

MURILO FONSECA RIBEIRO

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E DE OVIPOSIÇÃO DE *Gonipterus* spp.
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E APLICAÇÕES PARA CRIAÇÃO
LABORATORIAL DA PRAGA E DE SEU PARASITOIDE *Anaphes nitens*
(HYMENOPTERA: MYMARIDAE)**

Botucatu

2023

MURILO FONSECA RIBEIRO

**ASPECTOS REPRODUTIVOS E DE OVIPOSIÇÃO DE *Gonipterus* spp.
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E APLICAÇÕES PARA CRIAÇÃO
LABORATORIAL DA PRAGA E DE SEU PARASITOIDE *Anaphes nitens*
(HYMENOPTERA: MYMARIDAE)**

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

Coorientador: Prof. Dr. Brett Philipp Hurley

Botucatu

2023

R484a	Ribeiro, Murilo Fonseca Aspectos reprodutivos e de oviposição de <i>Gonipterus</i> spp. (Coleoptera: Curculionidae) e aplicações para criação laboratorial da praga e de seu parasitoide <i>Anaphes nitens</i> (Hymenoptera: Mymaridae) / Murilo Fonseca Ribeiro. -- Botucatu, 2023 83 p. : tabs., fotos, mapas Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu Orientador: Carlos Frederico Wilcken Coorientador: Brett Philipp Hurley 1. Controle Biológico de Pragas. 2. Entomologia Florestal. 3. Eucalipto. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ASPECTOS REPRODUTIVOS E DE OVOPOSIÇÃO DE *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) E APLICAÇÕES PARA CRIAÇÃO LABORATORIAL DA PRAGA E DE SEU PARASITOIDE *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae)

AUTOR: MURILO FONSECA RIBEIRO

ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

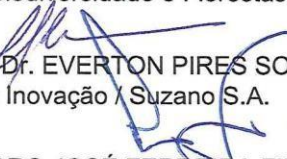
COORIENTADOR: BRETT PHILLIP HURLEY

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciência Florestal, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN (Participação Presencial)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu UNESP

 Prof.ª Dr.ª NÁDIA CRISTINA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Agricultura, Biodiversidade e Florestas / Universidade Federal de Santa Catarina

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


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


Prof.ª Dr.ª REGIANE CRISTINA DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas UNESP

Botucatu, 02 de março de 2023.

À minha mãe, Ana Rita

Pelo apoio soberano mesmo quando as incertezas
me abateram, mas nunca a você.

Dedico

Agradecimentos

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

À Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCA/UNESP), particularmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal.

Ao convênio Capes-PrInt-Unesp pela concessão de bolsa de doutorado sanduíche.

À Universidade de Pretória e ao Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) pelo período sanduíche na África do Sul.

Ao Programa Cooperativo sobre Proteção Florestal (PROTEF) e o Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) pelo auxílio financeiro na condução das pesquisas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken, pela amizade, confiança e ensinamentos transmitidos nessa jornada que foi o doutorado.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Brett P. Hurley, pela excelente hospitalidade, mesmo durante uma triste pandemia, por aprimorar minha formação como pesquisador e por me mostrar as belezas da África do Sul.

Ao Prof. Dr. José Raimundo de Souza Passos, pela amizade e pelo auxílio com as análises estatísticas.

Ao Conselho do PPG Ciência Florestal, em especial aos professores Magali, Carmen, Iraê, Raimundo e Danilo pelo tempo compartilhado nas reuniões do conselho e pelo incentivo quando me candidatei ao doutorado-sanduíche.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), meus agradecimentos pela partilha de lutas diárias desse universo mutável dos experimentos com insetos e pelas boas conversas, acadêmicas ou não. Deste grupo levo grandes amigos e colegas de profissão.

Imensa gratidão ao Gabriel Solce e à Gabriela Cavalini que cuidaram das criações de insetos e experimentos enquanto estive fora. Tive o grande prazer de fazer parte da equipe *Gonipterus* com vocês, amigos e profissionais dedicados.

Aos colegas da FABI e do Biocontrol Center, na África do Sul. Muito obrigado por acolherem um brasileiro perdido, pelas discussões acadêmicas de alto nível, pelas risadas e pelos momentos que levarei para sempre em minha memória.

À minha família, em especial à minha mãe, meu pai, minhas irmãs e minhas tias. Que me acompanharam durante a jornada, me impulsionaram e me apoiaram. Amo vocês.

Ao Rafa, que nunca desistiu de mim, me apoiou, amou e foi fundamental nesses anos, seja a 130 km ou um oceano Atlântico de distância. Pelo nosso plano de vida juntos. Te amo!

“A educação é o grande motor do desenvolvimento pessoal. É através dela que a filha de um camponês se torna médica, que o filho de um mineiro pode chegar a chefe de mina, que o filho de trabalhadores rurais pode chegar a presidente de uma grande nação”

MANDELA, N.R. **Long walk to freedom:** The autobiography of Nelson Mandela. Back Bay Books, 1995. p. 656.

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* está entre os gêneros de árvores mais plantados no mundo e está sujeito ao ataque de pragas. Conhecidos popularmente como gorgulho-do-eucalipto, besouros desfolhadores do gênero *Gonipterus* (Coleoptera: Curculionidae) foram relatados como praga exótica na África, América, Europa e Oceania. No Brasil, a espécie predominante em surtos é *Gonipterus platensis* Marelli, enquanto na África do Sul a espécie existente é *Gonipterus* sp. 2. O controle biológico é atualmente uma das principais estratégias de manejo desses insetos-praga, com destaque para a utilização de parasitoides de ovos, como *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). Contudo, a multiplicação destes insetos em laboratório é um desafio, uma vez que podem ficar semanas sem oviposição. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de oviposição e cópula de *Gonipterus* spp. visando otimizar condições de criação de *Gonipterus* spp. e *A. nitens*. No primeiro capítulo a dispersão geográfica de *G. platensis* no Brasil foi atualizada a partir do primeiro relato do inseto para Minas Gerais, território que concentra a maior área de plantações florestais no país. No segundo capítulo foi abordada a influência de poliandria e macho impositivo nos aspectos reprodutivos de *G. platensis* em laboratório. Os experimentos foram conduzidos com insetos virgens submetidos a tratamentos de monogamia e poliandria com e sem chance de escolha, ou modificando o número de machos presentes durante o período reprodutivo das fêmeas com avaliação dos períodos de pré-oviposição e oviposição, fertilidade e fecundidade. Influências negativas não foram encontradas associadas a macho impositivo em laboratório e o tratamento de poliandria com chance de escolha apresentou os maiores período de oviposição, fecundidade e número de ovos por escatoteca. No terceiro capítulo foi avaliado o tempo ótimo de armazenamento em geladeira a 7°C de ovos de *G. platensis* para criação e multiplicação do parasitoide *A. nitens*. O período de 20 dias de armazenamento foi o maior tempo encontrado sem interferências negativas em *G. platensis* ou *A. nitens*. O quarto capítulo teve como objetivo adaptar uma dieta artificial merídica, que possa ser utilizada em criação laboratorial de *Gonipterus* spp. Embora, nenhuma formulação tenha mostrado resultados aceitáveis para implementação, o capítulo apresenta avanços e hipóteses para a formulação e melhoria dos aspectos nutricionais. O quinto capítulo envolve apresentação e discussão sobre as diferenças

de criação, sobrevivência e comportamento entre *G. platensis* e *G. sp. 2* no Brasil e na África do Sul.

Palavras-chave: gorgulho-do-eucalipto; armazenamento a frio; criação de laboratório; comportamento reprodutivo; dieta artificial; poliandria.

ABSTRACT

The *Eucalyptus* genus is among the most planted genus of trees in the world and is susceptible to insect pests' attack. Popularly known as *Eucalyptus* snout-beetle or *Eucalyptus* weevil, defoliating beetles of the genus *Gonipterus* (Coleoptera: Curculionidae) have been reported as an exotic pest in Africa, America, Europe, and Oceania continents. In Brazil, *Gonipterus platensis* Marelli is the predominant species in outbreaks, while in South Africa the present species is *Gonipterus* sp. 2. Biological control is currently one of the main management strategies for these pests, with emphasis on the use of egg parasitoids, such as *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae). However, rearing *Gonipterus* spp. in laboratory facilities is a challenge since they can remain weeks without oviposition. The aim of this work was to evaluate *Gonipterus* spp. oviposition and mating and optimize rearing conditions for *Gonipterus* spp. and *A. nitens*. In the first chapter, the geographic dispersion of *G. platensis* in Brazil was updated based on the first report of the insect in the State of Minas Gerais, a territory that concentrates the largest area of forest plantations in the country. In the second chapter, the influence of polyandry and male harassment on the reproductive aspects of *G. platensis* in the laboratory was discussed. The polyandry experiments were carried out with virgin insects submitted to treatments of monogamy, polyandry with choice, and polyandry without choice. The number of males present during females' reproductive period was modified to evaluate male harassment behavior. Periods of pre-oviposition and oviposition, fertility and fecundity were evaluated in all experiments. No negative influences were found associated with male harassment in the laboratory, and the polyandry with choice treatment presented the greatest oviposition period, fecundity, and number of eggs per egg capsule. In the third chapter, the optimal cold storage at time of *G. platensis* eggs was evaluated for rearing the insect and for multiplication of the parasitoid *A. nitens*. The period of 20 days of storage was the longest storage time found without negative interference in *G. platensis* or *A. nitens*. The fourth chapter aimed to adapt an artificial meridian diet that could be used in laboratory rearing of larvae and adults of *Gonipterus* spp. Although no formulation has shown acceptable results for implementation, the chapter presents advances and hypotheses for the formulation and improvement of its nutritional aspects. The fifth chapter involves presentation and discussion about the

differences in rearing, survival and behavior between *G. platensis* and *G. sp. 2* in Brazil and South Africa.

Keywords: eucalyptus snout beetle; eucalyptus weevil; cold storage; laboratory rearing; artificial diet; polyandry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO 1 – GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF <i>Gonipterus platensis</i> (COLEOPTERA CURCULIONIDAE) IN BRAZIL: FIRST DETECTION ON EUCALYPTUS PLANTATIONS IN THE STATE OF MINAS GERAIS AND DETECTION OF ITS PARASITOID <i>Anaphes nitens</i> (HYMENOPTERA: MYMARIDAE).....	22
1.1 Scientific Note.....	22
1.2 References.....	26
CAPÍTULO 2 – POLYANDRY CONTRIBUTES TO <i>Gonipterus platensis</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) REARING.....	29
2.1 Abstract.....	29
2.2 Introduction.....	30
2.3 Material and Methods.....	32
2.3.1 <i>Gonipterus platensis</i> rearing.....	32
2.3.2 Poliandry.....	32
2.3.3 Male harassment.....	33
2.3.4 Statistical analyses.....	34
2.4 Results.....	35
2.4.1 Poliandry.....	35
2.4.2 Male Hassment.....	36
2.5 Discussion.....	38
2.6 Conclusion.....	40
2.7 References.....	41
CAPÍTULO 3 – ARMAZENAMENTO A FRIO DE OVOS DE <i>Gonipterus platensis</i> (COLEOPTERA: CURCULIONDAE) PARA MULTIPLICAÇÃO DO PARASITOIDE <i>Anaphes nitens</i> (HYMENOPTERA: MYMARIDAE).....	44
3.1 Resumo.....	44
3.2 Introdução.....	45
3.3 Material e Métodos.....	46
3.3.1 Criação de <i>Gonipterus platensis</i>	46
3.3.2 Criação de <i>Anaphes nitens</i>	46

3.3.3 Armazenamento de ovos de <i>G. platensis</i>	47
3.3.4 Armazenamento de ovos de <i>G. platensis</i> para multiplicação de <i>A. nitens</i>	47
3.3.5 Análise Estatística.....	48
3.4 Resultados.....	49
3.4.1 Armazenamento de ovos de <i>G. platensis</i>	49
3.4.2 Armazenamento de ovos de <i>G. platensis</i> para multiplicação de <i>A. nitens</i>	51
3.5 Discussão.....	52
3.6 Conclusão.....	54
3.7 Referências.....	54
CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE DIETA ARTIFICIAL PARA <i>Gonipterus</i> sp. 2 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE).....	58
4.1 Resumo.....	58
4.2 Abstract.....	58
4.3 Introdução.....	59
4.4 Material e Métodos.....	60
4.4.1 Criação de <i>Gonipterus</i> sp. 2.....	60
4.4.2 Bioensaio com larvas de <i>Gonipterus</i> sp. 2.....	61
4.4.3 Bioensaios com adultos de <i>Gonipterus</i> sp. 2.....	62
4.5 Resultados.....	63
4.5.1 Bioensaio com larvas de <i>Gonipterus</i> sp. 2.....	63
4.5.2 Bioensaios com adultos de <i>Gonipterus</i> sp. 2.....	64
4.6 Discussão.....	65
Referências.....	68
CAPÍTULO 5 – CRIAÇÃO LABORATORIAL DE <i>Gonipterus</i> <i>platensis</i> E <i>Gonipterus</i> sp. 2 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE).....	70
5.1 Protocol & Techniques.....	70
5.2 Referências.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui uma área de 9,93 milhões de hectares de florestas plantadas, dos quais, 7,53 milhões de hectares (75,8%) com eucalipto (IBÁ, 2022). A África do Sul, por sua vez, possui a maior área de florestas plantadas do continente africano, com aproximadamente 1,21 milhão de hectares, dos quais 520 mil ha (43%) são destinados aos plantios de eucalipto (GODSMARK e OBERHOLZER, 2019). Em ambos os países, fatores como o aumento da globalização, com conseguinte aumento do comércio internacional e movimentação de pessoas, o modo de produção na forma de maciços florestais homogêneos, a falta de materiais genéticos resistentes e a ausência de inimigos naturais favorece a introdução e estabelecimento de insetos-praga que podem causar danos às plantas hospedeiras (COSTA et al., 2014; HURLEY et al., 2016; MEURISSE et al., 2019; ADAME et al., 2022).

Os primeiros relatos de insetos exóticos atacando *Eucalyptus* foram registrados na Nova Zelândia no final do século XIX com expressivo aumento de introduções observado entre 1986 e 2014 em escala mundial devido principalmente ao aumento do comércio global (HURLEY et al., 2016; MEURISSE et al., 2019). Neste período, em uma análise global, uma nova espécie de praga exótica foi detectada para cada 1,4 anos fora do ambiente nativo na cultura do eucalipto (HURLEY et al., 2016). Atualmente, os plantios de *Eucalyptus* têm sido afetados pela introdução de novas pragas exóticas e com a ressurgência de outras consideradas estabelecidas e controladas (SOUZA et al., 2016).

Gonipterus "scutellatus" (Coleoptera: Curculionidae) representa um complexo de espécies crípticas que inclui pelo menos oito espécies diferentes de besouros desfolhadores australianos, sendo que três destas espécies são consideradas pragas exóticas nos continentes Africano, Europeu, Oceânico e Américas do Norte e do Sul por se alimentarem de várias espécies de *Eucalyptus* (MAPONDERA et al. 2012; SCHRÖDER et al., 2020). Duas destas espécies podem ser encontradas no Brasil, sendo que *Gonipterus pulverulentus* Lea é uma praga secundária encontrada apenas na Região Sul, enquanto *G. platensis* Marelli é mais fácil de se encontrar no país e relaciona-se com surtos populacionais nas regiões Sul e Sudeste (WILCKEN e OLIVEIRA, 2015; SOUZA et al., 2016). Na África do Sul, pode ser encontrada a

espécie *Gonipterus* sp. 2 (ainda sem descrição taxonômica), detectada pela primeira vez em 1916 (SCHRÖDER et al., 2020).

Tanto a fase adulta quanto a larval de *Gonipterus* spp. se alimentam do limbo foliar das espécies hospedeiras, sendo que as principais injúrias e danos econômicos são causados pela alimentação das fases larvais. Larvas de primeiro e segundo ínstar se alimentam raspando as folhas, sem causar a perfuração do limbo. Quando atingem o terceiro e quarto ínstar se alimentam de todo limbo foliar (TOOKE, 1955; SANCHES, 1993). Os danos relacionados a estes insetos incluem desfolha da copa, perda de dominância apical, produção de crescimentos epicórmicos e bifurcação de fuste (TOOKE, 1955; SANCHES, 1993), o que pode causar perda de produtividade de até 42,8% no incremento médio anual (IMA) em híbridos *E. grandis* x *E. dunnii* no Brasil e perda de madeira de mais de 85% em *E. globulus* em Portugal (REIS et al., 2012; SOUZA et al., 2016).

Como *Eucalyptus* spp. e *Gonipterus* spp. são exóticos tanto para a África do Sul quanto para o Brasil o controle biológico clássico é uma estratégia adotada para o manejo da população de pragas, em que os inimigos naturais são importados do ambiente nativo, visando o estabelecimento permanente, mantendo a população de pragas abaixo do limiar de dano econômico (KENIS et al., 2019). O parasitoide de ovos *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) foi introduzido pela primeira vez na África do Sul em 1926 para controlar *Gonipterus* sp. 2 e devido ao sucesso de controle foi, posteriormente, introduzido em outros países onde *Gonipterus* foi encontrado (TRIBE, 2005), incluindo países da América do Sul. No entanto, em algumas áreas apenas *A. nitens* não é suficiente para controlar a praga e surtos de *Gonipterus* ainda são um problema (MAPONDERA et al., 2012; REIS et al., 2012; SOUZA et al., 2016), o que leva à busca de novos inimigos naturais, com ênfase em outras espécies de parasitoides de ovos como *A. inexpectatus* Huber e Prinsloo, *A. tasmaniae* Huber e Prinsloo, *Centrodora damoni* Girault (Hymenoptera: Aphelinidae) e *Euderus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) (VALENTE et al., 2017a; SCHRÖDER et al., 2021; SOUZA et al., 2021).

A partir da ressurgência de surtos de *Gonipterus* ao redor do mundo, outras estratégias de controle vêm sendo adotadas e pesquisadas visando a implementação do manejo integrado de pragas (MIP) para o inseto. Outros agentes de controle que atuam sobre diferentes fases do inseto, além dos ovos, foram acrescentados ao plano de controle biológico de *Gonipterus*. O parasitoide *Anagonia* sp. (Diptera: Tachinidae)

foi relatado parasitando larvas de *Gonipterus* sp. em campo em seu ambiente de origem (SOUZA et al., 2021) e seu potencial de liberação para controle em outros países tem sido avaliado. O parasitoide *Entedon magnificus* Girault & Dodd (Hymenoptera: Eulophidae) foi registrado parasitando larvas de *G. platensis* na Tasmânia (GUMOVSKY et al., 2015), porém sua criação em laboratório apresentou dificuldades de estabelecimento. No Brasil, o controle de larvas em condição de pré-surto tem sido realizado com a liberação do percevejo predador *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) após comprovação de eficiência em laboratório (NASCIMENTO et al., 2017). A utilização de nematoides entomopatogênicos tem sido estudada para controle da fase de pupa da praga (DAMASCENA et al., 2020). Inseticidas microbiológicos a base de *Beauveria bassiana* também têm sido utilizados no Brasil para o controle da fase adulta do inseto, principalmente (JORDAN et al., 2021). Não existe, até o momento, inseticida químico registrado para o controle de *Gonipterus* no Brasil. O monitoramento da praga ainda é realizado de maneira visual, em que o monitor observa as árvores e avalia a severidade do ataque. Procurando melhorar essa etapa, estudos utilizando sensoriamento remoto têm sido realizados para identificação de área de desfolha pela praga na África do Sul (LOTTERING et al., 2020) e feromônios têm sido prospectados em *G. platensis* (BRANCO et al., 2020).

Os parasitoides de ovos utilizados no controle biológico devem ser criados em instalações de quarentena antes de novas introduções e somente são liberados em campo após a confirmação de não-interferência em espécies nativas não-hospedeiras (KENIS et al., 2019). Portanto, uma colônia de laboratório estabelecida de *Gonipterus* produzindo ovos frescos é necessária para a multiplicação adequada desses parasitoides, inclusive para *A. nitens*. Contudo, o comportamento de oviposição de *Gonipterus* está longe de ser compreendido e longos períodos de oviposição são comuns em insetos de laboratório ou mesmo daqueles provenientes diretamente de campo. Essa instabilidade de fornecimento de hospedeiros para multiplicação de parasitoides também pode prejudicar as pesquisas iniciais necessárias para o cumprimento dos protocolos de segurança, utilizados em controle biológico clássico, quanto para a multiplicação em laboratório de *A. nitens*, uma vez que *Anaphes* spp. são parasitoides específicos do gênero *Gonipterus* (VALENTE et al., 2017b), e não podem ser criados em hospedeiros alternativos.

Atualmente, a criação laboratorial de *Gonipterus* spp. utiliza ramos frescos contendo folhas jovens de *Eucalyptus* spp. trocadas regularmente demandando o

plântio de árvores suscetíveis próximas às instalações de criação. O desenvolvimento de uma dieta artificial é passo fundamental para a produção de insetos de alta qualidade, que asseguram a confiabilidade de estudos que venham a utilizá-los, assim como a utilização em programas de controle biológico como para estudos laboratoriais (COHEN, 2003). Embora não exista formulação que possa ser utilizada para a criação de *Gonipterus*, dietas merídicas, em que parte dos componentes são inteiramente caracterizados e conhecidos enquanto outros não (COHEN, 2003) foram desenvolvidas para outros besouros desfolhadores e podem servir como base para o desenvolvimento de uma formulação específica (OJIMA et al. 2005; ICHIKI et al. 2011).

Enquanto uma formulação de dieta artificial que permita o desenvolvimento das fases larvais e oviposição pelos adultos de *Gonipterus* de maneira constante ao longo do ano não exista, é possível aprimorar os protocolos atuais a fim de estimular a oviposição e o armazenamento dos ovos para multiplicação de parasitoides.

Poliandria é um comportamento reprodutivo em que fêmeas, de determinada espécie, copulam mais de uma vez com um ou diferentes machos (ARNQVIST e NILSSON 2000). Este comportamento está relacionado a ganhos diretos, como o aumento do fornecimento de esperma para fertilização dos óvulos, nutrientes e estimulantes hormonais fornecidos pelo fluido seminal dos machos (ARNQVIST e NILSSON 2000; OMKAR E PANDEY 2010), e indiretos, como melhor *fitness* da progênie e maior diversidade genética, que pode possibilitar melhor adaptação a novos ambientes (YASUI 1998; BAYOUMY e MICHAUD, 2014; RAFTER et al. 2018). Em laboratório, a alta densidade de indivíduos em um mesmo ambiente permite que estes insetos realizem múltiplas cópulas por machos e/ou fêmeas. Poliandria pode também levar ao aumento da fertilidade e fecundidade de insetos (SCHWARTZ e PETERSON 2006) e o entendimento dessas relações nas criações de *Gonipterus* pode contribuir para estimular a oviposição.

O armazenamento de ovos de *Gonipterus* em baixas temperaturas é uma estratégia adotada tanto para a manutenção de colônias de laboratório quanto para liberações sincronizadas de inimigos naturais durante períodos de surtos populacionais de pragas (COLINET e BOIVIN, 2011). Esta técnica já é utilizada no fornecimento de hospedeiros para a multiplicação de outros parasitoides da família Mymaridae (CHEN e LEOPOLD, 2007; BARBOSA et al., 2018), sendo de fácil aplicação no sistema *Gonipterus*-parasitoides desde que fatores como condições de

armazenamento, tempo ideal e consequências para a progênie dos inimigos naturais seja conhecida.

CAPÍTULO 1

Geographic distribution of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) in Brazil: First detection on eucalyptus plantations in the State of Minas Gerais and detection of its parasitoid *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae)¹

1.1 Scientific Note

The area with forest plantations in Brazil is one of the largest in the world, 9.93 million hectares with 75.8% (7.53 million ha) of eucalyptus plantations with a mean annual productivity of 38.9 m³/ha to produce raw materials, mainly for the bioenergy, pulp and paper and laminate flooring sectors. Minas Gerais is the Brazilian state with the largest area of eucalyptus plantations, more than 2 million hectares, followed by the Mato Grosso do Sul and São Paulo states (IBÁ, 2022) and insect pests, especially exotic ones, damage these plantations.

Gonipterus platensis Marelli (Coleoptera: Curculionidae), native to Australia, is one of the main defoliator beetles of *Eucalyptus* spp. in the world (Schröder et al., 2020). In Brazil, reports of *Gonipterus* spp., date from the 1950s. *Gonipterus platensis* was firstly detected in 1979 in Curitiba, Paraná state, and spread to Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and São Paulo states (Wilcken and Oliveira, 2015). The last major territorial expansion of this insect in Brazil was in the early 2000s, damaging more than 50,000 hectares of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* ('urograndis') plantations in the State of Espírito Santo (Wilcken et al., 2015) followed by its occurrence in the Bahia state (Nanini et al., 2022).

Adults and larvae of *G. platensis* feed on young leaves, mainly in the upper third of the plant, with larvae causing most of the damage. First and second instar larvae scrape the leaf surface without perforating the opposite epidermis and in the third and fourth instars, feed on the entire leaf blade causing complete defoliation

¹Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Brazilian Journal of Biology**

of the tree crown, productivity losses, stag-horned or witches broom appearance (Schröder et al., 2020)

In Brazil, *G. platensis* damaged *Eucalyptus camaldulensis*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. saligna*, *E. viminalis*, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. platyphylla* and the hybrids *E. grandis* x *E. urophylla* ('urograndis') and *E. grandis* x *E. dunnii* (Wilcken et al., 2008; Souza et al., 2016). The damage by this pest varies with the genetic material, from a reduction in the mean annual increment (MAI) of 10.4% in *E. grandis* and 42.8% in *E. grandis* x *E. dunnii* hybrids (Souza et al., 2016) in Brazil and more than 85% in wood production at the end of the cycle in *E. globulus* plantations in Portugal (Reis et al., 2012).

The biological control with the egg parasitoid *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) is the main management strategy for this pest (Schröder et al., 2020). This parasitoid was introduced and established in all regions of Brazil where this pest occurs (Ribeiro et al., 2022).

The objective is to report a new occurrence of *G. platensis* and its parasitoid on eucalyptus plantations in the Minas Gerais state, Brazil.

Adults and egg capsules of *G. platensis* were collected in *E. grandis* x *E. urophylla* plantations in the municipality of Uberlândia and Indianópolis, MG, and sent for taxonomic and molecular identification at the School of Agriculture of the Sao Paulo State University (FCA/UNESP). These materials were deposited in the entomological collection of the Plant Protection Department of the FCA/UNESP. The head and pronotum of adult beetles were macerated and homogenized in a solution of 80 µL of 10% Chelex100 resin (Bio-Rad Laboratories, USA), and 8 µL of proteinase K (20 µg/mL) (Bioline, USA). The samples containing the solutions were transferred to an Infinigen thermocycler (model TC-96CG) and incubated at 95°C for 20 minutes for DNA extraction.

The mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) gene was amplified by polymerase reaction (PCR) using specific primers to identify *G. platensis* and *Gonipterus pulverulentus* Lea (Coleoptera: Curculionidae) (Nanini et al. 2022) (Table 1).

PCR reactions used the standards: 12.5µL of Taq DNA Polymerase (NeoBio); 3.5 µl of milliQ water; 1.5 µL of each Primer (10 µM) and 3.0 µL of subject DNA, totaling 25 µL per reaction. Each PCR cycle had 95°C for 3 minutes; 35 cycles of 95°C for 30s, 58°C for 30s and 72°C for 2 minutes, with final polymerization at 72°C for 10 minutes. The positive control had *G. platensis* individuals reared at the laboratory and *G. pulverulentus* provided by Prof. Alberto S. Correa from the Luiz de Queiroz College of Agriculture of the University of Sao Paulo (ESALQ/USP). The column of the negative DNA control sample was replaced with milliQ water. PCR amplicons were visualized in a 1% agarose gel containing 80 ml of TBE buffer solution; 0.8g of agarose (Neo3Bio) and 0.4µl of DNA GelRed intercalator (NeoBio), in UV light transilluminator (Major Science).

Table 1. Primers used for the molecular identification of *Gonipterus platensis* and *Gonipterus pulverulentus* (Coleoptera: Curculionidae) (Nanini et al., 2022)

Primers	Sequence (5'-3')	Amplified species
Gpul_F	GGTATAGATGTAGATACGCGG	<i>G. pulverulentus</i>
Gpul_R	CGAGTACCGTGCAGGTATTCCTCTTAAT	<i>G. pulverulentus</i>
Gpla_R	TGAATATCGTCGAGGTATACCTCTTAAC	<i>G. platensis</i>
Guni_F	CATGATACTTATTATGTAGTTGCTC	<i>G. pulverulentus</i> and <i>G. platensis</i>

The egg capsules of *G. platensis* were maintained in 5 cm diameter acrylic plates in a biochemical oxygen demand (B.O.D.) chamber at 25±1°C; 60% RH and photoperiod 12:12h (light: dark) until parasitoid emergence.

The morphological and molecular analysis confirmed the adult insects collected as *G. platensis* and its detection in new productive areas of eucalyptus in Brazil reveals that it continues to disperse and adapting to regions with different climatic conditions (Figure 1). The *E. urophylla* and the *E. grandis* x *E. urophylla* hybrids, among the most susceptible hosts to *G. platensis* (Oliveira et al., 2022) and widely planted in Brazil with high productivity, favor the dispersal of this insect.

The egg capsules of *G. platensis* collected were parasitized by *A. nitens*, confirming the joint dispersal of *G. platensis* and its natural enemy. However, outbreaks of this pest indicate the need to include other natural enemies along with *A.*

nitens (Ribeiro et al., 2022), such as the native predatory stinkbug *Podisus nigrispinus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) (Nascimento et al., 2017) to manage this pest. Commercial products using entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* (Jordan et al., 2021) have been registered at Brazilian Ministry of Agriculture and entomopathogenic nematodes have been studied in the laboratory to manage this pest (Damascena et al., 2020)



Figure 1. Geographic distribution of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) in Brazil.

Exotic pests such as *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), *Leptocybe invasa* Fisher and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) and *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) already reduce productivity of eucalyptus plantations in the Minas Gerais state (Wilcken et al., 2010), where the establishment of *G. platensis* is a cause of concern. The detection of this pest in this state, with the largest area planted with eucalyptus in Brazil, must be evaluated and control measures adopted to reduce and/or to prevent productivity losses and to restrict its dispersal.

Acknowledgments

To Prof. Alberto S. Correa and Frederico Nanini from the Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) for helping us with the positive control sample. To the Brazilian institutions “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)”, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Finance Code 001)”, “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” and “Programa Cooperativo sobre Proteção Florestal (PROTEF) do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF)” for financial support.

1.2 References

- DAMASCENA, A. P., DE CARVALHO, V. R., RIBEIRO, M. F., HORTA, A. B., CASTRO E CASTRO, B. M., ZANUNCIO, A. J. V., WILCKEN, C. F., ZANUNCIO, J. C. and WILCKEN, S. R. S., 2020. *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) parasitizing *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Royal Society Open Science*, vol. 7, no. 8, 200282. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.200282>
- IBÁ, 2022 [viewed 03 January 2023]. Annual Report. Available from: relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf
- JORDAN, C., DOS SANTOS, P. L., OLIVEIRA, L. R. D. S., DOMINGUES, M. M., GÊA, B. C. C., RIBEIRO, M. F., MASCARIN, G. M. and WILCKEN, C. F., 2021. Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, 7233. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86638-9>
- NANINI, F., ROSSETTI, V.Z., SOLIMAN, E.P., ZAUZA, E.A.V., BENATTI, T.R. and CORREA, A.S., 2022. Molecular identification and phylogeography of *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) in Brazil. *Austral Entomology*, vol. 61, no. 4, pp. 462-471. <https://doi.org/10.1111/aen.12623>
- NASCIMENTO, L. I., SOLIMAN, E. P., ZAUZA, E. Â. V., STAPE, J. L. and WILCKEN, C. F. 2017., First global record of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) as predator of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) larvae and

- adults. *Florida Entomologist*, vol. 100, no. 3, pp. 675-677. <https://doi.org/10.1653/024.100.0331>
- OLIVEIRA, N. C., RIBEIRO, M. F., OTTATI, A., DE SOUZA TAVARES, W., SERRÃO, J. E., ZANUNCIO, J. C., ZANETTI, R. and WILCKEN, C. F. 2022., The survival, development, and reproduction of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) on the main *Eucalyptus* (Myrtaceae) genotypes planted in Brazil. *PeerJ*, vol. 10, no. 1, e13698. <http://doi.org/10.7717/peerj.13698>
- RIBEIRO, M. F., CARVALHO, V. R., FAVORETO, A. L., DE MARCHI, B. R., BELLO, V. H., JORDAN, C., SOLIMAN, E. P., ZANUNCIO, J. C., SABATTINI, J. A. and WILCKEN, C. F. 2022., Symbiotic bacteria in the relationship between *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) and *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Austral Ecology*, 00, pp 1-15. <https://doi.org/10.1111/aec.13259>
- REIS, A. R., FERREIRA, L., TOMÉ, M., ARAUJO, C. and BRANCO, M. 2012., Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management*, vol. 270, no. 1, pp. 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.01.038>
- SCHRÖDER, M. L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J. and HURLEY, B. P. 2020., Invasion history and management of *Eucalyptus* snout beetles in the *Gonipterus scutellatus* species complex. *Journal of Pest Science*, vol. 93, no. 1, pp. 11-25. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01156-y>
- SOUZA, N. M., JUNQUEIRA, L. R., WILCKEN, C. F., SOLIMAN, E. P., CAMARGO, M. B., NICKELE, M. A. and BARBOSA, L. R. 2016. [Viewed 24 January 2023]. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Available from: <https://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr209.pdf>
- WILCKEN, C. F. and OLIVEIRA, N. C. 2015. Gorgulho-do-eucalipto, *Gonipterus platensis* Marelli. In: E. F. VILLELA and R. A. ZUCCHI. *Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros*. Piracicaba. FEALQ, pp. 779-791.

WILCKEN, C., SOLIMAN, E. P., DE SÁ, L., BARBOSA, L. R., DIAS, T. K. R., FERREIRA-FILHO, P. J., and OLIVEIRA, R. J. R. 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research*, vol. 50, no. 2, pp. 201-205.

CAPÍTULO 2

Polyandry contributes to *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) rearing²

2.1 Abstract

Gonipterus platensis (Coleoptera: Curculionidae) is one of the main defoliating beetles in *Eucalyptus* plantations and biological control with egg parasitoids is one of the strategies to control it. To rear these parasitoids a constant supply of *G. platensis* fresh eggs is necessary. Polyandry can influence *Gonipterus* oviposition by increasing female fecundity and fertility. However, the high density of individuals in laboratory colonies can lead to male harassment, resulting in negative effects as lower reproduction rate. The aim of this study was to measure the effects of monogamy and polyandry on the reproduction of *G. platensis* and the effects of male harassment on laboratory rearing conditions. The experiment was conducted with one month old insects divided according to the treatments: monogamy, no choice polyandry, and polyandry with choice. Reproductive parameters were evaluated for seven months. Another experiment varying the density of males was conducted to evaluate negative effects associated with male harassment. Polyandry with choice resulted in the longest period of oviposition, highest fecundity and number of eggs per egg capsules when compared to monogamous females. Any negative influences related to male harassment in the laboratory was detected, such as decreased fertility, fecundity, or number of eggs per egg capsule. In conclusion, polyandry contributes to mass rearing as it increases fecundity and oviposition period on females and there is no evidence of male harassment on *G. platensis*.

Keywords: Eucalyptus snout-beetle; Fecundity; Fertility; Male Harassment; Monogamy

²Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Behavioral Ecology**

2.2 Introduction

Gonipterus platensis (Coleoptera: Curculionidae), also known as *Eucalyptus* snout-beetle, are native to Australia but invasive in several countries; they are considered one of the main defoliating beetles in *Eucalyptus* plantations worldwide (Mapondera et al. 2012; Hurley et al. 2016; Schröder et al. 2020). Infestations of *G. platensis* can result in considerable productivity loss, such as a 42.8% reduction in the Mean Annual Increment (MAI) in *E. grandis* x *E. dunnii* hybrids, reported in Brazil (Souza et al. 2016), and wood loss of more than 85% in *E. globulus*, reported in Portugal (Reis et al. 2012). Damage is mainly caused by the larval phase of these insects.

The first control strategy for *Gonipterus* spp. occurred with the introduction of the egg parasitoid *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) in South Africa in 1926 (Tooke, 1955). The success of this control in South Africa led to the introduction of this parasitoid in other countries, including in South America and Europe for the control of *G. platensis* (at that stage thought to be the same species as present in South Africa – see Mapondera et al. 2012). Currently, biological control is considered one of the main control strategies for *Gonipterus* spp. (Schröder et al. 2020). However, recent outbreaks have motivated the search for new natural enemies in the region of origin of these insects, with emphasis on other species of egg parasitoids such as *Anaphes inexpectatus* Huber and Prinsloo and *Centrodora damoni* Girault (Hymenoptera: Aphelinidae) (Garcia et al. 2019; Schröder et al. 2021; Souza et al. 2021).

When natural enemies are imported as part of a Classical Biological Control (CBC) programme, the natural enemies must be reared in certified quarantine facilities to confirm non-interference in non-host native species before they are released in the field (Kenis et al. 2019). The natural enemies are often reared on the target host insect in the quarantine facility. An adequate understanding of the biology of the host insect is required to establish a healthy colony of the host insect, and thus of the natural enemy. In the case of importing new parasitoids for the control of *G. platensis*, an established laboratory colony producing fresh eggs is fundamental for the multiplication of these parasitoids. However, the factors that influence *Gonipterus* oviposition are not fully understood and long periods without oviposition are common.

Polyandry, namely when a female mates with different males, has been reported for *G. platensis* (Santolamazza Carbonne and Cordero Rivera 1998; Arnqvist and Nilsson 2000). Adults of this insect have an average mating period of seven hours, reaching a maximum of 55 hours (Santolamazza Carbonne and Cordero Rivera 1998), but the female does not lay eggs directly after mating, being free to mate again with different males. Polyandry is commonly found in insects, but its effects on females are complex and can lead to increased risks of predation, infection, or physical injuries by males (Arnqvist and Nilsson 2000; Crudgington and Siva-Jothy 2000). To balance the possible negative effects, reproductive gains must occur in return, commonly related to increase in female fecundity and fertility, faster development and increase on progeny survival (Bayoumy and Michaud 2014; Fan et al. 2015). Polyandry can also lead to the production of more genetically diverse progeny when compared to females that mated only once, potentially increasing the ability of the new generation to adapt to and establish in a new location (Yasui 1998; Rafter et al. 2018)

The high density of individuals in laboratory colonies allows promiscuous behavior, with multiple mates by males and females. In nature, females have the option of avoiding areas with a high density of males that is not possible in the laboratory. In this condition, the high number of males can lead to male harassment, a sexual coercion where males repeatedly try to copulate with unreceptive females (Hollander and Gwynne 2009), resulting in lower female longevity, reproduction rate, number of eggs per oviposition, and changes in behavior, e.g., when high male densities at the oviposition site induce females to change their oviposition preferences (Gay et al., 2009; Bacon and Barbosa 2020). In these situations, the harm related to multiple copulations and/or attempts can outweigh the benefits. To better understand the dynamics of polyandry in the laboratory, it is necessary to assess possible negative aspects of male harassment and how the costs and benefits of multiple copulations interact with each other (Hollander and Gwynne 2009).

The aim of this study was to measure the effects of monogamy and polyandry on the reproduction of *G. platensis* and the effects of the constant presence of males on laboratory rearing conditions for biological control programs. Our hypotheses were that (1) polyandry stimulates female fertility and fecundity (2) cohabitating with males, and thus male harassment, decreases female fecundity and the number of eggs per egg capsule.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 *Gonipterus platensis* rearing

Gonipterus platensis adults were reared in wooden cages (40 x 45 x 80 cm) with a glass top and voile fabric sides. Each cage contained 25 couples, fed with tender leaves and shoots of *Eucalyptus urophylla*, forming a bouquet of branches. The bouquets were placed in 500mL plastic containers with water within the cages. The leaves also served as an oviposition substrate. The cages were kept in an environment-controlled room, with temperature at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity at $50\pm 10\%$ and a photoperiod of 12:12h.

The egg capsules collected from the rearing were kept in 5 cm diameter acrylic plates in the same room. The hatching of the larvae was evaluated daily, and they were transferred to a specific bouquet for feeding, where they remained until the pre-pupa stage, when they stop feeding and move towards the bottom of the cage. For pupation, 10 pre-pupae were placed in 1L plastic containers with 150g of autoclaved sand moistened with 15mL of distilled water, until adult emergence.

2.3.2 Poliandry

To measure the effect of polyandry, newly emerged insects were separated according to sex in wooden cages following the rearing protocols. When the insects were one month old, they were confined in couples in 1 liter plastic containers (11 x 14 x 9 cm) with a branch of *E. urophylla*, one of the best hosts for *G. platensis* (Oliveira et al., 2022), and divided according to the treatments: (1) female was allowed to mate daily with the same male (monogamy), (2) female was allowed to mate daily with a different male (no choice polyandry), (3) female was allowed to mate daily, being able to choose between five different males (polyandry with choice). The insects were placed together every day at 8:00 am and separated after mating was completed or at the end of the daily evaluations, at 6:00 pm. Females were kept isolated after the first oviposition. There was no differentiation between virgin and non-virgin males, as there is no difference between mate duration or volume of sperm by males (Santolamazza Carbonne and Cordero Rivera 1998).

The branches were replaced every 3 days, serving both as food and oviposition substrate. The oviposited egg capsules were collected daily, and the eggs were kept in a biochemical oxygen demand (B.O.D.) chamber at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; RH 60% and photoperiod 12:12h until hatching. Five days after the end of the last hatching, the egg capsules were dissected using a Nikon SMZ645 stereomicroscope to count infertile eggs and no hatched larvae.

The number of mates until the first oviposition, the pre-oviposition period (period from the first mating to the first oviposition); oviposition period (period between the first and last oviposition); total number of eggs; percentage of infertile eggs and number of eggs per egg capsule were evaluated for seven months.

To measure the effect on progeny we analyzed 10 larvae of each female from treatments 1 to 3, each larva was kept in a 500 mL plastic container (9.5 x 11 x 7.5 cm) and fed with *E. urophylla* until it reached the pre-pupal stage. Larval development time, mortality and pre-pupal mass were evaluated.

2.3.3 Male harassment

To measure the effects of male harassment, newly emerged *G. platensis* were sexed and separated following the same procedures as above and later divided according to the treatments, using virgin insects: (H1) female mated once and kept isolated after mating; (H2) female stayed together with the same male during reproductive period; (H3) female stayed together with two males during reproductive period. Each treatment had 10 replicates and were evaluated for 11 months

The branches were replaced every three days, serving both as food and oviposition substrate. The oviposited egg capsules were collected daily, and the eggs were kept in a biochemical oxygen demand (B.O.D.) chamber at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; RH 60% and photoperiod 12:12h until hatching. Five days after the end of the last hatching, the egg capsules were dissected using a Nikon SMZ645 stereomicroscope to count infertile eggs and no hatched larvae.

To measure the effect on progeny we analyzed 10 larvae of each female from treatments H1 to H3, each larva was kept in 500 mL plastic containers (9.5 x 11 x 7.5 cm) and fed with *E. urophylla* until they reached the pre-pupal stage. Larval development time, mortality and pre-pupal mass were evaluated.

2.3.4 Statistical analyses

The statistical analyzes of both experiments were adjusted according to generalized linear models (Nelder & Wedderburn, 1972) and varied according to the distribution and linkage function (Table 1).

The quality of the residues was fitted in all models through the analysis of deviations (deviance), standardized Pearson residuals plots. For comparisons between treatments, the Tukey-Kramer test (Westfall, et al., 1999) of the genmod procedure of the SAS statistical program – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition, was used.

Table 1 – Factors, Distribution and Linkage Function used in the statistical analysis of each of the variables measured for the polyandry and male harassment experiments

Experiment	Response variable	Distribution	Linkage Function
Polyandry	Pre-oviposition; Oviposition; Eggs/egg capsule	Normal	Identity
	Number of mates	Poisson	Logarithmic
	Total of eggs	Negative Binomial	Logarithmic
	Percentage of infertile eggs	Binomial	Logit
Polyandry Progeny	Pre-pupa mass	Normal	Identity
	Development time	Gamma	Logarithmic
Male Harassment	Pre-oviposition; Number of eggs per day	Normal	Identity
	Oviposition; Percentage of infertile eggs; Eggs/Egg capsule	Gamma	Logarithmic
	Total of eggs	Negative Binomial	Logarithmic
Male Harassment Progeny	Development time; Pre-pupae mass	Gamma	Logarithmic

2.4 Results

2.4.1 Poliandry

Results were analyzed only for females that laid eggs during the evaluation period. The number of matings until the first oviposition was statistically different between treatments ($p=0.0021$). Females on polyandry with choice treatment mated more times when compared to females in the no choice polyandry treatment, but neither of those treatments was significantly different to the monogamy treatment (Table 2). There was no difference on pre-oviposition period between the treatments ($p=0.7162$, Table 2). The oviposition period was statistically different between treatments ($p=0.0312$), being higher in the treatment of polyandry with choice, intermediate in no choice polyandry and lower for monogamy (Table 2).

Table 2 –Number of matings per female, pre-oviposition, and oviposition period (days) (Mean $\pm$ SE) of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) for monogamy, no choice polyandry and polyandry with choice treatments. T=25 $\pm$ 1°C; RH 60% and photoperiod 12:12h

Treatment	N*	Number mating	Pre-oviposition	Oviposition
Monogamy	9	2,44 $\pm$ 0,41 ab	45,44 $\pm$ 8,66 a	76,56 $\pm$ 22,34 b
Polyandry no choice	7	1,29 $\pm$ 0,18 b	40,86 $\pm$ 13,02 a	109,06 $\pm$ 23,06 ab
Polyandry with choice	9	4,11 $\pm$ 0,96 a	34,67 $\pm$ 9,81 a	151,33 $\pm$ 16,99 a

Means followed by the same letter on the column did not differ by the Tukey-Kramer test ($p<0,05$).

N* = number of replications

The total number of eggs were statistically different between treatments ($p=0.0196$). The total number of eggs was highest in the treatment of polyandry with choice, which was significantly higher than for the monogamy treatment (Table 3). The total number of eggs for the no choice polyandry treatment was intermediate and not significantly different to the other treatments. The percentage of infertile eggs was not statistically different between the treatments ($p=0.8289$, Table 3). The number of eggs/egg capsule was statistically different between treatments ($p=0.0095$), with the number of eggs/egg capsule being significantly lower in the monogamy treatment as compared to polyandry with choice and no choice polyandry (Table 3).

Table 3 - Number of eggs, percentage of infertile eggs and number of eggs per egg capsule (Mean $\pm$ ep) of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) on monogamy, no choice polyandry and polyandry with choice treatments. T=25 $\pm$ 1°C; RH 60% and photoperiod 12:12h

Treatment	Number of eggs	Infertile eggs (%)	Eggs/Egg capsule
Monogamy	145,56 $\pm$ 53,94 b	6,30 $\pm$ 1,78 a	3,67 $\pm$ 0,48 b
Polyandry no choice	240,29 $\pm$ 61,78 ab	7,05 $\pm$ 1,32 a	4,95 $\pm$ 0,26 a
Polyandry with choice	361,00 $\pm$ 76,95 a	8,31 $\pm$ 2,34 a	5,28 $\pm$ 0,36 a

Means followed by the same letter on the column did not differ by the Tukey-Kramer test ($p < 0,05$).

The number of larvae evaluated in the progeny varied according to the oviposition of females in each treatment (Table 4). The mortality in all treatments varied among 35,19 and 40,00%. The total development time of the larvae was not statistically different between the treatments ($p = 0.9139$, Table 4). Pre-pupae mass was also not statistically different between the treatments ($p = 0.1303$, Table 4).

Table 4 – Total number of larvae (N), total larval development period (days), mortality (%) and pre-pupa mass (g) (Mean $\pm$ ep) of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) progeny on monogamy, no choice polyandry and polyandry with choice treatments. T=25 $\pm$ 1°C; RH 60% and photoperiod 12:12h

Treatment	N	Mortality (%)	Larval Development Time (days)	Pre-pupae mass (g)
Monogamy	54	35,19	19,41 $\pm$ 0,37 a	0,109 $\pm$ 0,006 a
Polyandry no choice	64	39,06	19,28 $\pm$ 0,36 a	0,121 $\pm$ 0,006 a
Polyandry with choice	90	40,00	19,19 $\pm$ 0,39 a	0,118 $\pm$ 0,004 a

Means followed by the same letter on the column did not differ by the Tukey-Kramer test ($p < 0,05$).

2.4.2 Male harassment

Results were analyzed only for females that laid eggs during the evaluation period. There was no statistical difference in pre-oviposition period ($p = 0.2365$), oviposition period ($p = 0.4979$), the total number of eggs ($p = 0.9089$) and the number of eggs per day ($p = 0.0768$) between the treatments, namely: H1, female mated once and kept isolated after mating; H2, female stayed together with the same male during

reproductive period; and H3, female stayed together with two males during reproductive period (Table 5).

There was a statistical difference in the percentage of infertile eggs between treatments ($p < 0.0001$) being significantly higher in H1 (Table 5). The number of eggs per egg capsule was also statistically different between treatments ($p = 0.0292$), being higher in H3 (Table 5).

Table 5 –Pre-oviposition and oviposition period (days), total number of eggs, infertile eggs (%), eggs per day and eggs/egg capsule (Mean $\pm$ ep) of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) females on different male densities. T=25 $\pm$ 1°C; RH 60% and photoperiod 12:12h

Dependent variable	Number of males during oviposition period		
	0	1	2
Pre-oviposition (d)	57,71 $\pm$ 47,32 a	28,4 $\pm$ 23,14 a	24,9 $\pm$ 22,17 a
Oviposition (d)	216,57 $\pm$ 79,18 a	204,10 $\pm$ 83,28 a	135,70 $\pm$ 106,26 a
Total of eggs	370,00 $\pm$ 165,58 a	317,00 $\pm$ 82,99 a	297,60 $\pm$ 96,58 a
Infertile eggs (%)	44,25 $\pm$ 41,01 a	8,58 $\pm$ 6,60 b	4,31 $\pm$ 3,43 b
Eggs/day	1,57 $\pm$ 1,36 a	1,66 $\pm$ 1,03 a	3,26 $\pm$ 2,30 a
Eggs/egg capsule	4,18 $\pm$ 1,20 b	4,79 $\pm$ 0,68 ab	5,60 $\pm$ 1,17 a

Means followed by the same letter on the line did not differ by the Tukey-Kramer test ($p < 0,05$).

The number of larvae evaluated in the progeny varied according to the oviposition of females in each previous treatment. The total development time of the larvae ($p = 0.8018$) and the pre-pupal mass ($p = 0.4965$) were not statistically different between treatments (Table 6).

Table 6 – Total number of larvae (N), total larval development period (days), mortality (%) and pre-pupa mass (g) (Mean $\pm$ ep) of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) progeny on different parental male densities. T=25 $\pm$ 1°C; RH 60% and photoperiod 12:12h

Number of males during oviposition period	N	Mortality (%)	Larval Development Time (days)	Mass (g)
0	50	30,00	17,67 $\pm$ 0,32 a	0,128 $\pm$ 0,003 a
1	96	32,29	17,68 $\pm$ 0,29 a	0,123 $\pm$ 0,003 a
2	88	28,41	18,00 $\pm$ 0,67 a	0,123 $\pm$ 0,003 a

Means followed by the same letter on the column did not differ by the Tukey-Kramer test ($p < 0,05$).

2.5 Discussion

The study indicated that polyandry with choice is a beneficial mating strategy for *G. platensis* and thus advantageous to facilitate mating strategy in rearing colonies. In agreement with the initial hypothesis, polyandry with choice resulted in the longest period of oviposition, highest fecundity and number of eggs per egg capsules when compared to monogamous females. The polyandry with no choice treatment didn't differ from monogamous or polyandry with choice treatments in almost all parameters, presenting intermediate values among those treatments. In contrast to the initial hypothesis, there were no indications of male harassment in rearing conditions. Therefore, *G. platensis* rearing is favored by the constant presence of males, allowing multiple mates and with no negative interference over the female.

The number of matings until the first oviposition was higher in the polyandry with choice treatment but did not differ from the monogamy treatment. As mating can have gonadotrophic effects increasing female fecundity (Alonzo and Pizzari, 2013) and mate duration in *G. platensis* does not influence the volume of seminal fluid ejaculated (Santolamazza Carbonne and Cordero Rivera 1998) it would be expected that similar fecundity values would be found in both treatments, since the females would receive similar volumes of sperm and seminal fluids. However, the oviposition period was longer and the number of eggs (fecundity) higher for the polyandry treatment and statistically different from monogamy. One possible explanation of this can be by the existence of pseudo-copulations in *G. platensis*, where the male even introduces the aedeagus, but the amount of sperm transferred is very low and unable to inseminate the female (Santolamazza Carbonne and Cordero Rivera 1998). If the same pattern also occurs with the seminal fluid, mating events maybe not be enough to stimulate the female fecundity and hence not a good parameter to measure fecundity in *G. platensis*.

The pre-oviposition period was not affected by the treatments. The seminal fluid provided by the male can accelerate ovulation and oviposition (Gillott 2003) which benefits the female as it allows the production of eggs only when there is enough sperm for fertilization (Avila et al., 2011). In *G. platensis*, the lack of difference on pre-oviposition period between the monogamy and polyandry treatments indicate that the initial presence of seminal fluid is a sufficient stimulus to initiate oviposition, regardless of whether its origin is monogamous or polygamous. On the other hand, the duration

of the oviposition period was longer in the polyandric treatments, with the highest mean found in polyandry with choice, which also had the highest fecundity (number of eggs) and number of eggs per egg capsule when compared to monogamous females. The increase in polyandry-related fecundity may be attributed to an increase in sperm suitable for fertilization and/or nutrients and hormonal stimulants provided by seminal fluid by multiple males (Arnqvist and Nilsson 2000; Omkar and Pandey 2010). Evidence of increased fecundity associated with polyandry can be found in other beetles such as *Chrysochus cobaltinus* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Schwartz and Peterson 2006), *Cheilomenes sexmaculata* (Coleoptera: Coccinellidae), *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Propylea dissecta* (Coleoptera: Coccinellidae) (Omkar and Mishra 2005).

The fertility of *G. platensis* was not affected by the treatments. Fertile eggs were laid even 218 days after the last mating on polyandry with choice treatment. This condition was allowed due to the presence of spermatheca in the female reproductive system, which in *G. platensis* can store viable sperm throughout life (Santolamazza Carbonne and Cordero Rivera 1998).

Progeny characteristics were not influenced by the treatments of monogamy or polyandry. One of the possible positive aspects that can lead a species to polyandrous behavior is the gain of indirect benefits for the progeny, manifested in a better genetic ability to adapt to new environments and greater fitness, which can be inferred from the hatching rate, larval development, and body size (Yasui 1998; Bayoumy and Michaud, 2014; Rafter et al. 2018). Pre-pupal mass and larval development time were used to analyze *G. platensis* progeny, but neither differed significantly between treatments. Theoretically, copulation with different males increases competition between sperm within the spermatheca and biases fertilization towards the group of male gametes with higher fitness (Bayoumy and Michaud, 2014). Females of *G. platensis* when mated with different males fertilize their eggs randomly (Santolamazza Carbonne and Cordero Rivera 1998) and relative gains in progeny could not be identified. The progeny characteristics were compared in the same environment and therefore it is not possible to say whether the genetic diversity of the polyandric treatments can influence the adaptation when subjected to adverse conditions, as observed in *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae), where the progeny of polyandrous females showed better adaptation to higher temperatures (Omkar and Pandey 2010).

When analyzing the reproductive parameters for situations in which females are exposed to different male proportions, it was not possible to detect negative influences related to male harassment in the laboratory, such as decreased fertility, fecundity, or number of eggs per egg capsule (Gay et al. 2009; Bayoumy et al. 2014). The parameters related to the larval development time of the progeny also showed no differences for females exposed to several males.

The percentage of infertile eggs was significantly higher in the treatment in which females remained isolated after mating. Theoretically, enough sperm can be transferred through a single mate, ensuring reproductive success (Arnqvist and Nilsson 2000). The high percentage of infertile eggs ($44.25 \pm 41.01\%$) in the treatment in which the females were isolated after a single mating and the fact that three of these did not even start oviposition indicates that males of *G. platensis* do not provide enough sperm to fertilize all eggs in a single mating, further supporting the importance of polyandry for *G. platensis*. Low fertility negatively impacts the establishment of the base population in the laboratory colony. In addition, egg parasitoids are capable of differentiating between fertile and infertile eggs, the latter having lower rates of parasitism and longer development times and failures of emergence of parasitoid progeny (Krugner 2014; Du et al. 2018), hence infertile eggs are not indicated for biological control rearing programs.

The number of eggs per egg capsule was influenced by the proportion of *G. platensis* males during the female's reproductive period. Females that remained with two males oviposited larger egg capsules than those that were isolated after mating. This result is different from that reported for situations in which male harassment occurs, as observed in *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), where male harassment interferes on the oviposition substrate and induces lower postures due to energy costs and time for females to flee from males (Bacon and Barbosa 2020).

2.6 Conclusion

Polyandry contributes to *G. platensis* rearing as it increases fecundity and oviposition period on females. The increase of number of eggs assists biological control programs that rely on laboratory reared insects, especially egg parasitoids.

There is no evidence of negative characteristics for *G. platensis* egg production or progeny in laboratory rearing associated with male harassment.

2.7 References

- Alonzo SH, Pizzari T. 2013. Selection on female remating interval is influenced by male sperm competition strategies and ejaculate characteristics. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 368(1613), 20120044.
- Arnqvist G, Nilsson T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim Behav.* 60:145-164.
- Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF. 2011. Insect seminal fluid proteins: Identification and function. *Annu. Rev. Entomol.* 56: 21–40.
- Bacon E, Barbosa F. 2020. Male harassment leads to fitness costs for females by disrupting oviposition site preferences. *Behav Ecol.* 31:611-617.
- Bayoumy MH, Michaud JP. 2014. Female fertility in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) is maximized by polyandry, but reduced by continued male presence. *Eur J Entomol.* 111:513-520.
- Crudgington HS, Siva-Jothy MT. 2000. Genital damage, kicking and early death. *Nature.* 407:855-856.
- Du WM, Xu J, Hou YY, Lin Y, Zang LS, Yang X, Zhang JJ, Ruan CC, Desneux N. 2018. *Trichogramma parasitoids* can distinguish between fertilized and unfertilized host eggs. *J Pest Sci.* 91:771-780.
- Fan H, Wang Y, Li J, Zhang G. 2015. Exposure to males reduces the benefit gained from multiple mating in female *Galerucella birmanica* Jacoby (Coleoptera: Chrysomelidae). *Behav Ecol Sociobiol.* 69:109-116.
- Garcia A, Allen GR, Oberprieler RG, Ramos AP, Valente C, Reis A, Franco JC, Branco M. 2019. Biological control of *Gonipterus*: Uncovering the associations between eucalypts, weevils and parasitoids in their native range. *For Ecol Manag.* 443:106-116.
- Gay L, Eady PE, Vasudev RAM, Hosken DJ, Tregenza TOM. 2009. Costly sexual harassment in a beetle. *Physiol Entomol.* 34:6-92.
- Gillott, C. 2003. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 163–84.
- Hollander M, Gwynne DT. 2009. Female fitness consequences of male harassment and copulation in seed beetles, *Callosobruchus maculatus*. *Anim Beh.* 78:1061-1070.

- Hurley BP, Garnas J, Wingfield MJ, Branco M, Richardson DM, Slippers B. 2016. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. *Biol Invasions*.18:921-933.
- Hurst GDD, Sharpe RG, Broomfield AH, Walker LE, Majerus TMO, Zakharov-Gezekhus IA, Majerus MEN. 1995 Sexually transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata*. *Ecological Entomology*, 20:230–236.
- Kenis M, Hurley BP, Colombari F, Lawson SA, Sun J, Wilcken CF, Weeks R, Sathyapala S. 2019. Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests. FAO Forestry Paper
- Krugner R. 2014. Suitability of non-fertilized eggs of *Homalodisca vitripennis* for the egg parasitoid *Gonatocerus morrilli*. *BioControl*, 59: 167-174.
- Mapondera TS, Burgess T, Matsuki M, Oberprieler RG. 2012. Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Austr J Entomol*. 51:175-188.
- Nelder JA, Wedderburn RW. 1972. Generalized linear models. *J R Stat Soc*. 135: 370–384.
- Omkar, Mishra G. 2005. Mating in aphidophagous ladybirds: costs and benefits. *J. Appl Entomol*. 129: 432-436.
- Omkar, Pandey P. 2010. Benefits of polyandry in Parthenium beetle, *Zygogramma bicolorata* Pallister (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Asia-Pac Entomol*. 13:151-155.
- Rafter MA, McCulloch GA, Daglish GJ, Gurdasani K, Walter GH. 2018. Polyandry, genetic diversity and fecundity of emigrating beetles: understanding new foci of infestation and selection. *J Pest Sci*. 91: 287-298.
- Reis AR, Ferreira L, Tomé M, Araujo C, Branco M. 2012. Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. *For Ecol Manag*. 270:216-222.
- Santolamazza-Carbone S, Cordero-Rivera A. 1998. Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the *Eucalyptus* Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). *Etologia*. 6:33-40.
- Schröder ML, Slippers B, Wingfield MJ, Hurley BP. 2020. Invasion history and management of Eucalyptus snout beetles in the *Gonipterus scutellatus* species complex. *J Pest Sci*. 93:11-25.
- Schröder ML, Nahrung HF, Souza NM, Lawson SA, Slippers B, Wingfield MJ, Hurley BP. 2021. Distribution of *Gonipterus* Species and Their Egg Parasitoids in Australia: Implications for Biological Control. *Forests*. 12:969.
- Schwartz SK, Peterson MA. 2006. Strong material benefits and no longevity costs of multiple mating in an extremely polyandrous leaf beetle, *Chrysochus cobaltinus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Behav Ecol*. 17:1004-1010.

- Souza NM, Junqueira LR, Wilcken CF, Soliman EP, Camargo MB, Nickele MA, Barbosa LR. 2016. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Circular Técnica IPEF. 209:01-20. Disponível em <https://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr209.pdf> Acesso 14.03.2022.
- Souza NM, Lawson SA, Nahrung HF. 2021. *Gonipterus* (Coleoptera: Curculionidae) in subtropical Australia: host associations and natural enemies. Austral Entomol. 60:588-597.
- Tooke FGC. 1955. The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. a study of its ecology and control by biological means. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry.
- Valente C, Afonso C, Gonçalves CI, Alonso-Zaragaza MA, Reis A, Branco M. 2017. Environmental risk assessment of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for classical biological control of the *Eucalyptus* snout beetle, *Gonipterus platensis*. BioControl. 62:457-468.
- Westfall PH, Tobias RD, Rom D, Wolfinger RD, Hochberg Y. 1999. Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Yasui Y. 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. Trends Ecol Evol. 13:246-250.

CAPÍTULO 3

Armazenamento a frio de ovos de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) para multiplicação do parasitoide *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae)³

3.1 Resumo

Anaphes nitens Girault (Hymenoptera: Mymaridae) é um parasitoide de ovos utilizado no controle biológico de *Gonipterus* spp. nos países em que esta praga está presente. O objetivo deste trabalho foi determinar o tempo ótimo de armazenamento a baixas temperaturas de ovos de *G. platensis* para criação do hospedeiro e para multiplicação de *A. nitens*. Ovos de *G. platensis* com 1 e 3 dias de idade foram armazenados em geladeira a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ e escuro por períodos de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 dias, sendo calculadas as taxas de eclosão e sobrevivência das larvas ao 7 dia. Para a multiplicação do parasitoide, ovos frescos do hospedeiro foram armazenados em geladeira a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ e escuro por períodos de 5, 10, 15, 20 e 25 dias e posteriormente oferecidos para o parasitoide. Taxas de parasitismo efetiva e total, razão sexual e longevidade da progênie foram avaliadas. Os resultados encontrados para ovos com 1 e 3 dias de idade armazenados mostram os melhores resultados nos 10 primeiros dias, sendo possível obter eclosões superiores a 50% até 20 dias após armazenamento. O período de 20 dias de armazenamento foi o maior tempo de armazenamento encontrado sem interferências negativas no parasitismo de *A. nitens*. Portanto, o armazenamento de ovos por esse período é capaz de manter a multiplicação da colônia hospedeira ao mesmo tempo que contribuiu para a multiplicação do parasitoide.

Palavras-chave: Controle Biológico; Criação-massal; *Eucalyptus*; *Eucalyptus* snout-beetle; Parasitoide de ovos.

³Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Biological Control**

3.2 Introdução

Gonipterus platensis Marelli (Coleoptera: Curculionidae) é um besouro australiano considerado um dos principais desfolhadores de *Eucalyptus* no mundo (Hurley et al., 2016). Adultos e larvas se alimentam de folhas novas e brotações, podendo levar a desfolhas parciais ou totais dos ponteiros, resultando em diminuição de crescimento, bifurcações ou morte das árvores (Reis et al., 2012; Souza et al., 2016; Rua et al., 2020). Atualmente, o controle biológico é a principal estratégia utilizada para o combate destes insetos, com destaque para o parasitoide *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) (Valente et al., 2018)

Anaphes nitens é um parasitoide de ovos, idiobionte, endoparasitário e solitário de origem australiana (Tooke, 1955). Este parasitoide foi liberado globalmente para o controle de *Gonipterus* spp. em época em que se acreditava que *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal era a única espécie invasora deste gênero (atualmente é considerada um complexo de pelo menos 8 espécies crípticas, incluindo *G. platensis*). Por esta razão, *A. nitens* é o principal agente de controle biológico de *Gonipterus* spp. no mundo (Mapondera et al., 2012; Schröder et al., 2020). Fêmeas de *A. nitens* são fracamente sinovigênicas com capacidade de identificar ovos frescos de *G. platensis* e parasitar até 70 ovos do hospedeiro até a morte (Santolamazza-Carbonne e Cordero-Rivera 2003; Santolamazza-Carbonne, Rodríguez-Illamola e Cordero-Rivera 2004; Valente et al., 2017a)

Criações de *A. nitens* para fins de pesquisa ou liberação em campo devem ocorrer em ovos de *Gonipterus* spp., visto que estes parasitoides são específicos para o gênero (Valente et al., 2017b). Contudo, a criação de *Gonipterus* em laboratório é desafiadora, pois estes insetos podem permanecer várias semanas sem oviposição, o que pode levar ao esgotamento da colônia dos parasitoides.

A partir disso, o armazenamento de escatotecas de *G. platensis* em baixas temperaturas pode ser uma solução para a multiplicação de *A. nitens* em laboratório, distribuindo os ovos produzidos naqueles períodos de ausência de hospedeiros frescos.

O armazenamento de ovos de insetos hospedeiros para multiplicação de parasitoides de Mymaridae já foi relatado em ovos de *Homalodisca coagulata* Say (Hemiptera: Cicadellidae) que podem ser armazenados por até 30 dias a 10°C sem efeitos deletérios sobre o parasitoide *Gonatocerus ashmeadi* Girault (Chen e Leopold,

2007) enquanto o parasitoide *Cleruchoides noackae* Lin & Huber apresenta as mesmas taxas de parasitismo em ovos frescos e armazenados de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) a 5°C por até 14 dias (Barbosa et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi determinar o tempo de armazenamento ótimo de ovos de *G. platensis* para multiplicação de *A. nitens*.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Criação de *Gonipterus platensis*

A criação de *G. platensis* ocorreu em sala com condições controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($50\pm 10\%$) e fotoperíodo (12:12h claro: escuro).

Gaiolas de madeira de 40 x 45 x 80 cm, com teto de vidro e laterais de tecido voile foram utilizadas contendo 30 casais de indivíduos adultos, alimentados com folhas tenras e brotações de *Eucalyptus urophylla* formando um feixe de ramos (buquê), acondicionadas em recipientes plásticos de 500mL com água, que serviram também como substrato para oviposição.

3.3.2 Criação de *Anaphes nitens*

Para multiplicação de *A. nitens* foram utilizados tubos de vidro de fundo chato (1,5 x 10 cm), vedados com tecido voile, contendo 2 casais de *A. nitens* alimentados com mel puro e 6 escatotecas com até 24 horas de idade de *G. platensis*, provenientes da criação do laboratório.

Os tubos contendo hospedeiros e parasitoides permaneceram 3 dias em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro) para parasitismo, sendo as escatotecas posteriormente transferidas para placas de acrílico de 5 cm de diâmetro até a emergência da nova geração.

3.3.3 Armazenamento de ovos de *G. platensis*

Escatotecas foram coletadas diariamente a partir da criação de laboratório e distribuídas entre os seguintes tratamentos: (1) escatotecas com 1 dia de idade; (2) escatotecas com 3 dias de idade, sendo ambas armazenadas posteriormente. Os períodos de armazenamento em geladeira no escuro a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ variaram entre 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias para ambas as idades. O tratamento controle consistiu em escatotecas mantidas em sala de criação com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $50\pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12h. Cada escatoteca consistiu em uma parcela, com um total de 25 repetições para cada tratamento. O número de ovos avaliados foi diferente em cada tratamento devido à variação natural em cada escatoteca.

Após o período de armazenamento as escatotecas foram transferidas para placas de acrílico de 5 cm de diâmetro contendo uma folha tenra de *E. urophylla* e mantidas em câmara B.O.D. a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro). O número de larvas eclodidas foi avaliado diariamente, com posterior dissecação da escatoteca para contagem de ovos inférteis e larvas retidas. Adicionalmente, as larvas eclodidas foram mantidas em recipientes plásticos de 1 litro (11 x 14 x 9 cm) com um ramo de *E. urophylla* em câmara B.O.D. a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro) para avaliação de mortalidade 7 dias após a eclosão.

3.3.4 Armazenamento de ovos de *G. platensis* para multiplicação de *A. nitens*

Escatotecas de *G. platensis* foram coletadas diariamente da criação de laboratório e armazenadas em geladeira no escuro a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ com tempo de armazenamento variando entre 5, 10, 15, 20 e 25 dias. O tratamento controle consistiu em escatotecas de até 24 horas mantidas em sala de criação com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $50\pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12h. Cada escatoteca consistiu em uma parcela e cada tratamento possuiu 20 repetições. O número de ovos avaliados foi diferente em cada tratamento devido à variação natural em cada escatoteca.

Após o período de armazenamento a escatoteca foi oferecida para uma fêmea de *A. nitens* copulada de até 48 horas de idade em tubo de vidro de fundo chato (1,5 x 10 cm) vedado com Parafilm durante 24 horas em câmara B.O.D. a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro), alimentada com mel puro. Após o período de parasitismo, as escatotecas foram transferidas para placas de acrílico de 5 cm de

diâmetro e avaliadas diariamente até a eclosão/emergência dos insetos. Dez dias após a última emergência de parasitoides as escatotecas foram dissecadas em estereomicroscópio Nikon SMZ645 para a contagem de insetos retidos.

O parasitismo foi calculado de acordo com as fórmulas: taxa de parasitismo total $TP_{total} = [(n^{\circ} \text{ de parasitoides emergidos} + \text{retidos}) / \text{total de ovos}] * 100$; taxa de parasitismo efetiva $TP_{efetiva} = (n^{\circ} \text{ de parasitoides emergidos} / \text{total de ovos}) * 100$. Após a emergência da progênie, os parasitoides foram individualizados em tubos de vidro, alimentados com mel puro e mantidos em câmara B.O.D. a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro) para avaliação da longevidade.

3.3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram ajustadas de acordo com modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972) e variaram de acordo com a distribuição e função de ligação (Tabela 1).

Para todos os modelos lineares generalizados ajustados, a qualidade dos ajustes foi feita através da análise de desvios (*deviance*), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados. Para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999) do procedimento *genmod* do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition.

Tabela 1 – Fatores, Distribuição e Função de Ligação utilizadas nas análises estatísticas de cada uma das variáveis resposta medidas para os experimentos de Armazenamento de ovos de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae).

Experimento	Variável resposta	Fatores (covariáveis)	Distribuição	Função de ligação
Armazenamento ovos <i>Gonipterus</i>	Percentual de eclosão	Tratamentos; Idade dos ovos	Normal	Identidade
	Percentual de sobrevivência	Tratamentos	Normal	Identidade
Armazenamento ovos <i>Gonipterus</i> / <i>Anaphes</i>	Parasitismo Total	Tratamentos	Gama	Logarítmica
	Parasitismo Efetivo; Razão sexual	Tratamentos	Normal	Identidade
	Longevidade Progênie	Tratamentos; Sexo	Gama	Logarítmica

3.4 Resultados

3.4.1 Armazenamento de *G. platensis*

Os resultados para eclosão de larvas de *G. platensis* apresentaram interação entre os fatores tempo de armazenamento e idade dos ovos ($p < 0,0001$). O tratamento controle (ausência de armazenamento) apresentou eclosão de $94,25 \pm 14,02\%$. Os maiores percentuais para ovos com até 1 dia de idade foram observados após armazenamento por 5 dias ($88,89 \pm 16,60\%$) e 10 dias ($69,4 \pm 30,33$), que não diferiram entre si. O armazenamento por 40 dias apresentou o menor valor ($9,06 \pm 15,59\%$), e após 50 dias de armazenamento não foi identificada eclosão de larvas. Os ovos de 3 dias de idade puderam ser armazenados por 5 e 10 dias apresentando altos valores de eclosão ($94,81 \pm 14,39\%$ e $90,72 \pm 21,56\%$, respectivamente). O armazenamento por 30 dias apresentou o menor valor ($3,52 \pm 10,45\%$), e após 40 dias de armazenamento não foi identificada eclosão de larvas (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência de Eclosão (%) (Média $\pm$ ep) de larvas de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) de diferentes idades submetidos a diferentes períodos de armazenamento à $7 \pm 1^\circ\text{C}$ ($T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12h)

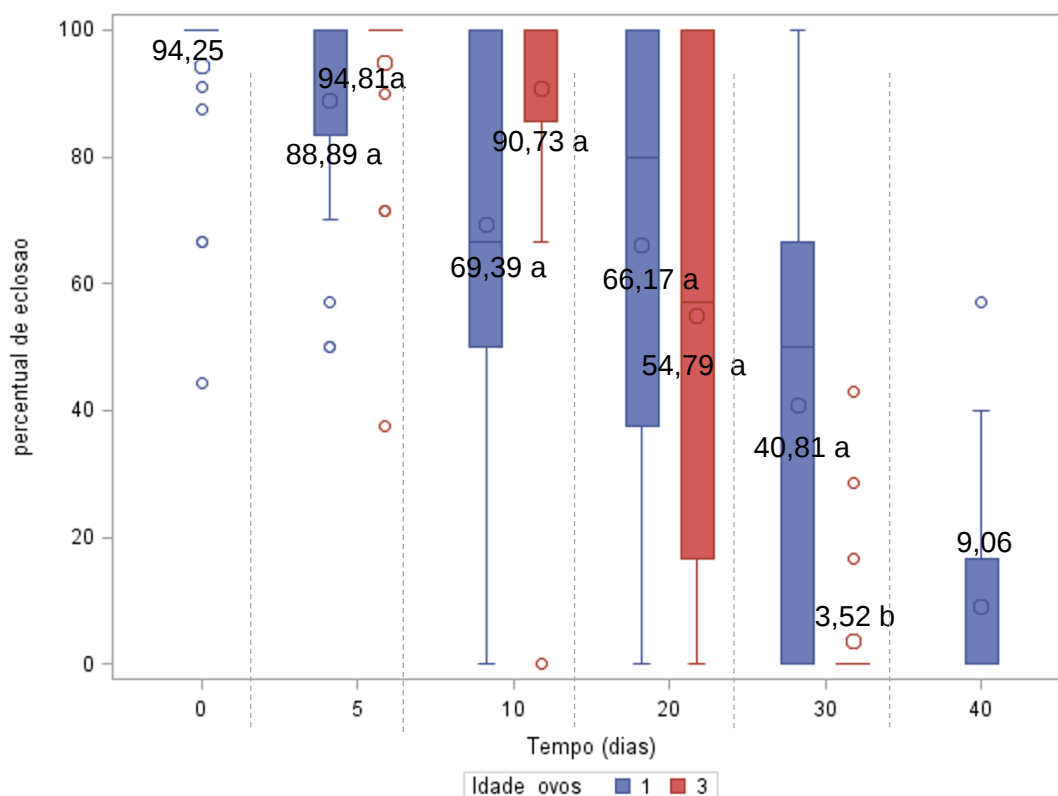
Tempo de armazenamento	Eclosão (%)	
	Idade Ovos (dias)	
	1	3
0	$94,25 \pm 14,02$ a	
5	$88,89 \pm 16,60$ ab	$94,81 \pm 14,39$ a
10	$69,4 \pm 30,33$ bc	$90,72 \pm 21,56$ a
20	$66,14 \pm 37,59$ c	$54,79 \pm 39,18$ b
30	$40,81 \pm 34,42$ d	$3,52 \pm 10,45$ c
40	$9,06 \pm 15,59$ e	*
50	*	*

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

* Ausência de eclosão

Ao avaliar as taxas de eclosão entre tratamentos verifica-se que até 20 dias de armazenamento não há diferença entre os ovos com 1 ou 3 dias de idade. Enquanto após 30 dias de armazenamento a taxa de eclosão de ovos com 1 dia de idade ($40,81 \pm 34,42$) foi significativamente maior do que ovos com 3 dias de idade ($3,52 \pm 10,45$) (Figura 1).

Figura 1 – Taxas de Eclosão (%) (Média $\pm$ ep) de ovos de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) de diferentes idades submetidos a diferentes períodos de armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$ (Média $\pm$ ep) a $25\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $50\pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12h



Médias seguidas de mesma letra no tratamento (tempo) não diferem pelo Teste de Tukey – Kramer ($p < 0,05$).

Os resultados para sobrevivência de larvas 7 dias após a eclosão não apresentaram interação entre os fatores tempo de armazenamento e idade dos ovos ($p < 0,2351$), dessa maneira os resultados foram agrupados e apresentados de acordo com o fator tempo de armazenamento. Os tratamentos considerando até 20 dias de armazenamento dos ovos não diferiram do tratamento controle com relação à taxa de sobrevivência larval (Tabela 3).

Tabela 3 – Taxas de Sobrevivência após 7 dias da eclosão (%) (Média $\pm$ ep) de ovos de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) submetidos a diferentes períodos de armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$ a $25\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $50\pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12h

Tempo de armazenamento	Sobrev.(%)
0	77,08 $\pm$ 12,46 a
5	63,29 $\pm$ 29,18 ab
10	67,35 $\pm$ 32,18 ab
20	62,22 $\pm$ 36,02 ab
30	44,34 $\pm$ 41,03 b
40	18,75 $\pm$ 37,20 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

3.4.2 Armazenamento de ovos de *G. platensis* para multiplicação de *A. nitens*

As taxas de parasitismo efetivo, considerando o número de parasitoides que emergiram da escatoteca, apresentaram efeito dos tratamentos ($p=0,0164$). Os tratamentos de 5 a 20 dias de armazenamento não diferiram entre si, enquanto o tratamento de 25 dias de armazenamento apresentou a menor taxa média ($14,17 \pm 6,73$) (Tabela 4).

Os valores de parasitismo total, considerando os parasitoides retidos na escatoteca, apresentaram efeito dos tratamentos ($p=0,0145$). Sendo a maior taxa média encontrada após 5 dias de armazenamento ($74,54 \pm 8,34\%$) e a menor para o tratamento de 25 dias de armazenamento ($16,31 \pm 7,22\%$). A taxa de parasitismo total para o tratamento de 10 dias de armazenamento apresentou menor valor quando comparada a períodos maiores de armazenamento, possivelmente devido a variações naturais de parasitismo presentes na geração utilizada para esse tratamento (Tabela 4).

A razão sexual da progênie não apresentou efeito dentre os tratamentos ($p=0,6162$), variando entre $0,58 \pm 0,16$ e $0,74 \pm 0,06$ para todos os tempos de armazenamento (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência de Parasitismo Efetivo (Par. Efet.) (%), Parasitismo Total (Par. Total) (%) e razão sexual da progênie (rs) (Média $\pm$ ep) de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) em ovos de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) submetidos a diferentes períodos de armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$

Dias Armazenados	Par. Efet.	Par. Total	rs
0	72,28 $\pm$ 6,25 a	84,01 $\pm$ 5,85 a	0,60 $\pm$ 0,04 a
5	69,25 $\pm$ 9,27 ab	74,54 $\pm$ 8,34 a	0,74 $\pm$ 0,06 a
10	41,73 $\pm$ 7,64 bc	45,06 $\pm$ 7,74 b	0,65 $\pm$ 0,09 a
15	51,10 $\pm$ 6,72 ab	64,36 $\pm$ 7,74 ab	0,65 $\pm$ 0,06 a
20	41,04 $\pm$ 8,36 bc	49,68 $\pm$ 9,01 ab	0,59 $\pm$ 0,07 a
25	14,17 $\pm$ 6,73 c	16,31 $\pm$ 7,22 b	0,58 $\pm$ 0,16 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Não houve efeito da interação entre os fatores tempo de armazenamento e longevidade da progênie de acordo com sexo ($p = 0,4643$), dessa maneira os resultados para machos e fêmeas foram agrupados e apresentados de acordo com o fator tempo de armazenamento. A maior longevidade média para a progênie foi encontrada no tratamento de 15 dias de armazenamento dos ovos ($11,60 \pm 6,25$), enquanto o menor valor foi encontrado na testemunha ($7,99 \pm 6,25$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Longevidade de adultos (machos + fêmeas) (Long. Progênie) (Média $\pm$ ep) de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) provenientes de ovos hospedeiros de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) submetidos a diferentes períodos de armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$. (T= 20°C , UR = 60% e fotoperíodo 12:12h)

Tempo de armazenamento (dias)	Long. Progênie (dias)
0	7,99 $\pm$ 6,25 b
5	8,04 $\pm$ 6,25 ab
10	8,37 $\pm$ 6,25 ab
15	11,60 $\pm$ 6,25 a
20	9,76 $\pm$ 6,25 ab
25	10,00 $\pm$ 6,25 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

3.5 Discussão

Uma colônia de laboratório saudável de *G. platensis* com fornecimento constante de ovos é requisito fundamental para a multiplicação do parasitoide *A. nitens*. Dessa maneira, ao analisar os tempos de armazenamento de ovos para a multiplicação de *A. nitens* é necessário também avaliar quais seriam os possíveis

impactos dessa técnica causados na colônia hospedeira. Os resultados encontrados para ovos com 1 e 3 dias de idade armazenados mostram os melhores resultados nos 10 primeiros dias, mas que é possível obter eclosões superiores a 50% até 20 dias de após armazenamento. O período de 20 dias foi o maior tempo de armazenamento encontrado sem interferências negativas no parasitismo de *A. nitens*. Portanto, o armazenamento de ovos por esse período a 7°C é capaz de manter a colônia hospedeira ao mesmo tempo que contribui para a multiplicação do parasitoide.

Os ovos de *G. platensis* puderam ser armazenados por 10 dias sem grandes interferências na taxa de eclosão de larvas, que começam a cair após 20 dias de armazenamento, sendo que nenhuma larva sobreviveu após 40 dias a partir de ovos de 3 dias de idade ou 50 dias de armazenamento a partir de ovos frescos. O limiar mínimo de temperatura calculado para *G. platensis* está entre 5 e 6,5°C em *Eucalyptus globulus* (Santolamazza-Carbone, Rodríguez-Illamola e Cordero-Rivera, 2006) e pode variar de acordo com a planta hospedeira, variando entre 10,3 e 10,6°C em *E. urophylla* e clones urograndis (Oliveira, 2006). O armazenamento a 7°C não impediu o desenvolvimento embrionário e estes ovos puderam ser utilizados para a manutenção da colônia hospedeira ou multiplicação do parasitoide.

O estágio de ovo é um dos estágios imaturos mais sensíveis à tratamentos térmicos (Maharjan et al., 2017) e seu armazenamento a baixas temperaturas é utilizado em programas de controle biológico para outras espécies de besouros. Para *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) os ovos puderam ser armazenados por 2 semanas sem diminuição das taxas de eclosão, embora tenha afetado negativamente o desenvolvimento larval (Geisert, Ludwick e Hibbard, 2019). Nesse estudo, embora não tenha sido avaliado todo o período de desenvolvimento a partir das larvas eclodidas em *G. platensis*, não houve diferença entre as taxas de sobrevivência de larvas até o 7º dia para os ovos armazenados por até 20 dias, indicando que até esse período de armazenamento não há efeitos negativos sobre o inseto.

Os resultados de parasitismo indicam que ovos de *G. platensis* armazenados por até 20 dias podem ser utilizados para multiplicação de *A. nitens* sem redução considerável de suas taxas de parasitismo. Enquanto valores superiores a esse período não são recomendados, uma vez que a diminuição de temperatura e/ou aumento do tempo de exposição a baixas temperaturas pode resultar em injúrias negativas cumulativas e irreversíveis em parasitoides (Colinet e Hance, 2010). As

fases larvais de *A. nitens* se alimentam do ovo hospedeiro (Tooke, 1955) e maiores tempos de armazenamento diminuem seu valor nutricional devido à deterioração (Pratissoli et al., 2003), perda de água ou crescimento de fungos (Chen e Leopold, 2007). Vários trabalhos concordam que as taxas de parasitismo diminuem conforme se aumenta o tempo de armazenamento (Chen e Leopold, 2007; Spinola-Filho et al., 2014; Haque et al., 2021)

Em *A. nitens* não foi observada alteração da razão sexual da progênie após o parasitismo em ovos armazenados por até 25 dias. Temperaturas baixas comumente alteram a razão sexual da progênie em espécies em que um dos sexos é mais suscetível a alterações no hospedeiro relacionadas à temperatura, levando a maior mortalidade dos parasitoides durante a fase larval (Forouzan et al., 2018). Embora existam relatos de espécies em que as baixas temperaturas não são influenciadas na razão sexual (Foerster e Doetzer, 2005) é também possível encontrar situações no qual a razão sexual se altere após longos períodos de armazenamento dos ovos hospedeiros, como em *Trichogrammatoidea bactrae* Nagajara (Hymenoptera: Trichogrammatidae), em que a razão sexual só se altera após 8 semanas de armazenamento a 4°C (Mohamed e El-Heneidy, 2020) e *Anastatus fulloi* Sheng e Wang (Hymenoptera: Eupelmidae) em que é necessário armazenamento dos ovos hospedeiros por 12 meses para que ocorra alteração na razão sexual (Zhao et al., 2021). Dessa maneira, os resultados obtidos neste experimento para *A. nitens* estão sujeitos a duração de tempo de armazenamento dos ovos hospedeiros de *G. platensis*.

3.6 Conclusão

Ovos de *G. platensis* podem ser armazenados a 7°C por até 20 dias sem afetar a eclosão do hospedeiro e sem efeitos negativos na multiplicação do parasitoide *A. nitens*.

3.7 Referências

Barbosa, L. R., Rodrigues, Â. P., de Souza, L. N., Foerster, L. A., de Souza, A. R., de Castro e Castro, B. M., Wilcken, C. F., Zanuncio, J. C. 2018. Development of *Cleruchoides noackae*, an egg-parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus*, in eggs

- laid on different substrates, with different ages and post-cold storage. *BioControl*, 63 (2), 193-202. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9863-3>
- Chen, W. L., Leopold, R. A. 2007. Progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) reared on stored eggs of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.* 100 (3), 685-694. <https://doi.org/10.1093/jee/100.3.685>
- Colinet, H., Hance, T. 2010. Interspecific variation in the response to low temperature storage in different aphid parasitoids. *Ann. Appl. Biol.* 156 (1), 147-156. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00374.x>
- Foerster, L. A., Doetzer, A. K. 2006. Cold storage of the egg parasitoids *Trissolcus basal* (Wollaston) and *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae). *Biol. Control.* 36 (2), 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.10.004>
- Forouzan, F., Jalali, M. A., Ziaaddini, M., Hashemi Rad, H. 2018. Effect of cold storage on biological traits of *Psix saccharicola* (Hymenoptera: Platygasteridae), an egg parasitoid of *Acrosternum arabicum* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Econ. Entomol.* 111 (3), 1144-1150. <https://doi.org/10.1093/jee/toy087>
- Geisert, R. W., Ludwick, D. C., Hibbard, B. E. 2019. Effects of cold storage on nondiapausing eggs of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 112 (2), 708-711. <https://doi.org/10.1093/jee/toy405>
- Haque, A., Islam, S., Bari, A., Hossain, A., Athanassiou, C. G., Hasan, M. 2021. Cold storage-mediated rearing of *Trichogramma evanescens* Westwood on eggs of *Plodia interpunctella* (Hübner) and *Galleria mellonella* L. *PLoS One*, 16(6), e0253287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253287>
- Hurley, B.P., Garnas, J., Wingfield, M.J., Branco, M., Richardson, D.M., Slippers, B. 2016. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. *Biol. Invasions.* 18 (4), 921-933. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1081-x>
- Mapondera, T.S., Burgess, T., Matsuki, M., Oberprieler, R.G. 2012. Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Goniapterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Austr. J. Entomol.* 51 (3), 175-188. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2011.00853.x>
- Maharjan, R., Yi, H., Young, Y., Jang, Y., Kim, Y., Bae, S. 2017. Effects of low temperatures on the survival and development of *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) under different storage durations. *J. Asia-Pac. Entomol.* 20 (3), 893-900. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2017.06.007>
- Mohamed, H. O., El-Heneidy, A. H. 2020. Effect of cold storage temperature on quality of the parasitoid, *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 30 (1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00288-z>

- Nelder, J. A., Wedderburn, R. W. 1972. Generalized linear models. J. R. Stat. Soc. 135 (3): 370–384. <http://doi.org/10.2307/2344614>.
- Oliveira, N. C. D. (2006). Biologia de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) em *Eucalyptus* spp. em diferentes temperaturas. Universidade Estadual Paulista, Tese.
- Pratissoli, D., Vianna, U. R., Oliveira, H. N., Pereira, F. F. 2003. Efeito do armazenamento de ovos de *Anagasta kuehniella*, (Lepidoptera: Pyralidae) nas características biológicas de três espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Rev. Ceres 50 (287) 95-105.
- Reis, A. R., Ferreira, L., Tomé, M., Araujo, C., Branco, M. 2012. Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. For. Ecol. Manag. 270, 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.01.038>
- Rua, J. C., Barreiro, S., Branco, M., Tomé, M. 2020. Estimating defoliation impact of *Gonipterus platensis* on *Eucalyptus globulus* stands productivity using a forest simulator based on 3-PG. For. Ecol. Manag. 478, 118495. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118495>
- Santolamazza-Carbone, S., Cordero-Rivera, A. 2003. Egg load and adaptive superparasitism in *Anaphes nitens*, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus*. Entomol. Exp. Appl. 106 (2), 127-134.
- Santolamazza-Carbone, S., Rodriguez-Illamola, A., Cordero-Rivera, A. 2004. Host finding and host discrimination ability in *Anaphes nitens* Girault, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. Biol. Control. 29 (1), 24-33. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00134-8](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00134-8)
- Santolamazza-Carbone, S., Rodríguez-Illamola, A., & Cordero-Rivera, A. 2006. Thermal requirements and phenology of the *Eucalyptus* snout beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. J. Appl. Entomol. 130 (6-7), 368-376. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01073.x>
- Schröder, M. L., Slippers, B., Wingfield, M. J., and Hurley, B.P. 2020. Invasion history and management of Eucalyptus snout beetles in the *Gonipterus scutellatus* species complex. J. Pest. Sci. 93 (1),11-25. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01156-y>
- Souza, N. M., Junqueira, L. R., Wilcken, C. F., Soliman, E. P., Camargo, M. B., Nickele, M. A., Barbosa, L. R. 2016. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Circular Técnica IPEF. 209:01-20. Disponível em <https://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr209.pdf> Acesso 04.04.2022.
- Spínola-Filho, P. R. D. C., Leite, G. L. D., Soares, M. A., Alvarenga, A. C., Paulo, P. D. D., Tuffi-Santos, L. D., Zanuncio, J. C. 2014. Effects of duration of cold storage of host eggs on percent parasitism and adult emergence of each of ten

- Trichogrammatidae* (Hymenoptera) species. Fla. Entomol. 97 (1), 14-21.
<https://doi.org/10.1653/024.097.0102>
- Tooke, F. G. C. 1955. The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. a study of its ecology and control by biological means. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry.
- Valente, C., Gonçalves, C.I., Reis, A., Branco, M. 2017a. Pre-selection and biological potential of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for the control of the *Eucalyptus* snout beetle, *Gonipterus platensis*. J. Pest Sci. 90 (3), 911-923.
<https://doi.org/10.1007/s10340-017-0839-y>
- Valente, C., Afonso, C., Gonçalves, C.I., Alonso-Zaragaza, M.A., Reis, A.; Branco, M. 2017b. Environmental risk assessment of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for classical biological control of the *Eucalyptus* snout beetle, *Gonipterus platensis*. BioControl. 62 (4), 457-468.
<https://doi.org/10.1007/s10526-017-9809-9>
- Westfall, P. H., Tobias, R. D., Rom, D., Wolfinger, R. D., Hochberg, Y. 1999. Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Zhao, C., Zhang, B., Liu, Z., Zhang, H., Li, D. 2021. Effects of Cold Storage on Host *Antheraea pernyi* Egg Quality for the Egg Parasitoid *Anastatus fulloi* Sheng and Wang. Insects. 12 (12), 1057. <https://doi.org/10.3390/insects12121057>

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento de dieta artificial para *Gonipterus* sp. 2 (Coleoptera: Curculionidae)

4.1 Resumo

Gonipterus sp. 2 é o principal besouro desfolhador de *Eucalyptus* no continente africano. Os métodos de criação em laboratório para esta praga, visando tanto pesquisas quanto a multiplicação de inimigos naturais em programas de controle biológico dependem do fornecimento constante de folhas novas de *Eucalyptus* que podem alterar seu valor nutritivo e disponibilidade conforme oscilações climáticas durante o ano. O objetivo deste trabalho foi adaptar uma dieta artificial que possa ser utilizada para a criação de *Gonipterus* sp. 2. Uma formulação de dieta merídica foi utilizada para a criação da fase larval do inseto, avaliando o desenvolvimento e sobrevivência tendo cada instar como tratamento. Outras formulações foram testadas para a fase adulta avaliando-se a sobrevivência. Nenhuma formulação de dieta artificial, para larvas ou adultos, mostrou resultados aceitáveis para sua utilização na criação em laboratório de *G.* sp. 2. Contudo, o presente capítulo apresenta avanços na formulação desta dieta.

Palavras-chave: Besouro desfolhador; Criação-massal; *Eucalyptus* snout-beetle;

4.2 Abstract

Gonipterus sp. 2 is the main *Eucalyptus* defoliating beetle on African continent. Laboratory rearing methods for this pest aimed both research and multiplication of natural enemies for biological control programs and depend on the constant supply of new *Eucalyptus* leaves, which can change their nutritional value and availability according to climate fluctuations throughout the year. The objective of this work was to adapt an artificial diet that can be used to rear *Gonipterus* sp. 2. A meridic diet formulation was used to create the larval stage of the insect, evaluating development and survival with each instar as treatment. Other formulations were tested for adulthood to assess survival. No artificial diet formulation, for larvae or adults, has

shown acceptable results for use in laboratory rearing of *G. sp. 2*. However, this chapter presents advances in the formulation of this diet.

Keywords: Defoliating beetle; Mass rearing; *Eucalyptus* snout-beetle;

4.3 Introdução

Besouros do gênero *Gonipterus* spp. são os principais besouros desfolhadores de *Eucalyptus* spp. ao redor do mundo (Hurley et al. 2016), sendo responsáveis por grandes perdas econômicas nas regiões em que foram introduzidos (Reis et al. 2012; Souza et al. 2016; Rua et al. 2020). A fase larval do inseto é a principal causadora de danos ao se alimentar de folhas jovens podendo ocasionar desfolha completa da copa, perda de dominância apical e diminuição de produtividade (Tooke, 1955). As espécies mais atacadas historicamente são *E. globulus*, *E. grandis*, *E. scoparia*, *E. smithii*, *E. urophylla*, *E. viminalis* (Newete, Oberprieler e Byrne, 2011).

O controle biológico é atualmente a principal estratégia de manejo utilizada para o controle desses insetos (Valente et al. 2018) com destaque para o parasitoide de ovos *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae), introduzido primeiramente na África do Sul a partir da Austrália e posteriormente utilizado para o controle nos demais países em que a praga se encontra (Schröder et al. 2020). Novas espécies de parasitoides continuam sendo prospectadas na região de origem da praga para novas introduções em programas de controle biológico (Garcia et al. 2019; Schröder et al. 2021; Souza; Lawson e Nahrung, 2021).

Seguindo as premissas do controle biológico clássico (Kenis et al. 2019), a criação de *Gonipterus* spp. em laboratório é necessária para a multiplicação destes parasitoides, seja para aquelas espécies já introduzidas ou visando o estabelecimento de um novo inimigo natural, uma vez que estes são específicos para o gênero da praga (Valente et al. 2017) e não podem ser multiplicados em hospedeiros alternativos fora de seu ambiente nativo.

Uma criação laboratorial de *Gonipterus* ao longo do ano impulsiona seu controle biológico, permitindo a multiplicação dos inimigos naturais e realização dos estudos que demandem insetos, como aqueles destinados a outros organismos potenciais ao controle da praga como o predador *Podisus nigrispinus* Dallas

(Hemiptera: Pentatomidae) (Nascimento et al. 2017) e nematoides ou fungos entomopatogênicos (Damascena et al. 2020; Jordan et al. 2021).

A criação em laboratório destes insetos depende da oferta constante de folhas novas de eucalipto, o que demanda o plantio dessas árvores em área próxima ao laboratório/biofábrica. Além dos desafios logísticos do fornecimento de folhas, a sazonalidade interfere diretamente em fatores como alimentação e taxa de oviposição desses insetos, sendo comum a ausência de oviposições por várias semanas.

Dietas artificiais merídicas, em que pelo menos um dos componentes não possui composição química inteiramente conhecida (Chaudhury, 2009), para outros besouros desfolhadores já foram desenvolvidas e podem servir como base para a formulação de uma dieta específica para *Gonipterus* spp., visando o fornecimento constante de alimento com as mesmas características nutricionais. *Brontispa longissima* Gestro (Coleoptera: Chrysomelidae) pode ser multiplicado em laboratório com dietas contendo material vegetal em pó de folhas maduras de coqueiros ou gramíneas (Ichiki et al. 2011), enquanto *Gastrophysa atrocyanea* Motschulsky (Coleoptera: Chrysomelidae) pode ser multiplicado por várias gerações em dieta artificial contendo pó de folhas de *Rumex obtusifolius* suplementada por estimulantes alimentares (Ojima et al. 2005).

O objetivo deste trabalho foi encontrar uma dieta artificial que possa ser utilizada em criação massal de *Gonipterus* sp. 2 que permita o desenvolvimento larval e oviposição em laboratório.

4.4 Material e Métodos

O presente capítulo foi desenvolvido no “Biocontrol and Insect Rearing Facility” do Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI) da Universidade de Pretória, Pretória, África do Sul.

4.4.1 Criação *Gonipterus* sp. 2

A criação de *Gonipterus* sp. 2 ocorreu em câmara incubadora a $23\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm10\%$ e fotoperíodo (14:10h claro: escuro).

Caixas plásticas de 23,5 x 16,5 x 11,0 cm foram utilizadas forradas com papel toalha autoclavado contendo máximo de 100 insetos adultos por caixa, alimentados com folhas tenras e brotações de *Eucalyptus dunnii*, trocadas 3 vezes por semana.

As escatotecas ovipositadas eram coletadas a cada troca de material vegetal e transferidas para pote plástico de 5,5 cm de altura e 8,5 cm de diâmetro. Após a eclosão, as larvas eram transferidas para containers de 19,0 x 12,5 x 6,5 cm forrados com papel toalha autoclavado e folhas tenras de *E. dunnii*, trocadas 3 vezes por semana até a fase de pré-pupa.

Máximo de 20 pré-pupas eram transferidas para containers de 5,5 cm de altura e 8,5 cm de diâmetro contendo areia autoclavada umedecida, em que se enterravam. O período de pupação foi em média 40 dias em câmara incubadora a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e escuro e os adultos que emergiam foram coletados diariamente.

4.4.2 Bioensaio com larvas de *Gonipterus* sp. 2

A dieta artificial para larvas consistiu em folhas jovens de *E. dunnii* liofilizadas e moídas misturada com os ingredientes apresentados em Mistura 1 (Tabela 1). A mistura 1 foi autoclavada a 121°C por 15 minutos com posterior inclusão dos ingredientes apresentados na Mistura 2. A dieta era então vertida em placas de Petri e armazenada a 4°C .

Tabela 1 – Composição e proporção de dieta artificial para larvas de *Gonipterus* sp. 2 (Coleoptera: Curculionidae)

	Componente	Quantidade	Proporção (%)
Mistura 1	Alfa celulose	5,80 g	4,65
	Caseína	4,30 g	3,44
	Colesterol	0,08 g	0,06
	Amido de milho	1,75 g	1,40
	Óleo de linhaça	0,04 g	0,03
	Folhas moídas de <i>E. dunnii</i>	10,00 g	8,01
	Methyl parabeno	0,08 g	0,06
	Água	100,00 g	80,10
	Sais de Wesson	0,39 g	0,31
Mistura 2	Ácido ascórbico	0,08 g	0,06
	Ácido sórbico	0,08 g	0,06
	Sucrose	1,50 g	1,20
	Vitaminas de Vanderzant	0,75 g	0,60
	Dis-Chem Gold Lecithin 1200 Softgel	$\frac{1}{2}$ cápsula	

Três repetições contendo 10 larvas cada foram divididas de acordo com os tratamentos: (1) larvas de primeiro ínstar recém eclodidas e em jejum; (2) larvas de segundo ínstar; (3) larvas de terceiro ínstar. Larvas de quarto ínstar não foram utilizadas pois em pré-teste foi observado que ao transferi-las de *E. dunnii* para a dieta estas interrompiam a alimentação e adiantavam a fase de pupa, o que resultava na morte da larva. Não foi adotado período de jejum para as larvas de segundo e terceiro ínstar para evitar mortalidade por inanição. A dieta era oferecida em tubos de vidro de fundo chato (1,5 x 10 cm), vedados com tecido voil e trocada a cada dois dias, momento em que se realizava a avaliação da sobrevivência. O experimento foi conduzido em câmara incubadora a $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$; fotoperíodo 14:10 (claro: escuro) e UR: $80\pm 10\%$.

4.4.3 Bioensaios com adultos de *Gonipterus* sp. 2

O protocolo para a dieta artificial dos adultos consistiu em pó de folhas jovens de *E. dunnii* moídas em nitrogênio líquido misturado com os ingredientes apresentados em Mistura 1 (Tabela 2). A mistura 1 foi autoclavada a 121°C por 15 minutos com posterior inclusão dos ingredientes apresentados na Mistura 2. A dieta era então vertida em placas de Petri e armazenada a 4°C .

Tabela 2 Composição e proporção de dieta artificial para adultos de *Gonipterus* sp. 2 (Coleoptera: Curculionidae)

	Componente	Quantidade	Proporção (%)
Mistura 1	Agar	2,64 g	2,07
	Alfa celulose	5,80 g	4,55
	Caseína	4,30 g	3,37
	Colesterol	0,08 g	0,06
	Amido de milho	1,75 g	1,37
	Óleo de linhaça	0,04 g	0,03
	Folhas liofilizadas de <i>E. dunnii</i>	10,00 g	7,84
	Methyl parabeno	0,08 g	0,06
	Água	100,00 g	78,44
	Sais de Wesson	0,39 g	0,30
Mistura 2	Ácido ascórbico	0,08 g	0,06
	Ácido sórbico	0,08 g	0,06
	Sucrose	1,50 g	1,18
	Vitaminas de Vanderzant	0,75 g	0,59
	Dis-Chem Gold Lecithin 1200 Softgel	$\frac{1}{2}$ cápsula	

Materiais genéticos de *Eucalyptus* com maior teor de carboidratos são mais atrativos a *Gonipterus* sp. 2, com maior alimentação e oviposição, e as concentrações destes carboidratos também variam entre as partes da árvore (Johannes Joubert dados não publicados). Procurando uma formulação de dieta que estimulasse tanto a alimentação quanto a oviposição de *G. sp. 2*, o experimento consistiu na análise de formulações diferentes para a porção de folhas de *E. dunnii* constituinte da dieta artificial: (1) usando apenas folhas moídas de *E. dunnii*; (2) usando folhas e ramos moídos juntos. As demais etapas seguiram os mesmos procedimentos da dieta base. Para isso, 3 repetições com 30 insetos adultos recém-emergidos provenientes de laboratório cada foram acondicionados em container plástico (19 x 12,5 x 6,5 cm) forrados com papel filtro contendo as diferentes dietas. As dietas eram trocadas duas vezes por semana e o número de insetos sobreviventes avaliado. O controle foi estabelecido por adultos se alimentando de folhas frescas de *E. dunnii*. O experimento foi realizado em câmara incubadora a $23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$; fotoperíodo 14:10h (claro: escuro) e UR: $80\pm 10\%$.

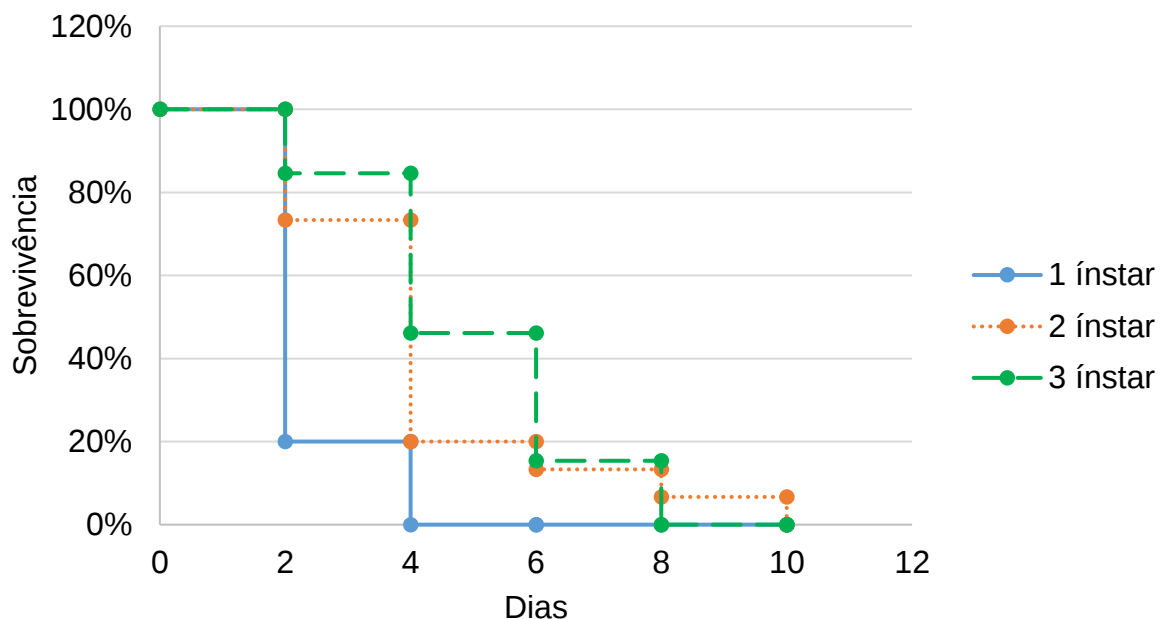
O oferecimento da dieta na forma de paralelepípedos foi estabelecido após pré-teste com insetos coletados em campo. O oferecimento de dieta nas formas cilíndrica e de paralelepípedo foi testado. A forma de paralelepípedo se mostrou qualitativamente superior à cilíndrica pois, ao fornecer mais arestas, permitiu que os insetos se agarrassem melhor à dieta (de forma semelhante com a que se agarram em ramos na natureza), permitindo melhor alimentação.

4.5 Resultados

4.5.1 Bioensaio com larvas de *Gonipterus* sp. 2

As larvas de primeiro ínstar foram o estágio que pior se adaptou à dieta artificial, com apenas 20% de sobrevivência na primeira avaliação, todas as larvas estavam mortas ao final de 4 dias de experimento. Mais da metade das larvas de segundo e terceiro ínstar sobreviveram até 4 dias se alimentando da dieta, após esse período a sobrevivência diminuiu e larvas de segundo e terceiro ínstar foram capazes de sobreviver por até 10 e 8 dias, respectivamente (Figura 1). Entretanto, em nenhum dos tratamentos as larvas trocaram de ínstar após o início das avaliações.

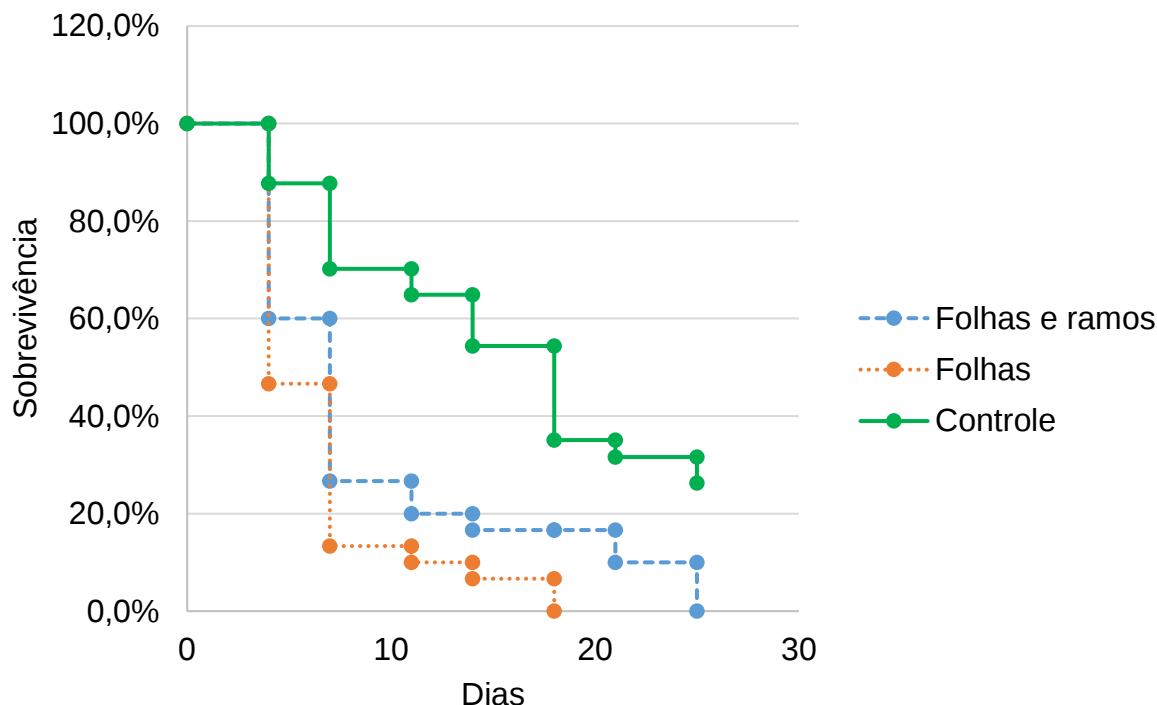
Figura 1 - Sobrevivência de larvas de *Gonipterus* sp. 2 (Coleoptera: Curculionidae) em dieta artificial. (T = 23°±1C; fotoperíodo 14:10h (claro: escuro) e UR:80±10%)



4.5.2 Bioensaios com adultos de *Gonipterus* sp. 2

Em ambos os tratamentos foi possível verificar que os insetos se alimentavam das dietas por meio de marcas de mordidas na dieta e pela presença de excremento. Contudo, em nenhum tratamento os insetos sobreviveram para iniciar seu período reprodutivo, morrendo antes de completarem um mês a partir da emergência (Figura 2).

Figura 2 – Sobrevivência de adultos de *Gonipterus* sp. 2 (Coleoptera: Curculionidae) em dieta artificial com diferentes composições de pó de *Eucalyptus dunnii* em sua composição. (T = 23°±1C; fotoperíodo 14:10h (claro: escuro) e UR:80±10%)



Após estes resultados, tentou-se alterar a composição proteica da dieta almejando o aumento da longevidade dos insetos. Substituição integral da caseína (uma proteína animal) por levedura foi testada, mantendo-se a quantidade de produto, e a combinação de caseína mais levedura nas proporções 1:2 e 1:1. Em nenhuma das formulações os adultos de *G. sp. 2* se alimentaram da dieta.

4.6 Discussão

Nenhuma formulação de dieta artificial, para larvas ou adultos, mostrou resultados aceitáveis para sua utilização na criação em laboratório de *G. sp. 2*. Porém, o estabelecimento de uma dieta artificial que permita a criação de insetos saudáveis por várias gerações é um estudo lento em que a concentração e forma de fornecimento de cada ingrediente é testada isoladamente e muitas vezes são estabelecidas de maneira empírica para cada espécie de inseto (Cohen, 2003). O presente capítulo apresenta avanços na formulação desta dieta.

A formulação da dieta oferecida para as larvas não possui ágar entre seus ingredientes para que a dieta apresentasse textura pastosa, facilitando a alimentação

das larvas. Larvas de primeiro ínstar são mais sensíveis dentre os estágios larvais e a alta mortalidade na primeira avaliação pode estar associada a dificuldades de alimentação, baixa atratividade à dieta ou por danos mecânicos na transferência para a placa de Petri. No ambiente natural essas larvas já iniciam sua alimentação na folha do hospedeiro assim que eclodem e o período de jejum inicial estabelecido no experimento até a transferência delas para a dieta pode ter contribuído para a mortalidade. Larvas de segundo e terceiro ínstar se alimentaram da dieta e alguns indivíduos foram capazes de sobreviver por até 10 dias, porém nenhuma larva realizou muda de ínstar. Em *G. platensis* cada ínstar possui duração entre 3 e 5 dias quando alimentado em hospedeiro suscetível (Oliveira et al., 2022). O aumento da mortalidade justamente nessa janela de tempo mostra que a dieta não forneceu os nutrientes necessários para a muda, que é regulada pelo hormônio ecdisônio, ou outros hormônios esteróides, produzidos nas glândulas protorácicas (Chapman, 2013). Insetos não produzem esteróis e seu fornecimento ocorre pela alimentação, geralmente na forma de colesterol ou fitoesteróis (Jing e Behmer, 2020). Para corrigir esse desbalanço é necessário realizar testes alterando a concentração e formas de fornecimento de esteróis na dieta. Os experimentos com outras formulações de dietas para larvas não foram continuados por falta de insetos em laboratório.

Ambas as formulações da dieta oferecidas para os adultos de *G. sp. 2* e o tratamento controle apresentaram alta mortalidade logo nas primeiras semanas após a emergência. *Gonipterus* sp. 2 passa vários dias se alimentando após a emergência e o período de oviposição se inicia duas ou três semanas após as primeiras cópulas (Tookey, 1955), em *G. platensis* o período de pré-oviposição é de 28,7 dias (Oliveira et al., 2022). Assim, as dietas testadas foram inaptas para a criação massal de *G. sp. 2* uma vez que os insetos morreram antes de atingir sua maturidade sexual e iniciar o período de oviposição. Contudo, a alta mortalidade presente no tratamento controle indica que a metodologia de criação de adultos em laboratório não foi satisfatória e precisa ser melhorada antes que novas formulações de dietas artificiais sejam comparadas. Sem um controle positivo satisfatório não é possível afirmar que a mortalidade observada nos tratamentos seja uma resposta nutricional ou metodológica.

A utilização de leveduras na formulação da dieta foi uma tentativa de aumentar seu valor nutricional para *G. sp. 2* pois estas são reconhecidas por contribuir para a localização do alimento, digestão e atuar como fonte de nutrientes como carboidratos

e proteínas em diversas espécies de insetos (Stefanini, 2018), sendo um ingrediente constituinte de dietas artificiais de espécies como *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae) (Giraldo-Jaramillo e Parra, 2018), *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) (Martins et al., 2007) e *Brontispa longissima* Gestro (Coleoptera: Chrysomelidae) (Murata et al., 2012). Contudo, para as proporções utilizadas nesse experimento a adição de leveduras teve direto impacto na aceitação da dieta e os insetos não se alimentaram. Dessa maneira, novas formulações devem ser buscadas para a melhoria do teor nutricional da dieta.

Dessa maneira, conclui-se que a dieta oferecida para a fase larval de *G. sp. 2* não fornece as condições nutricionais necessárias para a muda de ínstar, resultando em alta mortalidade. A inclusão de leveduras na formulação de dieta para adultos não estimula a alimentação. O protocolo de criação de *G. sp. 2* deve ser modificado visando diminuir a mortalidade de adultos recém-emergidos.

Referências

- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5th edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- DAMASCENA, A. P. *et al.* *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) parasitizing *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 8, p. 200282, 2020.
- CHAUDHURY, M. F. **Insect Nutrition, Feeding, and Artificial Diets**, pp. 121-147. In J. C. Scheneider (ed). Principles and procedures for rearing high-quality insects, vol.1. Mississippi State University, Starkville, USA, 2009.
- COHEN, A. C. **Insect diets: science and technology**. Boca Raton, Florida, CRC press, 2003. 324 p.
- GARCIA, A. *et al.* Biological control of *Gonipterus*: Uncovering the associations between eucalypts, weevils and parasitoids in their native range. **Forest Ecology and Management**, v. 443, n. 1, p. 106-116, 2019.
- GIRALDO-JARAMILLO, M.; PARRA, J. R. P. Artificial diet adjustments for Brazilian strain of *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae). **Coffee Science**, v. 13, n. 1, p. 132-135, 2018.
- HURLEY, B.P. *et al.* Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, v. 18, n. 1, p. 921-933, 2016.
- ICHIKI, R. T. *et al.* Artificial diets for rearing the coconut hispine beetle, *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae), and their suitability to two specialist parasitoids. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 1423-1435, 2011.
- JING, X.; BEHMER, S. T. Insect sterol nutrition: physiological mechanisms, ecology, and applications. **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 12, p. 251-271, 2020.
- JORDAN, C. *et al.* Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.
- KENIS, M. *et al.* **Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests**. FAO Forestry Paper, 2019.
- MARTINS, É. S. *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 65-68, 2007.
- MURATA, M. *et al.* A comparison of artificial diets for mass rearing *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae) as hosts for the larval and the pupal parasitoids. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 3, p. 802-809, 2012.
- NASCIMENTO, L. I. *et al.* First global record of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) as predator of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) larvae and adults. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 3, p. 675-677, 2017.

- NEWETE, S. W.; OBERPRIELER, R. G.; BYRNE, M. J. The host range of the Eucalyptus Weevil, *Gonipterus "scutellatus"* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), in South Africa. **Annals of Forest Science**, v. 68, p. 1005-1013, 2011.
- OLIVEIRA, N. C. et al. The survival, development, and reproduction of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) on the main *Eucalyptus* (Myrtaceae) genotypes planted in Brazil. **PeerJ**, v. 10, n. 1, e13698, 2022.
- OJIMA, N. et al. Continuous rearing of an entomoresource, the leaf beetle, *Gastrophysa atrocyanea* Motschulsky (Coleoptera: Chrysomelidae) on artificial diets. **Applied Entomology and Zoology**, v. 40, n. 1, p. 119-124, 2005.
- REIS, A. R. et al. Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. **Forest Ecology and Management**, v. 270, n. 1, p. 216-222, 2012.
- RUA, J. C. et al. Estimating defoliation impact of *Gonipterus platensis* on *Eucalyptus globulus* stands productivity using a forest simulator based on 3-PG. **Forest Ecology and Management**, v. 478, n. 1, p.118495, 2020.
- SCHRÖDER, M. L. et al. Invasion history and management of *Eucalyptus* snout beetles in the *Gonipterus scutellatus* species complex. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 1, n. 11-25, 2020.
- SCHRÖDER, M. L. et al. Distribution of *Gonipterus* species and their tgg parasitoids in Australia: Implications for biological control. **Forests**, v. 12, n. 8, p. 969, 2021.
- SOUZA, N. M. et al. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). **Circular Técnica IPEF**. **209**, 2016. Disponível em <https://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr209.pdf> Acesso 04.04.2022.
- SOUZA, N. M.; LAWSON, S. A.; NAHRUNG, H. F. *Gonipterus* (Coleoptera: Curculionidae) in subtropical Australia: host associations and natural enemies. **Austral Entomology**, v. 60, n. 3, p. 588-597, 2021.
- STEFANINI, I. Yeast-insect associations: It takes guts. **Yeast**, v. 35, n. 4, p. 315-330, 2018.
- TOOKE, F. G. C. **The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. a study of its ecology and control by biological means**. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry, 1955. 282 p.
- VALENTE, C. et al. Environmental risk assessment of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for classical biological control of the Eucalyptus snout beetle, *Gonipterus platensis*. **BioControl**, v. 62, n. 4, p. 457-468, 2017.
- VALENTE, C. et al. Economic outcome of classical biological control: a case study on the Eucalyptus snout beetle, *Gonipterus platensis*, and the parasitoid *Anaphes nitens*. **Ecological Economics**, v. 149, n. 1, p. 40-47, 2018.

CAPÍTULO 5

Criação laboratorial de *Gonipterus platensis* e *Gonipterus* sp.

2. (Coleoptera: Curculionidae)⁴

5.1 Protocol & Techniques

A alta semelhança taxonômica entre *Gonipterus platensis* e *Gonipterus* sp. 2 (Coleoptera: Curculionidae) fez com que por muitos anos estas espécies fossem consideradas uma só (*Gonipterus scutellatus*) (Mapondera et al. 2012). Estes besouros desfolhadores de eucalipto têm potencial de causar grandes perdas econômicas (Reis et al. 2012; Souza et al. 2016; Valente et al. 2018) e programas de controle biológico foram implementados para controle sempre que estes insetos eram detectados em um novo local. A África do Sul foi pioneira na prospecção de inimigos naturais para *Gonipterus*, que culminou na introdução do parasitoide de ovos australiano *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), em 1926 (Tooke 1955). Este agente de controle biológico foi responsável por altas taxas de parasitismo e o sucesso no controle da praga serviu de exemplo para que essa estratégia fosse replicada em outros países em que a praga viesse a ser detectada no futuro (Tribe 2005), uma vez que, acreditava-se ser uma única espécie.

Entretanto, a eficiência de controle do parasitoide variou entre as regiões introduzidas. Muito se questionou sobre a capacidade de adaptação do parasitoide e várias hipóteses foram levantadas para justificar as diferenças entre taxas de parasitismo como altitude, densidade do hospedeiro, fenologia da planta atacada e microclima (Cordero-Rivera, Santolamazza-Carbonne e Andrés 1999; Loch 2008; Reis et al. 2012); até que análises moleculares provaram que a espécie antes denominada *Gonipterus scutellatus* era na verdade um complexo de pelo menos 8 espécies, originárias de diferentes regiões da Austrália (Mapondera et al. 2012). A teoria de que as diferenças de parasitismo poderiam ser resultado de incompatibilidade entre parasitoide e hospedeiro ganhou espaço, embora os fatores

⁴Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Entomological Communications**

elencados anteriormente pudessem continuar atuando como agravantes para o cenário. A partir disso, novas prospecções de inimigos naturais foram realizadas na Austrália para melhor caracterizar a dinâmica entre parasitoides e as espécies praga hospedeiras (Garcia et al. 2019; Schroder et al. 2021; Souza et al. 2021) e a multiplicação em laboratório desses insetos se tornou fundamental para pesquisas e/ou produção e liberação de inimigos naturais.

Marelli (1927) foi um taxonomista argentino que embasava sua opinião de que a espécie de *Gonipterus* presente na América do Sul era diferente da presente na África por características morfológicas e comportamentais dos insetos. O presente trabalho apresenta dois protocolos de criação desenvolvidos de maneira independente por grupos de pesquisa no Brasil e na África do Sul visando as melhores condições para a multiplicação de *G. platensis* e *G. sp. 2*, respectivamente, e avalia suas etapas e as particularidades de cada espécie.

A criação de *G. platensis* foi realizada no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/Unesp), Brasil, em sala com condições controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($50\pm 10\%$) e fotoperíodo (12:12h). Gaiolas de madeira de 40 x 45 x 80 cm, com teto de vidro e laterais de tecido voil foram utilizadas contendo 30 casais de indivíduos adultos, alimentados com folhas tenras e brotações de *Eucalyptus urophylla* formando um feixe de ramos (buquê), acondicionadas em recipientes plásticos de 500mL com água, que servem também como substrato para oviposição (Figura 1A). As folhas foram lavadas previamente em solução de hipoclorito e detergente durante 30 minutos. As escatotecas provenientes da criação foram mantidas em placas de acrílico de 5 cm de diâmetro nas mesmas condições controladas. A eclosão das larvas foi avaliada diariamente e estas transferidas para buquê específico para sua alimentação, onde permaneceram até a fase de pré-pupa, momento em que param a alimentação e se lançam ao fundo da gaiola. Para a pupação, até 30 pré-pupas foram acondicionadas em potes de plástico de 1L contendo 150g de areia autoclavada umedecida com 15mL de água destilada, até a emergência dos adultos (Figura 1B).

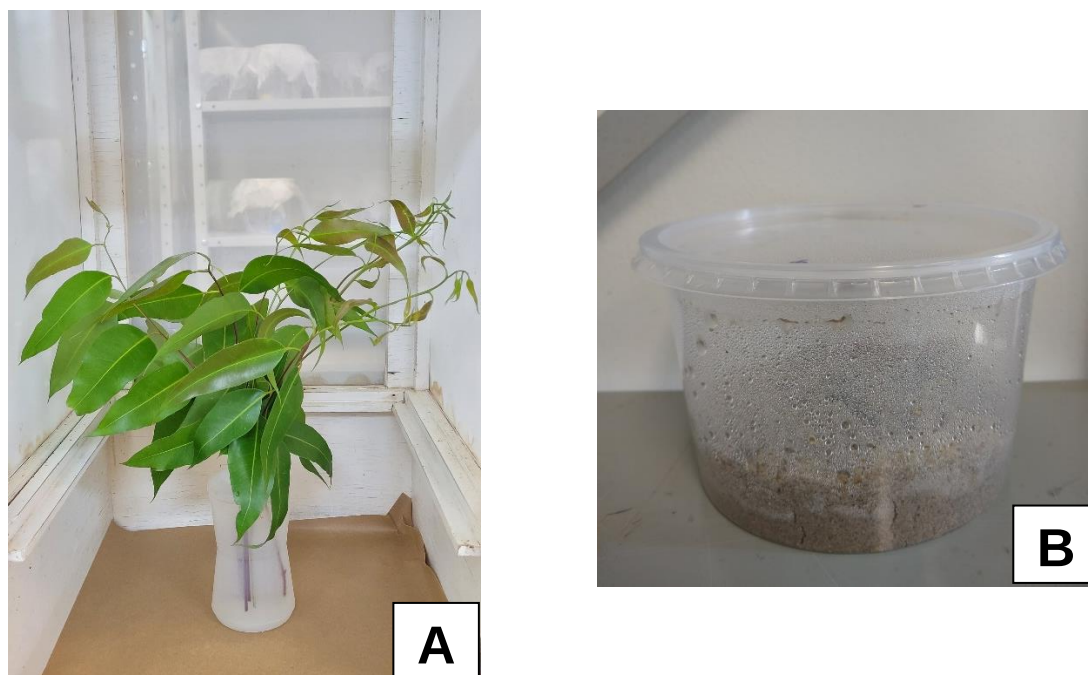


Figura 1 – Buquê com folhas tenras e brotações de *Eucalyptus urophylla* utilizado para criação de adultos e larvas de *Gonipterus platensis* (A) e pote plástico de 1L com areia autoclavada úmida utilizado para pupação dos insetos (B) em criação no Brasil

A criação de *Gonipterus* sp. 2 foi realizada no Laboratório de Biocontrole, do Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, da Universidade de Pretória, África do Sul, em câmara incubadora a $23\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm10\%$ e fotoperíodo (14:10h claro: escuro). Caixas plásticas de 23 x 16 x 11 cm foram utilizadas forradas com papel toalha autoclavado contendo máximo de 100 insetos adultos por caixa, alimentados com folhas tenras e brotações de *Eucalyptus dunnii*, trocadas 3 vezes por semana, que serviram também como substrato para oviposição (Figura 2A). As escatotecas ovipositadas foram coletadas a cada troca de material vegetal e transferidas para container plástico de 5,5 cm de altura e 8,5 cm de diâmetro e mantidos nas mesmas condições. Após a eclosão das larvas, estas eram transferidas para containers de 19 x 12 x 6 cm forrados com papel toalha autoclavado e folhas tenras de *E. dunnii*, trocadas 3 vezes por semana até a fase de pré-pupa. Máximo de 20 pré-pupas eram transferidas para containers de 5,5 cm de altura e 8,5 cm de diâmetro contendo areia autoclavada umedecida (Figura 2B) em câmara incubadora a $23\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm10\%$ e escuro até a emergência dos adultos.

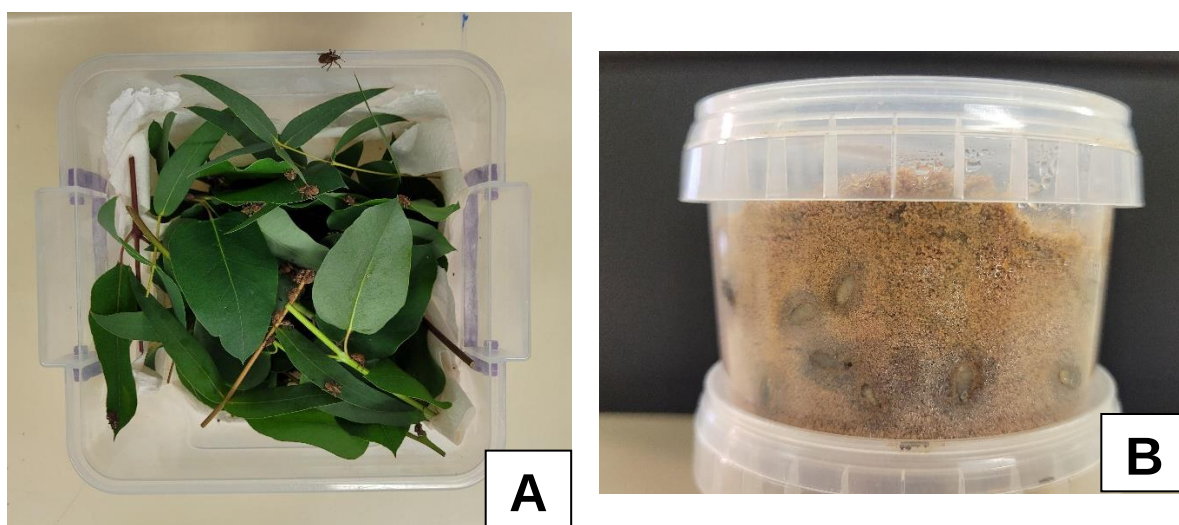


Figura 2 – Caixa aberta com folhas tenras de *Eucalyptus dunnii* utilizado para criação de adultos de *Gonipterus* sp. 2 (A) e container plástico com areia autoclavada úmida utilizado para pupação dos insetos (B) em criação na África do Sul

As espécies de *Eucalyptus* utilizadas foram escolhidas dentre as espécies suscetíveis com maior disponibilidade.

O primeiro ponto de comparação entre as duas metodologias foi o número de insetos por módulo de criação (Tabela 1). As gaiolas de madeira utilizadas para *G. platensis* possuem volume de 144.000 cm³ e comportam o máximo de 60 insetos (2.400cm³ por inseto), bem maiores que as caixas plásticas de 4.265,25 cm³ com capacidade de até 100 insetos (42,65 cm³ por inseto) utilizadas para a criação de *G. sp. 2*. O maior adensamento e menor volume utilizado para *G. sp. 2* permite que mais insetos sejam mantidos em menor espaço no laboratório, contudo, as folhas são ofertadas soltas na caixa e secam mais rápido, o que demanda maior frequência de troca do material vegetal, uma vez que os insetos não irão se alimentar ou ovipositar em folhas secas. Por sua vez, as gaiolas utilizadas em *G. platensis* ocupam mais espaço. O alimento oferecido na forma de buquê mantém a turgidez por maior período e demanda menos trocas. Tentativas de adensamento de *G. platensis* ocorreram no passado, porém induzia a morte em poucas semanas da maioria dos insetos de maneira atípica (com abdômen ressecado e asas membranosas esticadas para fora do élitro). Nossa hipótese é que o estresse causado pelo adensamento estimule o aparecimento de sintomas de possível microsporidiose (Jordan et al. 2021). Por sua vez, *G. sp. 2* parece suportar e ser estimulado por altas densidades populacionais,

que estimulam a oviposição, fato que pode estar relacionado a comportamento poliandrico de estímulo à fertilidade e fecundidade, já comprovado em *G. platensis*.

Tabela 1 – Comparação entre metodologias de criação e comportamento entre *Gonipterus platensis* e *Gonipterus* sp. 2 (Coleoptera: Curculionidae)

Criação	<i>G. platensis</i>	<i>G. sp. 2</i>
Hospedeiro	<i>E. urophylla</i>	<i>E. dunnii</i>
Temperatura	25°C	23°C
Umidade	50%	60%
Fotoperíodo	12:12 (claro:escuro)	14:10 (claro: escuro)
Módulo de criação	Gaiola 40 x 45 x 80 cm	Caixa 23 x 16 x 11 cm
Nº máximo de insetos por módulo	60	100
Volume por inseto	2.400 cm ³	42,65 cm ³
Forma oferecimento do material vegetal	Buquê	Folhas soltas podadas
Troca do material vegetal por semana (adultos)	1x	3x
Condensação no módulo de criação	Não	Sim
Troca do material vegetal por semana (larvas)	3x	3x
Identificação pré-pupa	Fácil	Moderada
Recipiente pupação	Pote 1L	Pote 19 x 12 x 6 cm
Substrato para pupação	Areia úmida	Areia úmida
Emergência	80%	Alta
Sobrevivência no 1º mês	80%	Baixa
Comportamento em Laboratório		
Suporta adensamento	Não	Sim
Longevidade em laboratório	~12 meses	~2 meses
Necessidade de coleta de adultos em campo	Semestral	Mensal

A umidade no interior dos módulos de criação também é um fator de grande divergência. As gaiolas de madeira possuem laterais com tecido voil que permitem aeração da gaiola, enquanto nas caixas plásticas a umidade liberada pelas folhas condensa nas paredes do recipiente, criando um ambiente ideal para a proliferação de fungos. A troca do material vegetal 3 vezes na semana foi a estratégia adotada para diminuir a formação de gotículas. Porém, manusear os insetos muitas vezes pode interromper a cópula dos casais, que possui duração média de 7 horas e máximo de 55 horas (Santolamazza Carbonne e Cordero Rivera 1998), com consequências negativas sobre a oviposição. A desinfecção do material vegetal adotado na metodologia utilizada para *G. platensis* diminui o aparecimento de contaminações e organismos indesejados como aranhas e ácaros, a ausência de procedimento metodológico semelhante na metodologia utilizada para *G. sp. 2* junto com a alta umidade e alta temperatura no interior do módulo de criação favorece o aparecimento de contaminações.

A criação das larvas em caixa plástica pode induzir o erro operacional na identificação da pré-pupa. As larvas de *Gonipterus* se alimentam de folhas novas no topo das árvores até atingem a fase de pré-pupa, quando cessam a alimentação e se jogam ao solo para se enterrarem e formarem a câmara pupal (Tooke 1955). Ao alimentar larvas de 4 ínstar com folhas avulsas em caixas corre-se o risco de supor que uma larva parou de se alimentar e transferi-la para o recipiente de pupação, quando na realidade está apenas procurando um novo alimento. Adiantar a pupação da larva leva à morte do inseto. No sistema de alimentação com buquês esse problema é corrigido pois as pré-pupas irão se soltar das folhas e permanecer no fundo da gaiola, enquanto as larvas de 4 ínstar estarão se alimentando no alto do buquê.

As metodologias de pupação apresentaram resultados similares. Em ambos os casos a areia deve manter-se úmida durante todo o período até a emergência dos adultos, que devem ser transferidos diariamente para os módulos de adultos para iniciarem sua alimentação. A mortalidade observada em pupas geralmente está relacionada a problemas de nutrição nas fases larvais.

Após a emergência em laboratório foi observada alta mortalidade de adultos jovens de *G. sp. 2* em relação à *G. platensis*. Adultos de *G. platensis* passam por um período de pré-oviposição de 28,7 dias (Oliveira et al. 2022) no qual ocorre o desenvolvimento do sistema reprodutivo e primeiras cópulas, enquanto *G. sp. 2* passa

vários dias se alimentando após a emergência antes das primeiras cópulas, com início do período de oviposição cerca de duas ou três semanas após (Tooke 1955). Dessa maneira, a alta mortalidade de insetos nos primeiros meses após a emergência impacta diretamente na manutenção da colônia e na multiplicação de inimigos naturais específicos a *Gonipterus*, pois grande parte dos insetos irá morrer antes mesmo de realizar a primeira oviposição. A alternativa encontrada para a obtenção de escatotecas de *G. sp. 2* em laboratório foi a coleta frequente de insetos em campo.

G. platensis possui longevidade média de 223,9 dias (Oliveira et al. 2022) e alguns insetos vivem por até 14 meses em laboratório. Não há registro da longevidade em laboratório de *G. sp. 2*, uma vez que os insetos eram provenientes de coletas de campo, porém estes adultos não sobreviviam mais de 3 meses na incubadora. Caso as diferenças de longevidade de laboratório também ocorram em campo é possível dizer que *G. platensis* é mais longo vivo que *G. sp. 2*, o que justificaria estratégias de controle visando a fase adulta do inseto, como a utilização de fungos entomopatogênicos (Jordan et al. 2021). Se a alta mortalidade de adultos jovens e baixa longevidade de *G. sp. 2* observada em laboratório também ocorrerem em campo as estratégias de controle para a espécie serão mais efetivas caso enfoquem nos estágios imaturos do inseto, como ovos, larvas e pupas.

Isto posto, nota-se que existem diferenças comportamentais entre *G. platensis* e *G. sp. 2* no adensamento dos insetos adultos nos módulos de criação que podem levar ao sucesso ou não da manutenção das colônias em laboratório. Em outras etapas cujo comportamento é similar, como fases de larva e pupa, é válida a aplicação da metodologia de maior sucesso de uma espécie à outra. Estudos futuros sobre a mortalidade e longevidade de *G. sp. 2* podem contribuir para o modo de criação em laboratório e controle do inseto em campo.

5.2 Referências

- Cordero-Rivera, A.; Santomalazza-Carbone, S.; Andrés, J.A. (1999) Life cycle and biological control of the *Eucalyptus* snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. *Agricultural and Forest entomology*, 1(2): 103-109.
- Garcia, A.; Allen, G.R.; Oberprieler, R.G.; Ramos, A.P.; Valente, C.; Reis, A.; Franco, J.C.; Branco, M. (2019) Biological control of *Gonipterus*: Uncovering the associations

between eucalypts, weevils and parasitoids in their native range. *Forest Ecology and Management*, 443(1): 106-116.

Jordan, C.; Santos, P. L.; Oliveira, L. R. S.; Domingues, M. M.; Gêa, B. C. C.; Ribeiro, M. F.; Mascarin, G. M.; Wilcken, C. F. (2021) Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. *Scientific reports*, 11(1): 1-13.

Loch, A. D. (2008) Parasitism of the *Eucalyptus* weevil, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal, by the egg parasitoid, *Anaphes nitens* Girault, in *Eucalyptus globulus* plantations in southwestern Australia. *Biological Control*, 47(1): 1-7.

Mapondera, T.S.; Burgess, T.; Matsuki, M.; Oberprieler, R.G. (2012) Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Australian Journal of Entomology*. 51(3): 175-188.

Marelli, C. A. (1927) El gorgojo de los eucaliptos hallado em la Argentina [No es l77spécieie originaria de Tasmania *Gonipterus scutellatus* Gyll.]. *Revista del Museo de La Plata*, 30(1): 257-269.

Oliveira, N. C.; Ribeiro, M. F.; Ottati, A.; Tavares, W. S.; Serrão, J. E.; Zanuncio, J. C.; Zanetti, R.; Wilcken, C. F. (2022) The survival, development, and reproduction of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) on the main *Eucalyptus* (Myrtaceae) genotypes planted in Brazil. *PeerJ*, 10(1): e13698.

Reis, A.R.; Ferreira, L.; Tomé, M.; Araujo, C.; Branco, M. (2012) Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management*. 270(1): 216-222.

Santolamazza-Carbone, S.; Cordero-Rivera, A. (1998) Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the *Eucalyptus* Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). *Etologia*, 6(1): 33-40.

Schröder, M.L.; Nahrung, H.F.; Souza, N.M.; Lawson, S.A.; Slippers, B.; Wingfield, M.J.; Hurley, B.P. (2021) Distribution of *Gonipterus* Species and Their Egg Parasitoids in Australia: Implications for Biological Control. *Forests*, 12(8): 969.

Souza, N.M.; Junqueira, L.R.; Wilcken, C.F.; Soliman, E.P.; Camargo, M.B.; Nিকেle, M.A.; Barbosa, L.R. (2016) **Ressurgência de uma antiga ameaça**: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Circular Técnica IPEF, n. 209: 01-20.

Souza, N.M.; Lawson, S.A.; Nahrung, H.F. (2021) *Gonipterus* (Coleoptera: Curculionidae) in subtropical Australia: host associations and natural enemies. *Austral Entomology*, 60(1): 588-597.

Tooke, F. G. C. (1955) **The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. a study of its ecology and control by biological means**. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry, 282 p.

Tribe, G.D. (2005) The present status of *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of the Eucalyptus snout beetle *Gonipterus scutellatus*, in the

Western Cape Province of South Africa. *Southern African Forestry Journal*, 203(1): 49-54.

Valente, C.; Gonçalves, C.I.; Monteiro, F.; Gaspar, J.; Silva, M.; Sottomayor, M.; Paiva, M.R.; Branco, M. (2018) Economic outcome of classical biological control: a case study on the *Eucalyptus* snout beetle, *Gonipterus platensis*, and the parasitoid *Anaphes nitens*. *Ecological economics*, 149(1): 40-47.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Besouros do gênero *Gonipterus* são importantes pragas desfolhadoras de eucalipto no mundo há mais de 100 anos. Nesse período, muito se evoluiu em aspectos relacionados a taxonomia e identificação molecular, assim como a prospecção de alternativas de manejo, com enfoque no controle biológico. Contudo, a criação desses insetos em laboratório e a produção irregular de ovos são limitantes para a multiplicação em escala de inimigos naturais. Este trabalho procurou contribuir com informações que auxiliem nesta atividade ao analisar diferentes etapas do processo de criação de *Gonipterus* spp. e *A. nitens*.

Gonipterus platensis está presente oficialmente no Brasil desde a década de 1970, se dispersando no país com o passar do tempo. Neste trabalho, relatou-se a presença deste inseto para o estado de Minas Gerais, que possui a maior área de plantações florestais do país. Esforços para controle do inseto devem ser realizados para evitar que continue se dispersando para o interior do estado ou para regiões vizinhas, como o Mato Grosso do Sul, que possui a segunda maior área plantada com eucalipto no Brasil.

Este trabalho avaliou a oviposição de *G. platensis* em laboratório e concluiu que fêmeas do inseto se beneficiam ao copular com vários machos ao longo do seu período reprodutivo, com aumento da fecundidade e fertilidade. Esses aspectos auxiliam no fornecimento de ovos para a multiplicação de inimigos naturais e a metodologia de manutenção destes insetos em laboratório deve permitir o comportamento poliândrico.

Após a obtenção dos ovos, e a partir dos resultados do Capítulo 3, agora definimos o período máximo de armazenamento a frio para a manutenção da colônia de *G. platensis* e oferecimento para parasitismo por *A. nitens* de até 20 dias sem interferências negativas sobre os insetos. O armazenamento é um mecanismo para ser utilizado no planejamento da criação do parasitoide visando a multiplicação programada em períodos de maior demanda no campo e manutenção da colônia em períodos de baixa oviposição por *Gonipterus*. Todavia, o capítulo não avaliou o efeito do armazenamento em ovos já parasitados. Estudo esse que pode contribuir para a definição da melhor fase a ser armazenada.

Avanços foram apresentados na formulação de uma dieta artificial. Estudos como esse podem demorar vários anos, uma vez que a constituição da receita e a concentração de seus ingredientes precisam ser avaliados de maneira isolada, o que implica na prática de dezenas de experimentos e centenas de insetos em condições ideais. Os experimentos apresentados aqui são o início desse caminho que ao final pode fornecer condições de criação ideal para estes insetos, com menor dependência de material vegetal fresco.

REFERÊNCIAS

- ADAME, P. *et al.* Drivers and spread of non-native pests in forests: The case of *Gonipterus platensis* in Spanish *Eucalyptus* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 510, p. 120104, 2022.
- ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**, v. 60, n. 2, p. 145-164, 2000.
- BARBOSA, L. R. *et al.* Development of *Cleruchoides noackae*, an egg-parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus*, in eggs laid on different substrates, with different ages and post-cold storage. **BioControl**, v. 63, n. 2, p. 193-202, 2018
- BAYOUMY, M. H.; MICHAUD, J. P. Female fertility in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) is maximized by polyandry but reduced by continued male presence. **European Journal of Entomology**, v. 111, n. 4, p. 513-520, 2014.
- BRANCO, S. *et al.* Identification of pheromone candidates for the eucalyptus weevil, *Gonipterus platensis* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 144, n. 1-2, p. 41-53, 2020.
- CHEN, W. L.; LEOPOLD, R. A. 2007. Progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) reared on stored eggs of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 3, p. 685-694, 2007.
- COLINET, H.; BOIVIN, G. Insect parasitoids cold storage: a comprehensive review of factors of variability and consequences. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 83-95, 2011.
- COHEN, A. C. **Insect diets: science and technology**. Boca Raton, Florida, CRC press, 2003. 324 p.
- DAMASCENA, A. P. *et al.* *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) parasitizing *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 8, p. 200282, 2020.
- GODSMARK, R.; OBERHOLZER, F. **South African forestry and forest products industry 2018**. 2019. Disponível em: <
https://www.forestry.co.za/uploads/File/industry_info/statistical_data/statistical%20data%20april%202020/South%20African%20Forestry%20&%20Forest%20Products%20Industry%20-%202018.pdf>. Acesso em: 05 out. 2021
- GUMOVSKY, A. *et al.* Re-description and first host and biology records of *Entedon magnificus* (Girault & Dodd) (Hymenoptera, Eulophidae), a natural enemy of *Gonipterus* weevils (Coleoptera, Curculionidae), a pest of *Eucalyptus* trees. **Zootaxa**, v. 3957, n. 5, p. 577-584, 2015.
- 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.
- ICHIKI, R. T. *et al.* Artificial diets for rearing the coconut hispine beetle, *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae), and their suitability to two specialist parasitoids. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 1423-1435, 2011.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório Anual**, 2022. 96p. Disponível em: < <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf> >. Acesso em: 04 jan. 2023.

JORDAN, C. et al. Entomopathogenic fungi as the microbial frontline against the alien *Eucalyptus* pest *Gonipterus platensis* in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

KENIS, M. et al. Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests. **FAO Forestry Paper**, n. 182, 2019.

LOTTERING, R. et al. Spatially optimizing vegetation indices integrated with sparse partial least squares regression to detect and map the effects of *Gonipterus scutellatus* on the chlorophyll content of eucalyptus plantations. **International Journal of Remote Sensing**, v. 41, n. 16, p. 6444-6459, 2020.

MAPONDERA, T. S. et al. Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). **Australian Journal of Entomology**, v. 51, n. 3, p. 175-188, 2012.

MEURISSE, N. et al. Common pathways by which non-native forest insects move internationally and domestically. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 1, p. 13-27, 2019.

NASCIMENTO, L. I. et al. First global record of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) as predator of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) larvae and adults. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 3, p. 675-677, 2017.

OJIMA, N. et al. Continuous rearing of an entomoresource, the leaf beetle, *Gastrophysa atrocyanea* Motschulsky (Coleoptera: Chrysomelidae) on artificial diets. **Applied Entomology and Zoology**, v. 40, n. 1, p. 119-124, 2005.

OMKAR; PANDEY, P. Benefits of polyandry in Parthenium beetle, *Zygogramma bicolorata* Pallister (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, n. 2, p. 151-155, 2010.

RAFTER, M. A. et al. Polyandry, genetic diversity and fecundity of emigrating beetles: understanding new foci of infestation and selection. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 1, p. 287-298, 2018.

REIS, A. R. et al. Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. **Forest Ecology and Management**, v.270, p. 216-222, 2012.

SANCHES, M. A. **Influência da temperatura no desenvolvimento de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal 1833 (Coleoptera, Curculionidae) em *Eucalyptus viminalis* Labill: Aspectos bionômicos e parasitismo na Região de Curitiba (PR)**. 1993. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.7

SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; CORDERO-RIVERA, A. Sperm competition, cryptic female choice and prolonged mating in the *Eucalyptus* Snout-Beetle, *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera, Curculionidae). **Etologia**, v. 6, p. 33-40, 1998.

SCHRÖDER, M. L. *et al.* Distribution of *Gonipterus* Species and Their Egg Parasitoids in Australia: Implications for Biological Control. **Forests**, v. 12, n. 8, p. 969, 2021.

SCHRÖDER, M. L. *et al.* Invasion history and management of *Eucalyptus* snout beetles in the *Gonipterus scutellatus* species complex. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 1, p. 11-25, 2020.

SCHWARTZ, S. K.; PETERSON, M. A. Strong material benefits and no longevity costs of multiple mating in an extremely polyandrous leaf beetle, *Chrysochus cobaltinus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 6, p.1004-1010, 2006.

SOUZA, N. M. *et al.* **Ressurgência de uma antiga ameaça**: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Circular Técnica IPEF, n. 209, p. 01-20, 2016.

SOUZA, N. M.; LAWSON, S. A.; NAHRUNG, H. F. *Gonipterus* (Coleoptera: Curculionidae) in subtropical Australia: host associations and natural enemies. **Austral Entomology**, v. 60, n. 1, p. 588-597, 2021.

TOOKE, F. G. C. **The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. a study of its ecology and control by biological means**. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry, 1955. 282 p.

TRIBE, G. D. The present status of *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of the Eucalyptus snout beetle *Gonipterus scutellatus*, in the Western Cape Province of South Africa. **Southern African Forestry Journal**, v. 203, n. 1, p. 49-54, 2005.

VALENTE, C. *et al.* Pre-selection and biological potential of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for the control of the Eucalyptus snout beetle, *Gonipterus platensis*. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 3, p. 911-923, 2017a.

VALENTE, C. *et al.* Environmental risk assessment of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for classical biological control of the *Eucalyptus* snout beetle, *Gonipterus platensis*. **BioControl**, v. 62, n. 4, p. 457-468, 2017b.

WILCKEN, C. F.; OLIVEIRA, N. C. Gorgulho-do-eucalipto, *Gonipterus platensis* Marelli. In: VILLELA E. F.; ZUCCHI, R. A. **Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros**. FEALQ, 2015. p. 779-791.

YASUI Y. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. **Trends in Ecology Evolution**, v. 13, n.6, p. 246-250, 1998.