

BARBARA DE OLIVEIRA PURETZ

***Leptocybe invasa* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) E PARASITOIDES
ASSOCIADOS: MORFOLOGIA REPRODUTIVA COMPARADA E DISTRIBUIÇÃO
ESPAÇO TEMPORAL EM PLANTIOS DE EUCALIPTO**

BOTUCATU

2021

BARBARA DE OLIVEIRA PURETZ

***Leptocybe invasa* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) E PARASITOIDES
ASSOCIADOS: MORFOLOGIA REPRODUTIVA COMPARADA E DISTRIBUIÇÃO
ESPAÇO TEMPORAL EM PLANTIOS DE EUCALIPTO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Ciência
Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

Coorientadora: Dra. Amanda Rodrigues de Souza

BOTUCATU

2021

D418p	Puretz, Barbara de Oliveira Leptocybe invasa (Hymenoptera: Eulophidae) e parasitoides associados: morfologia reprodutiva comparada e distribuição espaço temporal em plantios de eucalipto / Barbara de Oliveira Puretz. -- Botucatu, 2021 91 p. : tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu Orientador: Carlos Frederico Wilcken Coorientadora: Amanda Rodrigues de Souza 1. Controle biológico. 2. Eucalipto. 3. Leptocybe invasa. 4. Selitrichodes nesi. 5. Quadrastichus mendeli. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Leptocybe invasa* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) E PARASITÓIDES ASSOCIADOS: MORFOLOGIA REPRODUTIVA COMPARADA E DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO TEMPORAL EM PLANTIOS DE EUCALIPTO

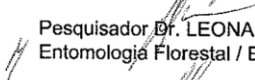
AUTORA: BARBARA DE OLIVEIRA PURETZ

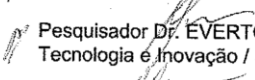
ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

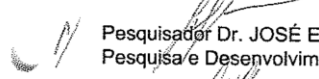
COORIENTADORA: AMANDA RODRIGUES DE SOUZA

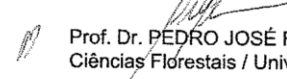
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu UNESP


Pesquisador Dr. LEONARDO RODRIGUES BARBOSA (Participação Virtual)
Entomologia Florestal / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária


Pesquisador Dr. ÉVERTON PIRES SOLIMAN (Participação Virtual)
Tecnologia e Inovação / Suzano S.A.


Pesquisador Dr. JOSÉ EDUARDO PETRILLI MENDES (Participação Virtual)
Pesquisa e Desenvolvimento / Bracell


Prof. Dr. PEDRO JOSÉ FERREIRA FILHO (Participação Virtual)
Ciências Florestais / Universidade Federal de São Carlos

Botucatu, 25 de novembro de 2021

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Adriana e Luiz Carlos (in memoriam)
por se doarem tanto na educação
dos filhos, por todo incentivo,
amor e compreensão para sempre
conseguir realizar meus sonhos.
Também ao meu filho Arthur,
pelo ensinamento diário,
por me fazer enxergar o que
realmente importa na
vida e me tornar uma
pessoa melhor a cada dia.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me proteger e me guiar pelos caminhos do bem.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas, e ao programa de Ciência Florestal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken, pela orientação, apoio, paciência, conhecimentos compartilhados, e pelos ensinamentos não somente científicos, mas para vida.

À minha coorientadora Dra. Amanda Rodrigues de Souza, pela coorientação, grande paciência e apoio.

Aos membros da banca examinadora de defesa, pelas contribuições e sugestões para melhoria do trabalho.

Ao Programa Cooperativo de Proteção Florestal (PROTEF) do Instituto de Estudos e Pesquisas Florestais (IPEF).

Ao Departamento de Proteção Vegetal, e todos os funcionários.

Ao Prof. José Eduardo Serrão e José Lino Neto pelo apoio nos trabalhos que foram realizados na UFV.

Às empresas Sylvamo Brasil e Suzano Papel e Celulose Três Lagoas-MS, pelo apoio e áreas concedidas para realização desse trabalho.

Ao Dr. Vítor Passos da Silva Júnior pela ajuda nas análises estatísticas, apoio e grande amizade que construímos.

À empresa Bracell SP Celulose Ltda., pela certa compreensão para conciliar estudo e trabalho.

Ao meu gestor José Eduardo, por ser mais do que gestor, por se importar com a equipe muito além do trabalho, um exemplo de profissional para mim.

Ao Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), à Lorena e Fernanda, pela ajuda e amizade. À Caroline, Luciane, Heitor, Leonardo, Camila,

Rafaela, Carolina, Vanessa, Murilo, Diego, Fábio, Flávia e Sidinei, pelo convívio no laboratório e ajuda nas atividades.

À Thaís, pela amizade tão especial e a grande ajuda nos experimentos, sem você não teria conseguido.

À Amanda, pela grande amizade que construímos durante alguns anos em Botucatu e no LCBPF, e que ainda continua.

Ao meu esposo, Thomas, pelo amor e paciência constante, apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Obrigada por ser meu equilíbrio.

Aos meus irmãos Gabriel e Ana Luíza, por me fortalecer ainda mais. Amo vocês.

Às minhas avós Eni e Izidora pelos ensinamentos, amor e educação dados à mim.

À minha família Cecília, Carlos, Vera, Rafaela, Maria Lura, Alexandre, Marlene, Bethânia, Rodrigo por todo carinho de sempre.

RESUMO

O Brasil é referência mundial na eucaliptocultura, sendo uma atividade importante comercialmente para o país. Porém, os plantios de eucaliptos podem ter a redução da produtividade pelos danos ocasionados por insetos-praga, principalmente pragas exóticas. *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), ocasiona danos nas regiões da nervura central das folhas, pecíolos, ramos novos e ponteiros, afetando o crescimento e produtividade das plantas atacadas. As alternativas de controle para pode ser pela utilização de materiais genéticos resistentes ao desenvolvimento da praga, controle químico com ingredientes ativos capazes de atingir o inseto no interior da galha, interrompendo seu ciclo e controle biológico, considerado a mais promissora, com o uso dos parasitoides *Selitrichodes neseri* e *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae). Devido à importância das táticas de controle e conhecimento sobre aspectos biológicos dos parasitoides de *L. invasa*, o presente trabalho teve o objetivo de analisar a morfologia dos sistemas reprodutivos feminino e masculino de *S. neseri*, verificar a dispersão de *S. neseri* em plantios de *Eucalyptus* com infestação por *L. invasa* e registrar a primeira ocorrência de *Q. mendeli* no Brasil. Quanto ao estudo de morfologia os resultados demonstram que *S. neseri* é um parasitoide sinovigênico, com ovário politrófico meroístico, uma vez que tanto virgem quanto acasalados existem oócitos maduros. Os testículos dos machos degeneram na fase adulta, com espermatozoides produzidos apenas na fase de pupa. Quanto a dispersão de *S. neseri*, ele foi capaz de dispersar mais de 200 metros do ponto de liberação e apresentou redução significativa na infestação de *L. invasa* no campo. Outro ponto importante desse trabalho foi o registro do parasitoide *Quadrastichus mendeli* no Brasil, o que dá ao manejo de *Leptocybe invasa* no país uma nova ferramenta para o controle biológico.

Palavras-chave: controle biológico clássico; dispersão; morfologia de parasitoides; *Leptocybe invasa*.

ABSTRACT

Brazil is a world reference in eucalyptus plantations, being a commercially important activity for the country. However, eucalyptus plantations may have reduced productivity through damage caused by insect pests, especially exotic pests. *Leptocybe invasiva* (Hymenoptera: Eulophidae) causes damage in parts of the central ridge of the leaves, petioles and new branches, forming galls affecting the growth and productivity of infested plants. The alternatives for control may be the use of genetic materials resistant to pest development, chemical control, and biological control, considered the most promising, through the parasitoid *Selitrichodes neseri* and *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae). Due to the importance of control tactics and knowledge of biological aspects of *L. invasa* parasitoids, this study aimed to analyze the morphology of the female and male reproductive systems of *S. neseri*, to verify the dispersion of *S. neseri* in plantations of *Eucalyptus* infested by *L. invasa* and record the first occurrence of *Q. mendeli* in Brazil. As for the morphology study, the results show that *S. neseri* is a synovigenic parasitoid with meroistic polytrophic ovary, since both virgin and mated have mature oocytes. Male testicles degenerate into adulthood, with sperm produced only in the pupal stage. As for the dispersal of this *S. neseri*, it was able to disperse more than 200 meters from the release point, and showed a significant reduction in the infestation of *L. invasa* in the field. Another important point of this work was the registration of the parasitoid *Quadrastichus mendeli* in Brazil, which gives the management of *Leptocybe invasa* in the country a new tool for biological control.

Keywords: classic biological control; dispersal; parasitoid morphology; *Leptocybe invasa*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 1 - Morfologia dos sistemas reprodutivos feminino e masculino do parasitoide <i>Selitrichodes neseri</i> Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae)	18
1.1 Introduction.....	20
1.2 Materials and Methods.....	21
1.3 Results and Discussion.....	22
References.....	27
CAPÍTULO 2 - Dispersão de <i>Selitrichodes neseri</i> (Hymenoptera: Eulophidae) em plantios de eucalipto.....	30
2.1 Introdução.....	32
2.2 Material e Métodos.....	34
2.2.1 Áreas experimentais.....	34
2.2.2 Delineamento experimental.....	35
2.2.3 Avaliação das amostras e liberação dos parasitoides.....	38
2.2.4 Análise estatística.....	39
2.3 Resultados e Discussão.....	40
2.4 Conclusões.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 3 - Primeira ocorrência de <i>Quadrastichus mendeli</i> Kim & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) no Brasil.....	78
3.1 Introdução.....	80
3.2 Material e Métodos.....	81
3.2.1 Coleta dos ramos.....	81
3.2.2 Acondicionamento e coleta de insetos.....	82
3.2.3 Identificação dos insetos.....	82
3.3 Resultados e Discussão.....	82
3.4 Conclusões.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS.....	91

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é referência mundial na eucaliptocultura, com área plantada de aproximadamente 9,0 milhões de hectares, representando cerca de 77% da área total de florestas plantadas no país. Esse setor possui grande importância econômica, contribuindo com aproximadamente 1,3% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e sendo responsável pela produção de madeira, celulose e papel, carvão vegetal para siderurgia, painéis de madeira e pisos laminados, além de exercer papel relevante na geração de empregos e na balança comercial brasileira (IBÁ, 2020).

Apesar da elevada produtividade dos plantios de *Eucalyptus*, a ocorrência de insetos-praga pode comprometer significativamente o desempenho desses sistemas florestais (Pimentel *et al.*, 2001; Wingfield *et al.*, 2008; Wilcken *et al.*, 2011; Hurley *et al.*, 2016). Em sistemas de monocultivo extensivo, como os plantios comerciais de eucalipto, a grande disponibilidade de hospedeiros, associada a condições climáticas favoráveis e à ausência ou baixa abundância de inimigos naturais, pode favorecer o estabelecimento e o aumento populacional de espécies-praga.

Nesse contexto, as pragas exóticas têm se destacado como importantes agentes de dano econômico em florestas plantadas. A expansão das áreas cultivadas com *Eucalyptus*, aliada à intensificação da globalização, ao aumento da circulação de pessoas e mercadorias e à introdução de material vegetal entre regiões e países, tem favorecido o surgimento e a disseminação de insetos invasores, os quais podem causar elevados prejuízos quando introduzidos fora de sua área de origem (Wingfield *et al.*, 2001; Wingfield *et al.*, 2008; Queiroz, 2009; Hurley *et al.*, 2016).

Entre as principais pragas exóticas registradas em plantios de eucalipto no Brasil destacam-se *Gonipterus pulverulentus* Lea (Coleoptera: Curculionidae), registrada em 1950, e *Gonipterus platensis* Marelli em 1979 (Barbiellini, 1955; Freitas, 1979); *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), registrada em 2003 (Wilcken *et al.*, 2003; Santana; Burckhardt, 2007); *Thaumastocoris peregrinus* Carpinteiro e Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), registrada em 2008 (Wilcken, 2008; Wilcken *et al.*, 2015); e a vespa-da-galha do eucalipto,

Leptocybe invasa Fisher e La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), também registrada no Brasil em 2008 (Wilcken; Berti Filho, 2008).

Leptocybe invasa, conhecida popularmente como vespa-da-galha do eucalipto, causa danos principalmente nas nervuras centrais das folhas, pecíolos, ramos jovens e ponteiros das plantas. O desenvolvimento do inseto ocorre no interior dos tecidos vegetais, desde a fase de ovo até a emergência do adulto, resultando na formação de galhas que comprometem o crescimento e a produtividade das plantas infestadas (Wilcken; Berti Filho, 2008; Masson, 2015; Souza, 2016).

O manejo dessa praga pode envolver diferentes estratégias de controle. Entre elas destacam-se o uso de materiais genéticos menos suscetíveis ao desenvolvimento do inseto, práticas de manejo cultural, como a remoção de ramos infestados e o manejo adequado de viveiros para redução de focos de infestação, além do controle químico com ingredientes ativos capazes de atingir o inseto no interior das galhas, interrompendo seu ciclo de desenvolvimento (Dittrich-Schröder *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014; Wilcken *et al.*, 2015; Masson, 2015).

Entre as estratégias disponíveis, o controle biológico tem sido considerado uma das alternativas mais promissoras para o manejo de *L. invasa*, principalmente devido à utilização de parasitoides específicos da praga (Zheng *et al.*, 2014). O uso de inimigos naturais pode contribuir para a redução das populações do inseto em campo, favorecendo o equilíbrio ecológico e reduzindo a necessidade de intervenções químicas em sistemas florestais.

No Brasil, o controle biológico de *L. invasa* pode ser realizado com o uso do parasitoide *Selitrichodes neseri* Kelly e La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), um ectoparasitoide que se desenvolve sobre larvas ou pré-pupas do hospedeiro no interior das galhas. Essa espécie apresenta reprodução biparental e taxas de parasitismo variando de 9,7% a 71,8%, demonstrando boa adaptação às condições edafoclimáticas do país (Dittrich-Schröder *et al.*, 2014; Souza, 2016; Puretz, 2017; Masson *et al.*, 2017).

Outro parasitoide associado ao controle dessa praga é *Quadrastichus mendeli* Kim e La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), também considerado promissor para o

manejo de *L. invasa*. Essa espécie atua como ectoparasitoide de estágios imaturos do hospedeiro no interior das galhas, apresentando reprodução uniparental e taxas de parasitismo em condições laboratoriais de até 63,1%, além de longevidade que pode alcançar 104,7 dias quando alimentada com mel a 100% a 21 °C (Puretz *et al.*, 2019; Mota, 2020).

Apesar da importância do controle biológico no manejo de *Leptocybe invasa*, ainda existem lacunas de conhecimento sobre aspectos biológicos e ecológicos dos parasitoides associados a essa praga. Informações relacionadas à morfologia do sistema reprodutivo, à capacidade de dispersão em campo e à ocorrência de novos inimigos naturais são fundamentais para aprimorar programas de controle biológico em plantios de *Eucalyptus*.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo analisar a morfologia dos sistemas reprodutivos feminino e masculino de *Selitrichodes nesi*, avaliar a dispersão dessa espécie em plantios de *Eucalyptus* infestados por *Leptocybe invasa* e registrar a primeira ocorrência do parasitoide *Quadrastichus mendeli* no Brasil.

CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA DOS SISTEMAS REPRODUTIVOS FEMININO E MASCULINO DO PARASITOIDE *Selitrichodes neseri* KELLY & LA SALLE (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)¹

Morphology of the female and male reproductive systems of parasitoid *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae)

Barbara de Oliveira Poretz; Amanda Rodrigues de Souza; José Eduardo Serrão;
José Lino Neto; Carlos Frederico Wilcken

Resumo

Os parasitoides são importantes para o controle biológico de pragas agrícolas e florestais. Estudos básicos são necessários para avanços em sistemas florestais. O parasitoide *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) tem sido estudado como agente de controle da praga do eucalipto *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). Entre os estudos necessários para auxiliar nos avanços do controle biológico está a morfologia do aparelho reprodutor feminino e masculino desse parasitoide. Este estudo teve como objetivo descrever a morfologia do trato reprodutivo de fêmeas em diferentes idades e de machos de *S. neseri*, por meio de análises morfológicas realizadas em microscopia. Esse parasitoide é sinovigênico, apresentando ovários politróficos meroísticos. Tanto as fêmeas virgens quanto as acasaladas apresentaram oócitos maduros, indicando que não há necessidade de cópula para ativação ovariana. Os testículos dos machos de *S. neseri* degeneram na fase adulta, indicando que os espermatozoides são produzidos apenas na fase de pupa. Esses resultados sugerem que fêmeas com diferentes idades podem ser utilizadas em liberações no campo, embora a presença de machos seja importante para a fertilização dos ovos.

Palavras-chave: ovários; testículos; inimigo natural; controle biológico; morfologia.

¹Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico *Agricultural and Forest Entomology*.

Abstract

1 - Parasitoids play an important role in the biological control of agricultural and forest pests.

2 - Basic studies are essential for improving biological control programs in forest systems.

3 - *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) has been studied as a biological control agent of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae).

4 - Among the studies required to support advances in biological control is the morphological characterization of the female and male reproductive systems of this parasitoid.

5 - This study aimed to describe the morphology of the reproductive tract of females at different ages and of males of *S. neseri* through morphological analyses under microscopy.

6 - This parasitoid is synovigenic and has meroistic polytrophic ovaries.

7 - Both virgin and mated females showed mature oocytes, indicating that copulation is not required for ovarian activation.

8 - The testes of *S. neseri* males degenerate during the adult stage, indicating that sperm production occurs only during the pupal stage.

9 - These results suggest that females of different ages may be used in field releases; however, the presence of males is necessary for egg fertilization.

Keywords: ovaries; testes; natural enemy; biological control; morphology.

1.1 Introduction

Parasitoids play a key role in the biological control of agricultural and forest pests by regulating phytophagous insect populations and contributing to the sustainability of production systems. Detailed knowledge of the biology of these organisms is essential for the improvement of biological control programs, especially in forest systems, in which the efficiency of a natural enemy depends on its adaptation, reproductive capacity, and interaction with the host.

Among the parasitoids associated with the control of eucalyptus pests, *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) stands out as a promising species for the biological control of the eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). This exotic pest induces gall formation on leaves, petioles, midribs, and young shoots of *Eucalyptus* species and hybrids, impairing plant growth and development (Wilcken *et al.*, 2015; Souza, 2016). *Selitrichodes neseri*, an Australian species described by Kelly *et al.* (2012), has been introduced into Brazil as a biological control agent of *L. invasa*.

Knowledge of the reproductive system morphology of parasitoids is particularly relevant because it provides information on reproductive strategies, ovarian maturation, fertilization, and offspring production, all of which are directly related to the establishment and multiplication potential of these insects in biological control programs. In *S. neseri*, previous studies have shown a relatively short life cycle, a female-biased sex ratio, high parasitism rates, and ectoparasitoid development inside galls of *L. invasa* (Dittrich-Schröder *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018). These features highlight the importance of improving our understanding of its reproductive organization, since such information may support both mass rearing and field release strategies.

In parasitoid Hymenoptera, reproductive traits such as synovigeny and the degree of oocyte maturation throughout adult life have practical implications for mass-rearing and release programs because they influence female oviposition capacity and the reproductive performance of the population. In this context, the morphological characterization of the female and male reproductive organs of *S.*

neseri may contribute to a better understanding of its biological potential and its application in management strategies against *L. invasa*.

Therefore, this study aimed to describe the morphology of the female and male reproductive systems of *Selitrichodes neseri* by means of morphological analyses of females at different ages and of males, in order to expand the biological knowledge of this species and provide information to improve its use in the biological control of the eucalyptus gall wasp.

1.2 Materials and Methods

Production of seedlings and parasitized galls

Seedlings of hybrid clones of *Eucalyptus grandis* × *E. camaldulensis* were planted in 1.7-L plastic pots containing sterilized soil in a soil:sand:manure mixture (1:1:1) and watered daily. The seedlings were maintained in an open nursery under full sunlight at the Department of Plant Protection, School of Agricultural Sciences, São Paulo State University (FCA/UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil (22°50'S, 48°25'W, 786 m altitude). The plants were exposed to natural infestation by *Leptocybe invasa*. Approximately 70 days after infestation, plants bearing galls were transferred to a climate-controlled room at 25 ± 2 °C, 60 ± 10% RH, and a 12:12 h photoperiod. Two *L. invasa*-infested plants were placed in wooden cages (40 × 45 × 80 cm) and irrigated every 2 days. Galls were counted, and 10 to 15 pairs of *S. neseri* parasitoids were released into each cage for parasitism, where they remained for approximately 15 days. Parasitoids were fed pure honey every 2 days. The cages were maintained in the laboratory under artificial lighting provided by LED tubular lamps (9 W/6000 K) to simulate the light conditions required for plant maintenance.

Parasitoids

Galls on the seedlings were collected approximately 15 days after parasitism by *S. neseri*. These galls were individually placed in glass vials (2.5 cm diameter × 8.5 cm height) covered with plastic film until the emergence of *S. neseri* females. As females emerged, they were collected and transferred to another vial either to mate with males or to remain virgin. In all cases, honey was provided as food.

Morphology

The description of the female and male reproductive systems of *S. neseri* was carried out at the Laboratory of Cellular Ultrastructure, Department of General Biology, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Specimens used in the analyses were obtained as described above. Some individuals were transported alive to the laboratory, whereas others were previously fixed in an alcoholic solution. Female *S. neseri* (n = 3) and males (n = 2) were anesthetized at -5 °C and dissected in 125 mM NaCl solution for removal of the reproductive tracts, which were photographed under a stereomicroscope (Zeiss).

Another set of insects consisted of: (1) females 24 h after mating; (2) females 48 h after mating; (3) virgin females 24 h after emergence; (4) virgin females 48 h after emergence; and (5) males. Five replicates were used for each experimental group, with each replicate corresponding to one individual. Parasitoids were dissected and the reproductive tracts were transferred to 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 24 h. Samples were then dehydrated in a graded ethanol series (70, 80, 90, and 95%) for 10 min and embedded in Leica Histoiresin®. Sections 2 µm thick were obtained using a rotary microtome, stained with hematoxylin and eosin, and analyzed under a light microscope.

1.3 Results and Discussion

The female reproductive tract of *S. neseri* consists of a pair of ovaries, with the number of ovarioles ranging from four to six. This range is close to that reported by Dittrich-Schröder *et al.* (2014), who described six ovarioles per ovary for this species. Because the studies did not necessarily use the same histological procedures, this comparison should be interpreted with caution. The ovarioles present a short terminal filament, followed by a short germarium and a long vitellarium containing oocytes at different stages of development. In all ovarioles, at least one elongated mature oocyte was observed in the basal region (Figure 1A).

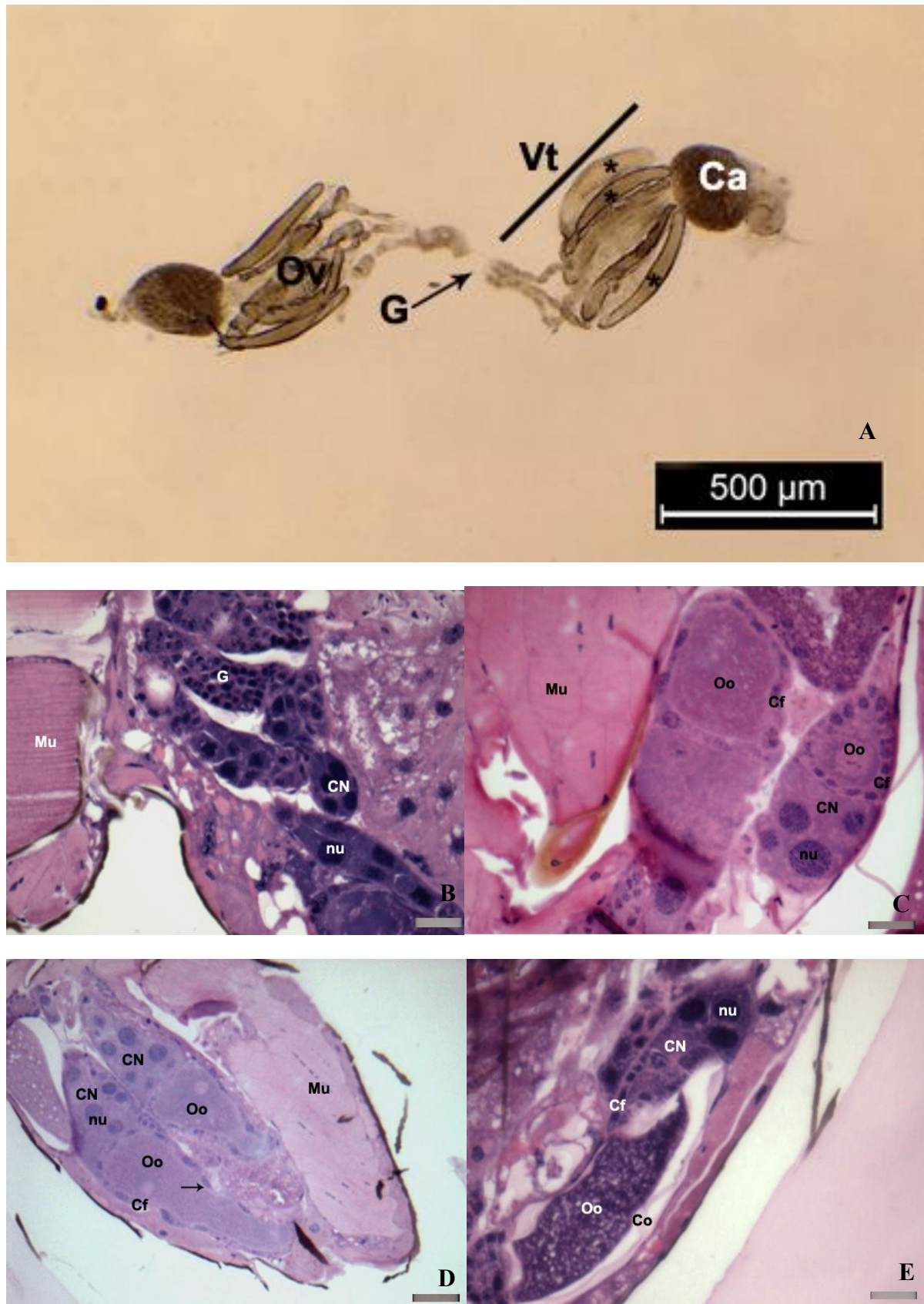


Figure 1. Photomicrographs of the ovaries of *Selitrichodes neseri* (Hymenoptera: Eulophidae). (A) Ovarioles (Ov) composed of a short germarium (G) followed by a long vitellarium (Vt), opening into an enlarged egg calyx (Ca). Note the presence of mature oocytes (asterisks) at the base of the ovarioles. (B) Histological section of the thorax–abdomen transition of a female, showing the germarium (G) of

the ovarioles containing undifferentiated cells and the beginning of nurse-cell differentiation (NC) with large nuclei. Mu, thoracic muscle. Scale bar = 40 μ m. (C) Histological section of the abdomen showing the beginning of the vitellarium of two ovarioles, with the nurse chamber (NC) more developed than the oocytic chamber containing the oocyte (Oo). Note the large nuclei (nu) of the nurse cells with predominantly decondensed chromatin and the layer of follicular cells (fc) surrounding both the nurse and oocytic chambers. Mu, abdominal muscle. Scale bar = 40 μ m. (D) Histological section of the abdomen of a virgin female showing two ovarioles with developing oocytes (Oo) larger than the nurse chamber (NC). Mu, muscle; nu, nurse-cell nucleus; arrow, follicular-cell nucleus. Scale bar = 40 μ m. (E) Histological section of the abdomen of a virgin female showing the basal portion of the ovariole, with an oocyte (Oo) rich in yolk granules and chorion formation (Co). Note the nuclei (nu) of the nurse cells (NC) with condensed chromatin. fc, follicular cell. Scale bar = 40 μ m.

The ovarian organization observed in *S. nesei* is characteristic of meroistic polytrophic ovaries, a pattern commonly reported for parasitoid Hymenoptera. In this type of ovariole, each oocyte is associated with nurse cells during its development, which may favor rapid maturation and sustained egg production throughout adult life. The presence of oocytes at different developmental stages, together with mature basal oocytes, supports the interpretation that females emerge with ongoing egg maturation and maintain reproductive activity during the adult stage.

Histological analyses showed that the germarium contains undifferentiated cells and the beginning of nurse-cell differentiation, with large nuclei visible in this region (Figure 1B). Along the vitellarium, oocytes in successive stages of maturation were observed, indicating continuous ovarian development. These characteristics reinforce the interpretation that *S. nesei* is synovigenic, as mature eggs are present while additional oocytes continue to develop during adult life.

Ovarian activation and oocyte development were similar in virgin females evaluated at 24 and 48 h after emergence and in mated females evaluated at 24 and 48 h after copulation, with oocytes at different stages of development in all observed conditions (Figure 2A–D). These data indicate that egg maturation does not depend on mating and that fertilization occurs after ovulation, during oviposition. From a biological perspective, this pattern is compatible with parasitoids that must maintain reproductive capacity throughout a short adult life span, which may favor rapid exploitation of available hosts. Thus, early egg maturation may represent an important trait for the reproductive efficiency of *S. nesei*.

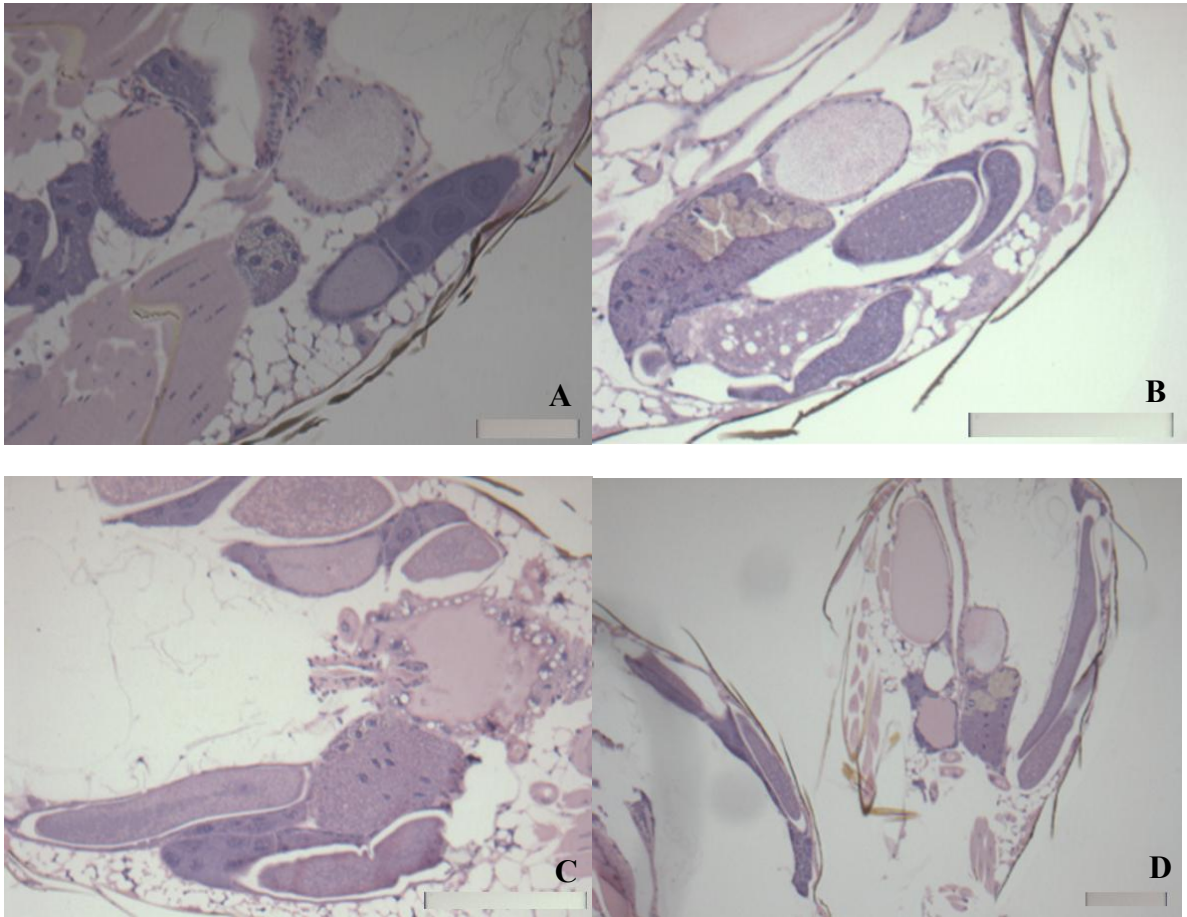


Figura 2. **A** - Photomicrographs of the abdomen of female *Selitrichodes neseri* (Hymenoptera: Eulophidae) at different reproductive conditions and ages. **(A)** Virgin female, 24 h after emergence. Scale bar = 10 μ m. **(B)** Virgin female, 48 h after emergence. Scale bar = 20 μ m. **(C)** Mated female, 24 h after copulation. Scale bar = 20 μ m. **(D)** Mated female, 48 h after copulation. Scale bar = 10 μ m.

In males, the reproductive tract consists of a pair of testes, each followed by a narrow vas deferens, the initial portion of which enlarges to form the seminal vesicle. Posteriorly, the seminal vesicle is connected to a well-developed sac-like accessory gland, and both vasa deferentia are connected to an ejaculatory duct (Figure 3A). Histological analyses showed that the testes of adult males have a degenerated appearance, characterized by testicular follicles with disorganized cysts and fragmented nuclei (Figure 3B). In contrast, the seminal vesicles showed a lumen filled with bundles of spermatozoa (Figure 3C), whereas the accessory gland presented a flattened single-layered epithelium and a lumen containing acidophilic material (Figure 3D).

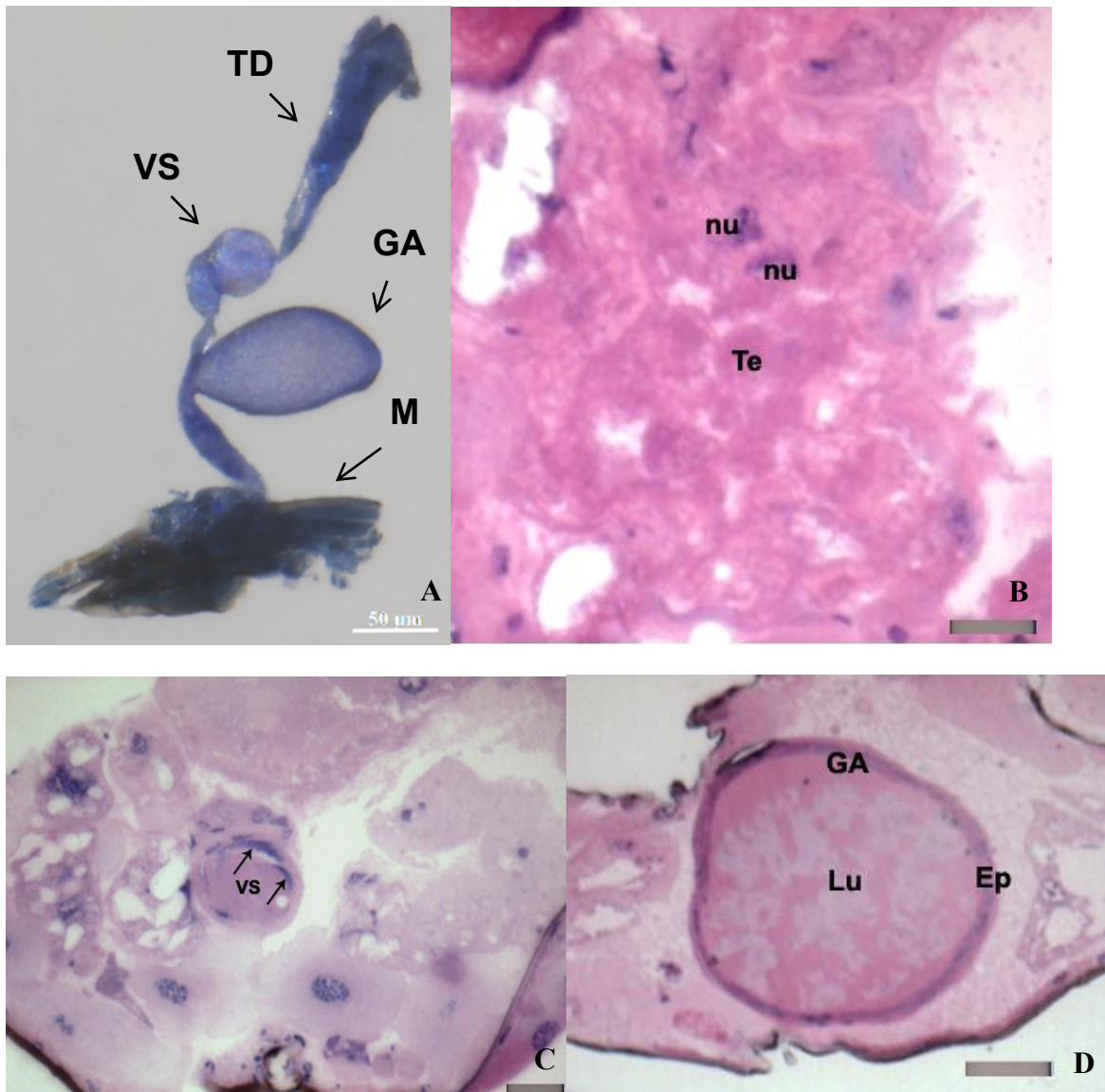


Figura 3. A - Male reproductive system of *Selitrichodes neseri* (Hymenoptera: Eulophidae). **(A)** Male reproductive tract showing the degenerated testis (TD), seminal vesicle (SV), and accessory gland (AG). M, muscle. **(B)** Photomicrograph of a histological section of the testis (Te) showing disorganized follicles and cysts and some fragmented cellular nuclei (nu). Scale bar = 40 µm. **(C)** Photomicrograph of the seminal vesicle (SV), with the lumen containing bundles of spermatozoa (arrows). Scale bar = 40 µm. **(D)** Photomicrograph of the accessory gland (AG) of a post-copulatory male, showing a flattened epithelium (Ep) and a lumen (Lu) containing acidophilic material. Scale bar = 40 µm.

The occurrence of degenerated testes in adult males is common in parasitoid Hymenoptera, in which sperm develop during the pupal stage and no additional sperm production occurs during adulthood. In *S. neseri*, the presence of sperm stored in the seminal vesicle and the testicular degeneration observed in adults indicate that spermatogenesis is completed before emergence. This pattern is consistent with the short reproductive phase of males and with the reproductive strategy of the species.

Overall, the morphology of the reproductive system of *S. nesei* reveals features consistent with the reproductive biology of parasitoids. In females, the presence of merostic polytrophic ovarioles, with oocytes at multiple developmental stages and mature oocytes present in both virgin and mated females, reinforces the interpretation that the species is synovigenic. In males, adult testicular degeneration associated with sperm storage in the seminal vesicle indicates that spermatogenesis is completed before emergence. Taken together, these findings expand the current understanding of the reproductive biology of *S. nesei* and contribute to discussions of its potential as a natural enemy of *Leptocybe invasa*, although inferences regarding field performance still depend on complementary evidence of parasitism and biological efficacy.

References

- Andrade, G.S., Sousa, A.H., Santos, J.C., Gama, F.C., Serrão, J.E. & Zanuncio, J.C. (2012) Oogenesis pattern and type of ovariole of the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **84**, 767–774.
- Bodin, A., Jaloux, B., Delbecq, J., Vannier, F., Monge, J. & Mondy, N. (2009) Reproduction in a variable environment: How does *Eupelmus vuilleti*, a parasitoid wasp, adjust oogenesis to host availability? *Journal of Insect Physiology*, **55**, 643–648.
- Costa, V.A., Berti-Filho, E., Wilcken, C.F., Stape, J.L., La Salle, J. & Teixeira, L.D. (2008) *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil: New forest pest reaches the New World. *Revista de Agricultura*, **83**, 136–139.
- Cruz-Landim, C. (2009) *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo, Editora UNESP, 408 pp.
- Damiens, D. & Boivin, G. (2005) Male reproductive strategy in *Trichogramma evanescens*: sperm production and allocation to females. *Physiological Entomology*, **30**, 241–247.

- Dossi, F.C.A. & Cõnsoli, F.L. (2010) Desenvolvimento ovariano e influência da cópula na maturação dos ovários de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Neotropical Entomology*, **39**, 414–419.
- Dittrich-Schröder, G., Harney, M., Naser, S., Joffe, T., Bush, S., Hurley, B.P., Wingfield, M.J. & Slippers, B. (2014) Biology and host preference of *Selitrichodes nesi*: A potential biological control agent of the eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa*. *Biological Control*, **78**, 33–41.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J. & Báó, S.N. (2008) Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). *Micron*, **39**, 1271–1280.
- Hassell, M.P. (2000) Host-parasitoid dynamics. *Journal of Animal Ecology*, **69**, 543–566.
- Huang, F., Shi, M., Chen, Y., Cao, T. & Chen, X. (2008) Oogenesis of *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its associated polydnavirus. *Microscopy Research and Technique*, **71**, 676–683.
- Jervis, M.A., Heimpel, G.E., Ferns, P.N., Harvey, J.A. & Kidd, N.A.C. (2001) Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. *Journal of Animal Ecology*, **70**, 442–458.
- Kavitha-Kumari, N., Kulkarni, H., Vastrad, A.S. & Goud, K.B. (2010) Biology of eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher and La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, **23**, 211–212.
- Kelly, J., La Salle, J., Harney, M., Dittrich-Schröder, G. & Hurley, B. (2012) *Selitrichodes nesi* n. sp., a new parasitoid of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). *Zootaxa*, **3333**, 50–57.
- Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N. & La Salle, J. (2004) Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. *Australian Journal of Entomology*, **43**, 101–113.

- Santos, T.C.A. & Cruz-Landim, C. (2002) Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. *Revista Brasileira de Zoologia*, **19**, 703–714.
- Souna, D.A., Bokonon-Ganta, A., Ravallec, M., Cusumano, A., Pittendrigh, B.R., Volkoff, A.-N. & Tamò, M. (2017) An insight in the reproductive biology of *Therophilus javanus* (Hymenoptera, Braconidae, and Agathidinae), a potential biological control agent against the legume pod borer (Lepidoptera, Crambidae). *Psyche*, **2017**, 3156534.
- Souza, A.R., Puretz, B.O., Souza, N.M., Becchi, L.K., Veloso, S.G.M. & Wilcken, C.F. (2015) Controle biológico de pragas exóticas de *Eucalyptus* spp. In: Baldin, E.L.L., Kronka, A.Z. & Fujihara, R.T. (eds) *Proteção Vegetal*, pp. 71–84. Botucatu, Fepaf.
- Sperandio, L.A.A. (2001) Alguns aspectos do comportamento de oviposição de fêmeas selvagens de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Bruchidae) em condições de privação do hospedeiro. MSc Dissertation, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
- Wilcken, C.F., Zaché, B., Masson, M.V., Pereira, R.A., Barbosa, L.R. & Zanuncio, J.C. (2015) Vespa-da-galha-do-eucalipto, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle. In: Vilela, E.F. & Zucchi, R.A. (eds) *Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros*, pp. 835–844. Piracicaba, FEALQ.

CAPÍTULO 2

DISPERSÃO DE *Selitrichodes neseri* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) EM PLANTIOS DE EUCALIPTO

Barbara de Oliveira Puretz

Resumo

Leptocybe invasa Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) é uma importante praga exótica do eucalipto, responsável pela formação de galhas em folhas, pecíolos, nervuras centrais e brotações jovens, comprometendo o desenvolvimento das plantas. Entre as estratégias de manejo, o controle biológico com parasitoides destaca-se como alternativa promissora. Neste estudo, avaliou-se a dispersão de *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) em plantios de *Eucalyptus* infestados por *L. invasa*, bem como sua ocorrência nas áreas após a liberação e sua associação com a infestação observada ao longo das avaliações de campo. Foram conduzidos experimentos em diferentes áreas, com monitoramento da infestação, emergência de adultos e distribuição espacial da praga e do parasitoide. Os resultados indicaram maior formação de galhas na nervura central e no pecíolo das folhas, principalmente nas fases intermediárias de desenvolvimento. *Selitrichodes neseri* apresentou estabelecimento nas áreas avaliadas e capacidade de dispersão em campo, atingindo aproximadamente 300 m a partir do ponto de liberação. Além disso, a infestação de *L. invasa* apresentou redução após a liberação do parasitoide nas áreas de estudo. Os resultados reforçam o potencial de *S. neseri* como agente de controle biológico de *L. invasa* em plantios de eucalipto.

Palavras-chave: controle biológico; dispersão; *Selitrichodes neseri*; *Leptocybe invasa*; eucalipto.

Abstract

Leptocybe invasa Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) is an important exotic pest of eucalyptus, causing gall formation on leaves, petioles, midribs, and young shoots, thereby affecting plant development. Among the available management strategies, biological control with parasitoids stands out as a promising alternative. This study evaluated the dispersal of *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) in *Eucalyptus* plantations infested by *L. invasa*, as well as its occurrence in the areas after release and its association with pest infestation throughout the field evaluations. Experiments were conducted in different areas, with monitoring of infestation, adult emergence, and spatial distribution of both the pest and the parasitoid. The results indicated greater gall formation on the leaf midrib and petiole, especially in intermediate developmental stages. *Selitrichodes neseri* established in the evaluated areas and showed field dispersal capacity, reaching approximately 300 m from the release point. In addition, *L. invasa* infestation decreased after parasitoid release in the study areas. These findings reinforce the potential of *S. neseri* as a biological control agent of *L. invasa* in eucalyptus plantations.

Keywords: biological control; dispersal; *Selitrichodes neseri*; *Leptocybe invasa*; eucalyptus.

2.1 Introdução

Uma das principais pragas exóticas da cultura do eucalipto no Brasil é *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), conhecida como vespa-da-galha-do-eucalipto. As fêmeas induzem a formação de galhas em plantas de *Eucalyptus*, com preferência por brotações, nervura central, pecíolos e ramos jovens, causando prejuízos tanto em viveiros quanto em campo (Kavitha-Kumari *et al.*, 2010; Wilcken *et al.*, 2015). As fêmeas medem de 1,1 a 1,4 mm, enquanto os machos apresentam de 1,21 a 1,37 mm de comprimento, com coloração marrom-escura e brilho metálico azul-esverdeado (Mendel *et al.*, 2004). No Brasil, o ciclo biológico de *L. invasa* é de aproximadamente 87 dias (Souza, 2016).

A espécie é de origem australiana e encontra-se distribuída em diferentes países da Ásia, Europa, África e América (Nugnes *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016). No Brasil, sua detecção ocorreu em 2007, no nordeste da Bahia (Mendel *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008). O monitoramento em plantios florestais pode ser realizado com armadilhas adesivas amarelas ou pela contagem de galhas nas árvores de eucalipto. Entre as alternativas de manejo têm sido empregados inseticidas em viveiros, nem sempre com controle satisfatório, o uso de materiais genéticos resistentes e o controle biológico clássico, considerado uma das estratégias mais promissoras para essa praga (Souza *et al.*, 2015; Wilcken *et al.*, 2015).

Como *L. invasa* se reproduz predominantemente por partenogênese, com machos raramente observados, sua rápida multiplicação em campo representa um desafio adicional para o manejo. Nesse contexto, compreender a dinâmica de ocorrência da praga e a ação de seus inimigos naturais torna-se essencial para o aprimoramento das estratégias de controle biológico.

Entre os inimigos naturais associados ao manejo de *L. invasa* destaca-se o parasitoide *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), espécie de origem australiana importada da África do Sul para o Brasil em 2015, com posterior estabelecimento em campo. As fêmeas medem de 0,87 a 1,08 mm, enquanto os machos variam de 0,65 a 0,73 mm, ambos com coloração do corpo de marrom-escura a preta (Kelly *et al.*, 2012). O ciclo biológico de *S. neseri* é, em média, de 19,3 dias, com razão sexual de machos para fêmeas de 1:3. Em

laboratório, as fêmeas apresentaram taxa de parasitismo variando de 9,7% a 71,8%. A espécie parasita larvas em últimos ínstaras, pupas e adultos imaturos de *L. invasa*, desenvolvendo-se externamente ao corpo do hospedeiro, no interior das galhas (Dittrich-Schröder *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018).

No Brasil, estudos de longevidade mostraram que o período máximo de sobrevivência de fêmeas de *S. nesei* foi de 65 dias, enquanto o de machos foi de 73 dias, quando ambos foram alimentados com mel e mantidos a 22 °C. Também foi observado que a temperatura exerce forte influência sobre a longevidade da espécie, sendo 34 °C considerada limitante para sua sobrevivência (Puretz, 2017). Esses aspectos biológicos são relevantes para a compreensão do potencial de estabelecimento do parasitoide e de sua permanência em campo após a liberação.

Apesar do potencial de *S. nesei* para o controle biológico de *L. invasa*, ainda são escassos os estudos sobre sua liberação, capacidade de dispersão e adaptação em condições de campo. Informações desse tipo são fundamentais para compreender o estabelecimento do parasitoide após a soltura, sua distribuição nas áreas infestadas e sua ocorrência em associação com diferentes níveis de infestação e fases de desenvolvimento das galhas.

A dispersão é um atributo central para o sucesso de parasitoides em programas de controle biológico, pois determina sua capacidade de localizar hospedeiros, ocupar novas áreas e manter-se distribuídos no ambiente após a liberação. Em parasitoides, a dispersão pode ser influenciada por fatores como disponibilidade de hospedeiros, condições climáticas, estrutura da vegetação e características biológicas da espécie. Assim, estudos em campo são necessários para avaliar como essas variáveis se expressam em condições reais de plantio e como afetam a eficiência do agente de controle biológico.

Considerando o uso de *S. nesei* no controle biológico de *L. invasa*, informações sobre estabelecimento, sobrevivência e dispersão em condições de campo são importantes para compreender o comportamento do parasitoide após a liberação e sua ocorrência em áreas infestadas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a dispersão de *S. nesei* em plantios de *Eucalyptus* infestados por *L. invasa*, bem como registrar sua ocorrência nas áreas avaliadas após a liberação e sua

associação com a infestação observada ao longo das avaliações de campo. Partiu-se da hipótese de que *S. nesei* seria capaz de se estabelecer e se dispersar nas áreas após a liberação, ocorrendo em associação com plantas infestadas por *L. invasa*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Áreas experimentais

O estudo foi conduzido em três áreas experimentais de plantio clonal de eucalipto infestadas por *Leptocybe invasa*, localizadas em diferentes municípios e avaliadas em distintos períodos. A primeira área experimental foi instalada em maio de 2017, no município de Mogi Guaçu, SP (47.08484 W; 22.192062 S). A segunda foi instalada em setembro de 2017, no município de Três Lagoas, MS (51.814621 W; 20.965572 S). A terceira foi instalada em janeiro de 2019, no município de Luís Antônio, SP (47.93399 W; 21.49467 S).

As três áreas foram implantadas com plantas de eucalipto com até um ano de idade, pertencentes ao mesmo material genético, correspondente ao clone de *Eucalyptus grandis*. A adoção do mesmo material genético nas três áreas buscou reduzir a influência de diferenças entre hospedeiros sobre a ocorrência de galhas e sobre o estabelecimento de *S. nesei*, permitindo que a comparação entre as áreas fosse feita com maior uniformidade experimental.

As áreas foram tratadas como unidades experimentais distintas ao longo do estudo, uma vez que diferiram quanto ao local e ao período de instalação. Essa distinção é importante para a interpretação dos resultados, especialmente em estudos de dispersão em campo, nos quais condições locais e temporais podem influenciar a ocorrência do parasitoide e da praga associada.

Nesta subseção, apresentam-se a localização das áreas e as características comuns do plantio. As informações referentes ao número e à distribuição dos pontos amostrais, bem como ao arranjo espacial de avaliação em cada área, são descritas na subseção seguinte, de delineamento experimental, com apoio da Tabela 1 e das Figuras 1, 2 e 3.

2.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi estabelecido de acordo com o espaçamento dos plantios em cada área experimental. Os pontos amostrais corresponderam às árvores selecionadas para coleta, mantendo-se distância constante entre linhas e entre árvores dentro de cada área avaliada. O total de pontos amostrais, a distância entre eles e a área total avaliada em cada área experimental foram determinados para as três áreas estudadas (Tabela 1). O alinhamento georreferenciado das áreas experimentais 1, 2 e 3 foi estabelecido conforme a distribuição dos pontos amostrais em cada local (Figuras 1, 2 e 3).

Tabela 1 - Número de pontos amostrais, distância entre pontos e área total avaliada nas três áreas experimentais de plantios de *Eucalyptus grandis* infestados por *Leptocybe invasa*

Experimento	Total de pontos amostrais	Distância entre pontos (m)	Total eixo X (linhas) (m)	Total eixo Y (árvores) (m)	Área total (ha ²)
1	110	10,0 x 9,3	102,3	110	1,13
2	99	12,5 x 9,0	112,5	100	1,13
3	81	46,7 x 46,7	420,3	420,3	17,67

Figura 1 - Arranjo georreferenciado dos pontos amostrais na área experimental 1, em plantio de *Eucalyptus grandis* infestado por *Leptocybe invasa*.

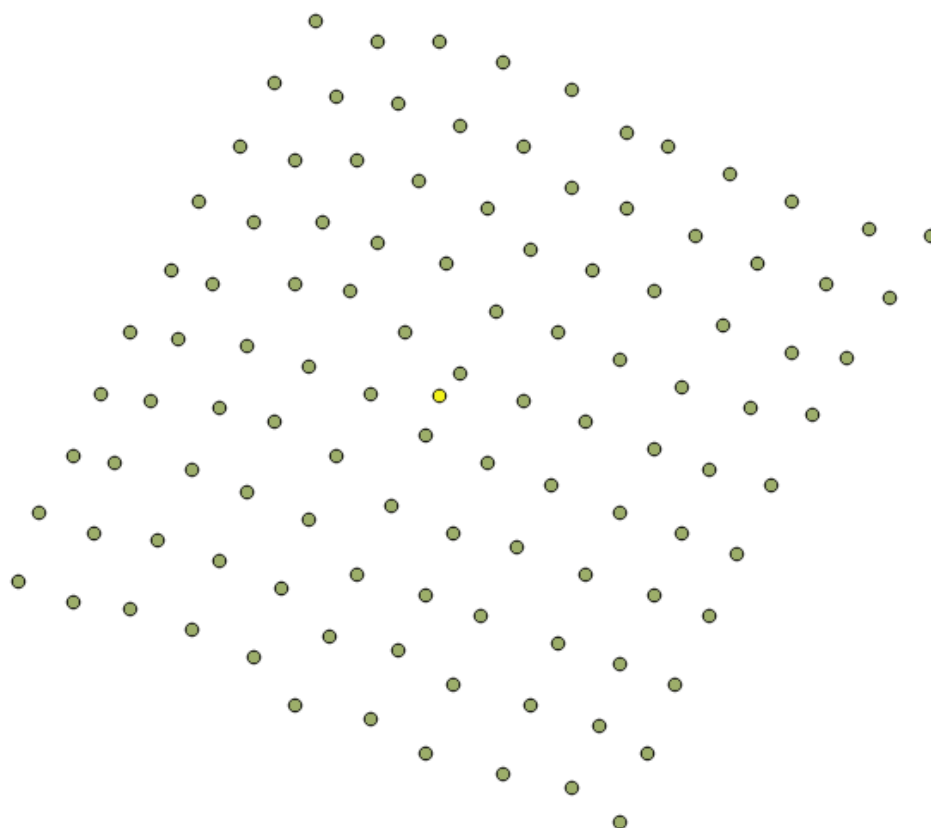


Figura 2 - Arranjo georreferenciado dos pontos amostrais na área experimental 2, em plantio de *Eucalyptus grandis* infestado por *Leptocybe invasa*.

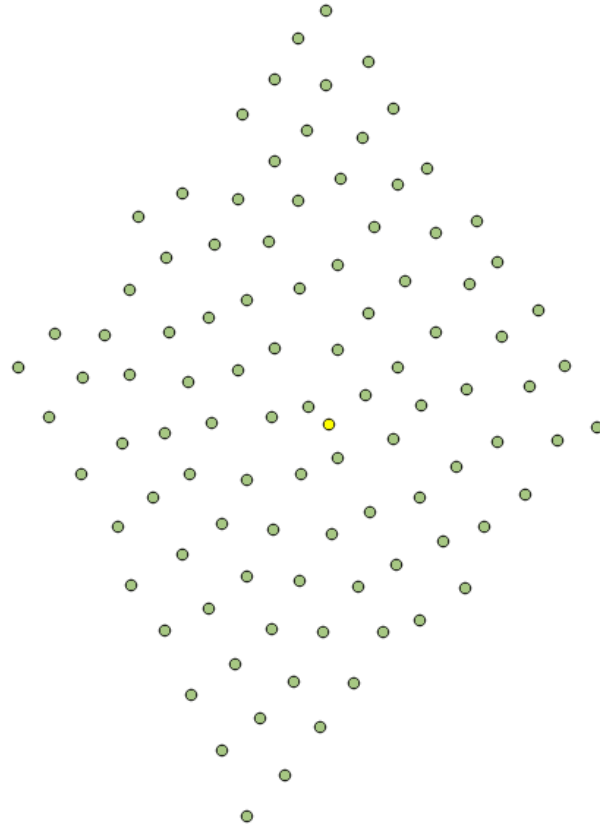
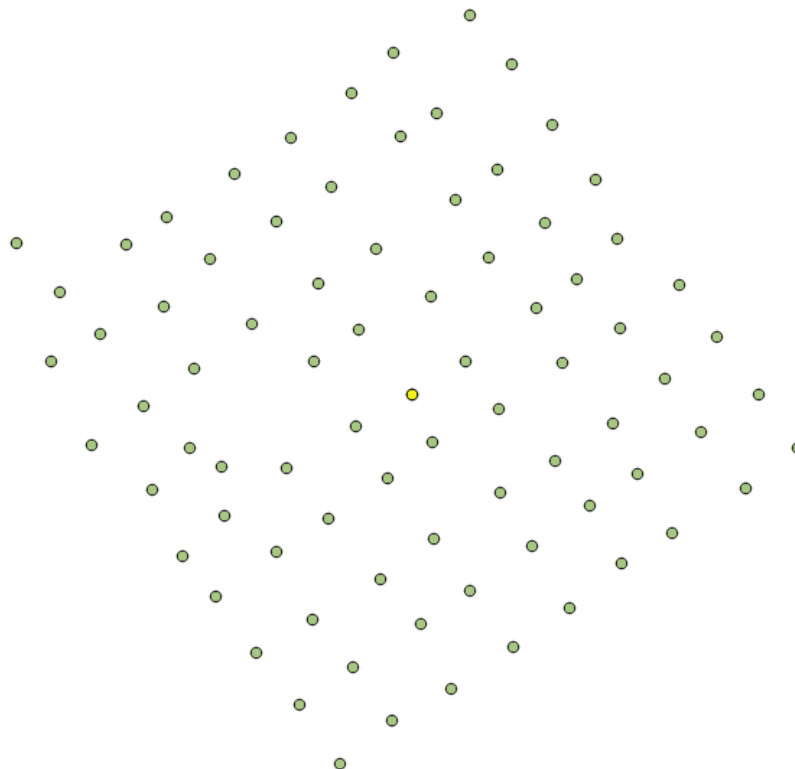


Figura 3 - Arranjo georreferenciado dos pontos amostrais na área experimental 3, em plantio de *Eucalyptus grandis* infestado por *Leptocybe invasa*.



2.2.3 Avaliação das amostras e liberação dos parasitoides

Em cada ponto amostral, foi coletado um ramo de eucalipto com galhas do terço médio da árvore. Dez folhas foram avaliadas por ramo. Os ramos foram acondicionados em embalagens plásticas previamente identificadas e levados ao Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), da FCA/UNESP, Campus de Botucatu, SP, para avaliação.

A primeira coleta de ramos, em todos os experimentos, foi realizada antes da liberação de *S. neneri*, com o objetivo de verificar a presença ou ausência do parasitoide na área. Nos experimentos 1 e 2, as avaliações foram realizadas mensalmente ao longo de oito meses, de maio a dezembro de 2017 e de setembro de 2017 a abril de 2018, respectivamente. No experimento 3, foram realizadas três avaliações, de janeiro a maio de 2019; a primeira e a segunda com intervalo de 30 dias, e as demais com intervalo de três meses. O crescimento das árvores em altura impediu a realização das demais avaliações programadas.

Os parasitoides foram liberados no centro de cada área experimental (Figuras 1, 2 e 3). Para isso, foram utilizados frascos de poliestireno transparente contendo 50 indivíduos, machos e fêmeas, obtidos da criação do LCBPF. Antes da liberação, os insetos foram mantidos em câmara climatizada (B.O.D.), à temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h. Os parasitoides foram alimentados com mel e transportados em caixa térmica até a área de liberação. Foram liberados 1.000, 350 e 1.000 parasitoides nos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Os parâmetros avaliados foram sinais de oviposição de *L. invasa*, número de galhas na nervura central e no pecíolo das folhas, bem como na haste do ramo, com separação das galhas em quatro fases de desenvolvimento. A fase 1 corresponde à cicatriz de oviposição, resultante da inserção dos ovos na planta. Na fase 2, as galhas aumentam de tamanho, inicialmente com coloração verde e posteriormente rosa. Na fase 3, as galhas continuam o desenvolvimento e passam da coloração rosa para vermelha. Na fase 4, observam-se os orifícios de emergência de *L. invasa* (Souza, 2016). O número de adultos de *L. invasa* e do parasitoide *S. nesei* emergidos dessas galhas também foi contabilizado.

2.2.4 Análise estatística

Foram realizadas análises de variância com dois modelos, um ao nível de data de avaliação e outro ao nível de experimento, seguidas da análise de agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de confiança.

O modelo 1 considerado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + A_j + e_{ij}$$

em que Y_{ijk} se refere à observação de contagem de insetos emergidos (*Leptocybe invasa*, *Selitrichodes nesei* e *Quadrastichus mendeli*) na linha i e árvore j ; μ se refere à média geral; L_i é o efeito da linha i ; A_j é o efeito da árvore j ; e e_{ij} refere-se ao erro aleatório.

Para o modelo 2, a seguinte modelagem foi adotada:

$$Y_{ijkl} = \mu + L_i + A_j + D_k + e_{ijkl}$$

em que D_k refere-se ao efeito da data de avaliação, enquanto as demais siglas já foram discriminadas no modelo 1.

Para a quantidade de insetos emergidos (*Leptocybe invasa*, *Selitrichodes nesi* e *Quadrastichus mendeli*), foram realizadas análises de variância utilizando os modelos 1 e 2, seguidas da análise de agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de confiança.

Para uma análise mais detalhada sobre a posição e a fase da galha, foi realizada uma terceira modelagem:

$$Y_{ijklm} = \mu + L_i + A_j + D_k + P_l + F_m + DP_{kl} + PF_{lm} + DF_{km} + DPF_{klm} + e_{ijklm}$$

em que P_l se refere à posição da galha de *L. invasa* na folha; F_m se refere à fase de desenvolvimento da galha; DP_{kl} é o efeito fixo da interação entre data de avaliação e posição da galha; PF_{lm} é o efeito fixo da interação entre posição e fase da galha; DF_{km} é a interação entre data de avaliação e fase da galha; e, por fim, DPF_{klm} é a interação tripla entre os efeitos de data de avaliação, posição da galha e fase de desenvolvimento da galha.

Após a análise de variância, foi realizado o teste de Scott-Knott.

Para a representação espacial dos dados, foi utilizada a função `expand.grid` do software R para gerar a grade de combinações entre as posições geográficas consideradas. Em seguida, utilizou-se a função `levelplot`, do pacote `lattice`, para gerar os mapas de distribuição de cada inseto, em cada experimento e data de medição. As análises estatísticas foram realizadas no programa R, versão 3.5.1 (R Core Team, 2018).

2.3 Resultados e Discussão

A média de galhas de *L. invasa* no experimento 1 variou de acordo com o período de avaliação, a posição e a fase de desenvolvimento da galha (Tabela 2).

Foram observadas diferenças estatísticas entre as médias, com formação de 11 grupos. As maiores médias ocorreram na nervura central e no pecíolo das folhas, principalmente nas fases 2 e 3. Nos ramos, foram registradas as menores médias, incluindo valores nulos, sobretudo nas fases 3 e 4, sem diferença estatística entre si.

Tabela 2 – Número médio de galhas de *Leptocybe invasa* nas diferentes fases de desenvolvimento, na nervura central (NC), no pecíolo e no ramo, ao longo do tempo, no experimento 1, em Mogi Guaçu, SP, de maio a dezembro de 2017.

Experimento	Mês	Posição	Fase	Média de galhas SK(5%)	
1	Novembro	NC	2	62,02	a
	Dezembro	NC	2	28,44	b
	Outubro	NC	3	28,39	b
	Outubro	NC	2	24,77	c
	Novembro	NC	3	25,96	c
	Novembro	Pecíolo	2	23,46	c
	Setembro	NC	2	18,13	d
	Dezembro	NC	3	20,48	d
	Setembro	NC	3	19,31	d
	Maio	Pecíolo	2	17,84	d
	Dezembro	NC	4	15,02	e
	Dezembro	Pecíolo	2	16,42	e
	Junho	Pecíolo	2	15,11	e
	Julho	Pecíolo	2	14,22	e
	Setembro	Pecíolo	2	13,66	e
	Outubro	Pecíolo	2	13,65	e
	Junho	NC	2	11,46	f
	Julho	NC	2	11,29	f
	Maio	NC	2	11,08	f
	Agosto	NC	2	10,42	f
	Agosto	Pecíolo	2	11,16	f
	Setembro	NC	1	9,35	g
	Agosto	NC	3	9,30	g
	Novembro	NC	4	9,90	g
	Dezembro	Pecíolo	4	7,29	g
	Novembro	Ramo	2	8,02	g
	Maio	NC	3	6,08	h
	Dezembro	Pecíolo	3	6,69	h
	Dezembro	Ramo	2	6,90	h
	Novembro	NC	1	4,33	i
	Julho	NC	3	4,63	i
	Junho	NC	3	4,61	i
	Maio	Pecíolo	3	4,68	i
	Junho	Pecíolo	3	5,73	i
	Agosto	Ramo	2	4,59	i
	Julho	Ramo	2	5,00	i
	Junho	Ramo	2	5,55	i
	Maio	Ramo	2	4,87	i
	Agosto	NC	1	3,71	j

Julho	NC	1	3,34	j
Junho	NC	1	2,73	j
Maio	NC	1	1,90	j
Novembro	Pecíolo	4	2,47	j
Outubro	Ramo	2	3,95	j
Setembro	Ramo	2	3,16	j
Outubro	NC	1	1,60	k
Dezembro	NC	1	1,20	k
Maio	NC	4	0,17	k
Outubro	NC	4	0,10	k
Junho	NC	4	0,08	k
Agosto	NC	4	0,07	k
Julho	NC	4	0,03	k
Setembro	NC	4	0,00	k
Junho	Pecíolo	1	0,60	k
Julho	Pecíolo	1	0,54	k
Agosto	Pecíolo	1	0,53	k
Outubro	Pecíolo	1	0,27	k
Setembro	Pecíolo	1	0,17	k
Novembro	Pecíolo	1	0,11	k
Dezembro	Pecíolo	1	0,00	k
Maio	Pecíolo	1	0,00	k
Novembro	Pecíolo	3	1,43	k
Julho	Pecíolo	3	1,31	k
Outubro	Pecíolo	3	0,95	k
Agosto	Pecíolo	3	0,45	k
Setembro	Pecíolo	3	0,30	k
Junho	Pecíolo	4	0,49	k
Maio	Pecíolo	4	0,10	k
Agosto	Pecíolo	4	0,05	k
Julho	Pecíolo	4	0,05	k
Outubro	Pecíolo	4	0,01	k
Setembro	Pecíolo	4	0,00	k
Agosto	Ramo	1	0,00	k
Julho	Ramo	1	0,00	k
Junho	Ramo	1	0,00	k
Maio	Ramo	1	0,00	k
Novembro	Ramo	1	0,00	k
Outubro	Ramo	1	0,00	k
Setembro	Ramo	1	0,00	k
Dezembro	Ramo	1	0,00	k
Agosto	Ramo	3	0,14	k
Dezembro	Ramo	3	0,15	k
Julho	Ramo	3	0,05	k
Junho	Ramo	3	0,25	k
Maio	Ramo	3	0,65	k
Novembro	Ramo	3	0,27	k
Outubro	Ramo	3	0,25	k
Setembro	Ramo	3	0,06	k
Agosto	Ramo	4	0,05	k
Dezembro	Ramo	4	1,17	k

Julho	Ramo	4	0,01	k
Junho	Ramo	4	0,04	k
Maio	Ramo	4	0,00	k
Novembro	Ramo	4	0,65	k
Outubro	Ramo	4	0,00	k
Setembro	Ramo	4	0,00	k

Obs.: Médias com letras iguais não diferiram pelo teste de Scott Knott à 95% de confiança

Observou-se maior ocorrência de galhas na nervura central das folhas, seguida pelo pecíolo e pelo ramo, com variação ao longo das avaliações e tendência de redução após a liberação de *S. nesei* (Gráficos 1, 2, 3 e 4).

Figura 1 - Número médio de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 1 na nervura central, pecíolo e ramo de árvores de eucalipto, ao longo do tempo no experimento 1. Mogi-Guaçu, SP. Maio a dezembro de 2017.

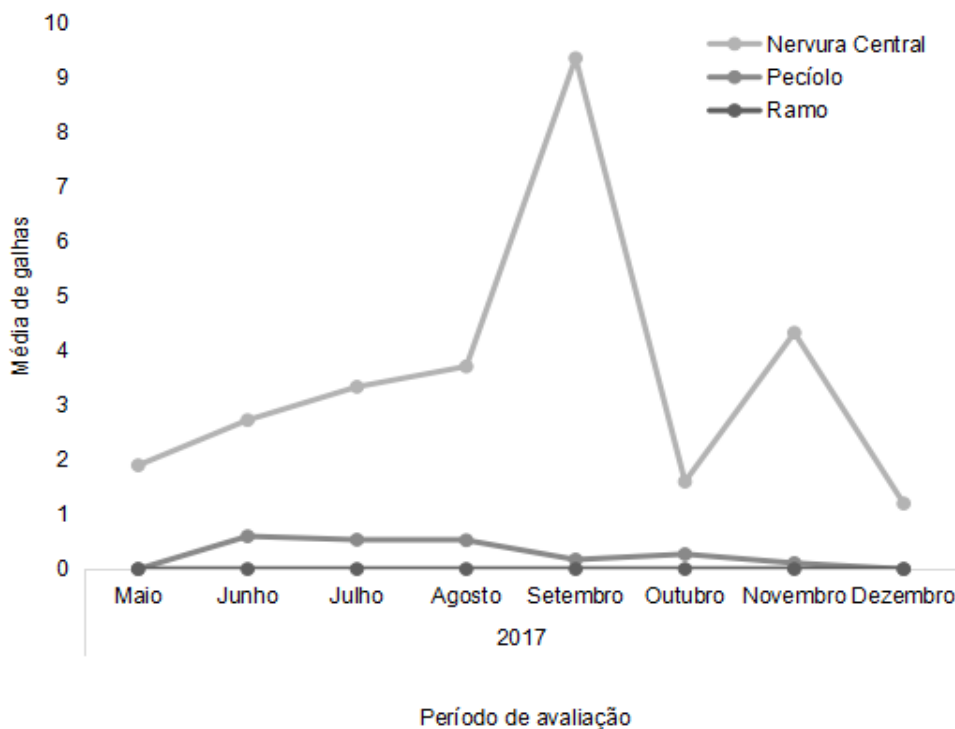


Figura 2 – Número médio de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 2 na nervura central, pecíolo e ramo de árvores de eucalipto, ao longo do tempo no experimento 1. Mogi-Guaçu, SP. Maio a dezembro de 2017.

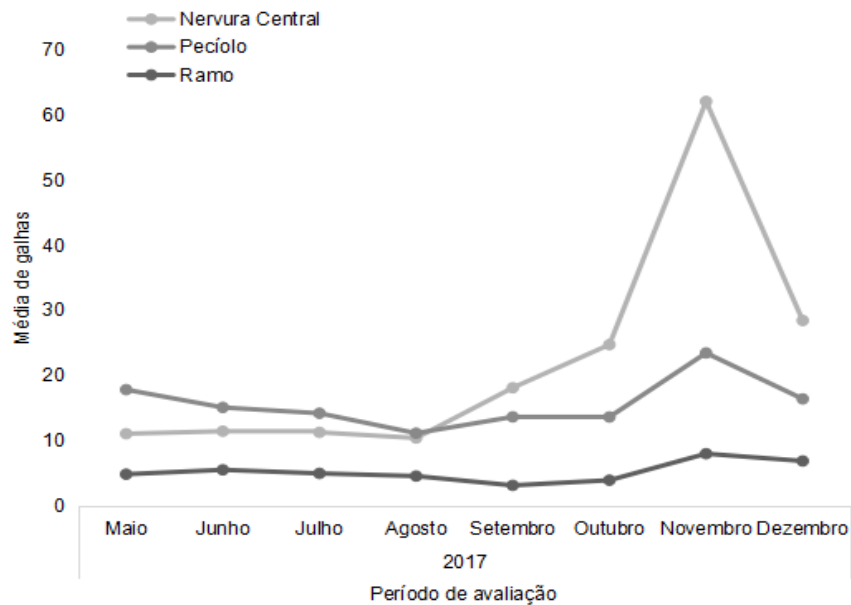


Figura 3 – Número médio de de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 3 na nervura central, pecíolo e ramo de árvores de eucalipto, nos meses de avaliação no experimento 1. Mogi-Guaçu, SP. Maio a dezembro de 2017.

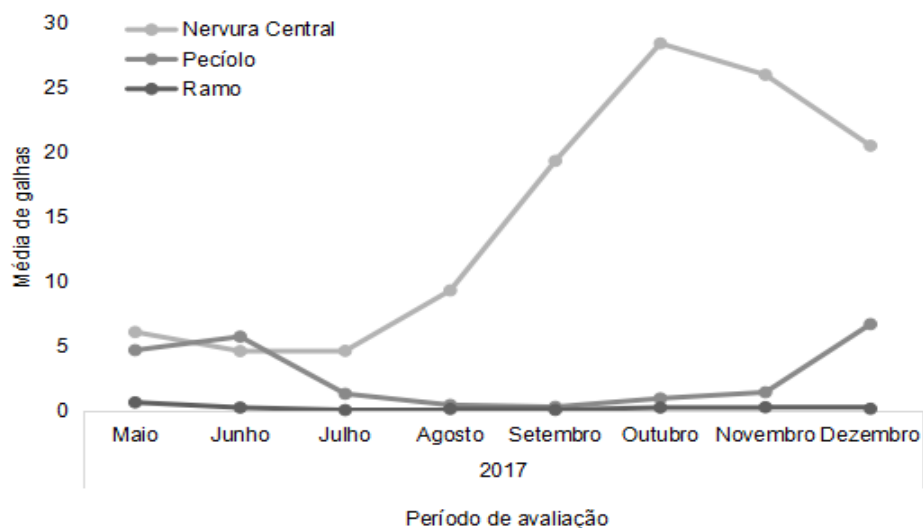
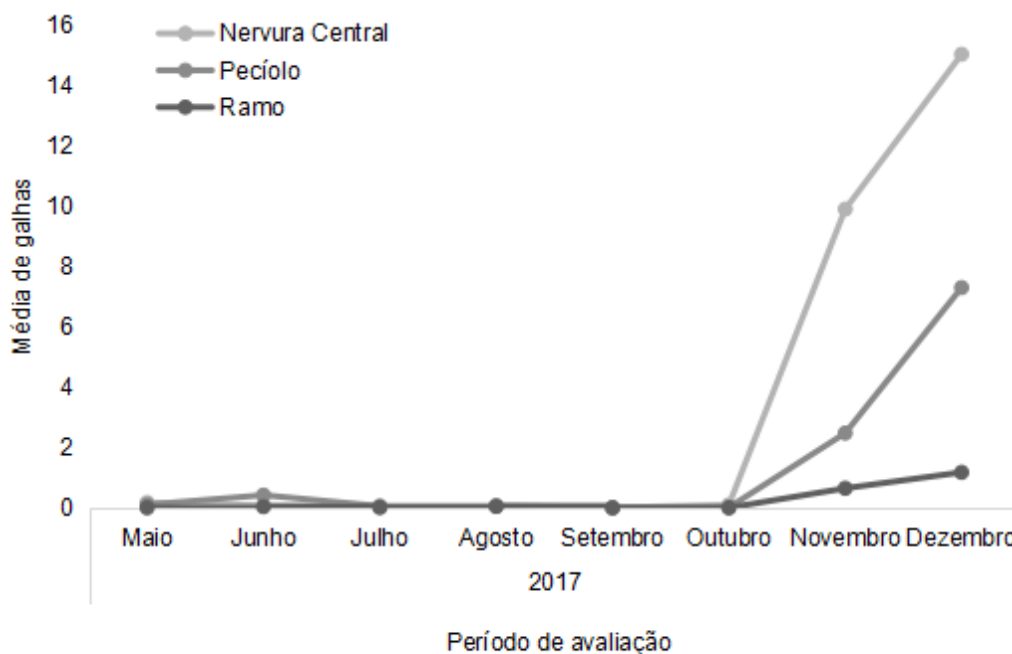


Figura 4 – Número médio de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 4 na nervura central, pecíolo e ramo de árvores de eucalipto, ao longo do tempo no experimento 1. Mogi-Guaçu, SP. Maio a dezembro de 2017.



De modo geral, a tendência de redução foi mais evidente na nervura central e no pecíolo das folhas, onde foram registradas as maiores ocorrências ao longo do período avaliado. As galhas em fase 4, entretanto, não apresentaram o mesmo comportamento, o que pode estar relacionado à continuidade do desenvolvimento de galhas já presentes na área antes da liberação.

Considerando que o período de avaliação não abrangeu um ciclo anual completo, a interpretação desses resultados deve ser feita com cautela. Assim, os dados indicam um padrão temporal observado no experimento, mas não permitem atribuir, de forma conclusiva, a redução das galhas exclusivamente à ação de *S. neseri*.

A emergência média de adultos de *Leptocybe invasa* e *Selitrichodes neseri* no experimento 1 variou ao longo do período avaliado (Tabelas 3 e 4). Para *L. invasa*, observou-se maior emergência média em novembro, com redução em dezembro. Para *S. neseri*, a primeira emergência foi registrada em agosto, com aumento progressivo até novembro e redução em dezembro (Figura 5).

Tabela 3 – Emergência média de adultos de *Leptocybe invasa* ao longo das avaliações do experimento 1, em Mogi Guaçu, SP.

Meses de avaliação	Média SK(5%)	
Maio/2017	0,82	c
Junho/2017	0,15	c
Julho/2017	0,00	c
Agosto/2017	0,47	c
Setembro/2017	0,03	c
Outubro/2017	0,85	c
Novembro/2017	28,12	a
Dezembro/2017	17,08	b

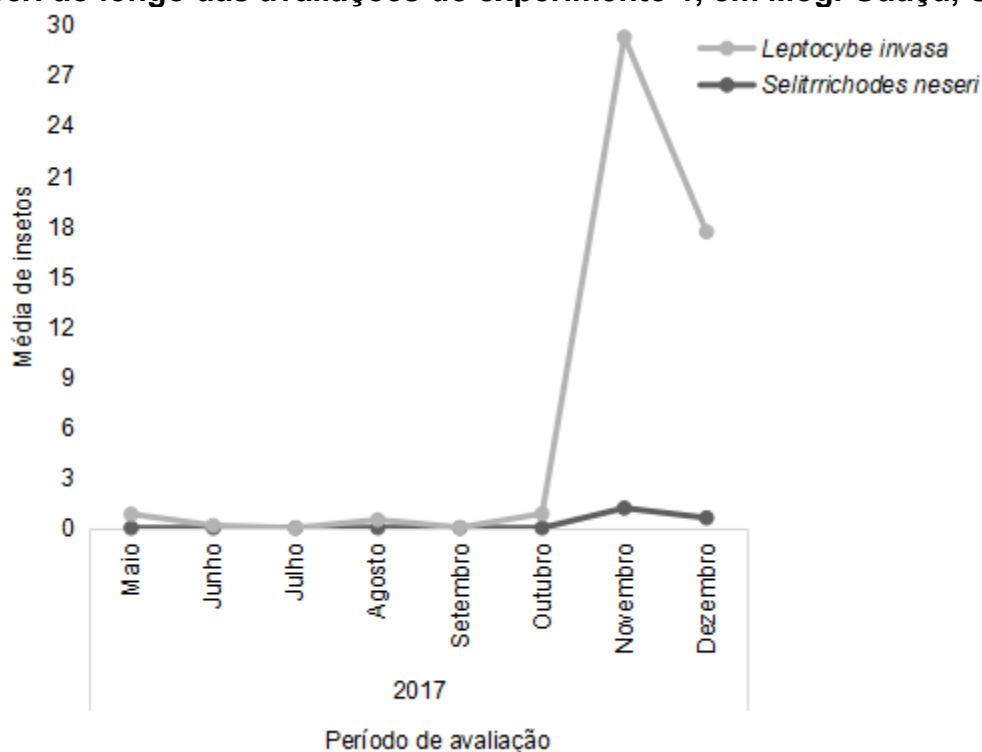
Obs.: Médias com letras iguais não diferiram pelo teste de Scott Knott à 95% de confiança

Tabela 4 - Emergência média de adultos de *Selitrichodes neseri* ao longo das avaliações do experimento 1, em Mogi Guaçu, SP.

Período de avaliação	Média SK(5%)	
Maio/2017	0,00	c
Junho/2017	0,00	c
Julho/2017	0,00	c
Agosto/2017	0,01	c
Setembro/2017	0,00	c
Outubro/2017	0,00	c
Novembro/2017	1,18	a
Dezembro/2017	0,60	b

Obs.: Médias com letras iguais não diferiram pelo teste de Scott Knott à 95% de confiança

Figura 5 – Emergência média de adultos de *Leptocybe invasa* e *Selitrichodes nesi* ao longo das avaliações do experimento 1, em Mogi Guaçu, SP.

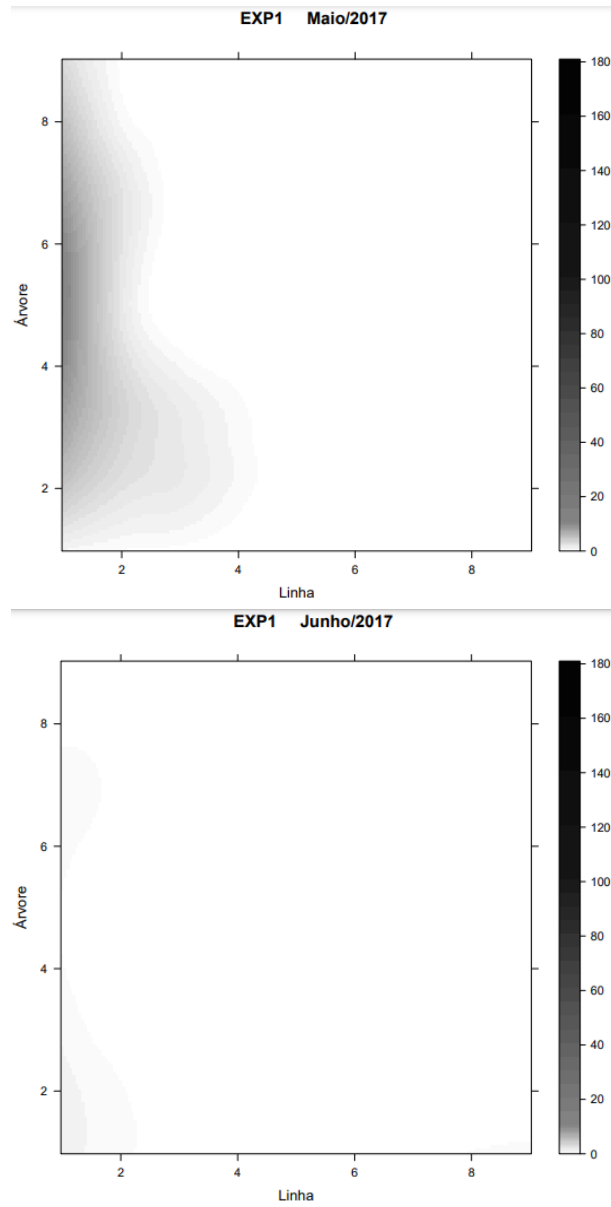


A ocorrência inicial de *S. nesi* em agosto indica que o parasitoide foi capaz de se estabelecer na área após a liberação realizada em maio. O aumento do número de adultos emergidos até novembro, seguido de redução em dezembro, sugere um padrão temporal de ocorrência do parasitoide no experimento. Entretanto, considerando o período de avaliação, esse comportamento deve ser interpretado com cautela, sem atribuição conclusiva de efeito isolado sobre a população de *L. invasa*.

A ocorrência inicial de *S. nesi* em agosto indica que o parasitoide foi capaz de se estabelecer na área após a liberação realizada em maio. O aumento do número de adultos emergidos até novembro, seguido de redução em dezembro, sugere um padrão temporal de ocorrência do parasitoide no experimento. Entretanto, considerando o período de avaliação, esse comportamento deve ser interpretado com cautela, sem atribuição conclusiva de efeito isolado sobre a população de *L. invasa*.

Quanto à dispersão de *L. invasa* e *S. nesei* na área no experimento 1 (Gráfico 6 e Figura 7), os adultos de *L. invasa* estiveram presentes desde o início das avaliações e apresentaram maior dispersão nos meses de novembro e dezembro. Para *S. nesei*, a dispersão foi observada a partir de novembro, seis meses após a liberação na área, inicialmente concentrada em torno do ponto de liberação e, posteriormente, distribuída por outras partes da área, embora em baixa concentração. O ponto mais distante em que o parasitoide foi registrado ficou a aproximadamente 83 metros do local de liberação.

Gráfico 6 - Dispersão de *Leptocybe invasa* ao longo dos meses de avaliação no experimento 1.



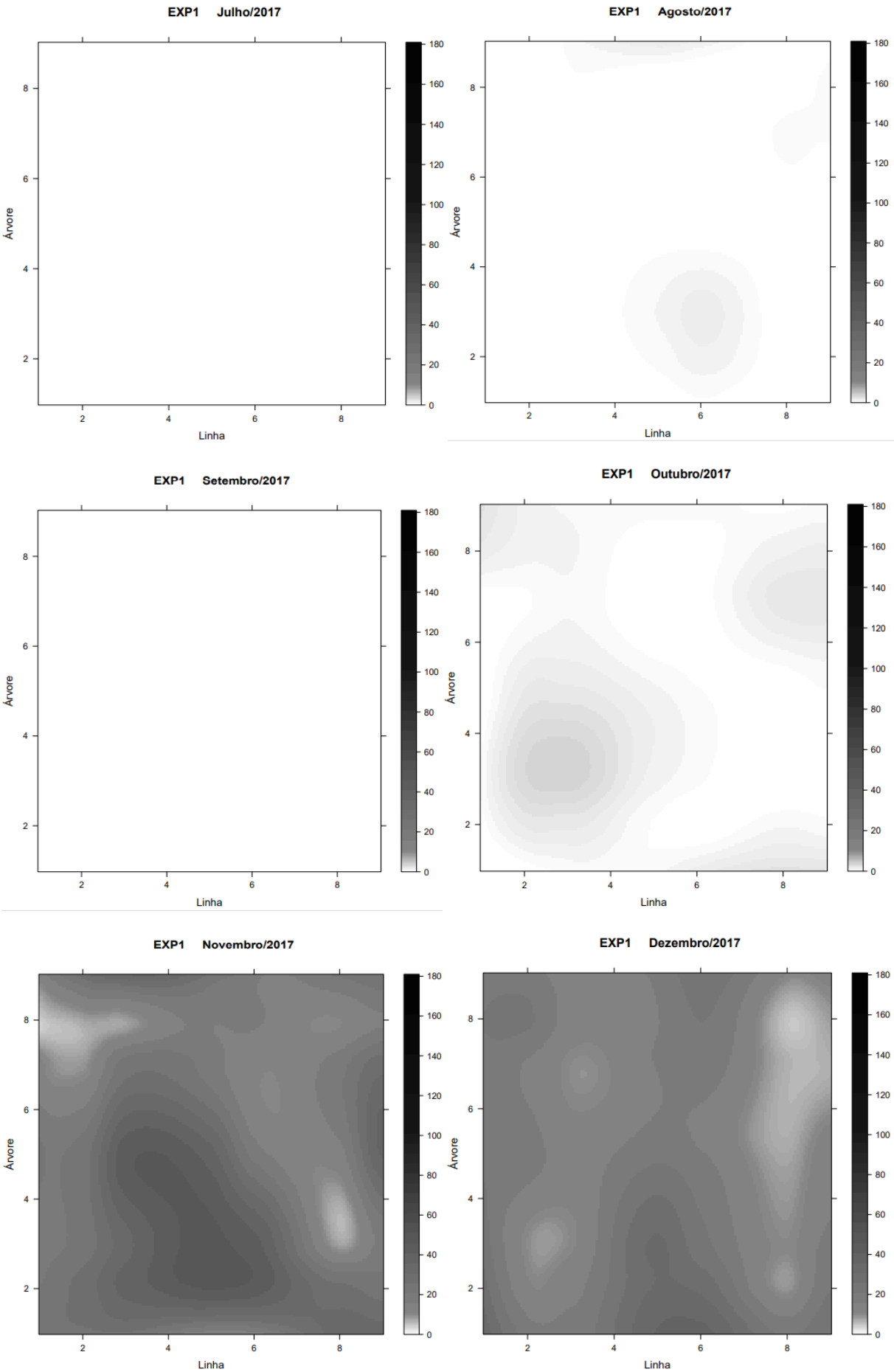
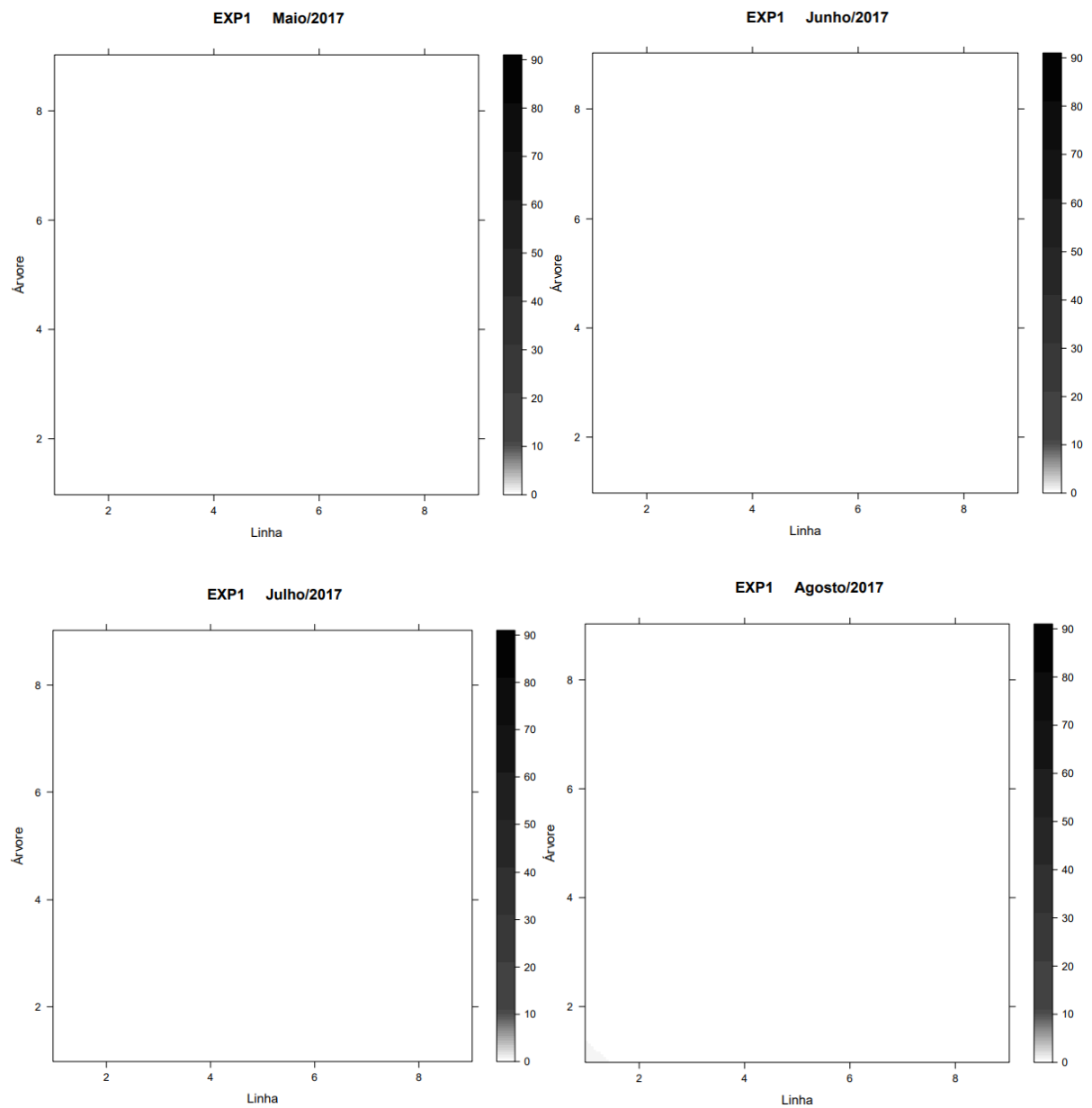
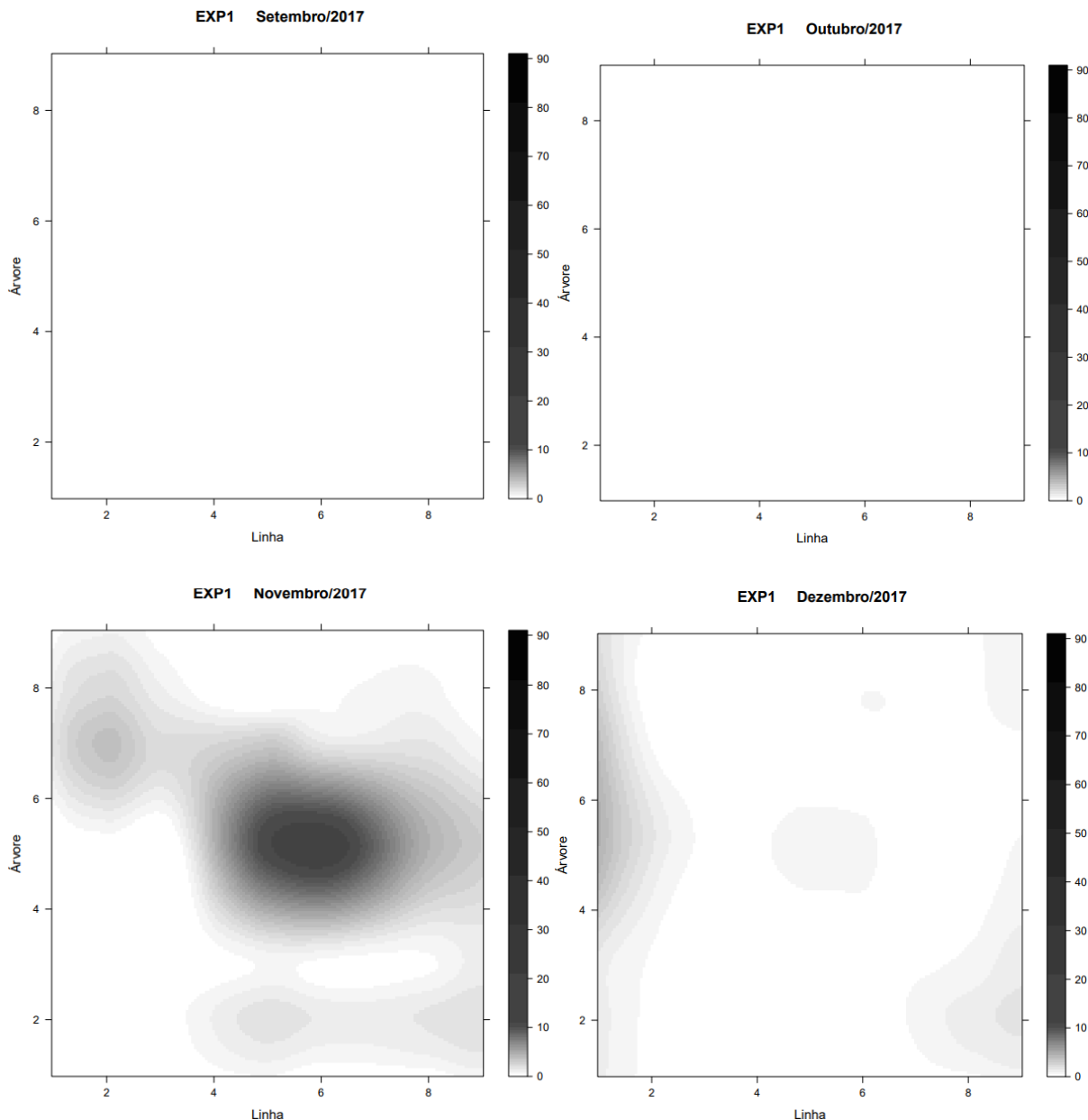


Figura 7 - Mapas de dispersão de *Selitrichodes neseri* ao longo dos meses de avaliação no experimento 1.





No experimento 2, também foram comparados o período de avaliação, a posição e a fase das galhas de *L. invasa*. Os resultados diferiram estatisticamente entre si, distribuindo-se em 12 grupos. De modo geral, observou-se tendência semelhante à do experimento 1, com maiores médias de galhas na nervura central e no pecíolo das folhas, especialmente nas fases 2, 3 e 4 (Tabela 5). As menores médias, incluindo valores nulos, foram registradas nos ramos. Além disso, verificou-se maior desenvolvimento de galhas na nervura central, seguido do pecíolo e do ramo.

Tabela 5 - Número médio de galhas de *Leptocybe invasa*, nas diferentes fases, na nervura central, pecíolo e ramo, ao longo do tempo, no experimento 2. Três Lagoas, MS. Setembro de 2017 a abril de 2018.

Mês	Posição	Fase	Média de galhas SK(5%)	
Setembro	NC	2	59,13	a
Outubro	NC	2	47,26	b
Novembro	NC	2	34,77	c
Dezembro	NC	2	29,56	d
Março	NC	2	31,13	d
Abril	NC	2	28,30	d
Março	NC	3	28,46	d
Abril	NC	4	30,36	d
Setembro	Pecíolo	2	26,12	e
Novembro	NC	3	25,82	e
Janeiro	NC	3	27,36	e
Fevereiro	NC	3	27,35	e
Março	NC	4	27,13	e
Setembro	NC	1	23,41	f
Janeiro	NC	2	25,23	f
Fevereiro	NC	2	23,95	f
Dezembro	Pecíolo	2	23,88	f
Abril	NC	3	24,31	f
Outubro	Pecíolo	2	21,52	g
Janeiro	Pecíolo	2	20,14	g
Abril	Pecíolo	2	21,04	g
Outubro	NC	3	20,25	g
Dezembro	NC	3	22,23	g
Fevereiro	NC	4	19,02	g
Abril	Pecíolo	4	18,04	g
Novembro	Pecíolo	2	16,84	h
Fevereiro	Pecíolo	2	15,86	h
Março	Pecíolo	2	15,57	h
Abril	Pecíolo	3	14,50	h
Janeiro	NC	4	13,58	h
Março	Pecíolo	4	14,31	h
Março	Pecíolo	3	10,49	i
Fevereiro	Pecíolo	4	11,15	i
Março	Ramo	2	6,75	j
Abril	Ramo	2	7,59	j
Setembro	NC	3	5,96	j
Fevereiro	Pecíolo	3	6,80	j
Janeiro	Pecíolo	4	7,59	j
Janeiro	Ramo	2	4,02	k
Fevereiro	Ramo	2	4,89	k
Novembro	NC	4	4,10	k
Dezembro	NC	4	4,03	k
Outubro	NC	1	1,88	l
Novembro	NC	1	0,08	l
Dezembro	NC	1	1,06	l
Janeiro	NC	1	1,38	l
Fevereiro	NC	1	1,08	l

Março	NC	1	1,72	
Abril	NC	1	0,97	
Setembro	Pecíolo	1	1,67	
Outubro	Pecíolo	1	0,07	
Novembro	Pecíolo	1	0,00	
Dezembro	Pecíolo	1	0,06	
Janeiro	Pecíolo	1	0,02	
Fevereiro	Pecíolo	1	0,03	
Março	Pecíolo	1	0,13	
Abril	Pecíolo	1	0,20	
Setembro	Ramo	1	0,00	
Outubro	Ramo	1	0,00	
Fevereiro	Ramo	1	0,00	
Novembro	Ramo	1	0,00	
Dezembro	Ramo	1	0,00	
Janeiro	Ramo	1	0,00	
Março	Ramo	1	0,00	
Abril	Ramo	1	0,00	
Setembro	Ramo	2	2,50	
Outubro	Ramo	2	2,63	
Novembro	Ramo	2	1,01	
Dezembro	Ramo	2	1,90	
Setembro	Pecíolo	3	0,07	
Outubro	Pecíolo	3	0,09	
Novembro	Pecíolo	3	0,06	
Dezembro	Pecíolo	3	1,51	
Janeiro	Pecíolo	3	0,00	
Setembro	Ramo	3	0,00	
Outubro	Ramo	3	0,09	
Novembro	Ramo	3	0,00	
Dezembro	Ramo	3	0,00	
Janeiro	Ramo	3	0,03	
Fevereiro	Ramo	3	1,59	
Abril	Ramo	3	0,98	
Março	Ramo	3	3,42	
Setembro	NC	4	0,14	
Outubro	NC	4	1,17	
Setembro	Pecíolo	4	0,10	
Outubro	Pecíolo	4	0,79	
Novembro	Pecíolo	4	2,37	
Dezembro	Pecíolo	4	2,32	
Setembro	Ramo	4	0,05	
Outubro	Ramo	4	0,04	
Novembro	Ramo	4	0,03	
Dezembro	Ramo	4	0,02	
Janeiro	Ramo	4	0,45	
Fevereiro	Ramo	4	2,10	
Março	Ramo	4	2,58	
Abril	Ramo	4	3,19	

Nos Gráficos 8, 9, 10 e 11, observa-se que as galhas não apresentaram redução tão acentuada quanto a observada no experimento 1, com exceção das galhas na fase 1, que diminuíram após a liberação dos parasitoides, a partir de setembro. As galhas na fase 4 apresentaram aumento ao longo das avaliações, o que pode estar relacionado à evolução de galhas já existentes, das quais também podem emergir parasitoides. A informação sobre a quantidade de parasitoides liberados no experimento 2 pode ser mantida apenas se for considerada relevante para a comparação metodológica entre as áreas, pois houve questionamento específico do revisor sobre sua necessidade nesse ponto do texto.

Gráfico 8 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 1 na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 2.

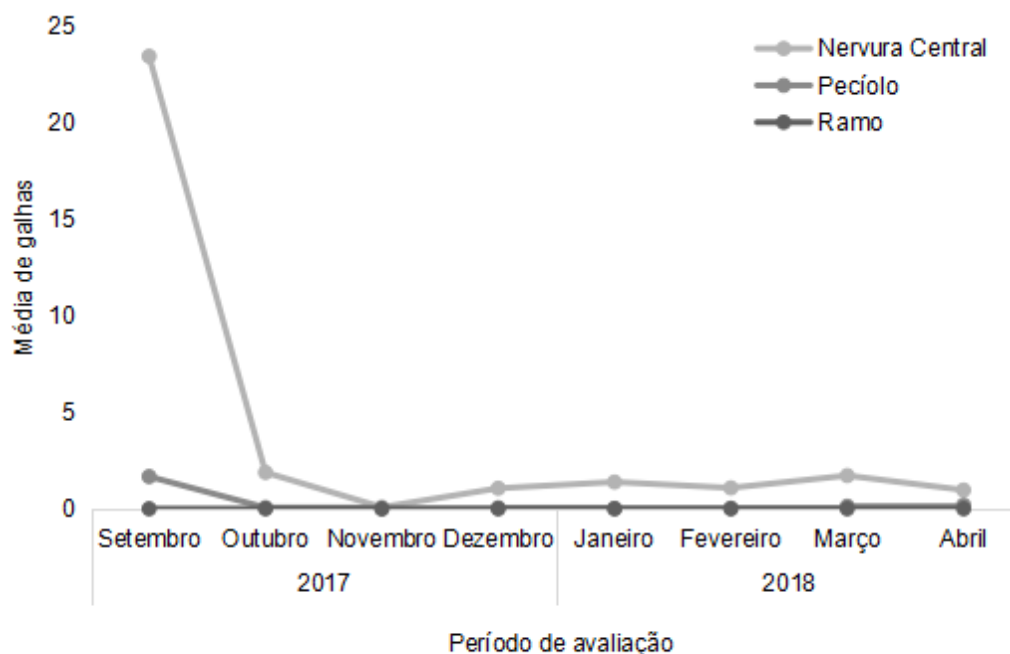


Gráfico 9 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 2 na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 2.

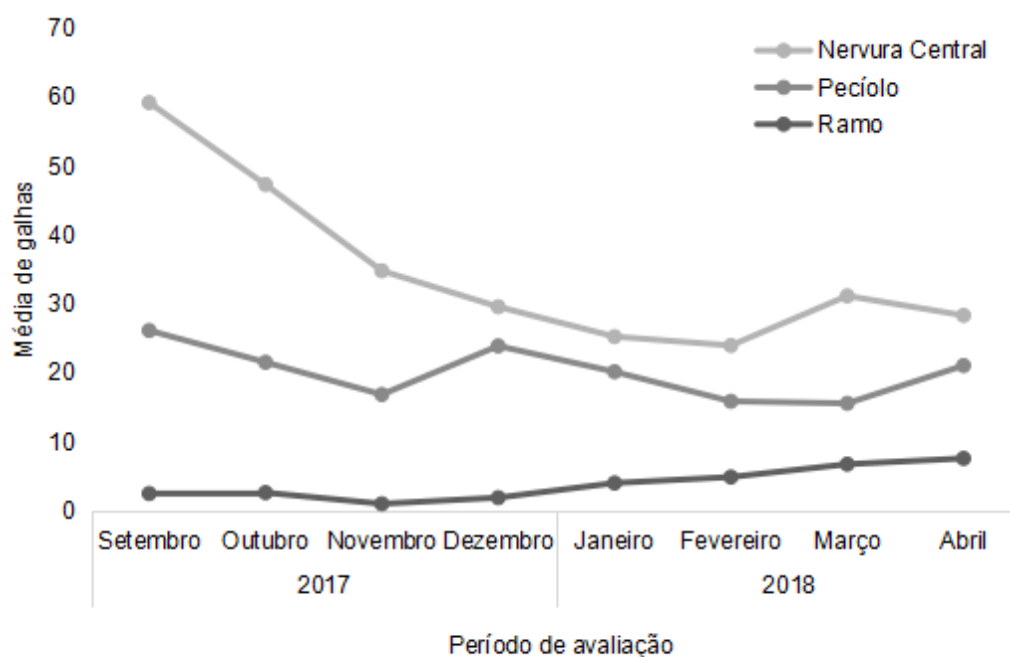


Gráfico 10 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 3 na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 2.

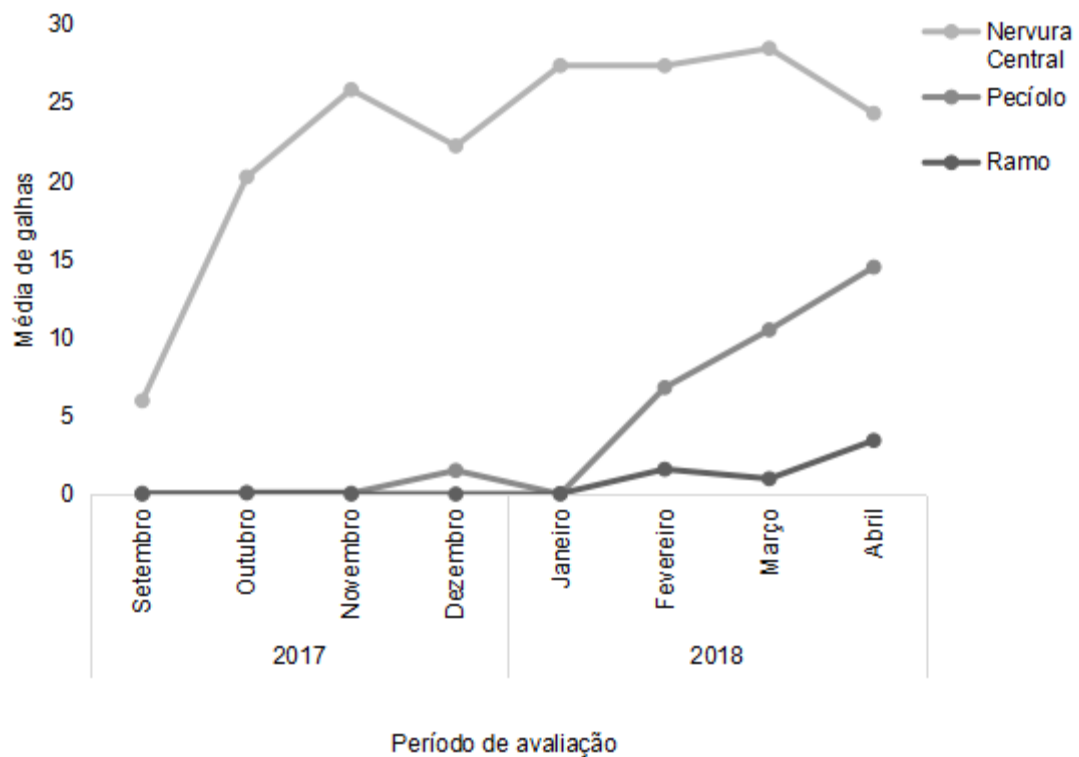
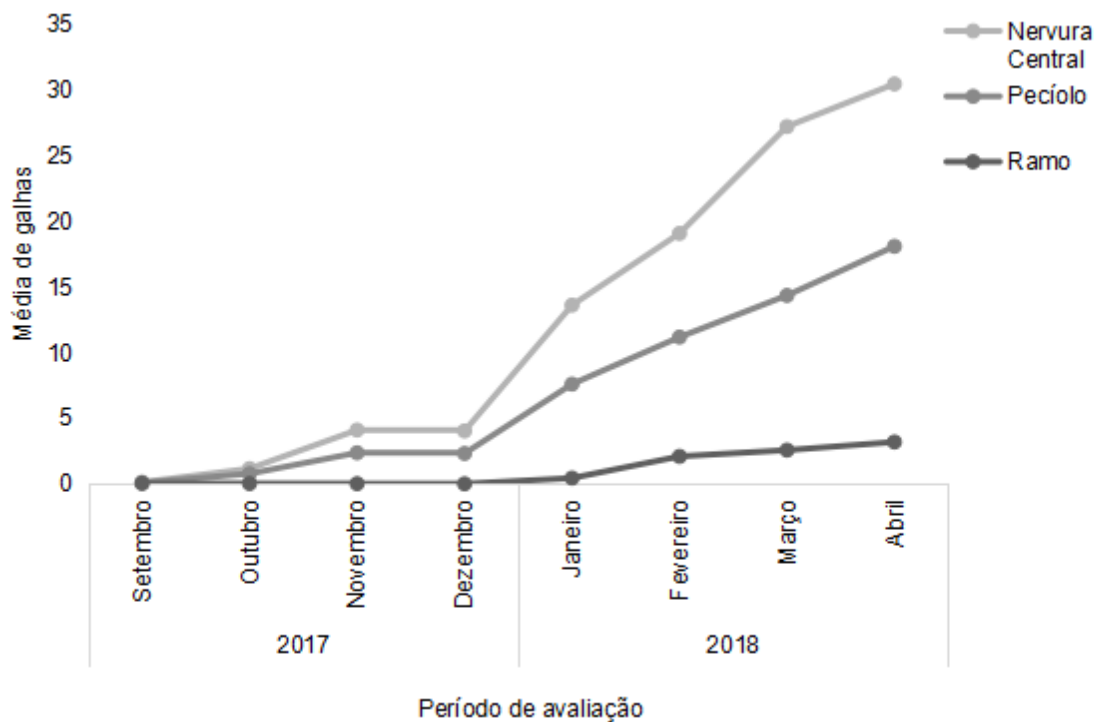


Gráfico 11 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 4 na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 2.



Os adultos de *L. invasa* e *S. nesei* emergidos das galhas no experimento 2 também diferiram estatisticamente entre si (Tabelas 6 e 7). O parasitoide foi registrado na área em outubro, um mês após sua liberação. Observou-se maior emergência de *S. nesei* nos meses de dezembro e fevereiro, enquanto *L. invasa* permaneceu presente ao longo do período avaliado. Esse padrão sugere o estabelecimento do parasitoide na área e uma possível associação com a redução da emergência de *L. invasa* em parte das avaliações, devendo essa interpretação ser apresentada com cautela (Gráfico 12).

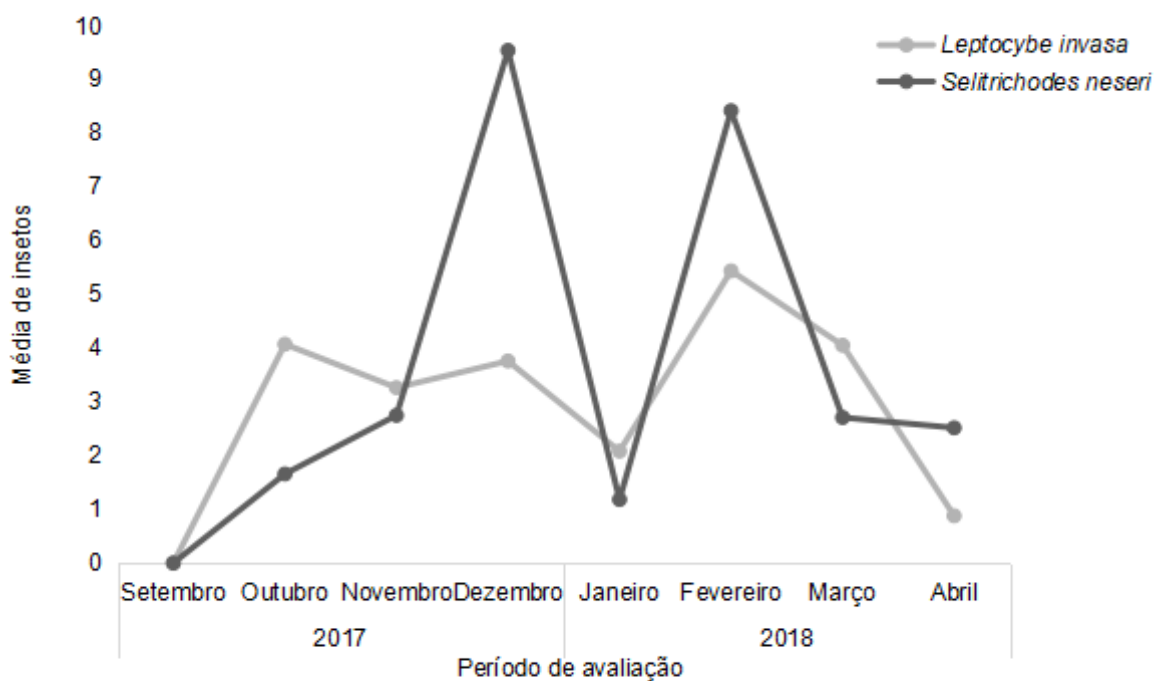
Tabela 6 - Médias de adultos de *Leptocybe invasa* emergidos nos meses de avaliação, agrupadas pelo teste de Scott Knott à 95% de confiança, para o experimento 2.

Meses de avaliação		Média SK(5%)	
2017	Setembro	0,0000000	b
	Outubro	4,0707071	a
	Novembro	3,2626263	a
	Dezembro	3,7575758	a
2018	Janeiro	2,0808081	b
	Fevereiro	5,4343434	a
	Março	4,05050510	a
	Abril	0,87878790	b

Tabela 7 - Médias de adultos de *Selitrichodes nesei* emergidos nos meses de avaliação, agrupadas pelo teste de Scott Knott à 95% de confiança, para o experimento 2.

Meses de avaliação		Média SK(5%)	
2017	Setembro	0,0000000	b
	Outubro	1,6565660	b
	Novembro	2,7474750	b
	Dezembro	9,535354	a
2018	Janeiro	1,1818180	b
	Fevereiro	8,4141410	a
	Março	2,70707100	b
	Abril	2,51515200	b

Gráfico 12 - Flutuação de *Leptocybe invasa* e *Selitrichodes nesei* nos meses de avaliação no experimento 2.

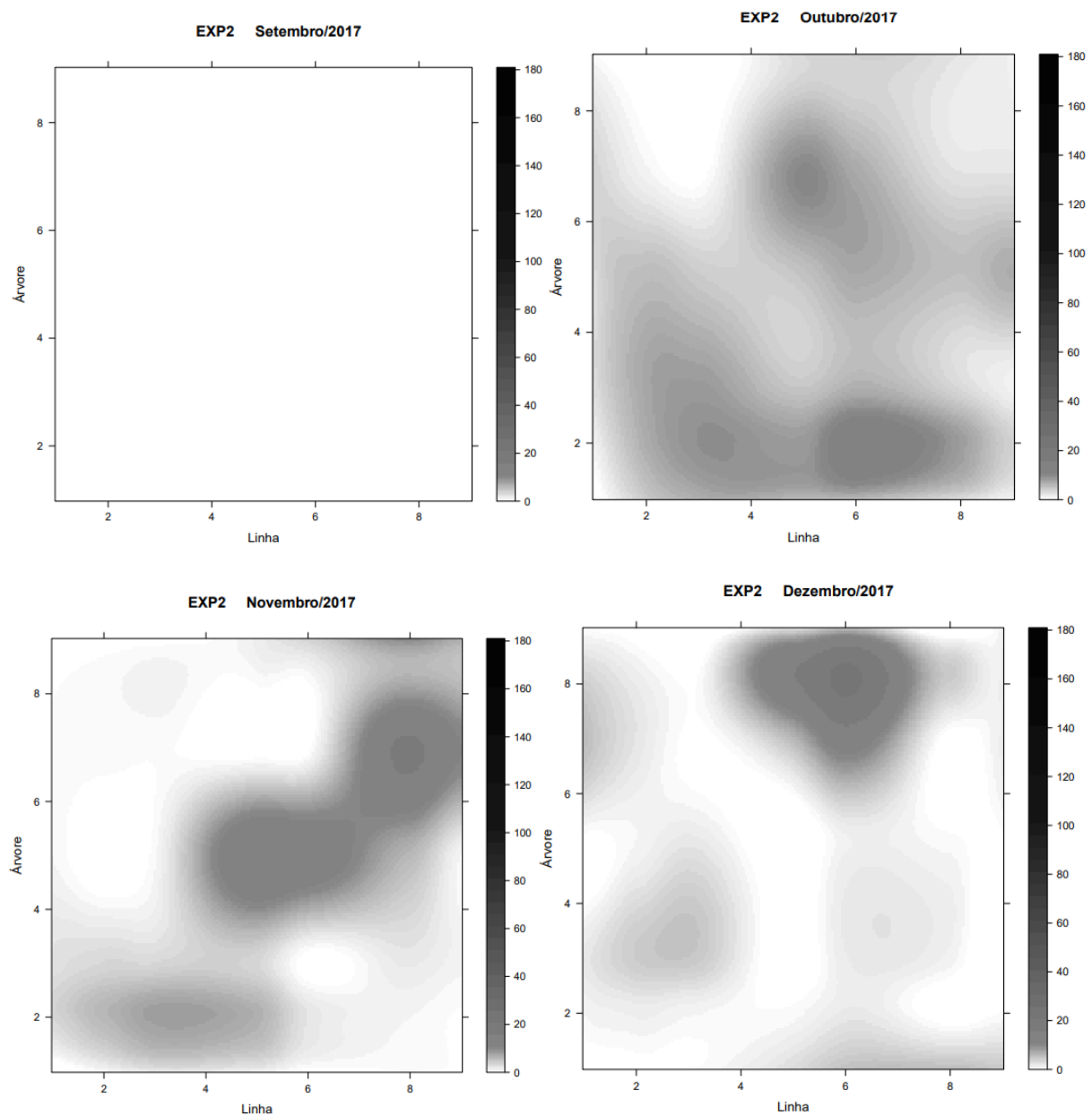


Nos Gráficos 13 e 14, observa-se a dispersão de *L. invasa* e *S. nesei* na área no experimento 2. No primeiro mês de avaliação, em setembro, antes da liberação do parasitoide, não foram encontrados adultos de *L. invasa* na área, embora já houvesse galhas, conforme observado nos Gráficos 8, 9, 10 e 11. *S. nesei* dispersou-se até os pontos mais extremos da área no primeiro mês após sua liberação, alcançando aproximadamente 83 metros a partir do ponto de soltura, ainda em baixa concentração. Nos meses seguintes, o parasitoide aumentou sua concentração e sua distribuição na área, superando a de *L. invasa*.

No Brasil, o parasitoide *Palmistichus elaeisis* foi capaz de se dispersar e parasitar hospedeiros a até 80 metros do ponto de liberação em plantio de eucalipto, resultado semelhante ao observado para *S. nesei*. Em estudo de Zaché (2012), a dispersão de *Trichospilus diatraeae* em plantio de eucalipto para controle de *Melanolophia consimilaria* foi maior em distâncias superiores a 30 metros. Esses

estudos oferecem um parâmetro comparativo para a capacidade de dispersão observada neste experimento.

Gráfico 13 - Gráficos de dispersão de *Leptocybe invasa* ao longo dos meses de avaliação no experimento 2.



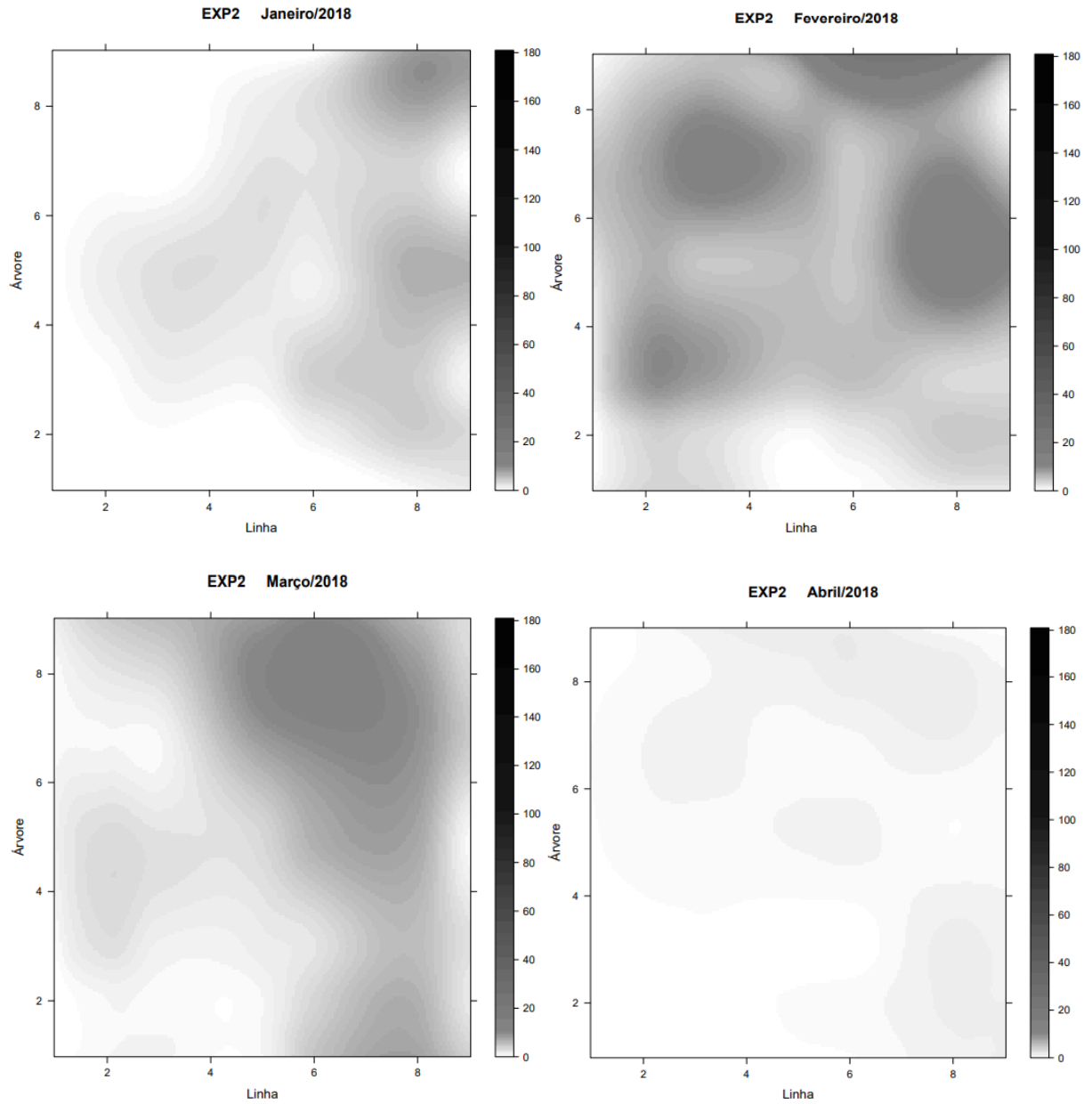
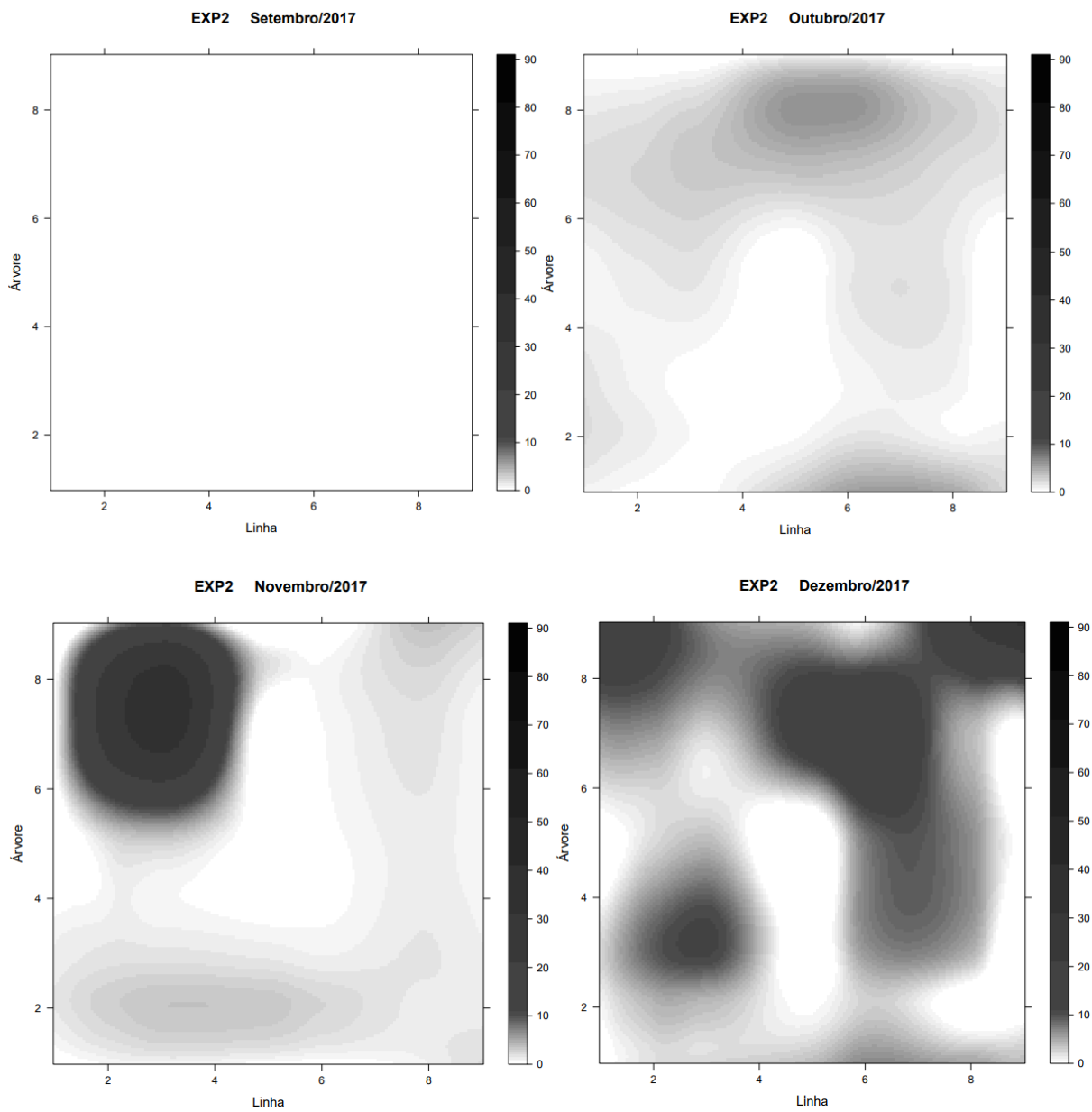
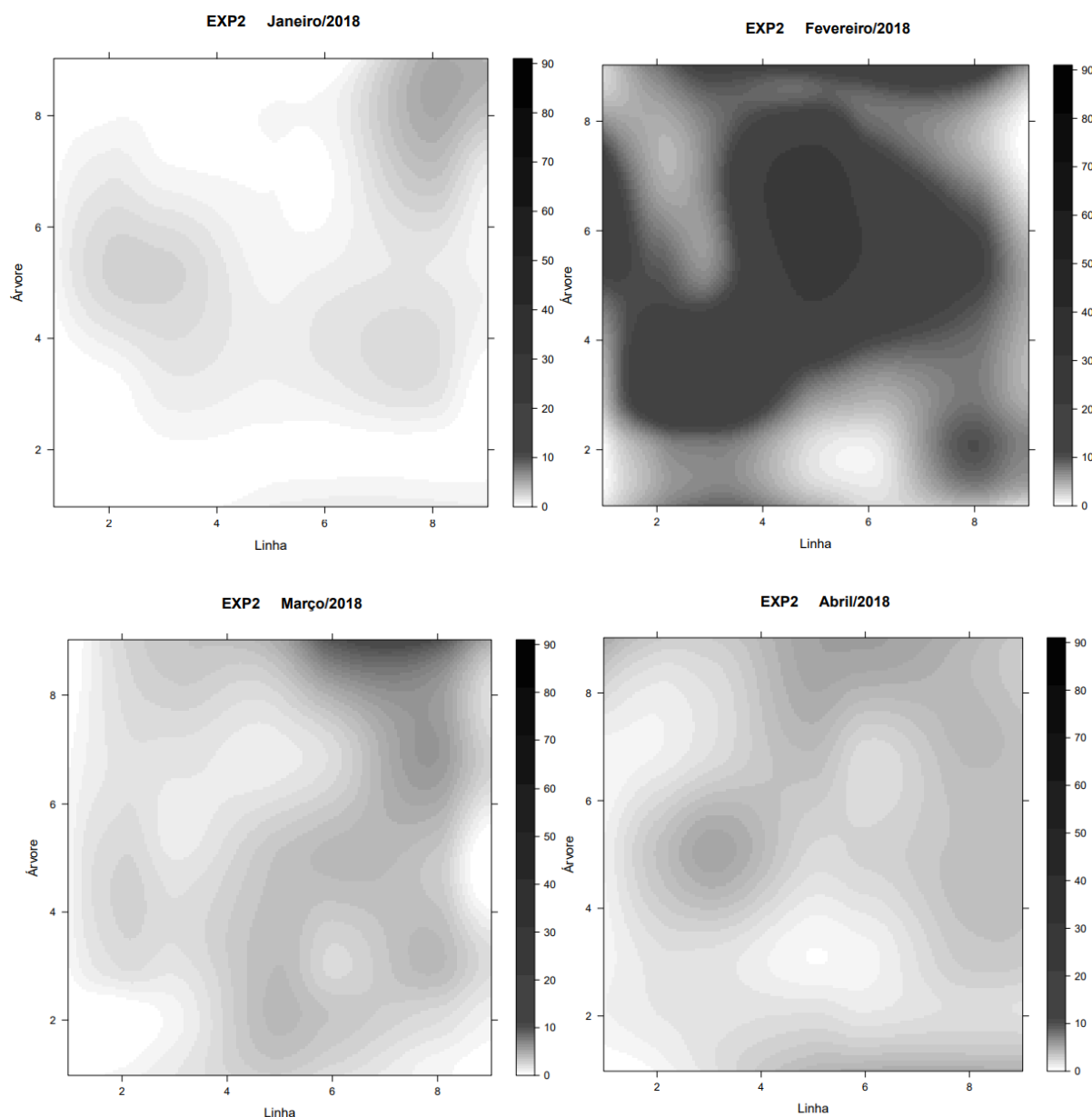


Gráfico 14 - Gráficos de dispersão de *Selitrichodes neseri* ao longo dos meses de avaliação no experimento 2.





No experimento 3, foram avaliados os mesmos parâmetros considerados nos experimentos 1 e 2. Os resultados diferiram estatisticamente entre si, distribuindo-se em seis grupos. De modo geral, as maiores médias de galhas de *L. invasa* foram registradas na nervura central e no pecíolo das folhas, principalmente nas fases 2, 3 e 4, enquanto os ramos apresentaram as menores médias (Tabela 8).

Tabela 8 - Número médio de galhas de *Leptocybe invasa*, nas diferentes fases, na nervura central, pecíolo e ramo ao longo do tempo, no experimento 3. Luís Antônio, SP. Janeiro a maio de 2019.

Mês	Posição	Fase	Média de galhas SK(5%)	
Janeiro	NC	2	12,99	a
Fevereiro	NC	2	13,58	a
Fevereiro	Pecíolo	2	12,20	a
Janeiro	NC	4	11,17	b
Fevereiro	NC	4	10,89	b
Janeiro	Pecíolo	2	11,32	b
Fevereiro	NC	3	9,20	c
Maio	Pecíolo	3	8,35	c
Fevereiro	Pecíolo	4	8,54	c
Janeiro	NC	3	7,62	d
Janeiro	Pecíolo	3	6,52	d
Fevereiro	Pecíolo	3	7,65	d
Janeiro	Pecíolo	4	7,80	d
Maio	Ramo	3	7,85	d
Maio	NC	3	2,52	e
Maio	Pecíolo	4	2,21	e
Janeiro	Ramo	2	2,77	e
Fevereiro	Ramo	2	3,67	e
Maio	Ramo	4	2,31	e
Janeiro	NC	1	0,99	f
Fevereiro	NC	1	1,44	f
Maio	NC	1	0,12	f
Maio	NC	2	0,31	f
Maio	NC	4	0,64	f
Janeiro	Pecíolo	1	0,00	f
Fevereiro	Pecíolo	1	0,00	f
Maio	Pecíolo	1	0,00	f
Maio	Pecíolo	2	0,07	f
Janeiro	Ramo	1	0,00	f
Fevereiro	Ramo	1	0,00	f
Maio	Ramo	1	0,00	f
Maio	Ramo	2	0,00	f
Janeiro	Ramo	3	0,41	f
Fevereiro	Ramo	3	1,33	f
Janeiro	Ramo	4	0,70	f
Fevereiro	Ramo	4	1,23	f

Nos Gráficos 15, 16, 17 e 18, observa-se que as galhas apresentaram redução no mês de maio, com exceção da fase 3. Esse comportamento pode sugerir a evolução das galhas já presentes na área, devendo, contudo, ser interpretado com cautela. No mesmo período, verificou-se maior emergência de *L. invasa*, o que também deve ser considerado na análise desse experimento.

Gráfico 15 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 1, na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 3. Luís Antônio, SP. Janeiro a maio de 2019.

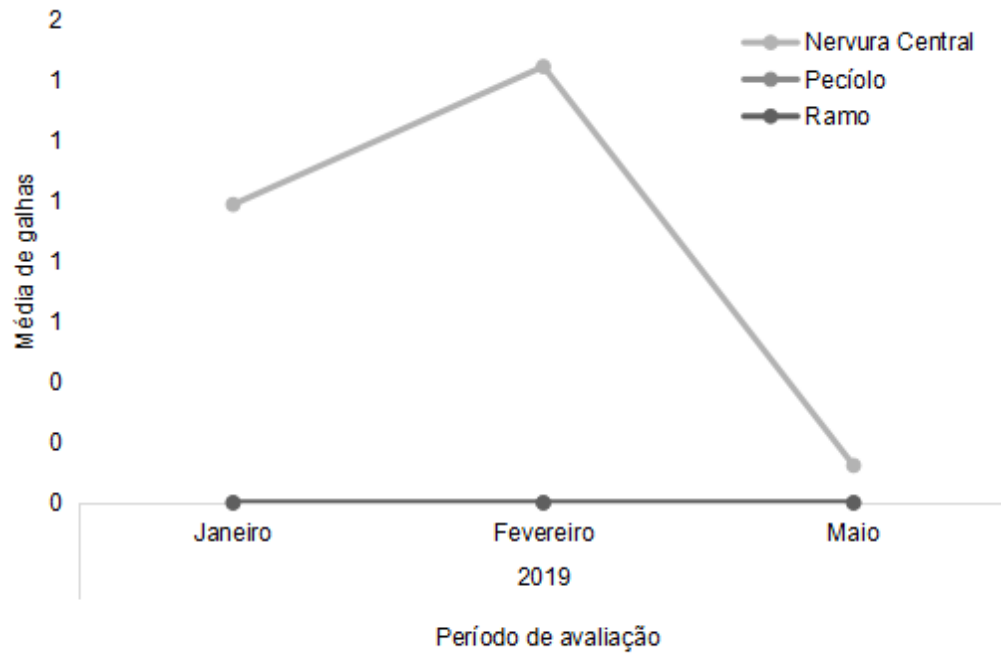


Gráfico 16 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 2, na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 3.

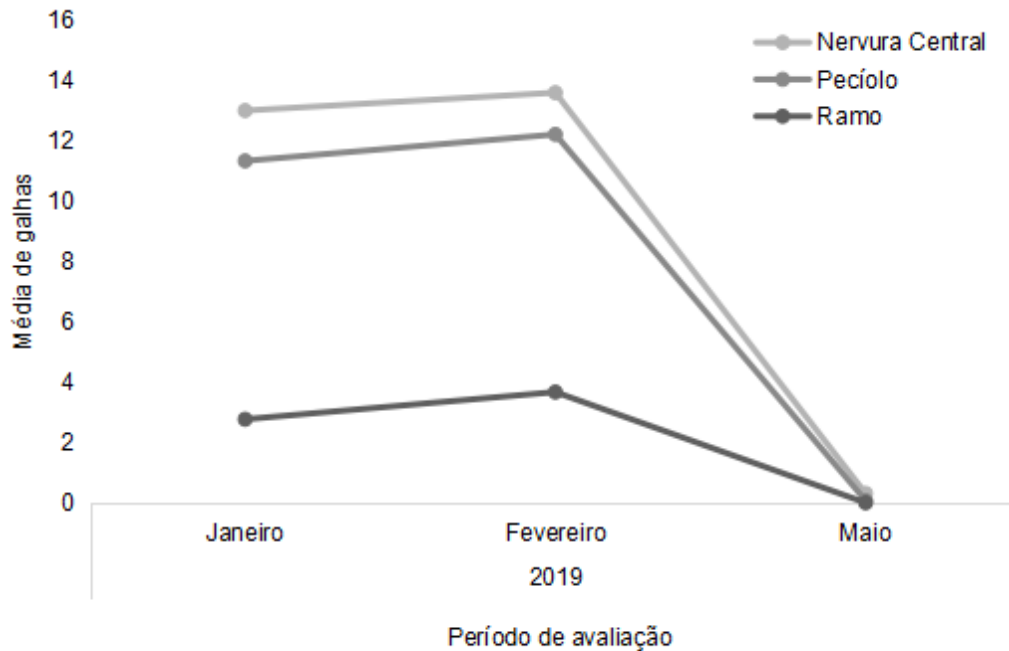


Gráfico 17 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 3, na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 3.

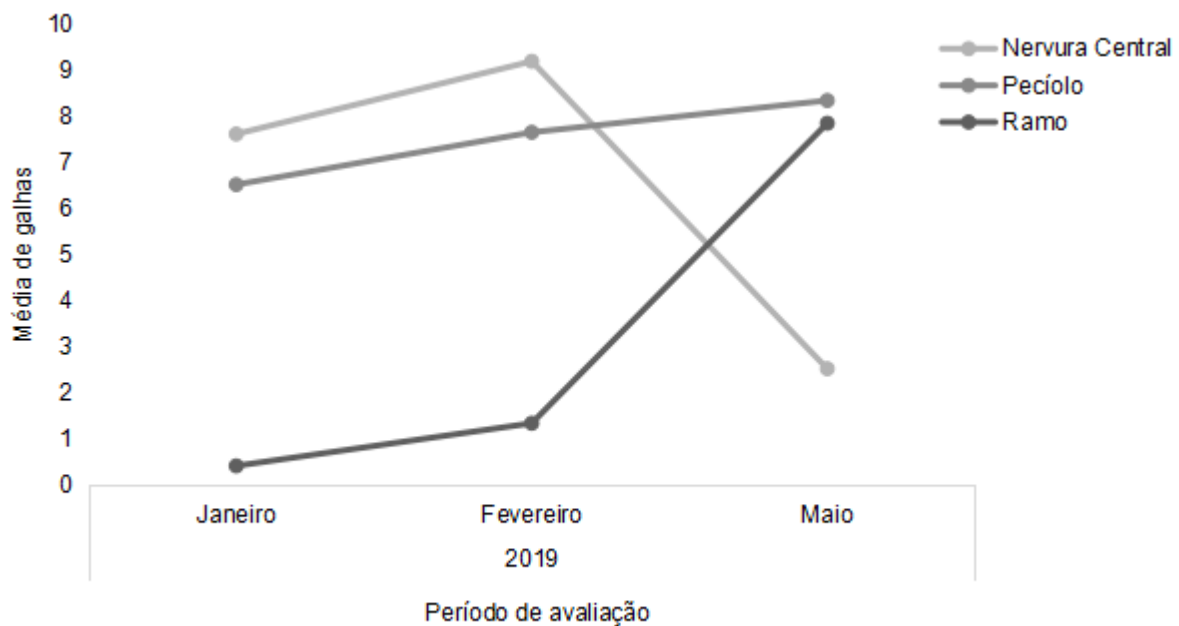
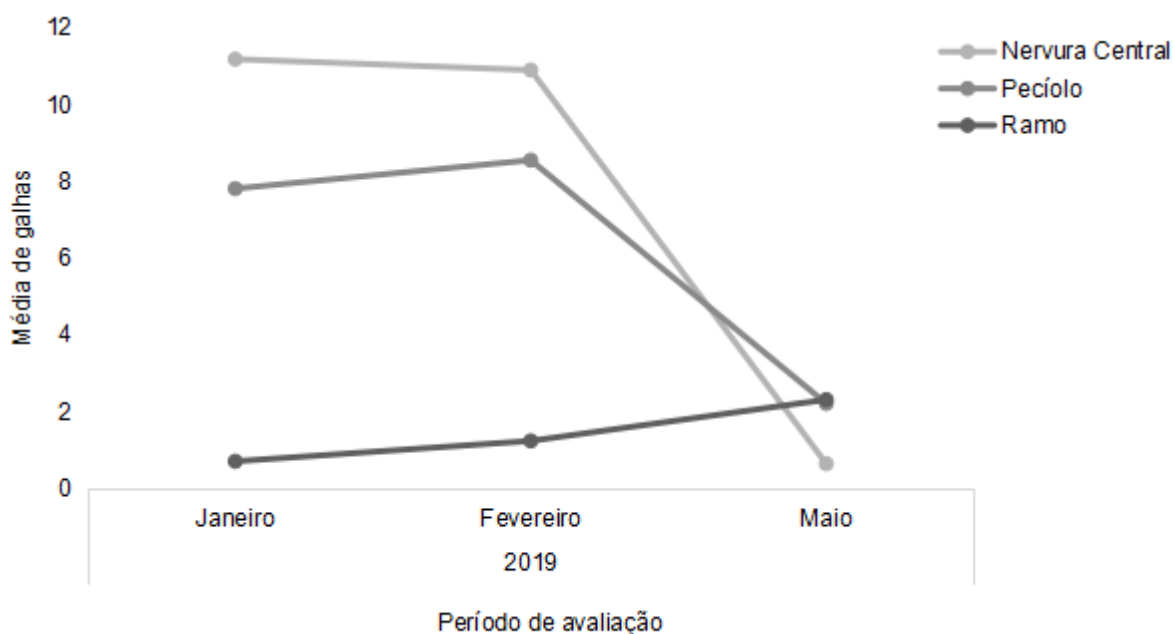


Gráfico 18 - Média da contagem de galhas de *Leptocybe invasa* na fase 4, na nervura central, pecíolo e ramo, nos meses de avaliação no experimento 3.



No experimento 3, além da emergência de adultos de *L. invasa* e *S. nesei*, também foi registrada a ocorrência do parasitoide *Q. mendeli*, até então sem ocorrência no Brasil. Nesse experimento, *S. nesei* também foi encontrado antes da liberação, em razão de uma emergência tardia nos ramos coletados previamente à instalação do experimento. Assim, foram contabilizadas as emergências dos três insetos, verificando-se que *L. invasa* e *Q. mendeli* diferiram estatisticamente entre si, enquanto *S. nesei* não apresentou diferença estatística entre os meses avaliados (Tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9 - Número médio de adultos de *Leptocybe invasa* emergidos ao longo do tempo em árvores de eucalipto no experimento 3. Luís Antônio, SP. Janeiro a maio de 2019.

Meses de avaliação		Média SK(5%)	
2019	Janeiro	1,94	b
	Fevereiro	1,40	b
	Maio	5,39	a

Tabela 10 - Número médio de adultos de *Selitrichodes neseri* emergidos ao longo do tempo em árvores de eucalipto no experimento 3. Luís Antônio, SP. Janeiro a maio de 2019.

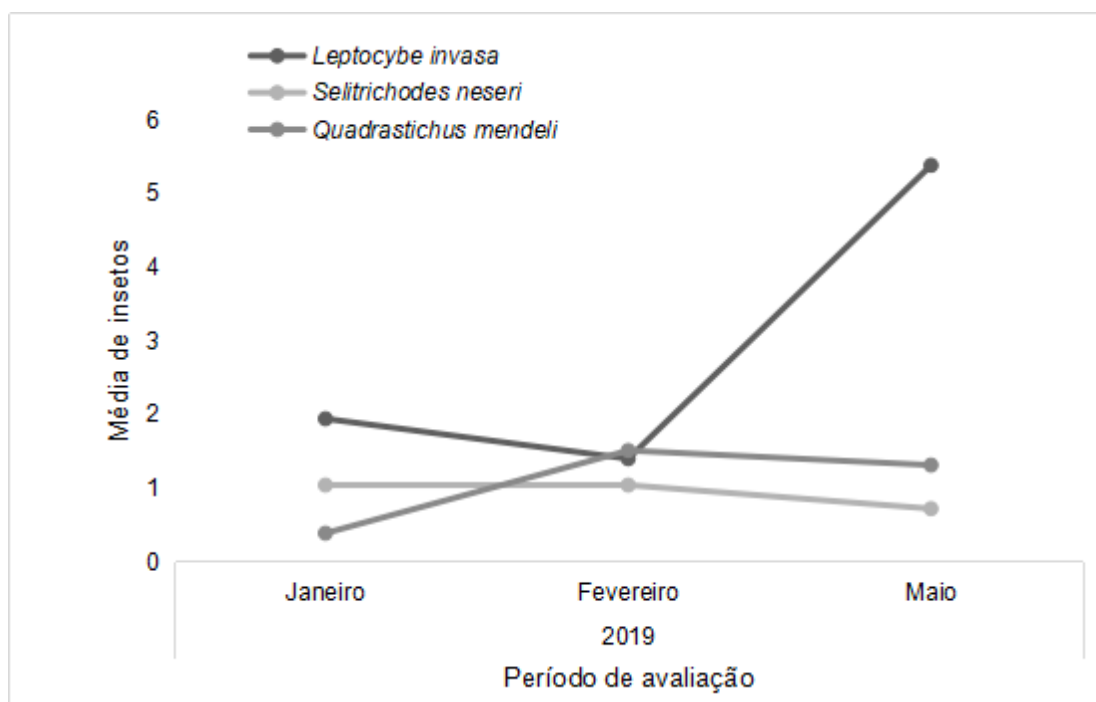
Meses de avaliação		Média SK(5%)	
2019	Janeiro	1,04	a
	Fevereiro	1,04	a
	Maio	0,72	a

Tabela 11 - Número médio de adultos de *Quadrastichus mendeli* emergidos ao longo do tempo em árvores de eucalipto no experimento 3. Luís Antônio, SP. Janeiro a maio de 2019.

Meses de avaliação		Média SK(5%)	
2019	Janeiro	0,38	b
	Fevereiro	1,51	a
	Maio	1,31	a

No Gráfico 19, observa-se redução de *L. invasa* e aumento dos parasitoides em fevereiro, seguida de aumento da praga e redução dos parasitoides em maio. Após maio de 2019, não foi possível realizar novas avaliações na área experimental, pois as árvores cresceram significativamente em altura e praticamente não foram encontradas galhas. Esse resultado pode ser apresentado como um indício de redução da praga na área, devendo ser interpretado com cautela.

Gráfico 19 - Flutuação populacional de *Leptocybe invasa*, *Selitrichodes neseri* e *Quadrastichus mendeli* em árvores de eucalipto no experimento 3. Luís Antônio, SP. Janeiro a maio de 2019.



No experimento 3, também foi avaliada a dispersão de *S. neseri* na área. Como nessa mesma área foi registrada a ocorrência de *Quadrastichus mendeli*, esse parasitoide também foi incluído na avaliação. Nesse experimento, foram liberados 1.000 parasitoides, e observou-se aumento da abundância de *S. neseri* após a liberação, com dispersão de aproximadamente 300 metros a partir do ponto de soltura (Gráfico 21).

Na primeira avaliação, *Q. mendeli* encontrava-se concentrado em pontos extremos da área e, ao longo do tempo, passou a ocorrer de forma mais distribuída (Gráfico 22). *Leptocybe invasa* esteve presente na área desde o início das avaliações e também aumentou sua abundância (Gráfico 20). Após a última avaliação de maio, observaram-se indícios de redução da praga na área, resultado que deve ser interpretado com cautela.

O parasitoide *Closterocerus chamaeleon* (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide de *Ophelimus maskelli* (Hymenoptera: Eulophidae), foi encontrado a 2

km de distância cinco meses após a liberação em campo, segundo Caleca *et al.* (2011). Esse resultado oferece um parâmetro comparativo para a interpretação da capacidade de dispersão de *S. nesi*, observada em aproximadamente 300 metros neste experimento.

Gráfico 20 - Gráficos de dispersão de *Leptocybe invasa* ao longo dos meses de avaliação no experimento 3.

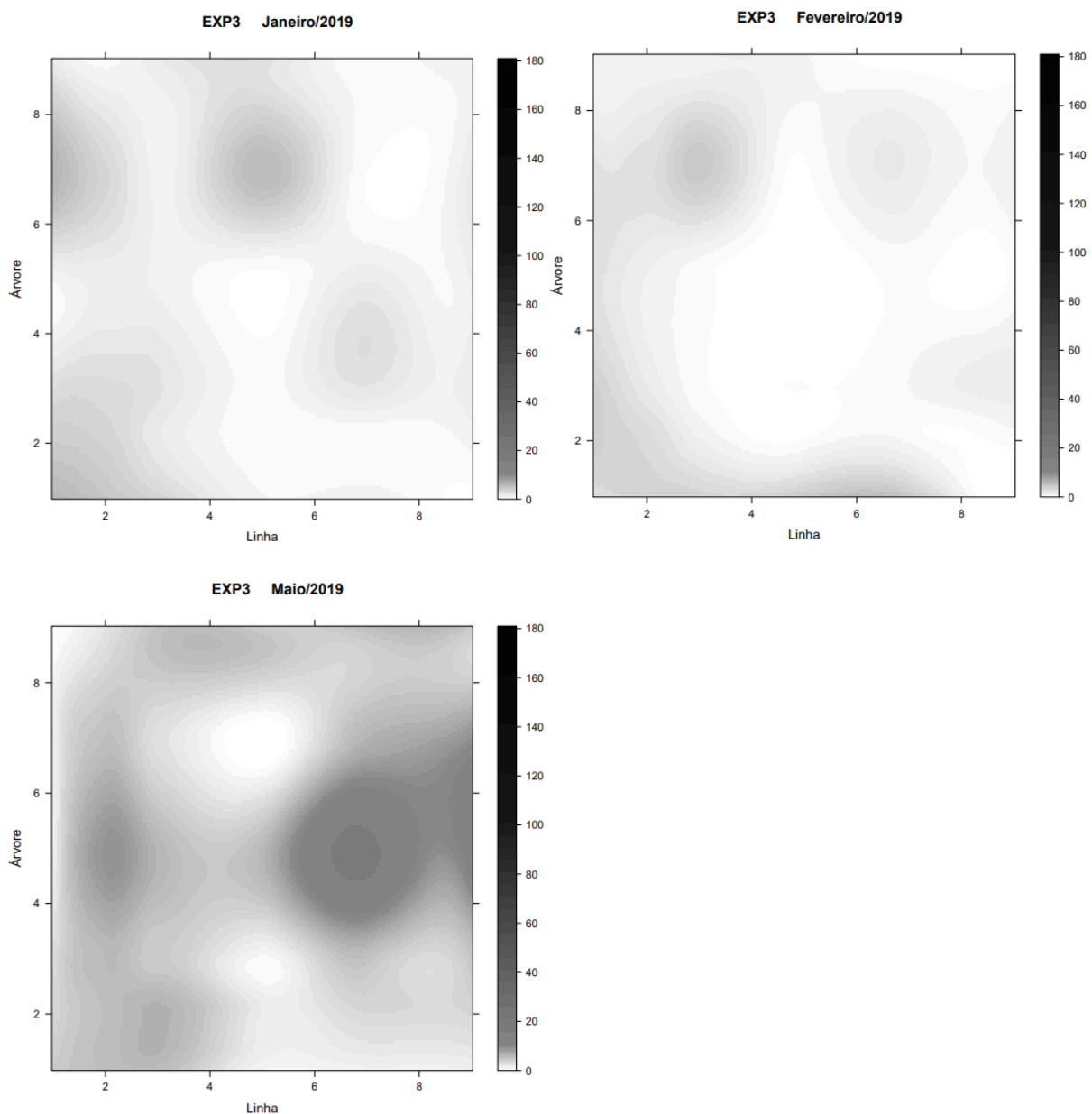


Gráfico 21 - Gráficos de dispersão de *Selitrichodes neseri* ao longo dos meses de avaliação no experimento 3.

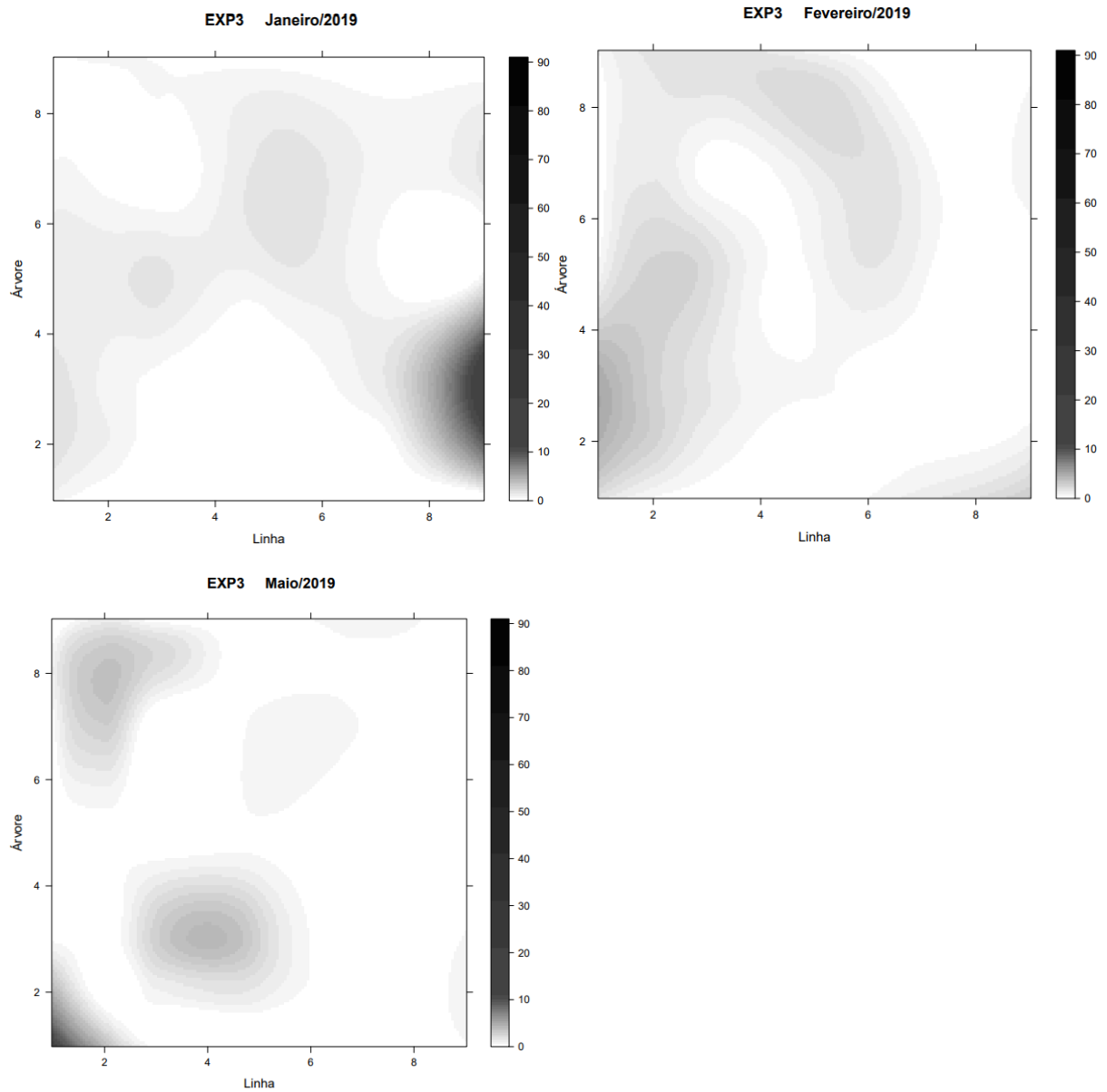
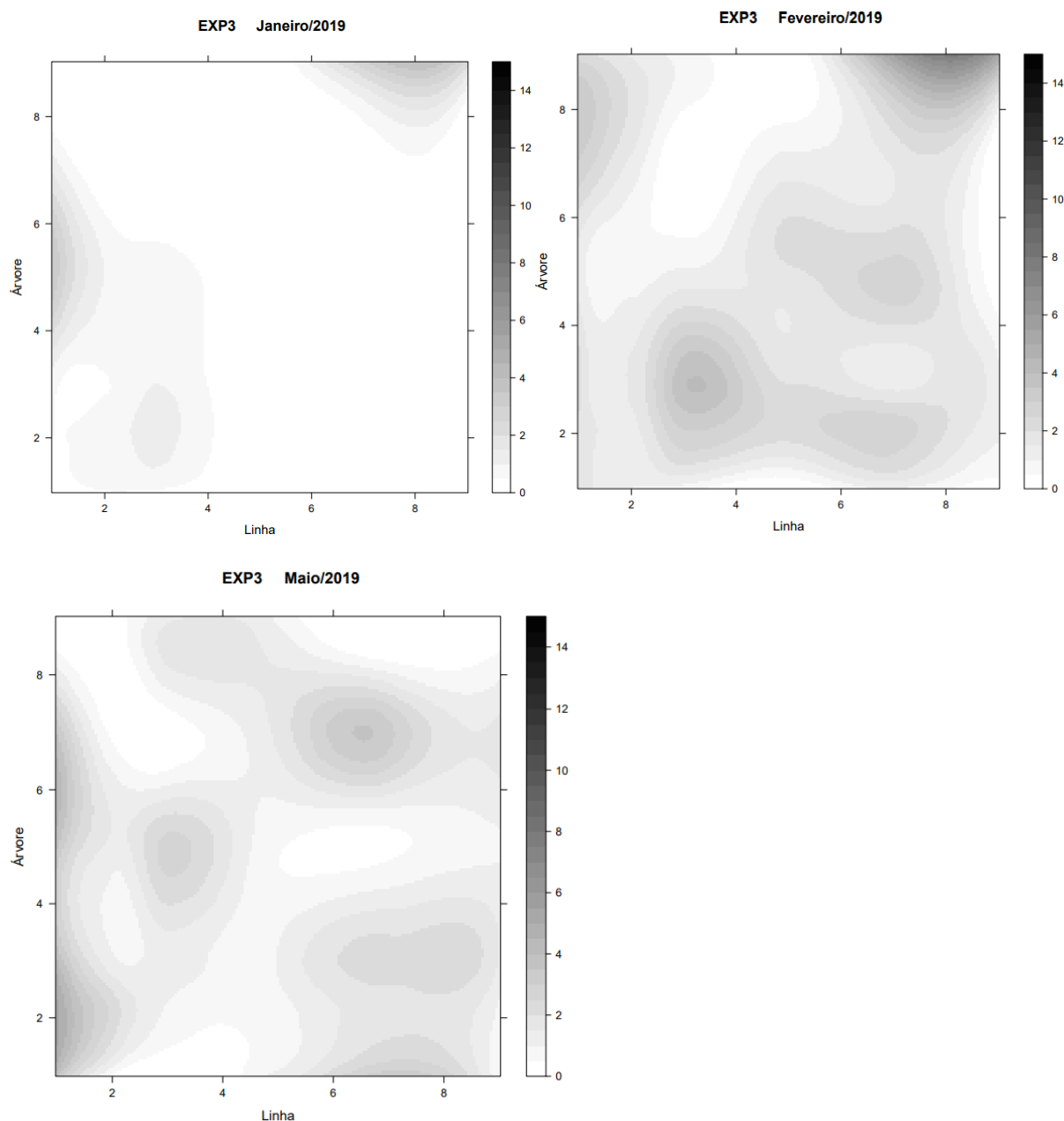


Gráfico 22 - Gráficos de dispersão de *Quadrastichus mendeli* ao longo dos meses de avaliação no experimento 3.



2.4 Conclusões

A infestação de *Leptocybe invasa* apresentou redução após a liberação de *S. nesei* nas áreas de estudo. A nervura central da folha de eucalipto apresentou maior formação de galhas e preferência de oviposição por *L. invasa*. Os meses de maior ocorrência da praga no campo foram de setembro a março. *Selitrichodes*

neseri mostrou adaptação e dispersão em campo, atingindo aproximadamente 300 metros do ponto de liberação.

REFERÊNCIAS

- CALECA, V.; LO VERDE, G.; RIZZO, M. C.; RIZZO, R. Dispersal rate and parasitism by *Closterocerus chamaeleon* (Girault) after its release in Sicily to control *Ophelimus maskelli* (Ashmead) (Hymenoptera, Eulophidae). **Biological Control**, v. 57, p. 66-73, 2011.
- CANDELÁRIA, M. C. *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae): densidade e idade do parasitoide e do hospedeiro alternativo e dispersão em plantação de eucalipto*. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.
- CORBETT, A.; ROSENHEIM, J. A. Quantifying movement of a minute parasitoid, *Anagrus epos* (Hymenoptera: Mymaridae), using fluorescent dust marking and recapture. **Biological Control**, v. 6, p. 35-44, 1996.
- COSTA, V. A.; BERTI FILHO, E.; WILCKEN, C. F.; STAPE, J. L.; LA SALLE, J.; TEIXEIRA, L. D. Eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil: new forest pest reaches the New World. **Revista de Agricultura**, v. 83, p. 136-139, 2008.
- DAJOZ, R. **Ecologia geral**. 3. ed. Petrópolis: Vozes, 1978. 472 p.
- DE SÁ, L. A. N.; PARRA, J. R. P.; SILVEIRA NETO, S. Capacidade de dispersão de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) em milho. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 226-231, 1993.
- SARKAR, D. **Lattice: multivariate data visualization with R**. New York: Springer, 2008.
- DITTRICH-SCHRÖDER, G.; HARNEY, M.; NESER, S.; JOFFE, T.; BUSH, S.; HURLEY, B. P.; WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B. Biology and host preference of *Selitrichodes neseri*: a potential biological control agent of the Eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa*. **Biological Control**, v. 78, p. 33-41, 2014.

HUANG, Z. Y.; LI, J.; LU, W.; ZHENG, X. L.; YANG, Z. D. Parasitoids of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe* spp.: a global review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 29983-29995, 2018.

KAVITHA-KUMARI, N.; KULKARNI, H.; VASTRAD, A. S.; GOUD, K. B. Biology of eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher and La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, p. 211-212, 2010.

KELLY, J.; LA SALLE, J.; HARNEY, M.; DITTRICH-SCHRÖDER, G.; HURLEY, B. *Selitrichodes neneri* n. sp., a new parasitoid of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **Zootaxa**, n. 3333, p. 50-57, 2012.

MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; FISHER, N.; LA SALLE, J. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. **Australian Journal of Entomology**, v. 43, p. 101-113, 2004.

NUGNES, F.; GEBIOLA, M.; MONTI, M. M.; GUALTIERI, L.; GIORGINI, M.; WANG, J.; BERNARDO, H. Genetic diversity of the invasive gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* endosymbiont, and associated sex-ratio differences. **PLOS ONE**, v. 10, p. 1-19, 2015.

PURETZ, B. O. Aspectos biológicos e reprodutivos de *Selitrichodes neneri* (Hymenoptera: Eulophidae) Kelly & La Salle e estabelecimento do parasitoide em plantios florestais de eucalipto no Brasil. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

SOUZA, A. R. Levantamento populacional e aspectos biológicos de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) e de seu parasitoide *Selitrichodes neneri* (Hymenoptera: Eulophidae). 2016. 83 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

SOUZA, A. R.; PURETZ, B. O.; SOUZA, N. M.; BECCHI, L. K.; VELOSO, S. G. M.; WILCKEN, C. F. Controle biológico de pragas exóticas de Eucalyptus spp. In: BALDIN, E. L. L.; KRONKA, A. Z.; FUJIHARA, R. T. (org.). **Proteção vegetal**. Botucatu: Fepaf, 2015. p. 71-84.

WILCKEN, C. F.; ZACHÉ, B.; MASSON, M. V.; PEREIRA, R. A.; BARBOSA, L. R.; ZANUNCIO, J. C. Vespa-da-galha-do-eucalipto, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle. In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A. (org.). **Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros**. Piracicaba: Fealq, 2015. p. 898-908.

ZACHÉ, B. Técnicas de criação em laboratório e dispersão do parasitoide de pupas *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) no campo. 2012. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

ZHENG, X. L.; HUANG, Z. Y.; DONG, D.; GUO, C. H.; LI, J.; YANG, Z. D.; YANG, X. H.; LU, W. Parasitoids of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) in China. **Parasite**, v. 23, p. 1-7, 2016.

CAPÍTULO 3

PRIMEIRA OCORRÊNCIA DE *Quadrastichus mendeli* KIM & LA SALLE (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE) NO BRASIL

Barbara de Oliveira Puretz

Resumo

Leptocybe invasa Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) é uma importante praga exótica de plantios de eucalipto, associada à formação de galhas em folhas, pecíolos, ponteiros e ramos novos, comprometendo o desenvolvimento das plantas. Entre as estratégias de manejo, o controle biológico tem se destacado como alternativa promissora, com ênfase no uso de parasitoides específicos. *Quadrastichus mendeli* Kim & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) é um parasitoide larval específico de *L. invasa*, já registrado em diferentes países, porém ainda sem registro formal no Brasil. Este trabalho teve como objetivo relatar a primeira ocorrência de *Q. mendeli* no Brasil. Ramos de eucalipto com galhas de *L. invasa* foram coletados em plantio localizado em Luís Antônio, São Paulo, Brasil, e mantidos em laboratório até a emergência dos insetos. Os exemplares obtidos foram encaminhados para identificação taxonômica e molecular. Após a confirmação da espécie, observou-se também parasitismo de larvas de *L. invasa* em galhas oferecidas ao parasitoide. Foi confirmada a presença de *Q. mendeli* no Brasil, representando o primeiro registro da espécie no país e indicando seu potencial como novo agente para o controle biológico de *L. invasa*.

Palavras-chave: controle biológico; *Quadrastichus mendeli*; *Leptocybe invasa*; eucalipto; parasitoide.

Abstract

Leptocybe invasa Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) is an important exotic pest of eucalyptus plantations, associated with gall formation on leaves, petioles, shoot tips, and young branches, impairing plant development. Among the available management strategies, biological control has been considered a promising alternative, especially through the use of specific parasitoids. *Quadrastichus mendeli* Kim & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) is a larval parasitoid specific to *L. invasa*, already recorded in different countries, but not yet formally reported in Brazil. This study aimed to report the first occurrence of *Q. mendeli* in Brazil. Eucalyptus branches bearing *L. invasa* galls were collected in a plantation located in Luís Antônio, São Paulo, Brazil, and maintained under laboratory conditions until insect emergence. The obtained specimens were sent for taxonomic and molecular identification. After species confirmation, parasitism of *L. invasa* larvae was also observed in galls offered to the parasitoid. The presence of *Q. mendeli* in Brazil was confirmed, representing the first record of the species in the country and indicating its potential as a new biological control agent of *L. invasa*.

Keywords: biological control; *Quadrastichus mendeli*; *Leptocybe invasa*; eucalyptus; parasitoid.

3.1 Introdução

Leptocybe invasa Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) é uma das principais pragas exóticas em plantios de eucalipto no mundo. O primeiro relato de *L. invasa* no Brasil ocorreu em 2007, causando danos em clones híbridos de *Eucalyptus camaldulensis* × *Eucalyptus grandis* em viveiro e plantios no norte da Bahia (Berti Filho *et al.*, 2008).

Leptocybe invasa, originária da Austrália, é conhecida popularmente como vespa-da-galha-do-eucalipto. Danos dessa praga reduzem o desempenho fisiológico das plantas de *Eucalyptus* spp. Esse inseto oviposita na região da nervura central das folhas, pecíolo, ponteiro e ramos novos, causando galhas nesses locais, impedindo o fluxo de seiva e podendo causar a morte da planta (Kavitha-Kumari *et al.*, 2010; Wilcken & Berti Filho, 2008).

O controle biológico e o melhoramento genético de plantas são promissores para o manejo dessa praga, pois o controle químico tem reduzida eficiência contra galhas desenvolvidas de *L. invasa* (Masson, 2015). Em 2015, o parasitoide específico de *L. invasa*, *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae), foi importado da África do Sul para o Brasil. Esse inimigo natural tem se adaptado em criações de laboratórios e se estabelecido no campo (Masson *et al.*, 2017). *Quadrastichus mendeli* Kim e La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae), originário da Austrália, é outro parasitoide promissor e uma alternativa eficaz para o manejo de *L. invasa* (Kim *et al.*, 2008).

Quadrastichus mendeli Kim & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) é um micro-himenóptero parasitoide larval específico de *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), praga exótica associada à formação de galhas em espécies de *Eucalyptus*. Esse parasitoide apresenta potencial para uso no controle biológico da praga, tendo sido registrado em diferentes países onde *L. invasa* ocorre. O reconhecimento de sua especificidade e de sua associação com galhas de eucalipto tem sustentado seu interesse em programas de manejo biológico.

As fêmeas de *Q. mendeli* ovipositam preferencialmente em galhas jovens, e o desenvolvimento do parasitoide ocorre no interior do tecido vegetal associado ao hospedeiro. O parasitismo tem sido observado principalmente em fases iniciais de desenvolvimento das galhas, o que reforça a importância do sincronismo entre a presença do parasitoide e os estágios suscetíveis de *L. invasa*.

Além de *Q. mendeli*, outros parasitoides têm sido relatados associados a *L. invasa*, entre eles *Selitrichodes neseri*. Entretanto, *Q. mendeli* tem sido apontado como um inimigo natural promissor devido à sua capacidade de parasitismo e ao seu estabelecimento em áreas infestadas. Em estudos conduzidos em campo, esse parasitoide apresentou ocorrência associada à redução da infestação da praga, embora a interpretação desse efeito deva ser feita com cautela e à luz das condições específicas de cada área avaliada.

O parasitoide *Quadrastichus mendeli* já foi relatado em Israel, Índia, China, Itália, Argentina, África do Sul e Tailândia (Kim *et al.*, 2008; Shylesha, 2008; Zheng *et al.*, 2016; Nugnes *et al.*, 2016; Aquino *et al.*, 2018; Bush *et al.*, 2018; Sangtongpraow & Charernsom, 2019). Na Tailândia, a espécie foi registrada em associação a *Leptocybe invasa*, com estabelecimento em campo, conforme relatado por Sangtongpraow e Charernsom (2019).

Na Itália e na Argentina, *Q. mendeli* também foi registrado de forma acidental, com ocorrência associada a áreas infestadas por *L. invasa* (Nugnes *et al.*, 2016; Aquino *et al.*, 2018).

O objetivo do presente trabalho foi relatar a primeira ocorrência de *Q. mendeli* no Brasil.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta dos ramos

A coleta de ramos foi realizada em Luís Antônio, São Paulo, Brasil, nas coordenadas (-21,49583, -47,93254), em um talhão plantado com o clone de *Eucalyptus grandis*, em 07 de dezembro de 2018. Nesse talhão, estava instalado um experimento cujo objetivo era conhecer a dispersão de *Selitrichodes neseri* em

campo. Os ramos coletados apresentavam galhas bem desenvolvidas de *Leptocybe invasa*.

3.2.2 Acondicionamento e coleta de insetos

Os ramos com galhas de *Leptocybe invasa* foram transportados ao Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) da FCA/UNESP, campus de Botucatu, São Paulo, onde foram acondicionados em potes de plástico com água, em gaiolas de madeira (40 × 45 × 80 cm), e mantidos em sala climatizada a 25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 12:12 h, até a emergência dos insetos. As galhas avaliadas correspondiam a [informar número de galhas], no estágio [informar estágio de desenvolvimento]. Após a emergência, os insetos foram armazenados em álcool 70% para posterior identificação. Foram obtidas [informar número de fêmeas] fêmeas de *L. invasa* e 30 exemplares de outro inseto (Figura 1), posteriormente identificado como *Quadrastichus mendeli*.

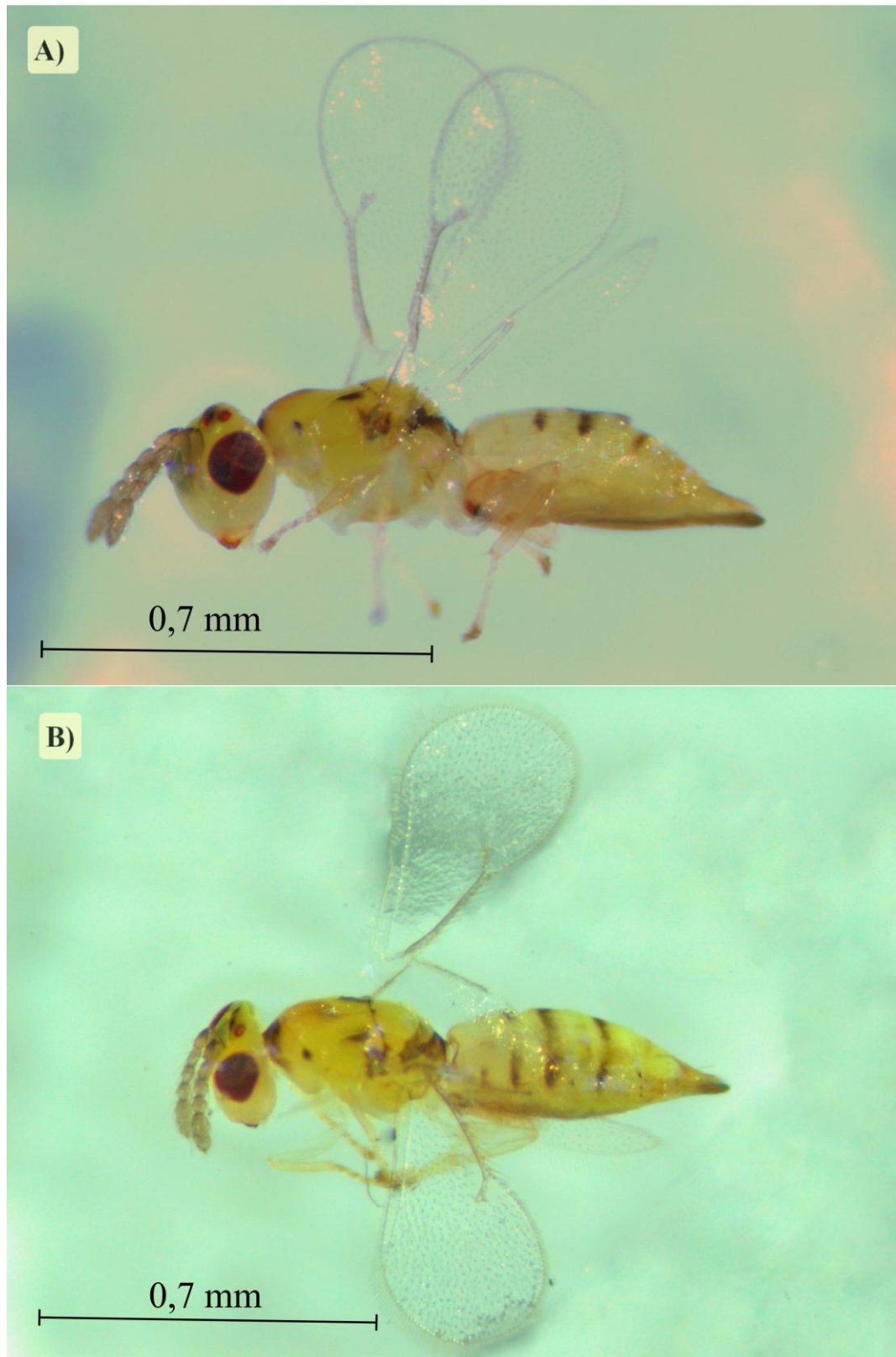
3.2.3 Identificação dos insetos

As amostras contendo os insetos emergidos foram enviadas ao Dr. Il-Kwon Kim, da School of Botany and Zoology da The Australian National University, para identificação morfológica. A identificação molecular também foi realizada. O DNA de um inseto foi extraído e analisado em triplicata, utilizando 80 µl de solução de resina Chelex100® a 10% [Bio-Rad Laboratories, EUA] e 8 µl de proteinase K (20 mg/ml). O gene 28S foi amplificado em termociclador [Infinigen, TC-96CG, EUA], com os iniciadores 28SF3633 (5'-TACCGTGAGGGAAAGTTGAAA-3') e 28SR4076 (5'-AGACTCCTTGGTCCGTGTTT-3'), conforme Tiawsirisup *et al.* (2008). O ciclo de PCR consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 38 ciclos de 94 °C por 30 s, recozimento a 58 °C por 50 s, extensão a 72 °C por 1 min e 30 s, e extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos das extrações de DNA e as reações de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% sob luz UV e fotografados. Os produtos de amplificação foram purificados por beads magnéticas e enviados ao Laboratório Central do IBTEC da UNESP/Botucatu, São Paulo, Brasil.

3.3 Resultados e Discussão

As amostras de insetos enviadas para identificação morfológica foram confirmadas como *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) (Figura 1). A identificação por técnicas moleculares também confirmou a espécie *Quadrastichus mendeli*. A sequência obtida por análise molecular apresentou cobertura e alta identidade, sendo depositada no GenBank sob o número de acesso MT645225.

Figura 1 – Fêmeas de *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) (A e B) emergidas de galhas de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae).



Fonte: DA MOTA (2019).

Após a confirmação do inseto, galhas de *Leptocybe invasa* em diferentes fases de desenvolvimento foram oferecidas a *Quadrastichus mendeli*, a fim de observar a ocorrência de parasitismo. Foi observado parasitismo de larvas de *L. invasa* nas galhas (Figura 2), com desenvolvimento do parasitoide no interior das galhas de *L. invasa*.

Figura 2 – Fêmeas de *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) parasitando galhas de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae).



Fonte: Da Mota (2019).

3.4 Conclusões

Foi confirmada a presença do parasitoide *Quadrastichus mendeli* no Brasil por meio de identificação taxonômica e molecular. Esse registro representa a primeira ocorrência da espécie no país e indica seu potencial como novo agente para o controle biológico de *Leptocybe invasa*.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, D. A.; ANDORNO, A. V.; PATHAUER, P. S.; BOTTO, E. N.; LÓPEZ, S. N. Primera cita de *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae) de Argentina, asociado a agallas de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **Acta Zoológica Lilloana**, v. 68, n. 1, p. 50-52, 2018.
- BUSH, S. J.; DITTRICH-SCHRÖDER, G.; NESER, S.; GEVERS, C.; BAFFOE, K. O.; SLIPPERS, B.; HURLEY, B. P. First record of *Quadrastichus mendeli*, a parasitoid of *Leptocybe invasa*, in South Africa. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, v. 80, n. 3, p. 275-277, 2018.
- COSTA, V. A.; BERTI FILHO, E.; WILCKEN, C. F.; STAPE, J. L.; LA SALLE, J.; TEIXEIRA, L. D. Eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil: new forest pest reaches the New World. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 83, n. 2, p. 136-139, 2008.
- FENG, M. X. Study on biology and ecology of *Quadrastichus mendeli* Kim & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). 2016. Dissertação (Mestrado) – Hainan University, China, 2016.
- HUANG, Z. Y.; LI, S. Y.; LU, W.; ZHENG, X. L. Structure and sense organs of ovipositors of an endoparasitoid *Aprostocetus causalis* and an ectoparasitoid *Quadrastichus mendeli* in *Leptocybe* spp. **Microscopy and Microanalysis**, v. 25, n. 1, p. 250-256, 2019.
- HUANG, Z. Y.; LI, J.; LU, W.; ZHENG, X. L.; YANG, Z. D. Parasitoids of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe* spp.: a global review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 29983-29995, 2018.
- HUANG, Z. Y.; ZHANG, Y. J.; LIU, J. Y.; YANG, Z. D.; LU, W.; ZHENG, X. L. Ultrastructure of female antennal sensilla of an endoparasitoid wasp, *Quadrastichus mendeli* Kim & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **Microscopy and Microanalysis**, v. 24, n. 4, p. 431-441, 2018.

KAVITHA-KUMARI, N.; KULKARNI, H.; VASTRAD, A. S.; GOUD, K. B. Biology of eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher and La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, p. 211-212, 2010.

KIM, I. K.; MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; BLUMBERG, D.; LA SALLE, J. Taxonomy, biology and efficacy of two Australian parasitoids of the eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **Zootaxa**, n. 1910, p. 1-20, 2008.

MASSON, V. M. Dinâmica populacional e manejo de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) em plantações de eucalipto. 2015. 86 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

MASSON, V. M.; TAVARES, W. S.; LOPES, F. A.; SOUZA, A. R.; FERREIRA-FILHO, P. J.; BARBOSA, L. R.; WILCKEN, C. F. *Selitrichodes neseri* (Hymenoptera: Eulophidae) recovered from *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) galls after initial release on *Eucalyptus* (Myrtaceae) in Brazil, and data on its biology. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 3, p. 589-593, 2017.

NUGNES, F.; GEBIOLA, M.; GUALTIERI, L.; RUSSO, E.; SASSO, R.; BERNARDO, U. When exotic biocontrol agents travel without passport: first record of *Quadrastichus mendeli*, parasitoid of the blue-gum chalcid *Leptocybe invasa*, in Italy. **Bulletin of Insectology**, v. 69, n. 1, p. 85-91, 2016.

QUEIROZ, D. L. Pragas exóticas e potenciais à eucaliptocultura no Brasil. In: **MANEJO fitossanitário de cultivos agroenergéticos**, 2009, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. p. 239-249.

SANGTONGPRAOW, B.; CHARERNSOM, K. Biological traits of *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoid of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) in Thailand. **Parasite**, v. 26, p. 1-9, 2019.

SHYLESHA, A. N. **Classical biological control of Eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle: final project report on the management of emerging pests of Eucalyptus**. 2008.

TIAWSIRISUP, S.; SRIPATRANUSORN, S.; ORAVEERAKUL, K.; NUCHPRAYOON, S. Distribution of mosquito (Diptera: Culicidae) species and *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections during the bird immigration season in Pathumthani province, central Thailand. **Parasitology Research**, v. 102, n. 4, p. 731-736, 2008.

ZHENG, X. L.; HUANG, Z. Y.; DONG, D.; GUO, C. H.; LI, J.; YANG, Z. D.; YANG, X. H.; LU, W. Parasitoids of the eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) in China. **Parasite**, v. 23, p. 1-7, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o avanço do conhecimento sobre *Leptocybe invasa* e seus inimigos naturais no Brasil. Foi possível descrever aspectos morfológicos do sistema reprodutivo de *Selitrichodes neneri*, bem como registrar sua adaptação e dispersão em campo. Além disso, confirmou-se a presença de *Quadrastichus mendeli* no Brasil por meio de identificação taxonômica e molecular, ampliando o conjunto de inimigos naturais associados a *L. invasa* no país.

Em campo, *S. neneri* foi observado em diferentes áreas de estudo, com dispersão de até aproximadamente 300 metros a partir do ponto de liberação. A nervura central das folhas de eucalipto destacou-se como o principal local de formação de galhas e de preferência de oviposição por *L. invasa*, e os meses de maior ocorrência da praga concentraram-se entre setembro e março.

Os achados deste estudo reforçam o potencial do controle biológico no manejo de *L. invasa*, mas a interpretação dos efeitos observados em campo deve ser feita com cautela, especialmente quanto à associação direta entre presença de parasitoides e redução da infestação. Nesse sentido, o registro de *Q. mendeli* no Brasil representa um resultado relevante e indica potencial como novo agente para o controle biológico da praga.

REFERÊNCIAS

- BARBIELLINE, A. A. Combate à praga do eucalipto no sul. **Chácaras e Quintais**, v. 91, n. 2, p. 191-192, 1955.
- BROCKERHOFF, E. G.; LIEBHOLD, A. M.; JACTEL, H. The ecology of forest insect invasions and advances in their management. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 36, n. 2, p. 263-268, 2006.
- COSTA, E. C.; ARALDI, D. B. Entomofauna florestal: uma visão holística. In: CANTARELLI, E. B.; COSTA, E. C. (org.). **Entomologia florestal aplicada**. Santa Maria: Editora UFSM, 2014. p. 13-34.
- DITTRICH-SCHRODER, G.; WINGFIELD, M. J.; HURLEY, B. P.; SLIPPERS, B. Diversity in Eucalyptus susceptibility to the gall-forming wasp *Leptocybe invasa*. **Agricultural and Forest Entomology**, 2012. 9 p.
- DITTRICH-SCHRÖDER, G.; HARNEY, M.; NESER, S.; JOFFE, T.; BUSH, S.; HURLEY, B. P.; WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B. Biology and host preference of *Selitrichodes neseri*: a potential biological control agent of the Eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa*. **Biological Control**, v. 78, p. 33-41, 2014.
- FREITAS, S. Contribuição ao estudo da morfologia e biologia de *Gonipterus gibberus* Boisduval, 1835 (Coleoptera, Curculionidae) e levantamento dos danos causados por esta espécie em eucaliptos dos arredores de Curitiba. Curitiba, 1979. 95 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979.
- HURLEY, B. P. et al. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, v. 18, n. 4, p. 921-933, 2016.
- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório anual 2020**. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2021.
- MASSON, M. V. Dinâmica populacional e manejo de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) em plantações de eucalipto. 2015. 86 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2015.
- MASSON, M. V.; TAVARES, W. S.; LOPES, F. A.; SOUZA, A. R.; FERREIRA-FILHO, P. J.; BARBOSA, L. R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C. *Selitrichodes neseri* (Hymenoptera: Eulophidae) recovered from *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) galls after initial release on eucalyptus (Myrtaceae) in Brazil, and data on its biology. **Florida Entomologist**, v. 100, p. 589-593, 2017.
- MOTA, T. A. Bioecologia dos parasitoides *Selitrichodes neseri* e *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae) em *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae). 2020. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2020.

PIMENTEL, D.; MCNAIR, S.; JANECKA, J.; WIGHTMAN, J.; SIMMONDS, C.; O'CONNELL, C.; WONG, E.; RUSSEL, L.; ZERN, J.; AQUINO, T.; TSOMONDO, T. Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 84, p. 1-20, 2001.

PURETZ, B. O. Aspectos biológicos e reprodutivos de *Selitrichodes neseri* (Hymenoptera: Eulophidae) Kelly & La Salle e estabelecimento do parasitoide em plantios florestais de eucalipto no Brasil. 2017. 77 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2017.

PURETZ, B. O.; JORGE, C.; MOTA, T. A.; DALLACORT, S.; CARVALHO, V. R.; SILVA, R. M. L.; WILCKEN, C. F. First record of *Quadrastichus mendeli* (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil: the Australian parasitoid of blue gum chalcid wasp not recognize geographical barriers. In: **IUFRO WORLD CONGRESS FOREST RESEARCH AND COOPERATION FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT**, 25., 2019, Curitiba. Anais... Curitiba, 2019. v. 39. p. 1-768.

QUEIROZ, D. L. Pragas exóticas e potenciais à eucaliptocultura no Brasil. In: **MANEJO FITOSSANITÁRIO DE CULTIVOS AGROENERGÉTICOS**, 2009, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. p. 239-249.

SANTANA, D. L. Q.; BURCKHARDT, D. Introduced Eucalyptus psyllids in Brazil. **Journal of Forest Research**, New York, v. 12, p. 337-344, 2007.

SOUZA, A. R. Aspectos biológicos de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) e de seu parasitoide *Selitrichodes neseri* (Hymenoptera: Eulophidae) e levantamento de vespas galhadoras em florestas de eucalipto na Austrália. 2016. 75 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2016.

WILCKEN, C. F.; BARBOSA, L. R.; SÁ, L. A. N.; SOLIMAN, E. P.; LIMA, A. C. V.; DAL POGETTO, M. H. F. A.; DIAS, T. K. R. Manejo de pragas exóticas em florestas de eucalipto. In: **ENCONTRO BRASILEIRO DE SILVICULTURA**, 2., 2011, Campinas. Anais... Piracicaba: ESALQ, 2011.

WILCKEN, C. F.; BARBOSA, L. R.; SOLIMAN, E. P.; LIMA, A. C. V.; SÁ, L. A. N.; LAWSON, S. Percevejo-bronzeado-do-eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé. In: **Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros**. Piracicaba: Fealq, 2015. v. 1, cap. 45, p. 898-908.

WILCKEN, C. F.; BERTI FILHO, E. Vespa-da-galha do eucalipto (*Leptocybe invasa*) (Hymenoptera: Eulophidae): nova praga de florestas de eucalipto no Brasil. Botucatu: IPEF, 2008. 11 p. (**Circular técnica IPEF**).

WILCKEN, C. F.; COUTO, E. B.; ORLATO, C.; FERREIRA FILHO, P. J.; FIRMINO, D. C. Ocorrência do psílideo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) em florestas de eucalipto no Brasil. **Circular técnica IPEF**, Piracicaba, n. 201, p. 1-11, 2003.

WILCKEN, C. F.; ZACHÉ, B.; MASSON, M. V.; PEREIRA, R. A.; BARBOSA, L. R.; ZANUNCIO, J. C. Vespa-da-galha-do-eucalipto *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle.

In: **Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros**. Piracicaba: Fealq, 2015. v. 1, cap. 45, p. 835-844.

WILCKEN, C. F. Percevejo-bronzeado-do-eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileira. Botucatu, SP: IPEF, 2008. (**Circular técnica IPEF**).

WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B.; HURLEY, B. P.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; ROUX, J. Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, v. 70, n. 2, p. 139-144, 2008.

WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D. Worldwide movement of exotic forest fungi, especially in the tropics and the Southern Hemisphere. **Bioscience**, v. 51, n. 2, p. 134-140, 2001.

ZHENG, X. L.; LI, J.; YANG, Z. D.; XIAN, Z. H.; WEI, J. G.; LEI, C. L.; WANG, X. P.; LU, W. A review of invasive biology, prevalence and management of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **African Entomology**, v. 22, p. 68-79, 2014.