UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

MURILO FONSECA RIBEIRO

PARASITISMO DE POPULAÇÕES DE *Anaphes nitens* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE) EM *Gonipterus platensis* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E ENDOSSIMBIONTES ASSOCIADOS

Botucatu

2019

MURILO FONSECA RIBEIRO

PARASITISMO DE POPULAÇÕES DE *Anaphes nitens* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE) EM *Gonipterus platensis* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E ENDOSSIMBIONTES ASSOCIADOS

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO – DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP – FCA – LAGEADO – BOTUCATU (SP)

Ribeiro, Murilo Fonseca, 1991-
R484p Parasitismo de populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) em *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) e endossimbiontes associados / Murilo Fonseca Ribeiro. – Botucatu: [s.n.], 2019
74 p.: fots., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2019
Orientador: Carlos Frederico Wilcken
Inclui bibliografia

1. Eucalipto – Doenças e pragas. 2. Parasitismo. 3. Pragas – Controle biológico. I. Wilcken, Carlos Frederico. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas – CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PARASITISMO DE POPULAÇÕES DE *Anaphes nitens* (HYMENOPTERA: MYMARIDAE) em *Gonipterus platensis* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) E ENDOSSIMBIONTES ASSOCIADOS

AUTOR: MURILO FONSECA RIBEIRO
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 Agronômicas

Prof.ª Dr.ª NÁDIA CRISTINA DE OLIVEIRA
Agronomia / Centro Universitário Integrado

Prof. Dr. LEONARDO RODRIGUES BARBOSA
Laboratório de Entomologia / EMBRAPA - FLORESTAS

Botucatu, 25 de janeiro de 2019

À minha avó, Iracema Ribeiro da Fonseca (*in memoriam)*

Por acreditar, incentivar e valorizar o poder da educação

Do seu neto favorito, e eternamente com saudades

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos transmitidos, pela condução durante o trajeto e pelo prazer em propagar conhecimento.

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

À Profa. Dra. Renate Krause Sakate, Msc. Vinicius Bello e Dr. Bruno De Marchi, pelo apoio e contribuições na realização do segundo capítulo.

Aos professores Edson Luiz Furtado e Edson Luiz Lopes Baldin, pelas contribuições ao trabalho no momento do exame de qualificação.

Á Profa. Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken, por permitir a utilização do Laboratório de Biologia Molecular, e por gostar de festas juninas, quadrilhas e forrós tanto quanto eu.

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

Ao Grupo de Trabalho sobre *Gonipterus,* com o qual muito aprendi sobre o manejo do inseto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de mestrado.

Aos membros do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF), Ana, Lorena, Jordan, Rafaela, Vanessa, Fernanda, Carolina Jorge, Heitor, Leonardo, Bárbara, Luciane, Thaís, Maurício, Fábio, Simone, Caroline Dias, Cendy, Diego, Sidnei, Flávia, Thamires, Renato e Vinicius, pelo convívio diário, amizade, companheirismo e apoio. Com vocês a vida fica mais leve.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Proteção Vegetal pelos ensinamentos e pela companhia.

À Juliane, pelas conversas descontraídas e por sempre me receber com um sorriso no rosto.

À Ana, pelas aventuras acadêmicas, atléticas, culturais e gastronômicas.

À Vanessa, pela amizade, pela alegria contagiante e pelos ensinamentos.

À minha família, em especial à minha mãe, meu pai e minhas irmãs. Vocês são parte de mim, me inspiram e me impulsionam. Amo vocês.

Ao Rafa, por me apoiar todo dia, por estar presente mesmo distante, pelo incentivo, pelo amor retribuído e pelo desejo de uma vida juntos. Te amo!

"Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los"

Isaac Asimov

RESUMO

O setor florestal brasileiro é um dos mais desenvolvidos e competitivos do mundo, sendo líder mundial em produtividade de eucalipto. A presença de grandes maciços florestais favorece a ocorrência de pragas. O gorgulho-do-eucalipto, *Gonipterus platensis* Marelli (Coleoptera: Curculionidae), é a principal espécie de besouro desfolhador do eucalipto no mundo. As injúrias na planta hospedeira são causadas por adultos e larvas, sendo a última responsável pelas desfolhas mais severas. Os danos podem chegar à redução de 42,8% no incremento médio anual da árvore. O controle biológico por meio do parasitoide de ovos *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) é a principal estratégia de controle de *Gonipterus* spp., responsável pelo controle populacional da praga desde as primeiras detecções no Brasil na década de 1950. Todavia, surtos de *G. platensis* têm sido observados em regiões onde ácaros do gênero *Pyemotes* foram detectados se alimentando de ovos de *G. platensis* e onde o parasitismo e o estabelecimento do parasitoide caíram. Este trabalho teve como objetivo estudar possíveis fatores bióticos associados ao parasitoide *A. nitens*, avaliando a capacidade de parasitismo em diferentes populações do parasitoide e realizando prospecção de bactérias simbiontes que possam de alguma maneira interferir no fitness do hospedeiro. Para o parasitismo entre 2 populações de *A. nitens*, provenientes dos Estados de São Paulo, e Espírito Santo, ambas exibiram resultados de parasitismo, porcentagem de emergência e razão sexual que não diferiram significativamente. Para a prospecção de endossimbiontes secundários em diferentes populações de *A. nitens,* adultos e ovos de *G. platensis* e ácaros do gênero *Pyemotes*, foram realizadas análises moleculares por meio de PCR para a presença de 9 gêneros bacterianos diferentes com a utilização de primers específicos. A bactéria endossimbionte *Rickettsia belli* e as espécies de bactérias de intestino *Yersinia massiliensis, Serratia grimesii* e *Erwinia amylovora* foram encontradas em todas as populações naturais de *A. nitens* e nas gerações F1 e F2 de laboratório. A espécie *Serratia grimesii* também foi encontrada em adultos e ovos de *G. platensis* e em fêmeas de *Pyemotes* sp. Todas essas detecções representam primeiros relatos para os hospedeiros.

Palavras-chave: Controle biológico; Parasitismo; Entomologia molecular;

ABSTRACT

The Brazilian forestry sector is one of the most developed and competitive in the world, being the world leader in eucalyptus productivity. The presence of large forest masses favors the occurrence of pests. The *Eucalyptus*-snout-beetle, *Gonipterus platensis* Marelli (Coleoptera: Curculionidae), is the main species of eucalyptus defoliator beetle in the world. Injuries to the host plant are caused by adults and larvae, the latter being responsible for the most severe defoliation. The damages can reach the reduction of 42.8% in the average annual increment of the tree. Biological control through the parasitoid *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) is the main control strategy of *Gonipterus* spp., responsible for population control of the pest since the first detections in Brazil in the 1950s. However, outbreaks of *G. platensis* have been observed in regions where *Pyemotes* mites were detected feeding on *G. platensis*'s eggs and where parasitism and parasitoid establishment occurred. The objective of this work was to study possible biotic factors associated with the *A. nitens* parasitoid, evaluating the parasitism capacity in different populations of the parasitoid and conducting prospection of symbiotic bacteria that may interfere in the host 's fitness. For the parasitism between two populations of *A. nitens*, from the States of São Paulo and Espírito Santo, both showed results of parasitism, emergency percentage and sexual ratio that did not differ significantly. For the prospection of secondary endosymbionts in different populations of *A. nitens*, adults and *G. platensis*'s eggs and mites of the genus *Pyemotes*, molecular analyzes were performed by means of PCR for the presence of 9 different bacterial genera with the use of specific primers. The bacteria endosymbiont *Rickettsia belli* and the intestinal bacteria species *Yersinia massiliensis*, *Serratia grimesii* and *Erwinia amylovora* were found in all natural populations of *A. nitens* and in the F1 and F2 generations of the laboratory. The *Serratia grimesii* species was also found in adults and eggs of *G. platensis* and in females of *Pyemotes* sp. All these detections represent first reports to the hosts.

Keywords: Biological control; Parasitism; Molecular entomology;

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 17
Revisão de Literatura 18
Complexo *Gonipterus scutellatus* no Brasil 18
Danos e injúrias de *Gonipterus* spp. 20
Controle Biológico de *Gonipterus* spp. no mundo 21
Anaphes nitens Girault (Hymenoptera: Mymaridae) 23
Ácaros em escatotecas de *Gonipterus platensis* 25
Bactérias simbiontes 26
Bactérias de intestino 26
Endossimbiontes celulares 27
Capítulo 1 - Parasitismo entre duas populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) 29
Resumo 29
Abstract 29
1.1 Introdução 30
1.2 Material e Métodos 32
Criação de *Gonipterus platensis* 32
Criação de *Anaphes nitens* 32
Comparação de Parasitismo 33
Análise Estatística 34
1.3 Resultados 35
1.4 Discussão 35
Referências Bibliográficas 37
Capítulo 2– Bactérias simbiontes em *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) e *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae) 40
Resumo 40
Abstract 41
2.1 Introdução 42
2.2 Material e Métodos 44
Criação de *Gonipterus platensis* 44
Criação de *Anaphes nitens* 44
Coleta, Amostragem e Extração de DNA 45
Detecção Molecular de Endossimbiontes 47
Análise Filogenética 48
Identificação no hospedeiro 48

2.3 Resultados 51
Detecção Molecular de Endossimbiontes 51
Análise Filogenética 55
Identificação no hospedeiro 58
2.4 Discussão 59
Referências Bibliográficas 62
CONSIDERAÇÕES FINAIS 67
REFERÊNCIAS 69

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui uma área de 7,84 milhões de hectares de florestas plantadas, dos quais, 5,7 milhões de ha (72,7%) foram destinados aos plantios de eucalipto (IBÁ, 2017). O setor florestal brasileiro é considerado atualmente um dos mais desenvolvidos e competitivos do mundo, mantendo a liderança no ranking global de produtividade de eucalipto, com valor médio de 35,7 m³/ha.ano em 2016 (IBÁ, 2017). Contudo, a presença de extensos maciços florestais homogêneos, a falta de materiais genéticos resistentes e a ausência de inimigos naturais, favorecem a ocorrência e a manutenção de altas populações de insetos-praga, o que resulta em seu aumento populacional, causando danos às plantas hospedeiras (HURLEY et al., 2016; COSTA et al., 2014).

O aumento nas introduções de pragas exóticas para a cultura do eucalipto foi observado entre os anos de 1986 e 2014 em escala mundial. Neste período, uma nova espécie de praga exótica foi detectada para cada 1,4 ano fora de seu ambiente nativo (HURLEY et al., 2016). No Brasil, há relatos de introduções de *Phoracantha semipunctata* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae) e *Gonipterus pulverulentus* (Lea) (Coleoptera: Curculionidae) na década de 1950 e *Gonipterus platensis* (Marelli) em 1979 (BARBIELLINI, 1955; BIEZANKO; BOSQ, 1956; FREITAS, 1979). O país ficou sem novos relatos de introduções de insetos-praga de eucalipto, até a primeira década do século XXI, quando foram registradas as espécies: *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), em 2003, e *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) e *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) em 2008 (WILCKEN et al., 2003; COSTA et al., 2008; WILCKEN et al., 2010)

O gorgulho-do-eucalipto, *Gonipterus "scutellatus"* (Coleoptera: Curculionidae), visto atualmente como um complexo de espécies, é tido como a principal espécie de besouro desfolhador de eucalipto no mundo (WILCKEN; OLIVEIRA, 2015).

As injúrias na planta são causadas pela alimentação de adultos e larvas, sendo essas responsáveis pelas desfolhas mais severas. Tais desfolhas podem levar ao superbrotamento do ponteiro, deixando-o com aspecto envassourado, podendo ocorrer bifurcação e entortamento do fuste e, em casos mais severos, a morte da árvore (TOOKE, 1955; EPPO, 2005; FAO, 2007; SOUZA et al., 2016).

O principal agente de controle para o gorgulho-do-eucalipto é o parasitoide de ovos nativo da Austrália *Anaphes nitens* (Girault) (Hymenoptera: Mymaridae), responsável pelo grande sucesso no controle da praga na África do Sul na década de 1920 e que levou à sua importação subsequente para demais países que sofriam com o ataque de *Gonipterus* spp. (TRIBE, 2005).

Contudo, nas demais regiões em que foi introduzido o parasitoide não se provou tão efetivo quanto no caso sul-africano e surtos populacionais da praga ainda ocorrem nas regiões produtoras de eucalipto. Para evitar os grandes prejuízos econômicos que *Gonipterus* spp. pode causar, pesquisas têm sido realizadas procurando identificar novos inimigos naturais que possam atuar em conjunto com *A. nitens* (GUMOVSKY et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2017; VALENTE et al., 2017).

Ambas as espécies de *Gonipterus* presentes no Brasil foram devidamente controladas pelo parasitoide até o final de 2012, quando ressurgiu como praga na região sul do Estado de São Paulo e vem se disseminando pela região central e pelo Paraná (SOUZA et al., 2016). Tal ressurgência veio acompanhada de queda na eficiência de parasitismo por *A. nitens* e as causas desse fenômeno ainda não foram esclarecidas.

A eficiência de um parasitoide pode sofrer influência de fatores abióticos e bióticos, como a ocorrência de ácaros parasitas do gênero *Pyemotes*, que se alimentam de ovos de *G. platensis* parasitados ou não por *A. nitens* (RIBEIRO et al., 2016). Dentre os demais fatores bióticos a ocorrência de patógenos e bactérias simbiontes afeta diretamente a sobrevivência, “fitness” e a capacidade de parasitismo do hospedeiro (FLEURY et al., 2000; FURIHATA et al., 2015).

Este trabalho teve como objetivo estudar possíveis fatores bióticos associados ao parasitoide *A. nitens*, avaliando a capacidade de parasitismo em diferentes populações do parasitoide e realizando prospecção de bactérias simbiontes que possam de alguma maneira interferir no fitness do hospedeiro

Revisão de Literatura

Complexo *Gonipterus scutellatus* no Brasil

O complexo *Gonipterus “scutellatus”* compreende ao menos 8 espécies de coleópteros curculionídeos de rostro curto nativos da Austrália, altamente

semelhantes entre si e distinguíveis a partir da genitália masculina (MAPONDERA et al., 2012). Apenas metade das espécies presentes neste complexo foram devidamente descritas, sendo elas *G. scutellatus* (Gyllenhal) G. *platensis* (Marelli)*, G. pulverulentus* (Lea) e *G. balteatus* (Pascoe)*,* enquanto as demais ainda carecem de descrições taxonômicas e são nomeadas por números, como *Gonipterus* sp. n.1 (MAPONDERA et al., 2012).

No Brasil, são encontradas atualmente 2 espécies de *Gonipterus*, conhecidas popularmente como gorgulho-do-eucalipto (SOUZA et al., 2016). Desde as primeiras detecções até 2012, acreditava-se que estas espécies eram *G. scutellatus* e *G. gibberus* (Boisduval), momento em que pesquisadores australianos elucidaram o complexo *scutellatus* e redefiniram a nomenclatura e dispersão dessas espécies crípticas ao redor do mundo, utilizando análises moleculares e comparações de genitália. Para o Brasil, mostraram que, na realidade, estão presentes *G. platensis* e *G. pulverulentus*, respectivamente (MAPONDERA et al., 2012).

Os primeiros relatos para *G. pulverulentus* (ex *G. gibberus*) ocorreram na década de 1950 no Estado do Rio Grande do Sul e constituem o primeiro registro formal de uma praga florestal exótica para o país (BARBIELLINI, 1955; IEDE, 2005; SCHUHLI et al., 2016), atualmente o inseto encontra-se distribuído nos Estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (WILCKEN; OLIVEIRA, 2015).

Embora seja a principal causadora de surtos no país e com maior área de ocorrência (SOUZA et al., 2016), a espécie *G. platensis* foi registrada pela primeira vez em 1979 na região de Curitiba (como *G. scutellatus)* (FREITAS, 1979) e hoje encontra-se distribuída pelos Estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Espírito Santo (WILCKEN; OLIVEIRA, 2015).

Machos adultos de *G. pulverulentus* medem entre 7,0 e 9,2 mm e as fêmeas entre 8,0 e 9,2 mm, possuem tegumento castanho-claro, corpo densamente revestido por escamas curtas e estreitas e nos élitros há uma faixa oblíquo-transversal de escamas mais alongadas e esbranquiçadas (ROSADO-NETO; MARQUES, 1996). Em *G. platensis* o comprimento dos machos adultos varia entre 5,7 e 8,9 mm e das fêmeas entre 7,5 e 9,4 mm, possuem tegumento castanho-escuro, revestimento escamoso mais notável ventralmente e escamas enegrecidas dorso-lateralmente (ROSADO-NETO; MARQUES, 1996).

As larvas desses insetos são ápodas, possuem 4 ínstares, com cabeça retrátil e corpo amarelo-creme com pequenas manchas pretas, sendo que *G. platensis* é

distinguível pela presença de três faixas longitudinais verde-escuras, ausentes em *G. pulverulentus* (ROSADO-NETO; MARQUES, 1996).

Ao atingir a fase de pré-pupa, as larvas param de se alimentar, lançam-se ao solo e penetram no mesmo, construindo uma pequena câmara pupal ovalada com grãos de solo e cimentadas com uma substância líquida excretada pela parte apical do abdome (TOOKE, 1955; FREITAS, 1979). No interior da câmara pupal ocorrem as fases de pré-pupa e pupa, com a emergência de novos adultos em cerca de 31 dias a 26ºC (OLIVEIRA, 2006).

Danos e injúrias de *Gonipterus* spp.

Gonipterus spp. são insetos desfolhadores e tanto os adultos quanto as larvas causam injúrias na copa de árvores de eucalipto. Os adultos se alimentam tanto de folhas jovens quanto de idade intermediária a partir da borda do limbo, causando aspecto serreado. Em altas populações podem se alimentar de brotações, causando a constrição da copa e mesmo a morte de ponteiros (TOOKE, 1955). Contudo, é a fase larval a grande causadora de danos aos plantios.

As fêmeas de *Gonipterus* ovipositam seus ovos na forma de escatotecas em folhas jovens das árvores, de onde eclodem as larvas após 7 dias, em média, a 26ºC (OLIVEIRA, 2006).

As larvas de primeiro e segundo ínstar se alimentam raspando as folhas, sem causar a perfuração do limbo, cenário que leva a folha a escurecer, deixando-a com aspecto encarquilhado. Quando atingem o terceiro e quarto ínstar, com aparelho bucal mais fortalecido, tornam-se capazes de se alimentar de todo o limbo foliar (SANCHES, 1993; TOOKE, 1955).

As larvas são capazes de provocar a desfolha completa do terço superior da planta, podendo levar à seca do ponteiro, perda de dominância apical e crescimento de brotações laterais, caracterizando o envassouramento. Quando o ataque ocorre em árvores jovens, pode acarretar em perda acentuada de produtividade e bifurcação do fuste, promovendo uma menor resistência da árvore a quebras durante o período de crescimento e problemas operacionais no procedimento de colheita (SANCHES, 1993; TOOKE, 1995).

No Brasil há relatos de ataques de *G. platensis* em *Eucalyptus dunnii, E. globulus, E. saligna, E. viminalis, E. grandis, E. urophylla, E. platyphylla* e nos

híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. grandis* x *E. dunnii* (FREITAS, 1979; WILCKEN et al., 2008; SOUZA et al., 2016), já *G. pulverulentus* foi relatado em *E. robusta, E. rostrata* e *E. viminalis* (LUBIANCA, 1955).

O primeiro grande surto para *G. platensis* ocorreu no Estado do Espírito Santo em 2003 quando a introdução da praga atingiu 50 mil hectares de florestas de eucalipto *E. grandis* x *E. urophylla* na região de Aracruz, sendo controlado com a introdução do parasitoide *A. nitens* (WILCKEN et al., 2008; SOUZA et al., 2016). Para o Estado de São Paulo, surtos vem se intensificando desde 2012, e ataques do inseto podem levar a redução de 12 a 16,1% no incremento médio anual (IMA) em clones híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, e de até 42,8% em híbrido de *E. grandis* x *E. dunnii,* sendo maior a redução em plantios mais jovens (SOUZA et al., 2016).

Controle Biológico de *Gonipterus* spp. no mundo

Atualmente, o controle biológico é a principal estratégia de combate ao gorgulho-do-eucalipto, sendo o parasitoide de ovos *Anaphes nitens* (Girault) (Hymenoptera: Mymaridae) seu representante mais relevante (JEGER et al., 2018).

O primeiro registro da utilização de *A. nitens* no controle de *Gonipterus* ocorreu com a importação do parasitoide da Austrália para a África do Sul em 1926, tornando-se um exemplo notório do sucesso na adoção de controle biológico clássico para o combate de uma praga exótica. Na época em que a introdução ocorreu, a praga já estava disseminada pelo mundo e, devido ao sucesso na África do Sul, foi introduzido em outros países africanos, Nova Zelândia e América do Sul (TRIBE, 2005).

Contudo, em vários países os resultados eram satisfatórios, porém não repetiam o caso de sucesso do primeiro relato e em algumas regiões onde surtos da praga ainda ocorriam (REIS et al., 2012). Parte da explicação para estes resultados contrastantes veio quando o complexo *Gonipterus "scutellatus"* foi melhor estudado (MAPONDERA, 2012).

Até essa ocasião, acreditava-se que *G. scutellatus* era uma única espécie e havia sido introduzida ao longo dos anos ao redor do mundo, em locais como: Nova Zelândia (1890), África (1916), América do Sul (1925), Europa (1975) e América do Norte (1994) e ilhas nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (MAPONDERA, 2012), razão pela qual a mesma estratégia de controle foi adotada em todos os países.

Entretanto, hoje sabe-se que essas introduções, na verdade, são representadas por espécies diferentes: *G. platensis*, *G. pulverulentus* e *Gonipterus* sp. n. 2, enquanto *G. scutellatus* nunca saiu de seu ambiente natural. Destas espécies invasoras, apenas a *Gonipterus* sp. n. 2, ocorrente na África do Sul, é de fato nativa da mesma região de origem evolutiva do parasitoide, Sudeste da Austrália continental, levando à hipótese de que a falha no controle em regiões que contenham outra espécie de *Gonipterus* seja em parte ocorrente por uma incompatibilidade do parasitoide e seu hospedeiro (MAPONDERA, 2012).

A identificação de um complexo de espécies crípticas, fez com que os países membros da União Europeia realizassem a recategorização da praga para o continente, além da atualização das espécies presentes em seu território. Assim, constatou-se que *G. platensis* está distribuído pela França, Portugal e Espanha e *G.* sp. n. 2, por sua vez, pode ser encontrado na Itália, sendo ambos considerados pragas quarentenárias para zonas protegidas de Portugal e Grécia. Outras espécies do complexo *G. scutellatus* foram consideradas quarentenárias para todo o território da União Europeia (JEGER et al., 2018).

Devido aos problemas no controle efetivo da praga por meio de *A. nitens,* novos agentes biológicos têm sido buscados em nível mundial. Em Portugal, iniciou-se a introdução do parasitoide de ovos de hábito gregário *Anaphes inexpectatus* (Huber & Prinsloo) (Hymenoptera: Mymaridae) (VALENTE et al., 2017).

O Chile, por sua vez, fez a introdução em 2009 de *Anaphes tasmaniae* (Huber & Prinsloo) (Hymenoptera: Mymaridae), um parasitoide de ovos solitário e que já foi considerado estabelecido em campo em 2013 (MAYORGA; JAQUES; PERAGALLO, 2013; SAG, 2014). Além da introdução do parasitoide de larvas *Entedon magnificus* (Girault & Dodd) (Hymenoptera: Eulophidae), a partir de 2015 (SAG, 2016; GUMOVSKY et al., 2015).

No Brasil, além do uso de *A. nitens*, outra opção de controle é a utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, relatado em epizootia pela primeira vez em 1992 (BERTI FILHO et al., 1992), e do qual existe produto comercial registrado junto ao Ministério da Agricultura (MAPA).

Em adição a esses agentes de controle, têm-se estudado a utilização de nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* para o controle sobre a fase de pupa do inseto, que ocorre no solo, com resultados promissores para *H. amazonensis* e *S. feltia e* (HORTA et al., 2017a; NICOLETTI et

al., 2018); isolados de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* e *B. thuringiensis* var. *israelenses* no controle de larvas (HORTA et al., 2017b); e do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), também atuando sobre a fase larval (NASCIMENTO et al., 2017).

Anaphes nitens Girault (Hymenoptera: Mymaridae)

Anaphes nitens é um parasitoide de ovos originário da Austrália, de coloração negra e que mede 0,9 mm de comprimento. As fêmeas possuem antenas clavadas e mais curtas, enquanto as dos machos são filiformes e mais longas (HUBER; PRINSLOO, 1990), permitindo a diferenciação sexual.

Somente um indivíduo adulto do parasitoide se desenvolve no interior de cada ovo hospedeiro parasitado. Entretanto, devido ao fato das escatotecas de *Gonipterus* spp. possuírem um número variável de ovos, *A. nitens* assume um comportamento “quase gregário”, uma vez que vários adultos poderão emergir juntos a partir de uma mesma massa de ovos (TOOKE, 1955; SANTOLAMAZZA-CARBONE; CORDERO-RIVERA, 2003a).

Como em muitos himenópteros, o sistema de reprodução de *A. nitens* segue o padrão haplodiplóide (partenogênese arrenótoca) em que ovos não fertilizados são haploides e produzem indivíduos machos, enquanto ovos fertilizados são diploides e produzem fêmeas (SANTOLAMAZZA-CARBONE; PESTAÑA-NIETO; CORDERO-RIVERA, 2007).

É considerado fracamente sinovigênico, ou seja, as fêmeas emergem com um determinado número de ovos maduros e prontos para serem ovipositados, porém, pode maturar outros ovos durante sua vida (SANTOLAMAZZA-CARBONE; CORDERO-RIVERA, 2003a).

A fêmea realiza a oviposição em escatotecas frescas de *Gonipterus* spp., considerando um período de vulnerabilidade de até 3 dias de idade. Ao encontrar a escatoteca do hospedeiro, ela realiza a inspeção da mesma por meio de tamborilar de antenas ou de inserções rápidas do ovipositor. Após o aceite do hospedeiro, a fêmea insere o ovipositor de modo a perfurar a crosta da escatoteca, realizando a oviposição, que pode durar de 20 segundos a mais de 1 minuto. Esse processo é repetido algumas vezes, visto que a fêmea realiza a oviposição de um ovo por vez (TOOKE, 1955; SANTOLAMAZZA-CARBONE; RODRÍGUEZ-ILLAMOLA;

CORDERO-RIVERA, 2004). Resultados de campo na Espanha mostraram que ela necessita de 1 dia para encontrar a escatoteca hospedeira e 2 a 3 dias para parasitá-la completamente (SANTOLAMAZZA-CARBONE; RODRIGUEZ-ILLAMOLA; CORDERO RIVERA, 2004).

A emergência de novos adultos leva entre 17 e 21 dias à 25ºC, os machos emergem primeiro, permitindo assim que a cópula possa ocorrer logo após a emergência das fêmeas (SANTOLAMAZA-CARBONE; CORDERO RIVERA, 2003b; SANTOLAMAZA-CARBONE; PESTAÑA-NIETO; CORDERO-RIVERA, 2006; VALENTE, et al., 2017).

Os primeiros relatos do parasitoide no Brasil ocorreram na década de 1950 (BARBIELINI, 1955; KOBER, 1955), porém não há registro de importação do mesmo no Brasil. Assim, acredita-se que *A. nitens* tenha chegado ao país por meio da Argentina, onde foi oficialmente introduzido em 1926 para o controle de *Gonipterus* (MARELLI, 1927).

Os ataques de *Gonipterus* spp. ocorriam de maneira esporádica na Região Sul e no sul do Estado de São Paulo, correspondente ao equilíbrio entre a praga e a presença do inimigo natural (WILCKEN; OLIVEIRA, 2015). Todavia, em 2003, foi diagnosticado um surto de *G. platensis* atacando mais de 50.000 ha de plantios de eucalipto no Estado do Espírito Santo, provavelmente introduzido de maneira acidental por meio de cargas de toras de eucalipto com casca, provenientes da Região Sul (WILCKEN et al., 2008a).

Tal dimensão de ataque, foi possível principalmente devido aos extensos plantios de *Eucalyptus* suscetíveis à praga e pela ausência do parasitoide na região. Dessa maneira, como estratégia de controle foram realizadas liberações inoculativas e pontuais de *A. nitens* trazidos da região sul do país, que, em conjunto com as aplicações de *B. bassiana*, controlaram o surto de maneira efetiva (WILCKEN et al., 2008b).

O cenário citado anteriormente de ataques esporádicos na região sul do Estado de São Paulo teve fim no ano de 2012, quando grandes surtos de *G. platensis* foram diagnosticados em plantios comerciais de híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* nos municípios de Itararé, Itaberá e Itapeva, que rapidamente espalharam-se para a região norte do Paraná e para o centro do Estado de São Paulo. Nessas zonas, a estratégia utilizada para controle no Espírito Santo não foi capaz de controlar a praga (SOUZA et al., 2016).

Um dos fatores responsáveis pelos surtos atuais é a menor eficiência do parasitoide *A. nitens* em controlar *G. platensis*. Condições semelhantes à brasileira já foram relatadas em outros países, e as razões para o baixo parasitismo encontradas em campo não são inteiramente entendidas, alguns autores atribuem tal ocorrência a: sazonalidade, densidade do hospedeiro, altitude, incompatibilidade parasitoide hospedeiro (CORDERO RIVERA; SANTOLAMAZZA-CARBONE; ANDRÉS,1999; TRIBE, 2005; LOCH, 2008; REIS et al., 2012; MAPONDERA et al., 2012). Porém os estudos têm sempre focado na relação do parasitoide com o meio e/ou hospedeiro e ignoram fatores intrínsecos a *A. nitens*, como influência de bactérias simbiontes ou presença de patógenos.

Ácaros em escatotecas de *Gonipterus platensis*

A ocorrência de ácaros nas escatotecas do hospedeiro é um dos fatores de interferência no equilíbrio das populações de *G. platensis* e *A. nitens* (RIBEIRO et al., 2016).

O primeiro relato da presença de ácaros no Brasil ocorreu em 2016 para os municípios de Itararé e Botucatu, SP, onde constatou-se que escatotecas contaminadas possuíam menos ovos de *G. platensis* (SOUZA, 2016). Avaliações taxonômicas mostraram que tal ácaro se trata de uma espécie nova pertencente ao gênero *Pyemotes*, ainda em fase de descrição taxonômica (WILCKEN, informação pessoal).

Ácaros da família Pyemotidae são, em sua grande maioria, parasitas de insetos e podem ser encontrados com frequência em armazéns e criações de insetos em laboratórios. Relatos de contaminação por *Pyemotes ventricosus* em criação massal de *A. nitens* ocorreram pela primeira vez na África do Sul na década de 1950, onde o parasita foi responsável por praticamente eliminar as colônias originais do parasitoide, vindas da Austrália (TOOKE, 1955).

Os indivíduos adultos de *Pyemotes* são ovais e alongados, esbranquiçados a amarelados e brilhantes, sendo este o único estágio de vida livre, uma vez que a prole se desenvolve no interior do idiossoma materno, permanecendo ali até completar seu desenvolvimento (MORAES; FLECHTMANN, 2008). A reprodução ocorre por partenogênese arrenótoca, fêmeas fecundadas procuram um inseto hospedeiro para se alimentarem, causando a sua morte. Durante a alimentação, o

idiossoma materno aumenta consideravelmente de tamanho, passando pelo processo de fisogastria (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

A utilização de tais ácaros em programas de controle biológico é descartada pois são responsáveis por causarem dermatites pruriginosas em humanos (CUNHA et al., 2006; MORAES; FLECHTMANN, 2008), que em alguns casos pode levar a febre, calafrios, vômitos ou dores de cabeça intensas (TOMCZYK-SOCHA et al., 2017).

A espécie encontrada em escatotecas de *G. platensis* se alimenta de ovos do hospedeiro, independentemente de estarem ou não parasitados por *A. nitens* e, no campo, esse hábito influencia diretamente na emergência de novos parasitoides. Para a região de Botucatu, foi constatado que escatotecas contaminadas reduziram o parasitismo efetivo (levando em consideração apenas os indivíduos de *A. nitens* que emergiram das escatotecas) para 1,78%, contra 49,02% da testemunha (RIBEIRO et al., 2018).

Bactérias simbiontes

A microbiota de um inseto é reconhecida por melhorar a nutrição de dietas originalmente pobres, digerir componentes recalcitrantes de alimentos, proteger de predadores, parasitas e patógenos, contribuir para relações interespecíficas, afetar a eficiência como vetores de doenças, influenciar a razão sexual e o “fitness” dos hospedeiros (ENGEL; MORAN, 2013).

Esta microbiota comumente está associada ao intestino dos insetos, porém também pode ser encontrada no interior das células, como endossimbiontes.

Bactérias de intestino

Os microorganismos no intestino de insetos são extracelulares, vivendo livremente no lúmen ou aderidas às paredes do intestino (ISHIKAWA, 2003) e podem incluir protistas, fungos, archaeas e bactérias. Protistas são mais comumente encontrados em cupins (HONGOH, 2010), fungos e archaeas são comuns em insetos que se alimentam de madeira e detritos, as bactérias, por sua vez, compreendem o maior grupo de simbiontes de intestino e geralmente são confinadas ao espaço endoperitrófico do mesêntero (ENGEL; MORAN, 2013).

Dentre os grupos de bactérias presentes no intestino podemos citar os filos *Gammaproteobactéria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacteriodetes, Firmicutes, Clostridia, Actinomycetes, Spirochetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Proteobacteria*, entre outros (COLMAN et al., 2012).

As maiores populações de bactérias simbiontes são encontradas em espécies de insetos detritívoras e aquelas consumidoras de madeira, que possuem intestinos mais compartimentalizados e expandidos para abriga-las (CAZEMIER et al., 1977). Enquanto que insetos sugadores possuem pouca diversidade de bactérias de intestino, tendo, em contrapartida, maior associação com simbiontes intracelulares (DOUGLAS, 1988; BAUMAN, 2005).

Na maioria dos insetos as fêmeas abandonam os ovos após a oviposição, limitando as oportunidades de transmissão de bactérias simbiontes de intestino. Exceção é encontrada em insetos sociais com comportamento de trofalaxia, que são capazes de transmitir bactérias intestinais entre indivíduos, promovendo a evolução de simbiontes especializados e dependentes dos hospedeiros (ENGEL; MORAN, 2013).

Bactérias transmitidas entre gerações de hospedeiros irão evoluir estruturas especializadas capazes de promover a persistência no nicho de intestino do hospedeiro (WIER et al., 2010). Alguns hymenópteros, enquanto larvas, não possuem conexão entre o mesêntero e o proctodeu e não são capazes de eliminar excrementos até que atinjam a fase adulta (GALLO et al., 2002), o que provém uma estabilização da cultura bacteriana em seu trato digestivo.

Por sua vez, bactérias intestinais que desempenham funções benéficas para o hospedeiro podem ser transmitidas da mãe para a progênie de maneira extracelular. Percevejos da família Plataspidae depositam “cápsulas de simbiontes” abaixo da massa de ovos de maneira que quando a prole emerge adquire as bactérias por meio oral (HOSOKAWA et al., 2006).

Endossimbiontes celulares

Organismos endossimbiontes são localizados no interior das células dos hospedeiros e podem ser divididos em primários ou secundários. Aqueles classificados como primários (ou obrigatórios), co-evoluíram com os hospedeiros por um longo período de tempo, sendo comumente encontrados em células

especializadas, chamadas bacteriócitos, são transmitidos de forma vertical e são essenciais para a sobrevivência do mesmo. Por sua vez, os endossimbiontes secundários (ou facultativos), não realizam funções essenciais para a sobrevivência do inseto, podem ser transmitidos de forma vertical ou horizontal e não possuem uma localização específica, sendo possível encontrá-los em diversos tecidos (BAUMANN, 2005; KIKUCHI, 2009).

A ocorrência de endossimbiontes secundários não tem surgimento claro na filogenia da espécie hospedeira, sugerindo que podem ter sido adquiridos em momentos diferentes da evolução e, ainda que para mesma espécie, a presença de endossimbiontes pode variar de acordo com o biótipo do hospedeiro ou o habitat que ocupa (ISHIKAWA, 2003).

As interações entre endossimbiontes secundários e o hospedeiro são frequentemente benéficas, porém existem casos em que ocorrem aspectos negativos para o hospedeiro. O endossimbionte celular *Wolbachia* pode ao mesmo tempo aumentar a atividade parasítica em *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae) e causar menor fecundidade, sobrevivência dos adultos e capacidade de locomoção de *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Figitidae) (FLEURY et al., 2000; FURIHATA et al., 2015).

Algumas bactérias endossimbiontes, como os gêneros *Wolbachia, Cardinium¸ Rickettsia* e *Spiroplasma,* são capazes de influenciar na razão sexual do hospedeiro matando os indivíduos machos durante o processo de embriogênese, causando a feminização da espécie ou interferindo no processo meiótico provocando partenogênese telítoca (VON DER SCHULENBURG et al., 2001; ISHIKAWA, 2003; ADACHI-HAGIMORI et al., 2008).

Existem ainda situações que uma mesma espécie de bactéria simbionte pode interagir de maneira diferente com o hospedeiro. *Serratia symbiotica* é caracterizada como um endossimbionte benéfico para afídeos, possuindo 2 clados descritos atualmente: o clado A é classificado como endossimbionte facultativo para *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea) e proporciona ao hospedeiro tolerância ao calor, sobrevivência e fecundidade (CHEN et al. 2000; MONTLLOR et al., 2002, RUSSEL & MORAN, 2006); o clado B é classificado como co-obrigatório para *Cinara cedri* (Hemiptera: Aphididae), pois assumiu funções do endossimbionte primário *Buchenera,* como a síntese de co-fatores importantes e vitaminas (LAMELAS et al., 2008).

Capítulo 1 - Parasitismo entre duas populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae)

Revista: Florida Entomologist

Murilo Fonseca Ribeiro; José Raimundo de Souza Passos; Carlos Frederico Wilcken

Resumo

Gonipterus platensis (Coleoptera: Curculionidae) é uma das mais antigas pragas exóticas de *Eucalyptus* encontradas no Brasil e ainda hoje apresenta surtos em certas regiões do país. O parasitoide de ovos *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) é o principal agente de controle biológico utilizado para a praga. Embora *G. platensis* esteja disseminado em vários Estados brasileiros, os surtos ocorrem com maior frequência em São Paulo e Paraná. O objetivo deste trabalho é comparar o parasitismo de escatotecas de *G. platensis* por duas populações diferentes de *A. nitens*: uma proveniente do Estado de São Paulo (SP), onde são observados surtos do inseto-praga, e outra do Espírito Santo (ES), onde o controle biológico é eficiente. Para isso, 5 escatotecas com até 24 horas de idade foram oferecidas para cada casal do parasitoide em tubos de vidro de fundo chato durante 3 dias. Em seguida, as escatotecas foram transferidas pra placas de acrílico. A emergência de larvas de *G. platensis* e adultos de *A. nitens* foi contabilizada para determinação da taxa de parasitismo e razão sexual. Após 30 dias as escatotecas foram dissecadas para avaliação de insetos retidos. Ambas as populações exibiram resultados de parasitismo, emergência e razão sexual semelhantes, não diferindo significativamente.

Palavras-chave: Controle biológico; *Eucalyptus*; *Gonipterus platensis*; Parasitoide de ovos

Abstract

Gonipterus platensis (Coleoptera: Curculionidae) is one of the oldest exotic *Eucalyptus* pests found in Brazil and outbreaks has still occuring in certain regions of the country. The egg parasitoid *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) is the main biological control agent used for control *G. platensis*. Although the pest is widespread in several states, outbreaks are more frequent in the States of São Paulo and Paraná. The aim of this work is compare the parasitism of *G. platensis* by two different populations of *A. nitens*: one from the State of São Paulo (SP), where the outbreaks of the insect-pest are observed, and another from Espírito Santo (ES), where biological control is efficient. For this, five egg capsules with up to 24 hours of age were offered to each pair of parasitoid in flat bottom tubes for 3 days. Then,they were transferred to acrylic Petri dishes. The emergence of *G. platensis* larvae and *A. nitens* adults was counted to determinate parasitism rate and sex ratio. After 30 days, egg capsules were dissected to account retained insects. Both population had parasitism rate, emergency rate and sexual ratio that did not differ statistically from each other

Keywords: Biological control; *Eucalyptus*; *Gonipterus platensis*; Egg parasitism

1.1 Introdução

Os primeiros relatos para insetos do gênero *Gonipterus* no Brasil, popularmente conhecidos como gorgulho-do-eucalipto, ocorreram oficialmente na década de 1950 para *G. pulverulentus* (Gyllenhal) (ex - *G. gibberus*) e em 1979 para *G. platensis* (Marelli), (ex - *G. scutellatus*) (Barbiellini, 1955; Freitas, 1979). Destes, *G. platensis* é atualmente a espécie de maior área de ocorrência e responsável pelos maiores impactos econômicos (Souza et al. 2016).

As fêmeas de *Gonipterus* realizam a postura de um número variável de ovos sobre folhas jovens das árvores, sendo recobertos por uma substância composta principalmente por fezes, que logo endurece (Tooke, 1955) formando uma estrutura conhecida como escatoteca.

Das escatotecas ocorre a eclosão das larvas em aproximadamente 7 dias, a 26ºC (Oliveira, 2006). Durante o primeiro e o segundo ínstar, as larvas se alimentam raspando as folhas, sem causar a perfuração do limbo; ao atingir o terceiro e durante

o quarto ínstar elas se tornam capazes de se alimentar de todo o limbo foliar (Tooke, 1955; Sanches, 1993).

Os adultos se alimentam das bordas do limbo foliar de *Eucalyptus* spp., porém, é a fase larval a principal causadora de danos e injúrias na cultura (Wilcken & Oliveira, 2015). Árvores atacadas podem apresentar desfolha completa do terço superior da planta, levando à morte do ponteiro, perda de dominância apical e crescimento de brotações laterais e acentuada perda de produtividade (Tooke, 1955; Sanches, 1993).

A principal estratégia de controle para *Gonipterus* no mundo é a utilização do parasitoide de ovos *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), originário do sudeste australiano (Mapondera et al., 2012). Sua introdução na África do Sul em 1926 para o controle de *Gonipterus* sp. n. 2 é tida como um dos maiores casos de sucesso do controle biológico clássico, onde apenas a utilização do parasitoide foi responsável pelo controle do inseto-praga (Tooke, 1955; Cordero-Rivera et al. 1999; Tribe, 2005).

O primeiro relato de *G. platensis* no Brasil ocorreu em 1979 na região de Curitiba, PR, mesma época em que foi identificada a presença de seu inimigo natural *A. nitens (*Freitas, 1979). Atualmente, os insetos ocorrem no Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Espírito Santo. Durante as décadas seguintes o parasitoide foi efetivo no controle da praga. Entretanto, surtos populacionais começaram a ser verificados a partir de 2012 nos Estados de SP e PR associados ao baixo parasitismo por *A. nitens* enquanto nas outras regiões esse controle permaneceu alto (Souza et al., 2016).

Para um parasitoide ser considerado um bom agente de controle ele deve ser capaz de encontrar, reconhecer e avaliar a qualidade dos hospedeiros no ambiente, (Driesche et al., 2008); deve apresentar grande capacidade de oviposição, bom “fitness” e sua progênie deve ser constituída de maior proporção de fêmeas do que machos, uma vez que estas são as responsáveis pelo parasitismo (Wajnberg et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi comparar o parasitismo de ovos de *G. platensis* por duas populações de *A. nitens*.

1.2 Material e Métodos

Criação de *Gonipterus platensis*

A criação de *G. platensis* ocorreu em sala com condições controladas de temperatura (25±1ºC), umidade relativa (50±10%) e fotoperíodo (12:12h).

Foram utilizadas gaiolas de madeira de 40 x 45 x 80 cm, com teto de vidro e laterais de tecido voil contendo 30 casais de indivíduos adultos, alimentados com folhas tenras e brotações de *Eucalyptus urophylla,* acondicionadas em recipientes plásticos de 500 mL com água, formando um feixe de ramos (“buquê”).

A cada 2 dias eram adicionados ramos novos ao buquê para garantir a presença de folhas jovens disponíveis para alimentação e oviposição dos insetos adultos. Os buquês foram trocados uma vez por semana.

Criação de *Anaphes nitens*

Os parasitoides foram inicialmente obtidos de escatotecas de *G. platensis* parasitadas coletadas no município de Aracruz/ES e enviadas para o Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais.

Os indivíduos adultos emergidos foram armazenados em câmara B.O.D. a 22±1ºC; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro) em tubos de vidro de fundo chato (1,5 x 10 cm), vedados com tecido voil e alimentados com solução de mel 50%.

Para multiplicação, foram utilizados os tubos de vidro supracitados contendo 2 casais de *A. nitens* e 6 escatotecas com até 24 horas de idade de *G. platensis*, provenientes da criação do laboratório.

Os tubos contendo hospedeiros e parasitoides permaneciam por 3 dias em câmara B.O.D. a 22±1ºC; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro), quando as escatotecas eram transferidas para placas de acrílico de 5 cm de diâmetro até a emergência da nova geração.

Comparação de Parasitismo

Foram comparadas duas populações de *A. nitens*: a primeira foi obtida a partir de ovos parasitados de *G. platensis* coletadas no município de Aracruz, ES, onde o parasitoide é efetivo no controle da praga e se mantém em equilíbrio populacional com o hospedeiro. A segunda foi obtida a partir de parasitoides coletados no município de Itararé, SP, local com os primeiros registros de surtos no Estado. Ambas as populações foram multiplicadas no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP).

Tabela 1. Tratamentos, município de coleta e material genético do povoamento florestal para populações de *Anaphes nitens* utilizados para a avaliação de parasitismo.

Localidade	Município de coleta	Altitude média (m)	Clima (Koppen)	Material genético plantio
São Paulo	Itararé	750	Cfa	*E. grandis;* *E. grandis* x *E. urophylla;* *E. grandis* x *E. dunni*
Espírito Santo	Aracruz	70	Aw	*E. grandis;* *E. grandis* x *E. urophylla;*

Para o experimento, os adultos de *A. nitens* recém-emergidos das escatotecas foram separados em casais e acondicionados em tubos de vidro de fundo chato (1,5 x 10 cm), vedados com Parafilm e alimentados com solução de mel a 50%. Cada tubo continha 5 escatotecas de *G. platensis* com até 24 horas de idade e tamanhos similares provenientes de criação de laboratório, representando uma repetição. Cada tratamento possuiu inicialmente 20 repetições, sendo que foram retiradas parcelas nas quais não ocorreu parasitismo.

As escatotecas permaneceram ofertadas por 3 dias (Santolamazza-Carbone et al., 2004) no interior dos tubos de vidro para parasitismo, quando eram retiradas e transferidas para placas de acrílico de 5 cm de diâmetro até a emergência da progênie.

Após 30 dias, considerando o primeiro dia de parasitismo, os ovos foram dissecados para contagem de parasitoides e larvas retidas. Para isso, ficaram imersas em álcool 70% por 15 minutos, dissecadas e avaliadas sob microscópio estereoscópico.

Para a estimativa do parasitismo foram calculados: Taxa de Parasitismo Efetiva (TPe), onde TPe = (nº parasitoides emergidos / total de ovos) *100; Taxa de Parasitismo Total (TPt), onde P = [(nº parasitoides emergidos + retidos) / (total de ovos)]*100 (Souza, 2016). A razão sexual foi calculada de acordo com a fórmula: rs = nº de fêmeas / (nº de fêmeas + nº machos) (Gallo et al. 2002).

O teste foi repetido para as duas populações após 3 gerações de criação em laboratório. Ambas as populações foram avaliadas simultaneamente. Porém, como a população proveniente do Espírito Santo (ES) foi estabelecida em laboratório antes da proveniente de São Paulo (SP) houve uma alteração nas gerações avaliadas. Sendo que SP foi analisada na 1ª e 4ª gerações e ES nas 6ª e 9ª gerações.

Todos os experimentos foram conduzidos em câmara B.O.D. (temp.: 22 ± 1 ºC; UR 60 ±10 % e fotoperíodo 12:12 h).

Análise Estatística

Nas análises estatísticas da taxa de parasitismo efetiva (TPe), taxa de parasitismo total (TPt) e da razão sexual (rs), todos tendo como fatores: tratamentos e geração, e para o período de desenvolvimento ovo-adulto, tendo como fator tratamentos, foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição gama e função de ligação logarítmica (Nelder & Wedderburn, 1972). Foi utilizado o procedimento *genmod* (do programa estatístico SAS – *Free Statistical Software, SAS University Edition*) e para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (Westfall et al., 1999). A qualidade dos ajustes de todos os modelos lineares generalizados ajustados foi feita pela análise de desvios (*deviance*), gráficos dos resíduos de Pearson padronizados.

1.3 Resultados

A avaliação das populações de *A. nitens* provenientes de São Paulo e Espírito Santo em condições de laboratório demonstrou que os valores encontrados para taxa de parasitismo efetiva e taxa de parasitismo total não diferiram significativamente entre os tratamentos e as gerações analisadas (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de parasitismo efetiva (TPe) (média ± e.p.) (%) e Taxa de parasitismo total (TPt) (média ± e.p.) (%) de *Anaphes nitens* em *Gonipterus platensis*, e razão sexual (rs) de progênie de *A. nitens* para as gerações de laboratório das populações de São Paulo e Espírito Santo (Temp: 22 ± 1ºC, UR: 60% e fotoperíodo: 12:12h).

Tratamento	Geração	TPe (%)	TPt (%)
SP	1	95,09 ± 1,5 n.s.	99,01 ± 0,6 n.s.
SP	4	85,46 ± 4,3	93,61 ± 3,5
ES	6	92,83 ± 1,5	98,33 ± 1,2
ES	9	88,30 ± 5,4	92,79 ± 5,6

* n.s.: não significativo pelo teste de Tukey-Kramer (p<0,05)

O período de desenvolvimento (ovo-adulto) de *A. nitens* coletado em São Paulo foi maior (f= 12,29; p= 0,0005) que aquele coletado no Espírito Santo (Tabela 3).

Tabela 3. Período de desenvolvimento ovo-adulto (dias) e razão sexual (rs) (média ± EP) de populações de *Anaphes nitens,* de diferentes localidades, em ovos de *Gonipterus platensis* (Temp: 22 ± 1ºC, UR: 60% e fotoperíodo: 12:12h).

Localidade	Desenvolvimento ovo-adulto (dias)	rs
SP	17,67 ± 0,15 a	0,58 ± 0,03 n.s.
ES	16,92 ± 0,14 b	0,51 ± 0,03

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey-Kramer (p<0,05); * n.s.: não significativo pelo teste de Tukey-Kramer (p<0,05)

1.4 Discussão

As áreas de coleta das populações de *A. nitens* foram escolhidas por diferirem na presença de surtos de *G. platensis* (Souza et al., 2016). Porém, quando transferidas para laboratório, ambas as populações exibiram resultados de parasitismo, porcentagem de emergência e razão sexual que não diferiram significativamente.

As fêmeas de *A. nitens* foram capazes de parasitar valores superiores a 90% dos ovos de *G. platensis* para ambas as populações analisadas. A fêmea do parasitoide necessita de 2 a 3 dias para parasitar completamente a escatoteca do hospedeiro (Santolamazza-Carbone et al., 2004). Nesse experimento, optou-se por oferecer os ovos durante 3 dias para que fosse avaliado o parasitismo potencial das populações, uma vez que não há estudos relatando o tempo de parasitismo ótimo para a espécie. Porém, o valor encontrado para a população São Paulo (96,46 ± 1,7 %) foi maior do que os valores encontrados por Souza (2016), que variaram entre 63,83 e 86,15%, para escatotecas de campo coletadas na mesma região, indicando que o tempo disponível para a oviposição pode ter sido excessivo e que, em condições de campo, o parasitoide talvez não permaneça tanto tempo num mesmo conjunto de escatotecas, pois uma vez que quanto maior o tempo que um parasitoide fêmea permanece sobre um conjunto de hospedeiros, maior é o parasitismo (Wajnberg et al., 2015). Outra hipótese seria que, no momento da avaliação realizada por Souza (2016), a população de *A. nitens* em campo era insuficiente para parasitar todos os ovos de *G. platensis* depositados em situações de surtos populacionais, conferindo menor controle.

A razão sexual de ambas as populações não diferiu significativamente, apresentando uma proporção ligeiramente maior de fêmeas. O modelo de competição local por cópula (“local competition model”) (Hamilton, 1967) prediz que em ambientes com grande oferta de hospedeiros e baixa população de parasitoides as fêmeas realizam a oviposição favorecendo a progênie feminina, e gerando apenas machos suficientes para copular com as filhas. Isso é possível pois parasitoides fêmeas copuladas armazenam esperma em espermatecas e são capazes de controlar o sexo de sua progênie no momento da oviposição, liberando ou retendo o esperma (Flanders, 1956).

O Brasil nunca realizou importação oficial de *A. nitens* e se considera que o parasitoide tenha chegado ao país naturalmente a partir de sua introdução na Argentina, que, por sua vez, importou o inimigo natural da África do Sul. O

cruzamento de indivíduos consanguíneos a partir da população inicial introduzida pode acarretar no aumento da frequência de alelos recessivos homozigotos capazes de causar efeitos deletérios no organismo (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Como a avaliação inicial de ambas as populações não apresentou diferenças significativas para os parâmetros analisados, optou-se por multiplica-las por 3 gerações para verificar a ação de possíveis efeitos deletérios. Contudo, os resultados continuaram os mesmos, e mais gerações precisam ser multiplicadas em laboratório para confirmar a expressão de efeitos deletérios. Em Hymenoptera os efeitos deletérios relativos à consanguinidade são suaves devido à formação dos sexos dos indivíduos (Henter, 2003). Para estes insetos, os machos são haploides e genes recessivos, que poderiam ser ocultados pela heterozigose nas fêmeas diploides, são totalmente expressados. Assim, o meio ambiente acaba selecionando e eliminando os indivíduos menos aptos (Antolin, 1999).

A população de São Paulo apresentou período de desenvolvimento ovo-adulto superior ao da população do Espírito Santo. Porém, ao analisar os valores se verifica que essa diferença é de aproximadamente 18 horas. Considerando que o período de suscetibilidade das escatotecas hospedeiras ao parasitoide é de até 3 dias (Santolamazza-Carbone et al., 2004), essa diferença em tempo não é capaz, sozinha, de influenciar na efetividade do parasitismo em campo.

Portanto, após comparar os resultados de parasitismo potencial para ambas as populações de *A. nitens* e a razão sexual da progênie se verifica que ambas possuem a mesma aptidão para o controle de *G. platensis*. Os surtos recentes observados em regiões do Brasil podem estar associados a fatores que atuem na adaptação dos insetos, como microclima, mudanças em material genético implantado, atratividade dos insetos, expressão de endossimbiontes, ocorrência de patógenos, entre outros, sendo necessários novos estudos para definição.

Referências Bibliográficas

Antolin MF. 1999. A genetic perspective on mating systems and sex ratios of parasitoid wasps. Researches on Population Ecology 41(1): 29–37.

Barbielline AA. 1955. Combate à praga do eucalipto no sul. Chácaras e Quintais 91(2): 191-192.

Charlesworth D, Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Annual Review of Ecology and Systematics 18(1): 237–268.

Cordero-Rivera A, Santolamazza-Carbone S, Andrés JÁ. 1999. Life cycle and biological control of the *Eucalyptus* snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. Agricultural and Forest Entomology 1(2): 103–109.

Flanders SE. 1956. The mechanisms of sex ratio regulation in the parasitic Hymenoptera. Insectes Sociaux 3(2): 325-334.

Freitas S. 1979. Contribuição ao estudo da morfologia e biologia de *Gonipterus gibberus* (Boisduval, 1835) (Coleoptera, Curculionidae) e levantamento dos danos causados por esta espécie em eucaliptos dos arredores de Curitiba. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 95f.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra, JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramin JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C. 2002. Ecologia. In: Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra, JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramin JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C. Entomologia Agrícola. FEALQ 191-218.

Hamilton WD. 1967. Extraordinary sex ratios. Science 156(3774): 477-488.

Henter HJ. 2003. Inbreeding depression and hapodiploidy: experimental measures in a parasitoid and comparisons across diploid and hapodiploid insect taxa. Evolution 57(8): 1793–1803.

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

Nelder JA, Wedderburn RW. 1972. Generalized linear models. Journal of the Royal Statistical Society Series A 135(3): 370-384.

Oliveira NC. 2006. Biologia de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) em *Eucalyptus* spp. em diferentes temperaturas. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 82 f.

Sanches MA. 1993. Influência da temperatura no desenvolvimento de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal 1833 (Coleoptera, Curculionidae) em *Eucalyptus viminalis*

Labill: Aspectos bionômicos e parasitismo na Região de Curitiba (PR). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 65 f.

Santolamazza-Carbone S, Rodriguez-Illamola A, Cordero-Rivera, A. 2004. Host finding and host discrimination ability in *Anaphes nitens* Girault, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. Biological Control 29(1): 24-33.

Souza NM. 2016.*Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae): infestação em eucalipto, aspectos morfológicos e biológicos e controle. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 83f.

Souza NM, Junqueira LR, Wilcken CF, Soliman EP, Carmargo MB, Nickele MA, Barbosa LR. 2016. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Circular Técnica 209. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais 20 p.

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

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

Van Driesche R, Hoddle M, Center T. 2008. Control of pests and weeds by natural enemies: an introduction to biological control. Blackwell Publishing. 473 p.

Wajnberg E, Roitberg BD, Boivin G. 2015. Using optimality models to improve the efficacy of parsitoids in biological control programmes. Entomologia Experimentalis et Aplicata 158(1): 2-16.

Westfall PH, Tobias RD, Rom D, Wolfinger RD, Hochberg Y. 1999. Multiple comparisons and multiple tests using the SAS System, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Wilcken CF, Oliveira NC. 2015. Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli. In: Villela EF, Zucchi RA. Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros. Piracicaba: FEALQ: 779-791.

Capítulo 2– Bactérias simbiontes em *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) e *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae)

Revista: Florida Entomologist

Murilo Fonseca Ribeiro; Vanessa Rafaela de Carvalho; Ana Laura Favoreto; Bruno Rossitto De Marchi; Vinicius Henrique Bello; Carlos Frederico Wilcken

Resumo

As influências de uma bactéria endossimbionte celular sobre o inseto hospedeiro podem ser positivas ou negativas. Em parasitoides podem afetar o "fitness", a longevidade e o parasitismo do hospedeiro. *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) é o principal agente de controle biológico para *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Tanto a praga quanto o parasitoide estão distribuídos em vários Estados brasileiros, porém, em determinados locais o controle biológico é efetivo enquanto em outros o parasitismo é baixo e ocorrem surtos da praga. Surtos de *G. platensis* têm sido observados em regiões onde ácaros do gênero *Pyemotes* foram detectados se alimentando de ovos de *G. platensis* e onde o parasitismo e o estabelecimento do parasitoide caíram. O objetivo deste trabalho é realizar a prospecção de endossimbiontes secundários em diferentes populações do parasitoide *A. nitens*, do hospedeiro *G. platensis* e de ácaros do gênero *Pyemotes* para identificar e verificar diferenças entre as bactérias simbiontes que poderiam estar influenciando a capacidade de parasitismo do parasitoide. Foram avaliadas seis populações diferentes de *A. nitens*, uma população de *G. platensis* e uma população de *Pyemotes* sp. Cada população teve seu DNA extraído por meio de Chelex a 10% e foi avaliada por meio de PCR para a presença de 9 gêneros de endossimbiontes celulares diferentes (*Arsenophonus; Cardinium; Hamiltonella; Regiella; Rickettsia; Serratia; Sodalis; Spiroplasma* e *Wolbachia*) com a utilização de primers específicos. Todas as populações de *A. nitens* apresentaram as bactérias *Rickettsia belli, Serratia grimesii, Yersinia massiliensis* e *Erwinia amylovora.* Nas populações de *G. platensis* e *Pyemotes* sp.

encontrou-se *Serratia grimesii*. A hipótese de que a população de *A. nitens* presente no Estado de São Paulo apresentava menores valores de parasitismo devido à presença de alguma bactéria simbionte diferente das encontradas para a população do Espírito Santo foi negada, pois todas as bactérias encontradas para *A. nitens* estavam presentes em todas as populações avaliadas. As influencias das bactérias encontradas sobre o hospedeiro não foram definidas, sendo necessário estudo futuro comparando os parâmetros biológicos do hospedeiro com uma população livre dos simbiontes.
Palavras-chave: Controle biológico; *Gonipterus platensis*; *Rickettsia*; *Serratia*; *Yersinia*; *Erwinia*

Abstract

Influences of a cellular endosymbiont bacterium on the insect host can be positive or negative. In parasitoids can affect the fitness, longevity and parasitism of the host. *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) is the main biological control agent for *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Both the pest and the parasitoid are distributed in several Brazilian states, but in some places the biological control is effective while in others the parasitism is low and there are outbreaks. Outbreaks of *G. platensis* have been observed in regions where mites of the genus *Pyemotes* were detected feeding on *G. platensis* eggs and where parasitism and parasitoid establishment is low. The objective of this work is to prospect for secondary endosymbionts in different populations of the parasitoid *A. nitens*, the host *G. platensis* and the *Pyemotes* mite to identify and verify differences among the symbiotic bacteria that could be influencing parasitism parasitism. Six different populations of *A. nitens*, a population of *G. platensis* and a population of *Pyemotes* sp. Each population had its DNA extracted by means of Chelex 10% and was evaluated by PCR for the presence of 9 genera of different cellular endosymbionts (*Arsenophonus, Cardinalium, Hamiltonella, Regiella, Rickettsia, Serratia, Sodalis, Spiroplasma and Wolbachia*) with the use of specific primers. All populations of *A. nitens* presented the bacteria *Rickettsia belli, Serratia grimesii, Yersinia massiliensis* and *Erwinia amylovora*. In the populations of *G. platensis* and *Pyemotes* sp. *Serratia grimesii* was found. The hypothesis that the population of *A. nitens* present in the State of São Paulo presented lower values of parasitism due to the presence of

some symbiotic bacteria other than those found for the population of Espírito Santo was denied, since all the bacteria found for *A. nitens* were present in all evaluated populations. The influences of the bacteria found on the host were not defined, and a future study is necessary comparing the biological parameters of the host with a population free of the symbionts.
Keywords: Biological control; *Gonipterus platensis*; *Rickettsia*; *Serratia*; *Yersinia*; *Erwinia*

2.1 Introdução

A microbiota de um inseto pode se relacionar com o hospedeiro por meio de associações específicas, e bactérias que vivem no interior do inseto podem ser caracterizadas como patógenos, exercendo funções maléficas, ou simbiontes, cumprindo funções benéficas ao hospedeiro (Nedoluzhko, 2017).

Bactérias simbiontes de insetos podem contribuir positivamente para a nutrição do hospedeiro, aumentando a habilidade de sobreviver em dietas pouco nutricionais, aumentando a eficiência da digestão, provendo vitaminas, impedindo a contaminação por bactérias patogênicas, influenciando na cópula e nos sistemas reprodutivos, entre outros. Tais funções podem ser estabelecidas tanto por endossimbiontes quanto por bactérias de intestino (Douglas, 1992; Dillon & Dillon, 2004).

Organismos endossimbiontes podem ser divididos em primários ou secundários. Aqueles classificados como primários (ou obrigatórios), coevoluíram com os hospedeiros por um longo período de tempo, sendo comumente encontrados em células especializadas do hospedeiro, chamadas bacteriócitos; são transmitidos de forma vertical e são essenciais para a sobrevivência do mesmo. Por sua vez, os endossimbiontes secundários (ou facultativos), não realizam funções essenciais para a sobrevivência do inseto, podem ser transmitidos de forma vertical ou horizontal e não possuem uma localização específica, sendo possível encontrá-los em diversos tecidos diferentes (Baumann, 2005; Kikuchi, 2009).

Mais de 70% das espécies de insetos possuem simbiontes intracelulares (Ishikawa, 2003). Podem ser listados como simbiontes obrigatórios os gêneros *Baumannia, Blochmannia, Buchnera, Carsonella, Nardonella, Portiera, Sulcia, Tremblaya* e *Wigglesworthia*, já os gêneros *Arsenophonus, Cardinium, Fritschea,*

Hamiltonella, Regiella, Rickettsia, Serratia, Sodalis, Spiroplasma e *Wolbachia* representam endossimbiontes facultativos (Kikuchi, 2009).

As influências de um endossimbionte sobre o inseto hospedeiro variam consideravelmente, sendo possível encontrar casos em que o hospedeiro é afetado negativamente e outros em que ocorre uma relação mutualística (Dedeine et al., 2003). Ao analisarmos espécies de parasitoides hospedeiras do endossimbionte *Wolbachia* observamos que fêmeas de *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae) apresentam maior atividade parasítica sobre *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) do que fêmeas sem a bactéria (Furihata et al., 2015); já em *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Figitidae) a presença da bactéria está relacionada a menores fecundidade, sobrevivência dos adultos e capacidade de locomoção (Fleury et al., 2000).

O gorgulho-do-eucalipto, *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) é o mais importante besouro desfolhador de *Eucalyptus* no mundo, cuja fase larval é a principal causadora de danos e injúrias em *Eucalyptus* spp. (Wilcken & Oliveira, 2015). O controle biológico por meio do parasitoide de ovos *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) é a principal estratégia de controle de *Gonipterus* spp. Todavia, apesar do sucesso alcançado em países como África do Sul, onde o parasitoide efetivamente controlou a praga (Tribe, 2005), existem localidades onde o parasitismo é baixo, ocasionando um controle ineficiente e induzindo países à importação de outros parasitoides na busca por espécies mais eficazes (Gumovsky et al., 2015; Valente et al., 2017). Para o Brasil, ambos os insetos se encontram distribuídos nos Estados da Região Sul, São Paulo e Espírito Santo, porém a ocorrência de surtos populacionais de *G. platensis* ocorre apenas nos Estados de São Paulo e Paraná, locais em que a eficiência de parasitismo de *A. nitens* tem caído recentemente (Souza et al., 2016). Para o Estado de São Paulo foi detectada a ocorrência de ácaros se alimentando de ovos de *G. platensis*, independentemente de estarem ou não parasitados por *A. nitens,* constatando-se que escatotecas contaminadas tiveram o parasitismo efetivo por *A. nitens* reduzida consideravelmente (Ribeiro et al., 2018).

Procurando entender os motivos das diferenças de eficiência do parasitoide no controle de *G. platensis,* o objetivo deste trabalho foi realizar a prospecção de endossimbiontes secundários em diferentes populações do parasitoide *A. nitens*, de *G. platensis* e de ácaros do gênero *Pyemotes* para verificar se existem diferenças

entre as bactérias simbiontes de populações provenientes onde o parasitoide é efetivo no controle da praga com outras onde o controle não é eficiente.

2.2 Material e Métodos

Criação de *Gonipterus platensis*

A criação de *G. platensis* ocorreu em sala com condições controladas de temperatura (25±1ºC), umidade relativa (50±10%) e fotoperíodo (12:12h).

Foram utilizadas gaiolas de madeira de 40 x 45 x 80 cm, com teto de vidro e laterais de tecido voil contendo 30 casais de indivíduos adultos, alimentados com folhas tenras e brotações de *Eucalyptus urophylla,* acondicionadas em recipientes plásticos de 500 mL com água, formando um feixe de ramos (“buquê”).

A cada 2 dias eram adicionados ramos novos ao buquê para garantir a presença de folhas jovens disponíveis para alimentação e oviposição dos insetos adultos. Os buquês foram trocados uma vez por semana.

Criação de *Anaphes nitens*

Os parasitoides foram inicialmente obtidos de escatotecas de *G. platensis* parasitadas coletadas no município de Aracruz/ES e enviadas para o Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais.

Os indivíduos adultos emergidos foram armazenados em câmara B.O.D. a 22±1ºC; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro) em tubos de vidro de fundo chato (1,5 x 10 cm), vedados com tecido voil e alimentados com solução de mel 50%.

Para multiplicação, foram utilizados os tubos de vidro supracitados contendo 2 casais de *A. nitens* e 6 escatotecas com até 24 horas de idade de *G. platensis*, provenientes da criação do laboratório.

Os tubos contendo hospedeiros e parasitoides permaneciam por 3 dias em câmara B.O.D. a 22±1ºC; UR 60% e fotoperíodo 12:12h (claro: escuro), quando as escatotecas eram transferidas para placas de acrílico de 5 cm de diâmetro até a emergência da nova geração.

Coleta, Amostragem e Extração de DNA

Escatotecas de *G. platensis* foram coletadas em plantios comerciais de *Eucalyptus* spp. (Tabela 1); transferidas para placas de acrílico de 5 cm de diâmetro e acondicionadas em câmara B.O.D a 15ºC e fotoperíodo de 12:12h (claro: escuro) até a emergência dos adultos de *A. nitens.* Os insetos emergidos foram coletados com a ajuda de um aspirador manual e preservados em freezer a 4ºC até o processamento das análises genéticas.

Foram escolhidas como pontos amostrais áreas com ocorrência de surtos de *G. platensis* no centro do Estado de São Paulo, (municípios de Botucatu, Itatinga, Lençóis Paulista e Pratânia); na divisa com o Estado do Paraná (município de Itararé), local onde ocorreu a ressurgência do inseto como praga em 2012; e no município de Aracruz, ES, onde a população de *G. platensis* está em equilíbrio com o parasitoide *A. nitens*, sem a ocorrência de surtos, e que serve como testemunha para as análises.

Tabela 1. Localização, material genético de eucalipto e data de coleta de escatotecas de *Gonipterus platensis* parasitadas por *Anaphes nitens*

População	Cidade	Estado	Data coleta	Material Genético
1	Aracruz	ES	10/11/2017	*E. grandis;* *E. grandis* x *E. urophylla;*
2	Botucatu	SP	15/10/2017	*E. grandis* x *E. urophylla*
3	Itatinga	SP	04/10/2017	*E. grandis* x *E. urophylla*
4	Lençóis Paulista	SP	03/10/2017	*E. grandis* x *E. urophylla*
5	Pratânia	SP	10/11/2017	*E. grandis* x *E. urophylla*
6	Itararé	SP	20/04/2017	*E. grandis;* *E. grandis* x *E. urophylla;* *E. grandis* x *E. dunnii*

A população de Aracruz foi multiplicada em laboratório para verificar a transmissão vertical dos endossimbiontes por 2 gerações (F1 e F2), utilizando a metodologia descrita no item “Criação de *Anaphes nitens*”.

Para cada população de *A. nitens* e para as gerações F1 e F2, extraiu-se o DNA de 50 insetos adultos. Os insetos foram macerados e homogeneizados em

solução de 80 µl de resina Chelex100 (Bio-Rad Laboratories) a 10%, diluído em água estéril e 8µl de proteinase K (20 microgramas/ml) em microtubos de 200µl. Os tubos foram agitados por alguns segundos em Vortex Biomixer MOD QL901 e Minicentrífuga de bancada Ministar a 6200 rpm e depois transferidos para termociclador Infinigen (modelo TC-96CG) a 95ºC durante 20 minutos. Nas extrações com apenas 1 inseto adulto foi utilizada solução de 20µl de Chelex 10% e 2µl de proteinase K, sendo as demais etapas idênticas àquelas para 50 indivíduos.

Nas análises com componentes das escatotecas de *G. platensis* utilizaram-se escatotecas com até 24 horas de idade provenientes da criação de laboratório e ausentes de parasitismo. Estas foram imersas em água destilada por 1 hora para amolecimento com posterior separação dos ovos da massa que compõe a escatoteca com ajuda de lupa estereoscópica.

Para a extração de DNA de cada componente foram utilizados 35 ovos e a massa de 5 escatotecas. As amostras foram maceradas e homogeneizadas em solução de 80 µl de resina Chelex100 (Bio-Rad Laboratories) a 10%, diluído em água estéril e 8µl de proteinase K (20 microgramas/ml) em microtubos de 200µl. Seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras de *A. nitens.*

Para a amostragem de adultos de *G. platensis* foi utilizado o abdômen de 5 insetos adultos provenientes da criação de laboratório. As amostras foram maceradas e homogeneizadas em solução de 1600 µl de resina Chelex100 (Bio-Rad Laboratories) a 10%, diluído em água estéril e 16µl de proteinase K (20 microgramas/ml) em microtubos de 200µl. Seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras de *A. nitens.*

Na avaliação dos ácaros, foram coletadas escatotecas contaminadas por *Pyemotes* sp. no município de Pratânia, SP, em 10/01/2018, armazenadas em etanol 92%. Previamente à extração, as escatotecas foram lavadas em água destilada e 50 fêmeas de *Pyemotes* foram coletadas e destinadas para a extração de DNA, que seguiu o mesmo protocolo utilizado para 50 adultos de *A. nitens.*

Todos os procedimentos de extração de DNA foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular (Nematologia) na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP).

Detecção Molecular de Endossimbiontes

As populações foram analisadas no Laboratório de Biologia Molecular (Nematologia) na Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP) seguindo metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção dos endossimbiontes secundários *Arsenophonus; Cardinium; Hamiltonella; Regiella; Rickettsia; Serratia; Sodalis; Spiroplasma* e *Wolbachia* com a utilização dos primers descritos na Tabela 2.

Foi utilizado mix de PCR contendo 12,5µl de Taq DNA Polimerase (NeoBio); 7,5µl água miliQ; 1,0µl de cada primer e 3,0µl de DNA da amostra, totalizando um volume de 25µl.Para leitura dos produtos das PCRs foi empregado marcador molecular 100pb (Norgen) e gel de agarose 1%, contendo 80 ml de solução tampão TBE; 0,8g de agarose (Neo3Bio) e 0,4µl de intercalante de DNA GelRed (NeoBio), sendo visualizados em transiluminador de luz UV (Major Science).

As reações de PCR foram executadas seguindo as seguintes condições: *Arsenophonus* e *Hamiltonella*: temperatura de desnaturação inicial a 95ºC por 2 min., seguido de 30 ciclos de 95ºC a 30 seg., 58ºC a 30 seg., 72ºC a 1 min. e extensão final de 72ºC por 5 min.; *Cardinium*: temperatura de desnaturação inicial a 95ºC por 2 min., seguido de 30 ciclos de 92ºC a 30 seg., 57ºC a 30 seg., 72ºC a 30 seg. e extensão final de 72ºC por 5 min; *Regiella* e *Spiroplasma*: temperatura de desnaturação inicial a 94ºC por 5 min., seguido de 30 ciclos de 94ºC a 1 min., 52ºC a 1 min., 72ºC a 2 min. e extensão final de 72ºC por 5 min; *Rickettsia*: temperatura de desnaturação inicial a 95ºC por 2 min., seguido de 30 ciclos de 92ºC a 30 seg., 58ºC a 30 seg., 72ºC a 30 seg. e extensão final de 72ºC por 5 min.; *Serratia*: temperatura de desnaturação inicial a 95ºC por 10 min., seguido de 35 ciclos de 95ºC a 1 min., 62ºC a 1 min., 72ºC a 1 min. e extensão final de 72ºC por 1 min; *Sodalis*: temperatura de desnaturação inicial a 94ºC por 5 min., seguido de 30 ciclos de 94ºC a 1 min., 62ºC a 1 min., 72ºC a 2 min. e extensão final de 72ºC por 5 min; *Wolbachia*: temperatura de desnaturação inicial a 95ºC por 3 min., seguido de 30 ciclos de 95ºC a 30 seg., 55ºC a 30 seg., 72ºC a 30 seg. e extensão final de 72ºC por 5 min.

A purificação dos produtos das PCRs foi realizada por kit de purificação Cellco, de acordo com as recomendações do fabricante. As análises quantitativas foram feitas por densidade ótica e espectrofotômetro (NanoDrop MD-1000 UV-Vis).

Os fragmentos amplificados foram sequenciados por sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 – Applied Biosystems), no Instituto de Biotecnologia (IBTEC/UNESP) em Botucatu e comparados com as sequencias depositadas no GenBank, utilizando o programa BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Análise Filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento para os genes 16SrRNA e 23SrRNA referente aos isolados de bactérias endossimbiontes obtidos para *A. nitens*, *G. platensis* e *Pyemotes* sp. foram analisadas utilizando o programa Geneious v. 9.1.5 e comparadas ao banco de dados (GenBank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) para a identificação de similaridade genética.

Em seguida, foi construído um alinhamento, utilizando o programa Geneious v.9.1.5, com as sequências obtidas nesse estudo acrescentadas de outras sequências de bactérias endossimbiontes obtidas no GenBank. A análise filogenética foi feita utilizando o programa MrBayes 3.2.2. (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). A análise Bayesiana foi rodada para 30 milhões de gerações com amostragem a cada 1000 gerações. Cada análise constituiu de quatro corridas independentes, cada uma utilizando quatro cadeias de Markov acopladas. A convergência da corrida foi monitorada encontrando o platô no score de probabilidade (desvio padrão de frequências divididas < 0.0015). Os primeiros 25% de cada corrida foram descartados para a estimativa de uma topologia consenso e probabilidade posterior para cada nó.

Identificação no hospedeiro

A técnica confocal de “Fluorescence in situ Hybridization” (FISH) permite a visualização das bactérias endossimbiontes e não cultiváveis no interior do inseto hospedeiro. Assim, auxilia no entendimento das interações entre os organismos.

Para localização das bactérias em *A. nitens* foi utilizado o protocolo desenvolvido para visualização dos endossimbiontes de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Gottlieb et al., 2008; Marubayashi et al., 2014), adaptado.

Escatotecas parasitadas de *G. platensis* foram coletadas no município de Botucatu, SP e armazenadas em câmara B.O.D. a 15±1ºC e fotoperíodo de 12h até a emergência dos adultos de *A. nitens*. Parasitoides recém emergidos foram imersos em uma solução de Carnoy (Clorofórmio: Etanol: Ácido Acético = 6:3:1) para fixação “overnight”.

As amostras foram retiradas de solução de Carnoy e clareadas em H_2O_2 (29%) durante 28 horas. Posteriormente, foi retirado o peróxido de hidrogênio e adicionado etanol 100%, onde as amostras permaneceram armazenadas até a inclusão da sonda.

Ao remover o etanol se adicionou buffer de hibridização 20 mM TRIS-HCL pH 8,0; 9,0M NaCl; 0,01% SDS; 30% Formamida) contendo 10 pmol/ml de sondas fluorescentes específicas para as bactérias endossimbiontes.

Os insetos foram montados em lâminas para visualização em microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5 com a utilização do Software LAS AF, no Centro de Microscopia Eletrônica no Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP). Ao menos 10 indivíduos foram analisados para cada endossimbionte.

Tabela 2. Lista de primers utilizados na prospecção de endossimbiontes secundários em *Anaphes nitens*

Endossimbionte	Gene Alvo	Sequência do Primer 5'>3'	Tamanho da banda (pb)	Referência
Arsenophonus	*23S rRNA*	F-CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA R-GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC	600	(Thao & Baumann, 2004)
Cardinium	*16S rRNA*	F-TACTGTAAGAATAAGCACCGGC R-GTGGATCACTTAACGCTTTCG	900	(Zchori-Fein & Pearlman, 2004)
Hamiltonella	*16S rRNA*	F-TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG R-AGTTCAAGACCGCAACCTC	700	(Zchori-Fein & Brown, 2002)
Regiella	*16S rRNA*	F-ATCGGGGAGTAGCTTGCTAC R-TACGGYTACCTTGTTACGACTT	1000	(Sandström et al., 2001) (Fukatsu & Nikoh, 1998)
Rickettsia	*16S rRNA*	F-GCTCAGAACGAACGCTATC R-GAAGGAAAGCATCTCTGC	900	(Gottlieb et al., 2006)
Serratia	*16S rRNA*	F- CGCAGGCGGTTTGTTAAGTC R- CTTCAAGGGCACAACCTCCA	268	Este trabalho
Sodalis	*16S rRNA*	F-ACCGCATAACGTCGCAAGACC R-CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG	1000	(Nováková & Hypša, 2007)
Spiroplasma	*16S rRNA*	F-GCTTAACTCCAGTTCGCC R-CCTGTCTCAATGTTAACCTC	800	(Montenegro et al., 2005)
Wolbachia	*16S rRNA*	F-CGGGGGAAAAATTTATTGCT R-AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	700	(Heddi et al., 1999)

2.3 Resultados

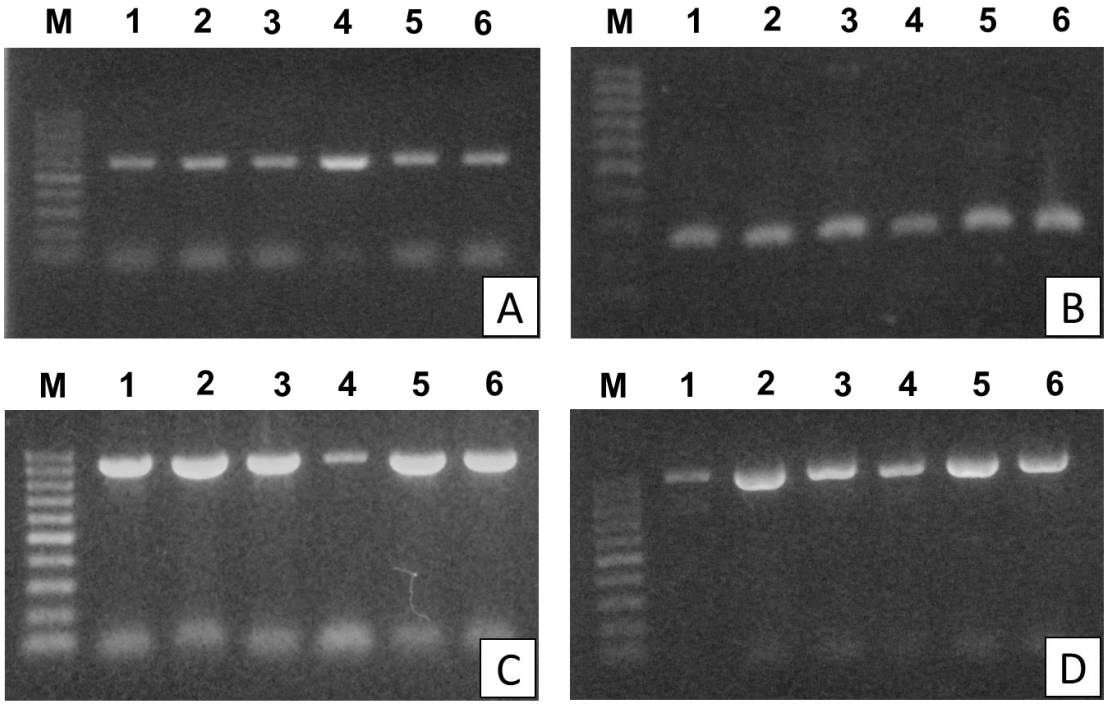
Detecção Molecular de Endossimbiontes

Todas as populações de *A. nitens* avaliadas mostraram resultados positivos para o endossimbionte *Rickettsia*, confirmado após o sequenciamento como *R. belli* (99% de identidade), assim como o primer desenhado para o gênero *Serratia*, confirmando após o sequenciamento como a bactéria de intestino *Serratia grimesii* (99% de identidade) (Figura 1).

O primer para o endossimbionte *Arsenophonus* anelou e sequenciou DNA relativo à bactéria de intestino *Yersinia massiliensis* (98% de identidade), situação análoga à que ocorreu com o primer para *Spiroplasma*, que detectou a bactéria *Erwinia amylovora* (96% de identidade) (Figura 1). Isto pode ter ocorrido devido aos primers utilizados amplificarem região do gene 16S que seja não-específica (Rehka et al., 2006).

Nenhum resultado foi encontrado para os endossimbiontes *Cardinium, Hamiltonella, Regiella, Sodalis* e *Wolbachia* nos hospedeiros *A. nitens*, *G. platensis* ou *Pyemotes* sp (Tabela 3).

Figura 1. Géis de agarose com produtos de reações em cadeia de polimerase (PCR) prospectando bactérias simbiontes em *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae)*:* (A) *Yersinia massiliensis,* (B) *Serratia grimesii,* (C) *Erwinia amylovora,* (D) *Rickettsia belli*. Onde: M = marcador molecular; 1 = população de Aracruz, ES; 2 = população de Botucatu, SP; 3 = população de Itatinga, SP; 4 = população de Lençóis Paulista, SP; 5 = população de Pratânia, SP; 6 = população de Itararé, SP.

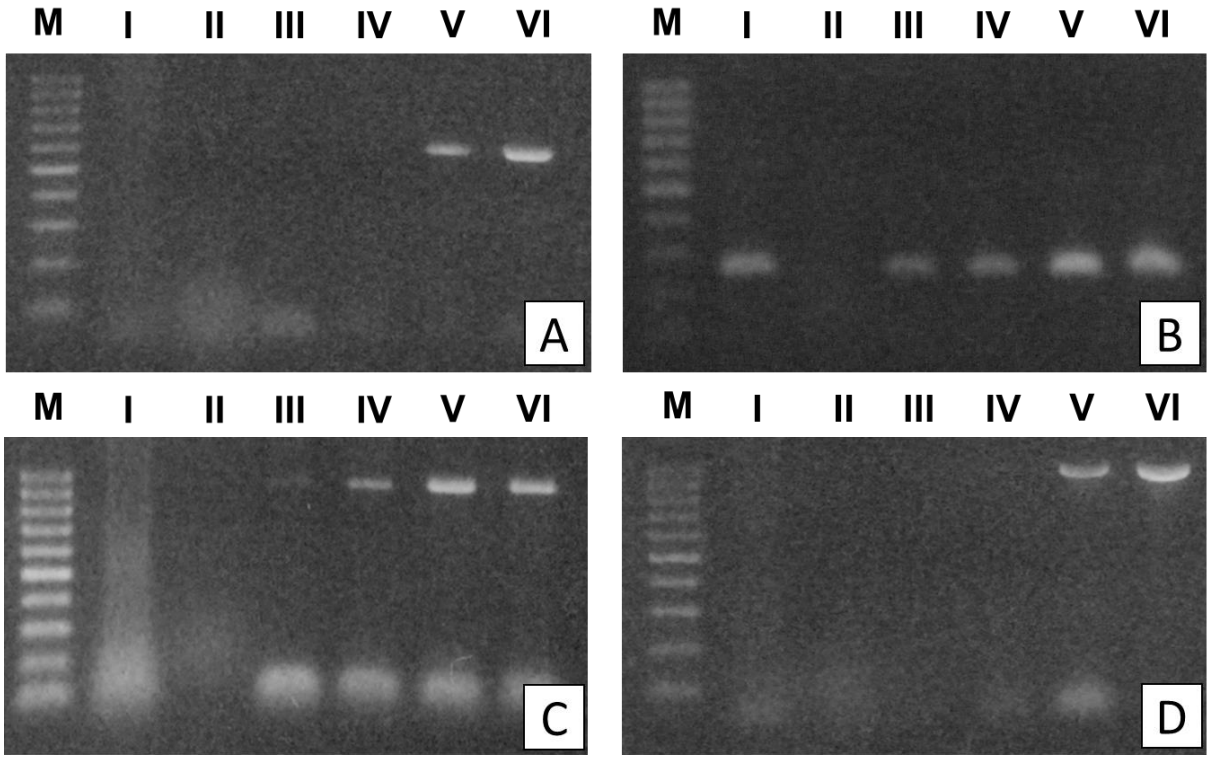


Após a confirmação dos endossimbiontes em adultos de *A. nitens* avaliou-se a presença destes nos ovos e adultos de *G. platensis* e na camada protetora da escatoteca, com a finalidade de verificar uma possível transmissão horizontal das bactérias. Fêmeas do ácaro *Pyemotes* sp. também foram analisadas por serem encontradas contaminando escatotecas de *G. platensis* em determinadas regiões.

A criação de laboratório foi implantada a partir da população originária de Aracruz, ES com o intuito de verificar a permanência dos endossimbiontes nas gerações seguintes.

Todas as bactérias encontradas nos insetos adultos de *A. nitens* foram encontradas nas gerações F1 e F2 de laboratório. Adultos e ovos de *G. platensis* apresentaram resultados positivos para *Serratia grimesii*, enquanto no material da escatoteca não foi identificada nenhuma bactéria prospectada. As fêmeas do ácaro *Pyemotes* sp. exibiram banda nos géis de agarose para *S. grimesii* e *Erwinia amylovora*, porém neste último não foi possível realizar o sequenciamento da amostra, sendo classificado como falso positivo (Figura 2).

Figura 2. Géis de agarose com produtos de reações em cadeia de polimerase (PCR) prospectando bactérias simbiontes em *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae)*, Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) e *Pyemotes* sp (Acari: Pyemotidae): (A) *Yersinia massiliensis,* (B) *Serratia grimesii,* (C) *Erwinia amylovora,* (D) *Rickettsia belli*. Onde: M = marcador molecular; I = Adultos de *G. platensis;* II= camada da escatoteca de *G. platensis;* III = ovos de *G. platensis*; IV = fêmeas de *Pyemotes* sp.; V = geração F1 de *A. nitens*; VI = geração F2 de *A. nitens*



O gênero *Rickettsia* pode interferir na razão sexual do hospedeiro durante a embriogênese matando os indivíduos machos (Von Der Schulenburg et al., 2001) ou induzindo a formação de células diploides e, consequentemente, originando fêmeas por meio de partenogênese telítoca (Adachi-Hagimori et al., 2008).

Embora em *A. nitens* ocorra a emergência comum de machos, extrações individuais de insetos adultos foram realizadas para conferir a presença do endossimbionte, que foi constatado em ambos os sexos do parasitoide (Figura 3), refutando a interferência de *Rickettsia* na razão sexual do hospedeiro.

Figura 3. Gel de agarose com produtos de reação em cadeia de polimerase (PCR) para *Rickettsia belli*. Onde: M = marcador molecular; 1 a 3 = indivíduos machos de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae)*;* 4 a 6 = indivíduos fêmeas de *A. nitens*

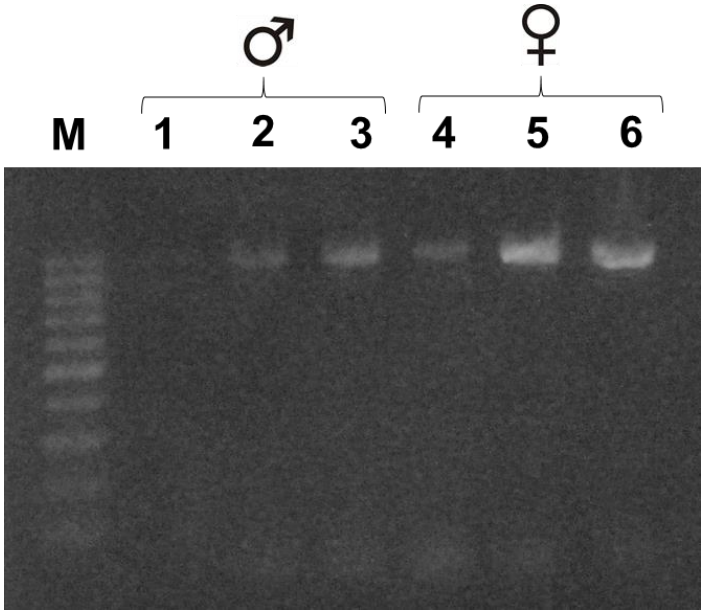


Tabela 3. Bactérias simbiontes e endossimbiontes celulares prospectadas em *Gonipterus platensis*, *Pyemotes* sp. e *Anaphes nitens*. Sinal negativo: ausência no hospedeiro, Sinal positivo: presença no hospedeiro.

	Hospedeiro					
Bactéria simbionte	***Gonipterus platensis* (adultos)**	***Gonipterus platensis* (ovos)**	***Pyemotes* sp.**	***Anaphes nitens* (parental)**	***Anaphes nitens* (F1)**	***Anaphes nitens* (F2)**
Arsenophonus	-	-	-	-	-	-
Cardinium	-	-	-	-	-	-
Erwinia	-	-	-	+	+	+
Hamiltonella	-	-	-	-	-	-
Regiella	-	-	-	-	-	-
Rickettsia	-	-	-	+	+	+
Serratia	+	+	+	+	+	+
Sodalis	-	-	-	-	-	-
Spiroplasma	-	-	-	-	-	-
Wolbachia	-	-	-	-	-	-
Yersinia	-	-	-	+	+	+

Análise Filogenética

As análises filogenéticas obtidas comparam as sequencias definidas no sequenciamento de nucleotídeos para as bactérias encontradas em *A. nitens*, *G. platensis* e *Pyemotes* sp. e as compara com espécies próximas e/ou endossimbiontes já registrados para outros hospedeiros.

Para *Y. massiliensis* pode-se observar a posição das bactérias encontradas em *A. nitens* dentro do clado do gênero *Yersinia* (Figura 4). Em *S. grimesii* é possível verificar a proximidade evolutiva de espécies de *Serratia* e *Yersinia* (Figura 5).

Figura 4. Análise filogenética para amostras de *Yersinia massiliensis* simbionte de diferentes populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae).

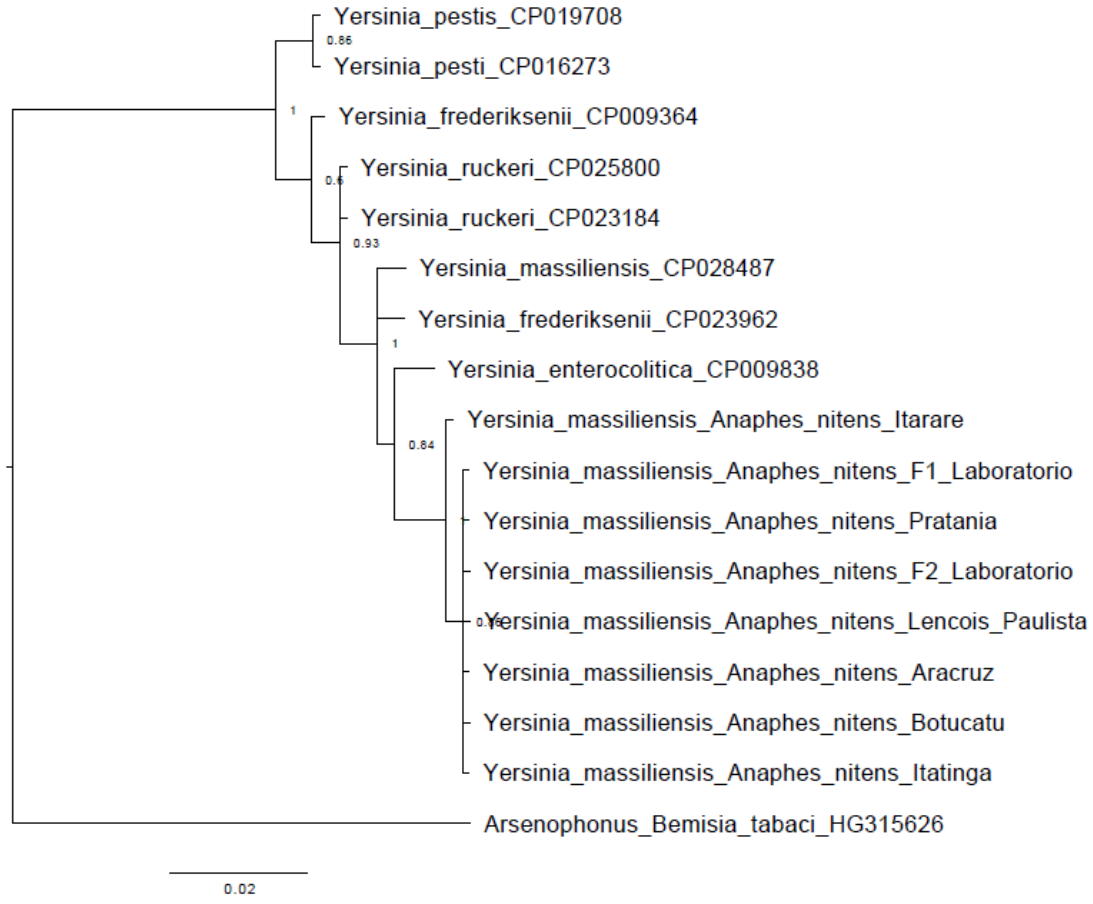
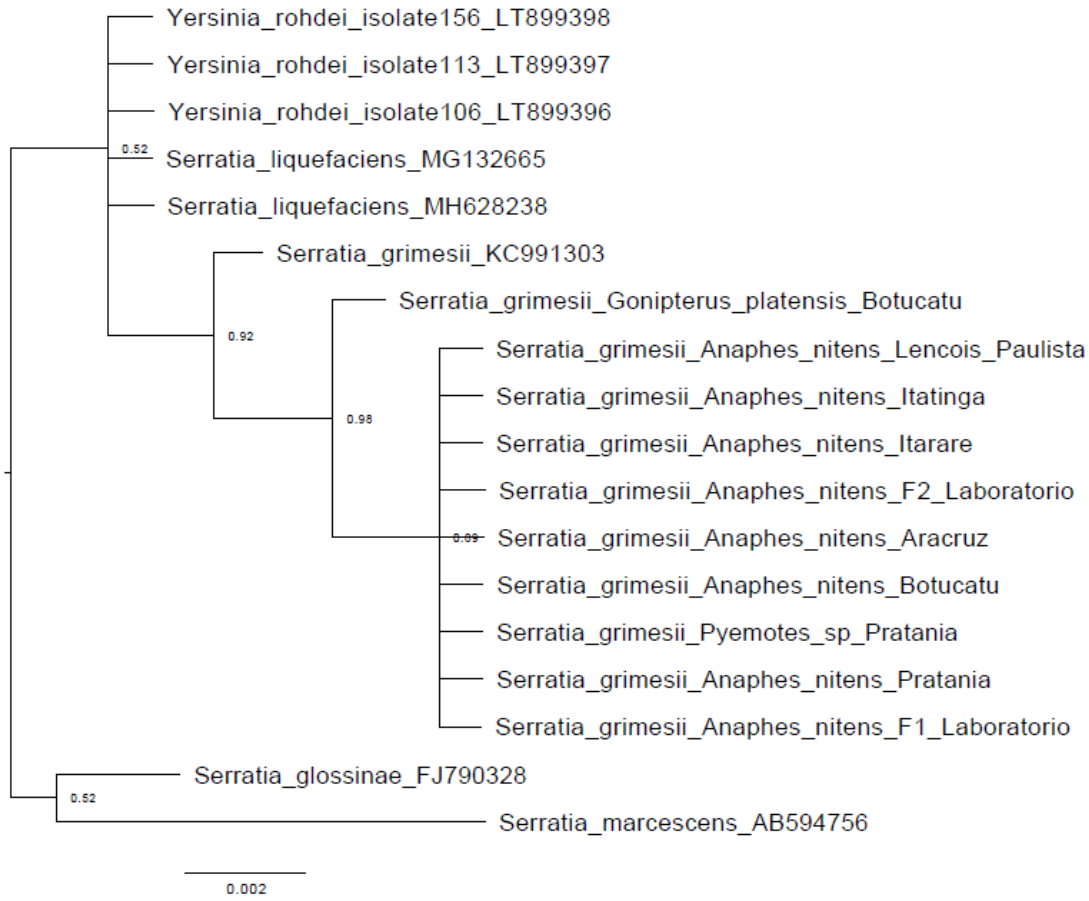


Figura 5. Análise filogenética para amostras de *Serratia grimesii* simbionte de diferentes populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) e *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae).



As bactérias *E. amylovora* e *R. belli* apresentaram grande similaridade entre as detecções para as diferentes populações de *A. nitens* avaliadas (Figuras 6 e 7). Em *R. belli* é possível verificar que o endossimbionte está mais próximo evolutivamente daqueles encontrados em *Chrisoperla pálida* (Neuroptera: Chrysopidae) e *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) do que para *Bemisia tabaci*, para qual o primer utilizado na prospecção foi utilizado.

Figura 6. Análise filogenética para amostras de *Erwinia amyloora* simbionte de diferentes populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae).

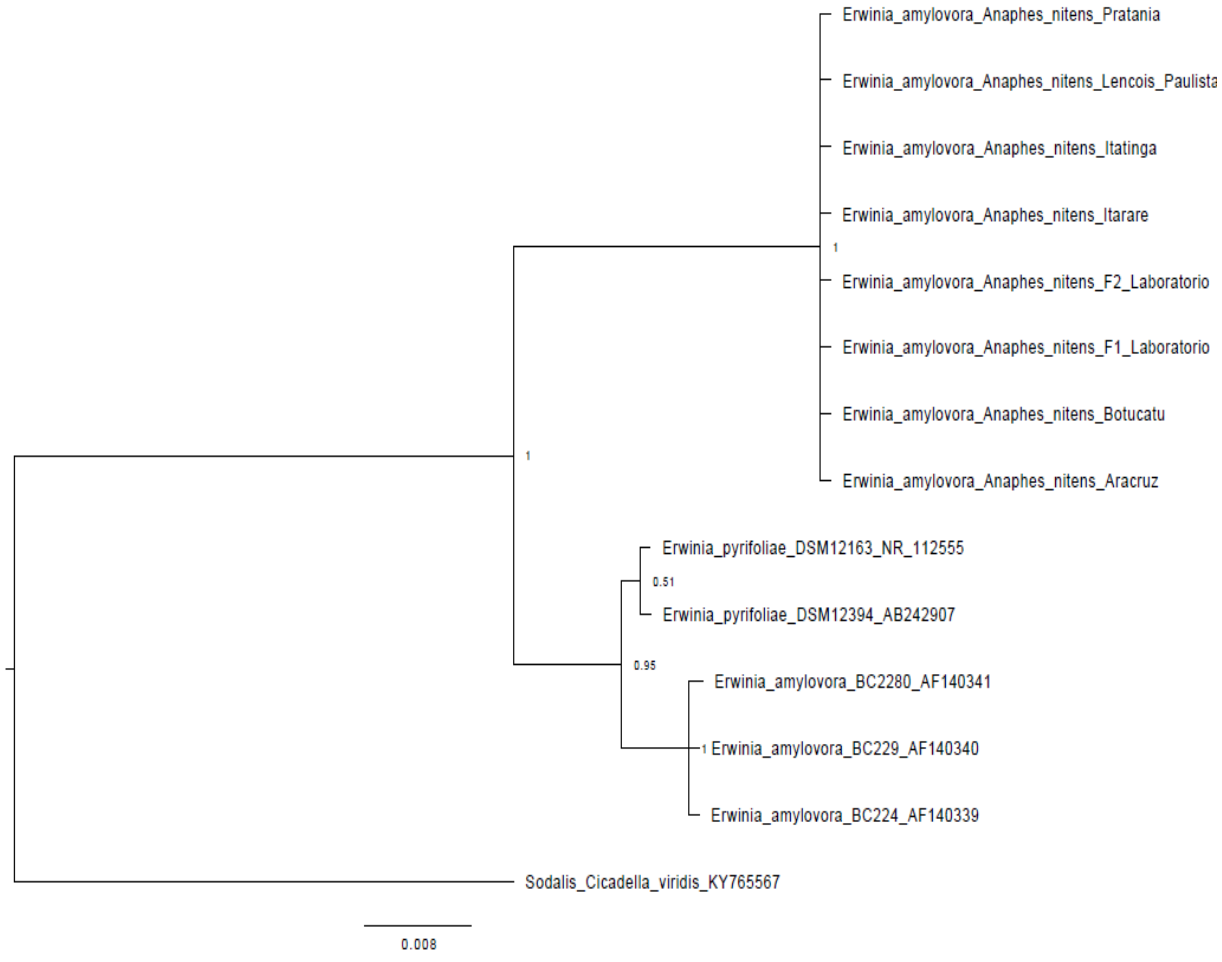
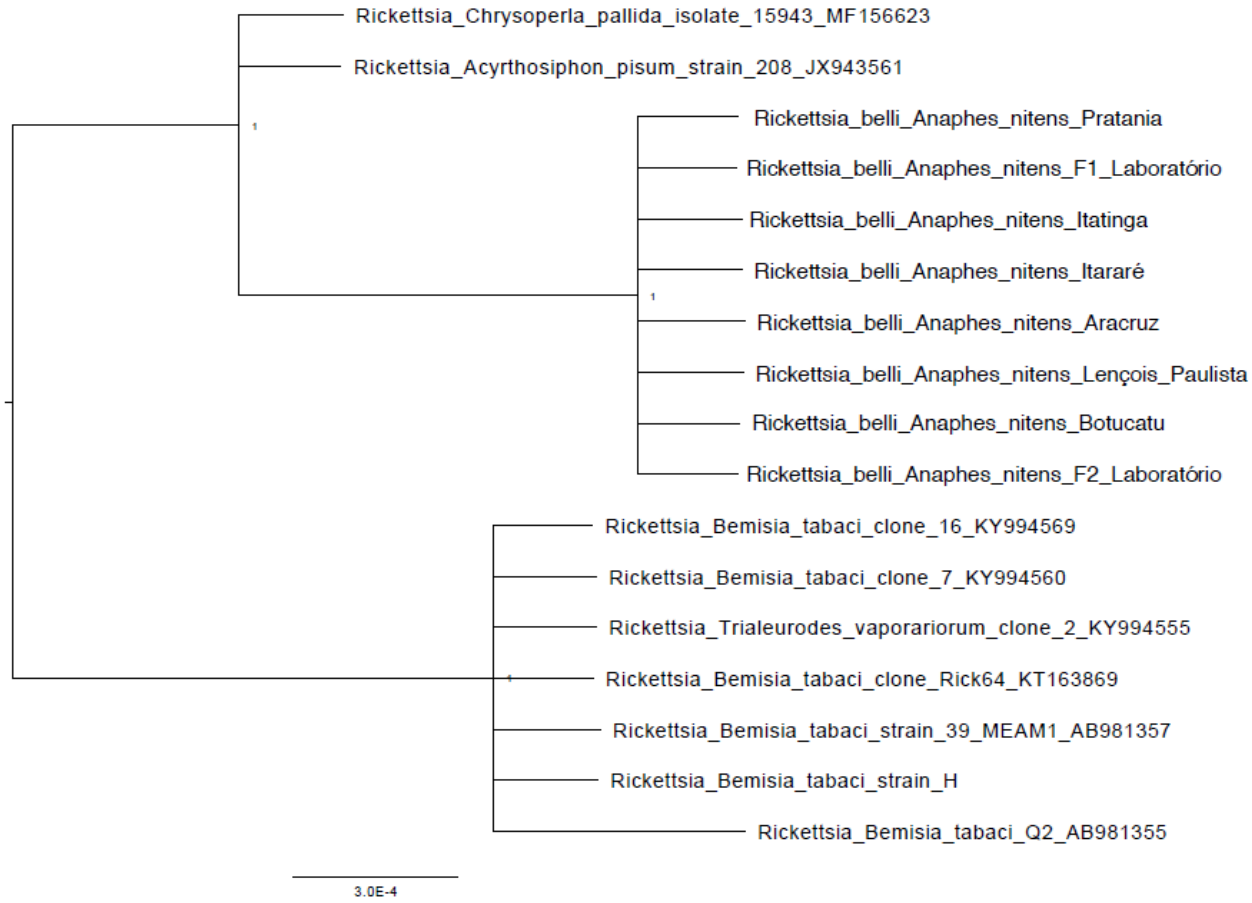


Figura 7. Análise filogenética para amostras de *Rickettsia belli* simbionte de diferentes populações de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae).



Identificação no hospedeiro

Foi possível utilizar a técnica FISH apenas para o endossimbionte *Rickettsia,* para a bactéria *Yersinia* foi utilizada sonda baseada no primer para *Arsenophonus* empregado na prospecção de endossimbiontes (Tabela 2), porém não houve hibridização no corpo do hospedeiro. Os gêneros *Erwinia* e *Serratia* não possuíam sondas específicas disponíveis e a obtenção das mesmas não aconteceu em tempo hábil para a realização dos testes.

Rickettsia se mostrou amplamente distribuída por todo o abdômen do inseto, sendo difícil precisar quais seriam os órgãos afetados (Figura 8).

Figura 8. Adultos de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) visualizados com a utilização de microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5, endossimbionte *Rickettsia* (vermelho) para todo o hospedeiro (A) e detalhe para o abdômen (B).

2.4 Discussão

A hipótese de que a população de *A. nitens* presente no Estado de São Paulo apresentava menores valores de parasitismo devido à presença de alguma bactéria simbionte ou patogênica diferente das encontradas para a população do Espírito Santo não foi comprovada, pois todas as bactérias encontradas para *A. nitens* estavam presentes em todas as populações avaliadas. No entanto, as avaliações realizadas tiveram apenas caráter qualitativo, não sendo verificado se existe diferença entre os parâmetros quantitativos das bactérias entre as populações hospedeiras e se esse equilíbrio atua sobre o comportamento de parasitismo.

A prospecção de bactérias em *A. nitens* resultou na detecção de uma espécie endossimbionte celular (*R. belli*) e três espécies associadas à microbiota intestinal do hospedeiro (*Y. massiliensis*, *E. amylovora* e *S. grimesii*). A colonização de insetos por bactérias simbiontes não tem sido estudada para a maioria das espécies e não há clareza se as espécies de insetos possuem uma microbiota natural ou se a adquirem a partir do ambiente e da alimentação, assim como não há certeza sobre o grau de permanência de bactérias ingeridas (Dillon & Dillon, 2004). Para tripes, é conhecido que bactérias nativas da microbiota do hospedeiro são capazes de

persistir por 50 gerações nos insetos, enquanto bactérias ingeridas pelo alimento não persistem para a próxima geração (Vries et al., 2001). Dessa maneira, se considerou neste trabalho que as bactérias que foram encontradas em *A. nitens* e ausentes nos ovos de *G. platensis* (hospedeiro) são específicas do parasitoide e possuem transmissão vertical, persistindo na população.

O gênero *Yersinia* contém atualmente 15 espécies comumente encontradas em solo, fontes de água, animais, alimentos e esgoto. Destas, *Y. enterocolica, Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* são patogênicas para o homem e animais, *Y. entomophaga* é patogênica a insetos, e as demais são tidas como bactérias oportunistas não-patogênicas (Merhej et al., 2008; Hurst et al., 2011; Souza et al., 2011). A espécie *Y. massiliensis* foi originalmente descrita como bactéria gram-negativa de vida livre encontrada em água doce (Merhej et al., 2008) e este é o primeiro relato da bactéria associada a um inseto como hospedeiro.

Serratia grimesii é uma enterobactéria originalmente isolada do ambiente e de seres humanos (Grimont, 1982), com relatos para a microbiota intestinal de coleópteros (Yilmaz et al., 2006, Hérnandez et al., 2015). Foi a única das bactérias prospectadas encontrada em adultos e ovos de *G. platensis*, indicando possível transmissão vertical para este hospedeiro. A detecção de *S. grimesii* em *Pyemotes* sp., nas populações de *A. nitens* e nas gerações F1 e F2 pode ser decorrente do fato destes organismos se alimentarem de ovos de *G. platensis*, indicando transmissão horizontal via ingestão.

Erwinia amylovora é caracterizada como agente causal da podridão de frutas, doença quarentenária para o Brasil que afeta culturas da família das rosáceas e solanáceas, como a macieira (Brasil, 2008). Os principais meios de transmissão da bactéria são vento, chuva e insetos, nos quais *E. amylovora* se adere externamente ao corpo do inseto vetor, sendo capaz de sobreviver até 72 horas sobre *Aphis pomi* (Hemiptera: Aphididae) (Plurad et al., 1965; Hildebrand et al., 2000). Devido ao tempo de sobrevivência fora da planta, é improvável que a bactéria esteja localizada no exterior de *A. nitens*, uma vez que não foi encontrada em ovos de *G. platensis.* Porém, foi detectada nas gerações F1 e F2 de *A. nitens*, apresentando transmissão vertical. Este é o primeiro relato para a bactéria atuando como bactéria intestinal em um inseto. Os efeitos para o hospedeiro e se o parasitoide poderia atuar como vetor para plantas ainda não estão esclarecidas.

Rickettsia belii é uma α-proteobactéria endossimbionte, transmitida verticalmente. Espécies do gênero *Rickettsia* podem interferir na razão sexual do hospedeiro durante a embriogênese eliminando os indivíduos machos (Von Der Schulenburg et al., 2001) ou, em algumas espécies da ordem Hymenoptera, interferir no processo meiótico dos gametas, induzindo a formação de células diploides e originando apenas fêmeas por meio de partenogênese telítoca (Adachi-Hagimori et al., 2008; Nugnes et al., 2015). A alteração na razão sexual da espécie hospedeira em favor de maior proporção de fêmeas é uma ferramenta encontrada por bactérias presentes no citoplasma para propagar sua própria transmissão, uma vez que são necessariamente transmitidas para a próxima geração via óvulo (Ishikawa, 2003). Contudo, no caso de *A. nitens* o endossimbionte foi encontrado tanto em indivíduos fêmeas quanto em machos, refutando a hipótese de interferência na razão sexual. A presença de bandas mais fortes para o endossimbionte no gel de agarose para as fêmeas pode indicar uma maior concentração de *Rickettsia,* possivelmente por estas serem as responsáveis por transmitir a bactéria para a próxima geração. Ao analisar a distribuição no corpo do hospedeiro pelo FISH (Figura 8) se constatou que ela se encontra amplamente distribuída por todo o abdômen do inseto, sendo difícil determinar quais seriam os órgãos ou tecidos infectados. Em *Bemisia tabaci*, *Rickettsia* pode ser detectada na hemolinfa de ambos os sexos do hospedeiro, ocorrendo de maneira dispersa em todas as partes do corpo (Gottlieb et al., 2006), em condição semelhante à encontrada neste estudo.

Os gêneros de bactérias intestinais encontrados apresentam grande diversidade de funções ecológicas e podem atuar de maneira benéfica ou não ao hospedeiro, dependendo da espécie. O gênero *Serratia*, por exemplo, compreende grande variedade de espécies patogênicas a humanos, plantas, insetos, nematoides e corais. Em contrapartida, *S. symbiotica* atua como endossimbionte secundário benéfico em afídeos, aumentando a tolerância a altas temperaturas, conferindo resistência a patógenos e sintetizando aminoácidos. Ao mesmo tempo diminui a longevidade de predadores que venham a se alimentar de insetos hospedeiros deste endossimbionte (Petersen et al., 2013; Costopoulos et al., 2014; Foray et al., 2014). Já *Y. pestis*, além de ser o agente causal da peste bubônica, reduz a longevidade de seu hospedeiro *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) em baixas temperaturas (Schotthoefer et al., 2011).

Para *E. amylovora* e *Y. massiliensis* este é o primeiro relato das espécies atuando como endossimbiontes em insetos e sua influência sobre o hospedeiro *A. nitens* ainda não foram definidas, assim como para *S. grimesii* e *R. belli*. Logo, são necessários estudos futuros para quantificar a presença destes simbiontes nas diferentes populações do hospedeiro, assim como a obtenção de uma população apossimbionte, a fim de definir a interferência dos mesmos no “fitness” e capacidade de parasitismo do parasitoide.

Referências Bibliográficas

Adachi-Hagimori T, Miura K, Stouthamer R. 2008. A new cytogenetic mechanism for bacterial endosymbiont-induced parthenogenesis in Hymenoptera. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 275(1652): 2667-2673.

Baumann P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. Annual Review of Microbiology 59: 155-189.

Brasil. 2008. Instrução Normativa nº 41 de 01 de julho de 2008. MAPA. Brasília: Diário Oficial da União.

Costopoulos K, Kovacs JL, Kamins A, Gerardo NM. 2014. Aphid facultative symbionts reduce survival of the predatory lady beetle *Hippodamia convergens*. BMC ecology 14(1): 5.

Dedeine F, Bandi C, Boulétreau M, Kramer LH. 2003. Insights into *Wolbachia* obligatory symbiosis. In: Bourtzis K, Miller TA Insect Symbiosis. Boca Raton: CRC Press: 267-282.

Dillon RJ, Dillon VM. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. Annual Review of Entomology 49(1): 71–92.

Douglas AE. 1992. Microbial brokers of insect-plant interactions. Proc. 8th Int. Symp. Insect-Plant Relationships, pp. 329–36. Dordrecht, Neth.: Kluwer

Fleury F, Vavre F, Ris N, Fouillet P, Boulétreau M. 2000. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. Parasitology 121(5): 493–500.

Foray V, Grigorescu AS, Sabri A, Haubruge E, Lognay G, Francis F, Fauconier ML, Hance T, Thonart P. 2014. Whole-genome sequence of *Serratia symbiotica* strain cwbi-2.3 t, a free-living symbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. Genome announcements 2(4): e00767-14.

Fukatsu T, Nikoh N. 1998. Two intracellular symbiotic bacteria from the mulberry psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). Applied and Environmental Microbiology 64(10): 3599-3606.

Furihata S, Hirata M, Matsumoto H, Hayakawa Y. 2015. Bacteria endosymbiont, *Wolbachia*, promotes parasitism of parasitoid wasp *Asobara japonica*. PloSone 10(10): 0140914.

Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, Gerling D, Portnoy V, Steinberg S, Tzuri G, Horowitz AR, Belausov E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Gershon M, Gal S, Katzir N, Zchori-Fein E. 2006. Identification and localization of a *Rickettsia* sp in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Applied Environmental Microbiology 72(5): 3646–3652.

Gottlieb Y, Ghanim M, Gueguen G, Kontsedalov S, Vavre F, Fleury F, Zchori-Fein E. 2008. Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. The FASEB Journal 22(7): 2591–2599.

Grimont PA, Grimont F, Irino K. 1982. Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* sensu stricto, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov. Current Microbiology 7(2): 69-74.

Gumovsky A, Little D, Rothmann S, Jaques L, Mayorga SEI. 2015. Re-description and first host and biology records of *Entedon magnificus* (Girault & Dodd) (Hymenoptera, Eulophidae), a natural enemy of *Gonipterus* weevils (Coleoptera, Curculionidae), a pest of *Eucalyptus* trees. Zootaxa 3957(5): 577-584.

Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H, Nardon P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. Proceedings of the National Academy Sciences 96(12): 6814–6819.

Hernández N, Escudero JA, Millán ÁS, González-Zorn B, Lobo JM, Verdú JR, Suárez M. 2015. Culturable aerobic and facultative bacteria from the gut of the polyphagic dung beetle *Thorectes lusitanicus*. Insect science 22(2): 178-190.

Hildebrand M, Dickler E, Geider K. 2000. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in a fire blight orchard. Journal of Phytopathology 148(4): 251-256.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17(8): 754-755.

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

Kikuchi Y. 2009. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. Microbes and Environments 24(3): 195-204.

Marubayashi JM, Kliot A, Yuki VA, Rezende JAM, Krause-Sakate R, Pavan MA, Ghanim M. 2014. Diversity and localization of bacterial endosymbionts from whitefly species collected in Brazil. PloS one 9(9): e108363.

Montenegro H, Solferini VN, Klaczko LB, Hurst GDD. 2005. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. Insect Molecular Biology 14 (3): 281-287.

Merhej V, Adékambi T, Pagnier I, Raoult D, Drancourt M. 2008. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58 (4): 779-784.

Nedoluzhko AV, Kadnikov VV, Beletsky AV, Sharko FS, Tsygankova SV, Mardanov AV, Ravin NV, Skryabin KG. 2017. Microorganisms associated with microscopic insects *Megaphragma amalphitanum* and *Scydosella musawasensis*. Microbiology 86(4): 533-535.

Nováková E, Hypša V, Moran NA. 2009. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. BMC Microbiology 9 (1): 143.

Nugnes F, Gebiola M, Monti MM, Gualtieri L, Giorgini M, Wang J, Bernardo U. 2015. Genetic diversity of the invasive gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* endosymbiont, and associated sex-ratio differences. PloS One 10(5): e0124660.

Petersen LM, Tisa LS. 2013. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. Canadian Journal of Microbiology 59(9): 627–640.

Rekha R, Alam Rizi M, Jaishree P. 2006. Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. Electronic Journal of Biotechnology 9(5): 0-0.

Ribeiro MF, Hilario LEDC, Horta AB, Souza NM, Wilcken CF. 2018. Influence of *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae) in the parasitism of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae).In: First IUFRO working party: improving forest health on commercial plantations, 1, 2018, Punta del Este. Book of Abstracts..., Punta del Este: IUFRO. p. 57.

Sandström JP, Russell JA, White JP, Moran NA. 2001. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. Molecular Ecology 10 (1): 217-228.

Schotthoefer AM, Bearden SW, Holmes JL, Vetter SM, Montenieri JA, Williams SK, Graham CB, Woods ME, Eisen RJ, Gage KL. 2011. Effects of temperature on the transmission of *Yersinia Pestis* by the flea, *Xenopsylla cheopis*, in the late phase period. Parasites & vectors 4(1): 191.

Souza NM, Junqueira LR, Wilcken CF, Soliman EP, Carmargo MB, Nickele MA, Barbosa LR. 2016. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). Circular Técnica 209. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais 20 p.

Souza RA, Falcao DP, Falcao JP. 2011. Emended description of *Yersinia massiliensis*. International journal of systematic and evolutionary microbiology 61(5): 1094-1097.

Thao ML, Baumann P. 2004. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. Applied Environmental Microbiology 70(6): 3401– 3406.

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

Valente C, Afonso C, Gonçalves CI, Alonso-Zarazaga MA, Reis A, Branco M. 2017. Pre-selection and biological potential of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for the control of the Eucalyptus snout beetle, *Gonipterus platensis*. Journal of Pest Science 90(3): 911-923.

Vries EJ, Jacobs G, Breeuwer JAJ. 2001. Growth and transmission of gut bacteria in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. J. Invertebr. Pathol 77(2):129–37.

Von Der Schulenburg JHG, Habig M, Sloggett JJ, Webberley KM, Bertrand D, Hurst GD, Majerus ME. 2001. Incidence of Male-Killing *Rickettsia* spp. (α-Proteobacteria) in the Ten-Spot Ladybird Beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). Applied and Environmental Microbiology 67(1): 270-277.

Wilcken CF, Oliveira NC. 2015. Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli. In: Villela EF, Zucchi RA. Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros. Piracicaba: FEALQ: 779-791.

Yilmaz H, Sezen K, Kati H, Demirbağ Z. 2006. The first study on the bacterial flora of the European spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). Biologia 61(6): 679-686.

Zchori-Fein E, Brown JK. 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Annals of the Entomological Society of America 95(6): 711– 718.

Zchori-Fein E, Perlman SJ. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. Molecular Ecology 13(7): 2009-2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gorgulho-do-eucalipto, *Gonipterus platensis*, ressurgiu como praga primária para o Estado de São Paulo e centro do Paraná a partir do final de 2012, acompanhada de queda na eficiência de parasitismo por *Anaphes nitens*. Contudo, nos demais Estados em que se encontra no país, o inseto-praga está em equilíbrio populacional com o parasitoide e não ocorrem surtos.

Este trabalho teve como objetivo entender fatores que poderiam estar influenciando a capacidade de parasitismo, com um enfoque nas características do parasitoide, procurando diferenças entre populações.

O primeiro passo foi comparar as taxas de parasitismo entre duas populações do parasitoide, uma proveniente de local onde existem surtos (São Paulo) e outra vinda de região onde este é eficiente no controle da praga (Espírito Santo). Porém, quando em condições controladas de laboratório ambas as populações apresentaram alto controle do inseto-praga e não diferiram estatisticamente.

Ainda tentando entender melhor as características de *A. nitens* realizou-se a prospecção de bactérias simbiontes, que poderiam de alguma maneira influenciar negativamente o “fitness” do hospedeiro e, como consequência, o parasitismo por ele realizado.

Foram encontrados uma espécie de bactéria endossimbionte celular (*Rickettsia belli*) e três espécies de bactérias simbiontes de intestino (*Serratia grimesii, Yersinia massiliensis* e *Erwinia amylovora*). Destas, apenas *S. grimesii* deve possuir transmissão horizontal, sendo adquirida pelo parasitoide por se alimentar do ovo de *G. platensis*, enquanto as demais são naturais de *A. nitens* e transmitidas verticalmente. Como todas as populações avaliadas apresentaram a mesmas espécies simbiontes, descartou-se a hipótese de que as diferenças encontradas de parasitismo fossem devido a uma associação bactéria-hospedeiro.

O presente trabalho avançou no conhecimento sobre *A. nitens,* pois este é o primeiro relato para estas bactérias atuando como simbiontes no inseto e o primeiro relato de *E. amylovora* e *Y. massiliensis* atuando como simbiontes de intestino. As influências que estas bactérias acarretam no hospedeiro ainda não foram definidas,

sendo necessários testes futuros comparando-se parâmetros biológicos, reprodutivos e de parasitismo com hospedeiro livre dessas bactérias.

Apesar disso, não foi possível definir a causa dos surtos localizados de *G. platensis* no Brasil. As hipóteses de que o baixo parasitismo seja referente estritamente a uma característica do parasitoide perdem força, dando lugar para hipóteses que contemplem relações mais complexas entre parasitoide-hospedeiro, relações tritróficas (incluindo a árvore atacada) ou alterações climáticas.

REFERÊNCIAS

ADACHI-HAGIMORI, T.; MIURA, K.; STOUTHAMER, R. A new cytogenetic mechanism for bacterial endosymbiont-induced parthenogenesis in Hymenoptera. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1652, p. 2667-2673, 2008.

BARBIELLINE, A.A. Combate à praga do eucalipto no sul. **Chácaras e Quintais**, v.91, n.2, p.191-192, 1955.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**., v. 59, p. 155-189, 2005.

BERTI FILHO, E. et al. Ocorrência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em adultos de *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal) (Coleoptera, Curculionidae). **Revista de Agricultura**, SP, v. 67, n. 3, p. 293-294, 1992.

BIEZANKO, C. M.; BOSQ, J. M. Cerambycidae de Pelotas e seus arredores. **Acros**, v. 9, p. 3-15, 1956

CAZEMIER, A. E. et al. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. **Microbial ecology**, v. 33, n. 3, p. 189-197, 1997.

CHEN, D. Q.; MONTLLOR, C. B.; PURCELL, A. H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 95, n. 3, p. 315-323, 2000.

COLMAN, D. R.; TOOLSON, E. C.; TAKACS-VESBACH, C. D. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? **Molecular Ecology**, v. 21, n. 20, p. 5124-5137, 2012.

CORDERO RIVERA, A.; SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; ANDRÉS, J. A. Life cycle and biological control of the Eucalyptus snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 1, n. 2, p. 103–109, 1999.

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

COSTA, V. A. et al. Eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle (Hymenoptera: Eulopjidae) in Brazil: new forest pest reaches the New World. **Revista de Agricultura**, v. 83, n. 2, p. 136-139, 2008.

CUNHA, U. S. et al. Ocorrência do ácaro *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae) em criações de insetos em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 563-565, 2006.

DOUGLAS, A. E. On the source of sterols in the green peach aphid, *Myzus persicae*, reared on holidic diets. **Journal of insect physiology**, v. 34, n. 5, p. 403-408, 1988.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects–diversity in structure and function. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

EPPO. Data sheets on quarantine pest: *Gonipterus gibberus* and *Gonipterus scutellatus*. **Bulletin,** v. 35, n. 3, p. 368-370, 2005.

FAO. Part II. Profiles of selected forest pests: *Gonipterus scutellatus.* **FAO Forestry Paper 156:** Global review of forest pests and diseases, p. 81-83, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/i0640e/i0640e00.htm>. Acesso em: 24 jan. 2018.

FLEURY, F. et al. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Parasitology**, v. 121, n. 5, p. 493–500, 2000.

FREITAS, S. **Contribuição ao estudo da morfologia e biologia de Gonipterus gibberus (Boisduval, 1835) (Coleoptera, Curculionidae) e levantamento dos danos causados por esta espécie em eucaliptos dos arredores de Curitiba**. 1979. 95 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979.

FURIHATA, S. et al. Bacteria endosymbiont, *Wolbachia,* promotes parasitism of parasitoid wasp *Asobara japonica*. **PloSone**, v.10, n. 10, p. 0140914.2015

GALLO, D. et al. Anatomia Interna e Fisiologia. In: GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. cap 5, p. 129-170.

GUMOVSKY, A. et al. Re-description and first host and biology records of *Entedon magnificus* (Girault & Dodd) (Hymenoptera, Eulophidae), a natural enemy of *Gonipterus* weevils (Coleoptera, Curculionidae), a pest of *Eucalyptus* trees. **Zootaxa**, v. 3957, n. 5, p. 577-584, 2015.

HONGOH, Yuichi. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 6, p. 1145-1151, 2010.

HORTA, A. B. et. al. Suscetibilidade de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae) In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 15, 2017, Ribeirão Preto. **Anais ...**, Ribeirão Preto: SEB, 2017a. p. 397.

HORTA, A. B. et al. Action of *Bacillus thuringiensis* on *Eucalyptus* Snout Beetle *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF ARTHROPODS, 5, 2017, Langkawi. **Proceedings…,** Langkawi: CABI, 2017b. p. 263-265.

HOSOKAWA, T. et al. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. **PLoS biology**, v. 4, n. 10, p. e337, 2006.

HUBER, J. T.; PRINSLOO, G. L. Redescription of *Anaphes nitens* (Girault) and description of two new species of *Anaphes* Haliday (Hymenoptera: Mymaridae), parasites of *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) in Tasmania**. Austral Entomology**, v. 29, n. 4, p. 333-341, 1990.

HURLEY, B. P. et al. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**. v.18, n.4, p.921-933, 2016.

IEDE, E.T. Importância das pragas quarentenárias florestais no comércio internacional: estratégias e alternativas para o Brasil. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2005.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. Relatório Anual, 2017. 80p. Disponível em:< http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf>. Acesso em: 15 nov 2018.

ISHIKAWA, H. Insect Symbiosis: An Introduction. In: BOURTZIS, K; MILLER, T. A. **Insect Symbiosis**, Boca Raton: CRC Press, 2003. cap. 1, p. 1-21.

JEGER, M. et al. Pest categorisation of the Gonipterus scutellatus species complex. **EFSA Journal**, v. 16, n. 1, 2018.

KIKUCHI, Y.9. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 195-204, 2009.

KOBER, E. Observações preliminares da ação de diversos inseticidas orgânicos de síntese, no controle ao *Gonipterus gibberus* Boisduvalli, praga do eucalipto. **Agronomia Sulriograndense**, v. 2, p. 30-40, 1955.

LAMELAS, A. et al. Evolution of the secondary symbiont “Candidatus *Serratia symbiotica*” in aphid species of the subfamily Lachninae. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 13, p. 4236-4240, 2008.

LOCH, A.D. Parasitism of the Eucalyptus weevil, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal, by the egg parasitoid *Anaphes nitens* Girault in *Eucalyptus globulus* plantations in southwestern Australia. **Biological Control**, v. 47, n. 1, p. 1–7, 2008.

LUBIANCA, J. L. O *Gonipterus gibberus* Boisduval, como praga do eucalipto no Rio Grande do Sul. **A Granja**, v. 11, p. 54- 57, 1955.

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

MARELLI, C.A. El gorgojo de los eucaliptos halladoenla Argentina no es laespecie originaria de Tasmania "*Gonipterus scutellatus*" Gyll. **Revista del Museo de La Plata**, v.30, p.257-269, 1927.

MAYORGA S. I.; JAQUES, L.; PERAGALLO, M. *Anaphes tasmaniae*, parasitoid of *Gonipterus platensis* (Marelli, 1926) (Coleoptera: Curculionidae) introduced in Chile. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF ARTHROPODS, 4, 2013, Pucón, Chile. **Proceedings…,** Pucón: CABI, 2013. p. 298.

MONTLLOR, C. B.; MAXMEN, A.; PURCELL, A. H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. **Ecological Entomology**, v. 27, n. 2, p. 189-195, 2002.

MORAES, G. J.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de acarologia:** acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2008, 288 p.

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

NICOLETTI, G. et al. Suscetibility of *Gonipterus platensis* to entomopathogenic nematodes. In: FIRST IUFRO WORKING PARTY: IMPROVING FOREST HEALTH ON COMMERCIAL PLANTATIONS, 1, 2018, Punta del Este. **Book of Abstracts...,** Punta del Este: IUFRO, 2018. p. 61.

OLIVEIRA, N. C. **Biologia de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) em *Eucalyptus* spp. em diferentes temperaturas**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

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

RIBEIRO, M. F. et al. Influence of *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae) in the parasitism of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae).In: FIRST IUFRO WORKING PARTY: IMPROVING FOREST HEALTH ON COMMERCIAL PLANTATIONS, 1, 2018, Punta del Este. **Book of Abstracts...,** Punta del Este: IUFRO, 2018. p. 57.

ROSADO-NETO, G.H.; MARQUES, M.I. Características do adulto, genitália e formas imaturas de *Gonipterus gibberus* Boisduval e *G. scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, n. 1, p. 77-90, 1996.

RUSSELL, J. A.; MORAN, N. A. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. **Proceedings of the Royal Society of London B**: Biological Sciences, v. 273, n. 1586, p. 603-610, 2006.

SAG – SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. **Informativo Fitosanitario Florestal**, n. 9, 2014.Disponível em: <http://www.sag.cl/sites/default/files/informativo_9.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2018.

SAG – SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. **Balance de gestión integral año 2015**, v. 1, n. 1, 2016.Disponível em: <http://www.sag.cl/sites/default/files/bgi_sag_2015_vf.pdf >. Acesso em: 19 abr. 2018.

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

SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; CORDERO RIVERA, A. Egg load and adaptive superparasitism in *Anaphes nitens*, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 106, n. 2, p. 127-134, 2003a.

SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; CORDERO RIVERA, A. Superparasitism and sex ratio adjustment in a wasp parasitoid: results at variance with Local Mate Competition? **Oecologia**, v. 136, n. 3, p. 365-373, 2003b.

SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; RODRIGUEZ-ILLAMOLA, A.; CORDERO RIVERA, A. Host finding and host discrimination ability in *Anaphes nitens* Girault, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. **Biological Control**, v. 29, n. 1, p. 24-33, 2004.

SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; RODRÍGUEZ-ILLAMOLA, A.; CORDERO RIVERA, A. Thermal requirements and phenology of the eucalyptus snout beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. **Journal of Applied Entomology**, v. 130, n. 6-7, p. 368-376, 2006.

SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; PESTAÑA NIETO, M.; CORDERO RIVERA, A. Maternal size and age affect offspring sex ratio in the solitary egg parasitoid *Anaphes nitens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 125, n.1, p. 23-32, 2007.

SCHUHLI, G. S. et al. A review of the introduced forest pests in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasilia, DF, v. 51, n. 5, p. 397-406, 2016.

SOUZA, N. M. ***Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae):** infestação em eucalipto, aspectos morfológicos e biológicos e controle. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

SOUZA, N. M. et al. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). **Circular Técnica 209**. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2016. 20 p.

TOMCZYK-SOCHA, M. et al. Outbreak of occupational dermatitis associated with *Pyemotes ventricosus*. **JAMA dermatology**, v. 153, n. 7, p. 686-688, 2017.

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

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

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

VON DER SCHULENBURG, J. H. G. et al. Incidence of Male-Killing *Rickettsia* spp. (α-Proteobacteria) in the Ten-Spot Ladybird Beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 270-277, 2001.

WIER, A. M. et al. Transcriptional patterns in both host and bacterium underlie a daily rhythm of anatomical and metabolic change in a beneficial symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 200909712, 2010.

WILCKEN, C. F. et al. Ocorrência do psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei)* em florestas de eucalipto no Brasil. **Circular técnica IPEF**, v. 201, p 1-11, 2003.

WILCKEN, C. F.; OLIVEIRA, N. C. Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli. In: VILLELA E. F.; ZUCCHI, R. A. **Pragas Introduzidas no Brasil**: Insetos e Ácaros. Piracicaba: FEALQ, 2015.cap. 45, p. 779-791.

WILCKEN, C. F. et al. Ocorrência de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) em plantações de eucalipto no Estado do Espírito Santo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 113-115, 2008a.

WILCKEN, C. F. et al. Biological control of eucalyptus snout beetle (*Gonipterus scutellatus*) in eucalyptus clonal plantations in Espirito Santo State, Brazil. In: IUFRO RECENT ADVANCES IN FOREST ENTOMOLOGY, 2008, Pretoria, **Proceedings...** Pretoria: University of Pretoria, 2008b. p. 41.

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