

FÁBIO ARAÚJO DOS SANTOS

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Glycaspis brimblecombei* (HEMIPTERA:
APHALARIDAE) E SEU PARASITOIDE *Psyllaephagus bliteus*
(HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) NO BRASIL**

Botucatu

2019

FÁBIO ARAÚJO DOS SANTOS

**FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Glycaspis brimblecombei* (HEMIPTERA:
APHALARIDAE) E SEU PARASITOIDE *Psyllaephagus bliteus*
(HYMENOPTERA: ENCYRTIDAE) NO BRASIL**

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

Orientador: Carlos Frederico Wilcken

Botucatu

2019

S237f Santos, Fábio Araújo dos
Filogeografia molecular de *Glycaspis brimblecombei*
(Hemiptera: Aphalaridae) e seu parasitoide
Psyllaephagus bliteus (Hymenoptera: Encyrtidae) no
Brasil / Fábio Araújo dos Santos. – Botucatu, 2019
39 p. : il., tabs., fotos, mapas

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

1. Pragas exóticas. 2. Eucalipto. 3. Molecular. 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 DISSERTAÇÃO: FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DE *Glycaspis brinblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) E SEU PARASITOIDE *Phyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) NO BRASIL

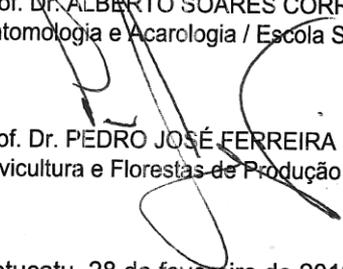
AUTOR: FÁBIO ARAÚJO DOS SANTOS

ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA FLORESTAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas


Prof. Dr. ALBERTO SOARES CORRÊA
Entomologia e Acarologia / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)


Prof. Dr. PEDRO JOSÉ FERREIRA FILHO
Silvicultura e Florestas de Produção / Universidade Federal de São Carlos

Botucatu, 28 de fevereiro de 2019

In memoriam: Manoel Nascimento da Silva (pai), que foi um dos grandes incentivadores dos meus estudos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por não me deixar sozinho nessa jornada e por sempre me amparar nas horas difíceis;

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken, Professor Associado na Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, pela oportunidade, paciência, apoio e orientação durante a condução do mestrado;

Ao Prof. Dr. Alberto Corrêa Soares, Professor Doutor no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP), por todos os ensinamentos e atenção durante o mestrado;

À Coordenadoria de Assistência à Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização do curso;

Ao Programa Cooperativo em Proteção Florestal (PROTEF) do Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF) sob a coordenação de Luís Renato Junqueira, por toda a ajuda logística durante o curso;

A todos do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF – FCA/UNESP), pela colaboração e convivência do dia-a-dia;

A todos do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes (EntoMol – ESALQ/USP), pela amizade e inestimável colaboração prestada durante a condução dessa pesquisa;

Ao professor Dr. Celso Luis Marino (IB/UNESP - Botucatu), professor Dr. Edson Luiz Furtado (FCA/UNESP) e ao professor Dr. Pedro José Ferreira Filho (UFSCAR - Sorocaba), por suas contribuições;

Aos Professores do Depto. de Ciência Florestal e do Depto. de Proteção de Plantas - FCA/UNESP - Campus de Botucatu, pelos ensinamentos e apoio durante a realização deste curso;

À minha família, amigos e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

O psilídeo-de-concha do eucalipto, *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) é uma das principais pragas exóticas do eucalipto e foi relatado no estado de São Paulo em 2003, causando danos em plantios de *Eucalyptus camaldulensis*. O parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) foi notificado juntamente com a praga e uma nova introdução de parasitoides do México foi realizada para maximizar a eficiência de programas de controle biológico dessa praga. Os objetivos foram avaliar a diversidade genética do psilídeo-de-concha e do seu parasitoide no Brasil utilizando sequenciamento de genes mitocondriais. Insetos das duas espécies, praga e parasitoide, foram coletados em diferentes regiões do Brasil para o sequenciamento de um fragmento de genes mitocondriais. Trinta e quatro indivíduos de *G. brimblecombei* e 12 de *Psyllaephagus* spp. foram sequenciados. Um único haplótipo de COI foi encontrado nas populações de *G. brimblecombei* do Brasil e este é compartilhado com amostras oriundas de Portugal. Isso indica que, provavelmente, houve apenas uma ou poucas introduções do mesmo centro de origem dessa espécie no Brasil e proveniente de uma linhagem invasora presente em diferentes locais do mundo. Este fato sugere que as rotas de invasão de *G. brimblecombei* no mundo estão interligadas, o que parece ser um padrão para pragas invasoras de eucalipto. Para o parasitoide dois haplótipos distintos foram encontrados, com alta distância genética entre eles, sugerindo a presença de duas espécies no Brasil, uma já identificada, *P. bliteus*, e a segunda espécie de *Psyllaephagus* ainda não identificada morfológicamente, mas também exótica e oriunda da Austrália.

Palavras-chave: Pragas exóticas do eucalipto, psilídeo-de-concha, marcadores moleculares

ABSTRACT

Red gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) is one of the most important *Eucalyptus* exotic pests. Its first report in Brazil was in 2003, in the state of São Paulo, damaging *Eucalyptus camaldulensis* plantations. The parasitoid *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) was recorded together with the pest and a new introduction of parasitoids from Mexico was carried out to improve the efficiency of biological control programs of this pest. The objectives were to evaluate the genetic diversity of the red gum lerp psyllid and its parasitoid in Brazil using mitochondrial genes sequencing. Insects of both species were collected from different regions in Brazil. Thirty-four individuals of *G. brimblecombei* and twelve samples of *Psyllaephagus* spp. were successfully sequenced. A single COI gene haplotype was found in *G. brimblecombei* populations from Brazil and this is the same haplotype that occurs in Portugal samples, indicating one or few introduction events of *G. brimblecombei* in Brazil is originated from an invasive lineage distributed in other regions from the world. This fact suggests that the invasion routes of *G. brimblecombei* in the world are interconnected, which seems to be a standard for invasive *Eucalyptus* pests. Two distinct haplotypes, with a high genetic distance between them, were identified for the parasitoid. It confirms the presence of two parasitoid species in Brazil, one already identified, *P. bliteus*, and a second species of *Psyllaephagus* not morphologically identified. However, we can confirm that both parasitoid species collected in Brazil are exotic species originated from Australia.

Key words: Eucalyptus, invasive pest, Red Gum Lerp Psyllid, molecular markers

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Importância da eucaliptocultura no Brasil	17
2.2	<i>Glycaspis brimblecombei</i> (Hemiptera: Psylloidea: Aphalaridae)	18
2.4	Marcadores moleculares	21
2.5	Marcadores Mitocondriais	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Local de desenvolvimento	23
3.2	Coleta dos insetos	23
3.3	Extração de DNA (<i>Glycaspis brimblecombei</i> e <i>Psyllaephagus bliteus</i>)	25
3.4	Amplificação de um fragmento do gene COI para <i>Glycaspis brimblecombei</i>	25
3.5	Amplificação de um fragmento do gene CytB para <i>Psyllaephagus</i> spp	26
3.6	Análises e edição das sequências	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Análises de gene COI de <i>Glycaspis brimblecombei</i>	28
4.2	Análises do gene CytB para <i>Psyllaephagus</i> spp	30
5	CONCLUSÕES	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

O mundo possui 290 milhões de hectares de florestas plantadas, contribuindo com o suprimento de madeira para diversos fins (FAO, 2016). *Eucalyptus* está entre os principais gêneros florestais plantados no mundo (NADEL et al., 2010; TURNBULL, 1999). No entanto, o eucalipto é constantemente atacado por vários agentes daninhos exóticos, o que pode diminuir sua produtividade. A globalização contribui para a introdução de pragas exóticas em vários países, isso se torna uma das principais preocupações das empresas e produtores florestais (BROCKERHOFF et al., 2006; WINGFIELD et al., 2008; NADEL et al., 2010; LIEBHOLD et al., 2012).

As principais pragas exóticas presentes em plantios de *Eucalyptus* no Brasil são: o percevejo-bronzeado (*Thaumastocoris peregrinus*), o psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) e a vespa-da-galha (*Leptocybe invasa*). Estudar os padrões de distribuição geográfica, a diversidade genética e a origem dessas pragas é importante para ajudar nos programas de controle de pragas exóticas do eucalipto. É necessário compreender a origem e os padrões dessas invasões no esforço de reduzi-las no futuro (BROCKERHOFF et al. 2006; WINGFIELD et al. 2008; NADEL et al., 2010; WILCKEN et al, 2010).

O psilídeo-de-concha do eucalipto, *Glycaspis brimblecombei* Moore. (Hemiptera: Aphalaridae), é uma praga natural da Austrália, relatada pela primeira vez no Brasil em 2003, causando danos em plantações de *Eucalyptus* sp. no estado de São Paulo. Ninfas de *G. brimblecombei* produzem uma estrutura de amido, em formato de concha, sobre si onde permanecem se alimentando por aproximadamente 15 dias até a fase adulta, com ciclo total de 22 dias. O psilídeo-de-concha se alimenta de seiva causando diminuição de área fotossintética, seca de ponteiros, propiciando aparecimento de fumagina, descoloração e queda prematura de folhas maduras, atraso no crescimento das árvores e, em ataques severos, causa mortalidade nas plantas (WILCKEN et al., 2015 FIRMINO-WINCKLER et al., 2009).

Glycaspis brimblecombei tem sido controlado pelo parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae). No entanto, surtos do psilídeo-de-concha nos últimos anos causando sérios danos ao *Eucalyptus* (TULLER et al., 2017), indicando

que o parasitismo não está sendo suficiente para o controle dessa praga. Dessa forma, entender a diversidade e possíveis linhagens genéticas da praga e do parasitoide em diferentes regiões edafoclimáticas brasileiras, pode gerar informações essenciais para a sustentabilidade de programas de controle dessa praga no Brasil.

Estudos de filogeografia podem explicar processos responsáveis pela distribuição de um organismo por grandes áreas ou regiões. Estudos desse tipo levam em consideração a distribuição geográfica e padrões genealógicos de populações de uma determinada espécie ou grupo de espécies (AVISE et al., 1987; AVISE, 2000). Esse trabalho teve como objetivo avaliar se há diferença genética entre populações da espécie *G. brimblecombei* e entre populações do seu parasitoide *P. bliteus* de diferentes regiões do Brasil, utilizando sequenciamento de genes mitocondriais, Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e Citocromo B (Cytb) para *G. brimblecombei* e *P. bliteus*, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da eucaliptocultura no Brasil

O Brasil possui 7.840.000 hectares plantados com espécies de árvores. Desse total, 5.700.000 hectares estão plantados com eucalipto. O setor florestal brasileiro foi responsável por 6,2% do Produto Interno Bruto (PIB) Industrial no País no ano de 2016. Com uma produtividade média, para plantios de eucalipto, de 35,7 m³.ha ano⁻¹, o Brasil mantém a liderança no ranking global de produtividade florestal. No ano de 2016 o setor obteve receita bruta de R\$ 71,1 bilhões (IBÁ, 2017).

No Brasil, a eucaliptocultura teve início a partir dos estudos de Edmundo Navarro de Andrade no Horto de Jundiaí, SP, entre 1904 e 1909. A partir de 1910, Navarro de Andrade começou a plantar, em Rio Claro, SP, a primeira grande coleção de eucalipto que, em 1919, já possuía cerca de 120 espécies do gênero plantadas. Estima-se que em 1941 havia cerca de 24 milhões de árvores plantadas pela Companhia Paulista de Estradas de Ferro, no estado de São Paulo. Já em 1960, esse número era de 46,5 milhões de árvores. Desde então, um dos problemas enfrentados pelos profissionais da área de proteção é a presença de extensos maciços florestais homogêneos geralmente com poucas espécies e/ou clones, a falta de materiais genéticos resistentes e a falta de inimigos naturais, favorecem a ocorrência e a manutenção de populações de insetos-praga nativos e exóticos, o que resulta em seu aumento populacional, causando injúrias as plantas hospedeiras e danos econômicos aos produtores florestais (ANDRADE, 1911; MORA; GARCIA, 2000; COSTA et al., 2014; HURLEY et al., 2016).

Houve introdução de um número expressivo de pragas exóticas para a cultura do eucalipto no Brasil entre 1986 e 2014. Podemos citar, entre algumas das pragas exóticas introduzidas, as espécies: *Glycaspis brimblecombei* (MOORE, 1964) (Hemiptera: Aphalaridae); *Gonipterus platensis* (MARELLI, 1926) (Coleoptera: Curculionidae); *Leptocybe invasa* (FISHER; LASALLE, 2004) (Hymenoptera: Eulophidae) e *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero & Dellapé, 2006) (Hemiptera: Thaumastocoridae) (HURLEY et al., 2016).

2.2 *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae)

Os psílídeos são insetos da superfamília Psylloidea, que abrange aproximadamente 3500 espécies em todo o mundo. Muitas espécies de Psylloidea são pragas de uma gama de plantas importantes para o homem, algumas espécies causam galhas e outras são vetores de fitopatógenos (SHARMA; RAMAN, 2017).

O psílídeo-de-concha do eucalipto (red gum lerp psyllid), *Glycaspis brimblecombei*, foi descrito a partir de espécimes coletados em Brisbane, Queensland, Austrália, em árvores de *Eucalyptus camaldulensis* (MOORE, 1964). Inicialmente, o gênero *Glycaspis* foi atribuído à família Spondylaspididae, depois foi incluída na família Psyllidae, mais recentemente na família Aphalaridae (SHARMA; RAMAN, 2017; NCBI, 2018).

O gênero *Glycaspis* contém aproximadamente 140 espécies divididas em três subgêneros por Moore (*Glycaspis*, *Boreioglycaspis* e *Synglycaspis*) que são divididas em 20 grupos. *G. brimblecombei* está incluído no grupo taylori de 20 espécies no subgênero *Glycaspis*, que contém 88 espécies. O gênero *Glycaspis* é distribuído por toda a Austrália e em outros países como a Malásia e as Filipinas (HODKINSON, 1983; MOORE 1970A, 1983).

As principais espécies hospedeiras do psílídeo-de-concha são *E. camaldulensis*, *E. rudis* e *E. tereticornis*. O termo lerp é oriundo dos aborígenes australianos para a cobertura da ninfa em forma de cone, composta de substâncias açucaradas excretadas. Nem todas as espécies de *Glycaspis* produzem concha, embora numerosas outras espécies em outros gêneros na Austrália e em outros lugares produzam concha. As formas e aparência geral das conchas podem ser específicas da espécie, mas a concha em forma de cone de *G. brimblecombei* não é suficientemente característica para identificação da espécie (HANKS, 1995; GARRISON, 1998; GILL, 1998; BRENNAN, 2001; SHARMA; RAMAN, 2017).

Glycaspis brimblecombei é uma espécie exótica ao Brasil, originário da Austrália. Pertence à ordem Hemiptera, subordem Sternorrhyncha e à família Aphalaridae. Descrita por Moore em 1964 a partir de espécimes coletados em Queensland na Austrália (GALLO et al, 2002; DIODATO; VENTURINI, 2007).

Os insetos dessa família são pequenos (2,5 a 3,1 mm), as fêmeas são maiores que os machos. Possuem pernas posteriores saltadoras, antenas bem desenvolvidas, esses insetos possuem hábito alimentar sugador, alimentando-se da seiva das plantas (CIBRIAN-TOVAR; INIGUEZ-HERREIRA, 2001; GALLO et al., 2002; RAMIREZ, 2003).

Glycaspis brimblecombei se reproduz sexuadamente, as fêmeas ovipositam em folhas abertas, os ovos são de coloração amarelo-alaranjados, brilhantes e ovalados. São postos em linha, agrupados ou individualizados. Cada fêmea oviposita, em média, 119 ovos (DREISTADT; DAHLSTEN, 2001; WILCKEN, et al., 2015). Em *E. camaldulensis*, à temperatura de 26°C e fotofase de 12h, *G. brimblecombei* teve duração média do estágio ninfal de 14,2 dias. Adultos nas mesmas condições viveram 8,4 dias e o período embrionário teve duração média de 7,9 dias. O ciclo total, considerando o período embrionário até a morte dos adultos, foi de 30,4 dias (FIRMINO, 2004).

Em junho de 1998, o psilídeo-de-concha foi detectado na Califórnia, EUA, atacando *Eucalyptus camaldulensis*. Desde então, a praga tem sido encontrada em diferentes estados americanos, aparentemente, disseminando-se de maneira natural. Vários estados do México também reportaram a presença da praga em eucalipto, que é uma das árvores mais utilizadas em programas de reflorestamentos e arborização urbana do país (GARRISON, 1998; RAMIREZ, 2003).

G. brimblecombei causa dano pela alimentação tanto das ninfas quanto dos adultos, ao extrair a seiva das folhas. Os danos causados pelo psilídeo-de-concha *G. brimblecombei* podem ser de grande proporção, já que chegam a apresentar 15% de mortalidade das plantas no primeiro ano e até 40% no segundo ano, se não forem realizados métodos de controle (GILL, 1998; DREISTADT; GILL, 1999).

A primeira detecção no Brasil, no estado de São Paulo, em junho de 2003, as árvores, que, inicialmente apresentavam algumas conchas, estavam com secamento de ponteiros e desfolha entre 20 a 30%. Árvores dominadas apresentavam desfolha de 100 %, sem possibilidade de recuperação (WILCKEN et al., 2003).

Psyllaephagus bliteus é parasitoide específico de *G. brimblecombei* e foi relatado junto com a praga em 2003, porém com baixo parasitismo. Uma nova

introdução de populações importadas do México foi realizada, o que aumentou a efetividade desse parasitoide. Esses insetos são microhimenópteros de 1 a 2 mm, caracterizados pela mesopleura larga e convexa. Para a determinação da dinâmica populacional são utilizadas armadilhas adesivas amarelas como método de amostragem para populações de *G. brimblecombei* e de *P. bliteus* em plantios de *Eucalyptus* (GALLO et al., 2002; WILCKEN et al., 2003; FERREIRA-FILHO, 2008). Em *Psyllaephagus bliteus* ocorre partenogênese arrenótoca facultativa, na ausência de machos, as fêmeas colocam ovos férteis, mas que dão origem apenas a parasitoides machos. Fêmeas de *P. bliteus* ovipositam em média 125,7 ovos, em um período de 22 dias após sua emergência (DAANE et al., 2005; PLASCENCIA-GONZÁLES et al., 2005).

A dinâmica populacional de *G. brimblecombei* e de *P. bliteus* é influenciada pelas estações do ano, temperatura e precipitação, com um pico no inverno e diminui no verão quando a temperatura e a precipitação aumentam. 22°C e 26°C são as temperaturas ideais para o desenvolvimento do psílideo-de-concha e as temperaturas de 18°C e 30°C são prejudiciais para *G. brimblecombei* (FERREIRA FILHO et al., 2008; FIRMINO-WINCKLER, et al., 2009).

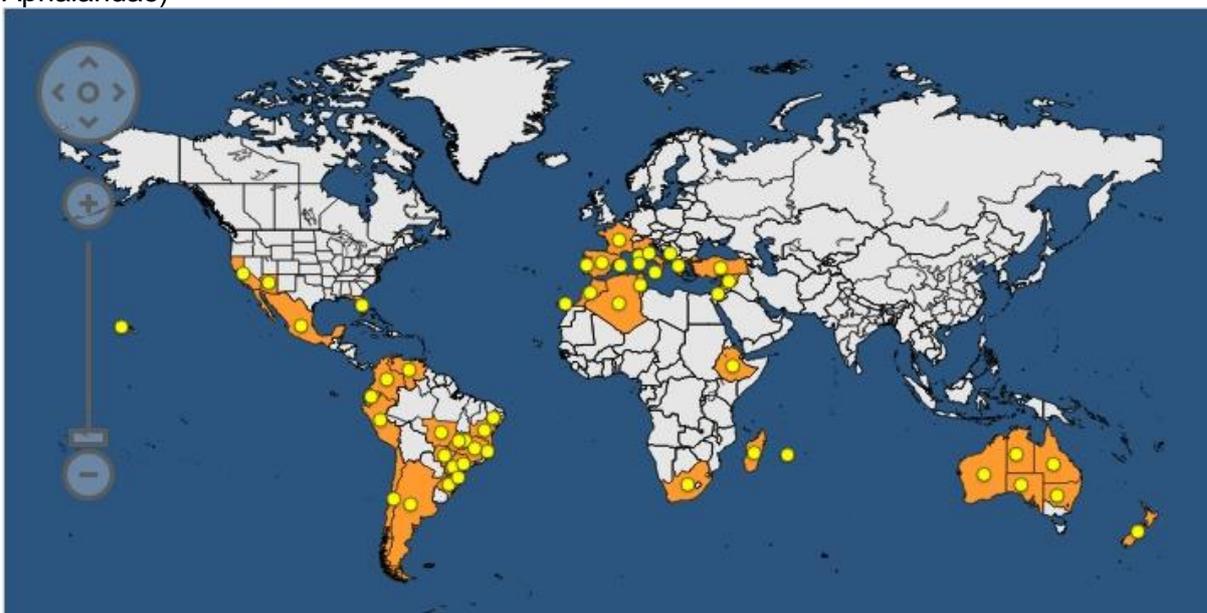
O parasitismo no campo era de 0,2 a 11% de ninfas parasitadas em florestas de *E. camaldulensis* nos estados de São Paulo e Minas Gerais (WILCKEN et al., 2005). Em 2006, com a importação de novas raças do parasitoide do México, a taxa de parasitismo aumentou, atingindo 25 a 94% (WILCKEN et al., 2015). No entanto Tuller e colaboradores (2017) relataram um baixo parasitismo (2,9%) da ninfa de *Glycaspis brimblecombei* por *Psyllaephagus bliteus*, independente do genótipo e período do ano em Minas Gerais.

2.3 Distribuição de *Glycaspis brimblecombei*

Originária da Oceania, *Glycaspis brimblecombei* está presente na África, América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa. (Figura1). Foi introduzido na Califórnia, EUA, em 1998, onde causou secamento de ponteiros em *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. diversicolor*, *E. globulus*, *E. sideroxylon* e *E. rudis* (BRENNAN et al., 1998). Detectado no ano 2000, em 2003 *G. brimblecombei* já estava presente em 24 estados do México (RAMIREZ, 2003).

G. brimblecombei foi detectada na África (Ilhas Maurício) e na América do Sul (Chile) em 2001, no Brasil foi detectado em 2003 (WILCKEN et al., 2015), na Europa foi detectada em 2007 na península ibérica (VALENTE; HODKINSON, 2008) . Os últimos países a detectar a presença de *G. brimblecombei* foram Etiópia, Nova Zelândia e Zâmbia (CHANGU et al., 2017; YIRGU; ANJULO, 2019).

Figura 1. Mapa de distribuição global de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae)



Fonte: EPPO, 2019.

2.4 Marcadores moleculares

A partir da década de 1970, os avanços na biologia molecular proporcionaram novas ferramentas, como os marcadores moleculares, o que possibilitou avanços nos estudos de genética de populações. Esses marcadores identificam variações da sequência de DNA encontrados no genoma e transmitidos pelas leis de padrão de herança (SEMAGN et al., 2006).

É importante obter marcadores moleculares para a análise genética dos organismos, pois permitem a determinação de variabilidade genética e identidade genética, a partir da detecção de polimorfismo (DURAN et al., 2009).

Diversas são as técnicas moleculares, diferentes tanto em seus princípios quanto em suas metodologias. Muitos marcadores moleculares estão disponíveis, podendo ser utilizados em diversas situações. É necessária uma cuidadosa escolha

do marcador a ser utilizado em cada trabalho, levando em consideração as questões biológicas a serem estudadas (BUSO et al., 2003; SEMAGN et al., 2006).

Os marcadores moleculares são classificados, de acordo com o método de análise, como: (i) baseados em hibridação, como marcadores de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs); (ii) os baseados em PCR, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), SSR (Simple Sequence Repeat) ou microssatélites; (iii) e marcadores de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (VARSHNEY et al., 2007).

Os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominantemente e podem ser utilizados tanto em indivíduos jovens como em adultos. Nesse sentido, foi desenvolvido o projeto *DNA Barcode - The Barcode Life Project*, que é um sistema único e universal que tem como objetivo identificar todos os eucariontes, tendo como base uma região específica do DNA mitocondrial, um fragmento da extremidade 5' da Subunidade I do gene Citocromo C Oxidase – COI. Essa região possui um comprimento aproximado de 650 pares de bases, na maioria dos grupos, e é ladeada por sequências conservadas, sendo, por isso, relativamente fácil de ser isolada e analisada (BRAMMER, 2000; HEBERT; GREGORY, 2005).

2.5 Marcadores mitocondriais

Presente em grandes quantidades nas células, o DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula pequena e circular. O genoma mitocondrial é composto por 37 genes envolvidos no processo de respiração aeróbica: 13 genes codificantes de proteínas, 22 de RNAs transportadores e 2 de RNAs ribossomais. Possui muitas cópias por célula, aparente ausência de íntrons e de recombinação, herança uniparental, genes com taxas evolutivas diferentes e taxas mutacionais, geralmente, superiores às de genes nucleares e conteúdo gênico bastante conservado fazem dos genes mitocondriais os marcadores mais comumente utilizados (SATTA et al., 1987; SIMON et al., 1994; SACCONI et al., 1999; GOTO; KIMURA, 2001; ROKAS et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de desenvolvimento

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), Campus de Botucatu e no Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes da Universidade de São Paulo, Campus “Luiz de Queiroz” (Esalq/USP) no município de Piracicaba.

3.2 Coleta dos insetos

Os espécimes de *G. brimblecombei* que foram utilizados para realizar os estudos foram coletados nos seguintes estados: Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (Figura 2 e Tabela 1). Já as amostras de *P. bliteus* foram coletadas nos seguintes estados: Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Figura 2 e Tabela 2). Todos os espécimes foram coletados em plantações de eucalipto. Para realizar a coleta foram retirados ramos infestados com psilídeo-de-concha, levados para o laboratório e colocados em gaiolas. Os adultos que emergiam foram separados para as análises. Em alguns casos os insetos foram coletados no campo em fase de ninfa, pois estavam em pequeno número e eram ninfas novas, não possibilitando que o ciclo biológico se completasse no laboratório. Após a coleta, os insetos foram transportados para o laboratório onde foram armazenados em etanol 100% P.A. a -22 °C.

Figura 2. Mapa de coleta de *Glycaspis brimblecombei* e *Psyllaephagus bliteus*

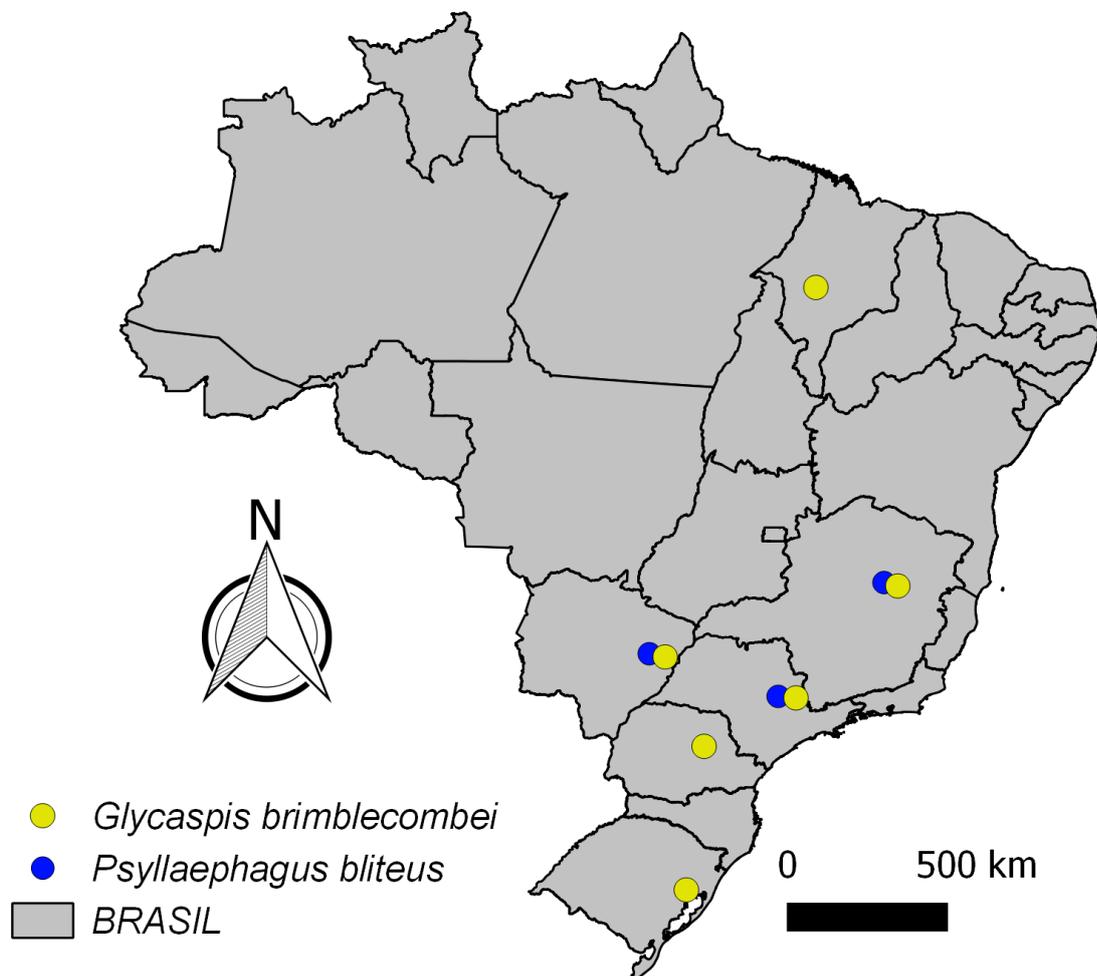


Tabela 1. Dados referentes às localidades, às datas de coleta, coletores e número de indivíduos (N) de *Glycaspis brimblecombei* coletados

Localidade	Data	Coordenadas	N
Botucatu – SP	05/02/2018	22°50'44''S 48°26'04''W	20
Capelinha – MG	20/03/2018	17°38'38''S 42°33'27''W	20
Grajaú – MA	10/10/2018	5°52'29''S 46°03'42''W	20
Guaíba – RS	20/05/2018	30°08'57''S 51°21'12''W	20
Itamarandiba – MG	20/03/2018	17°53'18''S 42°51'22''W	20
Moji Guaçu – SP	05/03/2018	22°11'37''S 47°04'49''W	20
Telêmaco Borba – PR	13/08/2018	24°17'47''S 50°37'10''W	20
Três Lagoas – MS	10/08/2018	20°35'26''S 51°37'08''W	20

Tabela 2 - Dados referentes às localidades, às datas de coleta, coletores e número de indivíduos(N) de *Psyllaephagus bliteus* coletados

Localidade	Data	Coordenadas	N
Botucatu – SP	10/09/2018	22°50'44''S 48°26'04''W	20
Itamarandiba – MG	08/10/2018	17°53'18''S 42°51'22''W	20
Moji Guaçu – SP	20/08/2018	22°11'37''S 47°04'49''W	20
Três Lagoas – MS	07/09/2018	20°35'26''S 51°37'08''W	20

3.3 Extração de DNA (*Glycaspis brimblecombei* e *Psyllaephagus bliteus*)

A extração do DNA genômico total foi realizada a partir de insetos inteiros de 48 indivíduos adultos pertencentes a seis localidades produtoras de eucalipto, utilizando uma modificação do método baseado na lise celular por CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (MARTINELLI et al., 2007; BLACK; DUTEAU, 1997). O inseto foi isolado em tubos de plástico de 1,5ml, macerado e adicionado 200 µl de tampão CTAB, 0,8 µl de β-mercaptoetanol e 4 µl de proteinase K (10mg/ml), por amostra. Após macerado foi incubado em banho-maria a 65°C por 3,5 horas e agitados em vortex a cada meia hora. Em seguida o material foi centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos a esta amostra foi acrescentando 200 µl de CIA (Clorofórmio - Álcool isoamílico) e centrifugada por 13000 rpm por 15 minutos, removido o sobrenadante para um novo tubo, adicionado 200 µl de CIA, agitada em vortex e novamente centrifugada por 13000 rpm por 15 minutos. Após esta etapa, foi removido o sobrenadante para um novo tubo, onde foi adicionado álcool isopropílico gelado e após “overnight” em freezer, centrifugado por 30 minutos a 13000 rpm, e realizada 2 lavagens no pellet com 200 µl de etanol 70%, e outra lavagem com etanol 100%. Após seco, o pellet foi ressuscitado com 50 µl de água milliQ autoclavada. A qualidade e quantidade do DNA foi verificada em gel de agarose (1,5% w/v).

3.4 Amplificação de um fragmento do gene COI para *Glycaspis brimblecombei*

A amplificação foi de fragmento de ≈ 570 pb por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR), onde se utilizou o iniciador C1-J-2441 (5' - CCTACAGGAATTA AAAATTTT TAGATGATTAGC - 3') e TL2-N-3014 (5' - TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA - 3'), publicados anteriormente por Simon et al. (1994). A amplificação via PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 3 µL de DNA (50ng/ µL); 10,7 µL de água ultrapura; 2,5 µL de tampão (10X); 2,5 µL

MgCl₂ (25 mM); 2 µl de dNTP (2,5mM); 2 µl de cada iniciador forward e reverse (10 pmols) e 0,3 µL de Taq (5U/ µL).

O programa de PCR consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, emparelhamento de 35 ciclos a 47°C por 1 minuto, polimerização de 35 ciclos a 72°C por 1,5 minutos e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos . Seguinte amplificação, as alíquotas foram inspecionadas visualmente por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5% w/v). Posterior a isto, foi preparado os produtos de PCR para sequenciamento, com a purificação de cada amostra, se utilizando 0,33 µl EXO; 0,33 µl SAP e 0,34 µl de água ultrapura depositados em tubos (0,2 mL) juntamente com 5 µl de cada amostra de PCR. Os tubos foram mantidos a 37°C por 30 min, em seguida a 80°C por 15 min no termociclador. Após a purificação as amostras foram submetidas a sequenciamento Sanger.

3.5 Amplificação de um fragmento do gene CytB para *Psyllaephagus* spp

A amplificação foi de fragmento de ≈ 750 pb por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR), onde se utilizou o iniciador CP1 (5´ - GATGATGAAATTTTGGATC-3´) e CB2 (5´ - ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT - 3´), publicados anteriormente por Harry et al., (1998), e Jermin e Crozier, (1994) respectivamente. A amplificação via PCR foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 3 µL de DNA (50ng/ µL); 10,7 µL de água ultrapura; 2,5 µL de tampão (10X); 2,5 µl MgCl₂ (25 mM); 2 µl de dNTP (2,5 mM); 2 µl de cada iniciador forward e reverse (10 pmols) e 0,3 µL de Taq (5U/ µL). O programa de PCR foi semelhante com descrito acima para *G. brimblecombei*.

Para cada amostra foram realizadas duas reações, sendo uma para o primer *forward* (F) e outra para o *reverse* (R), com concentração de DNA de 30 ng/ µl de acordo com o tamanho do fragmento. As amostras foram sequenciadas pelo CBTEC na Esalq/USP em Piracicaba, SP.

3.6 Análises e edição das sequências

As sequências de COI e CytB foram manualmente inspecionadas e editadas no software SEQUENCHER 4.1.4 e depois alinhadas com o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) utilizando o software MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Para *G. brimblecombei*, sequências adicionais do COI foram coletadas do GenBank oriundas de outras regiões do mundo (Austrália: KY923945.1; KY923944.1; KY923943.1; KY923942.1; KY923941.1; KY923940.1; KY923939.1; KY923938.1; Portugal: MG132460.1; MF197469.1; KY923992.1; KY923991.1; KY923990.1; KY923989.1; KY923988.1 (Apêndice 1). Posteriormente uma rede de haplótipos para o psílideo foi construída usando o algoritmo *median-joining* no software PopArt (LEIGH; BRYANT, 2015).

Para o parasitoide, *Psyllaephagus* spp, nós também coletamos 75 sequências do fragmento do gene CytB depositadas no Genbank (Apêndice 2). Posteriormente, foi realizada uma análise filogenética utilizando o método estatístico de Máxima Verossimilhança (ML), com o software MEGA X 10.0.5 (KUMAR et al., 2018). O modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado para o conjunto de dados foi o Hasegawa-Kishino-Yano com taxa de distribuição gama entre os sítios (HKY + G). A árvore com melhor verossimilhança foi selecionada entre cinco interações, com valores de bootstrap não-paramétrico calculados a partir da reamostragem de 10000 matrizes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

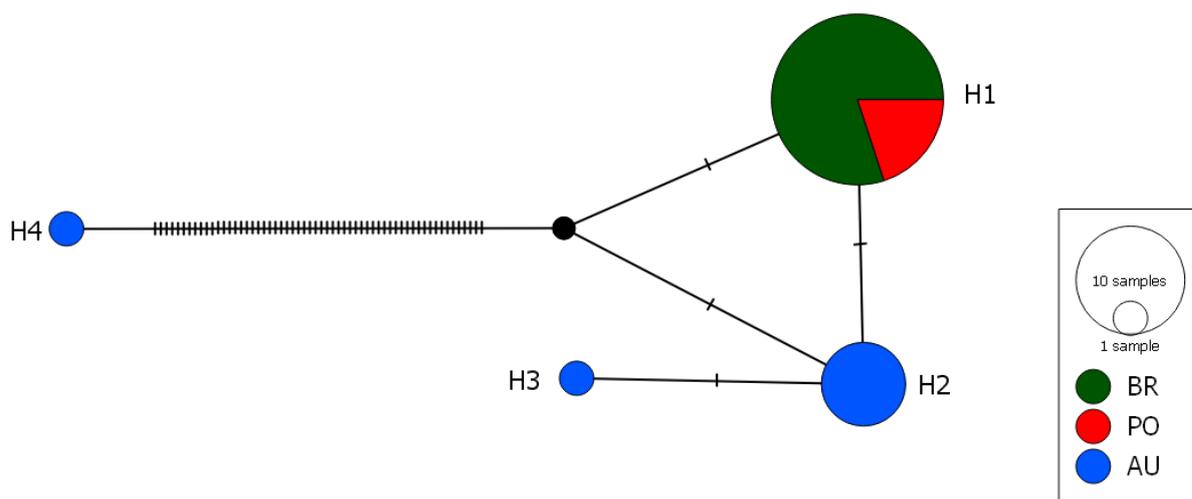
4.1 Análises de gene COI de *Glycaspis brimblecombei*

Um único haplótipo foi encontrado no Brasil para a espécie *G. brimblecombei* a partir de 720 pb do gene COI, independente da localidade, o que pode significar uma única invasão. Não há diversidade genética nessa espécie para o gene COI no Brasil. A ausência de diversidade pode ser explicada pelo efeito fundador, que é quando poucos fundadores originais se estabelecem, formando uma nova população. Esses fundadores carregam apenas uma pequena fração da variabilidade genética total da população parental do centro de origem.

Ao comparar as sequências de *G. brimblecombei* do Brasil com sequências depositadas no NCBI se verificou 4 haplótipos (Figura 3). As amostras do Brasil e de Portugal compartilham o mesmo haplótipo (H1) o que indica que, provavelmente, as rotas de invasão de *G. brimblecombei* na América do Sul, Europa e em outras regiões do mundo estão interligadas. A detecção em Portugal pode ter ocorrido inclusive do Brasil, devido a introdução no Brasil ter sido anterior (em 2003) a de Portugal (em 2007).

Foi observada outra linhagem de *G. brimblecombei* com cerca de 60 passos mutacionais que ainda não está presente fora da Austrália (Figura 3 – H4). Isso sugere uma ampla diversidade da praga no centro de origem e novos eventos de introdução da praga devem ser fortemente contidos para evitar a entrada de novos alelos nas populações brasileiras, que podem aumentar o “fitness” das populações invasoras e, conseqüentemente, intensificar os danos da praga, aumentar o número de espécies ou clones hospedeiros e dificultar o seu controle.

Figura 3 Rede de haplótipos do gene COI para *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) amostrado no Brasil, Portugal e Austrália.



Em estudo de populações de *Thaumastocoris peregrinus* da Austrália, América do Sul e da África do Sul, foram constatados oito haplótipos para essa espécie, sendo que dois deles estão na África do Sul (Hd e Hg) e um na América do Sul (Ha) (NADEL et al., 2010). Portanto, houve três invasões distintas de *T. peregrinus* no mundo a partir da Austrália, país de origem dessa espécie-praga de eucalipto. Os autores alertam para possíveis novas invasões e consideram que as altas populações na região de Sydney, Austrália, resultaram em introduções separadas e desconectadas dessa praga nas plantações de eucalipto sul-africanas e sul-americanas. Há possibilidade de novas introduções e que maior diversidade genética surja nas populações de *T. peregrinus* na África do Sul e na América do Sul nos próximos anos. (NADEL et al., 2010). Em estudo de caso sobre invasão de *Leptocybe invasa* no mundo foi determinado o “barcode” do gene COI, revelando apenas um haplótipo no Brasil para essa espécie. Isso confirma uma única invasão também para *L. invasa* no Brasil, apesar de confirmada uma segunda linhagem invasora na China e uma ampla diversidade da praga na Austrália (DITTRICH-SCHRÖDER et al., 2018).

O grande fluxo de pessoas e mercadorias entre regiões cosmopolitas e produtoras de eucalipto, como Sydney, Melbourne e Brisbane (Austrália), São Paulo e Rio de Janeiro (Brasil), Durban e Cidade do Cabo, (África do Sul) por exemplo, pode aumentar as chances de novos eventos de invasão de pragas exóticas no

Brasil, seja pragas que já presentes ou pragas ausentes, aumentando problemas fitossanitários para as florestas plantadas no Brasil.

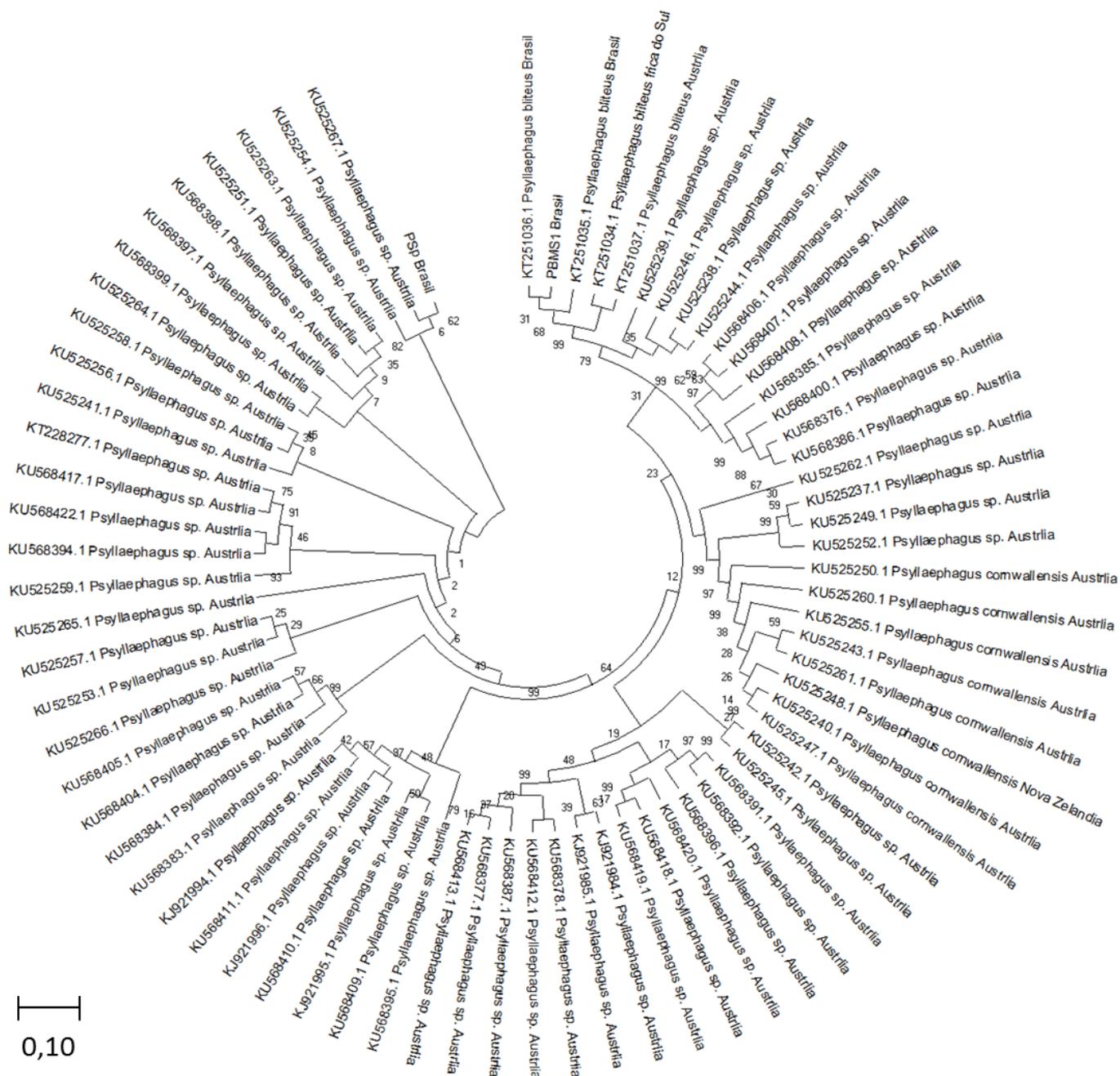
4.2 Análises do gene CytB para *Psyllaephagus* spp.

Foi verificada a presença de dois haplótipos com grande distância genética nos espécimes de *Psyllaephagus* spp. coletados no Brasil. O primeiro haplótipo foi identificado como *Psyllaephagus bliteus* e o segundo ainda não identificado taxonomicamente, mas com identidade de 100% com um voucher de *Psyllaephagus* sp. da Austrália. A árvore filogenética sugere a presença de aproximadamente 10 espécies do gênero *Psyllaephagus* não descritas taxonomicamente, mas com sequências depositadas no NCBI.

Todas as amostras do Brasil de *Psyllaephagus bliteus* (PBMS1) compartilham o mesmo haplótipo, obtendo identidade de 100% com amostras de *P. bliteus* da África do Sul e Austrália (Figura 4). Isso pode significar que, como o psilídeo-de-concha, ocorreu apenas uma introdução nesses países para o parasitoide, possivelmente pelas mesmas rotas de invasão do psilídeo. No caso da África do Sul, a ocorrência do mesmo haplótipo do Brasil era esperada, pois a introdução desse parasitoide naquele país foi realizada de espécimes importados do Brasil, mais precisamente de Botucatu, SP (WILCKEN, comunicação pessoal).

Para a segunda espécie de *Psyllaephagus* (PSp Brasil) uma hipótese é que seria a espécie *Psyllaephagus pilosus*, que é parasitoide de *Ctenarytaina eucalypti*, o psilídeo dos ponteiros do eucalipto. No entanto, essa espécie não possui um marcador molecular associado e a ausência de um voucher no Brasil impossibilita até a identificação precisa em nível de espécie.

Figura 4 - Árvore filogenética de *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) com amostras da África do Sul, Austrália, Brasil e Nova Zelândia



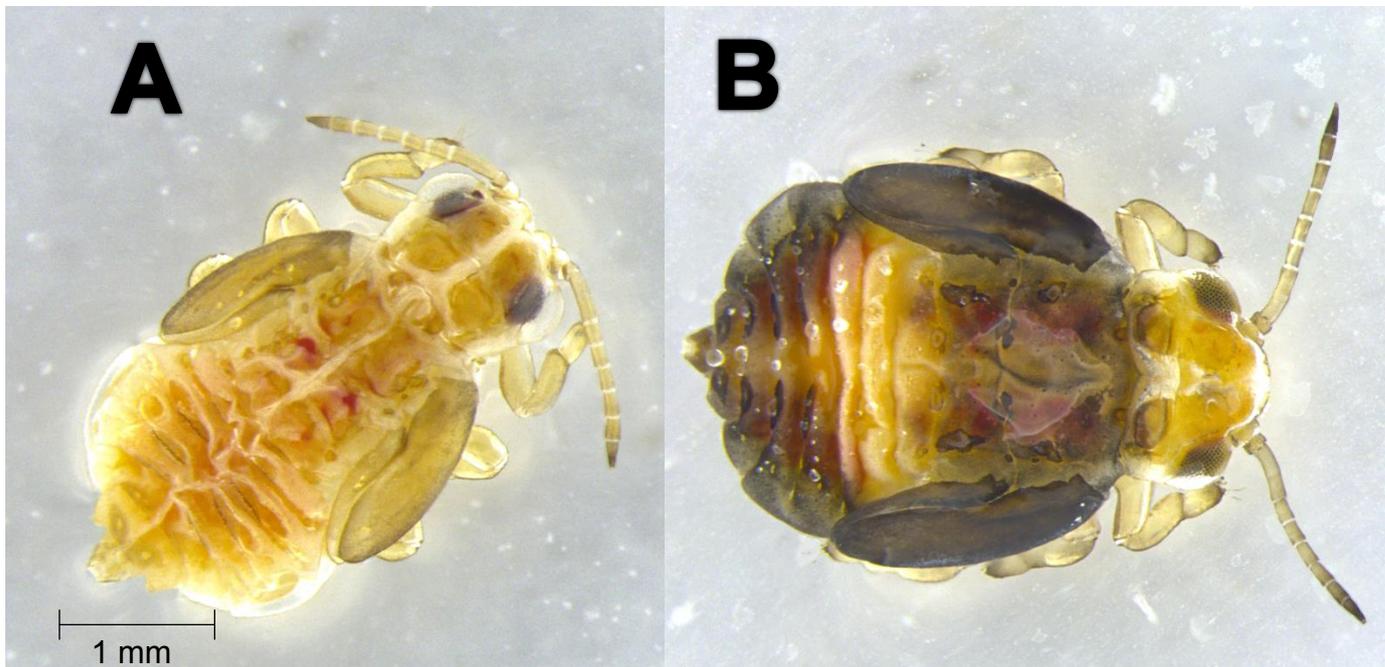
4.3 Variação fenotípica em ninfas de *G. brimblecombei*

Todas as ninfas de *G. brimblecombei* advindas do Maranhão (região Nordeste do Brasil) possuíam a coloração amarela (Figura 5 – A). Já as ninfas advindas do Paraná (região Sul do Brasil) possuíam a coloração mais escura, principalmente nas

tecas alares e abdome (Figura 5 - B). Cibrian-Tovar et al., s.d. verificaram que ninfas no último instar possuíam a coloração alaranjada ao verde e o abdome e as tecas alares apresentam coloração escura. Tanto a coloração mais clara do Maranhão quanto a mais escura do Paraná difere da descrição da literatura. Mesmo não apresentando diversidade haplotípica entre as populações, essa espécie apresenta diferença na coloração. Essa diferença na coloração pode ser devido à plasticidade fenotípica da espécie quando expostas a diferenças condições climáticas.

As temperaturas favoráveis ao desenvolvimento de *G. brimblecombei* são 22°C e 26°C, já as temperaturas de 18°C e 30°C são limitantes ao desenvolvimento do psilídeo-de-concha (WILCKEN et al, 2015). Em Grajaú, Maranhão, a temperatura média no mês mais quente, outubro, é de 27,6°C e em Telêmaco Borba, Paraná, a temperatura média do mês mais frio, julho, é de 14°C (INMET, 2018). No entanto, mais estudos devem ser realizados para conclusões definitivas do padrão de cor das ninfas e possíveis interações ecológicas com hospedeiros e parasitoides.

Figura 5 - Ninfas de 5º instar *Glycaspis brimblecombei* advindas do Maranhão A e do Paraná B



5 CONCLUSÕES

No Brasil ocorre apenas um haplótipo de *Glycaspis brimblecombei* e apenas uma ou poucas invasões.

Brasil e Portugal possuem o mesmo haplótipo de *G. brimblecombei* e a rota de invasão dessa espécie nesses países está interligada.

Dois haplótipos distintos de parasitoide do gênero *Psyllaephagus* foram encontrados no Brasil.

Foi constatada a presença de fenótipos regionais distintos de *G. brimblecombei* no Brasil, contudo sem conexão com linhagens mitocondriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, E. N. **Manual do plantador de eucaliptos**. São Paulo: Typographia Brazil de Rothschild, 343 p. 1911.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REED, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**. **18**: 489–522, 1987.

AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press. ISBN 0-674-66638-0, 2000.

BLACK, W. C.; DUTEAU, N. M. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: CRAMPTON, J.M.; BEARD, C.B.; LOUIS, C. **The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual**. London: Chapman & Hall, p. 361-373, 1997.

BRENNAN, E. B.; HRUSA, G. F.; WEINBAUM, S. A.; LEVISON, W. 2001. Resistance of *Eucalyptus* species to *Glycaspis brimblecombei* (Homoptera: Psyllidae) in the San Francisco Bay Area. **Pan-Pacific Entomologist** **77**: 249-253, 2001.

BROCKERHOFF, E. G.; LIEBHOLD, A. M.; JACTEL, H. The ecology of forest insect invasions and advances in their management. **Can J For Res** **36**: 263–268, 2006.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZHON, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais – Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 46-50, 2003.

CABI. **Invasive Species Compendium report - *Glycaspis brimblecombei* (red gum lerp psyllid)**. 2018. Disponível em: < <https://gd.eppo.int/taxon/GLYSBR> > Acesso em: 28 nov.2018.

CIBRIAN-TOVAR, D.; PADILLA, V.J.A.; ROA, J.A.; PÉREZ, I.L.; MACÍAS, B.D.J.; GRAN ADOS, A.M.C.; MARTÍNEZ, W.S. Introducción y antecedentes sobre *Glycaspis brimblecombei* y de su parasitoide *Psyllaephagus bliteus*. **Manual Técnico Operativo-Tema I**, s.d. 85p.

CHUNGU, D.; SHAKACITE, O.; CHAMA, H.; CHUNGU, B. C.; MBINDO, K.; MULONGWE, L. First record of the red gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psyllidae), in Zambia. **Afr. J. Ecol.**, **55**: 380-382, 2017.

COSTA, E. C.; D'AVILA, M.; CANTARELLI, E. B. **Entomologia Florestal**. 3 ed. Santa Maria, Ed. UFSM, 256 p., 2014.

DIODATO, L.; VENTURINI, M. Presencia del “psílido del escudo” (*Glycaspis brimblecombei*, Hemiptera, Psyllidae), plaga del *Eucalyptus*, en Santiago del Estero, Argentina. **Quebracho** v.14: p.84–89, 2007.

DITTRICH - SCHRÖDER .; G. DITTRICH SCHRÖDER, T. B.; HOAREAU, B. P. HURLEY, M. J.; WINGFIELD, S.; LAWSON, H.F.; NAHRUNG, B.; SLIPPERS. Population genetic analyses of complex global insect invasions in managed landscapes: a *Leptocybe invasa* (Hymenoptera) case study. **Biological Invasions**. 20(9): 2395-2420, 2018.

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

DURAN, C.; APPLEBY, N. EDWARDS, D.; BATLEY. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualization. **Current Bioinformatics**, v. 4, p. 16-27, 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **GLOBAL FOREST RESOURCES ASSESSMENT, 2015.**

FELSENSTEIN, J.. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783-791, 1985.

FERREIRA-FILHO, P. J.; WILCKEN, C. F.; GUERREIRO, J. C.; LIMA, A. C. V.; PRADO, E. P.; CARMO, J. B.; ZANUNCIO, J. C. Influences of temperature and rainfall on the population dynamics of *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) in *Eucalyptus* plantations. **Florida Entomologist** v. 98, 298 n. 1, p. 000-00, 2015.

FERREIRA FILHO, P.J.; WILCKEN, C.F.; OLIVEIRA, N.C.; DAL-POGETTO, M.H.F.A.; LIMA, A.C.V. Dinâmica populacional do psílideo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Psyllidae) e de seu parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) em floresta de *Eucalyptus camaldulensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2109-2114, nov, 2008.

FIRMINO-WINCKLER, D.C.; WILCKEN, C.F.; OLIVEIRA, N.C.; MATOS, C.A.O. Biologia do psílideo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera, Psyllidae) em *Eucalyptus* spp. **Rev. Bras. entomol.** vol.53, pp.144-146, 2009.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. FEALQ, Piracicaba, p.920, 2002.

GARRISON, R. W. New agricultural pest for Southern Califórnia: redgum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei*. **Los Angeles Country Agricultural Commissioner's Office**. p.4, 1998.

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

GOTO, S. G.; KIMURA, M.T. (2001). Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. **Molec. Phylog. Evol.** 18(3): 404--422.

HANKS, L. M.; PAINE, T. D.; MILLAR, J. G.; HOM, J. L. Variation among *Eucalyptus* species in resistance to *Eucalyptus* longhorned borer in southern California. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 74: 185-194, 1995.

HARRY, M.; SOLIGNAC, M.; LACHAISE, D. Molecular evidence for parallel evolution of adaptative syndromes in fig-breeding *Lissocephala* (Drosophilidae): Mol. Phylogen. Evol. 9, 542-55, 1998.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T.. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution** 22:160-174, 1985.

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.

HODKINSON, I. D. The psyllids (Homoptera: Psylloidea) of the Austro-Oriental, Pacific and Hawaiian zoogeographical realms: an annotated check list. **Journal of Natural History**, 17(3):341-377, 1983.

IBÁ – Industria Brasileira de Árvores. **Dados Estatísticos, 2017**. Disponível em: <http://iba.org/pt/dados-e-estatisticas> >. Acesso em 04 jun. de 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades, 2016**. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=172085>> Acesso em: 04 jun. 2017.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: **Agrometeorologia**. <http://agrometeorologia.seagro.to.gov.br/rede-de-monitoramento/inmet/>. Acesso em: 23 fev. 2019.

JERMIN, L. S.; CROZIER, R. H. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. **Journal of Molecular Evolution**, 38: 282–294, 1994.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 35:1547-1549, 2018.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods Ecol Evol**, 6(9):1110–1116, 2015.

LIEBHOLD, A. M.; BROCKERHOFF, E. G.; GARRETT, L. J.; PARKE, J. L.; BRITTON, K. O. Live plant imports: the major pathways for forest insect and pathogen invasions of the US. **Front Ecol Environ**, 10:135–143, 2012.

LOMBAERT, E.; GUILLEMAND, T.; THIAMS, C. E.; LAWSON,; HANDLEY LJ, LI J, WANG S.; PANG, H.; GORYACHEVA, I.; ZAKHAROV, I.A.; JOUSSELIN, E.; POLAND, R.L.; MIGEON, A.; VAN LENTEREN, J.; DE CLERCQ, P.; BERKVEN, S.

N.; JONES, W.; ESTOUP, A. Inferring the origin of populations introduced from a genetically structures native range by approximate Bayesian computation: a case study of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. **Molecular Ecology**, 20:4654–4670, 2011.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1963.

MARTINELLI, S. et al. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 97, p. 225-231, 2007.

MOORE, K. M. A revision of the genus *Glycaspis* (Homoptera: Psyllidae) with descriptions of seventy-three new species. **Australian Zoologist**, 15(3): 248-342, 1970.

MOORE, K. M. New species and records of *Glycaspis* Taylor (Homoptera: Spondyliaspidae) with phyletic groupings. **Journal of the Australian Entomological Society**, 22(3):177-184, 1983.

NADEL, R. L.; SLIPPERS, B. ; SCHOLE, M. C.; LAWSON, S. A.; NOACK, A. E.; WILCKEN, C. F. ; BOUVET, J. P.; WINGFIELD, M. J. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. **Biological Invasions**, V.12 (5), p.1067-1077, 2010.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. txid121847. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=121847> Acesso em: 21 set. 2018.

RAMIREZ, A. L. G. **Fluctuacion poblacional del psílido del eucalipto *Glycaspis brimblecombei* y el efecto del control biológico con la avispa parasitóide *Psyllaephagus bliteus*** [dissertação]. Cuatitlan Izcalli: Ingeniera Agrícola Facultad de Estudios Superiores Cuatitlan; 2003.

SÁNCHEZ, B. S. **Aspectos bionómicos del psílido del eucalipto *Glycaspis brimblecombei* Moore (Homoptera: Psylloidea: Spondyliaspidae)**. 2003. 76 f. Tesis de Maestria Universidade Autónoma Chapingo. División de Ciências Forestales. Chapingo, Texcoco, Edo. de México, 2003.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **Afr. J. Biotechnol.**, v.5, n.25, p.2540-2568, 2006.

SHARMA, A.; RAMAN, A. Feeding biology and nutritional physiology of Psylloidea (Insecta: Hemiptera): implications in host–plant relations. **Current Science**. 2017.

SIMON, C.; F. FRATI.; A. BECKENBACH.; B. CRESPI. H.; LIU.; P. FLOOK. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. **Entomol. Soc. Am.** 87: p.651-701, 1994.

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** 5:e3864, 2017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3864>

TURNBULL, J. W. Eucalypt plantations. **New Forest** 17:37–52, 1999.

VALENTE C.; HODKINSON. I. First record of the redgum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hem.: Psyllidae), in Europe. *Journal of Applied Entomology* 133(4), 315-317, 2009.

VARSHNEY, R.K.; BEIER, U.; KHLESTKINA, K. E.; KOTA, R.; KORZUN, V.; GRANER, A.; BORNER, A. Single nucleotide polymorphisms in rye (*Secale cereale* L.): discovery, frequency, and applications for genome mapping and diversity studies. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.114. p.1105-1116, 2007.

WILCKEN, C. F.; FIRMINO-WINCKLER, D. C.; DAL POGETTO, M. H. F. A.; DIAS, T. K. R.; LIMA, A. C. V.; SÁ, L. A. N.; FERREIRA FILHO, P. J. Psilídeo-de-concha-do eucalipto, *Glycaspis brimblecombei* Moore, pp. 866–880 *In* VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A. [eds.], **Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros**. Fealq, Piracicaba, Brasil, 2015.

WILCKEN, C. F.; SOLIMAN, E. P.; DE SÁ NOGUEIRA, L. A.; BARBOSA, L. R.; DIAS, T. K. R.; FERREIRA FILHO, P. J. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v.50, p.84-188, 2010.

WILCKEN, C. F.; COUTO, E. B.; ORLATO, C.; FERREIRA FILHO, P. J.; FIRMINO, D. C. **Ocorrência do psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) (Hemiptera: Psyllidae) em florestas de eucalipto no Brasil**. Piracicaba: IPEF, p. 01-11 (Série Técnica IPEF; n. 201), 2003.

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

WINGFIELD, M.J.; SLIPPERS, B.; HURLEY, B.P.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; ROUX, J. Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. **Southern Forest** 70:139–144, 2008.

YIRGU, A.; ANJULO, A. First record of *Glycaspis brimblecombei* Moore (hem.: Psyllidae) on *Eucalyptus camaldulensis* in Ethiopia. **Phytoparasitica** 47: 67-70, 2019.