamente ligado a qualidade dos indivíduos produzidos durante o processo de produção massal em laboratório (GRENIER & CLERCQ, 2003; NARANJO-GUEVARA et al., 2020), e à dispersão, à eficiência na localização e ao controle da praga após liberação (Van LENTEREN, 1992; Van LENTEREN e BIGLER, 2010).

É comum observar a diminuição na qualidade dos insetos produzidos nas criações massais em laboratório ao longo das gerações. Isso ocorre principalmente devido ao cruzamento consanguíneo, deriva genética (LEPPLA, 2003), mutações deletérias e adaptação genética ao cativeiro (BIGLER, 1989; FRANKHAM et al., 2008; TREVISAN et al., 2016), por isso é fundamental avaliar a qualidade de populações com diferentes gerações em laboratório, e estabelecer diretrizes à avaliação da qualidade de *C. noackae*.

Bactérias endossimbiontes que vivem no interior do corpo ou das células de um ser vivo (WERREN et al., 2008), apresentam um impacto importante na ecologia, reprodução e comportamento do hospedeiro (MILLER & SCHNEIDER, 2012;

NOUHUYS, et al., 2016), e podem reduzir a qualidade dos inimigos naturais produzidos. Os simbiontes podem ser adquiridos do ambiente ou matematicamente a cada geração (MORAN, et al., 2008; PISTONE et al., 2014) e a grande maioria possuem efeitos benéficos ao hospedeiro (OLIVER et al., 2003; DOUGLAS, 2015; OLIVER & HIGASHI, 2019). No entanto, alguns podem prejudicar a capacidade de locomoção, sobrevivência e fecundidade dos insetos (FLEURY et al., 2000; MANN et al., 2017; HARUMOTO et al., 2018). Bactérias do gênero *Wolbachia*, infectam 66% dos artrópodes (HILGENBOECKER et al., 2008), e influenciam na reprodução do hospedeiro por meio da mortalidade e feminização dos machos, manipulação da partenogênese e incompatibilidade citoplasmática (WERREN et al., 2008; MANN et al., 2017). A associação de endossimbiontes ao parasitoide *C. noackae* não foi relatada na literatura, e pode fornecer informações importantes para melhorar a qualidade de produção e entender a relação com seu hospedeiro *T. peregrinus*.

O conhecimento da mobilidade e dispersão de parasitoides é essencial para o sucesso no controle biológico (POMARI-FERNANDES, et al., 2018), e auxilia na determinação da distribuição de pontos de liberação (MILLS et al., 2006). O vento e as características da vegetação são fatores que influenciam na direção e dispersão dos insetos, principalmente inimigos naturais diminutos (PETIT et al., 2008; LOWENSTEIN et al., 2019). Diferentes métodos podem ser utilizados para estudar o comportamento de dispersão, como o uso de armadilhas amarelas (LOWENSTEIN et al., 2019), ovos sentinelas (SALAZAR-MENDONZA et al., 2020) e plantas pulverizadas com cola (SUVERKROPP et al., 2009).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade e prospectar endossimbiontes de populações de *C. noackae* com diferentes gerações em laboratório, e estudar a dispersão do parasitoide em plantação de eucalipto, visando melhorias na criação massal do parasitoide em laboratório e eficiência na liberação a campo para o controle do percevejo-bronzeado.

CAPÍTULO 1

CONTROLE DE QUALIDADE DE POPULAÇÕES DE *Cleruchoides noackae* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE) COM DIFERENTES GERAÇÕES CRIADOS EM LABORATÓRIO

Resumo

O percevejo-bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), nativo da Austrália, se disseminou e causa danos em plantação de *Eucalyptus* em diferentes países. Esse percevejo foi relatado no Brasil, pela primeira vez em 2008 e se dispersou pelo país causando perdas em plantação de eucalipto de empresas florestais e pequenos produtores. O parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae), principal agente de controle biológico de *T. peregrinus*, vem sendo multiplicado em laboratório e liberado em áreas infestadas, por *T. peregrinus*, desde sua importação em 2012. O controle de qualidade na produção deste inimigo natural é imprescindível para manter sua eficiência no controle desta praga. O objetivo foi avaliar parâmetros biológicos de cinco populações do parasitoide *C. noackae*, com diferentes gerações (F13, F18, F39, F67 e F122) em laboratório, em ovos de *T. peregrinus* e o comportamento de vôo desse parasitoide. Os parâmetros biológicos parasitismo, emergência e razão sexual de *C. noackae* não diferiram entre as populações, mas o desenvolvimento, longevidade, sobrevivência e a capacidade de vôo foram influenciadas pelo número de gerações. Os resultados confirmam a hipótese de que a criação sucessiva em laboratório em ovos de *T. peregrinus* apresentam mudanças nos parâmetros biológicos e comportamentais de *C. noackae*.

Palavras-chave: controle biológico; controle de qualidade; *Eucalyptus* spp.; parasitoide de ovos; teste de vôo.

¹ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Bulletin of Entomological Research.

Abstract

The bronze-bug *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), native to Australian, has spread and causes damage to *Eucalyptus* plantations in different countries. This pest was first reported in Brazil in 2008 and rapidly dispersed across the country generating losses in eucalyptus plantations of forestry companies and small producers. The egg parasitoid *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), the main biological control agent of *T. peregrinus*, has been multiplied in the laboratory and released in infested areas since it was imported from Australia in 2012. Quality control in the production of this natural enemy is essential to maintain its efficiency in controlling this pest. The objective was to evaluate biological parameters of five populations of the parasitoid *C. noackae* with different generations (F13, F18, F39, F67 e F122) in the laboratory, in eggs of *T. peregrinus*, and the flight behavior of this parasitoid. Biological parameters for parasitism, emergence and sex ratio of *C. noackae* did not differ among populations, but its development, longevity, survival and flight capacity were influenced by the number of generations. The results confirm the hypothesis that successive mass-rearing in the laboratory in *T. peregrinus* eggs results in changes in the biological and behavior parameters of *C. noackae*.

Keywords: biological control, egg-parasitoid, *Eucalyptus* spp., flight-test, quality control.

1.1 INTRODUÇÃO

A área de 9 milhões de ha, sendo 6,97 milhões com espécies de *Eucalyptus* torna o setor florestal brasileiro um dos mais desenvolvidos do mundo (IBÁ, 2021). Cultivos florestais por longos períodos e com reduzida variabilidade genética facilitam a adaptação e desenvolvimento de espécies-praga (Garnas *et al.*, 2012). O transporte de insetos em plantas vivas e toras de eucalipto é comum e difícil de controlar (Mutitu *et al.*, 2020). Por isso, o comércio e viagens dentro e entre os países aumentam as chances de introduções de pragas exóticas (Meyerson e Mooney, 2007; Hulme *et al.*, 2009; Nadel *et al.*, 2010).

O percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), originário da Austrália, foi relatado em 2008 no Brasil causando clorose e desfolha em plantação de *Eucalyptus* devido à sucção do parênquima paliçádico (Nadel e Noack, 2012; Wilcken *et al.*, 2010; Santadino *et al.*, 2017), redução de produtividade (Wilcken *et al.*, 2010) e, mesmo, a morte das plantas (Montagu *et al.*, 2020).

O parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae), encontrado inicialmente na região de Sidney, Austrália (Lin *et al.*, 2007) foi importado no Brasil em 2012 para o manejo de *T. peregrinus* (Wilcken *et al.*, 2014). O parasitismo em campo e laboratório de *C. noackae* foi de 50 e 50% respectivamente, e a emergência de 53 e 52%, respectivamente (Barbosa *et al.*, 2017) com partenogênese arrenótoca (Mutitu *et al.*, 2013; Becchi *et al.*, 2020). A longevidade de adultos e o período de desenvolvimento ovo-adulto de *C. noackae* variou de 48 a 96 h com ou sem alimento (Souza *et al.*, 2016) e de 19 a 27 dias a 22 e 18°C (Martínez *et al.*, 2018), respectivamente. A razão sexual de *C. noackae* em laboratório (0.76) foi maior que em campo (0.65) (Barbosa *et al.*, 2018; 2019) e, mesmo após sucessivas gerações em laboratório, a porcentagem de fêmeas foi maior que de machos (Martínez *et al.*, 2018).

A utilização e o sucesso dos inimigos naturais no controle biológico dependem da eficiência na produção massal e da qualidade dos indivíduos produzidos (Grenier e de Clercq, 2003; Naranjo-Guevara *et al.*, 2020). O controle de qualidade é fundamental em programas de controle biológico para reduzir ou evitar a redução da eficiência na localização e controle da praga com qualidade aceitável e próxima daqueles na natureza (van Lenteren, 1992; van Lenteren e Bigler, 2010).

A qualidade de insetos produzidos nas criações massais em laboratório pode diminuir ao longo das gerações, principalmente, devido a cruzamentos consanguíneos, deriva genética (Leppla, 2003), mutações deletérias e adaptação genética ao cativeiro (Bigler, 1989; Frankham *et al.*, 2008; Trevisan *et al.*, 2016). O cruzamento consanguíneo produz progênies mais homozigóticas com indivíduos, em geral, expressando alelos deletérios (Charlesworth, 1987; van Lenteren *et al.*, 2003; van Lenteren e Bigler, 2010) que podem afetar a viabilidade, morfologia (Cassel, 2001), longevidade, razão sexual, procura dos hospedeiros e fecundidade (Antolin, 1999; Henter, 2003) de insetos.

O parasitismo, número de adultos emergidos, razão sexual, duração do ciclo, mortalidade e longevidade (Clarke e Mckenzie, 1992; Prezotti e Parra, 2002; van Lenteren e Bigler, 2010), além de testes de vôo e eficiência em semi-campo e campo (Dutton e Bigler, 1995; van Lenteren e Tomazini, 1999) são parâmetros utilizados para avaliar a qualidade de agentes de controle biológico.

A capacidade de voar e caminhar afetam a dispersão e forrageamento do inimigo natural em campo e devem ser monitorados em criações massais, pois podem variar após gerações sucessivas (Gardner e van Lenteren 1986; Prezotti *et al.*, 2002). Avaliações da eficiência do inimigo natural permitem identificar e corrigir erros na produção de inimigos naturais (van Lenteren e Bigler, 2010). A introdução periódica de indivíduos silvestres aumenta a diversidade genética e melhora a qualidade das criações massais de insetos (van Lenteren *et al.*, 2003).

A Organização Internacional de Controle Biológico (IOBC) desenvolveu normas para o controle de qualidade de inimigos naturais, como *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Chysoperla carnea* Steph (Neuroptera: Chrysopidae) e *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) (van Lenteren *et al.*, 2003). Diretrizes tem sido feitas para parasitoides como *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) (Trevisan *et al.*, 2016), *Trichogramma pretiosum* Riley (Prezotti *et al.*, 2012), *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygastriidae) (Queiroz *et al.*, 2017; Naranjo-Guevara *et al.*, 2020) e *Palmistichus elaeasis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) (Feltrin-Campos *et al.*, 2016).

O controle de qualidade de *C. noackae*, em laboratório, começou a ser estudado no Uruguai com a avaliação da razão sexual, emergência e sobrevivência de duas populações, desse parasitoide, durante 30 gerações (Martínez *et al.*, 2018). No entanto, isto deve ser feito por mais gerações e outros parâmetros devem ser incluídos na avaliação da qualidade deste inimigo natural. O objetivo foi avaliar parâmetros biológicos, incluindo o comportamento de vôo de indivíduos de cinco populações de *C. noackae*, com diferentes números de gerações em laboratório, para estudar possíveis efeitos na qualidade desse parasitoide em criações de laboratório.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Criação de *T. peregrinus* e *C. noackae*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), campus de Botucatu em Botucatu, São Paulo, Brasil. Ovos, ninfas e adultos de *T. peregrinus* foram coletados em plantação de eucalipto em Minas Gerais e mantidos em ramos de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* (Myrtaceae), retirados de plantas com três anos de idade, em frascos Erlenmeyer de 500 ml com água e acondicionados em bandejas plásticas retangular (40 cm de comprimento x 35 cm de largura x 8 cm de altura) em sala climatizada a 25 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h. Novos ramos foram colocados a cada dois dias, encostados nos antigos, para migração dos insetos. Tiras de papel toalha (15,0 cm de comprimento x 1,5 cm de largura) foram dispostas na parte superior das folhas dos ramos por 24 horas para obtenção de ovos de *T. peregrinus* (Barbosa *et al.*, 2016).

Cinco populações de *C. noackae* e com diferentes números de gerações em laboratório (LCBPF) foram coletados inicialmente em plantações de eucalipto infestados por *T. peregrinus* em Três Marias, (F13), Itamarandiba (F18) e Curvelo (F39), Minas Gerais e em Arroio dos Cachorros (F67), Rio Grande do Sul, além de uma população introduzida da Austrália e com 122 gerações em laboratório no Brasil (F122). Adultos de cada população desse parasitoide foram mantidos em frascos de poliestireno (7,5 cm de altura x 3,0 cm de diâmetro) com tiras de papel filtro (7,0 cm de altura x 1,5 cm de largura) umedecidas em solução de mel a 50% como alimento. Ovos de *T. peregrinus* com até 24 horas de idade, foram oferecidos às fêmeas do parasitoide e mantidos a 25 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h (Barbosa *et al.*, 2017).

Parâmetros biológicos de *C. noackae*

Dez ovos de *T. peregrinus* (0-24 horas de idade) foram oferecidos por fêmea de cada população com diferentes gerações (F13, F18, F39, F67 e F122) de *C. noackae*, recém-emergida (acasalada e alimentada com mel 50%) a cada quatro horas (fase clara) e durante 12 horas (fase escura) em frasco de poliestireno (7,5 cm de comprimento x 3,0 cm de diâmetro) e mantidos à 25 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$ e

fotofase de 12 h até a morte das fêmeas. Esses ovos foram removidos e mantidos em frascos de poliestireno nas mesmas condições controladas até a emergência dos parasitoides, os quais foram contados e sexados de acordo com a antena, filiforme (machos) e clavada (fêmeas) (Lin *et al.*, 2007). O número de ovos parasitados e de parasitoides emergidos, a razão sexual ($rs = n^{\circ} \text{ de fêmeas} / n^{\circ} \text{ de machos}$), período de desenvolvimento (ovo-adulto) (dias) e longevidade (h) e sobrevivência das fêmeas foram avaliados. Estes dois últimos parâmetros foram, também, avaliados para machos e fêmeas sem experiência de parasitismo em cada população, individualizando os mesmos em frascos de poliestireno e alimentados com mel 50%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (cinco populações com diferentes gerações), 15 repetições, sendo a unidade experimental constituída por um frasco de poliestireno com uma fêmea com experiência de parasitismo, ou fêmea sem experiência ou um macho.

Teste de vôo de *C. noackae*

O teste de vôo foi avaliado em gaiola de PVC (desenvolvida por Dutton e Bigler 1995 e adaptada por Prezotti *et al.* 2002). Cem ovos de *T. peregrinus*, possivelmente, parasitados e perto da emergência de *C. noackae*, por população (F13, F18, F39, F67 e F122) foram individualizados em tubos de vidro de fundo chato (2 cm diâmetro x 8 cm de altura) e fixados no centro da arena de cilindro de PVC (20 cm x 15 cm). O interior, desses tubos, foi recoberto por cartolina preta com uma faixa de 0,5 cm de cola entomológica a 3,5 cm da extremidade inferior (para coletar os parasitoides caminhadores) e com tampa de placa de Petri (15 cm de diâmetro) pincelada com a mesma cola (para coletar os parasitoides voadores). As arenas foram mantidas a 25 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$ e fase clara de 24 h em câmara climatizada do tipo BOD. O número de parasitoides no anel de cola (“caminhadores”), na placa de Petri (“voadores”) e no fundo do tubo de vidro (“não-voadores”) foi avaliado e a porcentagem de cada categoria calculada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (cinco populações com diferentes gerações), cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma arena com cem ovos parasitados.

Análise estatística

Os dados de ovos parasitados, parasitoides emergidos, razão sexual e desenvolvimento ovo-adulto de *C. noackae* e de parasitoides voadores, caminheiros e não-voadores foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados sem normalidade e homogeneidade de variância foram analisados por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A sobrevivência dos parasitoides foi estimada por Kaplan-Meier e as médias comparadas pelo teste de Log-Rank.

1.3 RESULTADOS

Parâmetros biológicos de *C. noackae*

O número de ovos de *T. peregrinus* parasitados pelas populações com diferentes gerações de *C. noackae* foi semelhante, de 9,33 a 11,93 ($F_{4,74} = 0,826$; $p = 0,513$; Tabela 1) com até 22 ovos parasitados por fêmea desse inimigo natural.

Tabela 1. Número de ovos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) parasitados e de parasitoides emergidos, razão sexual e duração do desenvolvimento (ovo-adulto) (dias) (Duração) (média \pm EP) de *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) com diferentes gerações em laboratório ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; $60 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 h)

Geração	Ovos parasitados	Parasitoides emergidos	Razão sexual	Duração (dias) (ovo-adulto)
F13	10,67 \pm 1,54a	10,20 \pm 1,49a	0,58 \pm 0,05a	14,88 \pm 0,12 ^a
F18	9,33 \pm 1,31a	9,26 \pm 1,32a	0,76 \pm 0,02a	14,78 \pm 0,14 ^a
F39	9,60 \pm 1,34a	9,46 \pm 1,33a	0,65 \pm 0,05a	14,65 \pm 0,07ab
F67	11,86 \pm 1,43a	11,26 \pm 1,35a	0,69 \pm 0,04a	14,42 \pm 0,07b
F122	11,93 \pm 1,04a	11,46 \pm 1,04a	0,68 \pm 0,03a	14,36 \pm 0,07b

Médias seguidas de mesma letra minúscula por coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O número de *C. noackae* emergidos foi semelhante entre as populações com diferentes gerações, 9,26 a 11,46 ($F_{4,74} = 0,583$; $p = 0,676$; Tabela 1), com viabilidade acima de 95% nas populações.

A razão sexual de *C. noackae* variou de 0,58 a 0,76 nas gerações F13 e F18, respectivamente ($F_{4,71} = 2.009$; $p = 0.103$; Tabela 1), com maior emergência de fêmeas que machos em todas as populações com as diferentes gerações.

O período de desenvolvimento ovo-adulto de *C. noackae* foi menor nas populações com mais gerações em laboratório, F67 (14,42 dias) e F122 (14,36 dias) que naquelas com menor número de gerações, F13 (14,88 dias) e F18 (14,78 dias) ($H = 22,012$; d.f. = 4,74; $p < 0,001$; Tabela 1).

A longevidade de fêmeas de todas as populações de *C. noackae* sem hospedeiros foi maior que a daquelas com hospedeiros (Tabela 2). A longevidade de fêmeas de *C. noackae*, com experiência de parasitismo, foi semelhante entre as populações com diferentes gerações, 21,6 a 36,0 h ($H = 8,535$; d.f. = 4,74; $p = 0,074$; Tabela 2) e sem experiência de parasitismo das populações com 67 gerações, 80,0 h maior que a daquelas com menor número de gerações (F13, F18 e F39), 54, 44 e 42 h, respectivamente, não diferindo da F122, 68,8 h ($F = 4,335$; d.f. = 4,74; $p = 0,003$; Tabela 2). A longevidade de machos de *C. noackae* foi maior na população com 67 gerações, 78,9 h, que a daqueles das populações F13, F18 e F122 com 36,2, 25,8 e 36,0 h, respectivamente, e não diferiu da F39 47,2 h ($H = 20,550$; d.f. = 4,74; $p = 0,001$; Tabela 2).

Tabela 2. Longevidade (média \pm erro-padrão) (horas) de fêmeas (com ou sem experiência de parasitismo) e de machos de *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) de diferentes populações e gerações multiplicadas em laboratório (25 \pm 2°C, 60 \pm 10% UR e fotofase de 24h)

Ger.	Longevidade (Horas)		
	Fêmeas com parasitismo	Fêmeas sem parasitismo	Machos
F13	21,60 \pm 2,20 Ca	54,13 \pm 5,14 Ab	36,27 \pm 5,00 Bb
F18	31,20 \pm 3,40 Ba	44,00 \pm 6,91 Ab	25,87 \pm 3,28 Bb
F39	27,47 \pm 3,97 Ba	42,93 \pm 6,64 Ab	47,20 \pm 11,71 Aab
F67	33,07 \pm 3,79 Ba	80,00 \pm 10,11 Aa	78,93 \pm 8,96 Aa
F122	36,00 \pm 5,58 Ba	68,80 \pm 8,86 Aab	36,00 \pm 5,43 Bb

Médias seguidas de mesma letra minúscula, por coluna, ou maiúscula, por linha, não diferem pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

A sobrevivência de fêmeas de *C. noackae*, sem experiência de parasitismo, com 67 e 122 gerações foi maior que a daquelas com menor número de gerações em laboratório ($\chi^2 = 19,468$; d.f. = 4,75; $p < 0,001$). Um total de 80% de machos de *C.*

noackae, das populações F13, F67 e F122, sobreviveram por, até, 24 h ($\chi^2 = 27,267$; d.f.= 4,75; $p < 0,001$). A sobrevivência de fêmeas de *C. noackae* com experiência de parasitismo foi semelhante entre as populações com diferentes números de gerações em laboratório ($\chi^2 = 9,500$; d.f.= 4,75 $p < 0,050$), com mais de 80% e 50% de sobreviventes até 12 h e 24 h nas populações F18, F39, F67 e F122 e F122 e F67, respectivamente (Figura 1).

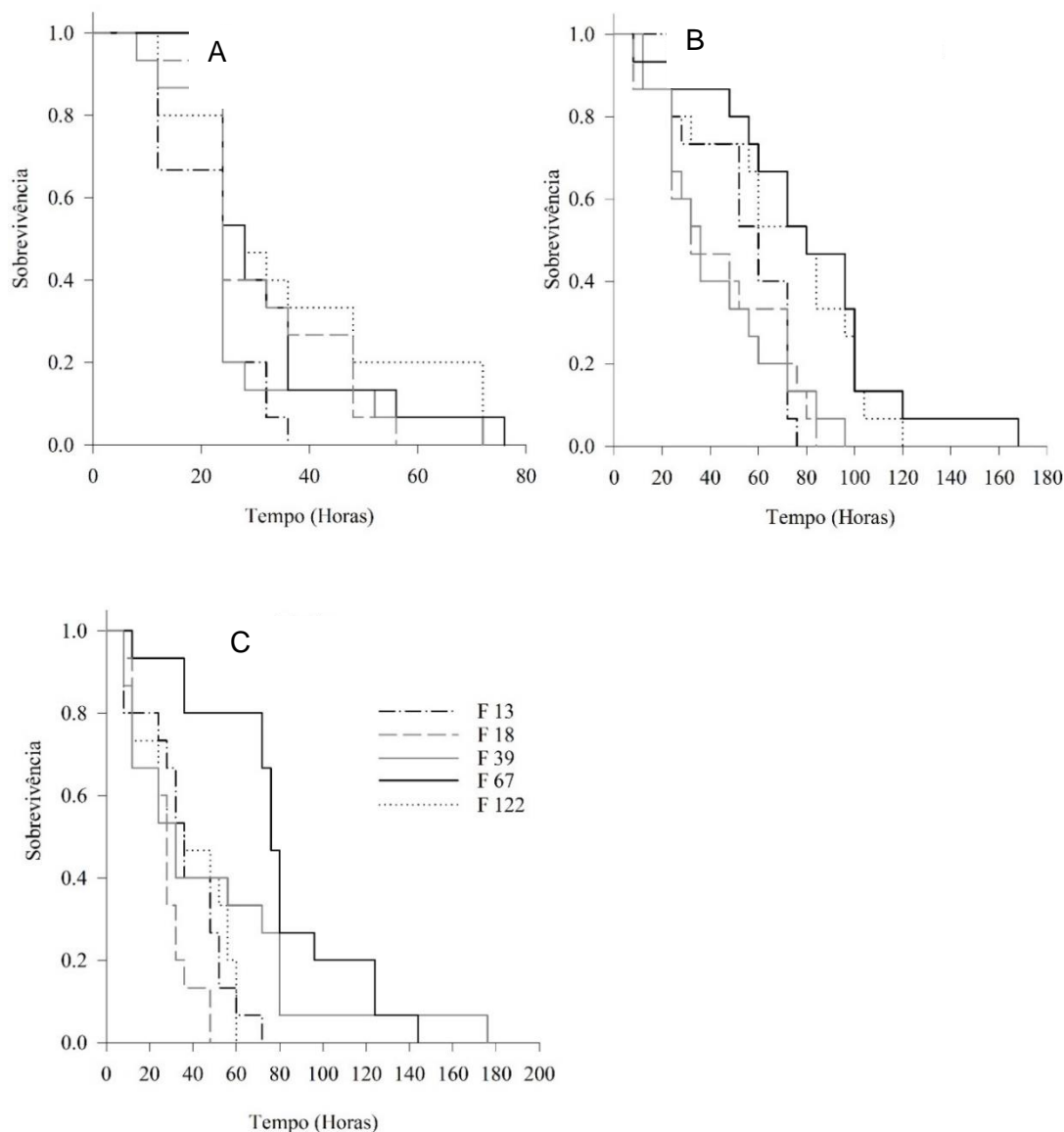


Figura 1. Sobrevivência de fêmeas, com (A) ou sem (B) experiência de parasitismo, e de machos (C) de *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) de diferentes gerações em laboratório (25°C, UR 60% e fotofase de 12 h).

Teste de vôo de *C. noackae*

O número de parasitoides “voadores” foi maior nas populações de *C. noackae* com menor número de gerações (F13 e F18) de 68 e 63%, que com maior número de

gerações (F67 e F122), 28 e 30%, respectivamente, e o daquela com 39 gerações semelhante às outras ($F_{4,20} = 6,340$; $p = 0,002$; Figura 2). A porcentagem de parasitoides “caminhadores” foi maior nas populações com maior número de gerações (F67 e F122), 46 e 49%, respectivamente, que com menor número de gerações, F13 e F18, 20 e 23%, respectivamente ($F_{4,20} = 6,841$; $p = 0,001$) (Figura 2). O número de *C. noackae* “não-voadores” foi semelhante entre tratamentos, com valores de 11 a 24% ($F_{4,20} = 0,847$; $p = 0,512$; Figura 2).

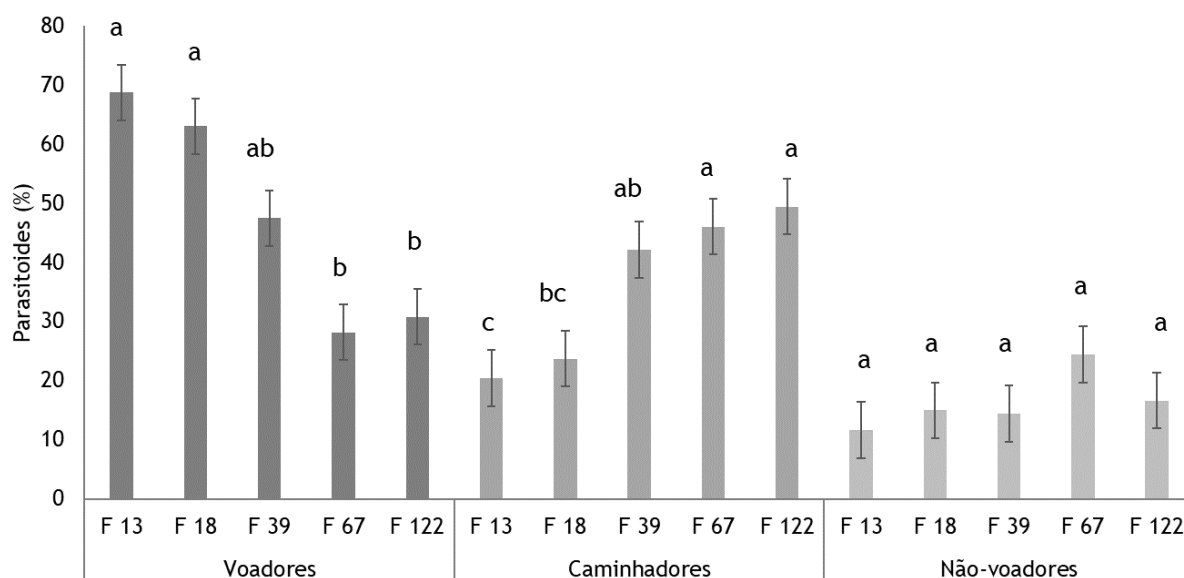


Figura 2. Porcentagem de indivíduos das categorias “voadores”, “caminhadores”, e “não-voadores” de cinco populações de *Cleruchoidea noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) com diferentes gerações em laboratório ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e fotofase de 24 h). Barra de erros indicam média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre tratamentos por categoria pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

1.4 DISCUSSÃO

O número semelhante de ovos de *T. peregrinus*, parasitado por fêmea de *C. noackae* das populações com diferentes gerações indica falta de efeito negativo do cruzamento consanguíneo durante a criação desse parasitoide por várias gerações em laboratório, possivelmente, sem perda de variabilidade genética, o que poderia resultar em efeitos deletérios na fecundidade de fêmeas desse inimigo natural (Henter, 2003). Isto pode ser explicado pelo fato desse efeito ser mais severo em espécies de adultos diploides que haplodiploides, como *C. noackae* com redução do

alelo deletério expresso pelos machos (Werren, 1993; Antolin, 1999). Além disso, o cruzamento consanguíneo é, freqüente, em parasitoides devido ao comportamento normal de acasalamento ou baixa densidade populacional, mesmo, na natureza (Werren, 1993). Além disso, o aumento na fecundidade é relatado na literatura relacionado a adaptação as condições de criação, o que matematicamente podemos observar para as populações de *C. noackae* com mais gerações (F67 e F122), parasitando, em média, aproximadamente 12 ovos de *T. peregrinus*. Os resultados no número de ovos parasitados por *C. noackae* são semelhantes aos do parasitoide *Telenomus remus* Nixon, 1937 (Hymenoptera: Platygasteridae), após 35, 40 e 45 gerações, em ovos de *Corcyra cephalonica* Stainton, 1866 (Lepidoptera: Pyralidae) sem diferenças no número de ovos parasitados (Queiroz *et al.*, 2017). Além disso, o número de ovos parasitados por *C. noackae*, por todas as populações, maior que nove foi superior ao relatado para este parasitoide a 24 °C, 7,73 ovos (Becchi, 2017). Isso se deve ao maior intervalo de oferta de hospedeiros às fêmeas, 24 h (Becchi, 2017), enquanto, neste trabalho, isto foi feito de 4 em 4 horas, fase clara, e 12 h na fase escura.

O número semelhante de *C. noackae*, emergido entre as populações com diferentes gerações e viabilidade acima de 95% nas populações foi semelhante ao observado para o parasitoide *T. remus*, com viabilidade acima de 98% após diferentes gerações em ovos de *C. cephalonica* (Queiroz *et al.*, 2017).

A razão sexual semelhante de *C. noackae*, entre as populações com diferentes gerações e maior emergência de fêmeas que machos demonstram que este parâmetro não afeta a qualidade desse parasitoide em laboratório, pois as fêmeas são responsáveis pelo aumento populacional e controle biológico da praga (Bueno *et al.*, 2017; Laumann e Sampaio, 2020). Um maior número de progênie fêmeas foi obtido para aquelas de *C. noackae* acasaladas em laboratório com razão sexual de 0,68 no Brasil (Becchi *et al.*, 2020) e 0,50 na África do Sul (Mutitu *et al.*, 2013), e em estudos de campo em Minas Gerais com 0,65 (Barbosa *et al.*, 2017). No Uruguai, a razão sexual de *C. noackae* foi semelhante constante após diferentes gerações em laboratório (Martinez *et al.*, 2018). A razão sexual do parasitoide *T. remus*, multiplicado por 35, 40 e 45 gerações em ovos de *C. cephalonica*, foi levemente tendenciosa para fêmeas, 0,56 a 0,52 (Queiroz *et al.*, 2017), enquanto que para *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) a progênie foi altamente tendenciosa para fêmeas, com razão sexual de 0,70 a 0,91,

em populações com 5 e 50 gerações criadas em ovos de *Diatraeae saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) (Bertin *et al.*, 2017). Isto comprova ser essencial avaliar a razão sexual das populações para evitar a tendência de progênie machos e assegurar a manutenção da criação em laboratório e a efetividade do parasitismo nas liberações em campo.

O menor período de desenvolvimento de ovo-adulto de *C. noackae* nas populações com maiores números de gerações (F67 e F122), diferença de 0,4 dias indica adaptação as condições de criação, que podem afetar comportamentos e a biologia das populações e reduzir a capacidade adaptativa as condições naturais (Frankham, 2008). No entanto, esse menor tempo no desenvolvimento pode reduzir o período de exposição do parasitoide a fatores de mortalidade bióticos e abióticos (Laumann e Sampaio, 2020). O período de desenvolvimento ovo-adulto de *C. noackae* é semelhante a desse parasitoide na África do Sul (Mutitu *et al.*, 2013) e Brasil (Barbosa *et al.*, 2018).

A maior longevidade de fêmeas de *C. noackae* sem experiência de parasitismo pode estar relacionada ao maior gasto energético daquelas que ovipositaram em ovos *T. peregrinus* (Pacheco *et al.*, 1998). Isto é um indicador de qualidade em laboratório, por garantir um maior período de tempo para localizarem os hospedeiros, ovipositarem e aumentarem sua população no campo após liberação (Mason, 2010; Sorensen *et al.*, 2012; Laumann e Sampaio 2020). Resultados semelhantes para longevidade de fêmeas do parasitoide *T. remus*, multiplicado em ovos de *C. cephalonica*, não diferiram entre 35 e 45 gerações, com 5,6 e 6,1 dias, respectivamente (Queiroz *et al.*, 2017).

A maior sobrevivência de fêmeas de *C. noackae*, sem experiência de parasitismo, que as com hospedeiros e nas populações com mais gerações em laboratório pode ser atribuída a estratégia adaptativa quando armazenam recursos metabólicos e convertem em energia em períodos sem hospedeiros disponíveis (Bell e Koufopanou, 1986) e a mudanças genéticas, pois respostas ao longo do tempo são efeitos da seleção (Fry, 2003).

A maior porcentagem de parasitoides voadores nas populações de *C. noackae*, com menor número de gerações em laboratório, F13 e F18, com, 68 e 63%, respectivamente, indica uma maior capacidade de busca e controle do percevejo-bronzeado. Isso, pode ser devido a perda de capacidade de vôo após o condicionamento e sucessivas gerações em laboratório nas com mais gerações

(Naranjo-Guevara *et al.*, 2020). A habilidade de voar e caminhar são fundamentais para o desempenho dos parasitoides a campo condicionando sua dispersão e forrageamento do hospedeiro (Gardner e Lenteren, 1986; van Lenteren *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram relatados para *Trichogramma brassicae* Bezdenko 1968 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), com maior porcentagem de insetos voadores na geração com menor tempo em condições controladas (F2, 73,5%) que naquelas com maior (F39, 61,4%) (Dutton e Bigler, 1995). A porcentagem de indivíduos voadores de espécies de parasitoides de ovos como *T. remus* após 35, 40 e 45 gerações, de 83, 70 e 89% de insetos voadores, respectivamente (Queiroz *et al.*, 2017) e de *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) com 3, 35 e 72 gerações, entre 83 e 89% de indivíduos (Prezotti *et al.*, 2002) foi maior que as de *C. noackae*. O maior número de parasitoides “caminhadores”, nas populações com maior número de gerações em laboratório, F39, F67 e F122, que as com menor número, F13, pode ser devido a perda de capacidade de vôo após o condicionamento e sucessivas gerações em laboratório (Naranjo-Guevara *et al.*, 2020). Isso pode reduzir o sucesso do controle biológico por indivíduos liberados a campo, por reduzir o raio de dispersão do parasitoide (Volpe *et al.*, 2014). No entanto, a atividade de caminhar pode ter uma importância maior na procura pelo hospedeiro após o parasitoide encontrar a planta (Dutton e Bigler, 1995). A redução da habilidade de vôo foi, também, relatada para *T. remus* após várias gerações em laboratório, com maior porcentagem de insetos caminhadores na população de laboratório (38,7%) que na silvestre (4,83%) (Naranjo-Guevara *et al.*, *et al.*, 2020). O percentual de parasitoides não-voadores, entre 11 a 24%, foi maior que o das gerações 35 (7,9%) e 72 (10%) de *T. pretiosum* com menor propensão ao vôo ou com as asas deformadas (Prezotti *et al.*, 2002).

Os parâmetros biológicos parasitismo, emergência e razão sexual de *C. noackae* foram semelhantes entre as populações, mas o desenvolvimento, longevidade e sobrevivência foram influenciadas pelo número de gerações. A capacidade de vôo de indivíduos das populações com 67 e 122 gerações foi menor que as com menos, e possivelmente, reduzirá a dispersão e busca do ovo do hospedeiro *T. peregrinus* em campo após sua liberação. Os resultados confirmam a hipótese de que a criação sucessiva em laboratório em ovos de *T. peregrinus* apresentam mudanças nos parâmetros biológicos e comportamentais de *C. noackae*.

Os índices recomendados propostos neste estudo para o controle de qualidade de populações de *C. noackae* criadas em ovos de *T. peregrinus* em laboratório são: o número de ovos parasitados ≥ 9 ; emergência $\geq 80\%$; razão sexual $\geq 0,5$ e longevidade maior que 24 e 48 h para fêmeas com e sem experiência de parasitismo, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Antolin, M.F.** (1999) A genetic perspective on mating systems and sex ratios of parasitoid wasps. *Population Ecology* 41, 29-37.
- Barbosa, L.R., Santos, F., Buhner, C.B., Nichele, L.A., Wilcken, C.F. & Soliman, E.P.** (2016) *Criação massal do percevejo bronzeado, Thaumastocoris peregrinus: Carpinteiro & Dellapé, 2006 (Hemiptera, Thaumastocoridae)*. Brasília, Embrapa.
- Barbosa, L.R., Rodrigues, A.P., Soler, L.S., Fernandes, B.V., Castro, B.M.C.C., Wilcken, C.F. & Zanuncio, J.C.** (2017) Establishment in the field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an exotic egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Florida Entomologist* 100, 372-374.
- Barbosa, L.R., Rodrigues, A.P., de Souza, L.N., Foerster, L.A., de Souza, A.R., Castro, B.M.D.C. & Zanuncio, J.C.** (2018) Development of *Cleruchoides noackae*, an egg-parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus*, in eggs laid on different substrates, with different ages and post-cold storage. *BioControl* 63, 193-202.
- Barbosa, L.R., Santos, F., Soliman, E.P., Rodrigues, A.P., Wilcken, C.F., Campos, J.M. & Zanuncio, J.C.** (2019) Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. *Scientific Report* 9, 10174.
- Becchi, L.K.** (2017) Bioecologia do parasitoide *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) em ovos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 73 p., Botucatu.
- Becchi, L.K., Jorge, C., de Camargo, G.F., Barbosa, L.R., Soares, M.A., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. & Wilcken, C.F.** (2020) Oviposition behaviour of mated or

- unmated *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). *PLoS ONE* 15, e0239285
- Bell, G. & Koufopanou, V.** (1986). The cost of reproduction. pp. 83-131 in Dawkins, R. & M. Ridley (Eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Bertin, A., Pavinato, V.A.C. & Parra, J.R.P.** (2017) Fitness-related changes in laboratory populations of the egg parasitoid *Trichogramma galloi* and the implications of rearing on factitious hosts. *BioControl* 62, 435-444.
- Bigler, F.** (1989) Quality assessment and control in entomophagous insects used for biological control. *Journal of Applied Entomology* 108, 390-400.
- Bueno, E., Romero, A., Osorio, I. & Zaviezo, T.** (2017). Laboratory rearing methods that promote inbreeding have a negative impact on the fitness of *Mastrus ridens* Horstmann (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid used to control the codling moth. *Chilean Journal of Agricultural Research* 77, 413-419.
- Cassel, A., Windig, J., Nylin, S. & Wiklund, C.** (2001) Effects of population size and food stress on fitness-related characters in the Scare Heath, a rare butterfly in Western Europe. *Conservation Biology* 15, 1667-1673.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B.** (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 237-268.
- Clarke, G.M. & McKenzie, L.J.** (1992) Fluctuating asymmetry as a quality control indicator for insect mass rearing processes. *Journal of Economic Entomology* 85, 2045–2050.
- Dutton, A. & Bigler, F.** (1995) Flight activity assessment of the egg parasitoid *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) in laboratory and field conditions. *Entomophaga* 40, 223-233.
- Frankham, R.** (2008) Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* 17, 325-333.
- Fry, J.D.** (2003) Detecting ecological trade-offs using selection experiments. *Ecology*, 84, 1672-1678.
- Gardner, S.M. & Lenteren, J.C.** (1986) Characterization of the arrestment responses of *Trichogramma evanescens*. *Oecologia* 68, 265-270.
- Garnas, J.R., Hurley, B.P., Slippers, B. & Wingfield, M.J.** (2012) Biological control of forest plantation pests in an interconnected world requires greater international focus. *International Journal of Pest Management* 58, 211-223.

- Grenier, S. & De Clercq, P.** (2003) Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential use in biological control. pp 115-131 in van Lenteren, J.C. (Ed.) *Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures*. CABI Publishing, Wallingford, England.
- Henter, H.J.** (2003) Inbreeding depression and hapodiploidy: experimental measures in a parasitoid and comparisons across diploid and hapodiploid insect taxa. *Evolution* 57, 1793-1803.
- Hulme, P.E.** (2009) Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* 46,10-18.
- IBÁ.** (2020) *Relatório da Indústria Brasileira de Árvores, ano base 2019*, 80p, Brasília, Indústria Brasileira de Árvores, Brasil.
- Laumann, R.A. & Sampaio, M.V.** (2020) Controle de artrópodes-praga com parasitoides. pp 65-112 in Fontes, E. & Inglis, M. (Eds.) *Controle biológico de pragas da agricultura*. INFOTECA-E, Embrapa, Brasília.
- Leppla, N.C.** (2003) Aspects of total quality control for the production of natural enemies. pp 19-24 in van Lenteren, J.C. (Ed.). *Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures*. CABI publishing, Wallingford, England.
- Lin, N.Q., Huber, J.T. & Salle, J.L.** (2007) The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Zootaxa* 1596, 1-111.
- Martínez, G., González, A. & Dicke, M.** (2018) Rearing and releasing the egg parasitoid *Cleruchoides noackae*, a biological control agent for the *Eucalyptus* bronze bug. *Biological Control* 123, 97-104.
- Mason, G.J.** (2010) Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 713-721.
- Meyerson, L.A. & Mooney, H.A.** (2007) Invasive alien species in an era of globalization. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5, 199–208.
- Montagu, A., Robinson, K., Noack, A., Nahrung, H., Lawson, S. & Lo, N.** (2020) Global incursion pathways of *Thaumastocoris peregrinus*, an invasive Australian pest of eucalypts. *Biological Invasions* 22, 3501–3518.
- Mutitu, E.K., Garnas, J.R., Hurley, B.P., Wingfield, M.J., Harney, M., Bush, S.J. & Slippers, B.** (2013) Biology and rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the biological control of

Thaumastocoris peregrinus (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Journal of Economic Entomology* 106, 1979-1985.

- Mutitu, E.K., Hoareau, T.B., Hurley, B.P., Garnas, J.R., Wingfield & Slippers, B** (2020) Reconstructing early routes of invasion of the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): cities as bridgeheads for global pest invasions. *Biological Invasions* 22, 2325–2338.
- Nadel, R.L., Slippers, B., Scholes, M.C., Lawson, S.A., Noack, A.E., Wilcken, C.F., Bouvet, J.P. & Wingfield, M.J.** (2010) DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. *Biological Invasions* 12, 1067-1077.
- Nadel, R.L. & Noack, A.E.** (2012) Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. *International Journal of Pest Management* 58, 257-266.
- Naranjo-Guevara, N., dos Santos, L.A. O., Barbosa, N.C.C.P., Corrêa e Castro, A.C.M., & Fernandes, O.A.** (2020) Long-term mass rearing impacts performance of the egg parasitoid *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae). *Journal of Entomological Science* 55, 69- 86.
- Pacheco, D.J.P. & Corrêa-Ferreira, B.S.** (1998) Reproductive potential and longevity of the parasitoid *Telenomus podisi* Ashmead in eggs of different stinkbug species. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27, 585-591.
- Prezotti, L., Parra, J. R., Vencovsky, R., Dias, C. T., Cruz, I. & Chagas, M.** (2002) Teste de vôo como critério de avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Adaptação de metodologia. *Neotropical Entomology* 31, 411-417.
- Queiroz, A. P., Bueno, A. D. F., Pomari-Fernandes, A., Grande, M. L. M., Bortolotto, O. C., & Silva, D. M.** (2017) Quality control of *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) reared on the factitious host *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae) for successive generations. *Bulletin of Entomological Research* 107, 791-798.
- Santadino, M., Brentassi, M.E., Fanello, D.D. & Coviella, C.** (2017) First evidence of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) feeding from mesophyll of eucalyptus leaves. *Environmental Entomology* 46, 251-257.
- Souza, A.R., Candelaria, M.C., Barbosa, L.R., Wilcken, C.F., Campos, J.M., Serrão, J.E. & Zanuncio, J.C.** (2016) Longevity of *Cleruchoides noackae*

(Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), with various honey concentrations and at several temperatures. *Florida Entomologist* 99, 33-37.

- Trevisan, M., de Bortoli, S.A., Vacari, A.M., Laurentis, V.L. & Ramalho, D.G.** (2016) Quality of the exotic parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) does not show deleterious effects after inbreeding for 10 generations. *PLoS ONE* 11, e0160898.
- van Lenteren, J.C.** (1992) Quality control for natural enemies used in greenhouses. *Bull OILB-SROP* 16, 89-92.
- van Lenteren, J.C. & Tomazini, M.G.** (1999). Mass production, storage, shipment and quality control of natural enemies. pp 276-294 in Albajes, R., Gullino, M.L., van Lenteren, J.C. & Elad, Y. (Eds.) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*, Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- van Lenteren, J.C., Hale, A., Klapwijk, J.N., van Schelt, J. & Steinberg, S.** (2003) Need for quality control of mass-produced biological control agents. pp 265-303 in van Lenteren, J.C. (Ed.) *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*. Wallingford, Oxon, U.K.
- van Lenteren, J.C. & Bigler, F.** (2010) Quality control of mass reared egg parasitoids. pp 315-340 in Consoli, F.L., Parra, J.R.P. & Zuchi, R.A. (Eds.) *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- Volpe, H.X.L., Barbosa, J.C., Viel, S.R., Goulart, R.M., Vacari, A.M., Salas, C., Veiga, A.C.P. & Bortoli, S.A.** (2014) Determination of method to evaluate parasitism and cover area for studies on *Cotesia flavipes* in sugarcane. *African Journal of Agricultural* 9, 436-447.
- Werren, J.H.** (1993) The evolution of inbreeding in haplodiploid organisms. pp 42-94 in Thornhill, N.W. (Ed.) *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding*. University of Chicago, Chicago Press.
- Wilcken, C.F., Soliman, E.P., Nogueira de Sá, L.A., Barbosa, L.R., Dias, T.K.R., Ferreira Filho, P.J. & Rodrigues Oliveira, R.J.** (2010) Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research* 50, 201-205.

- Wilcken, C.F., Barbosa, L.R., Zache, B., Firmino, A., Nogueira de Sá, L.A., Zanuncio, J.C. & Junqueira, L.R.** (2014) Biological control of the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* in eucalyptus plantations in Brazil. *International Forestry Review* 16: 325.
- Wilcken, C.F., Barbosa, L.R., Soliman, E.P., Lima, A.C.V., Nogueira de Sá, L.A. & Lawson, S.** (2015) Percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpinteiro & Dellapé. Pp 898-908 in Vilela, E.F. & Zucchi, R.A. *Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros*. Fealq, Piracicaba, Brasil.

CAPÍTULO 2

ENDOSSIMBIONTES ASSOCIADOS AO PARASITOIDE DE OVOS *Cleruchoides noackae* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE)

Resumo

O percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), praga sugadora de seiva das folhas de eucalipto, originária da Austrália, está presente no Brasil desde 2008. Este inseto ocasiona o prateamento ou bronzeamento das folhas, seguido de desfolha, e consequente redução em altura e diâmetro das árvores de eucalipto, resultando em menor produtividade dos planios. O controle biológico por meio do endoparasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae), específico da subfamília Thaumastocoridae, introduzido no Brasil em 2012 tem sido uma das principais alternativas de manejo do *T. peregrinus*. Associações de parasitoides com bactérias endossimbiontes ou micro-organismos podem influenciar os parâmetros biológicos e reprodutivos dos insetos. O objetivo deste estudo foi prospectar a presença dos endossimbiontes *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Carsonella*, *Hamiltonella*, *Regiella*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Sodalis*, *Spiroplasma*, *Wolbachia*, e do microsporídio *Nosema*, em adultos de *C. noackae* provenientes do campo e da criação estoque de laboratório com diferentes gerações, por meio da extração e amplificação do DNA, com o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers específicos. Foi visualizado os produtos de PCR por gel de agarose e as amostras positivas foram purificadas e submetidas ao sequenciamento. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com as do banco de dados GenBank. Oito gêneros de endossimbiontes foram presentes nas populações de *C. noackae* e após o sequenciamento foi possível identificar 99% de identidade com os gêneros *Wolbachia*, *Rickettsia* e *Serratia*, havendo associação do parasitoide com essas bactérias. Efeitos dos endossimbiontes nos parâmetros biológicos e reprodutivos de *C. noackae* e seus efeitos na criação massal e na eficiência desse agente de controle biológico necessitam ainda serem investigados.

Palavras-chave: *Eucalyptus*; percevejo-bronzeado; *Rickettsia*; *Serratia*; *Wolbachia*.

² Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Journal of Insect Science.

Abstract

The Eucalyptus bronze-bug, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), a sap-sucking pest, that originated in Australia, has been present in Brazil since 2008. This insect causes silvering or tanning of the leaves, which is followed by defoliation and consequent reduction in height and diameter of eucalyptus trees, resulting in productivity losses. Biological control by endoparasitoid of eggs *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae), specific to the subfamily Thaumastocoridae, introduced in Brazil in 2012 has been one of the main alternatives for the management of *T. peregrinus*. Associations between parasitoid and endosymbiont bacteria or microorganisms may influence the biological and reproductive characteristics of these biological control agents. The objective of this study was to evaluate the presence of endosymbionts of the genera *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Carsonella*, *Hamiltonella*, *Regiella*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Sodalis*, *Spiroplasma*, *Wolbachia*, and the microsporid *Nosema*, in adults of *C. noackae* originated from the field and mass-reared in the laboratory at different insect generations, through DNA extraction and amplification, with the polymerase chain reaction method using specific primers. Eight genera of endosymbionts were present in the populations of *C. noackae*. After sequencing, it was possible to determine that 99% of identity belonged to the genera *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Serratia*, with an association of the parasitoid with these bacteria. The effects of endosymbionts on the biological and reproductive parameters of *C. noackae* on mass-rearing and efficiency of this biological control agent still need to be investigated.

Key words: bronze-bug, *Eucalyptus*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Wolbachia*.

2.1 INTRODUÇÃO

O parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae), encontrado inicialmente na região de Sidney, Austrália (Lin et al., 2007) foi introduzido no Brasil em 2012 para o controle do percevejo-bronzeado-do-eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) (Wilcken et al.,

2014). *Cleruchooides noackae* possui partenogênese arrenótoca (Mutitu et al., 2013; Becchi et al., 2020), mas a razão sexual de *C. noackae* em laboratório e campo foi de 0,76 e 0,65, respectivamente (Barbosa et al. 2018; 2019). O parasitoide *C. noackae* tem sido liberado, após criação em laboratório, de forma inoculativa em plantação de eucalipto infestados pelo percevejo-bronzeado, contudo, em algumas regiões o parasitoide não tem se adaptado por razões ainda desconhecidas.

Bactérias endossimbiontes e outros microrganismos apresentam um impacto importante na evolução e ecologia do hospedeiro (Nouhuys, et al. 2016) e podem ser adquiridos ou transferidos passivamente pelo ambiente ou maternalmente a cada geração ou por vetores como parasitoides (Jackson et al. 2004, Moran, et al. 2008).

Endossimbiontes primários (obrigatórios) encontram-se localizados em células especializadas, os bacteriócitos, e apresentam uma relação estreita com o inseto, sendo requeridos para sua sobrevivência e reprodução (Feldhaar, 2011), enquanto endossimbiontes secundários (facultativos) são encontrados em diversos tecidos, são transmitidos de forma vertical ou horizontal, e não são necessários a sobrevivência do inseto (Baumann, 2005; Kikuchi, 2009).

A grande maioria dos endossimbiontes possuem efeitos benéficos ao hospedeiro, metabolizam nutrientes essenciais, como aminoácidos e vitaminas B e fornecem proteção contra patógenos e parasitoides devido a produção de toxina ou modificação do sistema imune do inseto (Oliver et al. 2003; Douglas, 2015; Oliver e Higashi, 2019). Outros podem influenciar na emissão de voláteis emitidos pelas plantas alimentadas pela praga, resultando na modificação do comportamento dos insetos parasitoides quanto a localização e aceitação do hospedeiro, em resposta a uma possível competição por recursos entre parasitoides e simbiotes no mesmo hospedeiro (Frago et al. 2017; Monticeli et al. 2019). Ainda, bactérias endossimbiontes podem reduzir o tempo de desenvolvimento dos insetos (Pistone et al. 2014), aumentar o parasitismo (Segoli et al. 2013; Fugihata et al., 2015), a resistência ao parasitismo e infecção por patógenos (Nouhuys, et al., 2016). Em outros casos, a presença de endossimbiontes pode prejudicar a capacidade de locomoção, sobrevivência e fecundidade dos insetos (Fleury et al. 2000), aumenta a suscetibilidade do parasitoide ao hiperparasitismo (Nouhuys et al. 2016), e causa a mortalidade de embriões devido a incompatibilidade citoplasmática (Mann et al. 2017).

Bactérias do gênero *Wolbachia* influenciam no “fitness”, reprodução e comportamento do hospedeiro (Miller e Schneider, 2012), com rota de transmissão vertical ou horizontal entre gerações e espécies, respectivamente (Werren et al. 2008; Pistone et al. 2014). Mortalidade e feminização dos machos, manipulação da partenogênese e a incompatibilidade de cruzamento de machos infectados com fêmeas não infectadas ou com fêmeas infectadas com um genótipo simbiote distinto são estratégias que essa bactéria utiliza para manipular a reprodução do hospedeiro (Werren et al. 2008; Mann et al. 2017). As do gênero *Cardinium* estão associadas a incompatibilidade citoplasmática, partenogênese e feminização em alguns artrópodes (Wu e Hoy, 2012). *Arsenophonus*, *Spiroplasma* e *Rickettsia* também podem manipular a reprodução dos hospedeiros (Kageyama et al. 2012; Nugnes et al. 2015; Gualtieri et al. 2017) causando a mortalidade de descendentes machos de insetos infectados (Harumoto et al. 2018). Bactérias do gênero *Serratia* são relatadas causando doenças em insetos e podem ser utilizadas para monitorar a atividade de oviposição de parasitoides devido a produção de pigmentos vermelhos de algumas raças (Jackson et al. 2004) e ainda causar a mortalidade prematura em hospedeiros parasitados (Jackson e McNeill, 1998).

Em estudos com insetos da ordem Hymenoptera, na área florestal foram relatados a presença do endossimbiote *Rickettsia* na vespa-da-galha-do-eucalipto *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) (Nugnes et al. 2015) e no seu parasitoide *Quadrastichus mendeli* Kim & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) sendo possivelmente a bactéria causadora da partenogênese telítoca em *L. invasa* e *Q. mendeli* (Gualtieri et al. 2017). Em pinus, as pragas *Diprion pini* Linnaeus e *Neodiprion sertifer* Geoffroy (Hymenoptera: Diprionidae) e seu parasitoide *Dahlbominus fuscipennis* Zetterstedt (Hymenoptera: Eulophidae) foram positivas à presença do gênero *Wolbachia*, e negativa para *Cardinium* (Pistone et al. 2014). Em *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae), parasitoide de ovos de *Gonipterus platensis* Marelli (Coleoptera: Curculionidae) foi detectado a presença de *Yersinia massiliensis* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) (Ribeiro et al. 2021).

A presença de patógenos em hospedeiros, como os microsporídios pode interferir na duração do desenvolvimento, na longevidade e reprodução de parasitoides, e conseqüentemente no controle biológico de pragas em campo e na criação massal em laboratório (Simões et al. 2012; Paes et al. 2019). No entanto,

não há relatos de microsporídios ou bactérias endossimbiontes no parasitoide *C. noackae*. O objetivo foi prospectar a presença de endossimbiontes dos gêneros *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Carsonella*, *Hamiltonella*, *Regiella*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Sodalis*, *Spiroplasma*, *Wolbachia*, e do microsporídio *Nosema*, em adultos de *C. noackae* provenientes do campo e laboratório.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) e no Laboratório de Biologia Molecular Nematologia da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Obtenção das amostras

Adultos de *C. noackae*, de diferentes populações e gerações, da criação estoque do LCBPF, coletados inicialmente em diferentes épocas e localidades em plantações de eucalipto (Tabela 1) foram mortos por congelamento, preservados em tubo de congelamento (1,8 ml) e estocados a -20°C . Adultos de cada população desse parasitoide foram mantidos em frascos de poliestireno (7,5 cm de altura x 3,0 cm de diâmetro) com tiras de papel filtro (7,0 cm de altura x 1,5 cm de largura) umedecidas em solução de mel a 50% para alimentação dos parasitoides. Ovos de *T. peregrinus* com até 24 horas de idade, foram oferecidos às fêmeas do parasitoide e mantidos a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h (Barbosa et al. 2016). Ovos de *T. peregrinus* foram coletados em plantios florestais em diferentes municípios (Tabela 1), armazenados em frascos de poliestireno transparente, enviados para o LCBPF e mantidos a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h até a emergência de adultos do parasitoide *C. noackae*. Os indivíduos emergidos (N 50) foram mortos por congelamento, preservados em tubo de congelamento (1,8 ml) e estocados a -20°C .

A emergência ou coleta dos adultos de *C. noackae* ocorreu em agosto de 2018 no laboratório e campo, respectivamente.

Tabela 1. Identificação e localização das populações (Pop.) de *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) avaliadas

Pop.	Geração	Amostras	Local
1	128	Laboratório	Sidney, Austrália
2	20	Laboratório	Três Marias – MG
3	45	Laboratório	Curvelo – MG
4	10	Laboratório	Botucatu – SP
5	74	Laboratório	Arroio dos Cachorros-RS
6	25	Laboratório	Itamarandiba – MG
7	0	Campo	Ferrugem, RS
8	0	Campo	Mogi Guaçu – SP
9	0	Campo	Três Lagoas – MS

Extração de DNA genômico

Para cada população, a extração do DNA genômico foi realizada de 50 adultos de *C. noackae*. Os indivíduos foram macerados em solução de 80µl de resina Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories) a 10% e 8µl de proteinase K (20 mg/ml) (Walsh et al. 1991) e agitados por dez segundos em Vortex Bsiomixer MOD QL901 e minicentrífuga de bancada Ministar a 6200 rpm. As amostras foram colocadas em bloco térmico a 95°C por 20 min. Em seguida, foi coletado o sobrenadante para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Reação de PCR

As amplificações do DNA para os diferentes endossimbiontes dos gêneros *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Carsonella*, *Hamiltonella*, *Regiella*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Sodalis*, *Spiroplasma*, *Wolbachia*, e do microsporídio *Nosema* sp. foram realizadas mediante ao uso de primers específicos e efetuadas em termociclador INFINIGEN (modelo TC-96CG) com as condições específicas para cada conjunto de primers dos endossimbiontes e microsporídio de interesse (Tabela 2). O mix de PCR foi constituído de 12,5 µl de Gotaq, 7,5 µl de água nucleasse-free, 1,0 µl de cada primer (forward e reverse) e 3,0 µl de DNA genômico, totalizando 25 µl por reação, enquanto que para o microsporídio *Nosema* foi de 12,5 µl de Gotaq, 5,0 µl de água nucleasse-free, 1,25 µl de cada primer (forward e revers) e 5,0 µl de DNA genômico, totalizando 25 µl por reação. Para a visualização dos produtos de PCR foi utilizado marcador molecular 100 pb (Norgen) e gel de agarose 1%, e de intercalante de DNA GelRed

conforme as instruções do fabricante (NeoBio). O gel de agarose foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Major Science). Todos os procedimentos de extração de DNA foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Nematologia da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Tabela 2. Primers utilizados na prospecção de endossimbiontes e microsporídios associados ao parasitoide *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) ¹F: Forward e R: Reverse.

Endossimbionte/ microsporídio	Primers ¹	Sequência 5' - 3'	Ciclos	Tamanho (pb)	Referência
<i>Arsenophonus</i>	F	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA	95°C por (2') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 58° C (30'') e 72°C (1') e uma extensão final de 72° C por 5'	600	Thao e Baumann, 2004
	R	GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC			
<i>Cardinium</i>	F	TACTGTAAGAATAAGCACCGGC	95°C por (2') seguido de 30 ciclos: 92° C (30''), 57° C (30'') e 72° C (30'') e uma extensão final de 72° C por 5'	900	Zchori-Fein e Pearlman, 2004
	R	GTGGATCACTTAACGCTTTTCG			
<i>Carsonella</i>	F	CACGTGCTACAATGAGTAAAACAA	95°C por (2') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 58° C (30'') e 72° C (1') e uma extensão final de 72° C por 5'	600	Nachappa et al. 2011
	R	GGTTCCCCTACAGCTACCTTG			
<i>Hamiltonella</i>	F	TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG	95°C por (2') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 58° C (30'') e 72°C (1') e uma extensão final de 72° C por 5'	700	Zchori-Fein e Brown, 2002
	R	AGTTCAAGACCGCAACCTC			
<i>Regiella</i>	F	ATCGGGGAGTAGCTTGCTAC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 52° C (1') e 72° C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	1000	Sandström et al. 2001
	R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT			

Endossimbionte/ microsporídio	Primers ¹	Sequência 5' - 3'	Ciclos	Tamanho (pb)	Referência																																										
<i>Rickettsia</i>	F	GCTCAGAACGAACGCTATC	95°C por (2') seguido de 30 ciclos: 92° C (30''), 58° C (30'') e 72° C (30'') e uma extensão final de 72° C por 5'	900	Gottlieb, 2006																																										
	R	GAAGGAAAGCATCTCTGC				<i>Serratia</i>	F	CGCAGGCGGTTTGTAAAGTC	95°C por (10') seguido de 35 ciclos: 95° C (1'), 62° C (1') e 72° C (1') e uma extensão final de 72° C por 1'	268	Ribeiro, 2019		R	CTTCAAGGGCACAACCTCCA	<i>Sodalis</i>	F	ACCGCATAACGTCGCAAGACC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 62° C (1') e 72° C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	1000	Nováková e Hypša, 2007		R	CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG	<i>Spiroplasma</i>	F	GCTTAACTCCAGTTCGCC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 52° C (1') e 72°C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	800	Montenegro et al. 2005		R	CCTGTCTCAATGTTAACCTC	<i>Wolbachia</i>	F	CGGGGGAAAAATTTATTGCT	95°C por (3') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 55° C (30'') e 72°C (30'') e uma extensão final de 72° C por 5'	700	Heddi et al. 1999		R	AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	<i>Nosema</i>	F	CACCAGGTTGATTCTGCC	95°C por (4') seguido de 45 ciclos: 95° C (1'), 48° C (1') e 72°C (1') e uma extensão final de 72 ° C por 4'	222	Vossbrinck et al. 1993
<i>Serratia</i>	F	CGCAGGCGGTTTGTAAAGTC	95°C por (10') seguido de 35 ciclos: 95° C (1'), 62° C (1') e 72° C (1') e uma extensão final de 72° C por 1'	268	Ribeiro, 2019																																										
	R	CTTCAAGGGCACAACCTCCA				<i>Sodalis</i>	F	ACCGCATAACGTCGCAAGACC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 62° C (1') e 72° C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	1000	Nováková e Hypša, 2007		R	CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG	<i>Spiroplasma</i>	F	GCTTAACTCCAGTTCGCC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 52° C (1') e 72°C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	800	Montenegro et al. 2005		R	CCTGTCTCAATGTTAACCTC	<i>Wolbachia</i>	F	CGGGGGAAAAATTTATTGCT	95°C por (3') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 55° C (30'') e 72°C (30'') e uma extensão final de 72° C por 5'	700	Heddi et al. 1999		R	AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	<i>Nosema</i>	F	CACCAGGTTGATTCTGCC	95°C por (4') seguido de 45 ciclos: 95° C (1'), 48° C (1') e 72°C (1') e uma extensão final de 72 ° C por 4'	222	Vossbrinck et al. 1993		R	TTATGATCCTGCTAATGGTTC						
<i>Sodalis</i>	F	ACCGCATAACGTCGCAAGACC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 62° C (1') e 72° C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	1000	Nováková e Hypša, 2007																																										
	R	CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG				<i>Spiroplasma</i>	F	GCTTAACTCCAGTTCGCC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 52° C (1') e 72°C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	800	Montenegro et al. 2005		R	CCTGTCTCAATGTTAACCTC	<i>Wolbachia</i>	F	CGGGGGAAAAATTTATTGCT	95°C por (3') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 55° C (30'') e 72°C (30'') e uma extensão final de 72° C por 5'	700	Heddi et al. 1999		R	AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	<i>Nosema</i>	F	CACCAGGTTGATTCTGCC	95°C por (4') seguido de 45 ciclos: 95° C (1'), 48° C (1') e 72°C (1') e uma extensão final de 72 ° C por 4'	222	Vossbrinck et al. 1993		R	TTATGATCCTGCTAATGGTTC															
<i>Spiroplasma</i>	F	GCTTAACTCCAGTTCGCC	94°C por (5') seguido de 30 ciclos: 94° C (1'), 52° C (1') e 72°C (2') e uma extensão final de 72° C por 5'	800	Montenegro et al. 2005																																										
	R	CCTGTCTCAATGTTAACCTC				<i>Wolbachia</i>	F	CGGGGGAAAAATTTATTGCT	95°C por (3') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 55° C (30'') e 72°C (30'') e uma extensão final de 72° C por 5'	700	Heddi et al. 1999		R	AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	<i>Nosema</i>	F	CACCAGGTTGATTCTGCC	95°C por (4') seguido de 45 ciclos: 95° C (1'), 48° C (1') e 72°C (1') e uma extensão final de 72 ° C por 4'	222	Vossbrinck et al. 1993		R	TTATGATCCTGCTAATGGTTC																								
<i>Wolbachia</i>	F	CGGGGGAAAAATTTATTGCT	95°C por (3') seguido de 30 ciclos: 95° C (30''), 55° C (30'') e 72°C (30'') e uma extensão final de 72° C por 5'	700	Heddi et al. 1999																																										
	R	AGCTGTAATACAGAAAGTAAA				<i>Nosema</i>	F	CACCAGGTTGATTCTGCC	95°C por (4') seguido de 45 ciclos: 95° C (1'), 48° C (1') e 72°C (1') e uma extensão final de 72 ° C por 4'	222	Vossbrinck et al. 1993		R	TTATGATCCTGCTAATGGTTC																																	
<i>Nosema</i>	F	CACCAGGTTGATTCTGCC	95°C por (4') seguido de 45 ciclos: 95° C (1'), 48° C (1') e 72°C (1') e uma extensão final de 72 ° C por 4'	222	Vossbrinck et al. 1993																																										
	R	TTATGATCCTGCTAATGGTTC																																													

Purificação do DNA, sequenciamento Sanger e análise

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando o Kit de Purificação PCR (Cellco, Cat.DPK-106S) seguindo as recomendações do fabricante. As amplificações foram sequenciadas por sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 - Applied Biosystems) no Instituto de Biotecnologia (IBTEC/UNESP) em Botucatu-SP. As sequências obtidas referentes a prospecção dos endossimbiontes ou microsporídeo foram comparadas às outras do banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação de similaridade genética.

2.3 RESULTADOS

A presença de endossimbiontes secundários dos gêneros *Cardinium*, *Carsonella*, *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Sodalis*, *Spiroplasma* e *Wolbachia* foi confirmada, com banda positiva, em todas as populações de *C. noackae* de laboratório ou campo e apenas os gêneros *Arsenophonus*, *Regiella*, e o microsporídeo *Nosema* apresentaram resultados negativos (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 3. Bactérias simbiotes e endossimbiontes celulares prospectadas nas populações com diferentes gerações (Pop.(Ger.)) em *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). Sinal negativo: ausência no hospedeiro. Sinal positivo: presença no hospedeiro

Pop.(Ger.)	<i>Arsenophonus</i>	<i>Cardinium</i>	<i>Carsonella</i>	<i>Hamiltonella</i>	<i>Regiella</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Sodalis</i>	<i>Spiroplasma</i>	<i>Wolbachia</i>	<i>Nosema</i>
1 (128)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2 (20)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
3 (45)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
4 (10)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5 (74)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
6 (25)	-	+	+	+	-	+		+	+	+	-
7 (0)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
8 (0)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
9 (0)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

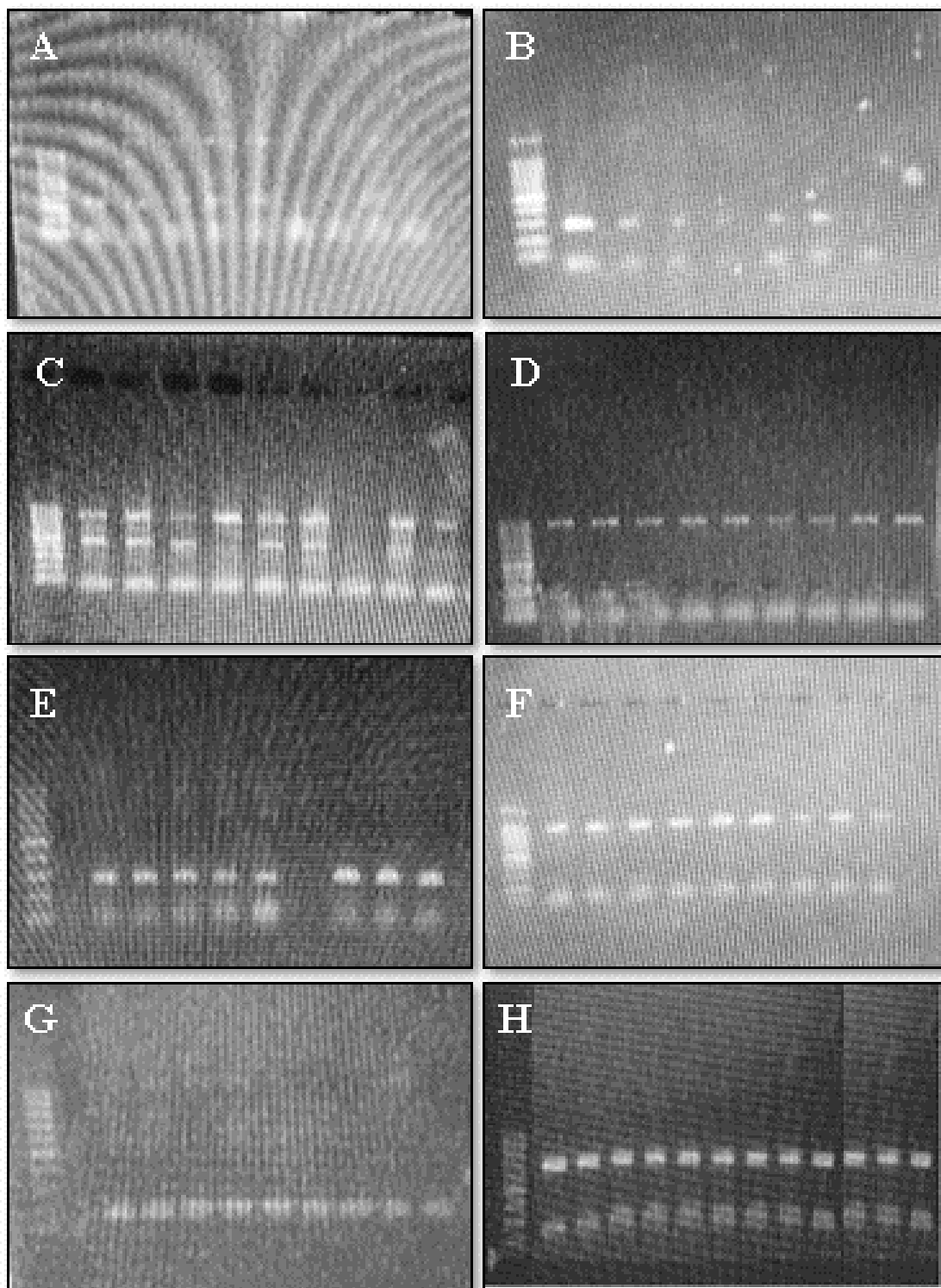


Figura 1. Géis de agarose com produtos de reações em cadeia de polimerase (PCR) prospectando bactérias simbióticas em *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). (A) *Cardinium*, (B) *Carsonella*, (C) *Hamiltonella*, (D) *Rickettsia*, (E) *Serratia*, (F) *Sodalis*, (G) *Spiroplasma* e (H) *Wolbachia*.

O sequenciamento apresentou 100% de cobertura e 99% identidade com gêneros *Wolbachia*, *Rickettsia* e *Serratia* havendo associação do parasitoide com essas bactérias (Tabela 4).

Tabela 4. Endossimbiontes associados ao parasitoide *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) e número de acesso

População	Endossimbiontes	Número de acesso
1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10	<i>Rickettsia</i> sp	KY799068.1
4	<i>Rickettsia (Bemisia tabaci)</i>	JQ305704.1
1, 2, 3	<i>Wolbachia</i> sp	MK462264.1
4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10	<i>Wolbachia</i> sp	MF509296.1
6	<i>Serratia quinivorans</i>	MK114621.1
1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 10	<i>Serratia</i> sp.	MG557761.1

2.4 DISCUSSÃO

A infecção por múltiplos endossimbiontes, como observado para *C. noackae* é relativamente comum (Duron et al. 2008), no entanto, o gênero *Wolbachia* se destaca, sendo presente em 66% das espécies de artrópodes (Hilgenboecker et al. 2008). Isso é devido a essa bactéria ser herdada matematicamente e transferida horizontalmente entre diferentes espécies (Werren et al. 2008; Pistone et al. 2014).

A presença de *Wolbachia* nas populações de *C. noackae* de laboratório e campo foi semelhante aos nucleotídeos encontrados em *Drosophila melanogaster* Meigen (Drosophila: Drosophilidae) infectada pela bactéria, que causou a mortalidade nos descendentes machos devido a danos ao DNA e apoptose durante a embriogênese masculina (Harumoto et al. 2018). A razão sexual tendenciosa para fêmeas em Hymenoptera é frequente (Heimpel e Boer, 2008), como relatado para fêmeas de *C. noackae* copuladas (Barbosa et al. 2018; 2019; Becchi et al. 2020). Isso pode estar associado a mortalidade de machos na presença da bactéria intracelular como a *Wolbachia*, sendo necessário investigar se parasitoides não-emergidos e mortos dentro do ovo do hospedeiro *T. peregrinus*, como observado no

estudo de Becchi et al. 2020, são machos ou fêmeas, e/ou remover a bactéria para analisar os efeitos na viabilidade do inseto para confirmar esta hipótese.

O parasitoide *Anagrus sophiae* Dozier (Hymenoptera: Mymaridae) teve maior sucesso reprodutivo (Segoli et al. 2013) e *Asobara japônica* Belokobylskij (Hymenoptera: Braconidae) foi mais eficiente em encontrar o hospedeiro *D. melanogaster* (Fugihara et al. 2015) quando infectados por *Wolbachia*. Em Eulophidae, a partenogênese induzida por *Wolbachia* foi relatada para *Tetrastichus coeruleus* Nees (Reumer et al. 2013). Nouhuys et al. (2016) relatou o aumento na suscetibilidade do parasitoide *Hyposoter hortícola* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae) ao hiperparasitismo de *Mesochorus cf. stigmaticus* Thunberg (Ichneumonidae: Mesochorinae), na presença dessa bactéria. Por isso, a influência de *Wolbachia* em *C. noackae* deve ser investigada para verificar os efeitos, positivos ou negativos, na biologia, reprodução ou comportamento desse inimigo natural.

Em Pinus, os insetos da mesma ordem que *C. noackae*, *D. pine* e *N. sertifer* e seu parasitoide *D. fuscipennis* foram positivas à presença do gênero *Wolbachia*, e negativas para *Cardinium* (Pistone et al. 2014). A densidade de bactérias no hospedeiro é influenciada por fatores ambientais, antibióticos e idade do hospedeiro (Bordenstein e Bordenstein, 2011). No estudo de Pistone et al. (2014), o aumento na temperatura ocasionou a eliminação de *Wolbachia* no hospedeiro *D. pini*, que consequentemente pode ter causado a redução no período de desenvolvimento das larvas e no sucesso da eclosão dos ovos. Além disso, a manipulação da partenogênese e incompatibilidade citoplasmática causada pela *Wolbachia* pode ser reduzida ao expor o hospedeiro em alta temperatura, devido à redução na sobrevivência dessa bactéria (Hoffmann, 1990).

A análise da sequência de *Rickettsia* da população 4 e demais, de *C. noackae*, foi próxima da que foi relatada para cepas bacterianas associadas a mosca-branca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) em Bangladsh (Jahan e Lee, 2012) e com o mosquito *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera: Culicidae): na República da Korea (Maina et al. 2017), respectivamente. Bactérias do gênero *Rickettsia* estão presentes em 24% das espécies de artrópodes terrestres (Weinert et al. 2015). Em estudos com insetos da ordem Hymenoptera, na área florestal foi

relatada a presença do endossimbionte *Rickettsia* no hospedeiro *L. invasa* com provável transmissão vertical à progênie (Nugnes et al., 2015) e no seu parasitoide *Q. mendeli* (Gualtieri et al. 2017). A partenogênese induzida por esta bactéria foi relatada para os parasitoides da família Eulophidae *Neochrysocharis formosa* Westwood (Adachi-Hagimori et al. 2008) e *Pnigalio soemius* Walker (Giorgini et al. 2010).

O parasitoide *Microctonus hyperodae* Loan (Hymenoptera: Braconidae) contaminado por *Serratia*, ocasionou a mortalidade prematura em 72 h de 30% do hospedeiro *Listronotus bonariensis* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae) após transmitir a bactéria via oviposição, quando comparado com a população sem a bactéria com 4% (Jackson et al. 2004).

Não foi detectado a presença do microsporídeo *Nosema* em *C. noackae*, no entanto, os parasitoides utilizados no controle biológico de lagartas desfolhadoras na área florestal, *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu e *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) tiveram a presença do microsporídeo *Nosema* confirmada, assim como no seu hospedeiro alternativo *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) (Paes et al. 2019), devido provavelmente à transmissão horizontal (Simões et al. 2012). O parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) infectado por *Nosema* sp, teve redução na habilidade de distinguir compostos voláteis liberados pela cana-de-açúcar infestados por larvas de *D. saccharalis* e entre hospedeiros infectados e não infectados com o microsporídeo (Simões et al. 2012).

Este trabalho é o primeiro que relata a presença de múltiplos endossimbiontes associados ao *C. noackae*, sendo os gêneros *Wolbachia*, *Rickettsia* e *Serratia* os que apresentaram 99% de identidade com as bactérias presentes no parasitoide após sequenciamento. A manipulação de endossimbiontes na biologia e comportamento desse inimigo natural precisa ser estudada para o aperfeiçoamento na criação massal e manejo de *T. peregrinus* em laboratório e campo respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Adachi-Hagimori, T., K. Miura, and R. A. Stouthamer. 2008.** A new cytogenetic mechanism for bacterial endosymbiont-induced parthenogenesis in Hymenoptera. *Proc. R. Soc. B.* 275: 2667–2673.
- Barbosa, L.R., F. Santos, C. B. Buhner, L. A. Nichele, C. F. Wilcken, and Soliman, E.P. 2016.** Criação massal do percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus*: Carpinteiro & Dellapé, 2006 (Hemiptera, Thaumastocoridae). Brasília, Embrapa, 22p.
- Barbosa, L. R., A. P. Rodrigues, L. N. de Souza, L. A. Foerster, A. R. de Souza, B. M. C. Castro, and J. C. Zanuncio. 2018.** Development of *Cleruchoides noackae*, an egg-parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus*, in eggs laid on different substrates, with different ages and post-cold storage. *Biocontrol* 63: 193-202.
- Barbosa, L.R., F. Santos, E. P. Soliman, A. P. Rodrigues, C. F. Wilcken, J. M. Campos, A. J. V. Zanuncio, and J. C. Zanuncio. 2019.** Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. *Sci. Rep.* 9: 10174.
- Baumann, P. 2005.** Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sapsucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 155-189.
- Becchi, L.K., C. Jorge, G. F. de Camargo, L. R. Barbosa, M. A. Soares, J. E. Serrão., J. C. Zanuncio, and C. F. Wilcken. 2020.** Oviposition behaviour of mated or unmated *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). *Plos One* 15: e0239285.
- Bordenstein, S. R., and S. R. Bordenstein. 2011.** Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility. *PLoS One.* 6: e29106.
- Douglas, A. E. 2015.** Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* 60:17-34.
- Duron, O., D. Bouchon, S. Boutin, L. Bellamy, L. Zhou, J. Engelstadter, and G. D. D. Hurst. 2008.** The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *Bmc Biol.* 24: 6–27.

- Feldhaar, H. 2011.** Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol. Entomol.* 36: 533–543.
- Fleury, F., F. Vavre, N. Ris, P. Fouillet, and M. Bouletreau. 2000.** Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology* 121: 493–500.
- Frago, E., M. Mala., B. T. Weldegergis., C. Yang., A. McLean., H. C. J. Godfray., R. Gols, and M. Dicke. 2017.** Symbionts protect aphids from parasitic wasps by attenuating herbivore-induced plant volatiles. *Nat. Commun.* 8: 1860.
- Furihata, S., M. Hirata, H. Matsumoto, Y. Hayakawa. 2015.** Bacteria endosymbiont, *Wolbachia*, promotes parasitism of parasitoid wasp *Asobara japonica*. *PLoS One* 10: e0140914.
- Giorgini, M., U. Bernardo, M. M. Monti, A.G. Nappo, and M. Gebiola. 2010.** *Rickettsia* symbionts cause parthenogenetic reproduction in the parasitoid wasp *Prigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Appl. Environ. Microb.* 76: 2589–2599.
- Gottlieb, Y., M. Ghanim, E. Chiel, D. Gerling, V. Portnoy, S. Steinberg, G. Tzuri, A. R. Horowitz, E. Belausov, N. Mozes-Daube, S. Kontsedalov, M. Gershon, S. Gal, N. Katzir, and E. Zchori-Fein. 2006.** Identification and localization of a *Rickettsia* sp in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3646-3652.
- Gualtieri, L., F. Nugnes, A. G. Nappo, M. Gebiola, and U. Bernardo. 2017.** Life inside a gall: closeness does not favour horizontal transmission of *Rickettsia* between a gall wasp and its parasitoid. *Fems. Microbiol. Ecol.* 93: 1-11.
- Harumoto, T., T. Fukatsu, and B. Lemaitre. 2018.** Common and unique strategies of male killing evolved in two distinct *Drosophila* symbionts. *Proc. Biol. Sci.* 285: 20172167.
- Heddi, A., A. M. Greiner, C. Khatchadourian, H. Charles, and P. Nardon. 1999.** Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *P. Natl. Acad. Sci. Usa.* 12: 6814-6819.
- Heimpel, G. E., and J. G. de Boer. 2008.** Sex determination in the hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 209-230.

- Hilgenboecker, K., P. Hammerstein, P. Schlattmann, A. Tels-chow, and J. H. Werren. 2008.** How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *Fems Microbiol. Lett.* 281: 215-220.
- Hoffmann, A.A., M. Turelli, and L. G. Harshman. 1990.** Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics.* 126: 933-948.
- Jackson, T. A. and M. R. McNeill. 1998.** Premature death in parasitized *Listronotus bonariensis* adults can be caused by bacteria transmitted by the parasitoid *Microctonus hyperodae*. *Biocontrol Sci. Techn.* 8: 389-396.
- Jackson, T., M. McNeill, and D. Madurappulige. 2004.** Use of *Serratia* spp. bacteria for monitoring behaviour of parasitoids. *Int. J. Pest Manage.* 50: 173-176.
- Jahan, S. M. H. and K. Y. Lee. 2012.** Infection of *Rickettsia* occurrences in indigenous Bangladesh whitefly 2 (BW2). Patuakhali Science and Technology University, Bangladesh.
- Kageyama, D., S. Narita, and E. Watanabe. 2012.** Insect sex determination manipulated by their endosymbionts: incidences, mechanisms and implications. *Insects.* 3:161-199.
- Kikuchi, Y. 2009.** Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes Environ.* 24: 195-204.
- Lin, N.Q., J. T. Huber, and J. L. Salle. 2007.** The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Zootaxa.* 1596: 1-111.
- Maina, A. N., T. A. Klein, H. C. Kim, S. T. Chong, Y. Yang, K. Mullins, J. Jiang, H. St John, R. G. Jarman, J. Hang, A.L, and Richards. 2017.** Molecular characterization of novel mosquito-borne *Rickettsia* spp. from mosquitoes collected at the Demilitarized Zone of the Republic of Korea. *PLoS One* 12: e0188327.
- Mann, E., C. M., Stouthamer, S. S. Kelly, M. Dzieciol, M. S. Hunter, and S. Schmitz-Esser. 2017.** Transcriptome sequencing reveals novel candidate genes for *Cardinium hertigii*-caused cytoplasmic incompatibility and host-cell interaction. *mSystems* 2:e00141-17.

- Miller, W.J., and D. Schneider. 2012.** Endosymbiotic microbes as adaptive manipulators of arthropod behavior and natural driving sources of host speciation. In D. P., J. Brodeur, F. Thomas (eds.), Host manipulation by parasites. Oxford University Press, UK.
- Montenegro, H., V. N. Solferini, L. B. Klaczko, and G. D. D. Hurst. 2005.** Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. Insect. Mol. Biol. 14: 281-287.
- Monticelli, L.S., Y. Outreman, E. Frago, and N. Desneux. 2019.** Impact of host endosymbionts on parasitoid host range - from mechanisms to communities. Curr. Opin. Insect. Sci. 32:77–82.
- Moran, N.A., J.P. McCutcheon, and A. Nakabachi. 2008.** Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annu. Ver. Genet. 42: 165-190.
- Mutitu, E.K., J. R. Garnas, B. P. Hurley, M. J. Wingfield, M. Harney, S. J. Bush, and B. Slippers. 2013.** Biology and rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). J. Econ. Entomol. 106: 1979-1985.
- Nachappa, P., J. Levy, E. Pierson, and C. Tamborindoguy. 2011.** Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. Curr. Microbiol. 62: 1510-1520.
- Nováková, E., V. Hypsa, and N. A. Moran. 2009.** *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. BMC Microbiol. 9: 143.
- Nouhuys, S. V., M. Kohonen, and A. Duploux. 2016.** *Wolbachia* increases the susceptibility of a parasitoid wasp to hyperparasitism. J. Exp. Biol. 219: 2984-2990.
- Nugnes, F., M. Gebiola, M. M. Monti, L. Gualtieri, M. Giorgini, J. Wang, and U. Bernardo. 2015.** Genetic diversity of the invasive gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* endosymbiont, and associated sex-ratio differences. PLoS One 5: 1-10.
- Nyabuga, F. N., Y. Outreman, J. C. Simon, D. G. Heckel, and W. W. Weisser. 2010.** Effects of pea aphid secondary endosymbionts on aphid resistance and

development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. Entomol. Exp. Appl. 136:243-253.

Oliver, K.M., J. A. Russell, N. A. Moran, M. S. Hunter. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. Proc. Natl. Acad. Sci. 100:1803-1807.

Oliver, K. M., and C. H. Higashi. 2019. Variations on a protective theme: *Hamiltonella* defensa infections in aphids variably impact parasitoid success. Curr. Opin. Insect. Sci. 32: 1-7.

Paes, J. P. P., V. R. Carvalho, A. R. Souza, C. F. Wilcken, and R. C. O. F. 2019. Infection by the microsporidium of Clado Nosema/Vairimorpha in pupal parasitoids. An. Acad. Bras. Ciênc. 91: e20180326.

Pistone, D., A. Bione, S. Epis, M. Pajoro, S. Gaiarsa, C. Bandi, and D. Sassera. 2014. Presence of *Wolbachia* in three hymenopteran species: *Diprion pini* (Hymenoptera: Diprionidae), *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae), and *Dahlbominus fuscipennis* (Hymenoptera: Eulophidae). J. Insect. Sci. 14: 1-5.

Reumer, B. M., J. J. M., van Alphen, and K. Kraaijeveld. 2013. Population genetics of *Wolbachia*-infected, parthenogenetic and uninfected, sexual populations of *Tetrastichus coeruleus* (Hymenoptera: Eulophidae). Mol Ecol. 22: 4433-4444.

Ribeiro, M. F. 2019. Parasitismo de populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) em *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) e endossimbiontes associados. M. S. thesis, Universidade Estadual Paulista, Brazil.

Ribeiro, M. F., V. R. Carvalho, A. L. Favoreto, B. R. De Marchi, C. Jordan, J. C. Zanuncio, M. A. Soares, A. J. V. Zanuncio, and C. F. Wilcken. 2021. *Yersinia massiliensis* (Enterobacterales: Enterobacteriaceae) in the host *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae): first report of association with insects. Braz. J. Biol. 82: e237098.

Segoli, M., R. Stouthamer, C. M. Stouthamer, P. F. Rugman-Jones, J.A. Rosenheim. 2013. The effect of *Wolbachia* on the lifetime reproductive success of its insect host in the field. J. Evolution. Biol. 26:12.

- Simões, R. A., L. G. Reis, J. M. S. Bento, L. F. Solter, and I. 2012.** Delalibera. Biological and behavioral parameters of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) are altered by the pathogen *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). *Biological Control* 3: 164-171.
- Thao, M.L, and P. Baumann. 2004.** Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl. Environ. Microb.* 70: 3401-3406.
- Vossbrinck, C. R., M. D. Baker., E. S. Didier., B. A. Debrunner-Vossbrinck, and J. A. Shaddock. 1993.** Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. *J. Eukaryot. Microbiol.*3: 354–362.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi. 1991.** Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques.* 10: 506-513.
- Weinert, L.A., E. V. Araujo-Jnr, M. Z. Ahmed, and J. J. Welch. (2015).** The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc Biol Sci.* 282: 20150249.
- Werren, J.H., L. Baldo, and M.E. Clark. 2008.** *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 741-751.
- Wilcken, C.F., L. R. Barbosa., B. Zache, A. C. Firmino, L. A. Nogueira de Sá, J. C. Zanuncio, and L. R. Junqueira. 2014.** Biological control of the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* in eucalyptus plantations in Brazil. *Int. Forest. Rev.* 16: 325.
- Wu, K, and M. A. Hoy. 2012.** *Cardinium* is associated with reproductive incompatibility in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). *J. Invertebr. Pathol.* 110: 359-365.
- Zchori-Fein, E., and J. K. Brown. 2002.** Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 711-718.
- Zchori-Fein, E, and S. J. Perlman. 2004.** Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Mol. Ecol.* 13: 2009-2016.

CAPÍTULO 3

DISPERSÃO DE *Cleruchoides noackae* APÓS LIBERAÇÃO EM PLANTAÇÕES DE EUCALIPTO

Resumo

A liberação do parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae) como agente de controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae) em plantações de eucalipto, tem sido realizado em diferentes regiões do Brasil e do mundo. O conhecimento sobre a capacidade de dispersão de parasitoides é indispensável para o êxito no controle biológico de pragas. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de dispersão de *C. noackae* em plantações de eucalipto, utilizando armadilhas adesivas amarelas. O estudo foi conduzido no município de Borebi, São Paulo. Em três talhões com plantação de eucalipto de 100,0 m x 100,0 m (10,000 m²), foram marcados dois quadrados concêntricos com distâncias de 25,0 e 50,0 m do ponto central ao ponto médio de cada lado do quadrado, e fixados a cada 25,0 m, no tronco das árvores a 1,8 m do solo, armadilhas adesivas amarelas, totalizando 25 pontos e 6 distâncias (0,0; 25,0; 32,35; 50,0; 55,9 e 70,7 m). No ponto central de cada parcela, foram liberados 3.000 adultos de *C. noackae* recém-emergidos e após 72 h os cartões foram removidos e avaliados. O parasitoide *C. noackae* se dispersou até 70,7 m de distância do ponto central de liberação em 72 h, com maior captura a 25,0 m, 3,66 adultos, que a 50,0 e 70,7 m, com 1,16 adultos.

Palavras-chave: controle biológico; dispersão em campo; *Eucalyptus* spp.; Hymenoptera; Mymaridae; parasitoide de ovos.

Abstract

The release of the egg parasitoid *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) as a biological control agent for *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in eucalyptus plantations, has been carried out in different regions of Brazil and the world. Knowledge about the ability of parasitoids to disperse

³ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico BioControl

is essential for successful biological pest control. The objective of this study was to evaluate the dispersion capacity of *C. noackae* in eucalyptus plantations, using yellow sticky traps. The study was conducted in the Borebi, São Paulo. In three eucalyptus plots 100.0 m x 100.0 m (10,000 m²), two concentric squares were marked with distances of 25.0 and 50.0 m from the central point to the midpoint on each side of the square, and fixed yellow sticky traps every 25.0 m, in the trunk of the trees at 1.8 m from the ground, totaling 25 points and 6 distances (0.0, 25.0, 32.35, 50.0, 55.9 and 70.7 m). At the central point of each plot, 3,000 adults of newly emerged *C. noackae* were released and after 72 h the cards were removed and evaluated. The parasitoid *C. noackae* dispersed up to 70.7 m away from the central point of release in 72 h, with greater capture at 25.0 m, 3.66 adults, than at 50.0 and 70.7 m, with 1,16 adults.

Keywords: biological bronze-bug, control, dispersal, *Eucalyptus* spp., egg parasitoid.

3.1 INTRODUÇÃO

Pragas exóticas de origem australiana, tem danificado plantações de *Eucalyptus* (Myrtaceae) no Brasil (Barbosa et al. 2019). O percevejo-bronzeado-do-eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), detectado em 2008 no país (Wilcken et al. 2010), se estabeleceu devido ao ambiente favorável, a alta capacidade reprodutiva e desenvolvimento em diferentes espécies de eucalipto (Soliman et al. 2012). De hábito alimentar sugador e gregário, o percevejo-bronzeado causa o bronzeamento, redução na área fotossintética, desfolha, redução na produtividade de eucalipto (Jabobs e Nesser 2005; Wilcken et al. 2015) e morte das árvores em altas infestações (Montagu et al. 2020).

O controle biológico de *T. peregrinus* com o parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) tem sido uma das principais alternativas ao elevado custo do controle químico e restrições da certificação florestal (Zanuncio et al. 2016; Barbosa et al. 2017a). O parasitismo de *C. noackae* em ovos de *T. peregrinus*, com um a três dias de idade foi superior a 60% (Barbosa

et al. 2018), o que demonstra sua eficiência para o controle da praga. *Cleruchoies noackae* possui partenogênese arrenótoca, mede aproximadamente 0,5 milímetros de comprimento (Lin et al. 2007; Mutitu et al. 2013; Becchi et al. 2020) e sua longevidade varia entre 2 a 4 dias sem e com alimento, respectivamente (Souza et al. 2016).

A presença de *C. noackae* como agente de controle de *T. peregrinus* já foi registrada em vários países, como Brasil (Barbosa et al. 2017), Uruguai (Martínez et al. 2018) e África do Sul (Mutitu et al. 2013) demonstrando sua adaptação em diferentes regiões, entretanto, sua capacidade de vôo na busca do hospedeiro é desconhecida, e como indicativos qualitativos de seu uso como inimigo natural (Gardner e Lenteren 1986) deve ser investigada.

O estudo da mobilidade e dispersão de inimigos naturais é fundamental no sucesso do controle biológico de insetos-praga (Pomari-fernandes et al. 2018), por fornecer informações a respeito de seu raio de ação e auxiliar na determinação da distribuição de pontos de liberação (Akey 1991; Mills et al. 2006). Informações sobre a dispersão desses agentes de controle são escassos, pela dificuldade na detecção do deslocamento desses pequenos organismos em campo (Godfray 1994; Mills et al. 2006), no entanto, a utilização de ovos sentinelas (Salazar-Mendoza et al. 2020), armadilhas adesivas (Lowenstein et al. 2019) e plantas pulverizadas com cola (Suverkropp et al. 2009) são metodologias que podem ser aplicadas para esses insetos.

Fatores bióticos e abióticos, como abundância do hospedeiro, características da vegetação, vento e direção dos inimigos naturais no campo, são os principais fatores que influenciam na dispersão de inimigos naturais (Petit et al. 2008; Lowenstein et al. 2019; Salazar-Mendoza et al. 2020), e não há na literatura relatos ou estudos com este parâmetro para o parasitoide *C. noackae*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de dispersão de *C. noackae* após sua liberação em plantações de eucalipto, utilizando armadilhas adesivas amarelas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Criação do hospedeiro *Thaumastocoris peregrinus*

Ovos de *T. peregrinus* foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual de São Paulo (FCA/UNESP), campus de Botucatu. Os insetos foram mantidos em ramos de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* (Myrtaceae), provenientes de plantação com cinco anos de idade, em frascos Erlenmeyer de 500 ml com água e acondicionados em bandeja plástica retangular (40 cm de comprimento x 35 cm de largura x 8 cm de altura). Tiras de papel toalha (1,5 cm de largura x 15,0 cm de comprimento) foram dispostos sobre ramos por 24 horas para obtenção dos ovos do percevejo-bronzeado. A criação de *T. peregrinus* foi mantida em laboratório a 24 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h (Barbosa et al. 2016).

Criação do parasitoide *Cleruchoides noackae*

Os parasitoides foram obtidos da criação estoque do LCBPF e mantidos em frascos de poliestireno transparente (7,5 cm de altura x 3,0 cm de diâmetro) com tiras de papel filtro (7,0 cm de altura x 1,5 cm de largura) umedecidas em solução de mel a 50% para alimentação dos insetos. Ovos de *T. peregrinus*, com 24 h de idade, obtidos da criação do percevejo-bronzeado, foram oferecidos ao parasitoide na proporção de 10:1 (ovos:fêmea) no frasco. A criação de *C. noackae* foi mantida em laboratório a 24 ± 2 °C, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h (Barbosa et al. 2017b).

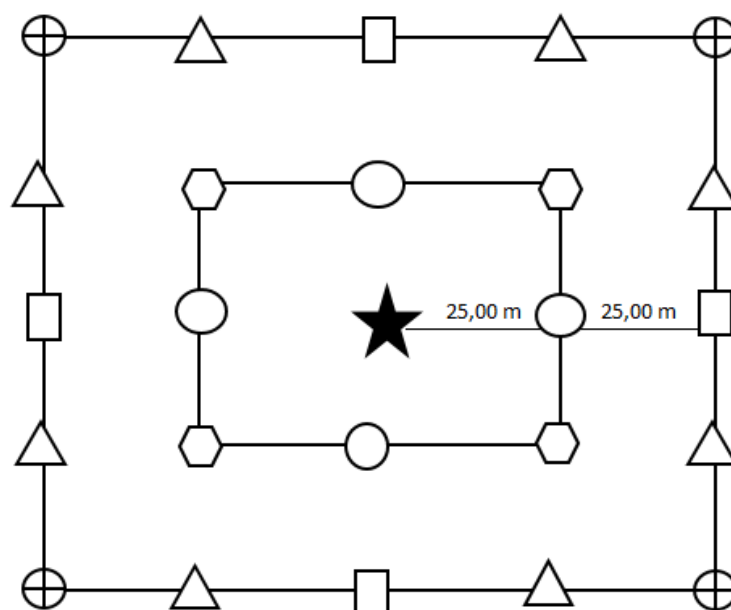
Dispersão de *Cleruchoides noackae* em plantação florestal de *Eucalyptus* spp.

O estudo foi conduzido na Fazenda Ipiranga (22°32'19.85"S, 48°55'30.69"W, 616 metros acima do nível do mar) no município de Borebi, São Paulo, Brasil, pertencente a empresa Bracell. Antes da instalação do experimento foram realizadas avaliações preliminares da área durante um mês para confirmação da ausência do parasitoide *C. noackae* utilizando-se armadilhas adesivas amarelas fixadas no tronco das árvores a 1,8 m acima do solo (Martinez et al. 2010; Wilcken et al. 2015). Três talhões (9, 19 e 21), com parcelas de 100,0 m x 100,0 m (10,000 m²), afastadas a mais de 500 m entre si, foram estabelecidas em plantação de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, com espaçamento 2 x 3 m e idade de 2 anos (Figura 1).



Figura 1. Talhões 9, 19 e 21 selecionados na fazenda Ipiranga, município de Borebi, São Paulo, Brasil.

Em cada parcela foram marcados dois quadrados concêntricos cuja distância do ponto central ao ponto médio de cada lado do quadrado foi de 25,0 e 50,0 m. Em cada lado do quadrado os pontos foram fixados igualmente distantes a cada 25 m, dessa forma, em cada um dos quadrados haviam 8 e 16 pontos marcados. No centro da parcela também foi instalado um ponto, totalizando 25 pontos por parcela e 6 distâncias (Figura 2 e Tabela 1). O exemplo esquemático abaixo foi adaptado de SALAZAR-MENDONZA et al., 2020.



Símbolo	Distância (m)	Número de pontos/parcela	Número de pontos total
★	0,00	1	3
○	25,00	4	12
⬡	35,35	4	12
◻	50,00	4	12
△	55,90	8	24
⊕	70,70	4	12

Figura 2. Exemplo esquemático, distribuição e número de pontos, símbolos e distâncias na parcela para avaliação da dispersão de *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) com cartões amarelos adesivos. Adaptado de SALAZAR-MENDONZA et al., 2020.

Em cada ponto foi fixado um cartão adesivo amarelo, com área de captura de 12,5 x 10 cm, em ramos da árvore, dispostos a 1,80 m metros acima do chão, devidamente identificados. Os parasitoides foram acondicionados em potes plástico transparente e transportados em caixa térmica até as áreas de liberação. Após a instalação de todos os cartões, 3.000 mil adultos de *C. noackae* (< 24 horas de idade e alimentados com solução de mel 50%) foram liberados em cada parcela, no ponto central, fixando o pote plástico na árvore a 1,80 m acima do solo. Após 72 horas de liberação foi realizada a coleta dos cartões, embalando-os com filme plástico transparente para conservação dos insetos, e levados para o Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) para contagem e sexagem dos

parasitoides com o auxílio de microscópio estereoscópico. O número de parasitoides coletados em cada distância e a porcentagem de parasitoides recapturados nas armadilhas amarelas adesivas, foram calculados pela fórmula $N = (\text{número de insetos capturados} * 100) / \text{número de insetos liberados}$.

O delineamento estatístico foi em blocos casualizados, com 6 tratamentos (distâncias de 0,0; 25,0; 35,35; 50,0; 55,9 e 70,7 m) e 3 repetições (parcelas). Os valores de número de parasitoides coletados em cada distância foram transformados em raiz de $x + 0,5$ e comparados por Anova – Holm-Sidak com nível de significância igual a 0,05. A construção dos mapas de dispersão de *C. noackae* após liberação foi realizada utilizando o método de estimação geoestatístico por Krigagem simples em cada parcela amostral. As latitudes, longitudes e o número de parasitoides coletados em cada ponto nas armadilhas adesivas foram considerados como eixos x, y e a variável resposta Z, respectivamente. O mapa gráfico populacional foi gerado utilizando o software Surfer® 18.

Os dados climatológicos do dia da liberação (Tabela 1) e os outros dois dias (Anexo 1) foram obtidos da estação climatológica da empresa.

Tabela 1. Dados climatológicos referente ao horário aproximado de liberação do parasitoide *Cleruchooides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), em cada talhão, no dia da liberação (13 julho de 2020). Dados completos dos demais horários e dias no Anexo 1.

Talhão	Hor.	¹ T (°C) máx.	² T (°C) mín.	³ UR (%) máx.	⁴ UR (%) mín.	⁵ Vel. vento (m/s)	⁶ Dir. vento (°)	Chuva (mm)
9	08:00	19.8	18.1	74	66	0.8	277	0
	09:00	18.4	17.7	78	71	1.2	275	0
19	10:00	18.1	16.9	79	73	0.1	291	0
	11:00	18.9	16.9	79	70	0.8	270	0
21	12:00	20.5	18.9	71	65	1.3	268	0
	13:00	22.3	20.5	66	60	1.1	276	0

¹Temperatura máxima = T (°C) máx.; ²Temperatura mínima = T (°C) mín.; ³Umidade relativa máxima = UR (%) máx.; ⁴Umidade relativa mínima = UR (%) mín.; ⁵Velocidade do vento = Vel. vento (m/s); ⁶Direção do vento = Dir. vento (°).

3.3 RESULTADOS

Nas avaliações prévias de cada talhão não foram capturados *C. noackae* e *T. peregrinus* nos cartões amarelos fixados na área. O parasitoide *C. noackae* se dispersou entre 0 e 70,7 m de distância do ponto central de liberação em 72 h, com maior captura a 25,0 m, com 3,66 adultos, que a 50,0 e 70,7 m, com 1,16 adultos ($F_{5,74} = 3,019$; $P = 0,016$; Figura 3).

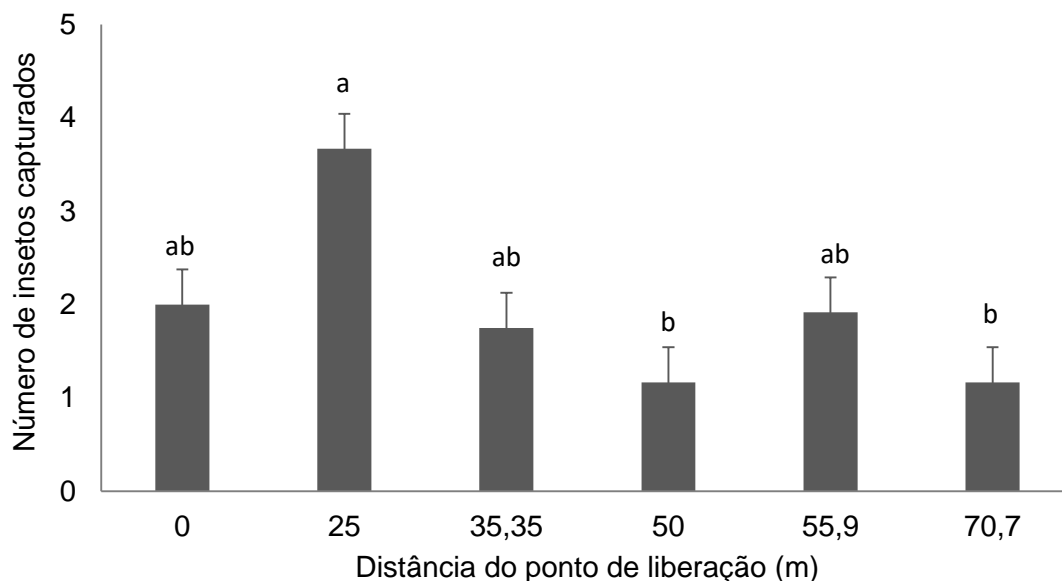
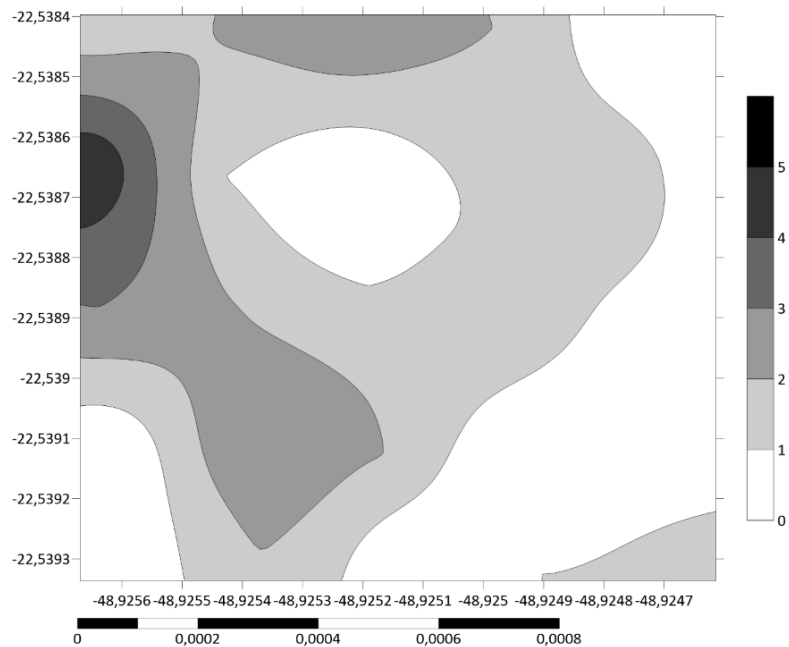


Figura 3. Número médio de *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) capturado nas diferentes distâncias do ponto de liberação. Barra de erros indicam média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as distâncias pelo teste de Holm-Sidak $< 0,05$.

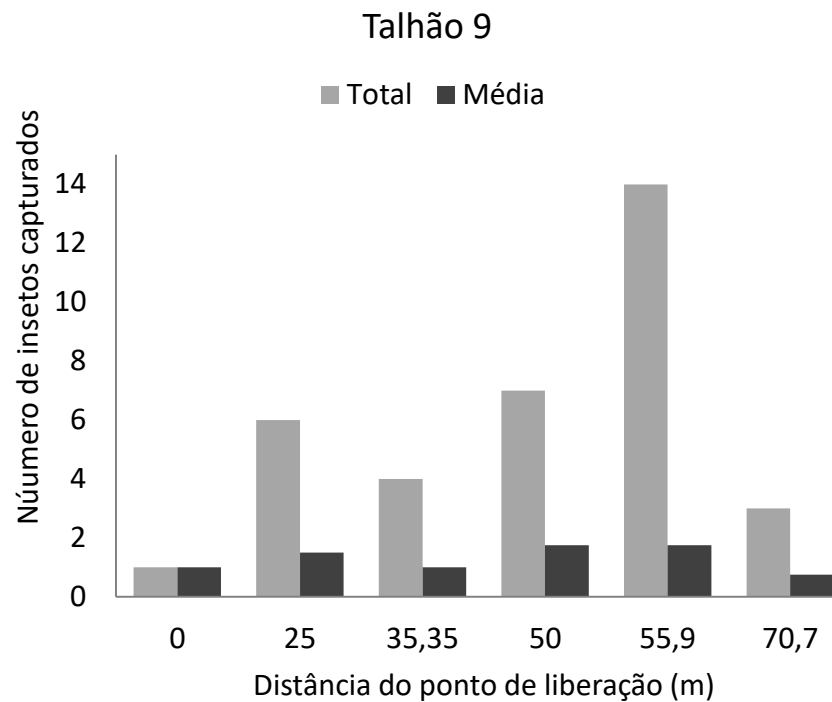
O número total e a porcentagem de recaptura de *C. noackae* nos talhões 9, 19 e 21 foram 35 (1,16%), 65 (2,16%) e 45 (1,5%) insetos, respectivamente (Figuras 4). Nas distâncias de 0,0; 25,0; 35,3; 50,0; 55,9 e 70,7 foram capturados 6, 44, 21, 14, 46 e 14 parasitoides, respectivamente, totalizando 145 indivíduos coletados nas armadilhas adesivas amarelas, com taxa de recaptura de 1,61% dos 9.000 parasitoides liberados.

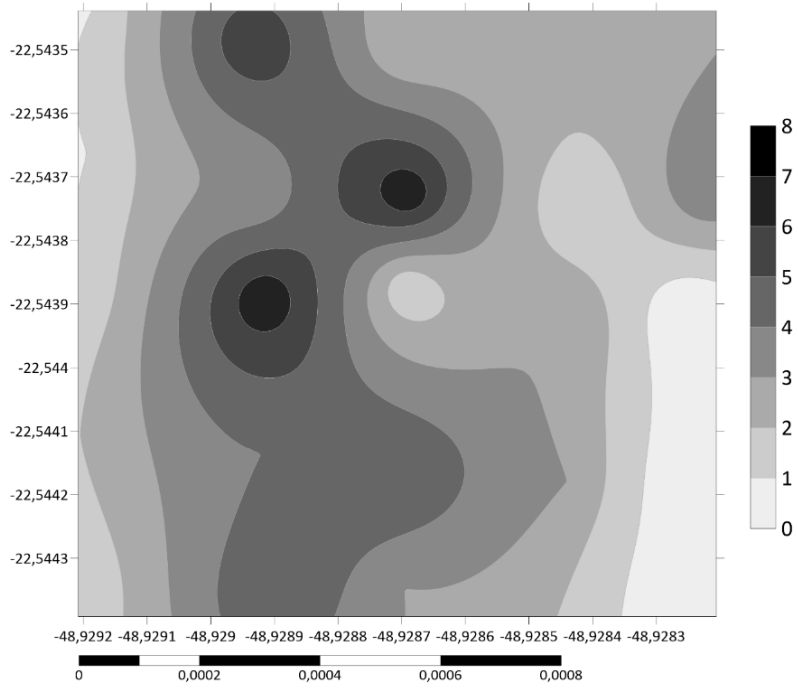
Neste trabalho foi observado uma relação entre a direção eólica e a dispersão do parasitoide, independente da velocidade do vento, com maior captura de *C. noackae* na direção 277° e 291° (sentido Oeste e Noroeste) no talhão 9 e 19, respectivamente, no horário aproximado de liberação (Tabela 1; Figuras 4). No

talhão 21, a direção do vento mudou para 268°, entre Sudoeste e Oeste, e posteriormente variou de 114° a 180°, entre Leste e Sul, sendo possível notar a captura e dispersão mais uniforme de *C. noackae* dentro do talhão (Figura 4).

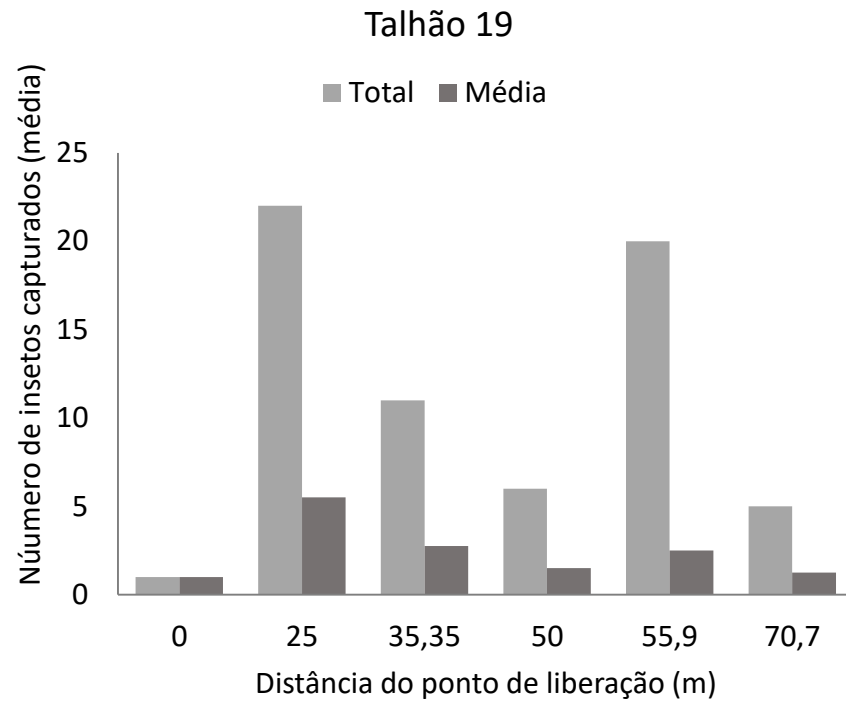


^
N





^
N



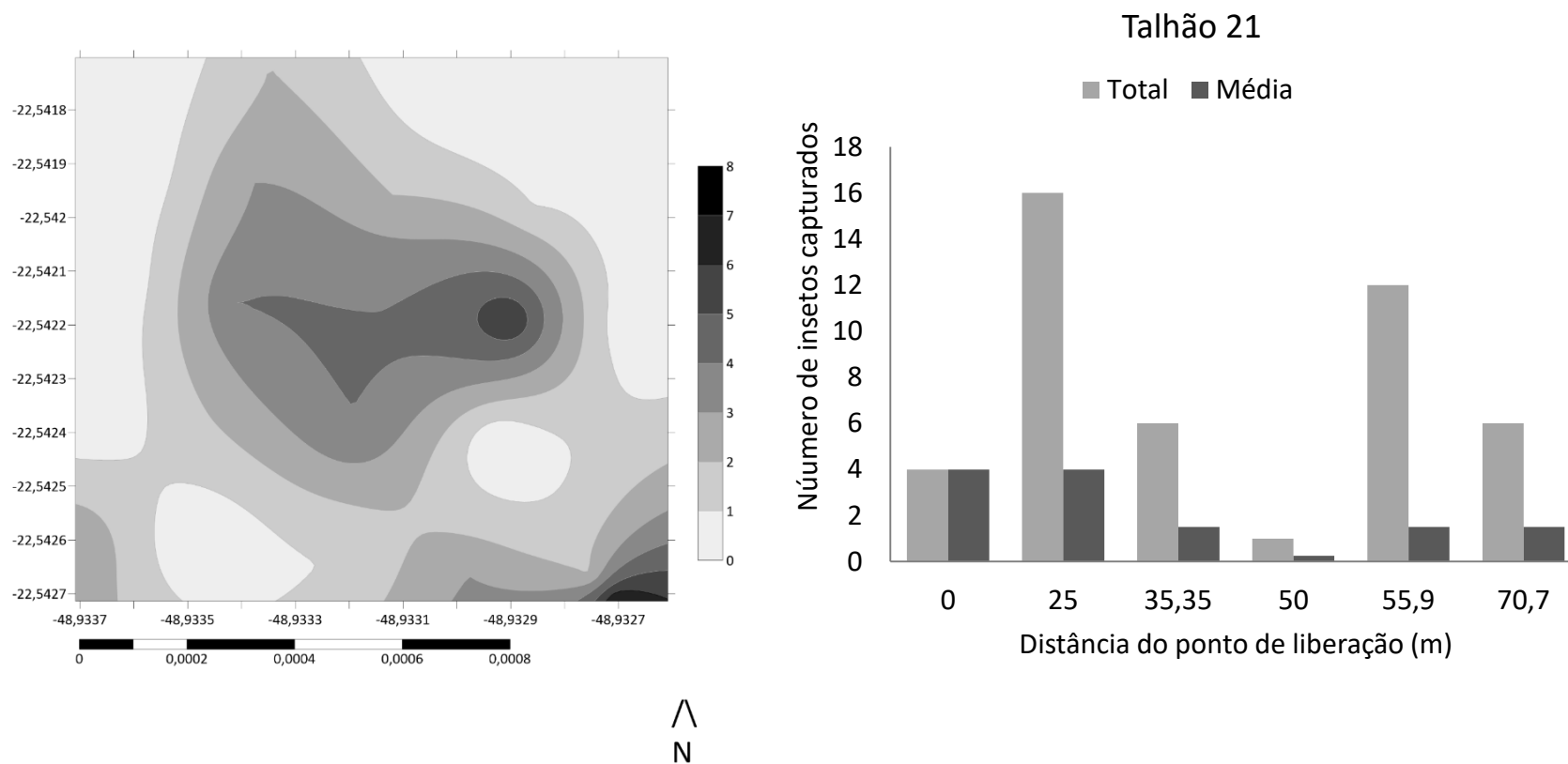


Figura 4. Mapa e gráfico do número de *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) capturados nas diferentes distâncias do ponto de liberação nos talhões 9, 19 e 21.

3.4 DISCUSSÃO

A maior captura de *C. noackae* a 25 m, que a 50,0 e 70,7 m, pode estar relacionado ao seu tamanho, pois parasitoides pequenos sempre se dispersam em pequenas distâncias, a não ser que sejam levados pelo vento (Lowenstein et al. 2019). A redução no número de insetos recuperados nos pontos mais distantes ocorre porque à medida que o parasitoide se afasta do ponto de liberação, a área a ser explorada aumenta, assim como o risco de mortalidade e o gasto energético (Bueno et al. 2012), no entanto, este último não resulta na redução da reprodução (Lowenstein et al. 2019). Na literatura a dispersão de parasitoides em campo varia de 2,7 a 65 m por dia (Petit et al. 2008). O parasitoide de *Homalodisca vitripennis* Germar (Hemiptera: Cicadellidae), *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Hymenoptera: Mymaridae), se dispersa no mínimo até 47 m/dia na presença de alta densidade do hospedeiros em áreas urbanas, com grande diversidade de plantas exóticas (Petit et al. 2008), enquanto que *Trissoulcus japonicus* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae), parasitoide de *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) se dispersou entre 5 a 50,0 m e 4 a 40,0 m de distância do ponto de liberação coletados em armadilhas amarelas em cultivos de amora e avelã, respectivamente (Lowenstein et al. 2019). Comumente os parasitoides utilizam pistas químicas do habitat para localizar seus hospedeiros (Finidori-Logli et al. 1996), e orientam-se inicialmente em resposta aos estímulos fornecidos pela planta ou pelo hospedeiro (Boethel e Eikenbary 1986).

A recaptura de *C. noackae* nas diferentes distâncias do ponto de liberação, entre 0 e 70,7 m, como observado em todos os talhões avaliados, é importante para otimizar o programa de controle biológico de *T. peregrinus*. A dispersão dos parasitoides pode variar em função das características da própria espécie (Stinner et al. 1974; Lowenstein et al. 2019), além do estágio de crescimento da cultura (Nogueira de Sá et al. 1993) e arquitetura da planta (Gontijo et al. 2010) onde os parasitoides são liberados. A capacidade de dispersão do parasitoide *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae), parasitando ovos de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) foi influenciada pelo estágio de desenvolvimento do

milho, com maior dispersão na fase inicial, devido a restrição na dispersão quando as plantas estavam altas (Salazar-Mendoza et al. 2020). A dispersão de *T. japonicus* em plantas de amora, com folhagem expostas ao sol e calor, pode ter limitado a dispersão desse parasitoide quando comparada com culturas na sombra, e a grande quantidade de folhas em pomares de avelãs afetaram o forrageamento e sua dispersão (Lowenstein et al. 2019). As condições ambientais como temperatura, umidade e vento podem interferir na capacidade de busca hospedeira e dispersão (Biever 1972; Cave 2000), mas neste trabalho, a direção do vento foi um dos fatores mais importantes na direção de dispersão de *C. noackae* em plantação de eucalipto.

A influência da direção do vento na dispersão de *C. noackae* não foi observada para o *G. ashmeadi* parasitoide de *H. vitripennis*, devido as características da vegetação e a densidade de hospedeiros no local em que foi avaliado (Petit et al. 2008). Em outros estudos, já foram relatadas a influência das condições eólicas no comportamento de dispersão dos insetos após liberações experimentais (Fink e Volkl 1995; Weisser et al. 1997). A dispersão de *C. noackae* até longas distâncias do ponto de liberação nos talhões com eucalipto de 2 anos de idade, pode ter ocorrido pois o espaço aberto entre plantas, significa que o vento dentro da cultura é maior (Suverkropp et al. 2009).

Este estudo é o primeiro que avaliou a capacidade de dispersão de *C. noackae* em plantação de eucalipto após liberação inoculativa, e pode ser utilizado como base para empresas e pequenos produtores estabelecerem pontos de liberação em plantios infestados pela praga, sendo recomendado a liberação a cada 25,0 m como estratégia para o controle biológico de *T. peregrinus*.

REFERÊNCIAS

- Akey DHA (1991) Review of marking techniques in arthropods and an introduction to elemental marking. *Southwes Entomol* 14:1-8.
- Barbosa LR, Santos F, Buhner CB, Nichele LA, Wilcken CF, Soliman EP (2016) Criação massal do percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus*: Carpinteiro and Dellapé, 2006 (Hemiptera, Thaumastocoridae).

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/145907/1/Criacao-massal-do-percevejo-bronzeado.pdf>. Acessado 12 janeiro 2021

- Barbosa LR, Rodrigues AP, Soler LS, Fernandes BV, Castro BMCC, Wilcken CF, Zanuncio JC (2017a) Establishment in the field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an exotic egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Fla Entomol 100:372-374. <https://doi.org/10.1653/024.100.0237>
- Barbosa LR, Rodrigues AP, Nichele LA, Souza AR, Becchi, LK, Wilcken CF (2017b) Orientações para a criação massal e liberação em campo de *Cleruchoides noackae* para controle biológico do percevejo bronzeado do eucalipto. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/167917/1/Livro-TA-1393-completo.pdf>. Acessado 12 janeiro 2021
- Barbosa LR et al. (2018) Development of *Cleruchoides noackae*, an egg-parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus*, in eggs laid on different substrates, with different ages and post-cold storage. BioControl 63:193-202. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9863-3>
- Barbosa LR et al. (2019) Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. Sci Rep 9:1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45663-5>
- Becchi LK et al. (2020) Oviposition behaviour of mated or unmated *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). PlosOne 15:1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239285>
- Biever KD (1972) Effect of the temperature on the rate of search by *Trichogramma* and its potential application in field releases. Environ Entomol 1:194-197. <https://doi.org/10.1093/ee/1.2.194>
- Boethel DJ, Eikenbary RD (1986) Interactions of plant resistance and parasitoids and predators insects. Chichester, UK
- Bueno ROF, Parra JRP, Bueno ADF (2012) *Trichogramma pretiosum* parasitism and dispersal capacity: a basis for developing biological control programs for soybean caterpillars. B Entomol Res 102:1-8. <https://doi.org/10.1017/S0007485311000289>

- Finidori-Logli V, Bagneres AG, Clement JL (1996) Role of plant volatiles in the search for a host by parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera, Eulophidae). *J Chem Ecol* 22:541–558. <https://doi.org/10.1007/BF02033654>
- Fink U, Volkl W (1995) The effect of abiotic factors of foraging and oviposition success of the aphid parasitoid, *Aphidius rosae*. *Oecologia* 103:371-378. <https://doi.org/10.1007/BF00328627>
- Gardner SM, Lenteren JC (1986) Characterization of the arrestment responses of *Trichogramma evanescens*. *Oecologia* 68:265-270. <https://doi.org/10.1007/BF00384798>
- Godfray HCJ (1994) *Parasitoids, Behavioural and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, New Jersey
- Gontijo LM, Margolies DC, Nechols JR, Cloyd RA (2010) Plant architecture, prey distribution and predator release strategy interact to affect foraging efficiency of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) on cucumber. *Biol Control* 53: 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.007>
- Jacobs DH, Nesser S (2005) *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to Eucalyptus trees: research in action. *S Afr J Sci* 101:233-236.
- Lin NQ, Huber JT, Salle JL (2007) The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Zootaxa* 1596:1-111.
- Lowenstein DM, Andrews H, Hilton RJ, Kaiser C, Wiman G (2019) Establishment in an introduced range: dispersal capacity and winter survival of *Trissolcus japonicus* an adventive egg parasitoid. *Insects* 10: 443. <https://doi.org/10.3390/insects10120443>
- Martínez G, González A, Dicke M (2018) Rearing and releasing the egg parasitoid *Cleruchoides noackae*, a biological control agent for the *Eucalyptus* bronze bug. *Biol Control* 23:97-104. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.008>
- Mills NJ, Babendreier D, Loomans AJ (2006) Methods for monitoring the dispersal of natural enemies from point source releases associated with augmentative biological control. In: Bigler F, Babendreier D, Kuhlmann U

(eds) Environmental impact of invertebrates for biological control of arthropods: Methods and risk assessment first edn. Wallingford, Berkeley, pp 114–131

- Montagu A, Robinson K, Noack A, Nahrung H, Lawson, Lo N (2020) Global incursion pathways of *Thaumastocoris peregrinus*, an invasive Australian pest of eucalypts. *Biol Invasions* 22:3501-3518. <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02337-y>
- Mutitu EK, Garnas JR, Hurley BP, Wingfield MJ, Harney M, Bush SJ, Slippers B (2013) Biology and rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *J Econ Entomol* 106: 1979-1985. <https://doi.org/10.1603/EC13135>
- Nogueira de Sá LA, Parra JRP, Silveira Neto S (1993) Capacidade de dispersão de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para controle de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) em milho. *Sci agric* 50:226-231.
- Petit JN, Hoddle M, Grandgirard J, Roderick GK, Davies N (2008) Short-distance dispersal behavior an establishment of the parasitoid *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) in Tahiti: Implications for its use as a biological control agent against *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Biol Control* 45:344-352. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.020>
- Pomari AF, Bueno AF, Bortoli AS, Favetti BM (2018) Dispersal capacity of the egg parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae) in maize and soybean crops. *Biol Control* 126: 158-168. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.009>
- Salazar-Mendoza P, Rodriguez-Saona C, Fernandes AO (2020) Release density, dispersal capacity, and optimal rearing conditions for *Telenomus remus*, an egg parasitoid of *Spodoptera frugiperda*, in maize, *Biocontrol Sci Techn* 30:1-20. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1776841>
- Soliman EP, Wilcken CF, Pereira JM, Dias, TKR, Zaché B, Dal Pogetto MHFA, Barbosa LR (2012) Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different eucalyptus species and hybrids. *Phytoparasitica* 40:223-230. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0226-4>

- Souza AR, Candelaria MC, Barbosa LR, Wilcken CF, Campos JM, Serrão JE, Zanuncio JC (2016) Longevity of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), with various honey concentrations and at several temperatures. Fla Entomologist 99:33-37.
- Stinner RE, Ridgway RL, Morrison RK (1974) Longevity, fecundity, and searching ability of *Trichogramma pretiosum* reared by three methods. Environ Entomol 3:558-560. <https://doi.org/10.1093/ee/3.3.558>
- Suverkropp BP, Bigler F, van Lenteren JC (2009) Dispersal behaviour of *Trichogramma brassicae* in maize fields. B Insectol 62:113-120.
- Weisser WW, Völkl W (1997) Dispersal in the aphid parasitoid, *Lysiphlebus cardui* (Marshall) (Hym. Aphidiidae). J Appl Entomol 121:23-28, 1997. <https://10.1111/j.1439-0418.1997.tb01365.x>
- Wilcken CF et al. (2010) Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on eucalyptus in Brazil and its distribution. J Plant Prot Res 50: 201-205. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0034-0>
- Wilcken CF et al. (2015) Percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpinteiro & Dellapé. In: Villela EF, Zucchi RA (eds) Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros, first edn. FEALQ, Piracicaba, pp 898-908.
- Wilcken CF, Barbosa LR, Velozo SM, Becchi LK, Junqueira LR, Nogueira de Sá LA, Zanuncio JC (2017) Biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in eucalyptus plantations in Brazil: An Update. In: Mason PG, Gillespie DR, Vicent C (eds) Proceedings of the 5th International Symposium on Biological Control of Arthropods 6:105-107.
- Zanuncio JC et al. (2016) The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. Ann Forest Sci 73: 205-214. <https://doi.org/10.1007/s13595-016-0548-3>

ANEXO 1. Dados climatológicos da fazenda Ipiranga, Borebi-SP.

Data	Horário	T (°C) máx.	T (°C) mín.	UR (%) máx.	UR (%) mín.	Vel. do vento	Dir. do Vento	Chuva (mm)
13-jul-20	08:00:00	19.8	18.1	74	66	0.8	277	0
13-jul-20	09:00:00	18.4	17.7	78	71	1.2	275	0
13-jul-20	10:00:00	18.1	16.9	79	73	0.1	291	0
13-jul-20	11:00:00	18.9	16.9	79	70	0.8	270	0
13-jul-20	12:00:00	20.5	18.9	71	65	1.3	268	0
13-jul-20	13:00:00	22.3	20.5	66	60	1.1	276	0
13-jul-20	14:00:00	25.1	22.3	61	52	0.7	273	0
13-jul-20	15:00:00	27.1	24.7	56	46	0.8	245	0
13-jul-20	16:00:00	28.7	27.1	48	38	1.9	212	0
13-jul-20	17:00:00	29	27.6	44	38	2.1	186	0
13-jul-20	18:00:00	29	27.2	47	38	1.6	114	0
13-jul-20	19:00:00	29	28.4	44	40	1.1	170	0
13-jul-20	20:00:00	28.7	26.9	45	38	1.5	149	0
13-jul-20	21:00:00	26.9	24.7	53	44	0.3	167	0
13-jul-20	22:00:00	24.8	23.1	58	52	0.2	152	0
13-jul-20	23:00:00	23.2	22.4	61	58	0.3	176	0
14-jul-20	00:00:00	22.9	21.8	63	59	0.3	142	0
14-jul-20	01:00:00	21.8	21.4	65	63	0.4	153	0
14-jul-20	02:00:00	21.9	21.5	64	62	0.5	155	0
14-jul-20	03:00:00	21.7	20.6	68	63	0.1	147	0
14-jul-20	04:00:00	20.6	19.9	72	68	0.2	124	0
14-jul-20	05:00:00	20.2	20	72	70	0.2	151	0
14-jul-20	06:00:00	21.7	20.2	70	65	0	107	0
14-jul-20	07:00:00	21.2	20.9	69	68	0.1	150	0
14-jul-20	08:00:00	21.3	20.6	74	67	0	114	0
14-jul-20	09:00:00	20.6	18.5	80	74	0	148	0
14-jul-20	10:00:00	19.1	17.9	84	79	1	80	0
14-jul-20	11:00:00	19.2	17.8	84	80	0	35	0
14-jul-20	12:00:00	22.6	19.2	80	67	0.4	4	0
14-jul-20	13:00:00	23	21.4	73	69	1.8	337	0
14-jul-20	14:00:00	25	23	69	64	1.1	345	0
14-jul-20	15:00:00	25.5	24.2	66	62	1.6	328	0
14-jul-20	16:00:00	26.2	25.1	64	59	0.9	329	0
14-jul-20	17:00:00	27.1	25.1	64	56	0.8	353	0
14-jul-20	18:00:00	28	25.8	61	52	0.8	347	0
14-jul-20	19:00:00	27	24.9	63	55	0.6	332	0
14-jul-20	20:00:00	25.3	24.5	66	61	0.8	309	0
14-jul-20	21:00:00	24.5	22.7	71	66	0.2	340	0
14-jul-20	22:00:00	22.7	21	79	71	0.3	350	0

14-jul-20	23:00:00	21	20.2	82	79	0.4	357	0
15-jul-20	00:00:00	20.2	19.1	84	81	0.4	18	0
15-jul-20	01:00:00	19.2	18.6	85	83	1	330	0
15-jul-20	02:00:00	18.6	17.7	86	85	1.2	344	0
15-jul-20	03:00:00	17.7	16.8	87	85	1.4	345	0
15-jul-20	04:00:00	16.8	15.9	88	86	0.9	338	0
15-jul-20	05:00:00	15.9	15.3	91	89	1.5	348	0
15-jul-20	06:00:00	15.3	14.6	92	91	1.5	349	0
15-jul-20	07:00:00	14.6	14	93	92	1.7	342	0
15-jul-20	08:00:00	14	13.8	94	93	2.3	344	0
15-jul-20	09:00:00	14	14	93	93	2.2	346	0
15-jul-20	10:00:00	14.1	14	93	92	1.9	344	0
15-jul-20	11:00:00	14.6	13.8	92	88	1.6	355	0
15-jul-20	12:00:00	16.6	14.6	88	79	2.6	359	0
15-jul-20	13:00:00	18.8	16.6	79	71	1.7	9	0
15-jul-20	14:00:00	21.2	18.8	72	63	1.1	357	0
15-jul-20	15:00:00	22.4	20.9	65	59	2.1	15	0
15-jul-20	16:00:00	23.6	22.2	61	55	2.2	360	0
15-jul-20	17:00:00	24.8	23.3	57	52	1.3	20	0
15-jul-20	18:00:00	25.3	24.7	54	50	1.4	348	0
15-jul-20	19:00:00	25.2	24.5	53	51	1.6	341	0
15-jul-20	20:00:00	24.6	23.4	57	51	1.6	325	0
15-jul-20	21:00:00	23.4	21.1	64	57	0.9	339	0
15-jul-20	22:00:00	21.1	19.7	67	64	1	360	0
15-jul-20	23:00:00	19.7	18.7	68	65	1.2	359	0

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados obtidos no controle de qualidade de cinco populações de *C. noackae*, parasitoide de *T. peregrinus*, com diferentes gerações confirmaram a hipótese de que a criação sucessiva desse inimigo natural em laboratório promove mudanças nos parâmetros biológicos e comportamentais de *C. noackae*, principalmente na longevidade e capacidade de vôo.
- Este é o primeiro relato de múltiplos endossimbiontes em *C. noackae*. Em todas as populações de laboratório e de campo foram encontrados oito gêneros de bactérias endossimbiontes, e após o sequenciamento foi possível identificar 99% de identidade com os gêneros *Wolbachia*, *Rickettsia* e *Serratia*. As influências dessas bactérias nos parâmetros biológicos e reprodutivos de *C. noackae* necessitam ainda ser investigadas, e podem servir no desenvolvimento de estratégias de controle biológico de *T. peregrinus*.
- Com base nos resultados da capacidade de dispersão de *C. noackae*, empresas e pequenos produtores podem ajustar a estratégia de liberação e estabelecer pontos de liberação em plantações infestados pela praga, sendo recomendado a liberação a cada 25,0 m.
- As informações e resultados obtidos neste trabalho podem servir para o aprimoramento da criação massal desse parasitoide em laboratório e na eficiência da liberação para o manejo do percevejo-bronzeado a campo.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT**- bases de dados. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2021.
- BARBOSA, L.R.; et al. Establishment in the field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an exotic egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Florida Entomologist**, v. 100, n. 2, p. 372-374, 2017.
- BARBOSA, L. R.; et al. Development of *Cleruchoides noackae*, an egg-parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus*, in eggs laid on different substrates, with different ages and post-cold storage. **Biocontrol**, v. 63, n. 1, p. 193-202, 2018.
- BARBOSA, L. R.; et al. Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. **Scientific Report**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.
- BECCHI, L.K.; et al. Oviposition behaviour of mated or unmated *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). **Plos One** v. 15, n. 10, p. 1-12, 2020.
- BIGLER, F. Quality assessment and control in entomophagous insects used for biological control. **Journal of Applied Entomology**, v. 108, n. 1-5, p. 390-400, 1989.
- BUTTON G. *Thaumastocoris peregrinus*. **Forestry facts**, Pietermaritzburg, p.16-17, 2007.
- CARPINTERO, D.L.; DELLAPÉ, P.M. A new species of *Thaumastocoris Kirkaldy* from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), **Zootaxa**, v. 1228, n. 1228, p.61-68, 2006.
- DIAS, T.K.R. et al. Predation of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) by *Atopozelus opsimus* (Hemiptera: Reduviidae) in Brazil. **ISJ-Invertebrate Survival Journal**, v.11, p.224-227, 2014.
- DOUGLAS, A. E. Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 17-34, 2015.
- FLEURY, F. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Parasitology**, v. 121, n. 5, p. 493-500, 2000.
- FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 325-333, 2008.
- GARLET, J.; COSTA, E. C.; BOSCARDIN, J. Levantamento da entomofauna em plantios de *Eucalyptus* spp. por meio de armadilha luminosa em São Francisco de Assis – RS. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 365-374, 2016.

GARNAS, J.R., HURLEY, B.P., SLIPPERS, B. & WINGFIELD, M.J. (2012) Biological control of forest plantation pests in an interconnected world requires greater international focus. **International Journal of Pest Management** 58, 211-223.

GRENIER, S.; de CLERCQ, P. Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential use in biological control. In: van LENTEREN, J.C. (Ed.) **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. CABI publishing, Wallingford, England, 2003, p. 115-131.

HARUMOTO, T.; FUKATSU, T.; LEMAITRE, B. Common and unique strategies of male killing evolved in two distinct *Drosophila* symbionts. **Proceedings of the Royal Society**, v. 285, p. 2-10, 2018.

HILGENBOECKER, K. et al. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, n. 2, p. 215-220, 2008.

HURLEY, B. P. et al. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, v. 18, p. 921–933, 2016.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. Relatório Anual, 2020. 122p. Disponível em: < <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf> >. Acesso em: 15 fev 2021.

JACOBS, D. H.; NESSER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to Eucalyptus trees: research in action. **South African Journal of Science**, v. 101, n. 5, p. 233-236, 2005.

LEPPLA, N.C. Aspects of total quality control for the production of natural enemies. pp 19-24 in van LENTEREN, J.C. (Ed.). **Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures**. CABI publishing, Wallingford, England, 2003, p. 19-24.

LIMA, A. C. V. et al. Intra-plant spatial distribution of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus grandis* plants. **Phytoparasitica**, v. 44, n. 3, p. 1-8, 2016.

LIN, N. Q.; HUBER, J. T.; SALLE, J. L. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Zootaxa**, v. 1596, n. 1596, p. 1-111, 2007.

LOWENSTEIN, D. M. et al. 2019. Establishment in an introduced ange: Dispersal capacity and winter survival of *Trissolcus japonicus*, an adventive egg parasitoid. **Insects**, v. 10, n. 12, p. 443, 2019.

MACHADO et al. One maternal lineage leads the expansion of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in the New and Old Worlds. **Scientific Reports**, v. 10, n. 3487, p. 1-13, 2020.

MANN, E. ET AL. Transcriptome sequencing reveals novel candidate genes for *Cardinium* hertigii-caused cytoplasmic incompatibility and host-cell interaction. **MSystems**, v. 2, n. 6, e00141-17, 2017.

MARTÍNEZ, G.; GONZÁLEZ, A.; SIMETO, S.; BALMELLI, G. Monitoring the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae): effect of trap placement. **International Forest Review**, v. 12, n. 5, p. 360.

MARTÍNEZ, G.; GONZÁLEZ, A.; DICKE, M. Rearing and releasing the egg parasitoid *Cleruchoides noackae*, a biological control agent for the *Eucalyptus* bronze bug. **Biological Control**, v. 123, n. 97-104, 2018.

MASCARIN, G.M.; DUARTE, V.S.; BRANDÃO, M.M.; DELALIBERA JR, I. Natural occurrence of *Zoopththora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) an invasive pest recently found in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, n. 2012, p.401-404, 2012.

MILLER, W.J.; SCHNEIDER, D. Endosymbiotic microbes as adaptive manipulators of arthropod behavior and natural driving sources of host speciation. In: BRODEUR, D. P. J.; THOMAS, F. (Eds.). **Host Manipulation by Parasites**. Oxford University Press, UK. 2012.

MILLS, N. J.; BABENDREIER, D.; LOOMANS, A. J. Methods for monitoring the dispersal of natural enemies from point source releases associated with augmentative biological control. In: Bigler, F.; Babendreier, D.; Kuhlmann, U. (Eds.). **Environmental impact of invertebrates for biological control of arthropods: Methods and risk assessment**, 2006, p. 114-131.

MONTAGU, A. et al. Global incursion pathways of *Thaumastocoris peregrinus*, an invasive Australian pest of eucalypts. **Biological Invasions**, v. 22, p. 3501-3518, 2020.

MORAN, N. A.; MCCUTCHEON, J. P.; NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 165-190, 2008.

MUTITU, E.K. et al. Biology and rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 5, p. 1979-1985, 2013.

MUTITU, E.K. et al. Reconstructing early routes of invasion of the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): cities as bridgeheads for global pest invasions. **Biological Invasions**, 22, 2325-2338, 2020.

NARANJO-GUEVARA, N. et al. Long-term mass rearing impacts performance of the egg parasitoid *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae). **Journal of Entomological Science**, v. 55, p. 69- 86, 2020.

NOACK, A.; ROSE, H. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. in the laboratory with some observations on behaviour. **General and Applied Entomology**, v. 36, p. 27-33, 2007.

NOACK, A.; CASSIS, G.; ROSE, H. A. Systematic revision of *Thaumastocoris Kirkaldy* (Hemiptera: Heteroptera: Thaumastocoridae). **Zootaxa**, v. 3121, p. 01-60, 2011.

NOUHUYS, S. V.; KOHONEN, M.; DUPLOUY, A. *Wolbachia* increases the susceptibility of a parasitoid wasp to hyperparasitism. **Journal Experimental Biology**, v. 219, n. 19, p. 2984-2990, 2016.

OLIVER, K.M.; RUSSELL, J. A.; MORAN, N. A.; HUNTER, M. S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 1803-1807, 2003.

OLIVER, K. M., HIGASHI, C. H. Variations on a protective theme: *Hamiltonella* defense infections in aphids variably affect parasitoid success. **Current Opinion Insect Science**, v. 32, p. 1-7, 2019.

PETIT, J.N. et al. Short-distance dispersal behavior and establishment of the parasitoid *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) in Tahiti: Implications for its use as a biological control agent against *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Biological Control**, v. 45, p. 344–352, 2008.

PISTONE, D. et al. Presence of *Wolbachia* in three Hymenopteran species: *Diprion pini* (Hymenoptera: Diprionidae), *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae), and *Dahlbominus fuscipennis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2014.

SALAZAR-MENDOZA, P.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; FERNANDES, O. A. Release density, dispersal capacity, and optimal rearing conditions for *Telenomus remus*, an egg parasitoid of *Spodoptera frugiperda*, in maize, **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 1-20, 2020.

POMARI-FERNANDES et al. Dispersal capacity of the egg parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygasteridae) in maize and soybean crops. **Biological Control**, v. 126, 158-168, 2018.

SANTADINO, M.; BRENTASSI, M. E.; FANELLO, D. D.; COVIELLA, C. First evidence of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) feeding from mesophyll of eucalyptus leaves. **Environmental Entomology**, v. 46, n. 2, p. 251-257, 2017.

SANTOS, et al. Monitoring *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in *Eucalyptus* plantations with remote sensing. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 17947-17960, 2020.

SOLIMAN, et al. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different eucalyptus species and hybrids. **Phytoparasitica**, v. 40, p. 223-230, 2012.

SOLIMAN, E. P. et al. Susceptibility of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), a Eucalyptus pest, to entomopathogenic fungi. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 3, p. 255-260, 2019.

SOUZA, A.R. et al. Longevity of *Cleruchoidea noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), with various honey concentrations and at several temperatures. **Florida Entomologist**, v. 99, n. 1, p. 33-37, 2016.

SUVERKROPP, B. P.; BIGLER, F.; van LENTEREN, J. C. Dispersal behaviour of *Trichogramma brassicae* in maize fields. **Bulletin of Insectology**, v. 62, n. 1, p. 113-120, 2009.

TREVISAN, M. et al. Quality of the exotic parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) does not show deleterious effects after inbreeding for 10 generations. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1-15, 2016.

van LENTEREN, J.C. Quality control for natural enemies used in greenhouses. **Bull OILB-SROP**, v. 16, p. 89-92, 1992.

van LENTEREN, J.C.; BIGLER, F. Quality control of mass reared egg parasitoids. In: CONSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; Zuchi, R. A. (Eds.). **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Dordrecht, the Netherlands, Springer, 2010, p. 315-340.

WERREN, J.H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 6, n. 10, p. 741-751, 2008.

WESTPHAL, M. I. et al. The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. **Biological Invasions**, v. 10, p. 391-398, 2008.

WILCKEN, C. F. et al. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 201-205, 2010.

WILCKEN, C. F. et al. Percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé. In: VILLELA E. F.; ZUCCHI, R. A. **Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros**. Piracicaba: FEALQ, 2015, p. 898-908.

WINGFIELD, M.J.; et al. Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to Eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 35-42, 2013.

ZANUNCIO, J.C.; et al. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. **Annals of Forest Science**, v. 73, p. 205-214, 2016.