

# **BIOLOGIA E PLANTAS HOSPEDEIRAS DE UMA NOVA ESPÉCIE GALÍCOLA DE EUCALIPTOS EM PORTUGAL - *OPHELMUS* SP.**

**Sónia Maria Gomes Matos**

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais**

Orientador: Professora Doutora Manuela Rodrigues Branco Simões  
Co-orientador: Mestre André Filipe Fidalgo Casquilho Garcia

**Júri:**

Presidente: Doutor António Manuel Dorotêa Fabião, Professor Associado com  
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Manuela Rodrigues Branco Simões, Professora Auxiliar com  
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa  
Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor Auxiliar do Instituto Superior de  
Agronomia da Universidade de Lisboa

## Agradecimentos

À Professora Doutora Manuela Branco pela sua disponibilidade e orientação científica.

Ao Eng. André Garcia, pelo seu apoio e ajuda nos trabalhos de campo e co-orientação deste trabalho.

Agradeço à empresa Portucel Soporcel, ao Dr. Carlos Valente e à sua equipa do RAIZ pela sua colaboração e ajuda no fornecimento de material vegetal para o ensaio.

Ao Eng. Sanchez do ICNF pela sua disponibilidade e acesso à Mata Nacional do Escaroupim.

À Liliana Vilas Boas pelos ensinamentos, paciência e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais por sempre me terem incentivado perante os desafios.

Ao Paulo pela sua compreensão e apoio incondicional.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do Projecto PTDC/AGR-CFL/111877/2009 "Pragas exóticas de citrinos e eucaliptos: otimizar estratégias de gestão para lidar com as invasões biológicas".

## Resumo

Em 2013, foi detectada em Portugal a presença de uma nova espécie ainda não identificada *Ophelimus* sp., no arboreto de *Eucalyptus* spp. do Instituto Superior de Agronomia. O presente trabalho visa estudar alguns aspectos bio-ecológicos de *Ophelimus* sp., relevantes para o controlo desta praga e diferenças relativamente a *Ophelimus maskelli*. Observaram-se diferenças morfológicas entre as galhas e os adultos de *Ophelimus* sp e de *O. maskelli*, assim como nas espécies hospedeiras. Registou-se maior número de galhas de *Ophelimus* sp. em *Eucalyptus globulus* e *E. viminalis*, enquanto se confirmou a preferência de *O. maskelli* por *E. camaldulensis*, *E. rudis* e *E. tereticornis*. Para *Ophelimus* sp. verificou-se também a existência de diferenças intra-específicas na dimensão das galhas e nível de infestação entre clones de *E. globulus*. A existência de uma única geração anual e a elevada mortalidade larvar e de pré-adulto, de cerca de 30% por factores desconhecidos, contribuirão para um crescimento mais lento das populações de *Ophelimus* sp. quando comparado com *O. maskelli*. As regiões mais frias, no Norte do País, parecem ser mais favoráveis ao desenvolvimento de *Ophelimus* sp. Não foi registada a presença do parasitóide, *Closterocerus chamaeleon*, ou outros parasitóides em *Ophelimus* sp., que permita o seu controlo biológico.

**Palavras-chave:** *Ophelimus* sp., *Eucalyptus* sp., insecto galícola, plantas hospedeiras, espécie invasora, *Closterocerus chamaeleon*.

## **Abstract**

In 2013, a new *Ophelimus* sp. was detected in a *Eucalyptus* arboretum in Lisbon. This study aims to study the bio-ecological characteristics of *Ophelimus* sp. as basic knowledge for its management. We further compare it with the previous introduced species *Ophelimus maskelli*. Our results showed morphological differences on the galls and adults of *O. maskelli* and *Ophelimus* sp., and on the host species. *Eucalyptus globulus* and *E. viminalis* were the most susceptible species to *Ophelimus* sp., whereas it was confirmed a preference of *O. maskelli* for *E. camaldulensis*, *E. rudis* and *E. tereticornis*. Intraspecific differences regarding gall size and infestation levels of *Ophelimus* sp. within *E. globulus* were further registered. *Ophelimus* sp. has one generation per year and about 30% of larvae and pre-adult mortality was registered due to unknown factors. These traits will contribute to a slower growth rate of its populations when compared to those of *O. maskelli*. In the North of Portugal, *Ophelimus* sp. seems to be better adapted, as indicated by the higher population levels compared to those observed in the South. From our surveys, we did not find galls with *Closterocerus chamaeleon* or any other parasitoid that could allow for the biocontrol of *Ophelimus* sp.

**Keywords:** *Ophelimus* sp., *Eucalyptus* sp., gall wasp, host plants, invasive species, *Closterocerus chamaeleon*.

## Extended Abstract

*Ophelimus maskelli* Ashmead and *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle are two Australian gall wasps belonging to the family Eulophidae and that could be found in the Mediterranean countries. In Portugal, only *L. invasa* and *O. maskelli* have economic impact on eucalyptus plantations. *Leptocybe invasa* was first detected in 2003 and *O. maskelli* was detected in 2006 near Lisbon. In 2005, a parasitoid of *O. maskelli*, *Closterocerus chamaeleon* Girault was successfully introduced in Israel in order to control this gall wasp populations. The parasitoid was later introduced in Italy and in 2006 was discovered for the first time in Portugal.

In 2010, in France, an undescribed species of *Ophelimus* was detected for the first time in leaves of *E. globulus*. *Ophelimus* sp. galls were detected in *E. cinerea*, *E. globulus*, *E. gunnii*, *E. nichollii* e *E. parvula*. Since *E. globulus* is the most planted species in Portugal, it is possible that economic losses caused by this new species will increased with the intensification of *E. globulus* plantations.

Since this biology is still little known in the literature and considering that *Eucalyptus* are the most planted genus in Portugal, the present study main objective is to understand more about *Ophelimus* sp. biology. Thus, we observed the morphology of galls, larvae and adult insects of both *O. maskelli* and *Ophelimus* sp. *Ophelimus maskelli* galls are bigger and grow to both sides of the leaves, whereas *Ophelimus* sp. galls only grow to one side. Even though, the size of the gall could vary from one host to the other. Adults of both species have one major difference that is the presence of single setae on submarginal vein in *O. maskelli* and the presence two to four setas in the submarginal vein of *Ophelimus* sp.

Field surveys were performed in two places in order to understand the host range of *O. maskelli* and *Ophelimus* sp. in Portugal: the arboretum of Instituto Superior de Agronomia (Lisbon) and Mata Nacional do Escaroupim (Santarém). We observed that only eucalyptus species belonging to the Maidenaria section such as *E. globulus* and *E. viminalis* were attacked by *Ophelimus* sp. *Ophelimus maskelli* galls were registered in *E. tereticornis*, *E. rudis* e *E. camaldulensis*, all species belonging to the Exsertaria. Intraespecific differences were also found between two *E. globulus* clones (Tuga and G74).

Regarding biological control of the two gall wasps, we observed that no parasitoid emerged from galls of *Ophelimus* sp., whereas from *O. maskelli* galls, only emerged *C. chamaeleon* adults, which suggests that this parasitoid is specialized in *O. maskelli* larvae or the life cycle of *Ophelimus* sp. and *C. chamaeleon* do not overlap.

During four months, larvae development was registered and adult survival was studied at different temperatures and with different food regimes in order to understand the biological cycle of this insect. We observed that the larval development is quite long (October to April) and adults survival ranged few days up to three weeks depending on temperature and food. Egg development from April to September/October, is probably because of diapause period.

The fact that *Ophelimus* sp. has only one generation and high percentage of larvae mortality could indicate that this gall wasp has a slower development and thus smaller impact on eucalyptus than *O. maskelli*.

# Índice

Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Extended Abstract.....	iv
Índice de figuras.....	viii
Índice de tabelas.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1 Dados biométricos de <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp.....	7
2.2 Parasitismo de <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp.....	7
2.3 Espécies hospedeiras usadas por <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp. ....	8
2.3.1 Espécies hospedeiras em dois locais de Portugal.....	8
2.3.2 Comparação do número de galhas por folha entre três locais de Portugal ....	9
2.4 Utilização de <i>E. globulus</i> como espécie hospedeira de <i>Ophelimus</i> sp.....	9
2.4.1. Diferenças intraespecíficas - Clones (TUGA e G74) em folhas juvenis .....	9
2.4.2. Diferenças intraespecíficas - <i>E. globulus</i> em dois locais (Valongo e Arboreto do do ISA).....	10
2.5 Ciclo biológico de <i>Ophelimus</i> sp. ....	10
2.6 Mortalidade larvar de <i>Ophelimus</i> sp. e mortalidade do pré-adulto em clone TUGA .....	11
2.7 Sobrevivência dos adultos de <i>Ophelimus</i> sp. em laboratório a diferentes temperaturas .....	11
2.8 Análise Estatística .....	12
3. RESULTADOS.....	13
3.1 Dados biométricos de <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp.....	13
3.1.1 Galhas de <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp.....	13

3.1.2 Diferenças morfológicas entre os indivíduos adultos de <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp. ....	14
3.2 Parasitismo de <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp. ....	15
3.3 Espécies hospedeiras usadas por <i>O. maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp. ....	16
3.3.1 Espécies hospedeiras em dois locais de Portugal .....	16
3.3.2 Comparação do número de galhas por folha entre três locais de Portugal ..	18
3.4 Utilização de <i>E. globulus</i> como espécie hospedeira de <i>Ophelimus</i> sp.....	19
3.4.1 Diferenças intraespecíficas - Clones (TUGA e G74) em folhas juvenis .....	19
3.4.2 Diferenças intraespecíficas - <i>E. globulus</i> em dois locais (Valongo e Arboreto do ISA) .....	19
3.5 Ciclo biológico de <i>Ophelimus</i> sp. ....	20
3.6 Mortalidade larvar e mortalidade do pré-adulto em clone TUGA.....	23
3.7 Ciclo biológico hipotético de <i>Ophelimus</i> sp. ....	24
3.8 Sobrevivência dos adultos de <i>E. globulus</i> em laboratório a diferentes temperaturas .....	26
4. DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÃO .....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35

## Índice de Figuras

<b>Fig. 1:</b> A - <i>Eucalyptus rudis</i> com galhas de <i>Leptocybe invasa</i> (Mata Nacional do Escaroupim, 2014); B – <i>Eucalyptus camaldulensis</i> com galhas de <i>Ophelimus maskelli</i> (Arboreto do ISA). ...	2
<b>Fig. 2:</b> Galhas em <i>Eucalyptus rudis</i> observadas no Arboreto do Instituto Superior de Agronomia: A – <i>Leptocybe invasa</i> ; B – <i>Ophelimus maskelli</i> .....	4
<b>Fig. 3:</b> A- Folha jovem de <i>Eucalyptus rudis</i> colhida no Arboreto do ISA, coberta de galhas de <i>Ophelimus maskelli</i> em vários estados de desenvolvimento. B - Folha adulta de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> com presença de galhas da geração anterior (galhas furadas) e da geração em desenvolvimento (verdes) de <i>Ophelimus</i> sp. ....	13
<b>Fig. 4:</b> A - Folha jovem de <i>Eucalyptus globulus</i> colhida em Valongo, com galhas de <i>Ophelimus</i> sp. em desenvolvimento. B- Folha adulta de <i>Eucalyptus globulus</i> de Valongo, com presença de galhas desenvolvidas de <i>Ophelimus</i> sp. ....	13
<b>Fig. 5:</b> A - Indivíduo adulto de <i>Ophelimus maskelli</i> (Fonte: Protasov et al., 2007a); B - Indivíduo adulto de <i>Ophelimus</i> sp. (Foto: Autora). ....	15
<b>Fig. 6:</b> A - Pormenor da asa de <i>Ophelimus</i> sp. A seta indica a presença de quatro pêlos setáceos (Foto: André Garcia); B - Pormenor da asa de <i>Ophelimus maskelli</i> . A seta indica a presença de um pêlo setáceo (Foto: André Garcia). ....	15
<b>Fig. 7:</b> Espécies hospedeiras de <i>Ophelimus maskelli</i> presentes no Arboreto do ISA..	16
<b>Fig. 8:</b> Espécies hospedeiras de <i>Ophelimus maskelli</i> presentes na Mata do Escaroupim.....	17
<b>Fig. 9:</b> Espécies hospedeiras de <i>Ophelimus</i> sp. presentes no Arboreto do ISA.....	17
<b>Fig. 10:</b> Espécies hospedeiras de <i>Ophelimus</i> sp. presentes no Arboreto do ISA.....	18
<b>Fig. 11:</b> Comparação do número de galhas de <i>Ophelimus</i> sp. por folha (adultas) de <i>E. globulus</i> em três locais... ..	18
<b>Fig. 12:</b> Área (média ± erro padrão) de galhas de <i>Ophelimus</i> sp. em folhas adultas e jovens em <i>Eucalyptus globulus</i> de dois locais: Arboreto do ISA e Valongo.....	19
<b>Fig. 13:</b> Comprimento das larvas (mm) (média ± erro padrão) de <i>Ophelimus</i> sp. em folhas adultas e jovens presentes de <i>Eucalyptus globulus</i> em dois locais: Arboreto do ISA e Valongo.....	20
<b>Fig. 14:</b> Evolução da área das galhas de folhas de dois clones de <i>Eucalyptus globulus</i> (G74 e TUGA) recolhidas em Valongo e de folhas de <i>E. globulus</i> recolhidas no Arboreto do ISA ao longo do tempo. ....	21
<b>Fig. 15:</b> Evolução do comprimento das larvas de folhas de dois clones de <i>Eucalyptus globulus</i> (G74 e TUGA) recolhidas em Valongo e de folhas de <i>E. globulus</i> recolhidas no Arboreto do ISA ao longo do tempo. ....	21
<b>Fig. 16:</b> Larva (A) e Pupa (B) de <i>Ophelimus</i> sp. de <i>Eucalyptus globulus</i> de Valongo .	22

<b>Fig. 17:</b> Pupa de <i>Ophelimus</i> sp. de <i>Eucalyptus globulus</i> em desenvolvimento.....	22
<b>Fig. 18:</b> A, Larva morta no interior da galha; B, Pré-adulto morto no interior da galha. Ambas as galhas são do clone TUGA de <i>E. globulus</i> . .....	24
<b>Fig. 19:</b> Ciclo de vida hipotético de <i>Ophelimus</i> sp. em <i>Eucalyptus globulus</i> do Arboreto do ISA.....	25
<b>Fig. 20:</b> Ciclo de vida hipotético de <i>Ophelimus</i> sp. em <i>E. globulus</i> de Valongo. ....	26
<b>Fig. 21:</b> Sobrevivência de indivíduos adultos provenientes de galhas de <i>Eucalyptus globulus</i> (A), <i>Eucalyptus cinera</i> (B) e <i>Eucalyptus cypelloarpa</i> (C), colocados a 5°C e na ausência de qualquer alimento ou água.....	27
<b>Fig. 22:</b> Sobrevivência de indivíduos adultos de <i>Eucalyptus globulus</i> (A), <i>E. cinerea</i> (B) e de <i>E. cypelloarpa</i> (C), colocados a 15°C e em três diferentes situações: ausência de alimento ou água (controlo); algodão embebido em água; algodão embebido numa solução à base de água e mel (50%).....	28
<b>Fig. 23:</b> Sobrevivência de indivíduos adultos de <i>Eucalyptus globulus</i> (A), <i>E. cinerea</i> (B) e de <i>E. cypelloarpa</i> (C), colocados a 25°C em três regimes alimentares diferentes: ausência de alimento ou água; algodão embebido em água; algodão embebido numa solução à base de água e mel (50%).....	29

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Espécies invasoras de insectos galícolas (Fonte: Mendel et al., 2014).....	3
<b>Tabela 2:</b> Média e desvio padrão da área de galhas de <i>Ophelimus</i> sp. no seu desenvolvimento máximo para <i>Eucalyptus cypellocarpa</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Eucalyptus macarthurii</i> e <i>Eucalyptus cinerea</i> do Arboreto do ISA, e clones de <i>Eucalyptus globulus</i> (TUGA e G74) de Valongo .....	14
<b>Tabela 3:</b> Número de insectos emergentes por cada espécie e taxa de parasitismo (%) de <i>Ophelimus maskelli</i> e <i>Ophelimus</i> sp. ....	16
<b>Tabela 4:</b> Média do comprimento das larvas medidas durante o mês de Março de <i>Ophelimus</i> sp. e o respectivo desvio padrão, no seu crescimento máximo em diferentes espécies hospedeiros e locais.....	23
<b>Tabela 5:</b> Mortalidade larvar e pré-adulta registada em três observações para galhas do clone TUGA.. ..	23

# 1. INTRODUÇÃO

Existem mais de 700 espécies de eucaliptos nativas da Austrália, Indonésia, Filipinas e Nova Guiné. Várias dessas espécies estão a ser plantadas como fonte de madeira e celulose para a indústria do papel, produção de óleos essenciais, protecção do solo, impedimento da desertificação ou para fins ornamentais em vários países da Europa, Norte de África, África do Sul, América do Norte, América do Sul e Ásia (Paine et al., 2011).

Os eucaliptos foram introduzidos em Portugal em 1819 (Fabião, 2014, comunicação pessoal) mas foi a partir dos anos 50 do séc. XX que a área de cultivo do eucalipto em Portugal cresceu exponencialmente, paralelamente ao crescimento da indústria da pasta do papel (Monteiro Alves et al., 2007). Actualmente, e segundo os dados preliminares do 6º Inventário Florestal Nacional, o eucalipto é a espécie florestal com maior distribuição em Portugal, ocupando 26% da área florestal num total de 812 mil ha, maioritariamente representada por *Eucalyptus globulus* Labill (ICNF, 2013). A produtividade e a qualidade da sua pasta de papel é uma das características que contribui para que seja uma das espécies florestais mais cultivadas no País, produzindo cerca de 16m<sup>3</sup>/ha/ano aos 12 anos, mais do dobro da produtividade do pinheiro bravo (7m<sup>3</sup>/ha/ano) (Soares et al., 2007; ICNF, 2006).

Na Península Ibérica, além de *E. globulus*, presente principalmente em povoamentos comerciais, também se encontra com frequência *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, presente sobretudo em áreas de lazer, nas bermas das estradas e em áreas urbanas (Branco 2007, Branco et al., 2009; Valente et al., 2008).

Durante cerca de 150 anos, os eucaliptos em Portugal beneficiaram de uma ausência quase total de pragas e doenças, lidando apenas com problemas de seca e geada. No entanto, a partir dos anos 70 começaram a aparecer as primeiras pragas e as primeiras doenças (Valente et al., 2008). Nas últimas décadas, verificou-se um aumento do número de agentes bióticos associados ao eucalipto, coincidindo com o aumento das áreas de plantação (Branco, 2007; Valente et al., 2008).

As trocas internacionais são um dos factores que mais contribuiu para difundir as pragas dos eucaliptos, tendo-se verificado a presença de algumas destas pragas invasoras em todas as regiões onde se cultivam eucaliptos (Paine et al., 2011). No entanto, na sua região de origem, um conjunto de inimigos naturais através de uma acção reguladora sobre as populações de insectos fitófagos, permite na maior parte dos casos uma estabilidade das populações, o que não se verifica fora da sua região de distribuição natural (Branco, 2007; Mendel et al., 2004). A reduzida cultura de

eucaliptos para produção de madeira na Austrália também contribui para a baixa incidência de pragas (Paine et al., 2011). Todavia, em algumas áreas da Austrália onde se tem intensificado as plantações de eucalipto, têm surgido alguns problemas com pragas (Paine et al., 2011), tal como seja, o gorgulho do eucalipto na região Ocidental da Austrália (Loch & Floyd, 2001).

Para além das espécies nativas da Austrália, em regiões subtropicais e tropicais, em particular no Brasil e Índia, espécies de insectos indígenas destas regiões têm provocado estragos severos nas plantações florestais de eucalipto, em particular, lepidópteros desfolhadores e perfuradores do tronco e formigas cortadoras de folhas (Branco, 2007). Na Europa, este fenómeno não se verifica, existindo contudo alguns fitófagos generalistas que se alimentam destas árvores hospedeiras, causando apenas estragos ocasionais (Branco, 2007) como é o caso da *Melolontha papposa* Illiger em Portugal (Ferreira & Ferreira, 1990).

Entre as espécies de insectos originárias da Austrália, que se introduziram e estabeleceram em várias regiões do globo, contam-se várias espécies indutoras de galhas, também designadas por cecidogéneas ou galícolas (Fig. 1 A e B; Tabela 1). Apesar de a lista ser constituída por mais de uma dezena de espécies, o número é muito pequeno quando comparado com as várias dezenas de espécies de insectos galícolas que na Austrália afectam as várias espécies do género *Eucalyptus* (Blanche, 2000; Mendel et al., 2004; Protasov et al., 2008). Estes insectos galícolas normalmente não constituem um problema na sua região nativa, onde a percentagem de plantas com galhas e a proporção de folhas atacadas na mesma planta são reduzidas (Mendel et al., 2004; Protasov et al., 2008). Mas com a sua introdução em regiões fora da Austrália, algumas destas espécies tornaram-se pragas importantes provocando prejuízos consideráveis (Branco, 2007; Mendel et al., 2004; Withers, 2001).



**Fig.1:** A - *Eucalyptus rudis* com galhas de *Leptocybe invasa* (Mata Nacional do Escarpim, 2014); B – *Eucalyptus camaldulensis* com galhas de *Ophelimus maskelli* (Arboreto do ISA).

**Tabela 1:** Espécies invasoras de insectos galícolas de *Eucalyptus* (Fonte: Mendel et al., 2014)

Ano de introdução	Espécie galícola	Família	Hospedeiro(s)	Primeiro registo
1921	<i>Ophelimus eucalypti</i>	Eulophidae	<i>E. saligna</i> <i>E. botryoides</i>	Nova Zelândia
1987	<i>Ophelimus</i> nr. <i>eucalypti</i>	Eulophidae	<i>E. saligna</i> <i>E. botryoides</i>	Nova Zelândia
1995	<i>Aprostocetus</i> sp.	Eulophidae	<i>Corymbia citriodora</i>	Hawai
2000	<i>Epichrysocharis burwelli</i>	Eulophidae	<i>Corymbia citriodora</i>	Califórnia, Brasil
2000	<i>Leptocybe invasa</i>	Eulophidae	<i>E. camaldulensis</i> <i>E. tereticornis</i>	Médio Oriente
2000	<i>Ophelimus maskelli</i>	Eulophidae	<i>E. camaldulensis</i> <i>E. tereticornis</i>	Austrália
2001	<i>Nambouria xanthops</i>	Pteromalidae	<i>E. cinerea</i>	Nova Zelândia
2007	<i>Quadrastichodella nova</i>	Eulophidae	<i>E. camaldulensis</i>	Austrália
2008	<i>Selitrichodes globulus</i>	Eulophidae	<i>E. globulus</i>	Califórnia
2005	<i>Ophelimus</i> sp. 1	Eulophidae	<i>E. globulus</i>	Chile
2011	<i>Ophelimus</i> sp. 2	Eulophidae	<i>E. globulus</i>	Mediterrâneo

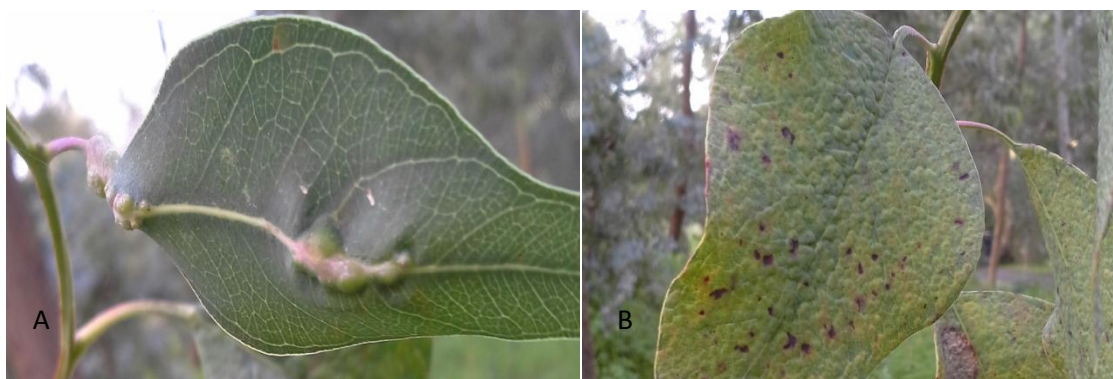
As interacções entre insectos galícolas e as plantas são complexas (Fay, 1996) e são consideradas a forma mais íntima de ligação entre um insecto fitófago e a sua planta hospedeira (Cook et al., 2002; Rocha et al., 2013). A facilidade com que as galhas podem ser colhidas, os indivíduos contados e observados e a forma como as interacções entre os insectos galícolas e os seus hospedeiros podem ser estudadas, fizeram das galhas um sistema de estudo bastante importante (Stone & Schönrogge, 2003). Os insectos galícolas induzem a diferenciação dos tecidos do hospedeiro em novas estruturas (Nyman et al., 1998; Schönrogge et al., 2000; Stone & Cook, 1998; Ronquist & Liljeblad, 2001). As galhas formam-se em diversos tecidos da planta, ricos do ponto de vista nutritivo, tais como, folhas, pecíolos, ramos, florescências, frutos e raízes, a sua forma permite em geral identificar a espécie ou género do insecto galícola com facilidade. As galhas são específicas de uma dada espécie galícola ou grupo de espécies próximas, possivelmente devido à resposta única que cada espécie galícola causa na activação de genes na planta e na fisiologia da planta hospedeira (Abrahamson et al., 1998; Floate et al., 1996; Stone & Schönrogge, 2003; Raman,

1996). As galhas representam também microhabitats que suportam comunidades de outros insectos especialistas, como parasitóides (Askew, 1961; Torossian, 1971; Pujade-Villar, 2004).

Com o desenvolvimento da galha, vários aspectos da sua morfologia, tais como, tamanho, espessura da parede, dureza, comprimento dos espinhos, aumento da densidade de pêlos, viscosidade da sua superfície e a presença de espaços internos de ar, vão-se alterando (Stone & Schönrogge, 2003; Stone et al., 2012).

Os insectos indutores de galhas distribuem-se por um elevado número de famílias, sendo as famílias Cecidomyiidae (Diptera) e Cynipidae (Hymenoptera: Cynipoidea) as mais conhecidas na região Paleártica as quais induzem galhas especialmente em fagáceas (Cook et al., 2002). Na Oceânia, outros grupos taxonómicos são responsáveis pela indução das galhas em eucaliptos, em particular da família Eulophidae (Hymenoptera: Chalcidoidea).

Actualmente, encontram-se bem disseminadas na região da Bacia do Mediterrâneo duas espécies de vespas indutoras de galhas da família Eulophidae, provenientes da Austrália: *Ophelimus maskelli* Ashmead (Protasov et al., 2007a) (Fig. 2 B), erradamente identificado como *Ophelimus eucalypti* Gahan por Viggiani & Nicotina (2001) e *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle (Mendel et al., 2004) (Fig. 1 A e 2 A).



**Fig. 2:** Galhas em *Eucalyptus rudis* observadas no Arboreto do Instituto Superior de Agronomia: A – *Leptocybe invasa*; B – *Ophelimus maskelli*

Em Portugal, as duas espécies galícolas, *O. maskelli* e *L. invasa*, são encontradas com infestações por vezes elevadas (Branco et al., 2006). *L. invasa* foi detectado pela primeira vez em Portugal em 2003 em *E. globulus*, *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* Sm., tendo-se verificado que afecta árvores jovens e adultas (Branco et al., 2006). No início de 2000, detectou-se em Itália uma nova praga de um insecto indutor de galhas, *O. maskelli*, que foi acidentalmente introduzida na região do Mediterrâneo e do Médio Oriente, tendo sido responsável por causar estragos importantes em folhas jovens de

*E. camaldulensis* (Mendel et al., 2004). *Ophelimus maskelli* foi detectado pela primeira vez em Portugal em 2006 próximo de Lisboa (Branco et al., 2007, 2009). *E. tereticornis* e *E. camaldulensis*, ambas as espécies pertencentes à secção Exsertaria, são dois dos hospedeiros mais susceptíveis de serem atacados por *O. maskelli* (Branco, 2007; Protasov et al., 2007a). No entanto, é possível que estes insectos galícolas possam atacar outras espécies de eucaliptos pertencentes às secções Latoangulata e Maidenaria quando se encontram em elevadas densidades (Mendel et al., 2004; Branco et al., 2014). Em França, por exemplo, verificaram-se ataques em *E. camaldulensis* e *E. nicholli* Maiden and Blakely (Borowiec et al., 2012). Apesar de *O. maskelli* atacar alguns indivíduos de *E. globulus*, existe uma clara preferência deste insecto por *E. camaldulensis* e espécies filogeneticamente próximas deste (Mendel et al., 2004; Branco et al., 2014).

*Ophelimus maskelli* pode ter até três gerações por ano, podendo causar estragos de importância económica mas também provocar problemas de saúde pública devido aos voos dos indivíduos adultos durante o período das emergências (Protasov et al., 2007a). Daí a necessidade de estudar a susceptibilidade e as condições que favorecem o estabelecimento destes insectos, assim como determinar o meio de controlo mais adequado.

Uma das vias mais promissoras para o combate a pragas exóticas é o controlo biológico clássico, através da introdução de inimigos naturais oriundos da região nativa do insecto e que no seu habitat de origem sejam eficientes na regulação das suas populações (Branco, 2007). Em 2004, foram descobertos na Austrália, dois parasitóides de *O. maskelli*: *Stethynium* sp. (Huber et al., 2006) e *Closterocerus chamaeleon* Girault (Protasov et al., 2007b). *Closterocerus chamaeleon* parece ser um parasitóide especializado em *O. maskelli*, pois parece não parasitar outros insectos galícolas, mesmo que estes induzam galhas no mesmo hospedeiro que *O. maskelli* (Protasov et al., 2007b). *Closterocerus chamaeleon* foi introduzido em Israel em 2005 para combater o avanço de *O. maskelli*, tendo demonstrado resultados eficazes num curto período de tempo (Protasov et al., 2007b). O parasitóide foi também introduzido em Itália em 2006 (Laudonia et al., 2006), tendo sido também encontrado em França, em populações bem estabelecidas controlando com sucesso *O. maskelli* (Borowiec et al., 2012). O parasitóide foi observado em Portugal pela primeira vez em 2006 (Branco et al., 2009).

Mais recentemente foi descoberta uma outra espécie de *Ophelimus* sp., responsável por estragos importantes em algumas espécies de eucaliptos utilizadas para exploração de madeira, em particular *E. globulus* (Borowiec et al., 2012). Esta espécie apesar de ser muito próxima de *O. maskelli*, ainda não foi identificada.

Segundo Borowiec et al. (2012), em França, as espécies que demonstraram ter susceptibilidade a *Ophelimus* sp. foram: *E. cinerea* F. Muell. ex Benth., *E. globulus*, *E. gunnii* Hook., *E. nichollii* e *E. parvula* L.A.S. Johnson & K.D. Hill . Sendo *E. globulus* a espécie com maior representação na maioria dos povoamentos comerciais plantados em Portugal, é possível que os estragos provocados por esta nova espécie de *Ophelimus* se agravem à medida que a área de distribuição desta praga vá aumentando, tal como a sua importância económica. Dada a importância que esta espécie pode ter para a cultura do eucalipto em Portugal e a escassez de conhecimentos sobre a sua biologia, o presente trabalho tem por objectivo geral estudar a biologia desta nova praga ainda pouco conhecida. São objectivos específicos: i) caracterizar diferenças entre *Ophelimus* sp. e *O. maskelli*, em particular na morfologia das galhas e dos adultos, que possam ser utilizados para a identificação expedita das espécies; ii) comparar o ciclo biológico de *Ophelimus* sp. em duas regiões, no Norte e Sul do País; iii) avaliar espécies hospedeiras susceptíveis; iv) detectar variações intra-específicas em *E. globulus* no desenvolvimento das larvas, e níveis de infestação que possam ser úteis para futura selecção de materiais genéticos em zonas de risco; v) detectar a presença de possíveis parasitóides de *Ophelimus* sp., em particular colocando-se a hipótese de que *C. chamaeleon*, parasitóide da espécie congénere *O. maskelli* também poderia parasitar este novo insecto galícola; vi) detectar e quantificar a mortalidade por outras causas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Dados biométricos de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.

De modo a caracterizar as diferenças morfológicas de galhas e adultos que possam servir de diagnóstico diferencial e identificação das duas espécies congêneres presentes em Portugal, foram recolhidas folhas com galhas, prestes a emergir. Durante o mês de Outubro de 2013, recolheram-se no Arboreto do Instituto Superior de Agronomia (ISA), cinco folhas adultas de *E. rudis* Endl. e cinco folhas adultas de *E. camaldulensis* para a medição de galhas de *O. maskelli*. No mês de Março de 2014, recolheram-se e mediram-se galhas de *Ophelimus* sp., obtidas de cinco folhas adultas de cada uma das espécies: *E. cypellocarpa* L.A.S. Johnson; *E. globulus*; *E. macarthurii* Dean & Maiden e *E. cinerea*. Durante este mês também foram medidas as galhas de dois clones de *E. globulus* (TUGA e G74) recolhidas em Valongo, permitindo comparar diferenças entre locais.

As galhas foram observadas com auxílio de lupa binocular (OLYMPUS SZX – ZB12) (108x). Após a observação, registou-se a cor, a forma e o tamanho de galhas e larvas. Para a determinação do tamanho das galhas, mediu-se os dois eixos perpendiculares de cada galha (N=30). Assumindo que as galhas possuíam uma forma elipsoidal, estimou-se posteriormente a área ocupada pela galha na superfície da folha com base na equação da área de uma elipse. Na determinação da dimensão das larvas, mediu-se apenas o comprimento (N=30). Os dados das dimensões das galhas foram comparados entre *O. maskelli* e *Ophelimus* sp. As diferenças de morfologia dos adultos de *O. maskelli* e de *Ophelimus* sp. foram registadas através de observações de exemplares adultos realizadas com o auxílio da mesma lupa binocular. Registaram-se as dimensões de tamanho de corpo e as características de diferentes partes do corpo do insecto, tais como: asas, tórax e patas.

### 2.2 Parasitismo de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.

De modo a determinar a eventual presença de parasitóides e comparar a sua incidência em galhas de *Ophelimus* sp. e *O. maskelli*, recolheram-se folhas com galhas que foram mantidas em laboratório em caixas separadas até à emergência dos insectos adultos e possíveis parasitóides.

Para *Ophelimus* sp., recolheram-se 60 folhas com presença de galhas em *E. cinerea* (3 árvores), 10 folhas em *E. globulus* (3 árvores) e 40 folhas em *E. cypellocarpa* (3

árvores). As amostras foram recolhidas no Arboreto do ISA durante o mês de Abril de 2014, quando se verificou a presença de galhas desenvolvidas.

Para determinar a taxa de parasitismo de *O. maskelli*, a colheita de folhas foi feita em Outubro de 2013, no Arboreto do ISA, pois esta é uma das duas alturas do ano em que existe emergências deste insecto. As espécies de hospedeiros seleccionados para esta amostragem foram: *E. rudis* (3 árvores) e *E. camaldulensis* (5 árvores). De cada hospedeiro recolheram-se 60 folhas com galhas. De notar que em Outubro, não há galhas de *Ophelimus* sp. desenvolvidas a não ser as galhas já vazias ou com larvas mortas no interior que restaram do período de emergência anterior (Março-Abril).

No laboratório, registou-se o número de galhas totais e o número de galhas furadas, isto é, galhas em que o insecto adulto já tinha emergido. De seguida, as folhas foram colocadas dentro de caixas seladas com o pecíolo em esponja húmida, para manter alguma humidade. Os insectos que emergiram das caixas, em ambos os casos, foram posteriormente observados à lupa, procedendo-se à sua identificação e contagem.

## **2.3 Espécies hospedeiras usadas por *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.**

### **2.3.1 Espécies hospedeiras em dois locais de Portugal**

Com o objectivo de determinar as espécies de eucalipto utilizadas como plantas hospedeiras por *O. maskelli* e *Ophelimus* sp., foram realizadas amostragens em dois arboretos, cada um deles, composto por várias espécies de eucaliptos: 1) Arboreto do ISA (Tapada da Ajuda, Lisboa) e 2) Mata Nacional do Escaroupim (Salvaterra de Magos). Para esta amostragem, recolheram-se ramos com 50 cm a 1 m de comprimento, num total de 4 ramos por árvore. No laboratório, contou-se o número de galhas existentes em cada ramo, usando óculos com lupa para melhor observação das galhas nas folhas.

No Arboreto do ISA, a amostragem foi realizada durante o mês de Outubro de 2013. Observaram-se todas as espécies do arboreto. Nas espécies que apresentavam algum tipo de galha, amostraram-se ramos para observação em laboratório, de duas a três árvores das seguintes espécies: *E. globulus*, *E. cinerea*, *E. camaldulensis* e *E. rudis*. Na Mata Nacional do Escaroupim, na mesma data, recolheram-se aleatoriamente quatro ramos de cada árvore de cada uma das seguintes espécies onde se observaram galhas: *E. globulus* (3 árvores), *E. viminalis* Labill. (apenas uma árvore, por se verificar uma grande ausência de galhas), *E. tereticornis* (3 árvores), *E. camaldulensis* (3 árvores), e *E. rudis* (3 árvores). Uma nova recolha de ramos da Mata

Nacional do Escaroupim, foi realizada durante o mês de Abril. Seleccionaram-se aleatoriamente quatro ramos de cada hospedeiro e três árvores de cada talhão. Recolheram-se ramos das seguintes árvores com galhas *E. rudis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* e *E. globulus*.

### **2.3.2 Comparação do número de galhas por folha entre três locais de Portugal**

Para comparar o número de galhas por folha entre três locais distintos, realizaram-se colheitas de ramos (com 50cm a 1m de comprimento) em ambos os locais. Em Outubro de 2014, fez-se uma recolha de ramos de *E. globulus* no Arboreto do ISA, em que se contou o número de galhas por folha adulta. Na Mata Nacional do Escaroupim, a recolha foi feita durante o mês de Outubro e no mês de Abril. Em Valongo, recolheram-se ramos durante os meses de Novembro, Dezembro e Janeiro do clone TUGA. Para todos os locais foi contado o número de galhas em cada folha adulta.

## **2.4 Utilização de *E. globulus* como espécie hospedeira de *Ophelimus* sp.**

### **2.4.1. Diferenças intraespecíficas - Clones (TUGA e G74) em folhas juvenis**

Foi realizada uma comparação entre dois clones de *E. globulus* de um local, para se testar a hipótese de existirem diferenças no desenvolvimento do insecto em função da árvore hospedeira, ao nível intraespecífico. Foram amostradas árvores de dois clones de *E. globulus* denominado TUGA e G74. As amostras foram recolhidas em Valongo em povoamentos que são propriedade da Soporcel.

Para esta amostragem, mediram-se 60 galhas de 10 folhas jovens do clone TUGA e 60 galhas de 10 folhas jovens do clone G74. Em Fevereiro de 2014, as galhas apresentam-se em desenvolvimento, o que permitiu medir as galhas e posteriormente as larvas que se encontravam no seu interior. As larvas foram medidas apenas em comprimento, enquanto as galhas foram medidas em largura e comprimento assumindo que têm uma forma elipsoidal. Os dados foram registados no mês de Fevereiro.

#### **2.4.2. Diferenças intraespecíficas - *E. globulus* em dois locais (Valongo e Arboreto do ISA)**

O número de galhas por tipo de folha (juvenil vs. adulta) foi registado em Fevereiro de 2014 para folhas provenientes de *E. globulus*, clone TUGA, recolhidas em Valongo e de *E. globulus* recolhidas no arboreto do ISA. Nas amostras provenientes de Valongo foram medidas 60 galhas para cada uma das duas árvores amostradas: 30 galhas em 5 folhas adultas e 30 galhas em 5 folhas jovens. Mediram-se as galhas e as larvas, como foi descrito anteriormente. No Arboreto do ISA foram recolhidas folhas de uma árvore de *E. globulus* para que fossem medidas 60 galhas. Amostrando-se 30 galhas de 5 folhas jovens e 30 galhas de 5 folhas adultas.

#### **2.5 Ciclo biológico de *Ophelimus* sp.**

O desenvolvimento de galhas e de larvas de *Ophelimus* sp. foi observado desde Outubro de 2013 a Março de 2014, de modo a determinar o ciclo biológico desta espécie no Norte e Sul do País. O desenvolvimento de galhas e larvas foi realizado em dois locais diferentes (Valongo e Lisboa) para se poder fazer uma comparação de duas zonas distintas do País com climas diferentes. As observações prolongaram-se até se registarem emergências de indivíduos adultos, de modo a que fosse possível determinar o início das emergências dos insectos nos diferentes locais. Durante o período em estudo acompanhou-se o crescimento das larvas, registando-se o seu comprimento, forma e cor.

Com este objectivo, galhas de folhas recolhidas no Arboreto do ISA foram observadas durante os meses de Outubro, Dezembro, Fevereiro e Março. As larvas foram medidas durante estes meses, excepto no mês de Outubro, uma vez que, as larvas ainda tinham um tamanho muito reduzido para que fosse possível serem medidas e, no mês de Março por estas já se encontrarem em pupa. As galhas foram observadas com auxílio de lupa binocular, tal como descrito para os adultos.

Procedeu-se da mesma forma para os ramos recolhidos em Valongo durante os meses de Novembro, Dezembro, Janeiro e Fevereiro. A partir desta altura verificou-se que as galhas já não se desenvolviam mais, pelo que não se efectuou mais nenhuma medição das galhas para além do mês de Fevereiro. No caso das larvas, foi ainda realizada a medição destas para o mês de Março, pois ainda se encontravam em desenvolvimento.

Com base nesta informação determinou-se um ciclo biológico hipotético de *Ophelimus* sp. para cada um dos locais em estudo, Arboreto do ISA e numa propriedade em Valongo.

## **2.6 Mortalidade larvar de *Ophelimus* sp. e mortalidade do pré-adulto em clone TUGA**

Com o objectivo de estudar a mortalidade da larva dentro da galha e determinar as percentagens de mortalidade larvar e mortalidade pré-adulto, foram recolhidos ramos do clone TUGA provenientes de Valongo, que continham galhas da geração anterior, isto é, galhas em que os adultos emergiram em Março-Abril de 2013. Não foi possível aplicar este estudo ao clone G74, pois este só continha folhas jovens, onde não se registou a presença de galhas da geração anterior. Foram feitas recolhas nos meses de Novembro e Dezembro de 2013 e Janeiro de 2014.

Uma vez recolhidos os ramos, estes foram levados para laboratório onde se registou o número total de galhas presentes nas folhas e desse valor, registou-se o número total de galhas que se encontravam fechadas, ou seja, em que não houve emergências do insecto adulto, e galhas com furos de emergência. Ao abrir as galhas da geração anterior que ainda estavam fechadas, foi possível identificar três situações distintas: i) galhas que se encontravam com o interior vazio; ii) galhas com larvas mortas; iii) adultos mortos que não chegaram a emergir. A primeira (i) corresponde possivelmente a uma mortalidade embrionária ou a uma mortalidade numa fase larvar muito inicial, enquanto as restantes (ii e iii), correspondem a uma mortalidade das larvas e dos pré-imagos.

## **2.7 Sobrevivência dos adultos de *Ophelimus* sp. em laboratório a diferentes temperaturas**

Realizou-se um ensaio para determinar a sobrevivência de indivíduos adultos de *Ophelimus* sp., quando sujeitos a diferentes temperaturas e a diferentes regimes alimentares. Para tal, capturam-se insectos emergidos de folhas com galhas recolhidas no Arboreto do ISA das seguintes espécies: *E. cypellocarpa* (3 árvores), *E. globulus* (3 árvores) e *E. cinerea* (3 árvores).

Os insectos foram colocados dentro de caixas em três diferentes temperaturas: 5°C, 15°C e 25°C. Para cada temperatura, foram colocadas 3 caixas em diferentes

situações: i) ausência de alimento ou água (controlo); ii) insectos alimentados apenas com algodão embebido em água; iii) insectos alimentados com algodão embebido numa solução à base de água e mel (50%).

As caixas foram colocadas em câmaras com condições controladas. Diariamente, foi registado o número de insectos mortos de modo a que fosse possível determinar a sobrevivência ao longo do tempo e os efeitos da alimentação na sua longevidade. Finalizado o ensaio, todos os insectos foram recolhidos e identificados de modo a verificar que apenas se encontravam *Ophelimus* sp. no interior das caixas.

## 2.8 Análise Estatística

A determinação das diferenças das médias da área das galhas em vários hospedeiros de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp. foi realizada através de uma ANOVA a um factor (espécies).

Para a determinação de diferenças no número de galhas por folhas entre espécies de hospedeiros usados por *O. maskelli* foi utilizado uma análise por modelos lineares generalizados (GLM) considerando-se a distribuição Binomial Negativa. O mesmo se fez para as espécies de hospedeiros usadas por *Ophelimus* sp. nos locais: Arboreto do ISA e Mata Nacional do Escaroupim. De modo a determinar as diferenças entre locais no número de galhas por folha em *E. globulus* proveniente do Arboreto do ISA, Mata Nacional do Escaroupim e Valongo, utilizou-se igualmente a distribuição Binomial Negativa.

Para a determinação de diferenças intraespecíficas no uso de *E. globulus* por *Ophelimus* sp., relativamente à área das galhas utilizou-se uma ANOVA, com o factor clone. A mesma análise foi usada para determinar diferenças entre as áreas de galhas e o comprimento de larvas para *E. globulus* de dois locais (Arboreto do ISA e Valongo) utilizando uma ANOVA com dois factores: local e tipo de folha (jovem e adulta). Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram avaliados previamente à ANOVA, utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente.

A sobrevivência de indivíduos adultos de *Ophelimus* sp., sujeitos a diferentes temperaturas e a diferentes regimes alimentares, foi analisada através de curvas de sobrevivência.

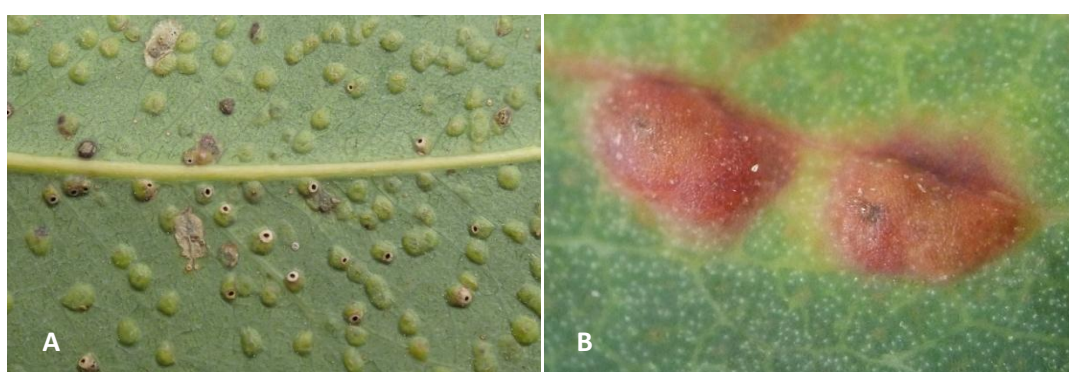
Todas as análises estatísticas efectuadas para este estudo foram realizadas com o auxílio do software SPSS versão 21.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Dados biométricos de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.

##### 3.1.1 Galhas de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.

As galhas de *O. maskelli* assemelham-se a pequenas pontuações que crescem simultaneamente para os dois lados da folha. Começam por ser esverdeadas e gradualmente podem obter uma coloração rosada, até atingirem o crescimento máximo (Fig. 3: A e B).



**Fig. 3:** Folhas de *Eucalyptus rudis* com galhas de *Ophelimus maskelli*: A - presença de galhas abertas e em desenvolvimento; B – presença de galhas desenvolvidas.

As galhas de *Ophelimus* sp. crescem apenas numa das faces da folha. Inicialmente, apresentam uma cor rosada que gradualmente vai ficando acinzentada ao atingir o seu crescimento máximo (Fig. 4: A e B).



**Fig. 4:** A - Folha jovem de *Eucalyptus globulus* colhida em Valongo, com galhas de *Ophelimus* sp. em desenvolvimento. B- Folha adulta de *Eucalyptus globulus* de Valongo, com presença de galhas desenvolvidas de *Ophelimus* sp.

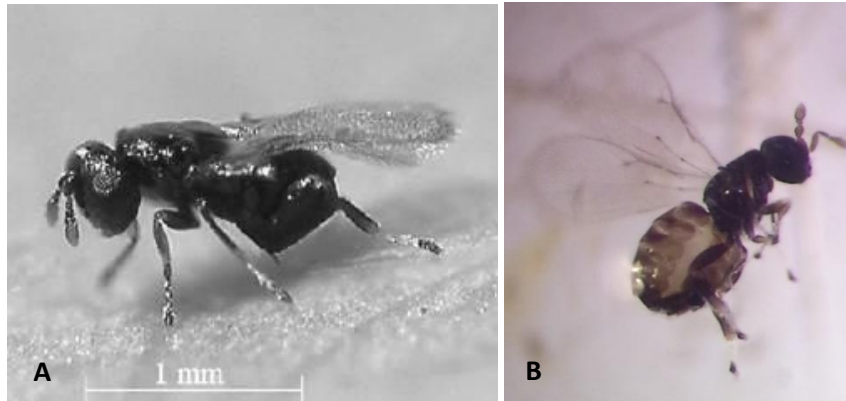
Para ambas as espécies observaram-se diferenças na dimensão das galhas maduras em função das espécies hospedeiras. Verificou-se a existência de diferenças significativas na área das galhas de *O. maskelli* ( $F_{1,60}=15,43$ ;  $p < 0,001$ ). A média da área das galhas ( $\pm$  erro padrão) foi maior em *E. camaldulensis* ( $1,32 \pm 0,039$ ) do que em *E. rudis* ( $1,11 \pm 0,039$ ). Relativamente a *Ophelimus* sp., verificou-se que existem diferenças significativas entre espécies do Arboreto ( $F_{3,120}=133,60$ ;  $p < 0,0001$ ). As galhas de *E. cypellocarpa* têm uma média da área superior a todos os outros hospedeiros avaliados (Tabela 2), enquanto *E. macarthurii* e *E. cinerea* têm dimensões mais pequenas e bastante semelhantes. Entre os clones de *E. globulus*, TUGA e G74 presentes em Valongo, existe uma diferença significativa entre as dimensões das áreas das galhas ( $F_{1,59}=19,56$ ;  $p < 0,0001$ ), sendo que no clone G74 estas apresentam-se mais pequenas para a mesma altura do ano (Tabela 2). Comparando os dois locais, verifica-se que as galhas em *E. globulus* presentes no Arboreto eram maiores que as de Valongo.

**Tabela 2:** Média e desvio padrão da área de galhas de *Ophelimus* sp. no seu desenvolvimento máximo para *Eucalyptus cypellocarpa*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus macarthurii* e *Eucalyptus cinerea* do Arboreto do ISA, e clones de *Eucalyptus globulus* (TUGA e G74) de Valongo. Dentro de cada local, os valores com letras diferentes são significativamente diferentes  $P < 0,05$ .

<i>Ophelimus</i> sp.						
Arboreto				Valongo		
	<i>E. cypellocarpa</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. macarthurii</i>	<i>E. cinerea</i>	<i>E. globulus</i> (TUGA)	<i>E. globulus</i> (G74)
Área (mm <sup>2</sup> )	1,34 a	0,90 b	0,63 c	0,63 c	0,72 a	0,59 b
Erro Padrão	0,029	0,029	0,029	0,029	0,022	0,02

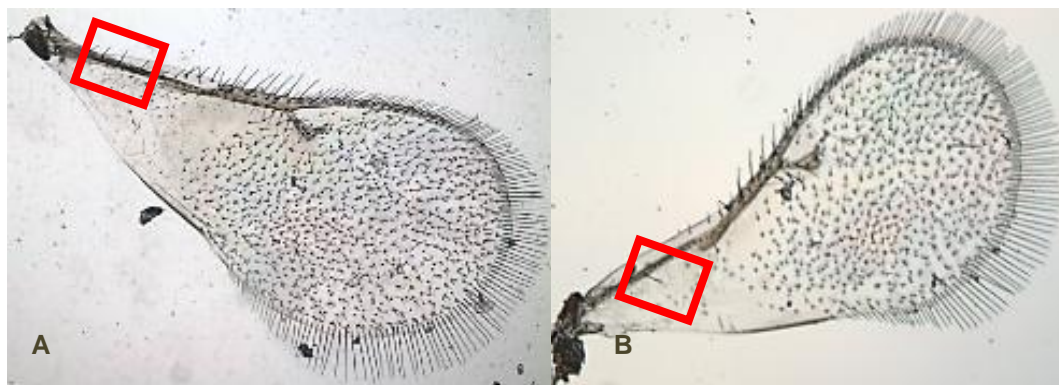
### 3.1.2 Diferenças morfológicas entre os indivíduos adultos de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.

Os adultos das duas espécies de *Ophelimus* quando observados à lupa binocular mostraram-se visualmente idênticos. Em ambas as espécies os adultos têm um corpo castanho-escuro, as antenas semelhantes, as coxas e os fêmures de coloração castanha, a tíbia de coloração branca e os tarsos de coloração castanha (Fig. 5 A e B). Contudo, foi possível verificar que o indivíduo adulto de *O. maskelli* é um pouco maior ( $0,99 \pm 0,11$ mm) que o indivíduo adulto de *Ophelimus* sp. ( $0,88 \pm 0,08$ mm).



**Fig. 5:** A - Individuo adulto de *Ophelimus maskelli* (Fonte: Protasov et al., 2007a); B - Individuo adulto de *Ophelimus* sp. (Foto: Autora).

Em concordância com Protasov et al. (2007a), verificámos que *O. maskelli* apresenta apenas um pêlo setáceo na membrana submarginal da asa anterior (Fig. 6A) enquanto que *Ophelimus* sp. tem dois a quatro pêlos setáceos na membrana submarginal da asa anterior (Fig. 6B). Actualmente, esta é a única forma de distinguir morfologicamente as duas espécies, sem recorrer a análises comparativas de ADN. Dos insectos recolhidos durante os ensaios nunca foram observados machos, tendo-se recolhido apenas fêmeas.



**Fig. 6:** A - Asa de *Ophelimus* sp. apresentando quatro pêlos setáceos (Foto: André Garcia); B - Asa de *Ophelimus maskelli*, apresentando um pêlo setáceo (Foto: André Garcia).

### 3.2 Parasitismo de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.

Para *Ophelimus* sp., o parasitismo foi nulo, pois nunca se encontrou nenhum parasitóide entre os adultos recolhidos das caixas de *E. cinerea*, *E. globulus* e *E. cypellocarpa* (Tabela 3). No caso dos adultos recolhidos que emergiram nas caixas de *E. camaldulensis* e *E. rudis*, apenas se encontrou *C. chamaeleon* (Tabela 3).

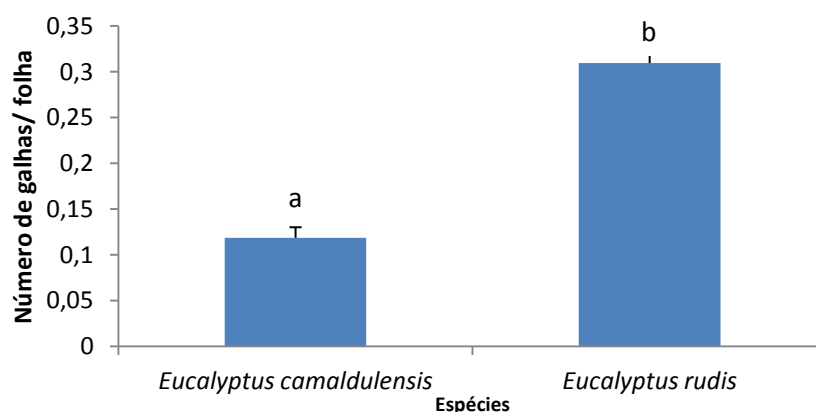
**Tabela 3:** Número de insectos galícolas parasitoides emergidos em galhas de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp., em função do hospedeiro vegetal.

Espécie Hospedeiro	N	<i>Ophelimus maskelli</i>	<i>Ophelimus</i> sp.	Parasitóides	Insectos não emergidos
<i>E. camaldulensis</i>	60	0	-	770	366
<i>E. rudis</i>	60	0	-	20	115
<i>E. cinerea</i>	60	-	677	0	629
<i>E. globulus</i>	10	-	351	0	130
<i>E. cypellocarpa</i>	40	-	4151	0	1178

### 3.3 Espécies hospedeiras usadas por *O. maskelli* e *Ophelimus* sp.

#### 3.3.1 Espécies hospedeiras em dois locais de Portugal

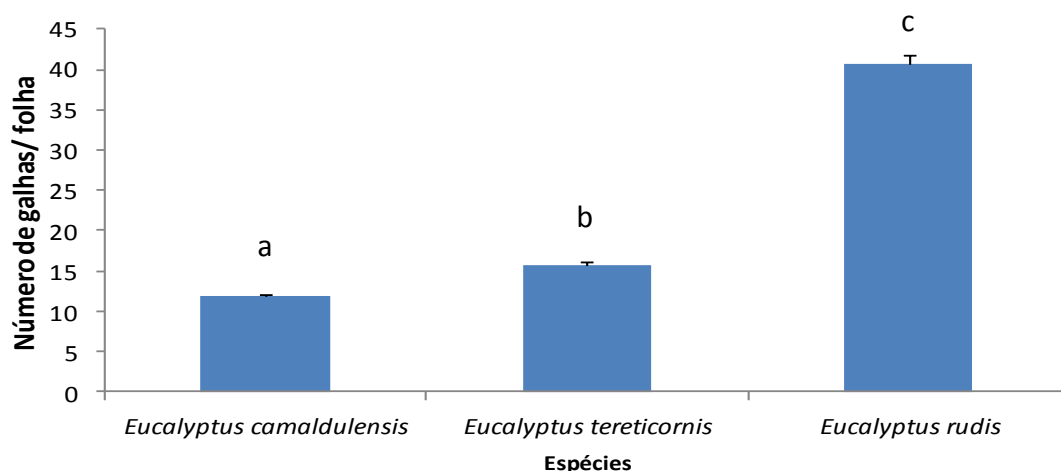
Das 30 espécies de eucaliptos presentes no Arboreto do ISA, só duas espécies apresentavam galhas de *O. maskelli* nas suas folhas: *E. camaldulensis* e *E. rudis*. Relativamente a estas duas espécies hospedeiras registaram-se diferenças significativas ( $Z = 66,9$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 7), sendo que *E. rudis* apresentou um maior número de galhas de *O. maskelli* comparativamente a *E. camaldulensis* (Fig. 7).



**Fig. 7:** Espécies hospedeiras de *Ophelimus maskelli* presentes no Arboreto do ISA. Os valores representam a média de galhas por folha  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

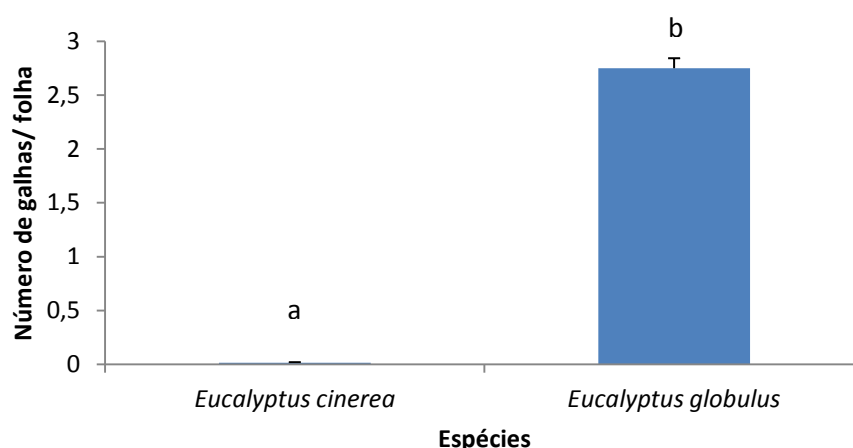
De igual modo, observou-se a presença desta vespa galícola em *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. rudis* no arboreto da Mata do Escaroupim. Registaram-se diferenças

significativas no número de galhas entre as diferentes espécies de hospedeiros ( $Z=840,9$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 8). A presença de galhas de *O. maskelli* foi superior em *E. rudis* quando comparada com *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* (Fig. 8).



**Fig. 8:** Espécies hospedeiras de *Ophelimus maskelli* presentes na Mata do Escaroupim. Os valores representam a média de galhas por folha  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

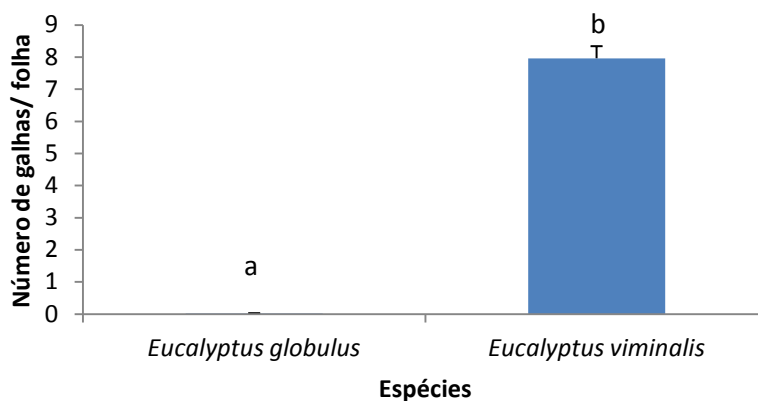
Das 30 espécies de eucaliptos presentes no Arboreto da Tapada avaliou-se a intensidade de galhas de *Ophelimus* sp. em duas: *E. globulus* e *E. cinerea*. Verificou-se que existiam diferenças significativas entre os dois hospedeiros ( $Z=655,27$ ;  $p < 0,0001$ ) com maior número de galhas em *E. globulus* do que em *E. cinerea* (Fig. 9).



**Fig. 3:** Espécies hospedeiras de *Ophelimus* sp. presentes no Arboreto do ISA. Os valores representam a média de galhas por folha  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Observou-se a presença de *Ophelimus* sp. apenas em *E. globulus* e *E. viminalis* no arboreto da Mata Nacional do Escaroupim (Fig.10). Registaram-se diferenças

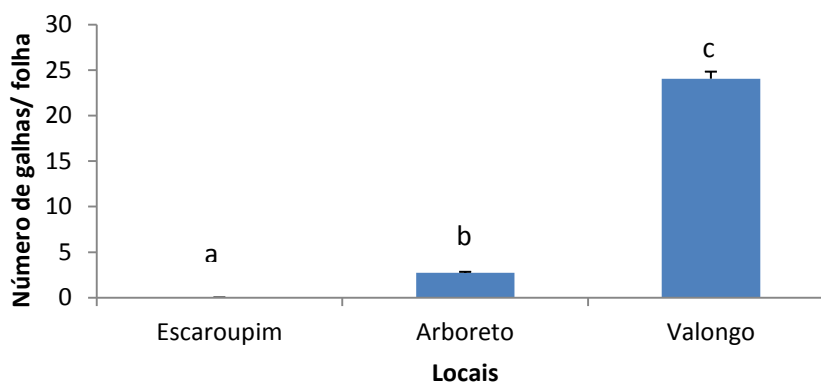
significativas entre as diferentes espécies ( $Z= 845,29; p < 0,0001$ ) (Fig. 10). A presença de galhas de foi maior em *E. viminalis* do que em *E. globulus*. (Fig. 10).



**Fig. 40:** Espécies hospedeiras de *Ophelimus* sp. presentes na Mata Nacional do Escaroupim. Os valores representam a média de galhas por folha  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.2 Comparação do número de galhas por folha entre três locais de Portugal

Comparando o número de galhas de *Ophelimus* sp. por folha recolhidas de ramos de *E. globulus* provenientes de três locais diferentes, observaram-se diferenças significativas entre locais ( $Z = 3062,03, p < 0,001$ ) sendo Valongo, no Norte do País, o local com maior incidência de galhas (Fig.11).



**Fig. 11:** Comparação do número de galhas de *Ophelimus* sp. por folha (adultas) de *E. globulus* em três locais. Os valores representam a média do número de galhas por folha  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

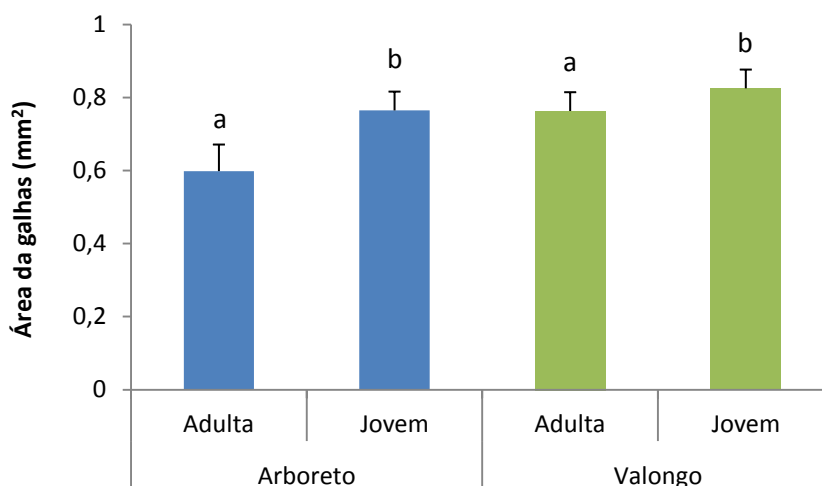
### 3.4 Utilização de *E. globulus* como espécie hospedeira de *Ophelimus* sp.

#### 3.4.1 Diferenças intraespecíficas - clones (TUGA e G74) em folhas juvenis

Ao nível intraespecífico registaram-se diferenças significativas na dimensão das galhas presentes em folhas juvenis nos dois clones estudados de *E. globulus*, recolhidas em Fevereiro ( $F_{1, 119}=6,127$ ;  $p=0,015$ ). As galhas do clone TUGA foram maiores ( $0,83\text{mm} \pm 0,72\text{mm}$ ) que as galhas observadas no clone G74 ( $0,59\text{mm} \pm 0,090\text{mm}$ ).

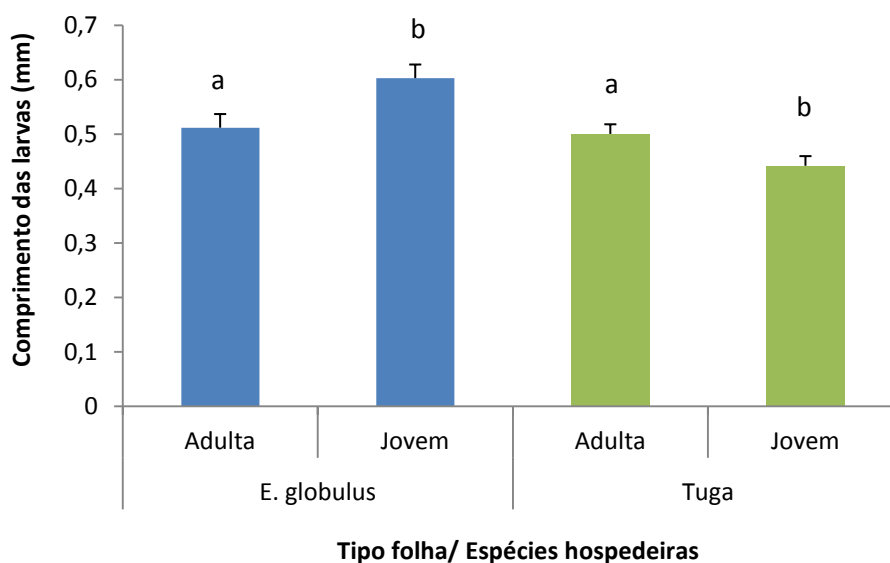
#### 3.4.2 Diferenças intraespecíficas - *E. globulus* em dois locais (Valongo e Arboreto do ISA)

Comparando a área das galhas de folhas adultas e jovens presentes em *E. globulus* no Arboreto do ISA e em Valongo no mês de Fevereiro, não se registaram diferenças significativas entre os dois locais ( $F_{1,210}=3,816$ ;  $p=0,052$ ). No entanto observaram-se diferenças significativas entre os dois tipos de folhas ( $F_{1,210}=3,923$ ;  $p=0,049$ ) (Fig. 12). A área das galhas das folhas jovens foi superior nos dois locais comparativamente à área de galhas presentes em folhas adultas (Fig. 12). Os valores registados são ligeiramente superiores em Valongo relativamente aos registados no Arboreto do ISA (Fig. 12).



**Fig. 5:** Área (média  $\pm$  erro padrão) de galhas de *Ophelimus* sp. em folhas adultas e jovens em *Eucalyptus globulus* de dois locais: Arboreto do ISA e Valongo. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

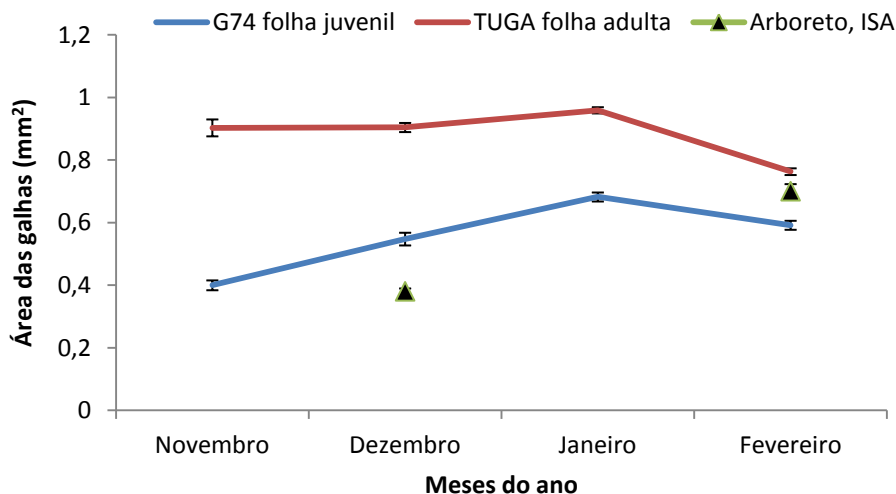
Comparando o comprimento das larvas presentes em galhas de folhas adultas e jovens presentes em *E. globulus* no Arboreto do ISA e em Valongo, verificou-se diferenças significativas entre os dois locais ( $F_{1,180}=15,80$ ;  $p<0,001$ ) mas não entre os dois tipos de folhas ( $F_{1,210}=0,561$ ;  $p=0,455$ ) (Fig. 13). Quando comparado o tipo de folha por local, o comprimento das larvas foi superior nas folhas jovens do arboreto enquanto que em Valongo, as larvas eram maiores nas galhas das folhas adultas (Fig. 13).



**Fig. 63:** Comprimento das larvas (mm) (média  $\pm$  erro padrão) de *Ophelimus* sp. em folhas adultas e jovens presentes de *Eucalyptus globulus* em dois locais: Arboreto do ISA e Valongo. Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro de cada local ( $P < 0,05$ ).

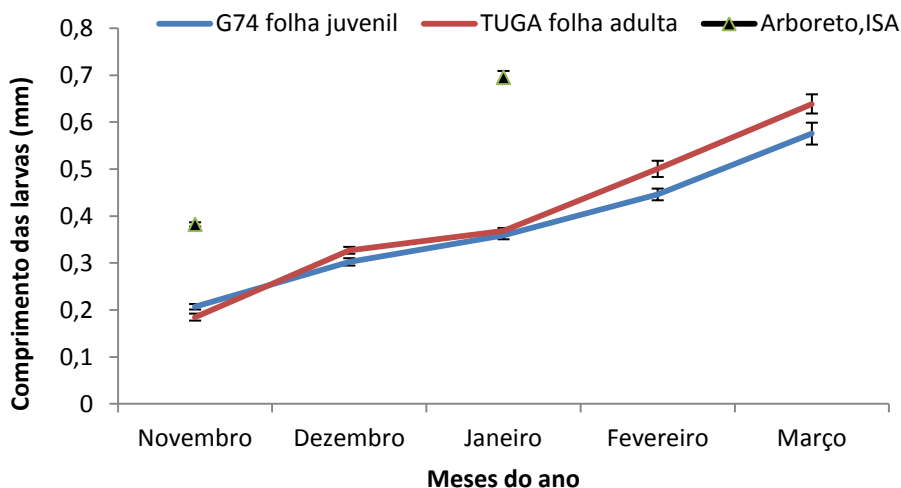
### 3.5 Ciclo biológico de *Ophelimus* sp.

A medição da área das galhas de *Ophelimus* sp. ao longo de quatro meses permitiu verificar um aumento linear até Janeiro, tendo-se verificado um ligeiro decréscimo em Fevereiro (Fig. 14). Neste período as galhas medidas em folhas de TUGA foram sempre maiores do que as galhas de *E. globulus* do Arboreto e de G74 (Fig. 14).



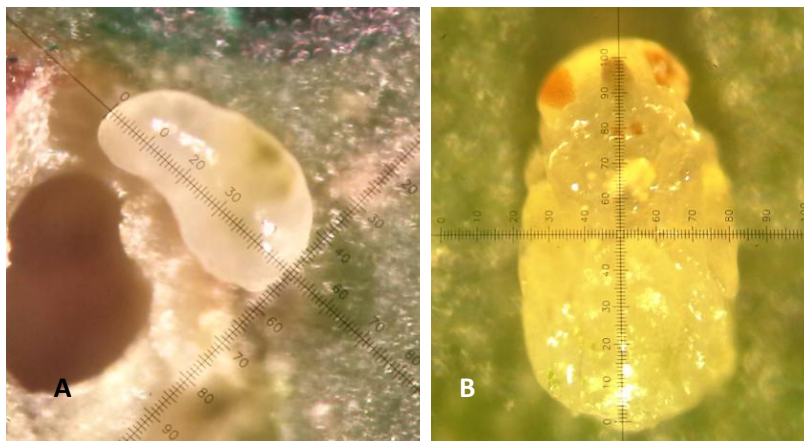
**Fig. 7:** Evolução da área das galhas de folhas de dois clones de *Eucalyptus globulus* (G74 e TUGA) recolhidas em Valongo e de folhas de *E. globulus* recolhidas no Arboreto do ISA ao longo do tempo. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão.

No comprimento das larvas presentes em galhas nos clones G74 e TUGA, verificou-se um aumento do tamanho das larvas até Fevereiro, sendo que as larvas presentes em TUGA eram maiores do que as larvas presentes em G74. Nas duas medições efectuadas no arboreto as larvas foram sempre maiores (Fig.15).



**Fig. 85:** Evolução do comprimento das larvas de folhas de dois clones de *Eucalyptus globulus* (G74 e TUGA) recolhidas em Valongo e de folhas de *E. globulus* recolhidas no Arboreto do ISA ao longo do tempo. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão.

As larvas de *Ophelimus* sp. apresentam uma cor esbranquiçada (Fig.16 A). No início do estado de pupa, surge uma coloração avermelhada onde futuramente estarão os olhos do insecto e surgem saliências que irão originar as patas (Fig.16 B e 17).



**Fig. 16:** Larva (A) e Pupa (B) de *Ophelimus* sp. de *Eucalyptus globulus* de Valongo. A escala corresponde a 1mm entre 0 e 100.



**Fig. 9:** Pupa de *Ophelimus* sp. de *Eucalyptus globulus* em desenvolvimento. A escala corresponde a 1mm entre 0 e 100.

Aquando do seu completo desenvolvimento, durante o mês de Março, o comprimento das larvas de *Ophelimus* sp. variou entre espécies hospedeiras de eucaliptos, tendo-se verificado, que as larvas eram menores em *E. macarthurii* do que as larvas nos restantes hospedeiros (Tabela 4). Entre clones de *E. globulus* (Tuga e G74) com origem de Valongo, também existiram diferenças na média do comprimento das larvas, sendo que o clone TUGA atingiu para o mesmo mês dimensões maiores. Entre

os dois locais avaliados, verificou-se que *E. globulus* presente no Arboreto do ISA atingiu valores mais elevados relativamente ao comprimento médio da larva (Tabela 4).

**Tabela 4:** Média do comprimento das larvas medidas durante o mês de Março de *Ophelimus* sp. e o respectivo desvio padrão, no seu crescimento máximo em diferentes espécies hospedeiros e locais.

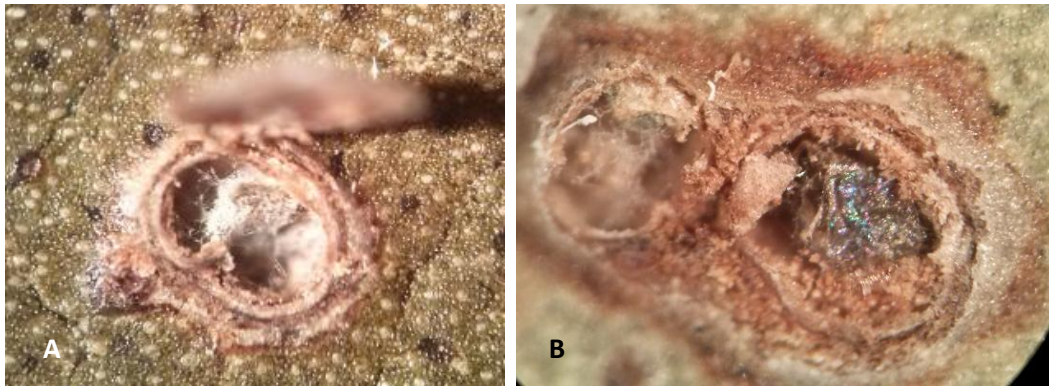
	<i>Ophelimus</i> sp.				
	Arboreto			Valongo	
	<i>E. globulus</i>	<i>E. macarthurii</i>	<i>E. cinerea</i>	<i>E. globulus</i> (TUGA)	<i>E. globulus</i> (G74)
Comprimento da larva (mm)	0,7	0,49	0,66	0,64	0,58
Desvio Padrão	0,25	0,17	0,15	0,16	0,18

### 3.6 Mortalidade larvar e mortalidade do pré-adulto em clone TUGA

Nas três amostragens de galhas que ficaram fechadas da geração anterior, observou-se a existência de mortalidade na fase larvar (Fig. 18 A) e de mortalidade na fase de imago antes da emergência (Fig. 18 B). A mortalidade larvar variou entre 14 e 25% e foi sempre superior à mortalidade dos pré-adultos (Tabela 5). No total a mortalidade foi de 22% a 34%.

**Tabela 5:** Mortalidade larvar e pré-adulta registada em três observações para galhas do clone TUGA. Os valores apresentados correspondem a média  $\pm$  erro padrão.

	Mortalidade larvar total (Média $\pm$ erro padrão)	Mortalidade pré-adulto (Média $\pm$ erro padrão)
Novembro	0,25 $\pm$ 0,028	0,09 $\pm$ 0,048
Dezembro	0,16 $\pm$ 0,019	0,08 $\pm$ 0,006
Janeiro	0,14 $\pm$ 0,019	0,08 $\pm$ 0,005
Média Global	0,18 $\pm$ 0,007	0,08 $\pm$ 0,002



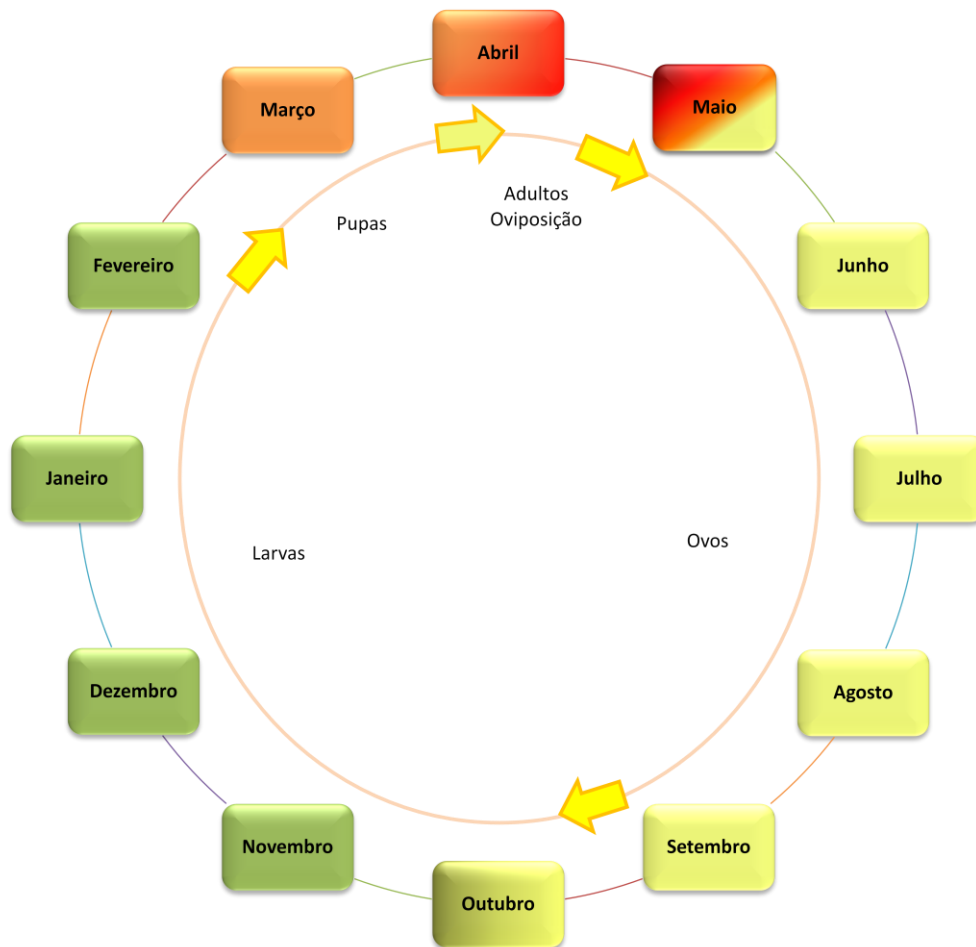
**Fig. 18:** A - Larva morta no interior da galha; B - Pré-adulto morto no interior da galha. Ambas as galhas são do clone TUGA de *E. globulus*.

Nas larvas mortas foi com frequência encontrado o micélio de um fungo, não foi no entanto possível determinar se este seria um fungo patogénico das larvas, eventualmente um mutualista da planta, ou um fungo saprófita.

### 3.7 Ciclo biológico hipotético de *Ophelimus* sp.

Como *Ophelimus* sp. revelou ligeiras diferenças no desenvolvimento larvar entre os dois locais em estudo, Arboreto do ISA (Lisboa) e numa propriedade em Valongo, determinou-se um ciclo biológico hipotético do insecto para cada um dos locais, de acordo com os registos de aparecimento de galhas, larvas, pupas e adultos, ao longo do tempo.

Pressupõe-se que a eclosão das larvas de *Ophelimus* sp. se inicia entre Setembro e Outubro (observações em campo), com o aparecimento de pequenas galhas que durante todo o Inverno se foram desenvolvendo (Fig. 19). Estas foram ganhando uma forma mais saliente à medida que a cor também começou a alterar-se. As larvas foram crescendo até se transformarem em pupa em Março. Durante o mês de Abril, emergiram os primeiros adultos, tendo-se iniciado de imediato a oviposição, formando novas galhas nas folhas dos hospedeiros, e começando uma nova geração destes insectos galícolas (Fig. 19).



**Fig. 1910:** Ciclo biológico hipotético de *Ophelimus* sp. em *Eucalyptus globulus* do Arboreto do ISA

O ciclo biológico de *Ophelimus* sp. em Valongo foi iniciado um pouco mais tarde, tendo-se verificado que as primeiras pupas apareceram apenas no início de Abril, com a emergência de adultos no fim de Abril, início de Maio (Fig. 20).

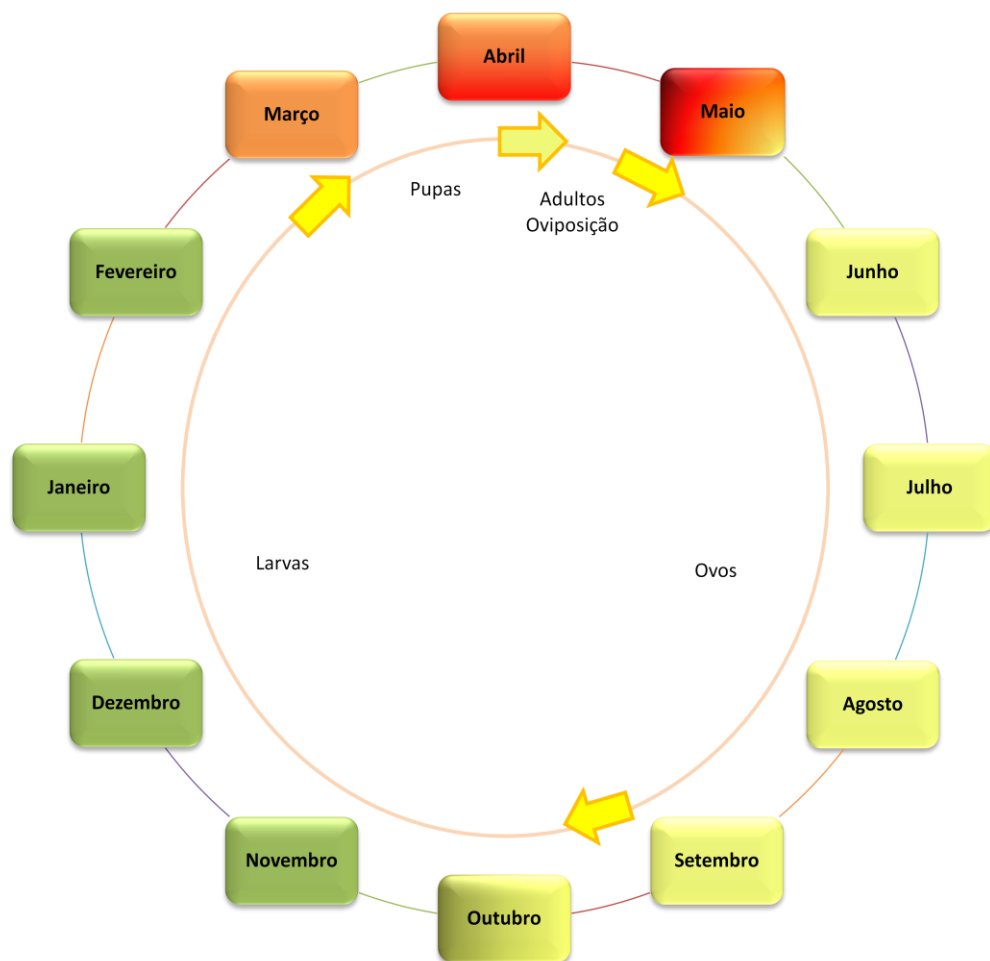
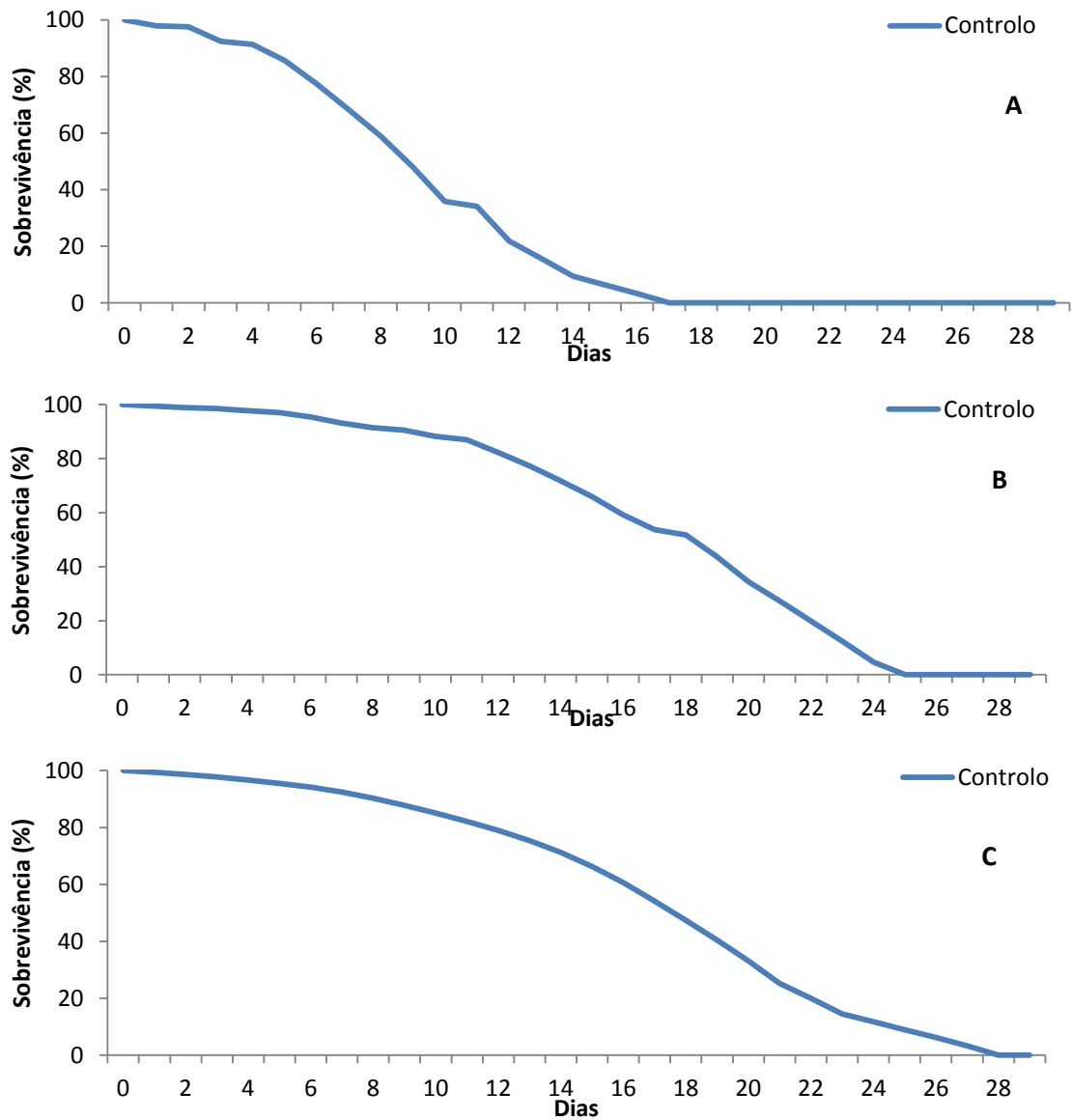


Fig. 11: Ciclo biológico hipotético de *Ophelimus* sp. em *E. globulus* de Valongo.

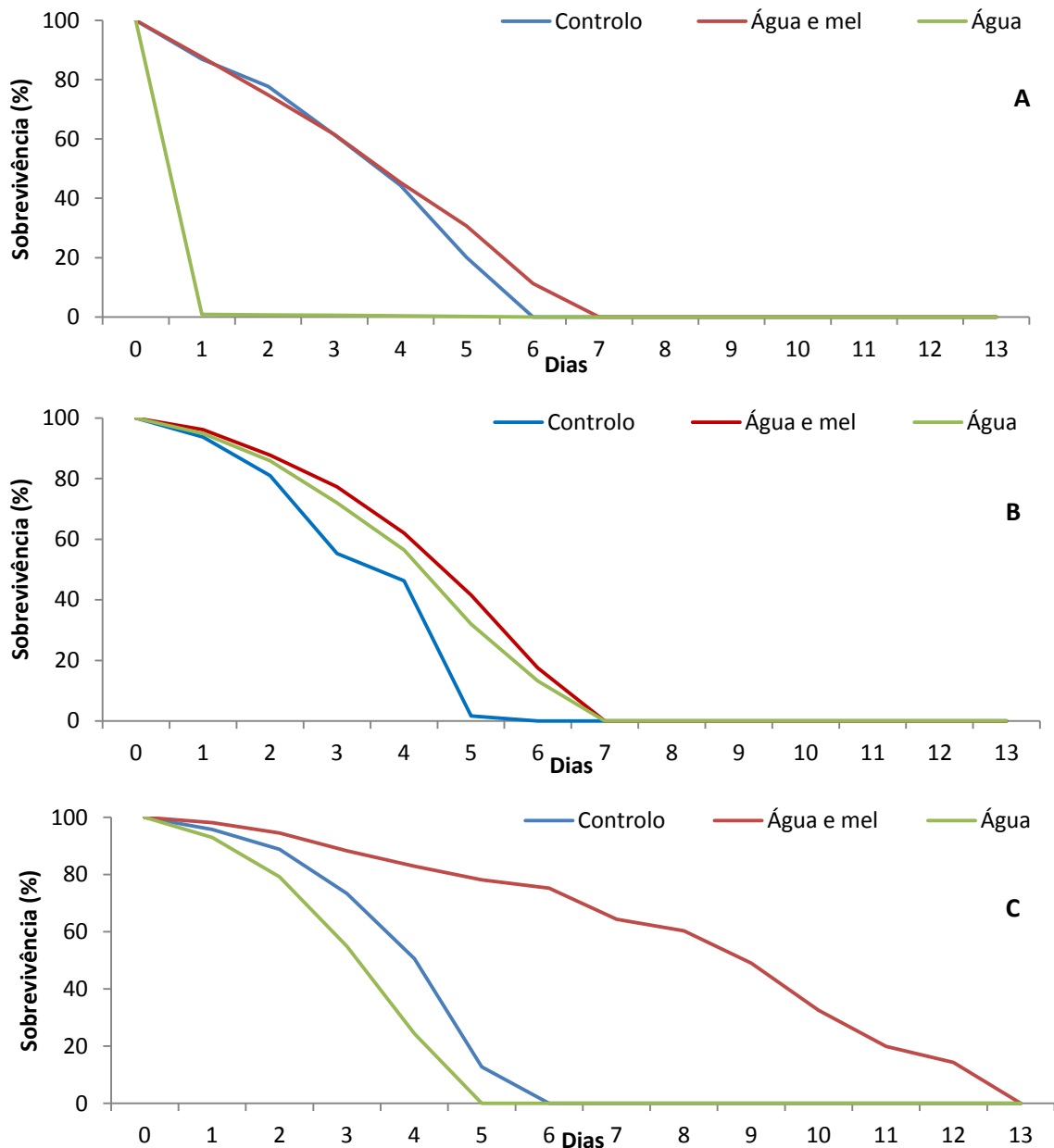
### 3.8 Sobrevivência dos adultos de *E. globulus* em laboratório a diferentes temperaturas

A sobrevivência de adultos de *Ophelimus* sp. a uma temperatura de 5°C e sem qualquer alimento (controlo), foi maior em adultos que emergiram de galhas de *E. cypellocarpa* recolhidas no Arboreto do ISA, sobrevivendo até aos 28 dias (Fig. 21 C), enquanto os indivíduos com origem em *E. globulus* de Valongo, sobreviveram apenas até ao 17º dia (Fig. 21 A).



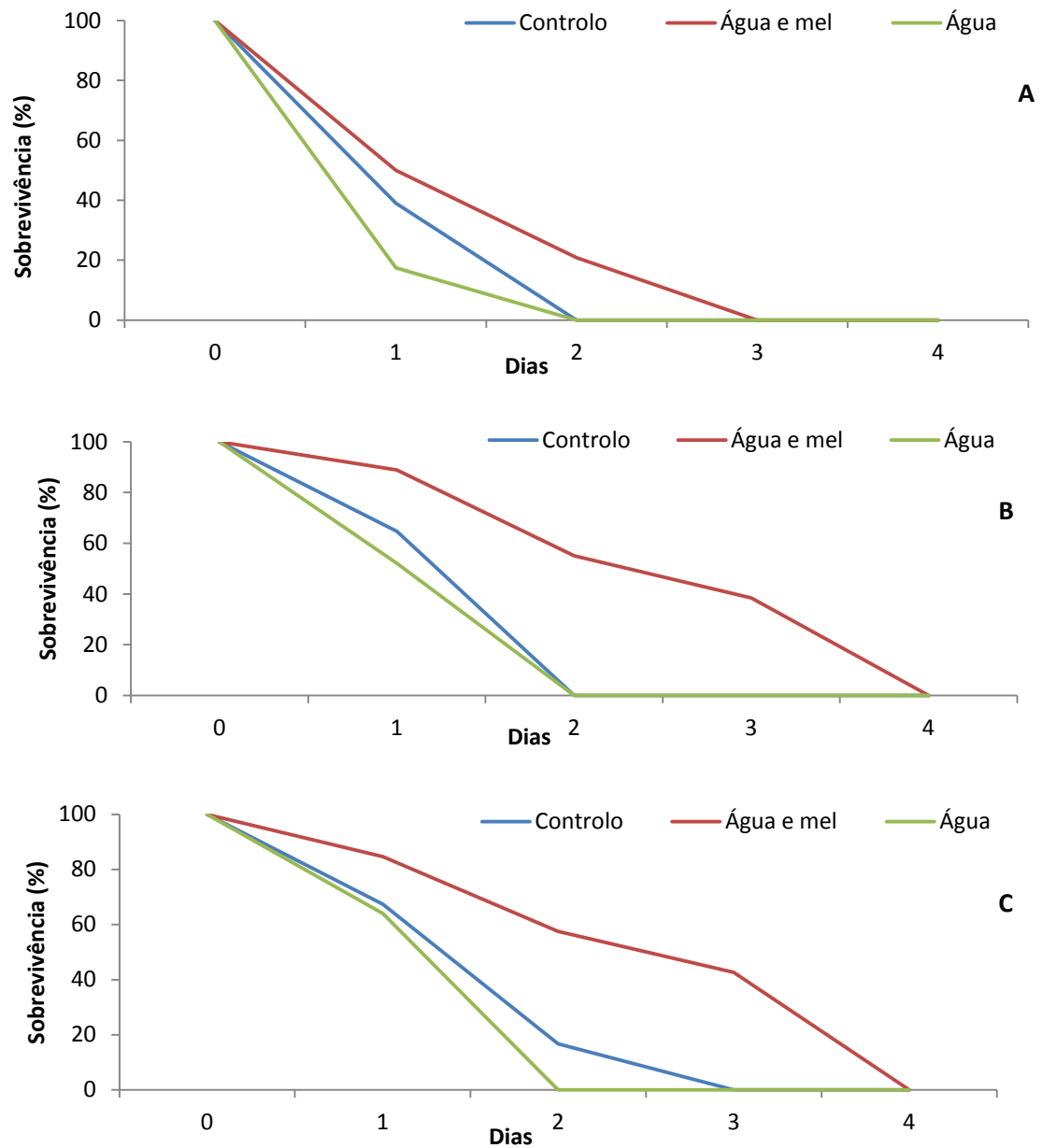
**Fig. 2112:** Sobrevivência de indivíduos adultos provenientes de galhas de *Eucalyptus globulus* (A), *Eucalyptus cinera* (B) e *Eucalyptus cypellocarpa* (C), colocados a 5°C e na ausência de qualquer alimento ou água.

A uma temperatura de 15°C, os insectos morreram mais rapidamente que os indivíduos colocados a 5°C. Os insectos provenientes de *E. cypellocarpa* foram aqueles que sobreviveram mais tempo, nomeadamente os insectos alimentados com água e mel que viveram até 13 dias (Fig. 22 C). No entanto a sobrevivência média deste grupo foi de 6 dias. Os adultos provenientes de *E. globulus* e alimentados apenas com água, só sobreviveram um dia (Fig. 22 A).



**Fig. 13:** Sobrevivência de indivíduos adultos de *Eucalyptus globulus* (A), *Eucalyptus cinerea* (B) e de *Eucalyptus cypellocarpa* (C), colocados a 15°C e em três diferentes situações: ausência de alimento ou água (controlo); algodão embebido em água; algodão embebido numa solução à base de água e mel (50%).

Quando colocados a 25°C, é possível observar que os insectos das três espécies têm uma mortalidade muito semelhante e muito mais elevada quando comparando com as outras temperaturas estudadas (Fig. 23 A, B e C). Os indivíduos adultos provenientes de folhas de *E. globulus* tiveram a sobrevivência mais baixa, apenas 3 dias (Fig. 23 A). Nos insectos originários dos hospedeiros *E. cinerea* e *E. cypellocarpa*, a partir do 4º dia já não existiam indivíduos vivos (Fig. 23 B e C, respectivamente).



**Fig. 14:** Sobrevivência de indivíduos adultos de *Eucalyptus globulus* (A), *Eucalyptus cinerea* (B) e de *Eucalyptus cypellocarpa* (C), colocados a 25°C em três regimes alimentares diferentes: ausência de alimento ou água; algodão embebido em água; algodão embebido numa solução à base de água e mel (50%).

## 4. DISCUSSÃO

O género *Ophelimus* é ainda pouco conhecido, embora tenham sido até agora descritas mais que 50 espécies (Protasov et al., 2007a). Até 2010, *O. maskelli* era a única espécie do género presente na Europa. No entanto, nesse ano e através de testes moleculares, morfológicos e bio-ecológicos, foi detectada a presença de uma nova espécie de *Ophelimus* em França, que até à data ainda não foi identificada (Borowiec et al., 2012).

Em 2013, *Ophelimus* sp. foi detectada pela primeira vez em Portugal em Lisboa no Arboreto do Instituto Superior de Agronomia (ISA) (Garcia et al., 2014) e também numa plantação de eucaliptos em Valongo pertencentes ao centro de investigação RAIZ do grupo Portucel-Soporcel. Até à realização deste estudo, muito pouco era conhecido sobre a biologia desta nova espécie, tendo portanto este estudo sido pioneiro a abordar vários aspectos da biologia e morfologia desta espécie até agora desconhecidos.

A observação da morfologia das galhas de *O. maskelli* e de *Ophelimus* sp. permitiu identificar algumas diferenças entre ambos. A morfologia exterior da galha difere entre ambas em termos de coloração, sendo que as galhas de *O. maskelli* no início do seu desenvolvimento são esverdeadas com tendência a ficarem rosadas à medida que envelhecem, como observado por outros autores (Borowiec et al., 2012; Protasov et al., 2007a), enquanto as galhas de *Ophelimus* sp., são inicialmente rosadas e gradualmente vão-se tornando acinzentadas. Os indivíduos adultos de *O. maskelli* induzem galhas em ambos os lados da folha (Protasov et al., 2007a), enquanto as galhas de *Ophelimus* sp. crescem apenas em um dos lados. Por outro lado, observámos que as galhas induzidas por *O. maskelli* são maiores que as galhas de *Ophelimus* sp., tal como observado por Borowiec et al. (2012), excepto em *E. cypellocarpa*, que apresentou galhas maiores que todos os outros hospedeiros. No conjunto, estas características permitiram diferenciar no campo as galhas das duas espécies de *Ophelimus*. Todavia, as medições do tamanho de galhas provenientes de várias espécies hospedeiras, demonstraram que o tamanho das galhas para a mesma espécie galícola varia em função do hospedeiro, tal como já havia sido referido no estudo de Branco et al. (2009), pelo que a dimensão da galha só por si deve ser considerada com precaução.

As características morfológicas dos indivíduos adultos de *O. maskelli* e *Ophelimus* sp. são muito semelhantes. Segundo Protasov et al. (2007a), a característica morfológica que permite distinguir *O. maskelli* relativamente a outras espécies do mesmo género, é

a presença de um único pêlo setáceo na membrana submarginal. Neste estudo constatou-se que *Ophelimus* sp. apresenta entre dois e quatro pêlos setáceos, tal como já havia sido descrito por Borowiec et al. (2012), confirmando tratar-se de uma espécie distinta.

Neste estudo, não se registou a emergência de nenhum parasitóide a partir das galhas de *Ophelimus* sp. e segundo o nosso conhecimento ainda não foi detectado a presença de parasitóides em nenhum outro país em que esta nova praga esteja estabelecida fora da Austrália. De todas as galhas de *O. maskelli* observadas, 100% dos indivíduos que emergiram eram *C. chamaeleon*. Segundo Borowiec et al. (2012), as taxas de parasitismo de *C. chamaeleon* são normalmente bastante elevadas, muitas vezes superiores a 90%. A ausência de parasitóides em galhas de *Ophelimus* sp. pode ser explicada por uma elevada especialização de *C. chamaeleon* em relação a *O. maskelli* (Protasov et al., 2007b) ou devido ao facto de o período de disponibilidade das larvas de *Ophelimus* sp. não coincidir com o ciclo de vida do parasitóide. Borowiec et al. (2012) referem que *Ophelimus* sp. possui somente um período de reprodução anual, enquanto que o ciclo de *O. maskelli*, contempla pelo menos dois períodos de reprodução por ano, sendo que em Israel pode chegar a três ciclos anuais (Protasov et al., 2007a). No nosso estudo, pudemos verificar que a fase larvar é a mais longa, desde Outubro até Abril. Os adultos vivem apenas de alguns dias a três semanas, dependendo do alimento, pelo que só estão no campo durante o início da Primavera. Deduzimos assim que a fase de ovo se prolongue de Abril a Setembro/Outubro, suportada por um possível período de diapausa estival.

Sendo importante conhecer as espécies de eucaliptos susceptíveis a *Ophelimus* sp., foram avaliados dois locais onde existem arboretos com várias espécies de eucaliptos. Das trinta espécies de eucalipto que constituem o Arboreto do ISA, apenas se observou a presença de galhas de *Ophelimus* sp. em quatro: *E. cinerea*, *E. globulus*, *E. macarthurii*, e *E. cypellocarpa*. Na Mata Nacional do Escaroupim (Salvaterra de Magos), as galhas de *Ophelimus* sp. foram observadas em *E. viminalis* e em *E. globulus*. Em França, registou-se a presença de *Ophelimus* sp. em *E. cinerea*, *E. globulus*, *E. gunnii* e *E. parvula* (Borowiec et al., 2012). Todas estas espécies pertencem à secção Maidenaria que sugere uma afinidade do insecto galícola por este grupo taxonómico de eucaliptos.

Foi realizada também a monitorização dos possíveis hospedeiros de *O. maskelli* no nosso País. Apenas duas espécies do Arboreto do ISA apresentavam galhas desta espécie: *E. rudis* e *E. camaldulensis*. Na Mata Nacional do Escaroupim, observaram-se galhas em *E. tereticornis* e *E. camaldulensis*. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Branco et al. (2014), que refere serem as espécies pertencentes à secção

Exsertaria, série Exsertae, as mais susceptíveis a *O. maskelli*. Apesar de *E. globulus* ser considerado um hospedeiro susceptível a *O. maskelli* (Protasov et al., 2007a), nunca foi detectada a sua presença neste hospedeiro nos dois locais estudados neste trabalho, Lisboa e Escaroupim. Segundo os estudos de Branco et al. (2009, 2014), *E. globulus* possui menor susceptibilidade ao ataque de *O. maskelli* do que *E. camaldulensis*.

Para se tentar perceber se existiam diferenças intraespecíficas relativamente a *Ophelimus* sp., foram comparados dois clones de *E. globulus*: Tuga e G74. Tanto a dimensão das galhas como das larvas, como os níveis de infestação foram superiores no clone TUGA, o que sugere existirem diferenças intraespecíficas e, em particular, uma maior susceptibilidade deste clone. Estes resultados são relevantes para a selecção de materiais menos susceptíveis nas regiões de maior risco. A área das galhas foi também maior nas folhas jovens do que nas folhas adultas em ambos os locais observados, sugerindo uma preferência do insecto galícola por este tipo de folha. Assim, ao contrário de *O. maskelli* que mostra uma tendência para ovipositar folhas adultas no seu estado inicial de desenvolvimento (Protasov et al., 2007a), *Ophelimus* sp. parece preferir a folhas juvenis para ovipositar. O mesmo comportamento foi registado para *O. eucalypti* (Protasov et al., 2007a).

Em Valongo verificou-se maior densidade de *Ophelimus* sp. em comparação com o Arboreto do ISA, tal resultado pode dever-se por uma melhor adaptação da vespa galícola a regiões mais frias, colocando-se, por hipótese, uma possível origem da espécie galícola na região da Tasmânia, de onde é igualmente proveniente *E. globulus*. Por outro lado pode também colocar-se como hipótese que *Ophelimus* sp. se estabeleceu à mais tempo em Valongo do que no Arboreto.

Pelo desenvolvimento das galhas e das larvas foi possível registar que a pupação de *Ophelimus* sp. ocorre mais cedo em Lisboa do que em Valongo, possivelmente devido ao clima mais ameno da primeira localidade. Segundo Borowiec et al. (2012), em França, a emergência dos adultos ocorre no final de Maio, enquanto que em Portugal se verificou que a emergência dos adultos ocorreu no início de Abril em Lisboa e no final de Abril em Valongo.

Com o objectivo de estudar a mortalidade das fases imaturas, foram abertas galhas das gerações anteriores que nunca emergiram. Observou-se que a mortalidade larvar foi maior que a mortalidade dos pré-adultos, possivelmente devido à presença de um fungo no interior da galha, ou devido à acção de algum factor abiótico como a temperatura. Independentemente do factor, é de registar uma mortalidade natural, no total de cerca de 25% a 35% que contribuirá para diminuir o crescimento das suas populações. Não foi possível determinar se os fungos presentes nas galhas eram

entomopatogénicos, mutualistas ou saprófitas, o que será interessante estudar num trabalho futuro.

A sobrevivência de indivíduos adultos foi testada a diferentes temperaturas sob diferentes regimes alimentares e com adultos provenientes de três hospedeiros diferentes. A sobrevivência foi bastante elevada quando os insectos foram colocados a 5°C, explicado por uma redução da taxa de metabolismo. A 25°C, os insectos não sobreviveram mais de 4 dias, o que sugere que a essa temperatura os insectos terão poucos dias para encontrar um hospedeiro adequado e ovipositar. A 15°C, a sobrevivência média foi de cerca de 6 dias, sendo esta temperatura próxima das condições atmosféricas de campo na altura em que os adultos emergem. Tal como esperado, os insectos sobreviveram mais dias no regime alimentar de água e mel do que só com água ou no controlo, tal como observado para outras espécies de parasitóides (Protasov et al., 2007b, 2008). A presença de néctar ou meladas no campo, permitirá, portanto, aumentar a sua sobrevivência. Os insectos recolhidos na Tapada da Ajuda, em *E. cypellocarpa*, sobreviveram sempre mais que os recolhidos em Valongo em *E. globulus*. Pensamos que este resultado se deveu ao transporte dos segundos que demorou alguns dias, período que deverá ter afectado a longevidade futura dos adultos emergentes.

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível diferenciar em termos morfológicos as galhas e indivíduos adultos de *O. maskelli* e de *Ophelimus* sp. Foi ainda possível determinar as espécies hospedeiras mais susceptíveis, tendo-se constatado que as espécies pertencentes à secção Maidenaria eram as mais atacadas por *Ophelimus* sp., em particular *E. cytellocarpa*, *E. globulus* e *E. viminalis*. Verificou-se que para além das diferenças entre diferentes espécies, existem também diferenças intraespecíficas no desenvolvimento das galhas, nomeadamente entre clones de *E. globulus*. Relativamente ao ciclo biológico, constatou-se que as regiões mais frias no Norte do País parecem ser mais favoráveis às populações, uma vez que apresentam uma maior densidade de galhas por folha em diferentes espécies de hospedeiro comparativamente às regiões mais a Sul. No entanto, também se registou um pequeno atraso no período de emergências no Norte, com as larvas apenas a emergirem no fim de Abril.

A existência de uma única geração anual e a elevada mortalidade larvar contribuem para um crescimento mais lento das populações de *Ophelimus* sp. quando comparadas com *O. maskelli*, o que indica que esta nova espécie poderá ter um menor impacto nas plantas hospedeiras que *O. maskelli*. Por outro lado, a ausência de um parasitóide de *Ophelimus* sp. em Portugal será favorável às suas populações. O nosso estudo indica que *C. chamaeleon* será um parasitóide específico de *O. maskelli* e não parasita *Ophelimus* sp.. Contudo, são necessários estudos laboratoriais de exposição de *Ophelimus* sp. ao parasitóide *C. chamaeleon* para confirmar esta hipótese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamson, W., Melika, G., Scrafford, R., Csoka, G. (1998). Gall-inducing insects provide insights into plant systematic relationships. *American Journal of Botany*, 85(8): 1159-1159.

Askew, R. R. (1961). On the biology of the inhabitants of oak galls of Cynipidae (Hymenoptera) in Britain. *Transactions of the Society for British Entomology*, 14: 237–268.

Blanche, K. R. (2000). Diversity of insect-induced galls along a temperature–rainfall gradient in the tropical savannah region of the Northern Territory, Australia. *Austral Ecology*, 25: 311-318.

Borowiec, N., Thaon, M., Brancaccio, L., Warot, S., Ris, N., Malausa, J.C. (2012). L'eucalyptus menace par une nouvelle espèce d'*Ophelimus* en France. Les hyménoptères galligènes de l'Eucalyptus en France (Hymenoptera: Eulophidae): une nouvelle espèce d'*Ophelimus* Haliday menace les plantations d'*Eucalyptus* dans la région méditerranéenne. *Phytoma - la Défense des végétaux*, 656: 42-44.

Branco, M. (2007). Agentes bióticos do eucalipto em Portugal. In: *O Eucalipto em Portugal – Impactes Ambientais e Investigação Científica*. A. Monteiro Alves, Santos Pereira, J., Neves Silva, J.M.. Eds. ISA Press. pp. 255-284.

Branco, M., Franco, J. C., Valente, C., Mendel, Z. (2006). Survey of *Eucalyptus* gall wasps (Hymenoptera: Eulophidae) in Portugal. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 32: 199 - 202.

Branco, M., Boavida, C., Durand, N., Franco, J. C., Mendel, Z. (2009). Presence of the Eucalyptus gall wasp *Ophelimus maskelli* and its parasitoid *Closterocerus chamaeleon* in Portugal: First record, geographic distribution and host preference. *Phytoparasitica*, 37:51-54.

Branco, M., Dhahri, S., Santos, M., Ben Jamaa, M. L. (2014). Biological control reduces herbivore's host range. *Biological control*, 69: 59-64.

Cook, J. M., Rokas, A., Pagel, M., Stone, G. M. (2002). Evolutionary shifts between host oak sections and host-plant organs in *Andricus* gallwasps. *Evolution*, 56: 1821 - 1830.

Fay, P. A., Hartnett, D.C., Knapp, A.K. (1996). Plant tolerance of gall-insect attack and gall-insect performance. *Ecology*, 77: 521-534.

Ferreira, M. C., Ferreira, G. W. S. (1990). Pragas de viveiros florestais, das plantações e da regeneração natural – guia de campo. Direcção Geral do Planeamento e Agricultura, Lisboa. pp. 20-25.

Floate, K. D., Fernandes, G. W., Nilsson, J. A. (1996). Distinguishing intrapopulacional categories of plants by their insect faunas: galls on rabbitbrush. *Oecologia*, 105: 221 - 229.

Garcia, A., Matos, S., Borowiec, N. Branco, B. (2014). A new gall wasp *Ophelimus* sp. affecting *Eucalyptus globulus* in Southwestern Europe. Xth European Congress of Entomology, York, UK.

Huber, J.T., Mendel, Z., Protasov, A., La Salle, J. (2006). Two new Australian species of *Stethynium* (Hymenoptera: Mymaridae), larval parasitoids of *Ophelimus maskelli* (Ashmead) (Hymenoptera: Eulophidae) on *Eucalyptus*. *Journal of Natural History*, 40: 1909-1921.

ICNF, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2006). Estratégia Nacional para as Florestas. ICNF, Lisbon, Portugal.

ICNF, Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (2013). IFN6 - Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal Continental em 1995, 2005 e 2010. ICNF, Lisbon, Portugal.

Loch, A. D., Floyd, R. B. (2001). Insect pests of Tasmanian blue gum, *Eucalyptus globulus globulus*, in south-western Australia: History, current perspectives and future prospects. *Austral Ecology*, 26:458-466.

Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N., La Salle, J. (2004). Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. *Australian Journal of Entomology*, 43: 101-113.

Mendel, Z., Protasov, A., Brand, D., Branco, M. (2014). Lessons from successful classical biological control of two eucalyptus gall wasps. Global approaches to the biological control of invasive *Eucalyptus* pests. IUFRO Congress, Salt Lake City, USA, pp.5-11.

Monteiro Alves, A., Santos Pereira, J., Neves Silva, J. M. (2007). A introdução e a expansão do eucalipto em Portugal. In: O Eucalipto em Portugal – Impactes Ambientais e Investigação Científica. ISAPress, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, pp. 13-24.

Nyman, T., Roininen, H., Vuorinen, J. A. (1998). Evolution of different gall types in willow-feeding sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Evolution*, 52: 465 - 474.

Paine, T. D., Steinbauer, M. J., Lawson, S. A. (2011). Native and exotic pests of *Eucalyptus*: a worldwide perspective. *Annual Review of Entomology*, 56: 181-201.

Protasov, A., La Salle, J., Blumberg, D., Brand, D., Saphir, N., Assael, F., Fisher, N., Mendel, Z. (2007a). Biology, revised taxonomy and impact on host plants of *Ophelimus maskelli*, an invasive gall inducer on *Eucalyptus* spp. in the mediterranean area. *Phytoparasitica*, 35:50-76.

Protasov, A., Blumberg, D., La Salle, J., Mendel, Z. (2007b). Biological control of the eucalyptus gall wasp *Ophelimus maskelli* (Ashmead): Taxonomy and biology of the parasitoid species *Closterocerus chamaeleon* (Girault), with information on its establishment in Israel. *Biological Control*, 42:196–206.

Protasov, A., Doganlar, M., La Salle, J., Mendel, Z. (2008). Occurrence of two local megastigmus species parasitic on the eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* in Israel and Turkey. *Phytoparasitica*, 36: 449 - 459.

Pujade-Villar, J. (2004). Les gales dels roures: una font de recursos per a molts organismes. *Habitats*, 9: 11 – 25.

Raman, A., (1996). Nutritional diversity in gall-inducing insects and their evolutionary relationships with flowering plants. *International Journal of Ecology and Environmental Science*, 22: 150–160.

Rocha, S., Branco, M., Vilas Boas, L., Almeida, M. H., Protasov, A., Mendel, Z. (2013). Gall induction may benefit host plant: a case of a gall wasp and eucalyptus tree. *Tree Physiology*, 33:388 - 397.

Ronquist, F., Liljeblad, J. (2001). Evolution of the gall wasp–host plant association. *Evolution*, 55: 2503 – 2522.

- Schönrogge, K., Harper, L. J., Lichtenstein, C. P. (2000). The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell & Environment*, 23: 215–222.
- Soares, P., Tomé, M., Santos Pereira, J. (2007). A produtividade do eucalipto. In: *O Eucalipto em Portugal – Impactes Ambientais e Investigação Científica*. A. Monteiro Alves, J., Santos Pereira & J. M., Neves Silva, Eds. ISA Press. pp. 27-60.
- Stone, G. N., Cook, J. M. (1998). The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265: 979-988.
- Stone, G. N., Schönrogge, K. (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18:512 - 522.
- Stone, G.N., Lohse, K., Nicholls, J.A., Fuentes-Utrilla, P., Sinclair, F., Schönrogge, K., Csóka, G., Melika, G., Nieves-Aldrey, J.N., Pujade-Villar, J., Tavakoli, M., Askew, R.R., Hickerson, M.J. (2012). Reconstructing Community Assembly in Time and Space Reveals Enemy Escape in a Western Palearctic Insect Community. *Current Biology*, 22: 532–537.
- Torossian, G. (1971). Faune secondaire des galles de Cynipidae; I: Étude systématique des fourmies et des principaux arthropodes récoltés dans les galles . *Insectes Sociaux* , 3: 135 – 154.
- Valente, C., Machado, H., Silva, M. (2008). Pragas e doenças do eucalipto. In: *Pragas e doenças em Pinhal e Eucalipto – Desafios para a sua gestão integrada*. Branco, M. Valente, C., Paiva, M.R. Eds. ISA Press. pp. 37-51.
- Viggiani, G., Nicotina, M. (2001). The eulophid leaf gallmaking of eucalyptus *Ophelimus eucalypti* (Gahan) (Hymenoptera: Eulophidae) in Campania. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, 33: 79 - 82.
- Withers, T.M. (2001). Colonization of eucalypts in New Zealand by Australian insects. *Austral Ecology*, 26: 467–476.