

ANA LAURA FAVORETO

**BIOECOLOGIA DE *Psyllaephagus bliteus* (HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) E
ENDOSSIMBIONTES BACTERIANOS ASSOCIADOS**

Botucatu

2020

ANA LAURA FAVORETO

**BIOECOLOGIA DE *Psyllaephagus bliteus* (HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) E
ENDOSSIMBIONTES BACTERIANOS ASSOCIADOS**

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

Orientador: Carlos Frederico Wilcken

Botucatu

2020

F275b Favoreto, Ana Laura
Bioecologia de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) e endossimbiontes bacterianos associados / Ana Laura Favoreto. -- Botucatu, 2020
99 p.

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

1. Endossimbiontes. 2. Comportamento oviposição. 3. Comportamento cópula e histologia. 4. Longevidade. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BIOECOLOGIA DE *Psyllaephagus bliteus* (HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) E ENDOSSIMBIONTES BACTERIANOS ASSOCIADOS

AUTORA: ANA LAURA FAVORETO


ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

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


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

 Pesquisadora Dr.^a AMANDA RODRIGUES DE SOUZA (Participação Virtual)
Pesquisa e Qualidade / Gerdau Florestal

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

 Prof. Dr. JOSÉ COLA ZANÚNCIO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Viçosa

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

Botucatu, 15 de dezembro de 2020

Aos meus amadíssimos pais,

Laudir e Sandra

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À minha família,

À minha querida irmã e cunhado, Julia e Thales, por serem pessoas extraordinárias,

Ao Murilo, meu namorado, por toda gentileza, apoio, amor e por ser meu companheiro nessa grande odisséia, a vida!

Ao grande mestre do conhecimento, o meu mais puro respeito e admiração:

Meu orientador, Prof. Carlos Wilcken, por toda a entomologia que lhe transcende as veias, presenteando-me com o privilégio da orientação, além das conversas e oportunidades.

À Profa. Silvia Renata, pelo suporte estrutural do Laboratório de Molecular, e a técnica Vanessa de Carvalho por toda cooperação no longo trabalho dos endossimbiontes.

Aos Professores do Programa de Proteção de Plantas por todo conhecimento.

Ao Dr. Simon Lawson, University of Sunshine Coast, pela orientação durante o doutorado-sanduíche, e também por compartilhar sua cultura e modo de vida, além dos ensinamentos da Ozzie fauna e flora com uma maestria simplista admirável.

Ao Prof. Raimundo Passos, o fera da estatística! Ao Prof. Zanuncio, pelas inúmeras correções e muita paciência. Ao Prof. Cristiano Soleo por ser pronto na colaboração e também no suporte.

À Juliana Fagion, por toda generosidade e compreensão, muitas risadas e horários encaixados.

Ao querido coordenador do PROTEF/IPEF, Luís Renato Junqueira, por todo o suporte, oportunidades e acima de tudo pela confiança, e todas as empresas que se envolveram na minha pesquisa.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais e também amigos, pelo suporte em todos os trabalhos realizados. Em especial ao Time Psilídeo-de-Concha, pois passar mais de oito horas diária com essa turma, não é pra qualquer um!

Aos amados amigos que reconheci durante toda minha jornada, os quais são poucos, mas suficientes!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código Financeiro 001), grande financiadora desse projeto.

O mais sincero e cordial, Muito obrigada!

Invencível

Nas noites que me encobrem,
Negras como um poço, de ponta a ponta,
Eu agradeço a um deus qualquer
Pela minha alma inconquistável.

Das garras impiedosas das circunstâncias
Não recuei nem chorei,
Sob os golpes do destino
Minha cabeça sangra, mas não se curva.

Além deste lugar de ódio e lágrimas
Há apenas o horror das sombras,
Entretanto a ameaça dos anos
Me encontra, e me encontrará, destemido.

Não importa quão estreito o caminho,
Quão cheia de punições a minha sina,
Eu sou o mestre do meu destino,
Eu sou o comandante da minha alma.

Willian Ernest Henley

RESUMO

Glycaspis brimblecombei Moore (Hemiptera: Aphalaridae) tem se destacado nos últimos quatro anos causando perdas econômicas em plantios de eucalipto no Brasil. Além disso, seu principal parasitoide, *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) não tem apresentado taxas efetivas de controle dependendo da região do país. Os principais objetivos desse trabalho foram: prospectar endossimbiontes associados à *G. brimblecombei* e *P. bliteus* de populações coletadas no Brasil e do centro de origem desses insetos, a Austrália, e avaliar as possíveis interações destes com os hospedeiros. Descrever comportamentos do parasitoide, *P. bliteus*, relacionados a oviposição, cópula-corte, cortes histológicos dos ovários de fêmeas virgens a copuladas e a longevidade dos mesmos quando submetidos a quatro diferentes dietas (mel 100%, solução de mel 50%, concha de *G. brimblecombei* e sem alimento) e temperaturas (18, 21, 25, 27, 30 e 35 °C) e também os voláteis emitidos por *G. brimblecombei*. Os endossimbiontes alvos foram *Arsenophonus*, *Carsonella*, *Hamiltonella*, *Rickettsia* e *Wolbachia* foram avaliados em: Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e São Paulo, e três localidades da cidade de Brisbane, Queensland, Austrália. As populações de *G. brimblecombei*, de maneira geral, foram positivas para endossimbiontes primário e secundário, como *Carsonella rudii* e *Arsenophonus*, respectivamente. O endossimbionte facultativo *Wolbachia pipientis*, foi encontrado em algumas populações do psilídeo-de-concha e do parasitoide, caracterizando transmissão horizontal. Além disso, esse endossimbionte aumentou a capacidade de oviposição de *G. brimblecombei*. Os comportamentos de oviposição e corte-cópula de *P. bliteus* foram observados diretamente em microscópio estereoscópio, com parasitoides recém-emergidos e sem conhecimento prévio. O comportamento de oviposição de *P. bliteus* foi caracterizado por dois tipos distintos, o primeiro com a inserção do ovipositor na junção concha-folha, e o segundo ao morder a concha e inserir o ovipositor. O comportamento de corte, desse parasitoide, foi caracterizado por machos tocando as fêmeas com as antenas nas antenas e/ou tórax-abdomen das mesmas, e forçando a cópula mas as fêmeas os repelem. Além disso, fêmeas disponíveis para o acasalamento tem um comportamento de “dança” com movimentos das asas e abdômen fazendo com que o macho se prepare para a monta. A idade de todas as fêmeas que copularam foi de 48 horas de idade ou mais. A morfologia, nos cortes histológicos dos ovários das fêmeas virgens ou copuladas de

P. bliteus foi semelhante, com ovócitos maduros e em desenvolvimento. A longevidade desse parasitoide foi mais longa com dietas ricas em carboidratos, mel 100% ou solução de mel a 50%, em todas as temperaturas estudadas, por isso a suplementação alimentar é imprescindível para a manutenção em criações em laboratório ou liberações em campo de *P. bliteus*. A longevidade desse parasitoide foi maior a 18 e 21°C, o que tem alta correlação com o baixo parasitismo em campo de *G. brimblecombei* por *P. bliteus*.

Palavras-chave: Comportamentos. Cortes histológicos. Endossimbiontes. Parasitoide de ninfa. Psilídeo-de-concha.

ABSTRACT

Glycaspis brimblecombei Moore (Hemiptera: Aphalaridae) has been highlighted as a pest in the last four consecutive years, causing economic losses to eucalyptus plantations in Brazil. Furthermore, its main parasitoid, *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) has not shown effective control rates. Within this context, the main objective of this thesis was to prospect endosymbionts associated with *G. brimblecombei* and *P. bliteus* from populations collected in Brazil, and from their original center, Australia, evaluating their impact on the hosts. Also describe some behaviors of the parasitoid, *P. bliteus*, related to oviposition, courtship-mate, histological cuts of unmated and mated females, and their longevity when submitted to four different diets (100% honey, 50% honey, lerp of *G. brimblecombei* and no food) and temperatures (18, 21, 25, 27, 30 and 35 °C). The target endosymbionts were *Carsonella*, *Arsenophonus*, *Wolbachia*, *Rickettsia* and *Hamiltonella*. The survey was conducted in six Brazilian states: São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Goiás and Maranhão and in three locations in the city of Brisbane, Queensland, Australia. In general, all the populations of *G. brimblecombei* were positive for primary and secondary endosymbionts, such as *Carsonella rudii* and *Arsenophonus*, respectively. Some populations of red gum lerp psyllid and parasitoid are carriers of the facultative endosymbiont *Wolbachia pipientis*, characterizing horizontal transmission, this endosymbiont provides increased oviposition capacity of *G. brimblecombei*. The oviposition and courtship-mate behaviors were performed with direct observations under the ZEISS® stereoscope, where newly emerged parasitoids were selected without randomly. *P. bliteus* have two oviposition behaviors, which are to insert the ovipositor into the lerp-leaf junction and bite the lerp and insert the ovipositor. The insects also presents courtship behaviors, where males touches the females with the antennas on the antennas and/or on thorax-abdomen, these can force copulation but females has the capability to repel it. In addition, females has shown their availability for mating with a "dance" where they move their wings and abdomen making the male prepare to mount, in all copulation observations the females were 48 hours old or more. The histological sections of the ovaries of virgin and copulated females of *P. bliteus* show similarity, with mature and developing oocytes. The highest rates of longevity of the parasitoids is given with diets rich in carbohydrates, such as honey 100% or 50%, in all the studied temperatures, so for maintenance in

laboratory rearing or field releases of *P. bliteus* it is essential the food supplementation. Besides, they longevity is higher under 18 and 21 °C, which has high correlation with low parasitism in *G. brimblecombei* field.

Keywords: Behaviors. Endosymbionts. Histological sections. Nymph parasitoid. Red gum lerp psyllid.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO E TRANSMISSÃO DE BACTÉRIAS SIMBIONTES EM <i>Glycaspis brimblecombei</i> (HEMIPTERA: APHALARIDAE)	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1.2.1 AMOSTRAS DE <i>Glycaspis brimblecombei</i> E <i>Psyllaephagus bliteus</i>	22
1.2.2 TESTES PRELIMINARES PARA PADRONIZAÇÃO DE PCR.....	22
1.2.3 EXTRAÇÃO GENÔMICA E DETECÇÃO DE ENDOSSIMBIONTES.....	23
1.2.4 CAPACIDADE DE OVIPOSIÇÃO E TRANSMISSÃO DE ENDOSSIMBIONTE.....	23
1.3 RESULTADOS.....	29
1.4 DISCUSSÃO.....	30
1.5 REFERÊNCIAS.....	32
1.6 ANEXO.....	37
CAPÍTULO 2 - COMPORTAMENTO E ESTRATÉGIA DE PARASITISMO DE <i>Psyllaephagus bliteus</i> (Hymenoptera: Encyrtidae) E EMISSÃO DE VOLÁTEIS POR <i>Glycaspis brimblecombei</i> (Hemiptera: Aphalaridae)	38
2.1 INTRODUÇÃO.....	40
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.2.1 CRIAÇÃO DE <i>Glycaspis brimblecombei</i> E DE <i>Psyllaephagus bliteus</i>	41
2.2.2 EXTRAÇÃO DO PSILÍDEO-DE-CONCHA.....	42
2.2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA EM ALTAS TEMPERATURAS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	42
2.2.4 OBSERVAÇÕES DO COMPORTAMENTO DE OVIPOSIÇÃO.....	43
2.3 RESULTADOS.....	44
2.4 DISCUSSÃO.....	48
2.5 CONCLUSÃO.....	51
2.6 REFERÊNCIAS.....	51

	CAPÍTULO 3 - COMPORTAMENTO DE CORTE E CÓPULA E HISTOLOGIA DOS OVÁRIOS DE FÊMEAS DE <i>Psyllaephagus bliteus</i>(Hymenoptera:Encyrtidae)	59
3.1	INTRODUÇÃO.....	61
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.2.1	CRIAÇÃO DE <i>Glycaspis brimblecombei</i> E <i>Psyllaephagus bliteus</i>	62
3.2.2	OBSERVAÇÃO DE CÓPULA.....	62
3.2.3	HISTOLOGIA DOS OVÁRIOS.....	63
3.3	RESULTADOS.....	63
3.4	DISCUSSÃO.....	68
3.5	REFERÊNCIAS.....	71
	CAPÍTULO 4 - Longevidade e sobrevivência de <i>Psyllaephagus bliteus</i> (Hymenoptera: Encyrtidae) em diferentes temperaturas e dietas	76
4.1	INTRODUÇÃO.....	78
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	79
4.2.1	COLETA DO PARASITOIDE <i>Psyllaephagus bliteus</i>	79
4.2.3	FONTE DE ALIMENTO E VIDA ÚTIL	79
4.2.4	METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	80
4.3	RESULTADOS.....	81
4.4	DISCUSSÃO.....	86
4.5	REFERÊNCIAS.....	88
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	REFERÊNCIAS	97

INTRODUÇÃO GERAL

Espécies exóticas tem sido detectadas fora de seus ambientes nativos com frequência maior, em escala mundial, com média de 1,4 ano em um novo país. Além disso, as pragas exóticas do eucalipto mais que dobraram nas últimas três décadas fora do centro de origem, Austrália (Hurley et al., 2016).

O primeiro relato do psílideo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae) foi nos EUA em 1998 (Dahlsten et al., 2001). No Brasil, a primeira ocorrência foi em 2003, estado de São Paulo, com desfolha de 20 a 30% em *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis* (Berti-Filho et al., 2003, Wilcken et al., 2003; Wilcken et al., 2015). A infestação, por esse inseto, é caracterizada por estruturas cônicas brancas, as conchas, produzidas durante a fase ninfal e composta por polissacarídeos e ceras (Phillips, 1992, Sánchez, 2003, Halbert et al., 2001).

A importância de *G. brimblecombei* tem aumentado no Brasil com danos e desfolhas em anos sucessivos em plantios de eucalipto. Adultos e ninfas, desse inseto, se alimentam da seiva das plantas preferindo brotações e folhas novas, e em altas infestações podem ocasionar secamento de ponteiro, descolorimento das folhas, redução da área foliar e diminuição na atividade fotossintética das plantas, afetando seu desenvolvimento e produção. Árvores danificadas por *G. brimblecombei* são mais suscetíveis a estresses nutricionais, doenças e ao ataque por outras pragas (Brennan et al., 1999; Dahlsten et al., 2000, Wilcken et al., 2003).

O principal agente de controle biológico do psílideo-de-concha, *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), foi introduzido acidentalmente junto com essa praga (Berti-Filho et al., 2003). Esse inimigo natural parasita ninfas, ovipositando de um a quatro ovos por ninfa de *G. brimblecombei*, entre o tórax e o abdome das mesmas, preferindo aquelas de terceiro ou quarto instares (Daane et al., 2005). As larvas, desse parasitoide, são vermiformes e esbranquiçadas, se alimentam e desenvolvem na cavidade abdominal das ninfas, consumindo-as, deixando-as com um aspecto de “múmia” (corpo dilatado e imóvel), antes de se transformarem em pupas. Adultos de *P. bliteus* emergem por um primeiro orifício de saída no abdome da múmia e outro na parte lateral da concha de *G. brimblecombei* (Plasencia-González et al., 2005).

Psyllaephagus bliteus foi responsável por 64% do controle de *G. brimblecombei* em campo (Margiotta et al., 2017) mas isto varia com fatores bióticos e abióticos. As taxas de parasitismo, desse inimigo natural, têm diminuído, o que contribuiu para o aumento dos surtos populacionais de *G. brimblecombe*, como relatado no Brasil, EUA, Itália e Portugal (Daane et al., 2012, Ferreira-Filho et al., 2015, Caleca et al., 2018, Boavida et al., 2016).

O efeito biótico das interações de *G. brimblecombei* e *P. bliteus*, incluindo a ocorrência de bactérias simbiotes ou mesmo patógenos, que podem influenciar o comportamento e “fitness” desses insetos com reflexos direto e imediato no campo são pouco conhecidos.

Os objetivos desta tese foram: (I) prospectar endossimbiontes associados ao *G. brimblecombei* e *P. bliteus* de populações coletadas em campo no Brasil e Austrália, e estudar a dinâmica e como estes manipulam seus hospedeiros, (II) observar e descrever comportamentos associados a oviposição de *P. bliteus* e os principais odores emitidos por ninfas de psilídeos-de-concha e se essas se associam ao desempenho do parasitoide, (III) corte, cópula e cortes histológicos de fêmeas virgens e copuladas de *P. bliteus*, e (IV) a longevidade e a sobrevivência de *P. bliteus* sob diferentes dietas e temperaturas.

CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO E TRANSMISSÃO DE BACTÉRIAS SIMBIONTES EM *Glycaspis brimblecombei* (HEMIPTERA: APHALARIDAE)

RESUMO

O psílídeo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), causa surtos em plantios de eucalipto desde 2017 e a taxas de parasitismo por seu principal inimigo natural, *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) são baixas em regiões mais quentes. Bactérias endossimbiontes podem causar a manipulação reprodutiva de hospedeiros, aumentando ou diminuindo a capacidade de oviposição dos mesmos. O objetivo desse estudo foi identificar, por análise de PCR, bactérias endossimbiontes em treze populações de *G. brimblecombei* e oito de *P. bliteus*, coletadas no Brasil e Austrália, e estudar a transmissão e relação das mesmas com o hospedeiro. Três espécies de bactérias, todas P e S-endossimbiontes, *Arsenophonus*, *Carsonella ruddi*, e *Wolbachia pipientis*, foram identificadas em algumas populações de *G. brimblecombei* com transmissão horizontal e vertical, entre as gerações da praga e de seu parasitoide *P. bliteus*. A oviposição de *G. brimblecombei*, infectado com *Wolbachia*, foi maior.

Palavras-chave: Capacidade de oviposição. Psílídeo-de-concha. *Psyllaephagus bliteus*. *Wolbachia*.

ABSTRACT

The red gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), causes outbreaks in eucalyptus plantations since 2017 and at parasitism rates, by its main natural enemy, *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) are low. Endosymbionts bacteria can cause the reproductive manipulation of hosts, increasing or decreasing their oviposition capacity. The objective of this study was to identify, by PCR analysis, endosymbionts bacteria in thirteen populations of *G. brimblecombei* and eight of *P. bliteus*, collected in Brazil and Australia, and to study their transmission and relation with the host. Three species of bacteria, all P and S-endosymbionts, *Arsenophonus*, *Carsonella ruddi*, and *Wolbachia pipientis*, were identified in some populations of *G. brimblecombei* with horizontal and vertical transmission, between generations of the pest and its parasitoid *P. bliteus*. The oviposition of *Glycaspis brimblecombei*, infected with *Wolbachia*, was higher.

Key-words: *Psyllaephagus bliteus*. Red gum lerp psyllid. Oviposition capacity. *Wolbachia*.

1 INTRODUÇÃO

Associações com micro-organismos são estimadas em 60% dos insetos, os quais co-evoluíram juntos em células especializadas, extra ou intracelulares, e essa relação de “simbioses” passou a ser denominada endossimbiontes (Ishikama et al., 2003, Bauman, 2005, Aurora et al., 2012).

Psílideos são hospedeiros obrigatórios de *Carsonella ruddii*, endossimbionte primário, P-endossimbionte, importantes para a sobrevivência de insetos hospedeiros por serem responsáveis pela síntese de aminoácidos essenciais, pois o floema é pobre nesses compostos (Dowie 2004, Moran 2007, Hansen et al., 2014). O genoma de *Carsonella* é o menor entre os endossimbiontes com aproximadamente, 160 pb, vivendo em células especializadas denominadas bacteriomas. A transmissão dessas bactérias é, matematicamente. Perdas completas no DNA, pelo endossimbionte, requer o complemento por endossimbiontes secundários ou facultativos, como S-endossimbionte (Bauman 2005, Sloan 2012).

A transmissão de S-endossimbiontes, pode ser vertical, de uma geração para outra, ou horizontal, via alimentação em plantas hospedeiras e na cadeia alimentar (Le Clec'h et al. 2013, Chrostek et al., 2017), mantendo ou aumentando a diversidade da microbiota (Hansen et al., 2014). *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Fritschea*, *Hamiltonella*, *Regiella*, *Rickettsia*, *Serratia*, *Sodalis*, *Spiroplasma* e *Wolbachia* são endossimbiontes facultativos, com relações com os hospedeiros mas não essenciais para os mesmos (Kikuchi, 2009, Chrostek et al., 2017).

A relações entre S-endossimbiontes com insetos, mutualística ou não, são pouco conhecidas (Dedeine et al., 2003, Monticelli et al., 2020). A infecção por *Wolbachia* reduziu a longevidade do parasitoide de pupas *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu (Hymenoptera: Eulophidae) em cerca de 50%, mas permite a reprodução por partogenese telitoca nesse inseto (Favoreto, A.L., dados não publicados). Além disso, esses microrganismos podem alterar a cor, induzir outras manipulações reprodutivas, como incompatibilidade citoplasmática e reduzir ou aumentar a capacidade de oviposição de insetos (Bagheri et al., 2019, Furihata et al., 2015, Fleury et al., 2000).

A Austrália é o centro de origem do psílideo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), mas esse inseto foi detectado no

Brasil em 2003 se dispersando por todo o país (Masson et al., 2009, Wilcken et al., 2015, Dias et al., 2017). *Glycaspis brimblecombei*, em seu primeiro ano de ocorrência, desfolhou entre 20-30% das plantas de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* e árvores com desfolha de 100% não se recuperaram (Wilcken et al., 2003).

O objetivo foi avaliar endossimbiontes de *G. brimblecombei*, e do seu parasitoide *P. bliteus*, coletados em diferentes regiões do Brasil e seu centro de origem, Austrália, e avaliar o impacto dessas bactérias em seus hospedeiros e os meios de transmissão das mesmas.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 AMOSTRAS DE *Glycaspis brimblecombei* E *Psyllaephagus bliteus*

Adultos de psilídeo-de-concha e do seu parasitoide, *P. bliteus*, foram coletados em plantios comerciais de eucalipto e árvores da composição da paisagem, entre maio de 2017 e março de 2020, em localidades de seis estados do Brasil e em três localidades da cidade de Brisbane, Austrália (Figura 1). Ramos de *Eucalyptus spp.* foram levados para o laboratório, onde os adultos de psilídeo-de-concha foram coletados com auxílio de sugador manual portátil, e suas ninfas parasitadas foram acondicionadas em placas de Petri (3 cm diâmetro) sob condições controladas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12:12 fotoperíodo) até a emergência do parasitoide *P. bliteus*. Indivíduos da praga e de seu parasitoide foram mantidos em álcool 90° em freezer -20°C até a identificação molecular dos endossimbiontes.

1.2.2 TESTES PRELIMINARES PARA PADRONIZAÇÃO DE PCR

Testes preliminares para padronização da PCR foram realizados com ovos (n= 40), ninfas de 1° (n= 40), 2° (n= 40), 3° (n= 30), 4° (n= 30), 5° (n =30) instares e adultos (n= 1, n= 4, n=10 e n=20) de *G. brimblecombei* e *P. bliteus*. Sendo o resultado positivo para amostras de ninfas grandes, 4° e 5° instares, e 20 insetos adultos. Assim, padronizando a PCR com insetos adultos.

1.2.3 EXTRAÇÃO GENÔMICA E DETECÇÃO DE ENDOSSIMBIOTES

A análise de PCR foi conduzida usando todo o genoma de 20 insetos adultos de cada população. Os insetos foram macerados e homogeneizados em solução de 40 µl de resina Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories) a 10% e 4µl de proteinase K (20 µg/ml) em microtubos de 1,5 mL com as amostras colocadas em bloco térmico a 95°C por 20 min. O DNA extraído de cada amostra foi usado para screening de cinco endossimbiontes: *Carsonella*, *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Wolbachia* e *Arsenophonus*, usando primers alvos de genes específicos da região 16S ou 23S rDNA. Sequência de primers e anelamento das temperaturas das reações de PCR estão descritos (Tabela 1). A presença de endossimbiontes foi confirmada pelo sequenciamento e amplificação das sequências das populações no sequenciador automático DNA Sanger sequencer (Modelo: ABI 3500 – Applied Biosystems) no Instituto Biotecnológico (IBTEC/ UNESP) em Botucatu, e comparado com as sequências depositadas no GenBank, usando o programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.2.4 CAPACIDADE DE OVIPOSIÇÃO E TRANSMISSÃO DE ENDOSSIMBIOTE

As populações de *G. brimblecombei* de Botucatu e Mogi-Guaçu, foram mantidas por seis gerações em *Eucalyptus camaldulensis* (Pereira et al., 2015) sob condições controladas de 25 ± 2 °C; 60 ± 10% UR e 12h de fotoperíodo. Indivíduos parentais e das gerações F1, F3 e F5 submetidas ao teste de PCR para avaliar a influência da planta hospedeira na microbiota do inseto, sem resultados positivos. Por isso, essas plantas foram usadas na avaliação da capacidade de oviposição de *G. brimblecombei*.

A capacidade de oviposição de *G. brimblecombei* foi avaliada nas condições controladas citadas. Dez mudas de *E. camaldulensis* dispostas em mosaico e equidistante em 5 centímetros, foram colocadas por gaiola de madeiras (40 cm x 45 cm x 80 cm), sendo cada muda uma repetição. Isto foi feito em duas gaiolas. Vinte casais do psilídeo-de-concha foram liberados no centro da gaiola, com densidade de dois casais por muda. A oviposição foi quantificada dez dias após, com microscópio estereoscópico ZEISS®. As populações, Mogi-Guaçu x

Botucatu (FCA) e São Jerônimo da Serra x Botucatu (FCA), foram cruzadas em laboratório, e a capacidade de oviposição e análise molecular da transmissão dos endossimbiontes avaliadas na geração F2.

O número de de ovos, por localidades, foram ajustados à modelo lineares generalizados (Nelder & Wedderburn, 1972) com a distribuição binomial negativa e função de ligação logarítmica A qualidade dos ajustes, de todos os modelos lineares generalizados ajustados, foi avaliada por análise de desvios (*deviance*), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados do procedimento *genmod* do programa estatístico SAS – *Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition* e as médias entre tratamentos comparada utilizando o teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999).

Figura 1. Pontos amostrais em Brisbane, Austrália, e diferentes estados do Brasil.

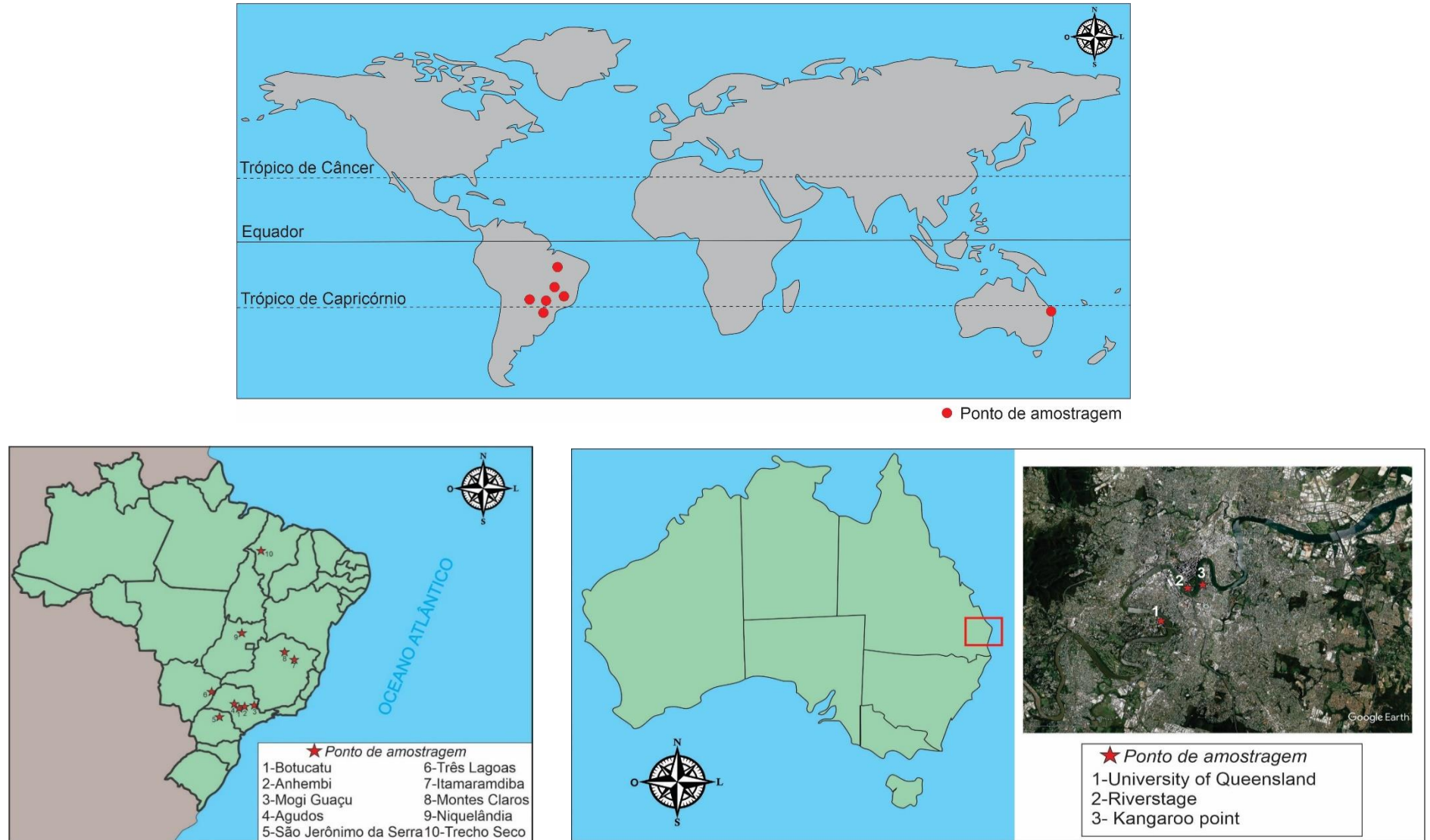


Tabela 1. Populações, hospedeiro, coordenada geográfica latitude (Lat.) e longitude (Long.), local e ano de coletas (Ano) de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) (G.b.) e *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) Brasil e Austrália de 2017-2020.

Populações	Hospedeiro	Latitude	Longitude	Local de coleta	Ano
1 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. camaldulensis</i>	-22,823524	-48,431460	Botucatu (FCA), São Paulo, Brasil	2017
2 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-22,350647	-46,978422	Mogi-Guaçú, São Paulo, Brasil	2017
3 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-22,812689	-48,158610	Anhembi, São Paulo, Brasil	2018
4 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>			Agudos, São Paulo, Brasil	2019
5 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-22,774889	-48,357394	Botucatu (ECT), São Paulo, Brasil	2019
6 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-20,517335	-51,753981	Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brasil	2017
7 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-17,816400	-42,900575	Itamarandiba, Minas Gerais, Brasil	2018
8 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-14,166763	-48,342316	Niquelândia, Goiás, Brasil	2018
9 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. camaldulensis</i>	-23,74529	-50,763389	São Jerônimo da Serra, Paraná, Brasil	2019
10 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-5,195670	-47,558397	Trecho Seco, Maranhão, Brasil	2019
11 <i>G. brimblecombei</i>	<i>E. tereticornis</i>	-27,47936	153,029837	Brisbane (Riverstage), Queensland, Austrália	2020

12	<i>G. brimblecombei</i>	<i>E. tereticornis</i>	-27,47226	153,02861	Brisbane (Kangaroo Point), Queensland, Austrália	2020
13	<i>G. brimblecombei</i>	<i>E. tereticornis</i>	-27,493961	153,016702	Brisbane (UQ), Queensland, Austrália	2020
14	<i>P. bliteus</i>	<i>E. camaldulensis</i>	-22,823524	-48,431460	Botucatu (FCA), São Paulo, Brasil	2017
15	<i>P. bliteus</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-22,350647	-46,978422	Mogi-Guaçú, São Paulo, Brasil	2017
16	<i>P. bliteus</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-22,452751	-48,925572	Agudos, São Paulo, Brasil	2019
17	<i>P. bliteus</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-20,517335	-51,753981	Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brasil	2017
18	<i>P. bliteus</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-16,595965	-44,010107	Montes Claros, Minas Gerais, Brasil	2017
19	<i>P. bliteus</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>	-17,816400	-42,900575	Itamarandiba, Minas Gerais, Brasil	2018
20	<i>P. bliteus</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. camaldulensis</i>	-23,74529	-50,763389	São Jerônimo da Serra, Paraná, Brasil	2019
21	<i>P. bliteus</i>	<i>E. tereticornis</i>	-27,47936	153,029837	Brisbane (Riverstage), Queensland, Austrália	2020

Tabela 2. Caracterização dos Endossimbiontes: genes e área de amplificação, sequência do primer, ciclo da PCR e referência.

Gene	Sequência do primer (5'>3')	Ciclo da PCR	Referência
<i>Carsonella</i> 16S rDNA	F'CACGTGCTACAATGAGTAAAACAA R'GGTTCCCCTACAGCTACCTTG	94 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos.	Nachappa <i>et al.</i> (2011)
<i>Hamiltonella</i> 16S rRNA	F'TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG R'AGTTCAAGACCGCAACCTC	95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; 72 °C for 5 minutos.	Zchori-Fein e Brown (2002)
<i>Arsenophonus</i> 23S rRNA	F'CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA R'GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAA C	95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 5 minutos.	Thao, Baumann (2004)
<i>Rickettsia</i> 16S rRNA	F'GCTCAGAACGAACGCTATC R'GAAGGAAAGCATCTCTGC	95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 92 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 5 minutos.	Gottlieb <i>et al.</i> (2006)
<i>Wolbachia</i> 16 rRNA	F'CGGGGGAAAAATTTATTGCT R'AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 5 minutos	Heddi <i>et al.</i> (1999)

1.3 RESULTADOS

Os endossimbiontes específicos 16S/23S rDNA PCR *Carsonella rudii*, P-endossimbionte, e *Arsenophonus*, S-endossimbionte, foram identificados em todas as populações de *G. brimblecombei*. O endossimbionte facultativo *Wolbachia pipientis* foi detectado em populações de *G. brimblecombei* de Agudos, Itamarandiba, Mogi-Guaçu, São Jerônimo da Serra e daquelas de cruzamento em laboratório entre indivíduos de Mogi-Guaçu x Botucatu (FCA) e São Jerônimo da Serra x Botucatu (FCA) (Tabela 3).

P e S-endossimbiontes de psílídeos, *Carsonella* e *Arsenophonus*, não foram detectados em nenhuma população do parasitoide *P. bliteus*. Os endossimbionte facultativo, *Hamiltonella*, *Rickettsia* e *Wolbachia*, não foram detectados em populações deste parasitoide, coletados em Botucatu (FCA), Brisbane (BBG), Montes Claros e Três Lagoas, mas aqueles de populações de *G. brimblecombei* de Agudos, Itamarandiba, Mogi-Guaçu e São Jerônimo da Serra, os quais foram também, positivas para *Wolbachia*, a mesma espécie de bactéria, caracterizando transmissão horizontal.

Tabela 3. Bactérias, pares de base (Pb), porcentagem de identidade (P%) e número de acesso no Genbank de identidade (Genbank) encontrada nos hospedeiros *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) e *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae)

Hospedeiro	Bactéria	Pb	P%	Genbank
<i>Glycaspis brimblecombei</i>	<i>Carsonella rudii</i>	212	99	MW086624.1
<i>Glycaspis brimblecombei</i>	<i>Arsenophonus</i>	700	99	MW079849.1
<i>Glycaspis brimblecombei</i>	<i>Wolbachia pipientis</i>	600	99	MW086624.1
<i>Psyllaephagus bliteus</i>	<i>Wolbachia pipientis</i>	600	98	MW079901

A oviposição de algumas populações de *G. brimblecombei* foi maior quando infectadas com *Wolbachia*, e o cruzamento entre populações não hospedeiras com hospedeira resultou em progênie portadora de *Wolbachia*, a qual teve oviposição intermediária quando comparada com os parentais (Tabela 4).

Tabela 4. Número (média \pm E.P.) e intervalo de variação (Int. Var.) total de ovos de populações de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) portadoras ou não do endossimbionte *Wolbachia pipientis*.

Populações	Portador	Ovos (Int. Var.)
Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil	+	33,70 \pm 6,06 a
São Jerônimo da Serra, Paraná, Brasil	+	31,20 \pm 4,78 a
Mogi-Guaçu x Botucatu (FCA), São Paulo, Brasil	+	16,85 \pm 4,50 ab
São Jerônimo da Serra x Botucatu (FCA), São Paulo, Brasil	+	14,25 \pm 2,91 abc
Botucatu (FCA), São Paulo, Brasil	-	7,55 \pm 1,55 bc
Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brasil	-	4,65 \pm 1,05 cd
Botucatu (ECT), São Paulo, Brasil	-	2,15 \pm 0,57 d

Médias seguidas de mesma letra, para o número de ovos, não diferem pelo teste de Tukey-Kramer.

1.4 DISCUSSÃO

A presença de bactérias dos gêneros *Carsonella* e *Arsenophonus* em 100% das populações de *G. brimblecombei* do Brasil e da Austrália concorda com relatos de co-especificidade, universais, desses endossimbiontes para Psylloidea (Baumann, 2005). O primeiro relato de *G. brimblecombei* para o continente Americano, na Califórnia, identificou *C. rudii*, e o S-endossimbionte *Arsenophonus* em todas as populações desse inseto, exceto naquelas de Bakersfield (Hansen et al., 2007), a qual, provavelmente, tinha outro S-endossimbionte. Psílídeos-de-concha, como *Cardiaspina* sp., estão, também, associados com *C. rudii* como P-endossimbionte, e diversas espécies de S-endossimbionte, como *Arsenophonus* e *Sodalis* (Hall et al., 2016). Diferentes linhagens de *Carsonella* como P-endossimbionte, foram relatadas nos psílídeos de vida livre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), *Diaphorina* cf. *continua* e *Diaphorina lycii* Loginova (Hemiptera: Liviidae), mas as mesmas podem variar com o inseto e a planta hospedeira (Nakabashi et al., 2020). O endossimbionte facultativo *Wolbachia* detectado em nove população de *G. brimblecombei*, em campo e laboratório no Brasil, são Enterobacterias responsáveis por diversas manipulações reprodutivas, assim como *Rickettsia* e *Lariskella*, no

mesmo clado e detectadas nos psílídeos *C. fiscella*, *Glycaspis* sp.2 e *C. maniformis* (Morrow et al., 2017).

A falta de identificação de *Carsonella* e *Arsenophonus* em populações de *P. bliteus* do Brasil e Austrália concorda com relatos para esse parasitoide na Califórnia (Hansen et al., 2007). A transmissão horizontal de *Wolbachia* de *G. brimblecombei* para o *P. bliteus*, se deve ao desenvolvimento do parasitoide dentro da ninfa hospedeira, a qual consome o conteúdo interno de *G. brimblecombei* (Sullivan et al., 2006). Parasitoides que se desenvolvem em fases ninfais de seus hospedeiros, como *Encarsia berlesei* Howard e *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoides de *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), foram também, positivas para *Rickettsia* e *Wolbachia* assim como seu hospedeiro (Qi et al., 2018).

A maior oviposição de indivíduos de algumas populações de *G. brimblecombei* quando infectadas com *Wolbachia* evidencia o transporte desse endossimbionte facultativo para a prole por transmissão vertical. Isto é semelhante ao relatado para a transferência dos S-endossimbionte, *Rickettsia* e *Wolbachia* em populações de *B. tabaci* e *Hylyphantes graminicola* (Araneae: Linyphiidae), respectivamente, por gerações subsequentes, após o cruzamento entre indivíduos de populações hospedeiras e não (Liu et al., 2020, Su et al., 2019). Além disso, S-endossimbiontes facultativos e manipuladores de reprodução sobreviverem e se mantem em seus hospedeiros por transmissão vertical, como nas gerações F2 de populações de *G. brimblecombei* obtidas de cruzamentos em laboratório, melhorando a capacidade de oviposição das mesmas. Este efeito pode variar, pois espécies portadoras de *Wolbachia* como *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae) aumentaram a atividade de parasitismo e triplicaram o número de insetos emergidos, mas reduziram a capacidade reprodutiva de *Leptopilina heterotoma* Thompson (Hymenoptera: Figitidae) (Furhata et al., 2015, Fleury et al., 2000).

A falta de identificação de endossimbiontes S-endossimbiontes introduzidos em populações de *G. brimblecombei* difere do relatado para *B. tabaci* (de Moraes et al., 2018) e evidencia ser baixa a diversidade genética de *G. brimblecombei* no Brasil (Santos et al., 2020). Além disso, esses endossimbiontes podem aumentar a capacidade reprodutiva dos hospedeiros, passam para populações não portadoras e se mantem por gerações, favorecendo surtos dessa praga em campo. Por outro lado, ao serem transferidas para o parasitoide, *P. bliteus*, também podem aumentar a taxa de oviposição e, conseqüentemente, o parasitismo por esse inimigo natural.

1.5 REFERÊNCIAS

BAGHERI, Z., TALEBI, A. A., ASGARI, S., MEHRABADI, M. *Wolbachia* induce cytoplasmic incompatibility and affect mate preference in *Habrobracon hebetor* to increase the chance of its transmission to the next generation. **Journal of Invertebrate Pathology**, 163, 1-7, 2019.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sapsucking insects. **Annual Review of Microbiology**, 59: 155-189, 2005.

BERTI-FILHO, E., COSTA, V.A., ZUPARKO, R.L., LA SALLE, J. Ocorrência de *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 78, p. 304, 2003.

CHROSTEK, E., PELZ-STELINSKI, K., HURST, G.D., HUGHES, G.L. Horizontal transmission of intracellular insect symbionts via plants. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2237, 2017.

DEDEINE F, BANDI C, BOULÉTREAU M, KRAMER LH. Insights into *Wolbachia* obligatory symbiosis. In: Bourtzis, K., Miller, T.A. **Insect Symbiosis**. Boca Raton: CRC Press: 267-282, 2003.

DE MORAES, L.A., MULLER, C., DE FREITAS BUENO, R.C.O., SANTOS, A., BELLO, V.H., DE MARCHI, B. R., WATANABE, L.F.M., MARUBAYASHI, J.M., SANTOS, B.R., YUKI, V.A., TAKADA, H.M., DE BARROS, D.R., NEVES, C.G., DA SILVA, F.N., GONÇALVES, M.J., GHANIM, M., BOYKIN, L., PAVAN, M.A., KRAUSE-SAKATE, R. Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

DIAS, T.K.R., PIRES, E.M., WILCKEN, C.F., SOUZA, A.P., SOLIMAN, E.P., SILVA, C.C. The psilid *Glycaspis brimblecombei* in transition areas Biomes Amazon and Brazilian Savanna. **Acta Brasiliensis**, 1: 19-22, 2017.

DOWNIE, D.A., GULLAN, P.J. Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes, and a review of the higher classification. **Systematic Entomology**, v. 29, p. 238–59, 2004.

FURIHATA, S., HIRATA, M., MATSUMOTO, H., HAYAKAWA, Y. Bacteria endosymbiont, *Wolbachia*, promotes parasitism of parasitoid wasp *Asobara japonica*. **PloS ONE**, v. 10, n.10, p. 0140914, 2015.

FLEURY, F., VAVRE, F., RIS, N., FOUILLET, P., BOULÉTREAU, M. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Parasitology**, v. 121, n.5, p. 493–500, 2000.

GOTTLIEB, Y., GHANIM, M., CHIEL, E., GERLING, D., PORTNOY, V., STEINBERG, S., TZURI, G., HOROWITZ, A. R., BELAUSOV, E., MOZES-DAUBE, N., KONTSEDALOV, S., GERSHON, M., GAL, S., KATZIR, N., ZCHORI-FEIN, E. Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.5, p. 3646-3652, 2006.

HALL, A.A., MORROW, J.L., FROMONT, C., STEINBAUER, M.J., TAYLOR, G.S., JOHNSON, S.N., JAMES, M.C., RIEGLER, M. Codivergence of the primary bacterial endosymbiont of psyllids versus host switches and replacement of their secondary bacterial endosymbionts. **Environmental Microbiology**, v. 18, n.8, p. 2591-2603, 2016.

HANSEN, A.K., JEONG, G., PAINE, T.D., STOUTHAMER, R. Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n.23, p. 7531-7535, 2007.

ISHIKAWA H. Insect Symbiosis: An Introduction. In: Bourtzis K, Miller TA. **Insect Symbiosis**. Boca Raton: CRC Press: 1-21, 2003.

KIKUCHI, Y. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. **Microbes and Environments**, v. 24, n.3, p. 195-204, 2009.

LE CLEC'H, W., CHEVALIER, F. D., GENTY, L., BERTAUX, J., BOUCHON, D., SICARD, M. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. **PloS one**, v. 8, n.4, p. e60232, 2013.

LIU, Y., FAN, Z.Y., AN, X., SHI, P.Q., AHMED, M.Z., QIU, B.L. A single-pair method to screen Rickettsia-infected and uninfected whitefly *Bemisia tabaci* populations. **Journal of Microbiological Methods**, v. 168, p. 105797, 2020.

MASSON, M.V. et al. Ocorrência e distribuição populacional do psílideo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore 1964, (Hemiptera: Psyllidae) em florestas de eucalipto no litoral norte do Estado da Bahia, Brasil. **Boletín Sanidad Vegetal Plagas**, v. 35, p. 559-562, 2009.

MONTICELLI, L.S., TENA, A., IDIER, M., AMIENS-DESNEUX, E., DESNEUX, N. Quality of aphid honeydew for a parasitoid varies as a function of both aphid species and host plant. **Biological Control**, v. 140, p. 104099, 2020.

MORROW, J. L., HALL, A. A., RIEGLER, M. Symbionts in waiting: the dynamics of incipient endosymbiont complementation and replacement in minimal bacterial communities of psyllids. **Microbiome**, v. 5, n.1, p. 58, 2017.

NAKABACHI, A., MALENOVSKÝ, I., GJONOV, I., HIROSE, Y. 16S rRNA Sequencing detected *Proffella*, *Liberibacter*, *Wolbachia*, and *Diplorickettsia* from relatives of the Asian Citrus Psyllid. **Microbial Ecology**, p. 1-13, 2020.

NELDER, J.A., WEDDERBURN, R.W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, v.135, n. 3. p. 370–384, 1972.

PEREIRA, J.M., BALDIN, E.L., SOLIMAN, E.P., WILCKEN, C.F. Attractiveness and oviposition preference of *Glycaspis brimblecombei* Moore in Eucalyptus spp. **Phytoparasitica**, v. 41, p. 117-124, 2013.

QI, L.D., SUN, J.T., HONG, X.Y., LI, Y.X. Diversity and phylogenetic analyses reveal horizontal transmission of endosymbionts between whiteflies and their parasitoids. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n.2, p. 894-905, 2019.

SANTOS, F.A., CORREA, A.S., NANINI, F., NASCIMENTO, D.A., JUNQUEIRA, L.R., WILCKEN, C.F. Genetic diversity of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) and its parasitoid *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, (AHEAD), 2020.

SLOAN, D.B., MORAN, N.A. Genome reduction and co-evolution between the primary and secondary bacterial symbionts of psyllids. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n.12, p. 3781-3792, 2012.

SU, Q., HU, G., YUN, Y., Peng, Y. Horizontal transmission of *Wolbachia* in *Hylyphantes graminicola* is more likely via intraspecies than interspecies transfer. **Symbiosis**, v. 79, n. 2, p. 123-128, 2019.

SULLIVAN, D.J., DAANE, K.M., SIME, K.R., ANDREWS JR, J.W. Protective mechanisms for pupae of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red-gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psylloidea). **Australian Journal of Entomology**, v. 45, n.1, p. 101-105, 2006.

THAO, M.L., BAUMANN, P. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.6, p. 401–3406, 2004.

WESTFALL, P. H., TOBIAS, R.D., ROM, D., WOLFINGER, R.D., HOCHBERG, Y. **Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System**, Cary, NC: SAS Institute Inc, 1999.

WILCKEN, C. F., FIRMINO-WILCKLER, D.C., DAL POGETTO, M.H.F.A., DIAS, T.K.R., LIMA, A.C.V., DE SÁ, L.A.N., FERREIRA-FILHO, P.J. **Psilídeo-de-concha-**

do-eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore. In: Pragas introduzidas no Brasil insetos e ácaros. Piracicaba. Fealq. 2015. p. 883-897.

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

1.6 ANEXO

Tabela 4. Endossimbiontes *Arsenophonus* (Ars.), *Carsonella* (Car.), *Hamiltonella* (Ham.), *Rickettsia* (Ric.) e *Wolbachia* (Wol.) prospectados em *Glycaspis brimblecombei* (Gb) e *Psyllaephagus bliteus* (Pb). Sinal positivo indica presença no hospedeiro, e negativo ausência

Espécie	Ars.	Car.	Ham.	Ric.	Wol.
<i>G.b.</i> Botucatu (FCA), SP	+	+	-	-	-
<i>G.b.</i> Botucatu (ECT), SP	+	+	-	-	-
<i>G.b.</i> Mogi-Guaçú, SP	+	+	-	-	+
<i>G.b.</i> Agudos, SP	+	+	-	-	+
<i>G.b.</i> Itamarandiba, MG	+	+	-	-	+
<i>G.b.</i> São J. da Serra, PR	+	+	-	-	+
<i>G.b.</i> Anhembi, SP	+	+	-	-	-
<i>G.b.</i> Trecho Seco, MA	+	+	-	-	+
<i>G.b.</i> Niquelândia, GO	+	+	-	-	-
<i>G.b.</i> Três Lagoas, MS	+	+	-	-	-
<i>G.b.</i> Brisbane (BBG), QLD	+	+	-	-	-
<i>G.b.</i> Brisbane (UQ), QLD	+	+	-	-	-
<i>G.b.</i> Brisbane (KGP), QLD	+	+	-	-	-
<i>P.b.</i> Montes Claros, MG	-	-	-	-	-
<i>P.b.</i> Três Lagoas, MS	-	-	-	-	-
<i>P.b.</i> Botucatu (FCA), SP	-	-	-	-	-
<i>P.b.</i> Agudos, SP	-	-	-	-	+
<i>P.b.</i> Mogi-Guaçú, SP	-	-	-	-	+
<i>P.b.</i> Itamarandiba, SP	-	-	-	-	+
<i>P.b.</i> São J. da Serra, PR	-	-	-	-	+
<i>P.b.</i> Brisbane (BBG), QLD	-	-	-	-	+

CAPÍTULO 2 - COMPORTAMENTO E ESTRATÉGIA DE PARASITISMO DE *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) E EMISSÃO DE VOLÁTEIS POR *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae)

RESUMO

O psílideo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), praga exótica, causa prejuízos em plantios de eucalipto no Brasil. *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) é o principal agente de controle biológico deste inseto. A interação praga-parasitoide é complexa e o comportamento de *P. bliteus* durante o parasitismo e compostos voláteis emitidos por *G. brimblecombei*, são pouco conhecidos. O objetivo foi avaliar o comportamento e a estratégia de parasitismo por *P. bliteus* e correlacionar estes parâmetros com a emissão de voláteis por *G. brimblecombei*. Ninfas de *G. brimblecombei*, com ou sem conchas, e conchas vazias, foram expostas à fêmeas de *P. bliteus*, em laboratório a 25 ± 1 °C, $60 \pm 20\%$ U.R. e 12:12 h C:E e observadas com microscópio estereoscópico. Ninfas, ninfa + concha e conchas vazias de *G. brimblecombei* são observadas em campo e, por isto, foram analisadas por cromatografia gasosa (GC-SM) em altas temperaturas acopladas à espectrometria de massas. A estratégia de parasitismo por *P. bliteus* inclui, inicialmente, busca ativa por ninfas de *G. brimblecombei* sem conchas, seguido por ninfas + conchas, as quais são detectadas por sondagem com o ovipositor e/ou tamborilar de antenas. Voláteis emitidos por ninfas, ninfa + concha e conchas vazias diferiram, mas os ácidos orgânicos e hidrocarbonetos de cadeia longa com alta proporção de ácido oleico, pentacosano e tetracosano foram majoritários e, altamente, correlacionados com o comportamento de parasitismo por *P. bliteus*. Fêmeas de *P. bliteus* identificaram a presença e/ou ausência de ninfas de *G. brimblecombei* sob as conchas, por voláteis emitidos, e as estratégias de parasitismo desse inimigo natural são a inserção do ovipositor na junção entre concha e a folha e mordida no topo da concha para inserção do ovipositor.

Palavras-chave: Controle biológico. Parasitoide de ninfas. Psílideo-de-concha. Voláteis.

ABSTRACT

Glycaspis brimblecombei Moore (Hemiptera: Aphalaridae) damages eucalyptus plants in Brazil and *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) is its main natural enemy. The pest-parasitoid interactions are complex and the parasitism behaviour of *P. bliteus* and volatile compounds emitted by *G. brimblecombei* are poorly studied. The objective was to evaluate the behaviour and strategy of parasitism by *P. bliteus* and to correlate them with the volatiles emitted by *G. brimblecombei*. Nymphs of *G. brimblecombei*, with or without lerps, and empty lerps, were exposed to *P. bliteus* females in laboratory at 25 ± 1 °C, $60\% \pm 20$ RH and 24:12 h L:D and observed with a stereomicroscope. These materials are observed in the field and they were analyzed by gas chromatography (GC-SM). Volatiles emitted by nymphs, nymphs with lerps and empty lerps differed, but long chain organic acids and hydrocarbons were the majority and highly correlated with parasitism behaviour of *P. bliteus*. The parasitoid identified the presence and/or absence of *G. brimblecombei* nymphs under the lerps, by volatiles emitted, and the parasitism strategies of this natural enemy are the insertion of its ovipositor between the lerp and the leaf and biting the lerp at its top to insert its ovipositor.

Keywords: Biological control. Nymph parasitoid. Red gum lerp. Volatile.

2.1 INTRODUÇÃO

Plantios de eucaliptos ocupam 6,97 milhões de hectares do território brasileiro (Ibá, 2020) e pragas exóticas, como o psilídeo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), podem limitar a produtividade dos mesmos. Esse inseto é originário da Austrália e foi relatado em mais de vinte países, nos continentes americano, europeu, africano e oceania (Bicep, 2020). Os danos pelo psilídeo-de-concha são ocasionados pela alimentação por suas ninfas e adultos, sugando floema das folhas (Dreistadt, 1999), resultando, em desfolha, seca dos ponteiros e “dieback” das plantas de eucalipto (Dahlsten et al., 2003, Wilcken et al., 2015).

A primeira detecção de *G. brimblecombei* fora do seu centro de origem, foi no estado da Califórnia, EUA, em 1998 (Brennan et al., 1999), causando mortalidade de 15% e 40% das árvores, respectivamente, no primeiro e segundo ano de ocorrência (Gill, 1998). No Brasil, foi detectado pela primeira vez em 2003 na região de Mogi-Guaçu, estado de São Paulo, causando desfolha de 20 a 30% e redução da produtividade de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis* (Wilcken et al., 2003; Wilcken et al., 2015), além da mortalidade de 40 a 95% das árvores de *E. camaldulensis* durante três anos consecutivos de infestação (Bicep, 2020).

Ninfas de *G. brimblecombei* constroem estruturas brancas cônicas, denominadas conchas, para proteção contra altas temperaturas, predadores e perda de água, onde permanecem até a fase adulta (Hodkinson, 1974; Ferreira-Filho et al., 2017), sendo rapidamente reconstruídas se removidas (Firmino-Winckler et al., 2009). *Glycaspis brimblecombei* pode ser manejado com controle químico e biológico, incluindo agentes microbianos (Dal Pogetto et al., 2011) e predadores como *Atopozelus opsimus* Elkins (Hemiptera: Reduviidae), joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae), moscas sirfídeos (Diptera: Syrphidae), crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) e vespas (Hymenoptera: Vespidae) (Berti-Filho et al, 2003; Wilcken et al., 2003; Dias et al., 2012; Cuelo et al., 2019). Entretanto, a proteção pela concha, desse inseto, pode reduzir a eficiência de inimigos naturais (Wilcken et al., 2003) e, por isto, parasitoides específicos, que conseguem vencer a barreira estabelecida pela concha, são mais eficientes.

O parasitoide *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), originário da Austrália, é o principal agente de controle biológico de *G. brimblecombei* (Wilcken et al., 2015). Este parasitoide foi introduzido, acidentalmente, no Brasil com

a praga (Berti-Filho et al., 2003) e uma nova introdução foi realizada em 2007 do México (Wilcken, C. F. informação pessoal). A fêmea de *P. bliteus* parasita ninfas de *G. brimblecombei* de todos os instares mas prefere aquelas de terceiro e quarto e completa seu desenvolvimento quando o hospedeiro atinge o quarto ou quinto instares (Daane et al., 2005; Plascenia-González et al., 2005).

Condições climáticas, como temperatura e umidade relativa, afetam populações de *G. brimblecombei* como relatado na Califórnia (EUA) (Daane et al., 2012), Brasil (Ferreira-Filho et al., 2017, Tuller et al., 2017), Itália (Caleca et al., 2018) e Portugal (Boavida et al., 2016). Esse parasitoide não controla, totalmente, *G. brimblecombei*, mas estudos sobre biologia, comportamento e testes de parasitismo podem melhorar sua eficiência (Paine et al., 2015).

O comportamento de forrageamento de parasitoides inclui, as etapas de pesquisa do habitat (1); localização (2), exame (3) e aceitação (4) do hospedeiro (Godfray, 1994). Semioquímicos são sinais importantes de comunicação, com funções inter e intraespecíficas mediando interações entre pragas, plantas hospedeiras e inimigos naturais (Penã-Flor et al., 2017). Artrópodes podem detectar voláteis à longas distâncias e suas fêmeas os distinguem reduzindo gastos energéticos (Saito et al., 2020) e encontrando hospedeiros ou plantas com herbivoria (Tognon et al., 2020, Naranjo-Guevara et al., 2017). Interações entre pragas e parasitoides são complexas e emissões de voláteis, pelos hospedeiros, são importantes para discriminação destes últimos e o parasitismo (Laumann et al., 2020).

O objetivo foi avaliar o comportamento e a estratégia de parasitismo por *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) e correlacionar estes parâmetros com a emissão de voláteis por *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 CRIAÇÃO DE *Glycaspis brimblecombei* E DE *Psyllaephagus bliteus*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) da Faculdade de Ciências Agronômicas na Universidade Estadual Paulista (UNESP-Botucatu), em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. *Glycaspis brimblecombei* foi criado em mudas de *Eucalyptus camaldulensis* e/ou *E. grandis* × *E. camaldulensis* em gaiolas (40 cm × 45 cm × 80 cm) a 25 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$

UR e 12h de fotoperíodo. Cem adultos de *G. brimblecombei* foram liberados por gaiola e depositaram ovos sobre as folhas das mudas de eucalipto onde suas ninfas passaram por cinco instares (Wilcken et al., 2010).

Adultos de *P. bliteus*, proveniente de múmias de *G. brimblecombei*, coletadas em infestações naturais, em *E. camaldulensis*, na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da UNESP-Botucatu, foram criados e multiplicados nas mesmas gaiolas com *G. brimblecombei* sob as mesmas condições controladas. Dez a quinze casais de *P. bliteus* foram liberados, por gaiola, quando as ninfas de *G. brimblecombei* estavam no terceiro instar e os parasitoides foram alimentados com gotículas de mel. As conchas, de ninfas de *G. brimblecombei*, foram verificadas, após aproximadamente 15 dias, e as pupas dos parasitoides individualizadas até a emergência de adultos (Wilcken et al., 2010).

2.3.2 EXTRAÇÃO DO PSILÍDEO-DE-CONCHA

Amostras do psilídeo-de-concha foram coletadas em infestações naturais sobre *Eucalyptus camaldulensis* no campus da UNESP-Botucatu. Três diferentes amostras com um grama de conchas, ninfas (a partir do 3º instar) e concha + ninfa (a partir do 3º instar), foram maceradas com um mL de n-heptano (Merck, Darmstadt, Alemanha), por 30 min a 1.400 rpm e 30 °C para a extração de 100 mg de solução e os extratos coletados com papel de filtro no Laboratório Central da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP-Botucatu.

2.3.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA EM ALTAS TEMPERATURAS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises foram desenvolvidas em Cromatógrafo a Gás acoplado a detector de massas (Shimadzu GCMS QP2020, Quioto, Japão), com um auto injetor (AOC-20i). As separações foram feitas em coluna capilar de 30m × 25 mm; 0,25 µm (Zebron ZB-5HT Inferno, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A pressão foi mantida constante em 103,8 kPa. O hélio a uma vazão fixa de 7,0 mL/min. foi o gás de arraste utilizado com temperatura do injetor de 380 °C.. A temperatura inicial do forno foi de 180 °C, mantida por 1 minuto, e depois elevada a uma taxa de 8 °C/min até 380 °C, a qual foi

mantida por 10 minutos. O gás de arraste foi injetado de maneira automática (volume de injeção de 2 µL por amostra) com uma razão de Split 3:1. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas por impacto eletrônico foi de 290 °C, o qual operou com varredura (scan) de relação massa/carga de 30 a 1000 u.m. Os dados foram coletados com o auxílio do software LabSolutions GCMSsolution v.4.41 (Shimadzu, Quioto, Japão) e os compostos identificados por comparação com padrões de fragmentação com espectros contidos nas bibliotecas NIST14 e WILEY pela integração dos picos com inclinação igual a 2500 µV/min.

2.3.4 OBSERVAÇÕES DO COMPORTAMENTO DE OVIPOSIÇÃO

O comportamento de oviposição de *P. bliteus* foi descrito durante o parasitismo e as atividades desse inseto registradas em observações sob microscópio estereoscópico ZEISS® Leica Application Suite (versão 2.1.0). Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada (25 ± 2 °C) com arenas de forrageamento compostas por placas de Petri (5 cm de diâmetro × 1 cm de altura) com folhas infestadas por ninfas de *G. brimblecombei* coletadas da criação estoque. Fêmeas de *P. bliteus*, com 24h de idade e sem experiência prévia de parasitismo e alimentadas ou não, receberam hospedeiros com presença ou ausência de concha protetora ou conchas sem hospedeiros.

Dez fêmeas de *P. bliteus*, individualmente, por 20 minutos, foram expostas a preferência entre ninfas com e sem concha. Onde, oito ninfas de *G. brimblecombei*, com ou sem conchas, foram dispostas na arena para avaliar a preferência e o comportamento relacionados ao parasitismo, propriamente ditos.

O comportamento de oviposição em conchas vazias foi observado, individualmente, por 20 minutos, para quinze fêmeas de *P. bliteus*, cada uma representando uma repetição. Cada fêmea de *P. bliteus*, alimentada com gotículas de mel, foi exposta a quatro conchas vazias, sem ninfas de *G. brimblecombei*.

O comportamento de oviposição em ninfas sob a proteção de conchas foi estudado em trinta fêmeas de *P. bliteus*, sendo quinze alimentadas com gotículas de mel, e quinze em jejum por 12 horas. Folhas infestadas com três a cinco ninfas, no terceiro e/ou quarto instares, de *G. brimblecombei*, cada uma, foram dispostas por arena (placas de Petri com 5 cm × 1 cm). Cada fêmea de *P. bliteus*, representando

uma repetição, foi observada individualmente por 40 minutos e substituída quando não apresentou comportamento de parasitismo por cinco minutos.

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (fêmeas alimentadas ou em jejum) com 15 repetições. Os dados de busca do hospedeiro pelo parasitoide foram submetidos a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis Ranking, software Minitab (Minitab, 2010).

Fêmeas, sem apresentavam comportamento de oviposição após cinco minutos de observação, foram substituídas. E os comportamentos de tamborilar de antenas, desse parasitoide, e estratégias para ovipositar, ingestão de hemolinfa e demarcar a superfície da concha, após a oviposição, foram estudados.

2.4 RESULTADOS

Fêmeas de *P. bliteus* parasitaram 100% das ninfas de *G. blimblecombei*, começando por aquelas sem conchas, e praticaram host-feeding em hemolinfa e fluidos corporais das mesmas antes de realizarem o parasitismo (Figura 1 A, B e D).

Psyllaephagus bliteus, exposto a conchas vazias de *G. brimblecombei*, iniciou o processo de parasitismo tamborilando com as antenas e/ou batendo o ovipositor na concha do hospedeiro (Figura 1C). No entanto, esse parasitoide interrompeu, imediatamente, este processo ao detectar a ausência da ninfa hospedeira, mantendo-se em repouso ou caminhando pela arena durante o tempo observado.

Fêmeas de *P. bliteus*, em jejum e expostas a ninfas com concha, encontraram o hospedeiro 2,6 vezes mais rápido que aquelas alimentadas (Tabela 1). Inicialmente, tamborilaram as antenas para detectar a ninfa protegida pela concha, subindo na mesma, fazendo movimento de ∞ , perfurando a concha com o aparelho bucal (Figura 2A), inserindo o ovipositor nesse orifício para alcançar o corpo do hospedeiro, raspando a concha com seu ovipositor para marcá-la ao terminar o processo. Esse comportamento de parasitismo foi executado por 60,00% e 26,67% das fêmeas de *P. bliteus* em jejum e alimentadas, respectivamente. O segundo comportamento, com a fêmea inserindo o ovipositor sob a concha translúcida e iniciando o parasitismo na junção entre a concha e a folha, enquanto a ninfa hospedeira tentava se esquivar foi executado por 73,33% e 40,00% das fêmeas de *P. bliteus* alimentadas ou em jejum, respectivamente (Figura 2B). O parasitoide, em algumas tentativas, deslocou a

concha ou perfurou toda a sua lateral para facilitar o parasitismo (Figura 2 C, D) e, novamente, marcou a concha raspando o abdome sobre a mesma.

Tabela 1. Tempo mediano de busca em segundos (média \pm erro padrão) pelo parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) por ninfas de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) a 25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa.

<i>Psyllaephagus bliteus</i>	Tempo médio (s)	Amplitude (s)	P
Sem alimento	87,00 \pm 20,64B	52-120	0,0001
Alimentada	229,00 \pm 39,22A	156-296	

Médias seguidas de mesma letra por coluna não diferem ($p < 0,05$).

Os perfis químicos, dos cromatogramas 1 e 2, de indivíduos de *G. brimblecombei*, coletados nas três infestações, são semelhantes e com maiores números de picos que no 3 (Figura 3). Os ácidos orgânicos e hidrocarbonetos de cadeia longa, como hexadecadien-7,11 ol-1 (A); ácido palmitoleico (B); ácido palmítico (C); lauril-3-mercaptopropionato (D); ácido linolelaídico (E); ácido oleico (F); tetracosano (G); pentacosano (H); heptacosano (I); nonacosano (J); triacontano (K); dilauril tiodipropionato (L) foram os compostos, majoritários nesses extratos. O perfil volátil do cromatograma de ninfas (cromatograma 1) foi mais intenso e com maior número de compostos identificados que o de conchas (cromatograma 3). Os compostos F (ácido oleico), G (tetracosano) e H (pentacosano) foram majoritários nos cromatogramas 1 e 2 e os A, B, C, E, F e K não foram detectados no 3.

Figura 1. Fêmea de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitando ninfa de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) sem concha (A); praticando host-feeding em ninfa de *G. brimblecombei* (B), verificando com o ovipositor, a presença da ninfa embaixo da concha (C) e ninfa de *G. brimblecombei*, de terceiro instar com duas cicatrizes de oviposição por esse parasitoide (D) (Fotos: A, B e D, Prof. Carlos F. Wilcken).



Figura 2. *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) com dois comportamentos de parasitismo, mordendo a concha antes de parasitar (A) e inserindo o ovipositor e a ninfa tentando se esquivar na parte oposta da concha (B) e concha de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) antes e após o parasitismo por *P. bliteus* inserindo o ovipositor sob a concha sobre a folha (C e D).

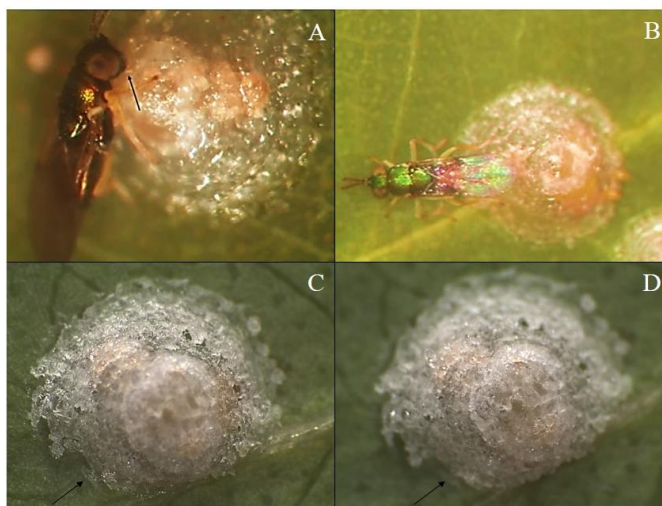
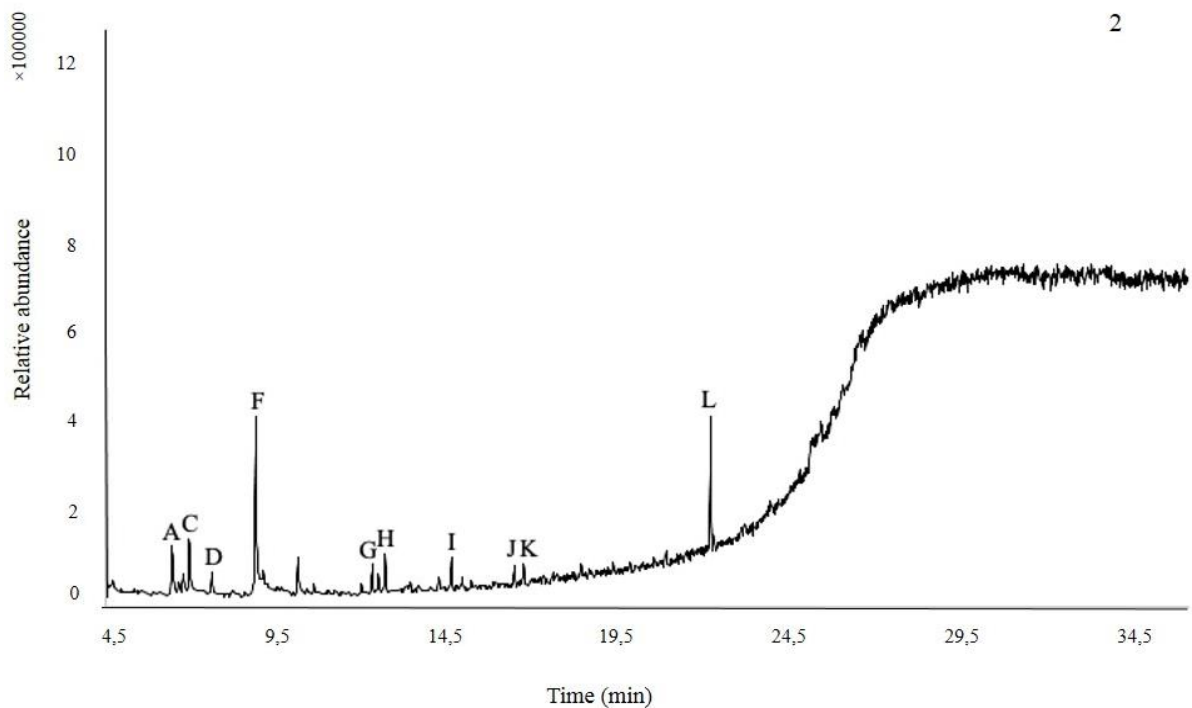
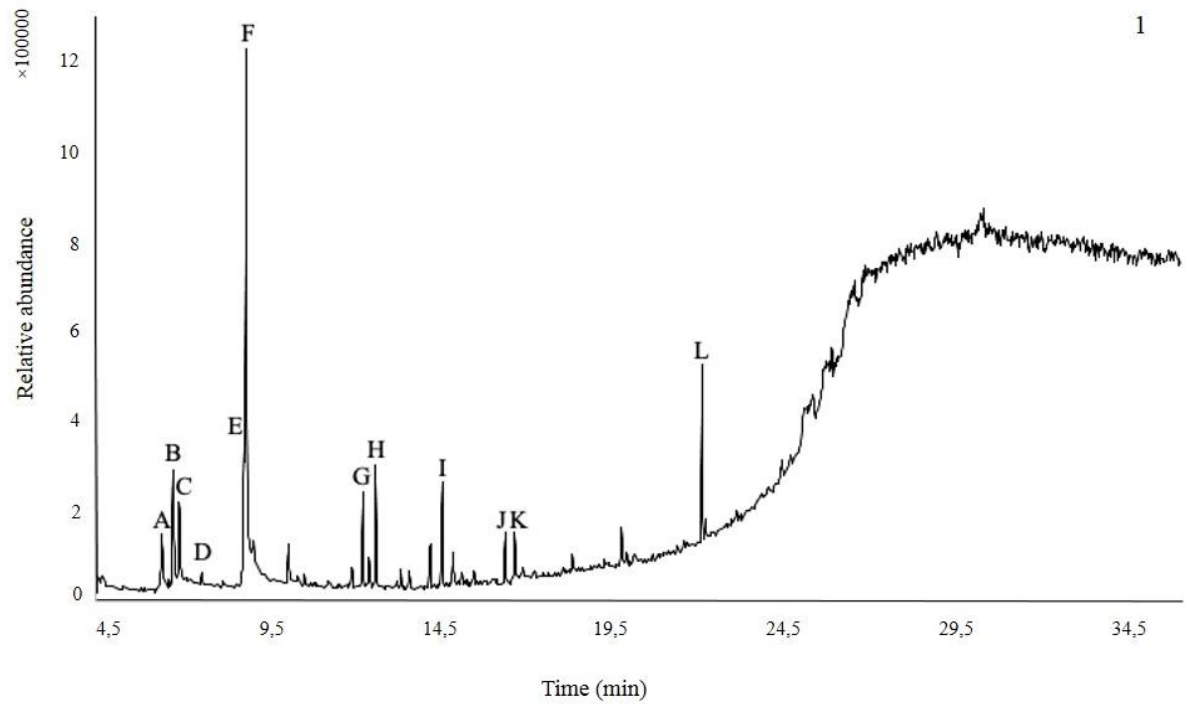
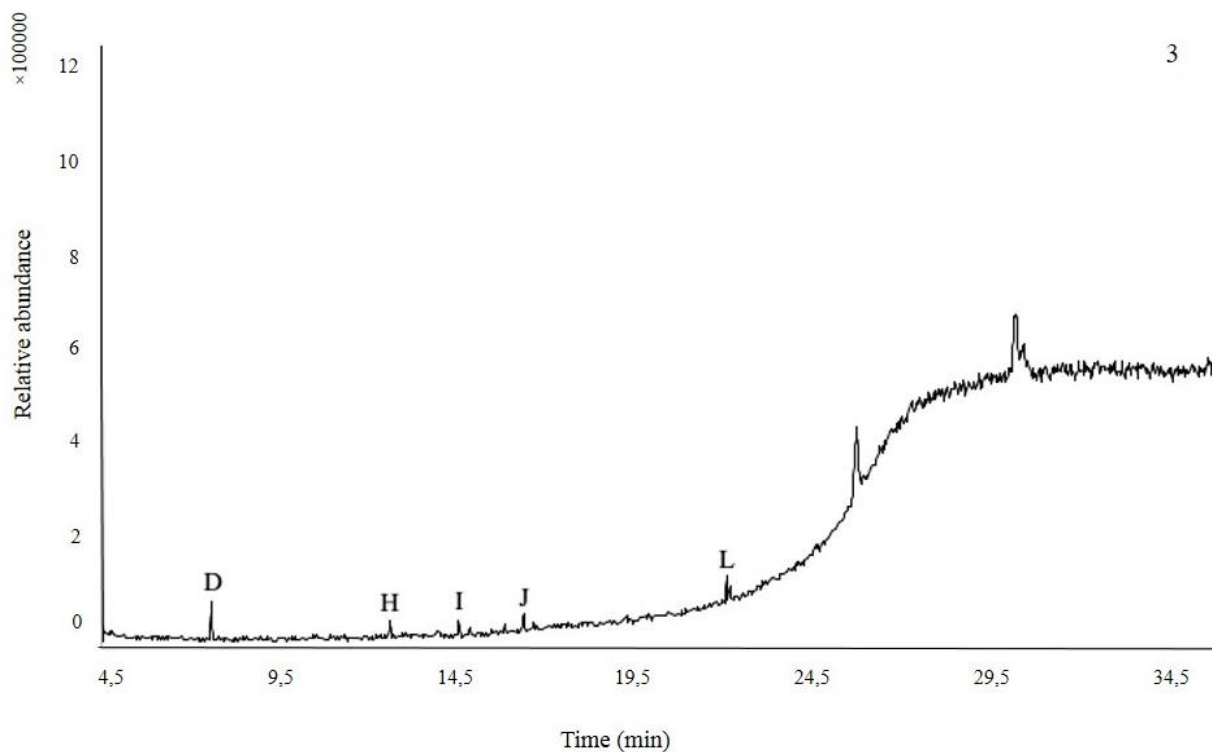


Figura 3. Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa dos extratos heptânicos de ninfas (1), concha + ninfas (2) e, somente, conchas (3) de *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae). Os compostos de A-L foram majoritários nas amostras.





2.5 DISCUSSÃO

O parasitismo de todas as ninfas de *G. blimblecombei*, com ou sem concha, confirma a capacidade do parasitoide *P. bliteus* localizar o hospedeiro e a escolha do local de oviposição está, geralmente, associado a pistas visuais, olfativas e táteis (Tognon, 2020; Liu et al., 2019). A preferência inicial de *P. bliteus* por ninfas de *G. brimblecombei* sem concha protetora se deve a maior vulnerabilidade das mesmas, como relatado para fêmeas de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) que preferiram parasitar ninfas de terceiro, quarto e quinto instares de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) (Liu et al., 2019), devido a esse hospedeiro não ter casca protetora. Por outro lado, a proteção cotonosa com cera branca não reduziu ou impediu o parasitismo de ninfas de *Blastopsylla occidentalis* (Taylor) (Hemiptera: Psylloidea) por *Psyllaephagus blastopsyllae* (Tamesse) (Hymenoptera: Encyrtidae) (Floris et al., 2018, Tamesse et al., 2014). O comportamento de host-feeding, importante e negligenciado no controle biológico, é considerado predação e confirma o fato de fêmeas de parasitoides obterem substâncias como açúcares, glicogênio, proteínas e água de seus hospedeiros, com picadas alimentícias além de parasitá-los (Jervis et al., 1986, Kidd et al., 1991, da Silva

et al., 2019). Este comportamento foi relatado para *P. bliteus* em *G. brimblecombei* em laboratório na Califórnia, EUA (Daane et al. 2005), *P. pilosus* (Noyes) em ninfas de *Ctenarytaina eucalypti* (Maskell) (Hemiptera: Psyllidae) (Fidalgo et al., 2005) e 140 espécies de himenópteros de 17 famílias (Heimpel et al., 1996). O host-feeding não é um comportamento exclusivo de fêmeas, pois machos o praticam em ninfas perfuradas, como relatado para *T. radiata* (Chen et al., 2014). O parasitoide *P. bliteus* se enquadra nas categorias não destrutiva (hospedeiro sobrevive a picada de prova e mantém os embriões do parasitoide) e destrutiva (pode causar a morte do hospedeiro).

O comportamento inicial de antenação e/ou batendo o ovipositor na concha vazia de *G. brimblecombei* por *P. bliteus*, indicam que esse parasitoide reconhece a qualidade de hospedeiros com auxílio das antenas e do ovipositor. O tamborilar de antenas permite ao parasitoide inspecionar e reconhecer o hospedeiro, além de detectar odores por órgãos quimo-sensíveis nas antenas, pernas e no ovipositor, as quais são complementadas com a visão (Klinner et al., 2016; Haverkamp et al., 2018, Laumann et al., 2020). Isto é semelhante ao relatado para o parasitoide *Cleruchoides noackae* (Lin e Huber) (Hymenoptera: Mymaridae) em ovos do hospedeiro *Thaumatoscoris peregrinus* (Carpintero and Dellapé) (Hemiptera: Thaumastocoridae) (Haas et al., 2018) e para *Cotesia flavipes* (Cameron) e *C. sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) parasitando larvas de *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Sesamia calamitis* (Hampson) (Lepidoptera: Noctuidae), examinando o hospedeiro, externamente, com as antenas e tarsos antes do parasitismo (Obonyo et al., 2010).

A localização e o parasitismo mais rápido de ninfas de *G. brimblecombei* por fêmeas de *P. bliteus*, em jejum, que por aquelas alimentadas pode ser devido ao fato das primeiras estarem buscando, inicialmente, carboidratos, proteínas e açúcares primários, presentes na concha do hospedeiro e importantes como fonte energética antes de iniciarem o parasitismo (Godfray, 1994). No entanto, isto varia entre parasitoides, pois fêmeas, alimentadas ou não, de *Paratelenomus saccharalis* (Dodd) (Hymenoptera: Platygasteridae) encontraram ovos do hospedeiro (tamborilar as antenas, parasitar e demarcar os ovos) em tempo semelhante (Takano et al., 2019). A perfuração da concha de *G. brimblecombei* por *P. bliteus* com a mandíbula, discorda do primeiro relato para esse parasitoide, perfurando a concha, diretamente, com o ovipositor (Daane et al. 2005). O parasitismo da ninfa de *G. brimblecombei*, entre a

inserção da concha e a folha, concorda com o descrito para esse inimigo natural na Califórnia (Daane et al., 2005; Sullivan et al., 2006). Parasitoides podem utilizar mais de uma estratégia de oviposição, como observado em *P. bliteus* e para os parasitoides *Exorista larvarum* (Linnaeus) e *E. japonica* (Townsend) (Diptera: Tachinidae) e *Protaphidius nawai* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) (Takada 1983; Maryama et al., 2013; Dindo et al., 2018). O comportamento de parasitismo pode variar, também, entre linhagens de uma mesma espécie parasitoide, como relatado para *P. nawai* com distanciamento genético de 0,03 interespecífico de COI se distribuindo alopatricamente mas co-habitando e compartilhando colônias de pulgões no Japão (Yamamoto et al., 2020).

Diferenças entre os perfis químicos, com maior número de compostos detectados nos cromatogramas 1 e 2, de indivíduos coletados nas três infestações de *G. brimblecombei*, confirma o fato de insetos hospedeiros, como *G. brimblecombei*, produzirem ácidos orgânicos, hidrocarbonetos e proteínas, normalmente, associados ao comportamento de alimentação (Murali-Baskaran et al., 2018). Os compostos pentacosano e tetracosano são, altamente, difusos no reino vegetal com função de cairomônio, importantes para atração e localização de presas e hospedeiros por inimigos naturais (Lewis et al., 1982, Murali-Baskaran et al., 2020, Ji et al., 2016). O perfil volátil mais intenso e diverso do cromatograma 1, com a volatilização de ácido oleico, pentacosano e tetracosano por ninfas sem a proteção da concha, aumenta a atração para *P. bliteus*. Tetracosano, detectado na superfície dos ovos de *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) foi, altamente, atrativo para fêmeas do parasitoides *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae) (Ji et al., 2016). Esse composto químico foi detectado na cutícula e frass de *Scirpophaga incertulas* (Walker) (Lepidoptera:Pyralidae) e ovos, desse hospedeiro, tratados com tetracosano sintético foram mais atrativos para o parasitoide *Trichogramma japonicum* (Ashmead) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que os não tratados (Rani et al., 2007). A falta de emissão de ácido oleico, pentacosano e tetracosano por conchas (cromatograma 3) confirma o fato desses compostos serem produzidos pelas ninfas de *G. brimblecombei*. Isto pode explicar a falta de atratividade e parasitismo, de conchas vazias, por *P. bliteus* e que voláteis emitidos pelos hospedeiros são importantes para parasitoides como ácido hexadecanoico, ácido linoleico, e ácido (Z)-9-octadecenoico em ovos de *Euchishus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) para *T. podisi* (Michereff et al., 2016) e o ácaro predador, *Gynaeseius liturivorus* (Ehara) (Acari:

Phytoseiidae) evitando ovos da própria espécie e a competição por sítios de oviposição, reduzindo o canibalismo (Saito et al., 2020). Além disso, danos pelo psílideo galhador, *Baccharopelma dracunculifoliae* (Burckhardt, Espírito-Santo, Fernandes, Malenovský) (Hemiptera: Psyllidae) aumentaram a produção de voláteis em, aproximadamente, 14-22% em folhas danificadas, enquanto as saudáveis emitiram menos de 1% dos mesmos (Besten et al., 2015).

2.6 CONCLUSÃO

Os ácido oleico, pentacosano e tetracosano são os principais voláteis emitidos por ninfas de *G. brimblecombei*, os quais atraem *P. bliteus*. Esse parasitoide discriminou, eficientemente, a qualidade e presença do hospedeiro sob as conchas e desenvolveu duas estratégias para parasitá-lo, a inserção do ovipositor na junção entre a concha e a folha e a mordida no topo da concha para inserção do ovipositor.

2.7 REFERÊNCIAS

BERTI-FILHO, E., COSTA, V.A., ZUPARKO, R.L., LA SALLE, J. Ocorrência de *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera Encyrtidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 78, n.3, p.304, 2003.

BESTEN, M.A., NUNES, D.S., GRANATO, D., SENS, S.L., WISNIEWSKI JR, A., EDESIO, L.S., RIVA-SCHARF, D. Volatile components from galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) on leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Quimica Nova**, v. 38, n.1, p. 66-70, 2015.

BICEP, Biological control of Eucalypt pest. Disponível em <<https://bicep.net.au/pests/glycaspis-brimblecombei/>> Acessado 01 abr de 2020.

BOAVIDA, C., GARCIA, A., BRANCO, M. How effective is *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) in controlling *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psylloidea)? **Biological Control**, v. 99, p.1-7, 2016.

BRENNAN, E.B., GILL, R.J., HRUSA, G.F., WEINBAUM, S.A. First record of *Glycaspis brimblecombei* (Moore) (Homoptera: Psyllidae) in North America: initial observations and predator associations of a potentially serious new pest of eucalyptus in California. **Pan-Pacific Entomologist**, v. 75, n.1, p. 55-57, 1999.

CALECA, V., BELLA, S., LA PERGOLA, A., LOMBARDO, A., LO, V.G., MALTESE, M., NUCIDORA, S., RIZZO, R., SUMA, P., TORTORICI, F., RAPISARDA, C. (2018). Environmental factors impact and incidence of parasitism of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera, Encyrtidae) on populations of *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Aphalaridae) in Mediterranean climatic areas. **Redia**, v. 101, p. 89-100, 2018.

CHEN, X., STANSLY, P.A. Biology of *Tamarixa radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoid of the citrus greening disease vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psylloidea): a mini review. **Florida Entomologist**, v. 97, n.4, p. 1404-1413, 2014.

CUELO, E.M., ANDORNO, A.V., HÉRNANDEZ, C.M., LÓPEZ, S.N. Prey consumption and development of the indigenous lacewing *Chrysoperla externa* feeding on two exotic *Eucalyptus* pests. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n.12, p.1159-1171, 2019.

DAANE, K.M., SIME, K.R., DAHLSTEN, D.L., ANDREWS, J.W., ZUPARKO, R.L. The biology of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red gum lerp psyllid (Hemiptera: Psylloidea). **Biological Control**, v. 32, n.2, p. 228–235, 2005.

DAANE, K.M., SIME, K.R., PAINE, T.D. Climate and the effectiveness of *Psyllaephagus bliteus* as a parasitoid of the red gum lerp psyllid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n.11, p. 1305-1320, 2012.

DAHLSTEN, D.L., DREISTADT, S.H., GARRISON, R.W., GILL, R. J. **Pest notes: Eucalyptus redgum lerp psyllid**. Oakland: University of California Agricultural Natural Resources Publications, n. 7460, p. 1-4, 2003.

DA SILVA, C.S.B., PRICE, B.E., WALTON, V. Water-deprived parasitic wasp (*Pachycrepoideus vindemmia*) kill more pupae of a pest (*Drosophila suzukii*) as a water-intake strategy. **Scientific Report**, v. 9, n.1, p. 3592, 2019.

DAL POGETTO, M.H.F.A., WILCKEN, C.F., GIMENES, M.J., CHRISTOVAM, R.S., PRADO, E.P. Control of red-gum lerp psyllid with formulates mycoinsecticides under semi-field conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 32, n.1-2, p. 85-91, 2011.

DREISTADT, S.H., GILL, R.J. **Pest notes: Eucalyptus redgum lerp psyllid**. Oakland: University of California Agricultural Natural Resources Publications, n. 7423, p. 1-8, 1999.

DIAS, T.K.R., WILCKEN, C. F., SOLIMAN, E. P., GIL-SANTANA, H., ZACHÉ, B. Occurrence of *Atopozels opsimus* preying on nymphs and adults of *Glycaspis brimblecombei*. **Phytoparasitica**, v. 40, n.2, p. 137-141, 2012.

DINDO, M.L., NAKAMURA, S. Oviposition strategies of Tachinid parasitoids: two exorista species as case studies. **International Journal of Insect Science**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2018.

FERREIRA-FILHO, P.J., WILCKEN, C.F., MASSON, M.V., TAVARES, W.S., GUERREIRO, J.C., BRAGA DO CARMO, J., PRADO, E.P., ZANUNCIO, J.C. Influence of temperature and rainfall on the population dynamics of *Glycaspis brimblecombei* and *Psyllaephagus bliteus* in *Eucalyptus camaldulensis* plantations. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 43, n.1, p. 1-6, 2017.

FIDALGO, P., OLIVARES, T.S., DE HARO, A.M., BARAÑAO, J.J. Control biológico de *Ctenarytaina eucalypti* (Hem.: Psyllidae), plaga del eucalipto en Argentina. **Bosque** (Valdivia), v. 26, n.2, p. 91-93, 2005.

FIRMINO-WINCKLER, D.C., WILCKEN, C.F, DE OLIVEIRA, N.C, DE MATOS, C.A.O. Biologia do psílideo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Psyllidae) em *Eucalyptus* spp. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n.1, p. 144-146, 2009.

FLORIS, I., COCCO, A., BUFFA, F., MANNU, R., SATTA, A. Insect pests of *Eucalyptus* plantations in Sardinia (Italy). **Redia-Giornale di Zoologia**, v. 101, p. 61-71, 2018.

GILL, R.J. New state records: Redgum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei*. **California Pest and Disease**, v.17, n.1/3, p. 7-8, 1998.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University, p.484, 1994.

HAAS, J., BARBOSA, L.R., POTRICH, M., LOZANO, E.R., MAZARO, S.M. Oviposition behaviour of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) in laboratory. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n.1, p. 1-4, 2018.

HAVERKAMP, A., HANSSON, B.S., KNADEN, M. Combinatorial codes and labeled lines: how insects use olfactory cues to find and judge food, mates, and oviposition sites in complex environments. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 49, 2018.

HEIMPEL, G. E., COLLIER, T. R. The evolution of host-feeding behavior in insect parasitoids. **Biological Reviews**, v. 71, n.3, p. 373–400, 1996.

HESPENHEIDE, H. A. Bionomics of leaf-mining insects. **Annual Review of Entomology**, v. 36, n.1, p. 535-560. 1991.

HODKINSON, I.D. The biology of Psylloidea (Homoptera): a review. **Bulletin of Entomological Research**, v. 64, n.2, p. 325-339, 1974.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório Anual 2020**. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>> Acessado em 31 out 2020.

JERVIS, M. A.; KIDD, N. Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. **Biological Reviews**, v. 61, n.4, p. 395–434, 1986.

JI, Q., BI, K., CHEN, J. Response of egg-pupal parasitoid *Fopius arisanus* (Sonan) to infochemicals from the host eggs' surface of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n.4, p. 1151–1157, 2016.

KIDD, N.A.C., JERVIS, M.A. Host-feeding and oviposition strategies of parasitoids in relation to host stage. **Researches on Population Ecology**, v. 33, n.1, p. 13-28, 1991.

KLINNER, C.F., KÖNIG, C., MISSBACH, C., WERCKENTHIN, A., DALY, K.C., BISCH-KNADEN, S., STENGL, M., HANSSON, B.S, GROßE-WILDE, E. Functional olfactory sensory neurons housed in olfactory sensilla on the ovipositor of the hawkmoth *Manduca sexta*. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 130, 2016.

LAUMANN, R.A., SAMPAIO, M.V. Controle de artrópodes-praga com parasitodes. pp 65-112 In: FONTES, E.M.G., VALADARES-INGLIS, M.C. **Controle biológico de Pragas da Agricultura**. Brasília, DF: Embrapa. 2020.

LEWIS, W.J.; NORDLUND, D.A.; GUELDNER, R.C.; TEAL, P.E. A.; TUMLINSON, J.H. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, n.10, p. 1323-1331, 1982.

LIU, Y. M.; GUO, S. H.; WANG, F. F.; ZHANG, L. H.; GUO, C. F.; CUTHBERTSON, A. G. S.; QIU, B. L.; SANG, W. *Tamarixa radiata* behaviour is influenced by volatiles from both plants and *Diaphorina citri* nymphs. **Insects**, v. 10, n. 5, p. 141-151, 2019.

MARYAMA, M., KOMATSU, T., KUDO, S., SHIMADA, T., KINOMURA, K. **The Guests of Japanese Ants**. Tokai University Press.xii, p. 208, 2013.

MICHEREFF, M.F.F., BORGES, M., AQUINO, M.F.S., LAUMANN, R.A., GOMES, A.M., BLASSIOLI-MORAES, M.C. The influence of volatile semiochemicals from stink bug eggs and oviposition-damaged plants on the foraging behaviour of the egg parasitoid *Telenomus podisi*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 106, n.5, p. 663-671, 2016.

MURALI-BASKARAN, R.K., SRIDHAR, J., CHANDER SHARMA, K., JAIN, L., SENTHIL-NATHAN, S., HUNTER, W.B., KUMAR, J., KAUSHAL, P. Kairomones effect on parasitic activity of *Trichogramma japonicum* against rice yellow stem borer, *Scirpophaga incertulas*. **Journal of Applied Entomology**, v. 144, p. 373– 381, 2020.

NARANJO-GUEVARA, N., PEÑAFLORES, M.F.G., CABEZAS-GUERRERO, M.F., BENTO, J.M.S. Nocturnal herbivore-induced plant volatiles attract the generalist predatory earwig *Doru luteipes* Scudder. **The Science of Nature**, v. 104, n.9-10, p. 77, 2017.

OBONYO, M., SCHLTHESS, F., LE RU, B., VAN DEN BERG, J., CALATAYUD, P.A. Host recognition and acceptance behaviour in *Cotesia sesamiae* and *C. flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of gramineous stemborers in Africa. **European Journal of Entomology**, v. 107, n.1, p. 169-176, 2010.

PAINE, T. D., MILLAR, J. G., HANKS, L. M., GOULD, J., WANG, Q., DAANE, K., DAHLSTEN, D. L., MCPHERSON, E. G. Cost–benefit analysis for biological control programs that targeted insect pests of eucalypts in urban landscapes of California. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2497-2504, 2015.

PEÑAFLORES, M.F.G., GONÇALVES, F.G., COLEPICOLO, C., SANCHES, P.A., BENTO, J.M.S. Effects of single and multiple herbivory by host and non-host caterpillars on the attractiveness of herbivore-induced volatiles of sugarcane to the generalist parasitoid *Cotesia flavipes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 165, n.1, p. 83-93, 2017.

PLASCENIA-GONZÁLEZ, A., CIBRIÁN-TOVAR, D., LLANDERAL-CÁZARES, C., LÓPEZ-PÉREZ, I., ARRIOLA-PADILLA, V. Biología del parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 11, n.1, p. 11-17, 2005.

RANI, P.U., KUMARI, S.I., SRIAMAKRISHNA, T., SUDHAKAR, T.R. Kairomones extracted from rice yellow stem borer and their influence on egg parasitization by

Trichogramma japonicum Ashmead. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n.1, p. 59-73, 2007.

SAITOH, F., JANSSEN, A., CHOH, Y. The use of volatile cues in recognition of kin eggs by predatory mites. **Ecological Entomology**, 2020. doi:10.1111/een.12872

SULLIVAN, D.J., DAANE, K.M., SIME, K.R., JUNIOR ANDREWS, J.W. Protective mechanisms for pupae of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red-gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psylloidea). **Australian Journal of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 101–105, 2006.

TAKADA, H. Redescription and biological notes on *Protaphidius nawaii* (Ashmead) (Hymenoptera, Aphidiidae). **Kontyû**, v. 51, n.1, p. 112–121, 1983.

TAKANO, S., TAKASU, K. Food increases reproductive effort in a parasitoid wasp. **Biological Control**, v. 133, n. 1, p. 75-80, 2019.

TAMESSE, J.L., SOUFO, L., TCHANATAME, E.C., DZOKOU, V.J., GUMOVSKY, A., DE CONINCK, E. Description of *Psyllaephagus blastopsyllae* sp. n. (Encyrtidae), new species, endoparasitoid of *Blastopsylla occidentalis* Taylor (Psyllidae, Spondylaspidinae) in Cameroon. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 228-236, 2014.

TOGNON, R., SANT'ANA, J., MICHEREFF, M.F.F., LAUMANN, R.A., BORGES, M., BLASSIOLI-MORAES, M.C., REDAELLI, L.R. Kairomones from *Euschistus heros* egg masses and their potential use for *Telenomus podisi* parasitism improvement. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1-7, 2020. doi:10.1017/S000748532000019X

TULLER, J., OLIVEIRA, K.N., SILVA, J.O., DE FARIA, M.L., DO ESPÍRITO-SANTO, M.M., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C. *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) attack patterns on different *Eucalyptus* genotypes. **PeerJ**, v. 5, p. e3864, 2017.

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

WILCKEN, C.F., FIRMINO-WILCKLER, D.C., DAL POGETTO, M.H.F.A., DIAS, T. K.R., LIMA, A.C.V., DE SÁ, L.A.N., FERREIRA-FILHO, P.J. Psilídeo-de-concha-do-eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore, pp. 883-897. In: Vilela, E.F, Zucchi, R.A. **Pragas introduzidas no Brasil insetos e ácaros**. Fealq, Piracicaba, SP. 2015.

YAMAMOTO, T., HASEGAWA, H., NAKASE, Y., KOMATSU, T., ITINO, T. Cryptic diversity in the aphid-parasitizing wasp *Protaphidius nawai* (Hymenoptera: Braconidae): discovery of two attendant-ant-specific mtDNA Lineages. **Zoological Science**, v. 37, n.2, p. 117-121, 2020.

CAPÍTULO 3 - COMPORTAMENTO DE CORTE E CÓPULA E HISTOLOGIA DOS OVÁRIOS DE FÊMEAS DE *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae)

RESUMO

O parasitoide de ninfas, *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), tem alto potencial para o controle biológico de *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae). O objetivo foi analisar o comportamento de corte e cópula de *P. bliteus*, na proporção 1:1 e 2 machos: 1 fêmea, e descrever a histologia dos ovários de fêmeas virgens e copuladas desse parasitoide. Em 1:1, a antenação nas antenas e no tórax-abdomen das fêmeas, por machos, foram registradas durante a corte. Essas fêmeas evitaram as investidas mostrando-se disponíveis, para cópula, apenas, com 48h de idade. Em 2:1, o comportamento de rivalidade entre parasitoides machos inibiu a cópula. Os cortes histológicos dos ovários de fêmeas virgens e copuladas foram semelhantes, com duas regiões bem definidas, germário e vitelário, e ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento, incluindo maduros com deposição de córion e ricos em vitelo. A descrição da histologia e do processo reprodutivo de *P. bliteus* melhora a compreensão da biologia desse parasitoide.

Palavras-chave: Abanar as asas. Controle biológico. Criação em laboratório. Parasitoide de ninfas.

ABSTRACT

The parasitoid *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) has high potential for the biological control of the eucalyptus pest *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae) nymphs. This research aimed was to analyze the courtship and mating behavior of *P. bliteus* at the proportion of 1:1 and 2 males: 1 female in Petri dish (5 cm diameter), and to describe the ovary histology of virgin and mated females of this parasitoid. At 1:1, males touch the antennae and thorax-abdomen of females during the courtship but females avoid being touched before they were 48 hours old. At 2:1 the competition between male parasitoids inhibit mating. The ovaries histology of virgin and mated *P. bliteus* females are similar, with two well-defined germarium and vitellarium regions, with oocytes at different development stages, including mature ones rich in yolk and with eggshell. The reproductive behavior and histology of *P. bliteus* improves the knowledge on this parasitoid for the biological control of *G. brimblecombei*.

Key-words: Biological control. Mass rearing. Nymph parasitoid. Wing fanning.

3.1 INTRODUÇÃO

O parasitoide de ninfas *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), é importante no controle da praga psilídeo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), ambos endêmicos da Austrália (Atlas of Living Australia, 2020).

Psyllaephagus bliteus foi introduzido acidentalmente com *G. brimblecombei* em 2003 na região de Mogi-Guaçu, estado de São Paulo, Brasil (Berti-Filho et al., 2003). Esse inimigo natural parasita os cinco instares do psilídeo-de-concha, entretanto prefere as de terceiro e quarto instares, depositando até dois ovos na região do tórax e abdome por ninfa dessa praga (Daane et al., 2005). Esse parasitoide modifica a fisiologia das ninfas de *G. brimblecombei*, as quais aumentam a excreção de carboidratos e proteínas para a confecção de conchas mais espessas e com maior proteção para o mesmo que inicia seu desenvolvimento quando a ninfa de *G. brimblecombei* atinge o quinto ínstar (Sullivan et al., 2006).

O aspecto de ninfas parasitadas do psilídeo-de-concha, denominadas “múmias”, é dilatado com cores opacas e a larva do parasitoide na cavidade abdominal consumindo os órgãos internos do hospedeiro (Plascencia-Gonzalez et al., 2005). Pupas de *P. bliteus* permanecem no interior das ninfas e são exaradas e pretas, sendo possível identificar o sexo das mesmas baseado na terminália pontiaguda ou arredondada de fêmeas e machos, respectivamente. O adulto abre, com suas mandíbulas, a porção posterior do abdômen da ninfa, de *G. brimblecombei*, e a parte lateral da concha, desse parasitoide, para emergir (Plascencia-Gonzalez et al., 2005).

Psyllaephagus bliteus não suprime totalmente a população do psilídeo-de-concha, controlando cerca de 64% dos indivíduos dessa praga (Margiotta et al., 2018). Fatores climáticos podem afetar as populações e taxas de parasitismo de *P. bliteus*, com relato de 0,21 a 7,03% no Brasil (Ferreira-Filho et al., 2015), 1,67 a 33% na Califórnia (Daane et al., 2012) e inferiores a 15% na Itália (Caleca et al., 2018) e Portugal (Boavida et al., 2016). Contudo, liberações inundativas aumentaram a taxa de parasitismo, em campo, por *P. bliteus* (Ferreira-Filho et al., 2015, Tuller et al., 2018) em *G. brimblecombei*, reduzindo perdas por esse inseto (Paine et al., 2015).

O uso de *P. bliteus*, no manejo de *G. brimblecombei*, depende de conhecimentos sobre a biologia reprodutiva, comportamento, maturação e fecundidade desse parasitoide para sua criação em laboratório. O objetivo desse

estudo foi descrever o comportamento de corte e cópula e a histologia dos ovários de fêmeas virgens e copuladas de *P. bliteus*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 CRIAÇÃO DE *Glycaspis brimblecombei* E *Psyllaephagus bliteus*

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. *Glycaspis brimblecombei* foi mantido em gaiolas (40 cm × 45 cm × 80 cm) com mudas de *Eucalyptus camaldulensis* e/ou de *E. grandis* × *E. camaldulensis*, a 25 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ UR e 12: 12h (claro: escuro) fotoperíodo. Cem adultos de *G. brimblecombei* foram liberados por gaiola e, após, sete dias os ovos depositados nas mudas de eucalipto foram contados. As mudas de eucalipto foram monitoradas, a cada três dias, para acompanhar o desenvolvimento ninfal de *G. brimblecombei* até a fase adulta (Firmino-Winckler et al., 2009, Wilcken et al., 2010).

Adultos de *P. bliteus* foram obtidos de múmias de *G. brimblecombei*, coletadas em plantio de *E. camaldulensis* na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP. Esses adultos foram coletados com auxílio de aspirador manual, sexados (Riek, 1962), alimentados com gotas de mel e criados em *G. brimblecombei* nas condições citadas. Dez a 15 casais de *P. bliteus* foram liberados por gaiola quando 50% das ninfas de *G. brimblecombei* estavam no terceiro instar. As conchas, de ninfas de *G. brimblecombei*, foram verificadas, após 15 dias, e as pupas do parasitoide individualizadas em placas de Petri (3 cm diâmetro) até a emergência de seus adultos (Wilcken et al., 2010), os quais foram individualizados e alimentados com mel *ad libitum* disponibilizado na parede da placa.

3.2.2 OBSERVAÇÃO DE CÓPULA

Os comportamentos de pré-cópula e cópula de *P. bliteus* foram obtidos por observações diretas com microscópio estereoscópico ZEISS® Leica Application Suite (versão 2.1.0). As observações foram realizadas por 20 minutos durante o período

vespertino, pois testes anteriores não identificaram variações na atividade de cópula nos períodos matutino, vespertino, crepuscular ou noturno, em observações por 60, 40, 30 ou 20 minutos.

Os experimentos foram conduzidos a 25 ± 2 °C, com cada casal ou combinações por placa de Petri (5 cm diâmetro) observados por 20 minutos. Machos e fêmeas permaneceram individualizados até o momento do teste e, também, após a observação. Os casais virgens, sem experiência prévia de cópula, foram analisados diariamente, até a morte sem a substituição de machos ou fêmeas. Onde cinquenta casais (1 macho: 1 fêmea), sendo dez casais recém-emergidos, 10 com fêmeas recém-emergidas e machos com 24 horas de idade, 10 com fêmeas de 24 horas de idade e machos recém-emergidos, 10 com fêmeas de 48 horas de idade e machos recém-emergidos, 10 com fêmeas recém-emergidas e machos com 48 horas de idade e 10 com fêmeas. E 20 combinações com 2 machos: 1 fêmea, todos recém-emergidos.

Tentativas com sucesso ou não de cópula foram analisadas, onde as sequências comportamentais de identificação, corte, número de cópula (duração) e pós-cópula foram analisadas.

3.2.3 HISTOLOGIA DOS OVÁRIOS

Dez fêmeas virgens recém-emergidas com menos de 24 h de idade, e outras 10 copuladas com 10 dias de idade e mantidas com machos foram transferidas para o fixador Carnoy's (clorofórmio: etanol: ácido acético, 6:3:1) e encaminhadas ao Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Essas fêmeas foram desidratadas em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 95%) por 10 minutos, em cada concentração, e embebidas em historesina (Leica). Amostras foram seccionadas com 2 µm de espessura, coradas com hematoxilina (12 min) e eosina (30 s) e analisadas em microscópio de luz.

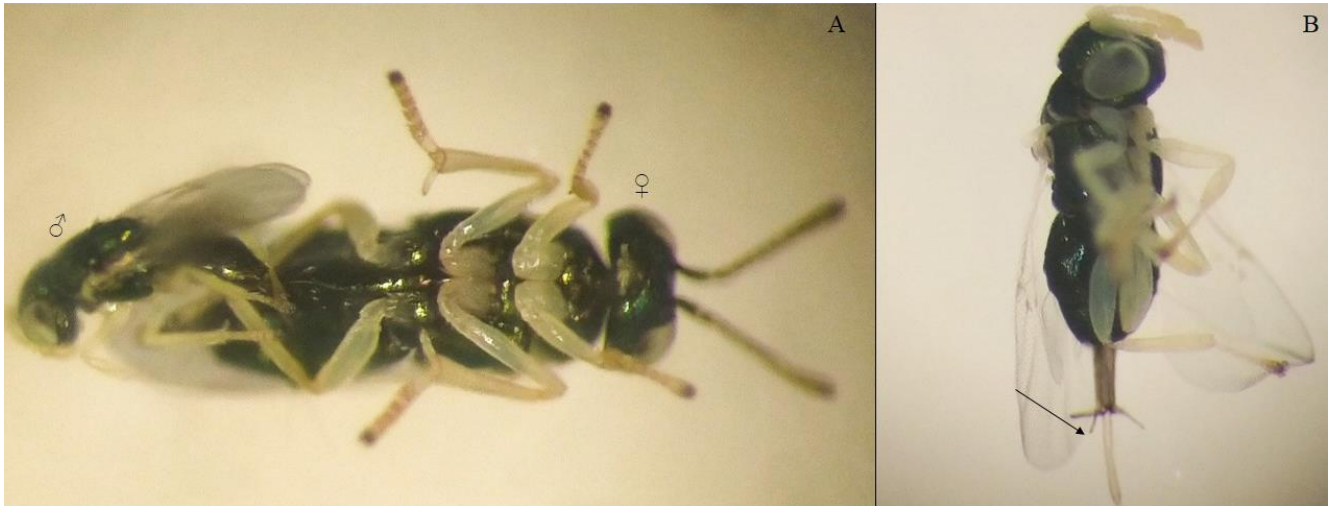
3.3 RESULTADOS

Na proporção 1:1, machos de *P. bliteus* foram mais ativos na corte, enquanto a fêmea se mantinha passiva, com pouco movimento de resposta. Os parasitoides machos, recém-emergidos, andavam pela arena (latência) como

reconhecimento da área, antes de detectar a presença da fêmea e iniciar a corte, enquanto a fêmea permanecia parada ou, algumas vezes, reconhecendo o ambiente. O macho, ao encontrar a fêmea, aproximava-se, pareando em frente à mesma e antenando-a pelas antenas e, em alguns momentos, entrelaçava suas antenas com as da fêmea com leve movimento para frente e para trás. Na sequência, o macho antenava o tórax e abdome da fêmea caminhando atrás da mesma e forçando a cópula. Fêmeas não receptivas repeliram as investidas, andando pela arena ou voaram para longe do macho. A sequência observada foi a mesma para casais recém-emergidos, com mais de 24h de idade, ou quando macho e fêmea tinham idades diferentes. Machos ao serem liberados na arena, iniciavam imediatamente a corte, repetindo o processo de investidas, antena-antena e/ou antena/tórax-abdome e repúdios, mas algumas fêmeas, com 48h de idade ou mais, mudavam o comportamento sendo receptivas com movimentos do abdome e abanar as asas em movimentos de semicírculo. Nesta situação, o macho se preparava para a monta ou alinhava o corpo de maneira oposta por baixo do corpo da fêmea (Figura 1A). Machos, na combinação de 2 machos: 1 fêmea, por arena, caminharam (latência) e, ao se encontrarem, confrontaram pelas antenas, algumas vezes abriram as asas e voltaram a procurar o rival para novo confronto por meio das antenas. Nesse caso, não foi observada corte ou cópula com a fêmea (Figura 2).

Oito cópulas foram observadas com duração de 5-32 segundos, média de 15,4 s, em que as fêmeas receptivas com mais de 48h de idade, movimentavam as asas e abdome e copularam mais de uma vez com machos diferentes. Machos copularam logo após emergirem, assim, cortejando as fêmeas. (Figura 1B).

FIGURA 1. Cópula de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) (A) e macho recém-emergido com detalhe do aedeagus (B).



O trato reprodutivo de fêmeas de *P. bliteus*, copuladas ou não, foi semelhante (Fig. 3A-D, Fig. 4A-D). Os ovários, dessas fêmeas, são do tipo meorístico politrófico com as regiões do germário e vitelário evidentes. Células grandes e indiferenciadas caracterizando as ovogônias, e células pré-foliculares menores ocorreram no germário. Os folículos começaram a se diferenciar, na porção basal do germário, com as câmaras nutridoras maiores que as ovocíticas e ambas delimitadas por camada única de células foliculares (Fig 3A, 4A). Os ovócitos, à medida que se deslocavam para a região do vitelário, aumentaram de tamanho e estavam revestidos por células foliculares colunares resultando em uma câmara ovocítica maior que a nutridora (Figs. 3B, 4C). A formação do córion em ovócitos maduros foi seguida pela degeneração das células nutridoras e as foliculares com aspecto achatado (Fig1B-C, 2D).

FIGURE 2. Sequência do comportamento de corte e copula de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae).

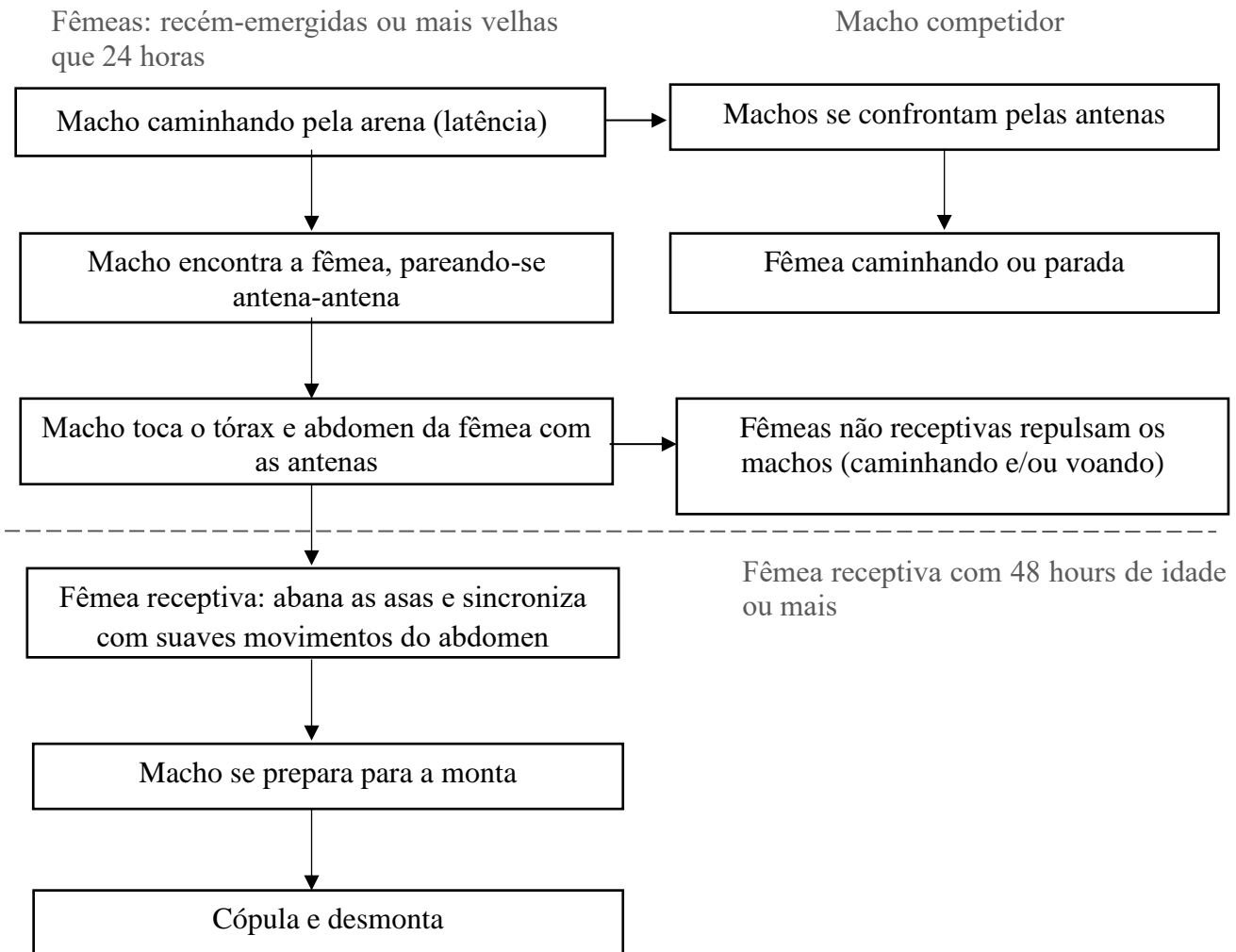


FIGURA 3. Ovário de fêmeas copuladas de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera Encyrtidae) com 240 horas de idade. (A) ovócito em desenvolvimento (OO1) e células foliculares colunares (FC) e câmara nutridora com as células nutridoras (NC) e bainha peritoneal (PS), (B) ovócitos desenvolvidos (OO3) com córion depositado (CH), ovócitos em desenvolvimento (OO2) com células foliculares achatadas (FC) e ovócitos jovens (OO1) e células foliculares colunares (FC), células nutridoras (NC), algumas muito ativas como reveladas pelos núcleos grandes (n), (C) ovócitos desenvolvidos (OO3) próximo do pedicelo, (D) detalhe de ovócito (OO3) rico em vitelo com células folicular achatada (FC) e córion (CH). Scale bar 10 μ m.

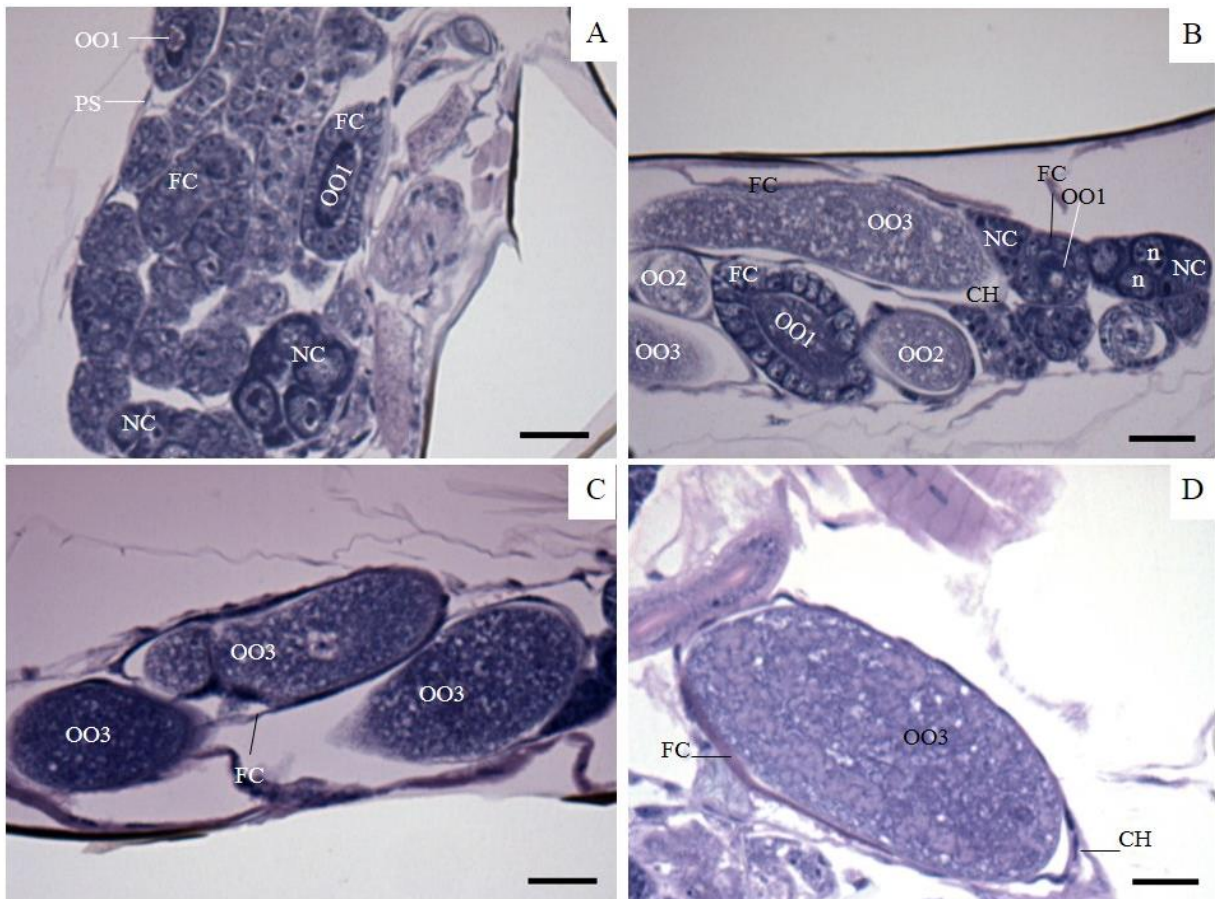
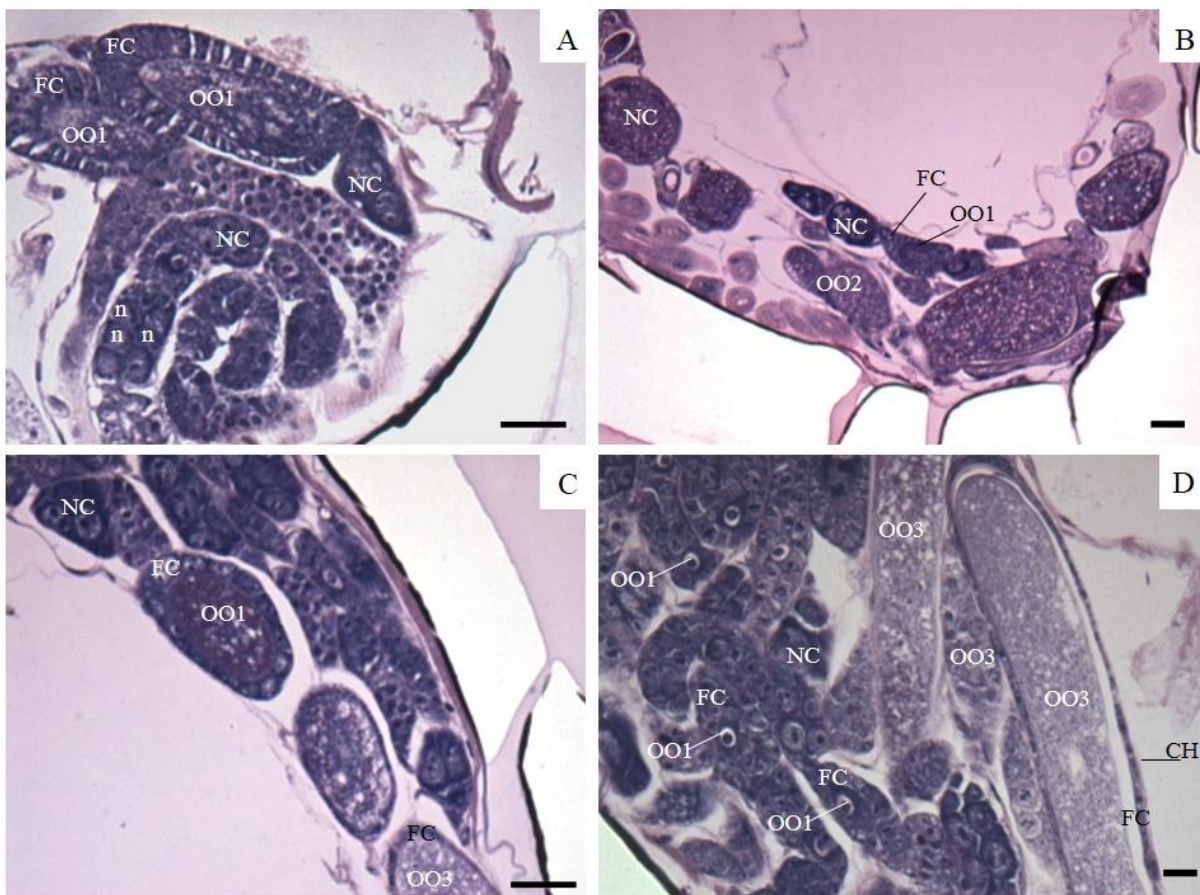


FIGURA 4. Ovário de fêmeas virgens de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) com 24 horas de idade. (A e B) ovócito em desenvolvimento (OO1) e células foliculares colunares (FC) e câmara nutridora com as células nutridoras (NC) com núcleos grandes (n), (C) ovócitos em desenvolvimento (OO1), células nutridoras (NC) e folicular (FC) e ovócito desenvolvido (OO3), (D) detalhe de ovócito (OO3) rico em vitelo com células folicular achatada (FC) e córion (CH), muitos ovócitos em desenvolvimento (OO1) com células foliculares colunares (FC). Scale bar 10 µm.



3.4 DISCUSSÃO

Movimentos de toque das antenas nas antenas e/ou tórax-abdome das fêmeas, executados pelos machos de *P. bliteus*, são comportamentos de corte que podem estimular a receptividade das fêmeas, como sugerido para *Ibalia japonica* Matsumura (Hymenoptera: Ibalidae) e *Sphex ingens* Smith (Hymenoptera: Sphecidae) reduzindo o período de corte e aumentando o sucesso reprodutivo

(Kuramitsu et al., 2019, Souza et al., 2015, Souza et al., 2016). As investidas dos machos de *P. bliteus*, entrelaçando as fêmeas pelas antenas, não garantiu a cópula, ao contrário dos parasitoides *Cephalonomia tarsalis* Ashmead (Hymenoptera: Bethyridae) que cortejam as fêmeas com o toque das antenas e estas permitem a cópula (Cheng et al., 2004). As fêmeas de *P. bliteus*, com mais de 48h de idade, estão disponíveis para cópula, com sutil movimentação das asas e do abdome, fazendo com que os machos se preparem para a cópula, assim como descrito para outro parasitoide Encyrtidae, *Leptomastidea abnormis* Girault (Hymenoptera: Encyrtidae) em que as fêmeas dispostas to bend their abdomen dorsally and spread their wings, fazendo com que o macho se prepare para a cópula (Romano et al., 2016). A cópula de *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) ocorre logo após emergirem sem corte e receptividade das fêmeas para outras cópulas *Psyllaephagus bliteus* (Mutitu et al., 2013). A repulsa a tentativa de cópula tem um padrão comum entre as fêmeas, assim como descrito para *P. bliteus*, no qual saem caminhando ou voam para longe do macho (Ávila et al., 2016, Romani et al., 2016), porém as fêmeas de *S. ingens* são mais agressivas, abrindo as mandíbulas parcialmente e inclinando o corpo na vertical (Souza et al., 2015). A presença do macho competidor em *P. bliteus* resulta em combate antena-antena, mas os de *Ceratosolen gravelyi* Grandi (Hymenoptera: Agaonidae) se agredem violentamente, mordendo a perna média ou posterior do oponente por trás (Liu et al., 2019). Machos de *Cotesia urabae* Austin & Allen (Hymenoptera: Braconidae) tentam interromper a cópula puxando o macho bem-sucedido para longe da fêmea (Ávila et al., 2016). O insucesso da cópula por um macho de *S. ingens* faz com que este manipule o tempo de exposição da fêmea, reduzindo as chances de machos competidores (Souza et al., 2016).

A duração das cópulas de *P. bliteus* variam de 5 a 32 segundos, e para que ocorra, as fêmeas se mostram disponíveis para os machos com movimentação de asas e abdome. Esse comportamento em que a fêmea “dança” também foi relatado para *L. abnormis*, no qual a cópula tem tempo médio de 5,7 s (Romano et al., 2016). Contudo, esse tempo é variável entre as espécies, para *C. noackae* a cópula é curta, com 2-5 segundos (Mituti et al., 2013) e *C. tarsalis* tem média de 23,3 segundos (Cheng et al., 2004). Além disso, machos recém-emergidos de *P. bliteus* cortejam fêmeas, virgens ou copuladas, assim como relatado para *Anastatus disparis* Motschulsky (Hymenoptera: Eupelmidae) (Liu et al., 2019), enquanto *C. urabae* são atraídos, apenas, por fêmeas virgens (Ávila et al., 2016).

Ovariolos com ovócitos em diferentes estágios de maturação, incluindo ovócitos maduros de fêmeas de *P. bliteus*, virgens ou copuladas, caracterizam esse parasitoide como sinovigênico, tendo, logo que emergem, a maioria de seus ovócitos maduros e outros que continuam se desenvolvendo e maturando durante a vida adulta do mesmo (Jervis et al., 2001). A presença de células pré-foliculares se desenvolvendo durante a maturação do ovócito associado é característica de ovários meroístico politróficos, como o de *P. bliteus* e de outros parasitoides como *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) (Andrade et al., 2012), *Therophilus javanus* Bhat & Gupta (Hymenoptera: Braconidae) (Souza et al., 2017) e *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae) (Farder-Gomes et al., 2018), os quais também são sinovigênicos, com ovócitos maduros em fêmeas virgens com até 24 horas de idade. A sincronia entre a maturação de ovos e a longevidade de *P. bliteus* permite que suas fêmeas ovipositem em várias ninfas em curto período de tempo logo após sua emergência, com maior oviposição nos primeiros 22 dias de vida em laboratório (Daane et al., 2005) sem a necessidade de cópula, pois a maturação dos óvulos ocorre assim que os parasitoides emergem. Contudo, a longevidade de *P. bliteus* é menor em campo (Daane et al., 2012), e reflete na taxa de parasitismo, aumentando após liberações inoculativas do parasitoide, atingindo mais de 70% nos primeiros 15 dias de avaliação e reduzindo, em aproximadamente, 37% após 30 dias (Ferreira-Filho et al., 2015). A queda na taxa de parasitismo por *P. bliteus* está correlacionada com a produção de ovos e a longevidade, mas varia com a partenogênese arrenótoca (Wilcken C.F., informação pessoal), em que machos se desenvolvem de ovos não fertilizados (Godfray, 1994; Heimpel et al., 2008), sendo essa uma desvantagem para o controle biológico uma vez que as fêmeas são responsáveis pelo parasitismo.

Fêmeas e machos de *P. bliteus* são parasitoides solitários, não emergem concomitantemente, mesmo a cópula sendo considerada um comportamento social, estes ainda copulam com mais parceiros durante a vida adulta. Além disso, fêmeas de *P. bliteus* emergem com óvulos prontos e com capacidade de parasitismo, e a cópula pode ocorrer, principalmente, após 48 horas de idade das mesmas. Indivíduos de ambos os sexos devem permanecer juntos, por pelo menos 48h, para garantir que copulem em criações em laboratórios.

3.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, G.S., SOUSA, A.H., SANTOS, J.C., GAMA, F.C., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C. Oogenesis pattern and type of ovariole of the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 3, p. 767-774, 2012.

ÁVILA, G.A., WITHERS, T.M., HOLWELL, G.I. Courtship and mating behaviour in the parasitoid wasp *Cotesia urabae* (Hymenoptera: Braconidae): mate location and the influence of competition and body size on male mating success. **Bulletin of entomological research**, v. 107, n. 4, p. 439, 2017.

ATLAS OF LIVING AUSTRALIA. 2020. Complete URL (<https://bie.ala.org.au/search?q=psyllaephagus+bliteus>).

BECCHI, L.K., JORGE, C., DE CAMARGO, G.F., BARBOSA, L.R., SOARES, M.A., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C., WILCKEN, C.F. Oviposition behaviour of mated or unmated *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae). **PloS one**, v. 15, n. 10, p. e0239285, 2020.

BERTI-FILHO, E., COSTA, V.A., ZUPARKO, R.L., LA SALLE, J. Ocorrência de *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 78, p. 304, 2003.

BOAVIDA, C., GARCIA, A., BRANCO, M. How effective is *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) in controlling *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psylloidea)? **Biological Control**, v. 99, p. 1-7, 2016.

CALECA, V., BELLA, S., LA PERGOLA, A., LOMBARDO, A., LO, V.G., MALTESE, M., RAPISARDA, C. Environmental factors impact and incidence of parasitism of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera, Encyrtidae) on populations of *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Aphalaridae) in Mediterranean climatic areas. **Redia**, v. 101, p. 89-100, 2018.

CHENG, L.L., HOWARD, R.W., CAMPBELL, J.F., CHARLTON, R.E., NECHOLS, J.R., RAMASWAMY, S.B. Mating behavior of *Cephalonomia tarsalis* (Ashmead) (Hymenoptera: Bethyridae) and the effect of female mating frequency on offspring production. **Journal of Insect Behavior**, v. 17, n. 2, p. 227-245, 2004.

DAANE, K.M., SIME, K.R., DAHLSTEN, D.L., ANDREWS JR, J.W., ZUPARKO, R.L. The biology of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red gum lerp psyllid (Hemiptera: Psylloidea). **Biological Control**, v. 32, n. 2, p. 228-235, 2005.

DAANE, K.M., SIME, K.R., PAINE, T.D. Climate and the effectiveness of *Psyllaephagus bliteus* as a parasitoid of the red gum lerp psyllid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 11, p. 1305-1320, 2012.

FARDER-GOMES, C.F., SANTOS, H.C.P., OLIVEIRA, M.A., ZANUNCIO, J.C., SERRÃO, J.E. Morphology of ovary and spermathecae of the parasitoid *Eibesfeldtphora tonhascai* Brown (Diptera: Phoridae). **Protoplasma**, v. 256, n. 1, p. 3-11, 2019.

FERREIRA FILHO, P.J., WILCKEN, C.F., LIMA, A.C.V., DE SÁ, L.A.N., DO CARMO, J.B., GUERREIRO, J.C., ZANUNCIO, J.C. Biological control of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) in eucalyptus plantations. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 2, p. 151-157, 2015.

FIRMINO-WINCKLER, D.C., WILCKEN, C.F., DE OLIVEIRA, N.C., DE MATOS, C.A.O. Biologia do psílídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Psyllidae) em *Eucalyptus* spp. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 144-146, 2009.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology**. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, 1994.

HEIMPEL, G.E., DE BOER, J.G. Sex determination in the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 209-230, 2008.

JERVIS, M.A., HEIMPEL, G.E., FERNS, P.N., HARVEY, J.A., KIDD, N.A. Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. **Journal of Animal Ecology**, v. 70, n. 3, p. 442-458, 2001.

KURAMITSU, K., YOBOON, T., TOMATSURI, M., YAMADA, H., YOKOI, T. First come, first served: precopulatory mate-guarding behavior and male–male contests by a hymenopteran saproxylic parasitoid. **The Science of Nature**, v. 106, n. 5-6, p. 23, 2019.

LIU, P.C., HAO, D.J. Behavioural and transcriptional changes in post-mating females of an egg parasitoid wasp species. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 1, p. 181453, 2019.

LIU, P.C., WEI, J.R., HAN, X., HAO, D.J., WANG, Z.Y., WANG, Z.Q., WANG, Q. Effects of female body size and age and male mating status on male combat in *Anastatus disparis* (Hymenoptera: Eupelmidae). **Ecological Entomology**, p. 1-9, 2020.

LIU, Z.X., YANG, P., ZHANG, Y., LI, Z.B., KJELLBERG, F. Antennae and the role of olfaction and contact stimulation in mate recognition by males of the pollinating fig wasp *Ceratosolen graveleyi* (Hymenoptera: Agaonidae). **Journal of Natural History**, v. 53, n. 13-14, p. 779-795, 2019.

MARGIOTTA, M., BELLA, S., BUFFA, F., CALECA, V., FLORIS, I., GIORNO, V., TORTORICI, F. Modeling environmental influences in the *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae)–*Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) parasitoid–host system. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 2, p. 491-501, 2017.

MUTITU, E.K., GARNAS, J.R., HURLEY, B.P., WINGFIELD, M.J., HARNEY, M., BUSH, S.J., SLIPPERS, B. Biology and rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 5, p. 1979-1985, 2013.

PAINE, T.D., MILLAR, J.G., HANKS, L.M., GOULD, J., WANG, Q., DAANE, K., DAHLSTEN, D.L., MCPHERSON, E.G. Cost–benefit analysis for biological control programs that targeted insect pests of eucalypts in urban landscapes of California. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2497-2504, 2015.

PLASCENIA-GONZÁLEZ, A., CIBRIÁN-TOVAR, D., LLANDERAL-CÁZARES, C., LÓPEZ-PÉREZ, I., ARRIOLA-PADILLA, V. Biología del parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 11-17, 2005.

RIEK, E.F. The Australian species of *Psyllaephagus* (Hymenoptera, Encyrtidae), parasites of psyllids (Homoptera). **Australian journal of zoology**, v. 10, n. 4, p. 684-757, 1962.

ROMANO, D., DONATI, E., CANALE, A., MESSING, R. H., BENELLI, G., STEFANINI, C. Lateralized courtship in a parasitic wasp. **Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition**, v. 21, n. 3, p. 243-254, 2016.

SOUNA, D.A., BOKONON-GANTA, A., RAVALLEC, M., CUSUMANO, A., PITTENDRIGH, B.R., VOLKOFF, A.N., TAMÒ, M. An insight in the reproductive biology of *Therophilus javanus* (Hymenoptera, Braconidae, and Agathidinae), a potential biological control agent against the legume pod borer (Lepidoptera, Crambidae). **Psyche**, v. 2017, 2017.

SOUZA, C.A.S., PREZOTO, F., LIMA, M.S.C.S., PEDERASSI, J. Antennation and sexual performance of male digger wasps *Sphex ingens* Smith (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of Natural History**, v. 50, n. 41-42, p. 2647-2655, 2016.

SOUZA, C.A.S., PREZOTO, F., LIMA, M.S.C.S., PEDERASSI, J. Sexual behavior of the digger wasp *Sphex ingens* Smith (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, n. 2, p. 107-112, 2015.

SULLIVAN, D.J., DAANE, K.M., SIME, K.R., ANDREWS JR, J.W. Protective mechanisms for pupae of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red-gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psylloidea). **Australian Journal of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 101-105, 2006.

TULLER, J., OLIVEIRA, K.N., SILVA, J.O., DE FARIA, M.L., ESPÍRITO-SANTO, M.M., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C. *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) attack patterns on different Eucalyptus genotypes. **PeerJ**, v. 5, p. e3864, 2017.

WILCKEN, C.F., DE SÁ, L.A.N., DAL POGETTO, M.H.F.A., DO COUTO, E.B., FERREIRA-FILHO, P.J., FIRMINO-WINCKLER, D.C. **Sistema de criação do psílide-de-concha *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) e de seu parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) para programa de controle biológico em plantações de eucalipto**, n. 2. Documentos técnicos IPEF, Piracicaba, SP, Brasil, 2010.

CAPÍTULO 4 - Longevidade e sobrevivência de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em diferentes temperaturas e dietas

RESUMO

Psyllaephagus bliteus Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) é a principal estratégia de manejo integrado de *Glycaspis brimblecombei*. O sucesso de liberações de parasitoides no controle biológico clássico e/ou aumentativo depende do conhecimento de aspectos biológicos para multiplicação desses inimigos naturais em laboratório. O objetivo foi determinar a longevidade e a sobrevivência de adultos de *P. bliteus* com diferentes dietas e temperaturas. As “múmias” de *G. brimblecombei* foram coletadas em campo e mantidas em laboratório até a emergência de *P. bliteus*. A longevidade desse parasitoide foi avaliada em câmaras climatizadas a 18, 21, 25, 27, 30 e 35 °C, e 60 ± 10 % UR e 12h:12h C:E de fotoperíodo, recebendo mel de abelha a 100% e 50%, concha de *G. brimblecombei* ou sem alimento, diariamente, até a morte. Os dados da longevidade foram submetidos à análise estatística com modelo linear generalizado ajustado em função logarítmica pelo produto-limite de Kaplan-Meier, tendo os fatores temperatura, alimento e sexo, e as curvas de sobrevivência por Sidak pelo teste de Log-Rank ajustado. A longevidade e a sobrevivência de *P. bliteus* variaram com a dieta e temperatura com melhores resultados para mel a 100% ou 50% e maior período de vida a 18 °C e menor a 25 e 35 °C. Além disso, as taxas de mortalidade de *P. bliteus*, geradas com os modelos de regressão, mostram redução da longevidade com o aumento da temperatura, mas com maior valor com alimentos com baixo valor calórico, concha ou sem alimento.

Palavras-chave: Controle biológico. Criação de laboratório. *Glycaspis brimblecombei*. Taxa de mortalidade.

ABSTRACT

Psyllaephagus bliteus is the main strategy of integrated management of *Glycaspis brimblecombei*. The success of parasitoid releases in classic and/or augmented biological control depends on the knowledge of biological aspects for multiplication of these natural enemies in the laboratory. The aim was to determine the longevity and survival of adults of *P. bliteus* with different diets and temperatures. The "mummies" of *G. brimblecombei* were collected in the field and kept in the laboratory until the emergence of *P. bliteus*. The longevity of this parasitoid was evaluated in climatized chambers at 18, 21, 25, 27, 30 e 35 °C, and 60 ± 10% RH and 12:12 C:E of photoperiod, receiving honey from bees at 100% and 50%, lerp of *G. brimblecombei* or no food, daily, until death. The longevity data were submitted to statistical analyses with a generalized linear model adjusted in logarithmic function by the Kaplan-Meier limit product, having the factors temperature, food and sex, and the survival curves by Sidak by the Log-Rank test adjusted. The longevity and survival of *P. bliteus* varied with diet and temperature, with better results for honey at 100% or 50% and longer life span at 18 °C and below 25 and 35 °C. In addition, the mortality rates of *P. bliteus*, generated with regression models, show a reduction in longevity with the increase in temperature, but a higher value with low caloric value food, lerp or no food

Key-words: Biological control. *Glycaspis brimblecombei*. Insect rearing. Mortality rate.

4.1 INTRODUÇÃO

Programas de controle biológico clássico com *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), principal inimigo natural no manejo de *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), teve início nos EUA em 1999 (Dahlsten et al., 2005), seguido por México e Chile (Plascencia et al., 2005; Ide et al., 2006). Esse parasitoide foi introduzido, acidentalmente, com *G. brimblecombei* em outros países, como Brasil (Berti-Filho et al., 2003; Wilcken et al., 2003), Portugal e Espanha (Dhahri et al., 2014, Otero et al., 2011), Itália (Caleca et al., 2011) e Grécia (Bella and Rapisarda, 2013). Além disso, *P. bliteus* foi relatado na Tunísia (Dhahri et al., 2014) e está em processo de introdução nos demais países da África Ocidental (Ndela, 2016, Jere et al., 2018).

Psyllaephagus bliteus reconhece odores emitidos pelas ninfas de *G. brimblecombei* (Favoreto et al., dados não publicados) e parasita, preferencialmente, aquelas de terceiro e quarto instares (Daane et al., 2005), desenvolvendo-se na cavidade abdominal das mesmas (Sullivan et al., 2006).

A tolerância de *P. bliteus* a temperaturas mais elevadas parece ser mais baixa que a de seu hospedeiro, *G. brimblecombei* (Boavida et al., 2016). O crescimento populacional desse parasitoide depende da disponibilidade de ovos e ninfas hospedeiras na fase ideal de parasitismo. A população de *P. bliteus* pode exceder à da praga ou diminuir até próximo de zero, enquanto a de *G. brimblecombei* pode se manter alta e garantir as gerações subsequentes em estágios não-alvo do parasitoide, como ovos, ninfas pequenas e adultos (Margiotta et al., 2017) como observado no Brasil (Ferreira Filho et al., 2017).

Baixas taxas de parasitismo em campo foram atribuídas à oscilações da população e não adaptação e estabelecimento de *P. bliteus* como relatado nos Estados Unidos, Brasil, Portugal e Itália (Daane et al., 2012, Ferreira Filho et al., 2015, Boavida et al., 2016, Caleca et al., 2018).

A liberação de *P. bliteus* no controle biológico aumentativo pode elevar as taxas de parasitismo de *G. brimblecombei* em campo à mais de 70% (Ferreira Filho et al., 2015), mas requer a produção massal desse parasitoide com qualidade e quantidade (Van Lenteren, 2012, Tuller et al., 2017). A adaptação, resposta imune, comportamento e sobrevivência dos insetos varia com parâmetros climáticos por serem pecilotérmicos (Colinet et al., 2015, Abram et al., 2017). Além disso, a

sobrevivência e a taxa de oviposição, por parasitoides alimentados com suplementação de néctar, antes da liberação, são maiores no campo (Winkler et al., 2006).

A definição da temperatura e de dietas ideais podem melhorar os métodos de criação e os parâmetros biológicos de *P. bliteus*, liberado para o manejo do psilídeo-de-concha. O objetivo desse trabalho foi determinar a longevidade e a sobrevivência de adultos do parasitoide *P. bliteus*, alimentado ou não, em diferentes temperaturas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 COLETA DO PARASITOIDE *Psyllaephagus bliteus*

Ramos infestados, naturalmente, por *G. brimblecombei* foram coletados no município de Mogi-Guaçu, estado de São Paulo, e trazidos para o Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. As conchas desse inseto foram retiradas à procura de ninfas parasitadas por *P. bliteus* (múmias). Essas múmias foram individualizadas em placas de Petri (5 cm de diâmetro x 1 cm de altura), mantidas a 25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ UR e 12L:12D e observadas, diariamente, para acompanhar a emergência desse parasitoide.

4.2.2 FONTE DE ALIMENTO E VIDA ÚTIL

Adultos de *P. bliteus*, recém-emergidos, foram sexados (Riek, 1962), individualizados em placas de Petri (5 cm de diâmetro x 1 cm de altura) e alimentados com mel 100% (T1), mel 50% (T2), lerp de *G. brimblecombei* (T3) e no food (T4) nas temperaturas de 18, 21, 25, 27, 30 e 35 ± 2 °C em câmaras climatizadas com $60 \pm 10\%$ UR e 12h:12h L:D. A longevidade e a sobrevivência dos adultos de *P. bliteus* foi avaliada, diariamente, quando o alimento era repostado até a morte de todos os parasitoides. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 15 repetições (oito fêmeas e sete machos) por dieta e temperatura, exceto a 18 °C lerp (cinco fêmeas e dez machos) e no food (sete fêmeas e oito machos), 21 °C honey 100% (nove fêmeas e seis machos), 25 °C lerp (cinco fêmeas e dez machos) e no

food (nove fêmeas e seis machos) e 35 °C, apenas, com machos, devido à menor emergência dos parasitoides.

A temperatura de 25 °C foi a padrão de criação em laboratório e as demais (18, 21, 27, 30 e 35) representam as condições de campo no Brasil, sendo 35 °C, extrema, em novas áreas de plantio no norte da região Centro-Oeste e em alguns estados do Nordeste brasileiro (Masson et al., 2009, Dias et al., 2017).

4.2.3 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Tempo de vida dos insetos

O período de vida dos insetos foi ajustado por um modelo linear generalizado (Nelder & Wedderburn, 1972) com a distribuição gama e função de ligação logarítmica tendo como fatores temperatura, alimento e sexo. A qualidade dos ajustes dos modelos lineares generalizados foi feita por análise de desvios (deviance), gráficos dos resíduos de Pearson, padronizados com o procedimento genmod do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition, e as médias submetidas ao teste de Tukey-Kramer (Westfall, et al., 1999).

Sobrevivência dos insetos

A sobrevivência no tempo de vida dos insetos foi analisada com o estimador produto-limite de Kaplan-Meier (Lee, 1992) para estimar as curvas desse parâmetro e os dados submetidos ao teste Log-Rank ajustado por Sidak (Westfall et al., 1999) para comparar as curvas de sobrevivência, considerando o alimento como fator por nível de temperatura. A análises estatísticas foram feitas pelo procedimento lifetest do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition.

Modelo de regressão do tempo de vida dos insetos em função da temperatura

Modelos de regressão linear generalizados foram ajustados com dados do tempo de vida dos insetos, em função das temperaturas e alimento (Nelder & Wedderburn, 1972) com a distribuição gama e função de ligação logarítmica. A qualidade dos ajustes dos modelos lineares generalizados foi feita através da análise

de desvios (deviance), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados do procedimento genmod do programa estatístico SAS – Free Statistical Statistical Software, SAS University Edition:

Modelo: tempo médio de vida= $\exp(\widehat{\beta}_0 + \widehat{\beta}_1 \text{ temperatura})$ (1), em que $\widehat{\beta}_0$ e $\widehat{\beta}_1$ são parâmetros estimados da taxa de mortalidade de *Psyllaephagus bliteus*.

4.3 RESULTADOS

A longevidade de *P. bliteus* variou com as dietas, com maiores valores com mel 100% e 50% e menores com concha de *G. brimblecombei* ou sem alimento (Tabela 1).

Tabela 1. Longevidade dos adultos de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) (mean \pm SE) em dias sob diferentes dietas e temperaturas (Temp.)

Temp.	Mel 100%	Mel 50%	Concha	Sem alimento
18 °C	38,67 \pm 4,77aA	41,07 \pm 3,80aA	2,93 \pm 0,52bA	1,93 \pm 0,07bA
21 °C	31,67 \pm 3,61aAB	22,67 \pm 4,11aAB	1,53 \pm 0,17bAB	1,33 \pm 0,13bA
25 °C	10,87 \pm 1,65aBC	15,07 \pm 4,13aBC	1,60 \pm 0,13bB	1,07 \pm 0,07bA
27 °C	16,40 \pm 2,73aCD	17,40 \pm 2,12aBC	1,33 \pm 0,13bB	1,47 \pm 0,13bA
30 °C	19,93 \pm 1,73aCD	16,20 \pm 1,97aBC	*	*
35 °C	6,87 \pm 1,04aD	9,13 \pm 0,61aC	*	1,33 \pm 0,13bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula, por linha, ou maiúscula, por coluna, não diferem pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$) entre si. *Dados originais sem variabilidade

A longevidade de *P. bliteus* diferiu entre as temperaturas, com maior valor a 18 °C e menor a 25 °C com $21,15 \pm 2,86$ e $7,15 \pm 1,34$, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Longevidade média (média \pm EP) dos adultos de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em diferentes temperaturas ($60 \pm 10\%$ UR em fotoperíodo de 12h).

Temperatura	Longevidade (dias)
18 °C	21,15 \pm 2,86A
21 °C	14,30 \pm 2,18AB
25 °C	7,15 \pm 1,34C
27 °C	9,15 \pm 1,32BC
30 °C	9,53 \pm 1,30BC

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

A longevidade de *P. bliteus* fêmeas (14,37 \pm 1,40) foi maior que a de machos (8,41 \pm 0,79) (Tabela 3).

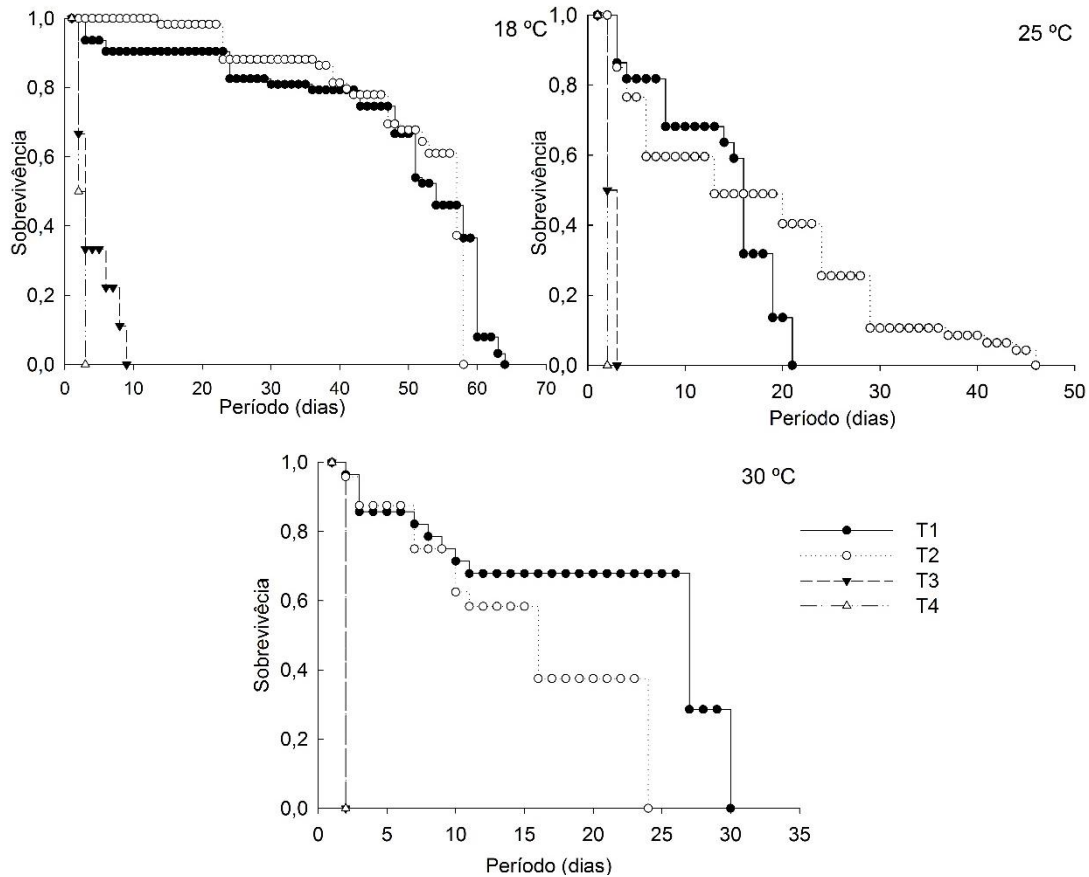
Tabela 3. Longevidade média (média \pm EP) de fêmeas e machos de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em função das dietas e temperaturas.

Sexo	Longevidade (dias)
Fêmea	14,37 \pm 1,40A
Macho	8,41 \pm 0,79B

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

A sobrevivência de *P. bliteus* foi maior com dietas de mel, 100% e 50%, que com concha de *G. brimblecombei* e sem alimento. A sobrevivência desse parasitoide, com conchas e sem alimento, foi semelhante, de 0% no segundo dia de avaliação a 30 °C comparado aos 46,67% e 33,34%, após o vigésimo dia, com mel 100% e 50%, respectivamente. À 18 °C, a sobrevivência no segundo dia foi de 93,3%, 100,00% e de 40% com mel 100%, mel 50% e conchas, e de 0% na dieta sem alimento. A sobrevivência a 25 °C, temperatura padrão para criações em laboratório, foi de 100%, 86,67%, 60,00% e 6,67% no segundo dia com mel 100%, mel 50%, concha e sem alimento, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Sobrevivência de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) nas temperaturas de 18, 25 and 30 ± 2 °C a 60 ± 10 % U.R. and 12:12 L:D alimentado com mel 100% (T1), mel 50% (T2), concha de *G. brimblecombei* (T3) e sem alimento (T4).



A qualidade de ajuste dos modelos de regressão foi melhor com a equação 1, onde há correlação negativa entre a longevidade de *P. bliteus* e a temperatura, principalmente, com alimentos com baixo teor calórico (Tabela 4, Figura 2).

Tabela 4. Modelos do tempo médio de vida de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) alimentado com mel, 100% e 50%, concha de *G. brimblecombei* e sem alimento, sob as temperaturas de 18, 21, 25, 27, 30 e 35 °C a 60 ± 10 % UR e 12h:12h L:D.

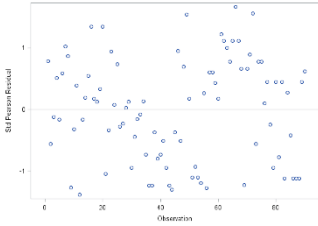
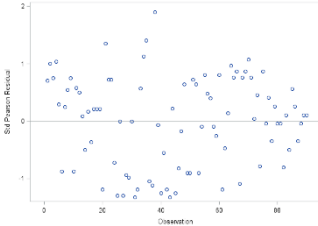
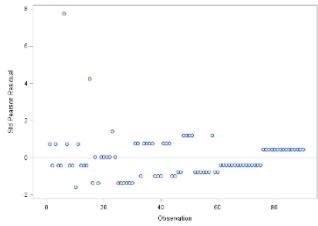
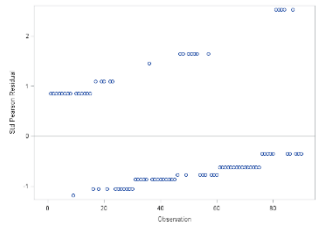
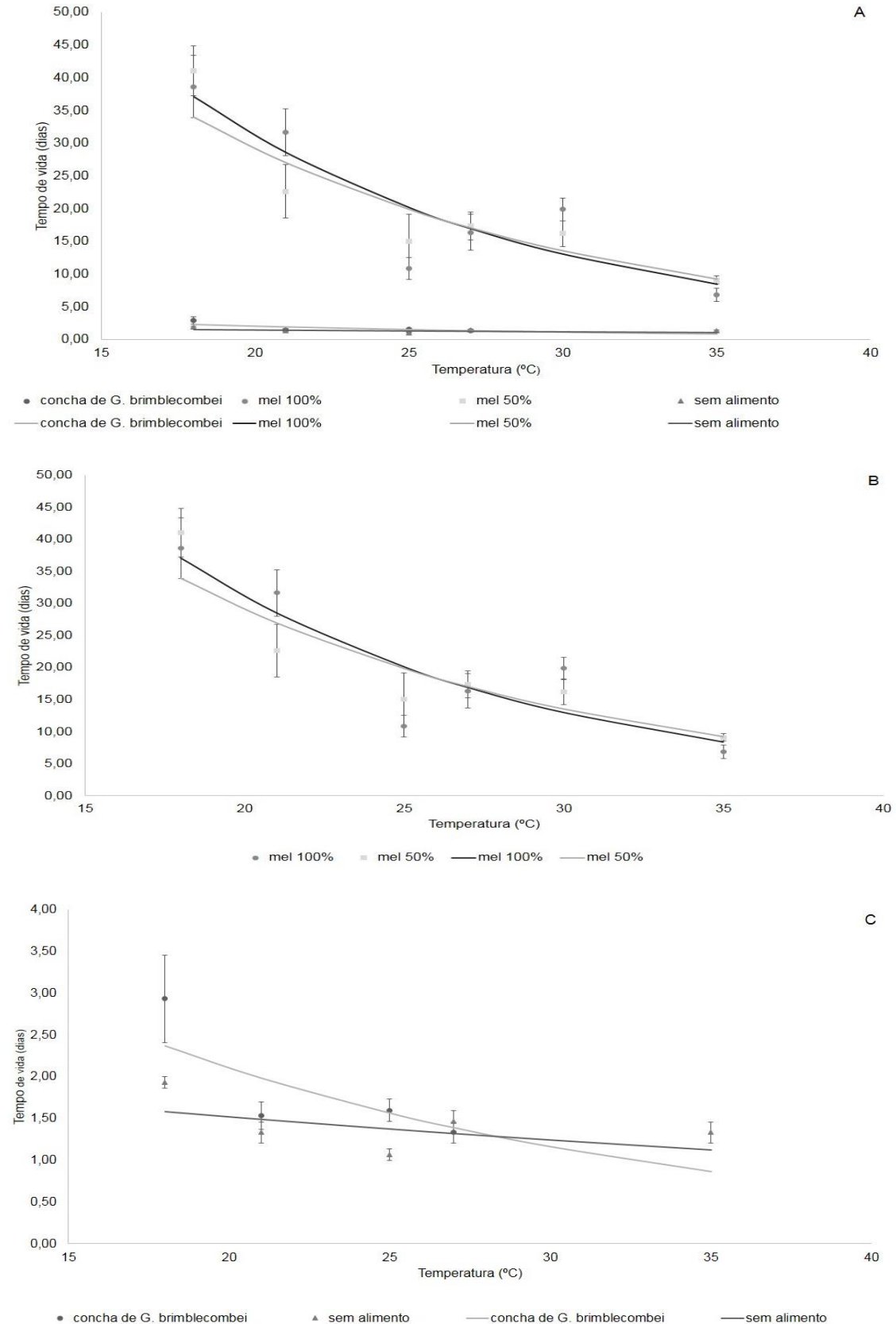
Alimento	$\widehat{\beta}_0$	$\widehat{\beta}_1$	Scaled devianc e	Resíduos padronizados de Pearson
Mel 100%	5.1835 ($p < 0.001$) (4.4988; 5.8683)	-0.0872 ($p < 0.001$) (-0.1129; -0.0614)	1.1032	
Mel 50%	4.8966 ($p < 0.001$) (4.2076; 5.5855)	-0.0762 ($p < 0.001$) (-0.1021; -0.0504)	1.1092	
Concha	1.9297 ($p < 0.001$) (1.5861; 2.2734)	-0.0592 ($p < 0.001$) (-0.0721; -0.0463)	1.0457	
Sem alimento	0.8227 ($p < 0.001$) (0.5299; 1.1154)	-0.0202 ($p < 0.001$) (-0.0312; -0.0092)	1.0397	

Figura 2. Correlação entre a longevidade e a temperatura para *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) (A), alimento mel 100% e 50% (B) e alimentados com lerp e no food e temperatura (C).



4.4 DISCUSSÃO

A maior longevidade de *P. bliteus*, com mel, 100% ou 50%, confirma a necessidade de suplementação alimentar para parasitoides por dependerem de fontes energéticas, ricas em carboidratos, independente da temperatura (Jervis et al., 1996, Zimba et al., 2020). Além disso, reforça a qualidade do mel com mais de 200 substâncias (Escuredo et al., 2013), incluindo açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, vitaminas e minerais, com 75% de monossacarídeos e 10-15% de dissacarídeos, como fonte de energia, além de água (da Silva et al., 2016; Kamal et al., 2011). A longevidade e a reprodução dos parasitoides de ovos *Cleruchoidea noackae* Carpintero and Dellapé (Hymenoptera: Mymaridae), *Trichogramma japonicum* Ashmead (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Trichogramma chilonis* Ishii (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do ectoparasitoide de larvas, *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) foram, também, maiores quando alimentados com mel (de Souza, 2016; Ashraf et al., 2017; Tian et al., 2016).

A maior longevidade de *P. bliteus* a 18 °C se deve ao centro de origem deste, região de Adelaide, estado da Austrália Meridional, Austrália (Lawson, S., informação pessoal), com temperaturas médias anuais inferiores a 25 °C (Australian Government, 2020), o que pode dificultar a adaptação e estabelecimento, desse parasitoide, em temperaturas mais elevadas (Daane et al., 2012) e, conseqüentemente, sua capacidade de parasitismo, como relatado na Califórnia, 1,67 a 33% (Daane et al., 2012), Brasil, 0,2 a 11% (Ferreira Filho et al., 2015), Itália e Portugal, abaixo de 15% em algumas áreas (Margiotta et al., 2017, Caleca et al., 2018, Boavida et al., 2016). Liberações aumentativas de *P. bliteus* podem aumentar as taxas de parasitismo até 70%, mas podem cair drasticamente (Ferreira Filho et al., 2015) em períodos de temperaturas altas devido ao aumento do metabolismo e gasto energético (Keil et al., 2015, Boavida et al., 2016). Isto não deve ser ignorado em regiões com expansão dos plantios de eucalipto e ocorrência de *G. brimblecombei*, como nos estados do Mato Grosso e Bahia com temperaturas máximas diárias acima de 35 °C. Além disso, *G. brimblecombei* suporta temperaturas mais elevadas (Boavida et al., 2016) e seu potencial de colonizar novas áreas e países entre as latitudes 20° e 40° em ambos hemisférios é alto (de Queiroz et al., 2013), ao contrário do parasitoide *P. bliteus*. Além disso, a longevidade de *P. bliteus* é drasticamente menor, a 25 °C

(Daane 2005), aumentando a importância de se multiplicar este parasitoide em temperaturas mais baixas.

A maior sobrevivência de *P. bliteus* com mel, 100% e 50%, concorda com o relatado para *Anagrus virlai* Triapitsyn (Hymenoptera: Mymaridae), de 100% ao sexto dia com mel, duas vezes maior que com honeydew ou sem alimento (Hill et al., 2020). A sobrevivência semelhante de *P. bliteus* sem alimento e conchas de *G. brimblecombei*, composta por polissacarídeo, proteínas e ceras (Sullivan et al., 2006), se deve à falta de carboidratos e açúcares primários (Godfray, 1994). Dietas com baixo valor calórico não garantem a sobrevivência de *P. bliteus*, assim como *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae), que sobreviveu 6 e 2,4 vezes menos, com dietas a base de folhas de *Eucalyptus* sp. e água destilada, respectivamente (de Souza, 2018). Temperaturas mais baixas reduziram o metabolismo de *P. bliteus* e, por isso, a sobrevivência desse parasitoide, mesmo com dieta de baixo valor calórico foi maior a 18 °C que a 25 e 30 °C (Brown et al., 2004, Keil et al., 2015).

A maior longevidade de fêmeas que de machos de *P. bliteus* concorda com o relatado para esse parasitoide na Califórnia, quando suas fêmeas viveram, aproximadamente, 10 dias a mais que os machos, em cinco temperaturas quando alimentadas com mel 50% (Daane 2005). A produção de fêmeas é um dos principais parâmetros de qualidade (Stouthamer, 2003) e a maior longevidade das mesmas é importante para o controle biológico de *G. brimblecombei*.

A qualidade de ajuste dos modelos de regressão, com correlação negativa entre a longevidade de *P. bliteus* e a temperatura, promove a catalise das reações metabólicas, as quais aumentam os gastos energéticos reduz a longevidade dos parasitoides (Keil et al., 2015). Em que a inclinação negativa dos modelos de regressão entre a longevidade de *P. bliteus* e a temperatura foi maior para dietas sem carboidrato, como no food, -0,0202 que com mel 100%, -0,0872. Isto é semelhante ao observado para *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) com coeficiente de correlação de -0.819 e -0.867 para fêmeas e machos, respectivamente (Moloń et al., 2020), o parasitoide *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae), a praga *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellape (Heteroptera: Thaumastocoridae) (Barbosa et al., 2019, Silva et al., 2018), e o hiperparasitoide, *Psyllaphycus diaphorinae* Hayat (Hymenoptera: Encyrtidae) com longevidade menor a 32 °C (Milosavljević et al., 2020). A longevidade de insetos pode

variar com a estação e local (Rosewell et al., 1987, Moloń et al., 2020), cujas condições determinam as reações metabólicas com maiores ou menores gastos energéticos e efeitos deletérios (Kiritani, 2013).

A multiplicação em laboratório e/ou para liberações de *P. bliteus* em campo depende da suplementação com dietas a base de mel, como 100 ou 50%, para aumentar a longevidade desse parasitoide. Esse inimigo natural deve ser criado em laboratório, com temperaturas constantes, menores que 21 °C. O desempenho e a sobrevivência de *P. bliteus* em campo podem ser maiores com introduções de populações desse parasitoide, provenientes, de regiões mais quentes da Austrália.

4.5 REFERÊNCIAS

ABRAM, P.K., BOIVIN, G., MOIROUX, J., BRODEUR, J. Behavioural effects of temperature on ectothermic animals: unifying thermal physiology and behavioural plasticity. **Biological Reviews**, v. 92, n.4, p. 1859–1876, 2017.

ASHRAF, S., ABDIN, Z., ABBAS, S. K., KHAN, R. S. A., TAHIR, M., RASOOL, S., ANWAR, M, AND HUSSAIN, F. Effect of different diet concentrations on longevity and fecundity of parasitic wasp *Bracon hebetor* (Say.) (Hymenoptera: Braconidae). **Pakistan Journal of Zoology**, v.49, n.3, p. 761-767, 2017.

AUSTRALIAN GOVRMENT, BUREAU OF METEOROLOGY, Disponível em: <<http://www.bom.gov.au/>> Acessado em 25 maio de 2020.

BARBOSA, L.R, SANTOS, F., SOLIMAN, E.P., RODRIGUES, A.P., WILCKEN, C.F., CAMPOS, J.M., ZANUNCIO, A.J.V., ZANUNCIO, J.C. Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. **Scientific Reports**, v. 9, p.10174, 2019.

BELLA, S., RAPISARDA, C. First record from Greece of the invasive red gum lerp psyllid *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psyllidae) and its associated parasitoid *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae). **Redia**, v. 96, n.1, p. 33-35, 2013.

BERTI-FILHO, E., COSTA, V.A., ZUPARKO, R.L., LASALLE, J. Ocorrência de *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 78, p. 304, 2003.

BOAVIDA, C., GARCIA, A., BRANCO, M. How effective is *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) in controlling *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psylloidea)? **Biological Control**, v. 99, p. 1-7, 2016.

BROWN, J. H., GILLOOLY, J. F., ALLEN, A. P., SAVAGE, V. M., WEST, G. B. Toward a metabolic theory of ecology. **Ecology**, v. 85, n.7, p. 1771-1789, 2004.

CALECA, V., BELLA, S., LA PERGOLA, A., LOMBARDO, A., LO, V.G., MALTESE, M., NUCIDORA, S., RIZZO, R., SUMA, P., TORTORICI, F., RAPISARDA, C. Environmental factors impact and incidence of parasitism of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera, Encyrtidae) on populations of *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Aphalaridae) in Mediterranean climatic areas. **Redia**, v. 101, p. 89-100, 2018.

CALECA, V., LO VERDE, G., MALTESE, M. First record in Italy of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera Encyrtidae) parasitoid of *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera Psyllidae). **Il Naturalista Siciliano**, v. 35, n. 3-4, p. 435-444, 2011.

COLINET, H., SINCLAIR, B. J., VERNON, P., RENAULT, D. Insects in fluctuating thermal environments. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n.1, p. 123-140, 2015.

DAANE, K. M., SIME, K. R., DAHLSTEN, D. L., ANDREWS, J. W., ZUPARKO, R. L. The biology of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red gum lerp psyllid (Hemiptera: Psylloidea). **Biological Control**, v. 32, n.2, p. 228–235, 2005.

DAANE, K.M., SIME, K.R., PAINE, T.D. Climate and the effectiveness of *Psyllaephagus bliteus* as a parasitoid of the red gum lerp psyllid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n.11, p. 1305-1320, 2012.

DAHLSTEN, D.L., DAANE, K.M., PAINE, T.D., SIME, K.R., LAWSON, A.B., ROWNEY, D.L., ROLTSCHW, J., ANDREWS JR., J.W., KABASHIMA, J.N., SHAW, D.A., ROBB, K.L., DOWNER, J. A., GEISEL, P.M., CHANEY, W.E., INGELS, C.A., VARELA, L.G., BIANCHI, M.L., TAYLOR, G. Imported parasitoid helps control red gum lerp psyllid. **California Agriculture**, v. 59, n.4, p. 229–234, 2005.

DHAHRI, S., JAMAA, M. L., GARCIA, A., BOAVIDA, C., BRANCO, M. Presença do *Glycaspis brimblecombei* e do parasitoide *Psyllaephagus bliteus* na Tunísia e em Portugal. **Silva Lusitana**, v. 22, n.1, p. 99-105, 2014.

DA SILVA, P.M., GAUCHE, C., GONZAGA, L.V., OLIVEIRA-COSTA, A.C., FETT, R., (2016) Honey: chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2016.

DE QUEIROZ, D.L., MAJER, J., BURCKHARDT, D., ZANETTI, R., FERNANDEZ, J.I.R., DE QUEIROZ, E.C., GARRASTAZU, M., FERNANDES, B.V., DOS ANJOS, N. Predicting the geographical distribution of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) in Brazil. **Australian Journal of Entomology**, v. 52, n.1, p. 20-30, 2013.

DE SOUZA, A.R.; BARBOSA, L.R.; PASSOS, J.R.S.; CASTRO, B.M.C.; ZANUNCIO, J.C.; WILCKEN, C.F. Longevity and survival of *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on Eucalyptus, with different diets and temperatures. **PeerJ**, v.6, p. e5265, 2018.

DE SOUZA, A.R., CANDELARIA, M.C., BARBOSA, L.R., WILCKEN, C.F., CAMPOS, J.M., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C. Longevity of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), with various honey concentrations and at several temperatures. **Florida Entomologist**, v. 99, n. 1, p. 33-37, 2016.

DIAS, T.K.R.; PIRES, E.M.; WILCKEN, C.F.; SOUZA, A.P.; SOLIMAN, E. P.; SILVA, C.C. The psyllid *Glycaspis brimblecombei* in transition areas Biomes Amazon and Brazilian Savanna. **Acta Brasiliensis**, v.1, n.1, p. 19-22, 2012.

ESCUREDO, O., MÍGUEZ, M., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., SEIJO, M.C. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, v.138, p. 851–856, 2013.

FERREIRA FILHO, P.J., WILCKEN, C.F., LIMA, A.C.V., SÁ, L.A.N., CARMO, J.B., GUERREIRO, J.C., ZANUNCIO, J.C. Biological control of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) in eucalyptus plantations. **Phytoparasitica**, v. 43, n.2, p. 151-157, 2015.

FERREIRA-FILHO, P.J., WILCKEN, C.F., MASSON, V., DE SOUZA TAVARES, W., GUERREIRO, J.C., BRAGA DO CARMO, J., PRADO, E. P., ZANUNCIO, J.C. Influence of temperature and rainfall on the population dynamics of *Glycaspis brimblecombei* and *Psyllaephagus bliteus* in *Eucalyptus camaldulensis* plantations. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 43, n.1, p. 1-6, 2017.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University, p.484, 1994.

HILL, J.G., AGUIRRE, M.B., BRUZZONE, O.A., VIRLA, E.G., LUFT ALBARRACIN, E. Influence of adult diet on fitness and reproductive traits of the egg parasitoid *Anagrus virlai* (Hymenoptera: Mymaridae), a potential biocontrol agent against the corn leafhopper. **Journal of Applied Entomology**, v.00, p. 1–11, 2020.

IDE, S., MUÑOZ, C., BEÉCHE, M., MONDACA, J., JAQUES, L., GONZÁLEZ, P., GOYCOOLEA, C. **Detección Y Control Biológico De *Glycaspis Brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psyllidae)**. Servicio Agrícola y Ganadero, División de Protección Agrícola, v. 32, 2006.

JERE, V., MHANGO, J., NJERA, D., JENYA, H. Infestation of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) on three Eucalyptus species in selected ecological zones in Malawi. **African Journal of Ecology**, v. 00, p. 1-9, 2019.

JERVIS, M.A., KIDD, N.A.C., HEIMPEL, G.E. Parasitoid adult feeding behavior and biocontrol – a review. **Biocontrol News Information**, v. 17, p. 11N–26N, 1996.

KAMAL, M.A., KLEIN, P. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.18, n.1, p. 17–21, 2011.

KEIL, G., CUMMINGS, E., DE MAGALHÃES, J.P. Being cool: how body temperature influences ageing and longevity. **Biogerontology**, v. 16, n.4, p. 383–397, 2015.

KIRITANI, K. Different effects of climate change on the population dynamics of insects. **Applied Entomology and Zoology**, v. 48, n.2, p. 97-104, 2013.

LEE, E.T. **Statistical Methods for Survival Data Analysis**, Second Edition, New York: John Wiley & Sons, 1992.

MARGIOTTA, M., BELLA, S., BUFFA, F., CALECA, V., FLORIS, I., GIORNO, V., LO VERDE, G., RAPISARDA, C., SASSO, R., SUMA, P., TORTORICI, F., LAUDONIA, S. Modeling environmental influences in the *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae)–*Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) parasitoid–host system. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 2, p. 491-501, 2017.

MASSON, M.V., MATOS, W.C., DA SILVA, A.G.P., ALVES, J.M., RIBEIRO, G.T., WILCKEN, C.F. Ocorrência e distribuição populacional do psílideo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore 1964, (Hemiptera: Psyllidae) em floresta de eucalipto no litoral norte do estado da Bahia, Brasil. **Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas**, v. 35, n.4, p. 559-562, 2009.

MILOSAVLJEVIĆ, I., MCCALLA, K.A., BISTLINE-EAST, A., HODDLE, M.S. Threshold temperatures and thermal requirements of *Psyllaphycus diaphorinae* (Hymenoptera: Encyrtidae), a hyperparasitoid of *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae) and *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, v.103, n.1, p. 23-31, 2020.

MOŁOŃ, M., DAMPC, J., KULA-MAXIMENKO, M., ZEBROWSKI, J., MOŁOŃ, A., DOBLER, R., DURAK, R., SKOCZOWSKI, A. Effects of temperature on lifespan of

Drosophila melanogaster from different genetic backgrounds: links between metabolic rate and longevity. **Insects**, v. 11, n.8, p. 470, 2020.

NDLELA, S. Dossier on the proposed importation of the natural enemy *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), for the control of the exotic invasive eucalyptus pest; the red gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psyllidae) in Zimbabwe. p. 1-24, 2016.

NELDER, J.A., WEDDERBURN, R.W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, v. 135, n. 3, p. 370–384, 1972.

OTERO, R.P., BORRAJO, P., VÁZQUEZ, J.P.M., FERNÁNDEZ, F.R. Primera cita en España de " *Psyllaephagus bliteus*" Riek (Hymenoptera, Encyrtidae), parasitoide de " *Glycaspis brimblecombei*" Moore (Hemiptera, Psyllidae). **Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas**, v.37, n.1, 37-44, 2011.

PLASCENIA-GONZÁLEZ, A., CIBRIÁN-TOVAR, D., LLANDERAL-CÁZARES, C., LÓPEZ-PÉREZ, I., ARRIOLA-PADILLA, V. Biología del parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 11, n.1, p. 11-17, 2005.

RIEK, E. F. The Australian species of *Psyllaephagus* (Hymenoptera, Encyrtidae), parasites of psyllids (Homoptera). **Australian Journal of Zoology**, v. 10, p. 684-757, 1962.

ROSEWELL, J., SHORROCKS, B. The implication of survival rates in natural-populations of drosophila-capture recapture experiments on domestic species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 32, n.4, p. 373–384, 1987.

SULLIVAN, D.J., DAANE, K.M., SIME, K.R., ANDREWS JR, J.W. Protective mechanisms for pupae of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red-gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psylloidea). **Australian Journal of Entomology**, v. 45, n.1, p.101-105, 2006.

SILVA, G.V., FREITAS BUENO, A., NEVES, P.M.O.J., FAVETTI, B.M. Biological characteristics and parasitism capacity of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) on eggs of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n.8, p. 210-220, 2018.

STOUTHAMER, R. The use of unisexual wasps in biological control. In: **Quality Control and Production of Biological Control Agents-Theory and Testing Procedures**. CABI, 2003. p. 93-113.

TIAN, J.C., WANG, G.W., ROMEIS, J., ZHENG, X.S., XU, H.X., ZANG, L.S., LU, Z.X. Different performance of two *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species feeding on sugars. **Environmental Entomology**, v. 45, n.5, p. 1316-1321, 2016.

TULLER, J., OLIVEIRA, K.N., SILVA, J.O., DE FARIA, M.L., ESPÍRITO-SANTO, M.M., SERRÃO, J.E., ZANUNCIO, J.C. *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) attack patterns on different Eucalyptus genotypes. **PeerJ**, v. 5, p. e3864, 2017.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v.57, n.1, p. 1-20, 2012.

WESTFALL, P.H., TOBIAS, R.D., ROM, D., WOLFINGER, R.D., AND HOCHBERG, Y. **Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System**, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

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

WILCKEN, C.F.; FIRMINO-WILCKLER, D.C.; DAL POGETTO, M.H.F.A.; DIAS, T.K.R.; LIMA, A.C.V.; DE SÁ, L.A.N.; FERREIRA-FILHO, P.J. Psílídeo-de-concha-do-eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore. In: **Pragas introduzidas no Brasil insetos e ácaros**. Piracicaba. Fealq. 2015. p. 883-897.

ZIMBA, K., MOORE, S.D., HESHULA, U., HILL, M.P. *Agathis bishopi*, a larval parasitoid of false codling moth *Thaumatotibia leucotreta*: laboratory rearing and effect of adult food on parasitism and longevity. **African Entomology**, v. 24, n.1, p. 153-161, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos são de grande valia e poderão auxiliar na melhora da criação de *P. bliteus* em laboratório e, conseqüentemente, no manejo de *G. brimblecombei*. A identificação de espécies de endossimbiontes como a *Wolbachia pipientis* favorecem surtos populacionais de psíldeo-de-concha devido a manipulação reprodutiva, como constatado para as populações de Mogi-Guaçu (SP), Agudos (SP), Itamarandiba (MG), São Jerônimo da Serra (PR), sendo que esses endossimbiontes se mantêm nas populações de *G. brimblecombei* pela transmissão vertical e também são transferidos para os parasitoides, *P. bliteus*, pela transmissão horizontal. Os aspectos bioecológicos das táticas de parasitismo e os voláteis extraídos do corpo das ninfas de *G. brimblecombei* podem ser caminhos para estudos futuros de sintetização dos compostos ácido oleico, tetracosano e pentacosano para maior atratividade do parasitoide para a área. *Psyllaephagus bliteus* é caracterizado por inseto solitário, ovários sinogênicos favorecem o não interesse imediato pela cópula, reforçando que ambos os sexos devem ser mantidos na proporção de 1:1, em laboratório, e por mais de 48 horas juntos para que copulem, já que emergem com ovos prontos para o parasitismo. Quanto à longevidade e sobrevivência de *P. bliteus* sob temperaturas controladas, ambas são afetadas quando acima de 25 °C, sendo aconselhável repensar o protocolo de criação do mesmo em laboratório. Além disso, a suplementação alimentar dos parasitoides deve ser feita com mel 100% ou 50%, tanto em laboratório quanto para liberações em campo.

REFERÊNCIAS

- BERTI-FILHO, E.; COSTA, V.A.; ZUPARKO, R.L.; LA SALLE, J. Ocorrência de *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera Encyrtidae) no Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 78, n.3, p.304, 2003.
- BOAVIDA, C., GARCIA, A., BRANCO, M. How effective is *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) in controlling *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psylloidea)? **Biological Control**, v. 99, p.1-7, 2016.
- BRENNAN, E.B., GILL, R.J., HRUSA, G.F., WEINBAUM, S.A. First record of *Glycaspis brimblecombei* (Moore) (Homoptera: Psyllidae) in North America: initial observations and predator associations of a potentially serious new pest of eucalyptus in California. **Pan-Pacific Entomologist**, v. 75, n.1, p. 55-57, 1999.
- CALECA, V., BELLA, S., LA PERGOLA, A., LOMBARDO, A., LO, V.G., MALTESE, M., NUCIDORA, S., RIZZO, R., SUMA, P., TORTORICI, F., RAPISARDA, C. Environmental factors impact and incidence of parasitism of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera, Encyrtidae) on populations of *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Aphalaridae) in Mediterranean climatic areas. **Redia**, v. 101, p. 89-100, 2018.
- DAANE, K.M., SIME, K.R., DAHLSTEN, D.L., ANDREWS, J.W., ZUPARKO, R.L. The biology of *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the red gum lerp psyllid (Hemiptera: Psylloidea). **Biological Control**, v. 32, n.2, p. 228–235, 2005.
- DAANE, K.M., SIME, K.R., PAINE, T.D. Climate and the effectiveness of *Psyllaephagus bliteus* as a parasitoid of the red gum lerp psyllid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n.11, p. 1305-1320, 2012.
- DAHLSTEN, D.L., DREISTADT, S.H. Pest notes: Psyllids. **University of California Agricultural Natural Resources Publications**, n. 7423, p. 1-6, 2001.

DAHLSTEN, D.L., DREISTADT, S.H., GARRISON, R.W., GILL, R. J. Pest notes: *Eucalyptus redgum* lerp psyllid. **University of California Agricultural Natural Resources Publications**, n. 7460, p. 1-4, 2003.

FERREIRA FILHO, P.J., WILCKEN, C.F., LIMA, A.C.V., DE SÁ, L.A.N., DO CARMO, J.B., GUERREIRO, J.C., ZANUNCIO, J.C. Biological control of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) in eucalyptus plantations. **Phytoparasitica**, v. 43, n.2, p. 151-157, 2015.

HALBERT, S.E., GILL, R.J., NISSON, J.N. Two *Eucalyptus* psyllids new to Florida (Homoptera: Psyllidae). **Fla. Department Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry**, 2001.

HURLEY, B.P., GARNAS, J., WINGFIELD, M.J., BRANCO, M., RICHARDSON, D. M., SLIPPERS, B. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, v. 18, n.4, p. 921-933, 2016.

PHILLIPS, C. **Forest insects: lerp insects**. South Australia Forestry, n. 6, p. 1-4, 1992.

PLASCENIA-GONZÁLEZ, A., CIBRIÁN-TOVAR, D., LLANDERAL-CÁZARES, C., LÓPEZ-PÉREZ, I., ARRIOLA-PADILLA, V. Biología del parasitoide **Psyllaephagus bliteus** (Hymenoptera: Encyrtidae). **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 11, n.1, p. 11-17, 2005.

SÁNCHEZ, B.S. **Aspectos bionómicos del psilideo del eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psylloidea: Spondylaspididae)**. 2003. 76p. Tesis (Maestría) - Universidad Autónoma Chapingo, México, 2003.

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

WILCKEN, C.F., FIRMINO-WILCKLER, D.C., DAL POGETTO, M.H.F.A., DIAS, T. K.R., LIMA, A.C.V., DE SÁ, L.A.N., FERREIRA-FILHO, P.J. Psilídeo-de-concha-do-

eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore, pp. 883-897. In: Vilela, E.F, Zucchi, R.A. **Pragas introduzidas no Brasil insetos e ácaros**. Fealq, Piracicaba, SP. 2015.