

Filipa Alexandra dos Santos Caldeira

Resposta do parasitoide *Anagonia lasiophthalma*  
(Diptera: Tachinidae), a odores emitidos pelo  
*Eucalyptus globulus* (Labill.) e/ou *Gonipterus*  
*platensis* Marelli (Coleoptera; Curculionidae)

.

Análise da interação tri-trófica eucalipto – gorgulho – anagonia.

Orientador: Teresa Maria Pinto Coelho Amado Vasconcelos

Coorientador: Catarina Isabel Antunes Gonçalves

Filipa Alexandra dos Santos Caldeira

Resposta do parasitoide *Anagonia lasiophthalma*  
(Diptera: Tachinidae), a odores emitidos pelo  
*Eucalyptus globulus* (Labill.) e/ou *Gonipterus*  
*platensis* Marelli (Coleoptera; Curculionidae)  
Análise da interação tri-trófica eucalipto – gorgulho – anagonia.

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária  
de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de mestre em RECURSOS FLORESTAIS

Orientador: Teresa Maria Pinto Coelho Amado Vasconcelos

Coorientador: Catarina Isabel Antunes Gosnçaves

Coimbra, 2024

# ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> (LABILL.) .....	1
1.2     PRAGAS E DOENÇAS DO EUCALIPTO EM PORTUGAL .....	2
1.3 <i>GONIPTERUS PLATENSIS</i> MARELLI (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) .....	3
1.4     MÉTODOS DE CONTROLO .....	6
1.5     CONTROLO BIOLÓGICO .....	7
1.6     PARASITOIDES .....	8
1.7     LOCALIZAÇÃO DO HOSPEDEIRO E RELAÇÕES TRITRÓFICAS .....	9
1.8     COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PLANTAS INDUZIDAS POR HERBÍVOROS .....	12
1.9     CONTROLO BIOLÓGICO DE <i>G. PLATENSIS</i> EM PORTUGAL.....	12
<b>2</b> <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
2.1     MATERIAL BIOLÓGICO .....	15
2.2     OLFATÓMETRO DE DUPLA ESCOLHA .....	16
2.3     CONDIÇÕES DE ENSAIOS.....	17
2.4     TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	19
<b>3</b> <b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b> <b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>5</b> <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>36</b>
<b>6</b> <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>38</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>41</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Pragas e doenças dos eucaliptos presentes em Portugal (Valente <i>et al.</i> , 2021) .....	2
Tabela 2 - Combinações dos ensaios .....	18
Tabela 3 - Síntese dos resultados obtidos nos ensaios de preferência .....	30

## Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição das florestas de eucalipto em Portugal continental segundo a COS2018 (cartografia produzida a partir da COS2018 disponibilizada pela DGT) .....	1
Figura 2 - Curva cumulativa do número de espécies de artrópodes australianos, fitófagos, associados aos eucaliptos em Portugal, com base no ano da sua primeira identificação (Valente <i>et al.</i> , 2021) .....	3
Figura 3 - Mapa representativo da evolução da distribuição de <i>G. platensis</i> em Portugal ao longo do tempo (Valente <i>et al.</i> , 2008) .....	4
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>G. platensis</i> (ICNF, 2015b) .....	5
Figura 5 - Sinais e sintomas da presença de <i>G. platensis</i> em povoamentos (ICNF, 2015b) .....	6
Figura 6 - Especialização da dieta e utilização químicos pelo terceiro nível trófico num contexto tri-trófico (Vet & Dicke, 1992) .....	11
Figura 7 - Esquema representativo do olfatómetro (Afonso <i>et al.</i> , 2023) .....	17
Figura 8 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Branco" .....	20
Figura 9 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Branco" .....	21
Figura 10 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Bouquet" .....	21
Figura 11 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Bouquet" .....	22
Figura 12 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Bouquet + larvas" .....	22
Figura 13 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs Bouquet + larvas" ..	23
Figura 14 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Larvas" .....	23
Figura 15 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Larvas" .....	24
Figura 16 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Bouquet com adultos" .....	25
Figura 17 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Bouquet + adultos" ..	25
Figura 18 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + larvas" .....	26
Figura 19 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + larvas" ..	26
Figura 20 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + adultos" .....	27
Figura 21 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + adultos" ..	27
Figura 22 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Larvas" .....	28
Figura 23 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Larvas" ..	29
Figura 24 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos" ..	29
Figura 25 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos" ..	30
Figura 26 - Gráficos síntese dos resultados obtidos por ensaio de preferência .....	31
Figura 27 - Gráficos síntese dos resultados obtidos por ensaio de preferência por período do dia .....	32

## **Agradecimentos**

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese e deste meu percurso académico, estou muito grata.

Quero agradecer à minha orientadora, Prof. Teresa Vasconcelos, que me apoiou, encorajou, orientou e proporcionou-me a oportunidade de desenvolver esta tese.

À Dr.<sup>a</sup> Catarina Gonçalves que me recebeu, ensinou, facultou material, apoiou, aconselhou e inspirou-me ao longo de todas as fases desta tese o meu muito obrigada. Sem claro esquecer todas as pessoas do RAIZ que me acolheram e tiveram imensa paciência comigo, desde ao início, ajudando-me a identificar as fêmeas, até ao final do dia, esperando que eu terminasse o trabalho.

Agradeço também às instituições ESAC e RAIZ que tornaram esta tese possível.

Estou muito agradecida à Prof. Manuela Branco e Dr.<sup>a</sup> Catarina Afonso que fizeram valiosas contribuições e sugestões para a tese.

À minha família: mãe, pai, irmão e irmã do coração que me apoiaram, encorajaram e motivaram ao longo de todo o percurso. Foram incansáveis e cheios de paciência.

Muito devo à família Redondo, Jacinta, César e Manuel, que durante este percurso me abriram as portas da sua casa para que pudesse tornar esta etapa académica possível, a vossa amizade não tem preço, muito obrigada.

A todos os amigos, colegas que se tornaram amigos e professores que me capacitaram para tornar esta tese possível e tornaram esta jornada agradável, obrigada.

Por fim às entidades patronais e colegas de trabalho que me incentivaram a prosseguir.

Filipa Caldeira

## RESUMO

Em Portugal, o eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) é uma das espécies florestais de maior interesse económico, pois o seu rápido crescimento e adaptabilidade a várias condições ecológicas tornaram-na uma das espécies mais plantadas com o propósito industrial de madeira e pasta de papel.

Ao longo do tempo foi detetado um aumento de pragas e doenças que poderão ter sido introduzidas acidentalmente, resultante da circulação de pessoas e bens. Os impactos negativos das pragas e doenças que afetam os eucaliptos são transversais a todas as funções que estes povoamentos prestam, em particular à produção com impactos económicos.

O controlo biológico é uma das principais estratégias para lidar com as pragas invasoras.

Neste estudo procura-se se a perceber se *Anagonia lasiophthalma* (Malloch) (Diptera: Tachinidae) é um bom agente de biocontrolo para a praga *Gonipterus platensis* Marelli (Coleoptera; Curculionidae) relativamente à sua especificidade, para tal tentou se responder de que forma os estímulos odoríferos influenciam a localização do hospedeiro pelas fêmeas de *A. lasiophthalma* e se os períodos do dia afetam a escolha do hospedeiro. O objetivo deste trabalho é a análise das interações tri-tróficas entre a planta hospedeira *E. globulus* (Labill.), a praga *G. platensis* e o parasitoide *A. lasiophthalma*.

Os resultados indicam que as fêmeas de *A. lasiophthalma* foram atraídas sobretudo por ramos de eucalipto a serem consumidos por *G. platensis*.

Os dados obtidos sugerem um comportamento atrativo das fêmeas de *A. lasiophthalma* a compostos voláteis induzidos por herbivoria, isto é a planta liberta odores diferentes quando sob ataque de *G. platensis* que fornecem pistas sobre a localização do hospedeiro à *A. lasiophthalma*.

Este trabalho valida a importância da planta hospedeira para a localização do hospedeiro. *A. lasiophthalma* pode tornar-se um agente de biocontrolo capaz de colmatar a lacuna no combate à praga com os agentes existentes, aumentando a produção dos povoamentos afetados.

Palavras-chave: Controlo biológico, Parasitoide, Localização de hospedeiro, Voláteis de plantas induzidas por herbívoros.

## ABSTRACT

In Portugal, eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) is one of the forest species of greatest economic interest, as its rapid growth and adaptability to various ecological conditions have made it one of the most widely planted species for industrial purposes such as timber and pulp production.

Over time, an increase in pests and diseases has been detected, which may have been accidentally introduced as a result of the movement of people and goods. The negative impacts of these pests and diseases affecting eucalyptus are significant across all functions that these plantations provide, particularly production, with economic repercussions.

Biological control is one of the main strategies to address invasive pests.

This study aims to assess whether *Anagonia lasiophthalma* (Malloch) (Diptera: Tachinidae) is an effective biocontrol agent for the pest *Gonipterus platensis* Marelli (Coleoptera: Curculionidae) in terms of its specificity. To achieve this, the study sought to answer how olfactory stimuli influence host location by *A. lasiophthalma* females and whether the time of day affects host choice. The objective of this work is to analyze the tritrophic interactions between the host plant *E. globulus* (Labill.), the pest *G. platensis*, and the parasitoid *A. lasiophthalma*.

The results indicate that *A. lasiophthalma* females were particularly attracted to eucalyptus branches being consumed by *G. platensis*.

The data obtained suggest an attractive behavior of *A. lasiophthalma* females to herbivory-induced volatile compounds, meaning that the plant releases different odors when under attack by *G. platensis*, which provide cues for host location to *A. lasiophthalma*.

This work validates the importance of the host plant in host location. *A. lasiophthalma* could become a biocontrol agent capable of filling the gap in pest management with existing agents, thereby enhancing the productivity of affected plantations.

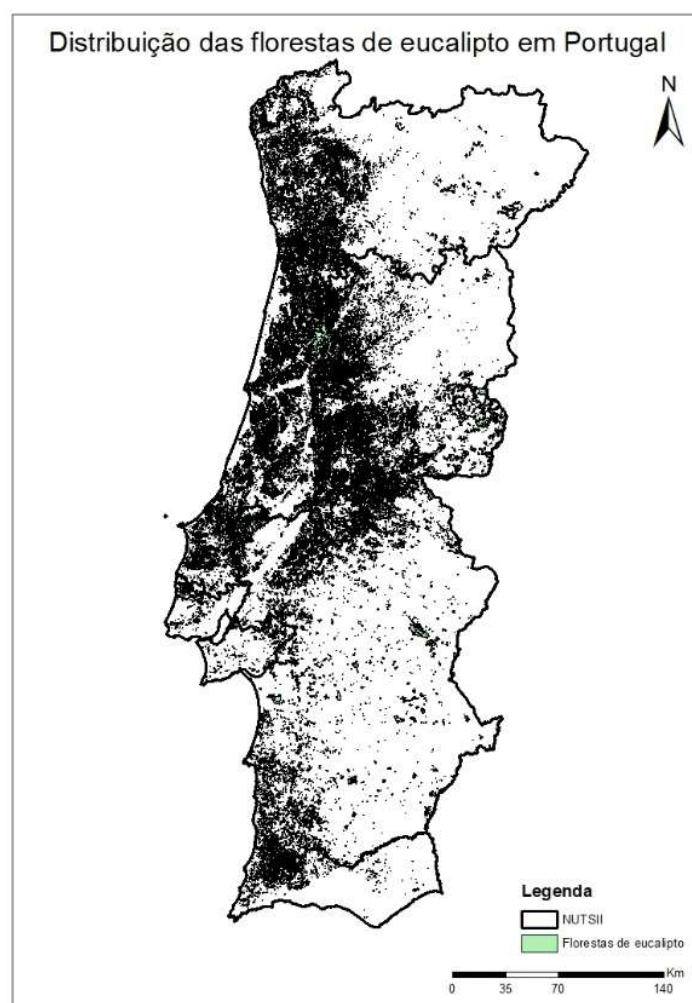
Key words: Biological control, Parasitoid, Host location, Herbivore Induced Plant Volatiles

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Eucalyptus globulus* (Labill.)

O eucalipto comum (*Eucalyptus globulus* Labill.) é uma espécie originária da Austrália (estados da Tasmânia e Vitória), introduzida em Portugal em meados do século XIX com propósitos ornamentais. O rápido crescimento e adaptabilidade a várias condições ecológicas tornaram-na uma das espécies mais plantadas com o propósito industrial de madeira e pasta de papel (Cerasoli *et al.*, 2016).

Segundo os dados do 6º Inventário Florestal Nacional de 2015 (ICNF, 2015a) as florestas de eucalipto ocupam uma área de cerca de 845 mil hectares em Portugal Continental, sendo a sua distribuição apresentada na Figura 1.



**Figura 1 - Distribuição das florestas de eucalipto em Portugal continental segundo a COS2018 (cartografia produzida a partir da COS2018 disponibilizada pela DGT)**

É a principal espécie florestal com interesse económico em Portugal, pelo que tem uma grande importância, não só pela área de ocupação atual, mas pela sua elevada rentabilidade (Alves *et al.*, 2007).

O forte crescimento, desenvolvimento e expansão do eucalipto logo após a sua introdução deve-se em parte a ausência de pragas e doenças do mesmo (Sarmiento, 2015). No entanto, ao longo do tempo foram detetadas várias pragas e doenças que poderão ter sido introduzidas acidentalmente, que se abordará com mais detalhe nos capítulos seguintes (Valente *et al.*, 2021).

## 1.2 Pragas e doenças do eucalipto em Portugal

A maioria dos agentes bióticos que afetam o eucalipto em Portugal são da Austrália, a região de origem do eucalipto. São raros os agentes bióticos nativos e exóticos que não sejam específicos ao eucalipto que os afetem no nosso país (Valente *et al.*, 2021).

Atualmente, as principais pragas e doenças que atacam os eucaliptos em Portugal são o gorgulho-do-eucalipto, a doença-das-manchas-das-folhas e as brocas-do-eucalipto. No entanto, existe um considerável conjunto de pragas e doenças que afetam várias partes da planta, como se pode ver na Tabela 1.

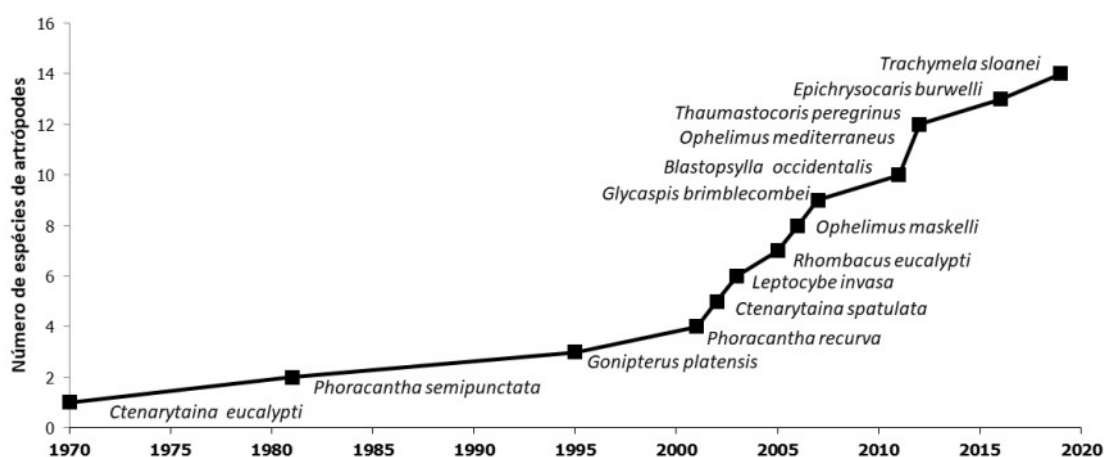
**Tabela 1 - Pragas e doenças dos eucaliptos presentes em Portugal (Valente *et al.*, 2021)**

	Tipo	Nome comum	Nome científico	Zonas de maior incidência
Pragas	Desfolhador	Gorgulho-do-eucalipto	<i>Gonipterus platensis</i>	Áreas de altitude do Norte e Centro
		Traquimela	<i>Trachymela sloanei</i>	Sudeste, em expansão
	Broca	Foracanta ou broca-do-eucalipto	<i>Phoracantha semipunctata</i>	Zonas secas do Interior, Centro e Sul
			<i>Phoracantha recurva</i>	
	Picador/sugador	Percevejo-do-bronzeamento	<i>Thaumastocoris peregrinus</i>	Zonas secas do Interior, Centro e Sul
		Psila-da-folha-adulta	<i>Ctenarytaina spatulata</i>	Generalizada
		Psila-da-folha-juvenil	<i>Ctenarytaina eucalypti</i>	Viveiro
		Psilídeo-de-concha	<i>Glycaspis brimblecombei</i>	Generalizada
		Psila-algodão	<i>Blastopsylla occidentalis</i>	Generalizada
		Ácaro-do-eucalipto	<i>Rhombacis eucalypti</i>	Generalizada
Galicola	Vespa-da-galha	<i>Leptocybe invasa</i>	Generalizada	
		<i>Ophelimus maskelli</i>	Generalizada	
		<i>Ophelimus mediterraneus</i>	Generalizada	
		<i>Epichrysocharis burwelli</i> <sup>1</sup>	Lisboa e Vale do Tejo	
Doenças	Doença da parte aérea	Doença-das-manchas-das-folhas	<i>Teratosphaeria</i> spp. <i>Mycosphaerella</i> spp.	Litoral Centro e Norte e viveiros
		Podridão cinzenta	<i>Botrytis cinerea</i>	Viveiros
		Quambalaria	<i>Quambalaria eucalypti</i>	Generalizada
	Doença do tronco	Cancro	<i>Pestalotiopsis</i> spp. <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	Viveiros
			<i>Neofusicoccum</i> spp. <i>Teratosphaeria gauchensis</i>	Generalizada
Doença das raízes	Fitóftora	<i>Phytophthora</i> spp.	Provavelmente generalizada	

<sup>1</sup> Inseto apenas encontrado em *Corymbia citriodora*.

Nas últimas décadas, tem-se verificado um aumento de fatores bióticos que atacam os eucaliptos, resultante do aumento da circulação de pessoas e bens. As pragas e doenças têm consequências negativas em termos económicos, uma vez que podem tornar povoamentos florestais em não rentáveis.

A Figura 2 mostra o número de espécies de artrópodes herbívoros, associados aos eucaliptos em Portugal em função do ano da sua primeira identificação (Valente *et al.*, 2021).



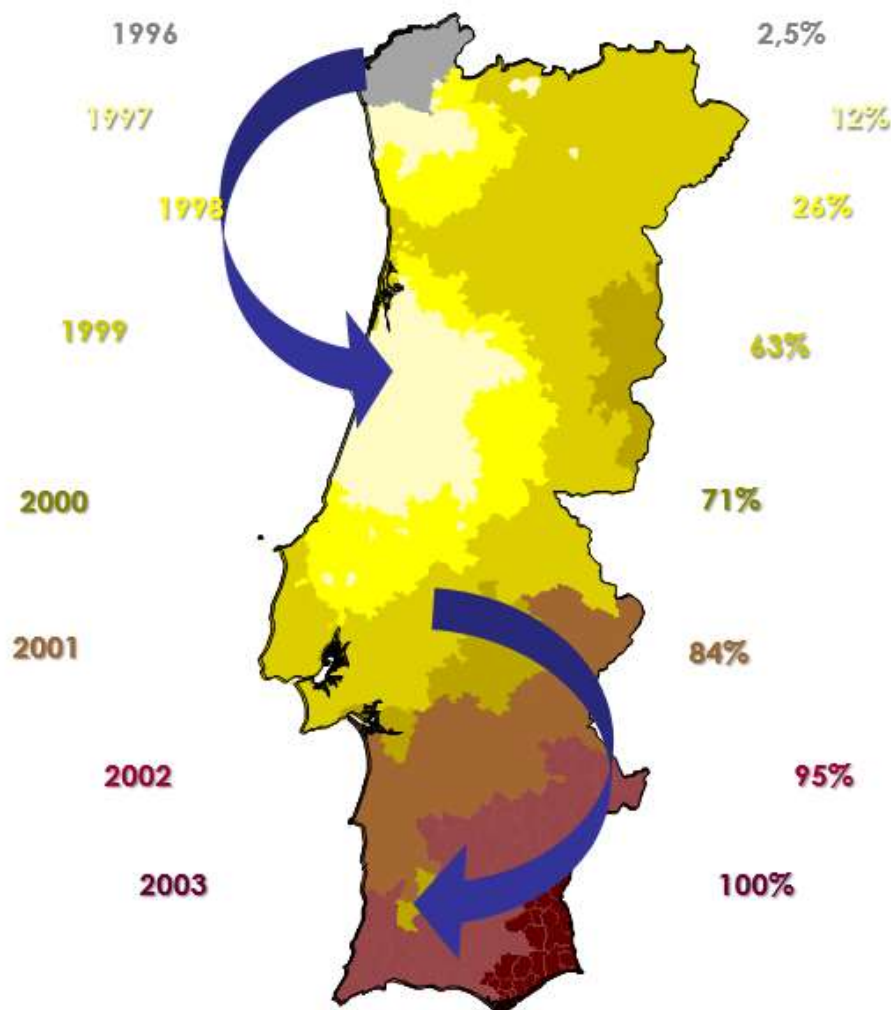
**Figura 2 - Curva cumulativa do número de espécies de artrópodes australianos, fitófagos, associados aos eucaliptos em Portugal, com base no ano da sua primeira identificação (Valente *et al.*, 2021)**

Os impactos negativos das pragas e doenças que afetam os eucaliptos são transversais a todas as funções que esses povoamentos prestam, como a produção de bens (o impacto mais direto e facilmente quantificável), funções de conservação, incluindo a mitigação da erosão dos solos, a retenção de água e o sequestro de carbono (Valente *et al.*, 2021).

### 1.3 *Gonipterus platensis* Marelli (Coleoptera: Curculionidae)

*G. platensis* é originário da Austrália Ocidental e foi descrito pela primeira vez em 1927. Pertence ao complexo *Gonipterus scutellatus* e é a espécie dentro do complexo que está mais amplamente distribuída (Mapondera *et al.*, 2012).

É um inseto desfolhador que se alimenta das folhas de eucalipto, apresentando dois picos de ataque por ano na Primavera e no Outono, em Portugal (Ceia *et al.*, 2021; Adame *et al.*, 2022). Detetado pela primeira vez em Portugal em 1996, na região do Minho, *G. platensis* expandiu-se para todo o país em oito anos (Figura 4), em parte devido à ação antrópica que mobiliza madeira contaminada para áreas de armazenamento e processamento (Valente *et al.*, 2004).



**Figura 3 - Mapa representativo da evolução da distribuição de *G. platensis* em Portugal ao longo do tempo (Valente *et al.*, 2008)**

Os adultos são castanho-escuros, medindo cerca de 7 a 9 mm, sendo as fêmeas maiores que os machos, apresentam dimorfismo sexual no quinto esternito abdominal. Têm a capacidade de voar nos períodos mais quentes do dia. Os ovos, depositados em fila dentro de uma cápsula, são colocados na parte superior das folhas (Tooke, 1953; Mansilla & Pérez-Otero, 1996; Sousa & Ferreira, 1996).

A larvas são ápodas, com cabeça escura e apresentam três faixas verde-escuras no abdómen, podem chegar a medir 7,5 a 12 mm. Quando estão prontas para pupar caem no chão e formam a câmara pupal a uma profundidade de 10 a 15 cm no solo.

A câmara pupal é constituída por partículas de solo cimentadas por uma secreção da larva. As pupas têm uma coloração amarelo-esbranquiçada e têm a forma semelhante ao adulto.

A Figura 4 esquematiza o ciclo de vida de *G. platensis*.



Fotos: Ana Reis e Dina Ribeiro

Figura 4 - Ciclo de vida de *G. platensis* (ICNF, 2015b)

O ciclo de vida de *G. platensis* é influenciado pelo clima, com a temperatura afetando os períodos de atividade dos adultos, e a precipitação afetando o desenvolvimento da pupa no solo. As fêmeas preferem as folhas mais jovens para oviposição e têm a capacidade de atrasar a postura caso as condições ambientais não sejam favoráveis (Sarmiento, 2015).

Valente *et al.* (2018) demonstrou que considerando apenas *G. platensis*, as perdas económicas em Portugal causariam perdas de cerca de 1 milhão de m<sup>3</sup> de madeira por ano. Os ataques são mais intensos em áreas acima de 400 metros de altitude (Valente *et al.*, 2018).

As larvas de *G. platensis* alimentam-se exclusivamente das folhas, de preferência rebentos, enquanto os indivíduos adultos são mais diversificados e também se alimentam dos ramos verdes. *G. platensis* têm preferência por povoamentos com árvores de 3 a 8 anos, pois provavelmente existe uma maior disponibilidade de folhas adultas a abrolhar para as suas larvas (Ceia *et al.*, 2021). Isso resulta em folhas totalmente consumidas, reduzindo a capacidade fotossintética das plantas e levando a perdas de produção (Reis *et al.*, 2012; Sarmiento, 2015).

A Figura 5 ilustra os sinais e sintomas da presença de *G. platensis* em povoamentos.



Figura 5 - Sinais e sintomas da presença de *G. platensis* em povoamentos (ICNF, 2015b)

#### 1.4 Métodos de controlo

O controlo de pragas e doenças é crucial para minimizar as perdas que podem ser causadas por esses organismos. A escolha dos métodos de controlo depende de vários fatores, incluindo os custos económicos e os impactes ambientais associados a cada método (Sarmiento, 2015). Existem várias formas de controlo, cada uma com suas vantagens e limitações:

- Controlo genético – Envolve a seleção e utilização de variedades de plantas que são mais resistentes a pragas e doenças;
- Controlo químico – Consiste na aplicação de produtos fitofarmacêuticos. No entanto além de não ser completamente eficaz, é muito oneroso e acarreta muito impactes negativos no meio ambiente;
- Controlo físico – Envolve práticas como a silvicultura, que inclui a eliminação de árvores por motivos sanitários;
- Controlo biotécnico – Utiliza o recurso a armadilhas com feromonas para atrair e capturar as pragas, reduzindo assim a sua população (Valente *et al.*, 2021);
- Controlo biológico – Implica a utilização de organismos vivos para controlar a população das pragas (que será abordado com maior detalhe no capítulo 1.5).

O controlo biológico clássico, isto é, uma estratégia de gestão de populações de pragas através da introdução deliberada de organismos vivos de uma área geográfica para outra com o objetivo de controlar a população da praga, têm sido a estratégia mais comum a nível mundial para controlar as populações de *G. platensis* (ICNF, 2015b; Valente *et al.*, 2017). Embora o controlo químico também seja utilizado em Portugal (Valente *et al.*, 2021), o controlo biológico é considerado mais eficaz, duradouro e económico a longo prazo. Em comparação com o uso de pesticidas, que pode apenas reduzir temporariamente as populações de pragas, o controlo biológico pode oferecer uma solução sustentável ao longo de tempo, com menos impactos ambientais negativos. É ainda importante notar que a certificação das florestas e do material lenhoso pode restringir o uso de certos produtos fitofarmacêuticos, o que pode afetar a eficácia dos métodos de controlo químico.

### 1.5 Controlo biológico

O controlo biológico é aplicável, em teoria, a todos os organismos e consiste na utilização de parasitoides, predadores, agentes patogénicos, antagonistas ou populações competidoras para suprimir a população de uma praga, tornando-a menos abundante e, por consequência, menos danosa do que seria sem controlo. Pode ser resultado de ação antropogénica ou de ação natural (Van Driesche & Bellows, 1996).

Os três principais métodos de controlo biológico são: a conservação, o aumento dos inimigos naturais e a importação. O controlo biológico por conservação consiste na abordagem de manutenção das populações de inimigos naturais existentes para controlar a(s) praga(s) de forma natural. O controlo biológico por aumento dos inimigos naturais envolve a criação e libertação deliberada de grandes quantidades de organismos que são inimigos da(s) praga(s) alvo. Este tipo de controlo biológico é considerado sustentável, pois utiliza organismos como agente de controlo que não causam danos significativos no ecossistema. O controlo biológico por importação é também conhecido por controlo biológico clássico e é frequentemente utilizado quando uma espécie de praga é introduzida (acidentalmente ou não) numa nova região sem predadores naturais levando a um aumento descontrolado da sua população e que pode causar danos significativos às culturas e/ou ecossistemas locais. Ao introduzir um agente de controlo espera-se restabelecer um equilíbrio ecológico que limite o crescimento da população da praga. O controlo biológico têm menos efeitos secundários negativos em comparação com o controlo químico. A segurança do controlo biológico depende de vários fatores como os agentes bióticos utilizados mostrarem um elevado grau de especificidade ao hospedeiro. A pesquisa pré

libertação têm em consideração as características dos inimigos naturais e do habitat (Huffaker *et al.*, 1976).

As etapas de implementação do controlo biológico por introdução são: identificação (dos inimigos naturais), autorização (para a importação), importação (de espécimes de inimigos naturais para a condução de estudos), estudos laboratoriais (avaliação de riscos que a nova espécie pode representar para o ecossistema e eficácia no combate a praga), autorização para libertação no campo, produção de espécimes e libertação em campo, avaliação do estabelecimento, da eficácia e eventuais impactes (Van Driesche & Bellows, 1996).

As fases iniciais (prospecção, identificação, importação, estudo, criação, libertação e avaliação em campo de inimigos naturais) implicam um grande investimento, mas assim que a espécie agente de controlo se estabeleça não existe a necessidade de mais recursos (ICNF, 2015b).

Caso não exista um estudo profundo sobre os riscos e eficácia da introdução de uma nova espécie (exótica) corre-se o risco de a mesma não ser específica ao hospedeiro que se pretende controlar e afetar espécies nativas, podendo tornar-se invasora (Morales-Ramos *et al.*, 2014).

O sucesso do controlo biológico não pode ser completamente previsto, no entanto, depende muito da adaptação às condições ambientais, estabelecimento da espécie, a capacidade de reprodução e longevidade (Huffaker *et al.*, 1976; Valente *et al.*, 2017).

O controlo biológico pode ser feito com recurso a parasitoides, predadores, agentes patogénicos, antagonistas ou populações competidoras da praga, neste trabalho aborda-se apenas um agente parasitoide.

## 1.6 Parasitoides

É importante distinguir os conceitos de parasita e parasitoide, este último foi introduzido por Reuter em 1913. Um parasitoide encontra-se entre um predador e um parasita pois, à semelhança dos predadores, matam sempre o seu hospedeiro e, à semelhança dos parasitas, necessitam de apenas um hospedeiro (artrópode) para se alimentar e completar o seu ciclo biológico.

A maioria dos parasitoides pertence às ordens Hymenoptera ou Diptera. Estima-se que cerca de 8,5% de todos os insetos sejam parasitoides, o que representa 68000 espécies descritas. Alguns autores consideram que existe relativamente pouco trabalho de investigação em parasitoides e que a sua representação real poderá ser cerca de 1,6 a 2 milhões de espécies (Godfray, 1994).

Os parasitoides da ordem Diptera constituem o segundo grupo de insetos parasitoides mais importantes, sendo o primeiro da ordem Hymenoptera, devido as suas características biológicas, fisiológicas e comportamentais. Isto permite-lhes desempenhar um papel fulcral na regulação de populações de insetos fitófagos (Morales-Ramos *et al.*, 2014). Existem cerca de 15000 espécies de parasitoides pertencentes à ordem Diptera descritos (Godfray, 1994).

A ordem Diptera divide-se nas subordens: Nematocera, Brachycera e Cyclorrhapha. A divisão da subordem Cyclorrhapha é bastante complexa e inclui as duas maiores divisões, dentro da ordem com parasitoides, a Acalypterae e a Calypterae (Godfray, 1994). A família Tachinidae, pertence à subordem Brachycera e secção Calyptratae, está presente em todos os sistemas terrestres do mundo. Todas as suas espécies são endo-parasitoides (desenvolvem-se e alimentam-se dentro do hospedeiro) de artrópodes, em termos evolutivos é considerada recente e em expansão em grupos de insetos pelo que o climax evolutivo de diversificação poderá ainda não ter acontecido.

Cerca de 100 espécies da família Tachinidae são utilizados como agentes em programas de controlo biológico com taxas de sucesso parciais ou completas (Stireman III *et al.*, 2006),

O nível de parasitismo pode variar muito e depende de fatores como o tamanho da população hospedeira, o tamanho da população de parasitoides (estabelecimento da população), as condições ambientais que variam localmente, consoante o alcance do hospedeiro. As taxas de parasitismo são dinâmicas ao longo de gerações, e local e dos ciclos de vida que influenciam e são influenciados pelo hospedeiro (O'Hara, 2008).

### 1.7 Localização do hospedeiro e relações tritróficas

A investigação existente para a localização dos hospedeiros pelos parasitoides cabimenta-se em duas abordagens principais. Uma visão preocupa-se em compreender os mecanismos comportamentais usados pelos parasitoides cujo objetivo é manipular estímulos percebidos pelos parasitoides de forma a melhorar o controlo biológico (começou na década de 1930 e revelou com sucesso uma série de pistas que os parasitoides utilizam para localizar os hospedeiros) e a outra abordagem concentra-se na plasticidade de respostas dos parasitoides a diferentes pistas e na importância da sua aprendizagem (começou na década de 1970) (Godfray, 1994).

Para a localização dos hospedeiros os parasitoides (e outros insetos carnívoros) utilizam pistas químicas originárias do hospedeiro/presa ou do alimento do hospedeiro/presa. Estas pistas podem ser específicas ao hospedeiro/presa, sendo que a reação a estas pistas pelos parasitoides

pode ser inata ou apreendida. A resposta comportamental pelos parasitoides vai depender da sua especialização com o hospedeiro/presa (Vet & Dicke, 1992; Steidle & van Loon, 2003). O modelo de localização de hospedeiro pode ser dividido hierarquicamente em: localização do habitat do hospedeiro, localização do hospedeiro, aceitação do hospedeiro, adequação do hospedeiro e regulação do hospedeiro; e esta divisão é amplamente aceita e adotada por quase todos os autores que fazem a revisão deste tema (Godfray, 1994).

A estratégia de oviposição é determinante na forma de selecionar os hospedeiros adequados e a capacidade de responder ao aumento da população hospedeira depende da recepção de estímulos que contêm pistas sobre a localização dos mesmos (Morales-Ramos *et al.*, 2014).

Algumas fêmeas parasitoides podem apresentar preferências de habitat, é o primeiro passo na seleção de hospedeiro, a fêmea procura inicialmente um habitat com condições adequadas à sua procriação. Os primeiros compostos voláteis a serem detetados são de longo alcance provenientes da planta ou de uma planta em stress. Uma vez encontrado o habitat adequado, a fêmea procura pistas adicionais, circunscrevendo cada vez mais a área de procura do hospedeiro (Valente *et al.*, 2017).

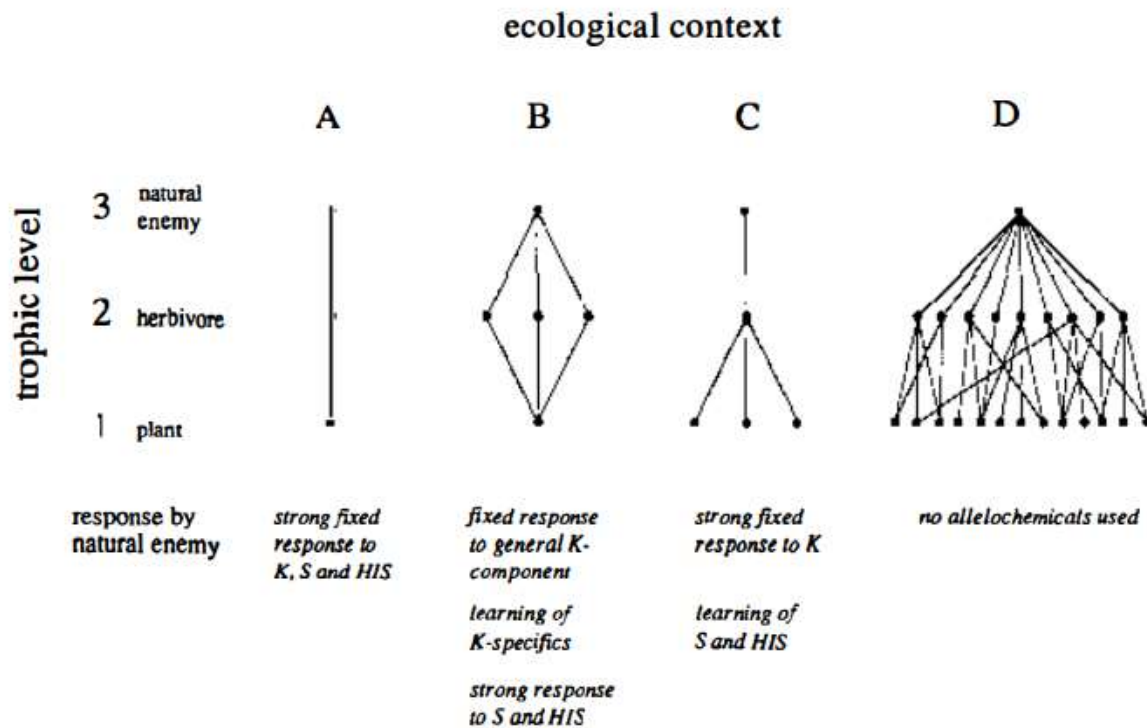
É comum os parasitoides orientarem-se por pistas derivadas de diferentes níveis tróficos e a informação química desempenha um importante papel (Vet & Dicke, 1992). Muitos parasitoides respondem a odores libertados pela atividade de alimentação dos seus hospedeiros (compostos voláteis de plantas induzidos por herbivoria).

As relações tritróficas entre plantas, hospedeiros (herbívoros) e os respetivos parasitoides (inimigos naturais) são uma parte integral de todos os ecossistemas terrestres (Turlings & Erb, 2018), são bastante complexas e alvo de vários estudos.

As interações entre herbívoros e plantas e entre herbívoros e inimigos naturais devem ser entendidas no contexto tritrófico, pois a sua importância é tal que condiciona os comportamentos dos intervenientes. Estas relações são mediadas por compostos voláteis emitidos e detetados pelos diferentes níveis tróficos.

A resposta a compostos voláteis emitidos pelas plantas e pelo segundo nível trófico é condicionada pela especialização da sua dieta, isto é, insetos fitófagos e inimigos naturais têm a capacidade de reconhecer compostos voláteis específicos de plantas e de insetos fitófagos quanto mais especialistas na sua dieta e oviposição forem. Insetos fitófagos e inimigos naturais que se alimentem de mais que uma espécie serão capazes de reconhecer várias combinações de compostos voláteis e optar por aquele que seja mais adequado, como mostra a Figura 6. A resposta dos estímulos químicos pelos inimigos naturais depende de dois fatores: a fiabilidade e a detetabilidade. Os estímulos derivados de hospedeiros são geralmente mais fiáveis, no

entanto tendem a ser menos detetáveis, isto é, indicam com maior certeza a adequação do hospedeiro pretendido, contudo estes odores são mais difíceis de identificar (Vet & Dicke, 1992)



**Figura 6 - Especialização da dieta e utilização químicos pelo terceiro nível trófico num contexto tri-trófico (Vet & Dicke, 1992)**

**Legenda:** K – Cairomona; S- Sinomona; HIS – Sinomona induzido por herbivoria.  
Os pontos indicam diferentes espécies.

Para os parasitoides, as plantas podem ter impactes positivos como: servir como suplemento alimentar, local para a oviposição em espécies que colocam os seus ovos nas imediações dos hospedeiros para que estes os ingiram, e local de refúgio; ou impactos negativos como: a restrição de movimentos (Pekas & Wackers, 2020).

A nível indireto, as plantas podem influenciar os parasitoides, alterando a sua qualidade nutricional que é consumida pelos hospedeiros e por sua vez serão consumidos pelos inimigos naturais. As plantas podem influenciar o tamanho e o sucesso reprodutivo dos parasitoides. Os processos mediados por plantas nas interações hospedeiro-parasitoide têm implicações no controlo biológico, que pode resultar numa melhor atuação do agente de controlo e por consequência na saúde das plantas (Pekas & Wackers, 2020).

## 1.8 Compostos voláteis de plantas induzidas por herbívoros

Bradleigh Vinson, Donald Nordlund e Joe Lewis foram os primeiros autores que comprovaram a existência de evidências químicas do papel ativo que as plantas desempenham quando lesionadas por herbívoros para recrutar predadores e parasitoides dos mesmos (Vinson *at al.*, 1980). Os compostos voláteis desempenham funções chave nas interações tritróficas, uma vez que podem funcionar para atrair predadores e/ou parasitoides aos herbívoros que atacam as plantas, embora este fenómeno seja mais evidente em parasitoides (Turlings & Erb, 2018).

Os compostos químicos que contenham informação capaz de ser lida entre espécies são chamados de alomonas, podem ser classificados de sinomonas se tanto o emissor e o recetor dos químicos beneficiarem da troca de informação química (Godfray, 1994).

Para haver a libertação destes compostos voláteis, as plantas têm de reconhecer que estão sob ataque de herbívoros e libertam compostos voláteis das folhas verdes. O ataque desencadeia a síntese de outros compostos voláteis que pode demorar mais tempo até a sua libertação, este tempo é variável consoante a espécie de planta em causa. Os compostos voláteis de plantas induzidos por herbivoria podem ser libertados dos tecidos atacados por três mecanismos:

- Podem sair da planta escorrendo pelas feridas, onde existe contacto direto com o conteúdo da célula e a atmosfera;
- Podem difundir-se pelas membranas e paredes celulares e atingir a atmosfera;
- Podem ser transportados ou difundidos do interior das células para o espaço apoplástico e posteriormente libertados pelos estomas (Turlings & Erb, 2018).

Os padrões moleculares dos compostos voláteis libertados pela planta podem ser associados a danos ou associados a herbívoros, os primeiros são substâncias derivadas de plantas e produtos de decomposição, enquanto os segundos são moléculas dos herbívoros que entram em contacto com a planta durante a alimentação (Turlings & Erb, 2018).

Vários compostos voláteis de plantas induzidos por herbivoria podem ter efeitos tóxicos em herbívoros ou inibidores de infeções patogénicas (Turlings & Erb, 2018).

## 1.9 Controlo biológico de *G. platensis* em Portugal

Em 1997, iniciou-se em Portugal um programa de introdução de *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera: Mymaridae) para o controlo de *G. platensis*, que consistiu na libertação de cerca de 300000 parasitoides ao longo de quatro anos. A população de *A. nitens* estabeleceu-se e controla com sucesso as populações de *G. platensis* nas áreas menos montanhosas e mais

quentes (Valente *et al.*, 2018). Requisitos climáticos diferentes do parasitoide e do seu hospedeiro e um atraso temporal entre *A. nitens* e a oviposição de *G. platensis*, que é a justificação mais plausível para a menor eficácia do controlo biológico a altitudes inferiores a 400m (Ceia *et al.*, 2021)

O controlo biológico neste caso particular ofereceu um retorno positivo no investimento e motivou a procura de outro agente de controlo que pudesse colmatar as áreas de insucesso de *A. nitens*, nomeadamente acima dos 400 m de altitude.

Foram conduzidos levantamentos na Tasmânia entre 2008 e 2012 para identificar e recolher espécies de inimigos naturais. Foram identificadas nove espécies de parasitoides, seis oófgos e três larvares, entre os quais o parasitoide de ovos *Anaphes inexpectatus* Huber e Prinsloo (Hymenoptera: Mymaridae), que aceitava bem *G. platensis* como hospedeiro e passou nos testes de risco, sendo que foi libertado em Portugal. Atualmente, *A. inexpectatus* está estabelecido, mas ainda seria benéfico reduzir as populações de *G. platensis* (Valente *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2020).

O foco deste programa de controlo biológico direcionou-se depois para as espécies parasitoides de larvas de *G. platensis*, uma vez que atualmente estas não têm qualquer inimigo natural em Portugal (Martins *et al.*, 2023). Das três espécies de parasitoides que emergiram das larvas, *A. lasiophthalma* foi a única que se reproduziu em laboratório, tornando-se assim a mais viável como possível agente de controlo para *G. platensis* (Gonçalves *et al.*, 2020).

Espera-se que *A. lasiophthalma* possa colmatar as áreas de insucesso de *A. nitens* e *A. inexpectatus* de forma a melhorar a produtividade dos povoamentos de eucalipto afetados por *G. platensis*.

Esta tese foca-se em concreto na *A. lasiophthalma* como agente de biocontrolo de *G. platensis*. *A. lasiophthalma* pertence, à subfamília Exoristinae, à família Tachinidae e à tribo Blondelini. *A. lasiophthalma* foi um dos parasitoides encontrados nas larvas do gorgulho-do-eucalipto que foram importados para Portugal nos levantamentos conduzidos na Tasmânia entre 2008 e 2012 (Gonçalves *et al.*, 2020).

Esta espécie teve um particular interesse como agente de controlo biológico pois parasitava larvas de *G. platensis* (em Portugal até ao momento apenas existam parasitoides de ovos de *G. platensis*). Foi possível criar laboratorialmente *A. lasiophthalma* além de apresentar resultados promissores enquanto específica ao hospedeiro (C. Gonçalves, comunicação pessoal). As fêmeas depositam os seus ovos dentro das larvas de *G. platensis*, e por sua vez as larvas do parasitoide desenvolvem-se internamente, eventualmente matando o hospedeiro à medida que completam o seu ciclo de vida (Gonçalves *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2023).

Apesar dos resultados promissores de *A. lasiophthalma*, é necessário confirmar o seu potencial de controlo biológico específico, adaptado ao clima, ao ciclo de vida do hospedeiro e com mobilidade para localiza-lo (Gonçalves *et al.* 2020).

O ciclo de vida de *A. lasiophthalma* em concreto é pouco conhecido, no entanto pode se assumir que vai de encontro ao dos taquinídeos, descrito por O'Hara. O ciclo de vida da família Tachinidae é composto por várias fases distintas, adaptadas para maximizar a eficácia parasitária em seus hospedeiros. Os adultos taquinídeos podem variar em tamanho, forma e coloração, podendo ser desde amarelo-pálido até preto intenso, com algumas espécies apresentando cores metálicas. O tórax que pode ser delgado ou largo e uma estrutura setosa ou quase sem pelos. As pernas são geralmente longas e as asas bem desenvolvidas, com variações na venação. O abdómen também é bastante diversificado, variando de estreito e longo a curto e arredondado. Existem duas estratégias principais de postura de ovos entre os taquinídeos, sendo que a estratégia de *A. lasiophthalma* é ovolarvípara (as fêmeas retêm os ovos até que estejam prontos para eclodir, depositando-os já com a larva de primeiro estágio desenvolvida). As larvas passam por três estágios de desenvolvimento (instares). No primeiro instar, a larva pode perfurar o hospedeiro e começar a alimentar-se da sua hemolinfa, evitando órgãos vitais inicialmente. O segundo instar envolve o crescimento rápido e o maior consumo de tecidos, com a larva a conectar-se ao sistema respiratório do hospedeiro para obter oxigénio. No terceiro instar, a larva consome o hospedeiro de forma mais indiscriminada, levando-o à morte antes de pupar. A fase de pupa ocorre dentro de um casulo formado pelo endurecimento da pele do terceiro instar. A maioria das espécies puparia no solo ou em detritos, mas algumas permanecem dentro do hospedeiro. Durante a emergência do adulto, ele infla uma estrutura chamada ptilino para romper o casulo e sair (O'Hara, 2008).

Vários dípteros parasitoides, incluindo o grupo a que *A. lasiophthalma* pertence, desenvolveram um ovipositor que é usado para perfurar e injetar os ovos diretamente no hospedeiro. Este tipo de estratégia permite minimizar as hipóteses de os ovos serem destruídos pelo hospedeiro ou eliminados durante a muda. É considerada uma estratégia eficaz na mortalidade do hospedeiro pois quer a introdução dos ovos, quer o pouco tempo que levam a eclodir não permite a sua destruição pelo hospedeiro, uma vez que a embriogénese de *A. lasiophthalma* ocorre dentro da fêmea. As fêmeas acasalam entre dois a dez dias depois da sua emergência e o pico de parasitismo ocorre entre a terceira a quinta semana. Considera-se que a sua taxa de fecundidade é relativamente baixa, tem em média 35 descendentes por fêmea, embora disseções *pos-mortem* revelam a presença de óvulos, sugerindo que a fecundidade não deverá ser um fator limitante (Martins *et al.*, 2023). Sabe-se ainda que a longevidade de *A.*

*lasiophthalma* aumenta na ausência de hospedeiro (possivelmente associado a menores gastos energéticos com o parasitismo) podendo durar até 25 dias para fêmeas, o que é um sinal positivo para o estabelecimento do parasitoide na natureza em concordância com o ciclo de vida de *G. platensis* que tem dois picos por ano, alternados com períodos de baixa densidade. (Martins *et al.*, 2023).

Trata-se de um parasitoide solitário, no entanto pode ocorrer superparasitismo, isto é, mais do que um ovo depositado no mesmo hospedeiro, mas apenas um sobrevive ou então todos morrem (Godfray, 1994).

O objetivo deste trabalho é a análise das interações tri-tróficas entre *E. globulus*, *G. platensis* e *A. lasiophthalma*.

Este trabalho visa entender como os estímulos odoríferos influenciam a localização do hospedeiro pelas fêmeas de *A. lasiophthalma*, investigando se os odores isolados de *E. globulus* ou combinados com *G. platensis* podem indicar o estado de maturidade do hospedeiro. Também se explorou se os períodos do dia (manhã ou tarde) afetam a escolha do hospedeiro por *A. lasiophthalma*. Os resultados podem fornecer evidências sobre a especificidade e eficácia de *A. lasiophthalma* como parasitoide de *G. platensis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em 2023 nas instalações do RAIZ, Instituto de Investigação da Floresta e Papel, em Eixo (Aveiro).

### 2.1 Material biológico

Todo o material biológico utilizado foi fornecido pelo instituto RAIZ. Foram utilizados ramos de eucalipto provenientes de plantações comerciais de *E. globulus* que foram mantidos a 8°C durante, no máximo, duas semanas. Os indivíduos de *G. platensis* (larvas e adultos) e *A. lasiophthalma* provinham das populações laboratoriais mantidas no RAIZ, mantidas conforme descrito em Martins *et al.* (2023).

Para os ensaios, utilizam-se apenas fêmeas de *A. lasiophthalma* provenientes da criação laboratorial (que se pressupunha estarem fecundadas e serem experientes) pois, segundo Crespo & Castelo (2008), certas espécies podem condicionar a sua resposta a estímulos

dependendo do sexo e estágio de maturação. Serão as fêmeas que irão apresentar comportamentos de localização e seleção de hospedeiro.

Foram preparados bouquets de eucalipto com cinco a oito rebentos jovens com cerca de 20 cm, num Erlenmeyer de 250 mL com água (de forma que os mesmos não secassem) e presos com uma esponja, para evitar a queda de insetos na água. Foram utilizados três tipos de estímulos, para cada tipo de ensaio: (1) bouquets apenas com ramos de eucalipto, para avaliar a atratividade do eucalipto, a planta hospedeira; (2) bouquets em que estiveram 20 larvas de *G. platensis* durante, pelo menos 12 horas; (3) bouquets em que estiveram 20 adultos de *G. platensis* durante, pelo menos 12 horas; e (4) 20 larvas de *G. platensis* numa base elevada.

## 2.2 Olfatómetro de dupla escolha

Para a realização desta experiência foi necessário um olfatômetro como representado esquematicamente na Figura 8, composto por dois cubos de acrílico transparentes com 30 cm de lado (A) ligados entre si por um tubo transparente de acrílico com 40 cm de comprimento e 15 cm de diâmetro (B).

Os dois cubos, além de estarem conectados entre si, possuem cada um, duas aberturas circulares, uma destinada à regulação da corrente de ar introduzida no olfatômetro (a regulação é feita pela aplicação de tecido semipermeável ao ar até produzir a corrente de ar desejável) (D) e a outra abertura para permitir a introdução do material biológico a testar e a retirada dos indivíduos de *A. lasiophthalma* após o tempo decorrido do ensaio (esta abertura quando fechada, não permite a passagem de corrente de ar) (C). O cilindro que conecta os dois cubos tem uma abertura a meio, que permite a entrada de *A. lasiophthalma* (F).

O olfatômetro é completado por duas ventoinhas (E) nas extremidades que estando ligadas durante o procedimento geram a corrente de ar para dentro dele, de forma a permitir que odores de ambos os lados possam ser detetados pelos indivíduos de *A. lasiophthalma* introduzidos no centro do olfatômetro. Garantiu-se que o fluxo de ar era equivalente dos dois lados com recurso a um anemômetro de fio quente TROTEC BA30WP.

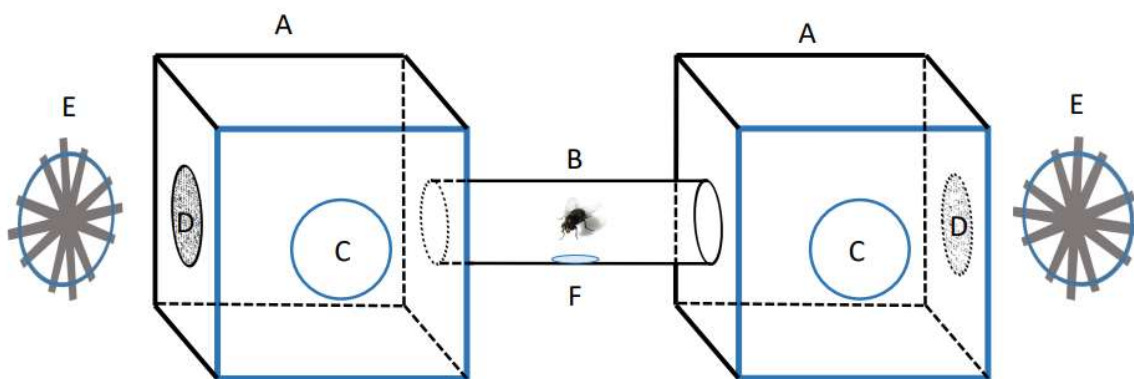


Figura 7 - Esquema representativo do olfatômetro (Afonso *et al.*, 2023)

### 2.3 Condições de ensaios

Foi comparada a atração das fêmeas de *A. lasiophthalma* pelos odores emitidos pela planta hospedeira (eucalipto), pelo hospedeiro (larvas de *G. platensis*) ou pela interação entre o hospedeiro e a planta hospedeira (eucalipto desfolhado por larvas ou por adultos de *G. platensis*). Para tal, colocava-se um tipo de estímulo num dos cubos do olfatômetro e outro tipo de estímulo no outro cubo, após o que se introduziam seis fêmeas de *A. lasiophthalma* no centro do olfatômetro e, após dez minutos, registava-se a localização das fêmeas: no cubo da esquerda, no cubo da direita ou no tubo central (empate).

Realizaram-se ensaios prévios de teste no olfatômetro para definir o procedimento experimental e concluiu-se que dez minutos de exposição no olfatômetro seriam suficientes para que as fêmeas de *A. lasiophthalma* fizessem uma escolha sobre qual o cubo para o qual se preferiram direcionar. Inclusive, verificou-se que este período era suficiente para que ocorresse parasitismo das larvas de gorgulho-do-eucalipto.

Devido às dimensões do olfatômetro e o tempo necessário para colocar e retirar os espécimes de *A. lasiophthalma*, que não permitia o uso de um número muito elevado de insetos, optou-se por realizar os ensaios com seis fêmeas.

Cada ensaio foi repetido com dez grupos de seis fêmeas distintas, para ter relevância estatística. Para eliminar a possibilidade de as fêmeas de *A. lasiophthalma* terem preferência pelo cubo da esquerda ou pelo cubo da direita (devido a fatores como, por exemplo, a intensidade da luz), após cinco repetições, invertia-se as posições dos tratamentos entre os cubos.

A Tabela 2 mostra as combinações de ensaios realizados foram os seguintes:

**Tabela 2 - Combinações dos ensaios**

	<b>Descrição</b>	<b>Número de repetições</b>
<b>Branco vs. Branco</b>	Os dois cubos estão vazios, para avaliar a preferência pelo cubo da esquerda ou cubo da direita	34
<b>Branco vs. Bouquet</b>	Um dos cubos está vazio e o outro contém um bouquet de eucalipto	20
<b>Branco vs. Bouquet + larvas</b>	Um dos cubos está vazio e o outro contém um bouquet de eucalipto com 20 larvas de <i>G. platensis</i>	48
<b>Branco vs. Larvas</b>	Um dos cubos está vazio e o outro contém 20 larvas de <i>G. platensis</i> numa placa elevada de forma à corrente de ar que atravessa o olfatômetro passar por ela	40
<b>Branco vs. Bouquet + adultos</b>	Um dos cubos está vazio e o outro contém um bouquet de eucalipto com 20 indivíduos adultos de <i>G. platensis</i>	20
<b>Bouquet vs. Bouquet + larvas</b>	Um dos cubos contém um bouquet de eucalipto e o outro contém um bouquet de eucalipto com 20 larvas de <i>G. platensis</i>	20
<b>Bouquet vs. Bouquet + adultos</b>	Um dos cubos contém um bouquet de eucalipto e o outro contém um bouquet de eucalipto com 20 indivíduos adultos de <i>G. platensis</i>	20
<b>Bouquet + larvas vs. Larvas</b>	Um dos cubos contém um bouquet de eucalipto com 20 larvas de <i>G. platensis</i> e o outro contém 20 larvas de <i>G. platensis</i> numa placa elevada de forma à corrente de ar que atravessa o olfatômetro passar por ela	20
<b>Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos</b>	Um dos cubos contém um bouquet de eucalipto com 20 larvas de <i>G. platensis</i> e o outro contém um bouquet de eucalipto com 20 indivíduos adultos de <i>G. platensis</i>	20

Entre cada grupo de ensaio, os cubos do olfatômetro foram limpos com álcool etílico (96%) para eliminar os odores dos ensaios anteriores.

Os vários ensaios decorreram ao longo do dia entre as 9h e as 20h, a hora a que decorreu cada ensaio foi registada, procurando-se saber se o período do dia teve influência na escolha das fêmeas de *A. lasiophthalma*. Os períodos do dia considerados foram:

- Manhã – das 9 horas às 15 horas;
- Tarde – das 15 horas às 20 horas.

Todas as fases dos ensaios decorreram a 20° C e a 60% de humidade relativa.

## 2.4 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico efetuou-se com recurso ao software SPSS.

Os dados foram classificados e organizados com indicação do tipo de escolha, hora e posição. Procurou-se saber se houve uma seletividade significativa entre opções, para tal, aplicou-se o teste Binomial que compara as frequências observadas das duas categorias da variável (escolha do cubo) com as frequências esperadas numa distribuição binomial caso não existisse seletividade. Neste caso a probabilidade de escolha para ambos os grupos é 0,5. Os dados são considerados como uma amostra aleatória.

Para esta análise usamos o Modelo Linear Generalizado (GLM), que permite que a variável dependente seja relacionada aos fatores e covariáveis por meio de uma função de ligação específica. Para este trabalho optou-se pela função Binominal dada a natureza dos dados.

Um GLM binominal é um tipo de GLM usado para modelar variáveis dependentes binárias. É adequado para situações em que a variável de resposta é binária (apenas dois resultados possíveis). Neste caso a distribuição de erro adequada é a distribuição binomial, que descreve a probabilidade de um determinado número de sucessos em um número fixo de tentativas independentes (tentativas com dois resultados possíveis).

Foram utilizadas análises GLM Binominal, em que as variáveis dependentes são as diferentes combinações dos ensaios.

Considerou-se este tipo de estatística adequado a este estudo, pois com os dados obtidos foi possível considerar apenas a variável da escolha dos cubos de *A. lasiophthalma* ou considerar além da escolha dos cubos a opção de empate.

Testou-se também os efeitos do modelo, em que cada termo do modelo. Considerou-se que os termos com valores com significância inferior a 0,05 têm algum efeito significativo para o modelo.

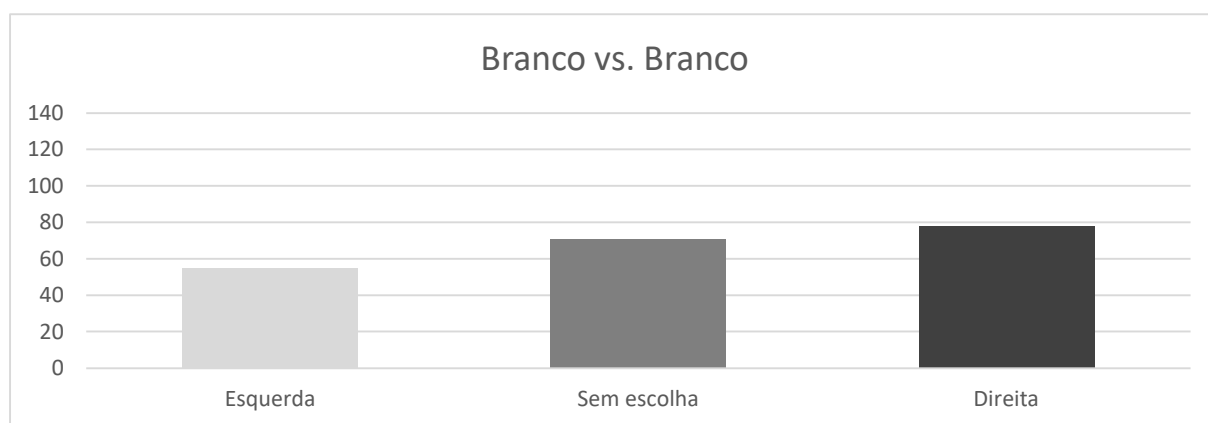
## 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados de seguida por tipo de ensaio.

É importante também realçar que para cada tipo de ensaio testou-se não só a preferência pelo conteúdo do cubo, mas também para o período do dia em que os ensaios foram realizados.

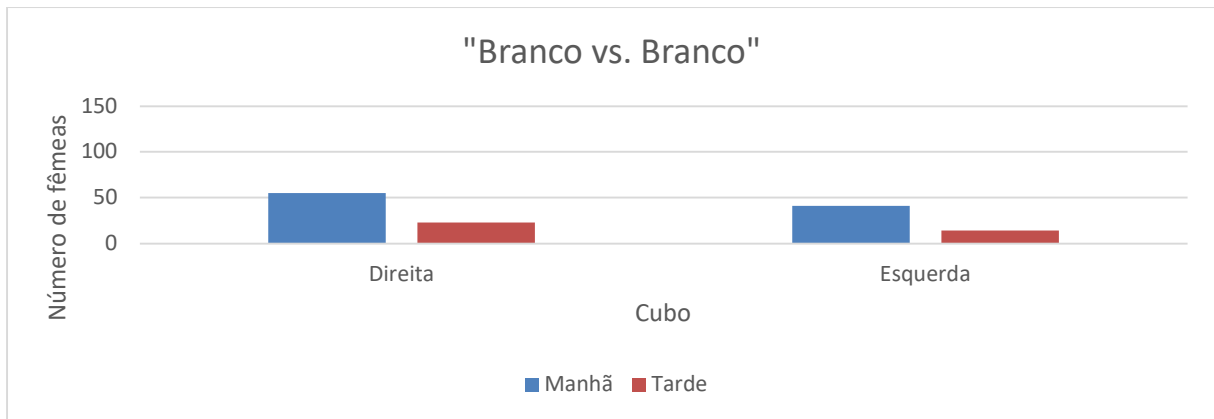
- “Branco vs. Branco”

Os ensaios de preferência do tipo “Branco vs. Branco” totalizaram 55 fêmeas a escolher o cubo esquerdo (27%), 78 a escolher o cubo direito (38%) e 71 (35%) a manterem-se no tubo de ligação dos cubos, como mostra a Figura 8. Foi aplicado o teste estatístico binomial (em que se considera apenas a escolha do cubo direito ou esquerdo) que **não foi significativo** com um valor de P de 0,056, que está muito próximo de ser significativo. Tal indica que, por algum motivo não identificado, as fêmeas de *A. lasiophthalma* parecem tender a deslocar-se para o cubo da direita.



**Figura 8 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Branco"**

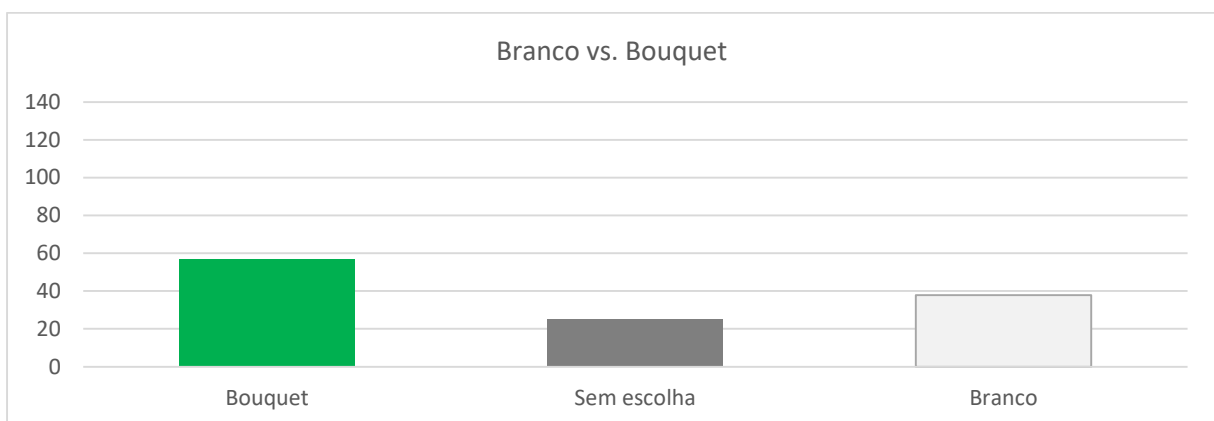
O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo “Branco vs. Branco” totalizou 41 fêmeas a escolher o cubo esquerdo, no período da manhã (representando 43% das escolhas para este tipo de ensaio) e 55 a escolher o cubo direito no mesmo período (57%). No período da tarde, 23 fêmeas escolheram o cubo direito (62%) e 14 preferiram o esquerdo (38%), representado na Figura 9. A análise estatística do modelo GLM Binomial em que a variável dependente é a escolha do cubo direito ou esquerdo e a variável independente foi o período do dia o resultado foi **não significativo**.



**Figura 9 – Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Branco"**

- “Branco vs Bouquet”

Os ensaios de preferência do conteúdo do cubo do tipo “Branco vs. Bouquet” totalizaram 57 fêmeas a escolher o cubo que continha o bouquet (48%), 38 a escolher o cubo vazio (32%) e 25 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos (21%), como indica a Figura 10. O teste binomial aplicado foi **não significativo** com o valor 0,064 para P e 5,970 para  $\chi^2$ , que está muito próximo de ser significativo, o que indica alguma atração das fêmeas de *A. lasiophthalma* pelos odores emitidos pelo eucalipto.



**Figura 10 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Bouquet"**

O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo “Branco vs. Bouquet” totalizou 29 fêmeas a escolher o cubo “Branco” no período da manhã, (representando 50% das escolhas para este tipo de ensaio) e 29 a escolher o cubo “Bouquet” no mesmo período (50%). No período da tarde, 28 fêmeas escolheram o cubo “Bouquet” (76%) e 9 preferiram o “Branco” (24%), apresentado na Figura 11. No teste do modelo de efeitos considerou-se o conteúdo dos cubos, se o conteúdo estava no cubo direito ou esquerdo e o período do dia e não foi possível estimar.

Para o Modelo GLM Binomial não foi possível estimar a variável período do dia.

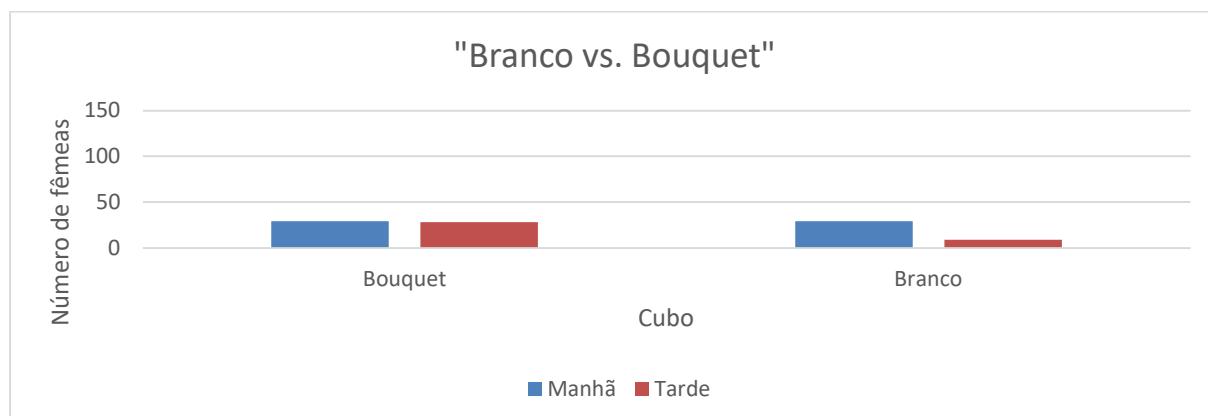


Figura 11 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Bouquet"

- “Branco vs. Bouquet + larvas”

Os ensaios de preferência do tipo “Branco vs. Bouquet + larvas” totalizaram 126 fêmeas a escolher o cubo que continha o bouquet e as larvas (44%), 92 a escolher o cubo vazio (32%) e 70 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos, como demonstra a Figura 12. O teste binomial aplicado foi **significativo** com um P de 0,025, o que indica a atração das fêmeas de *A. lasiophthalma* pelo bouquet com larvas.

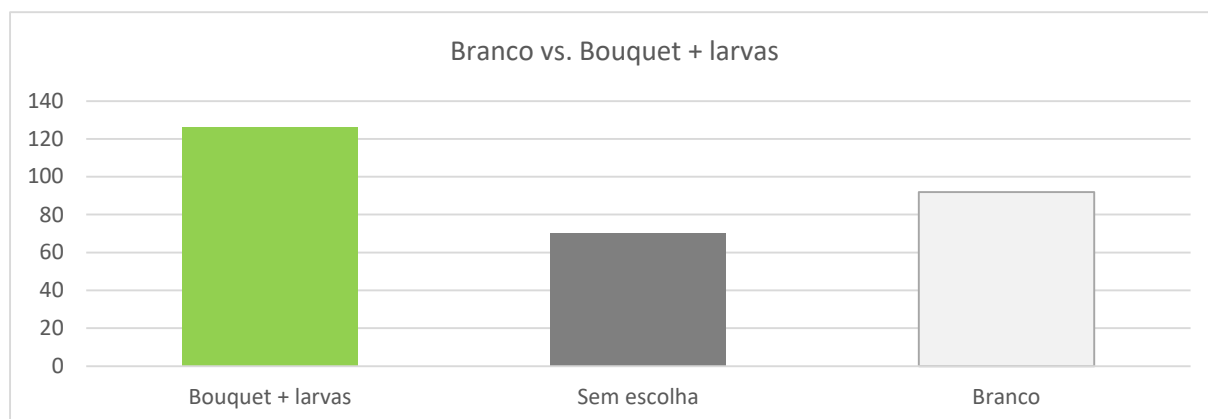
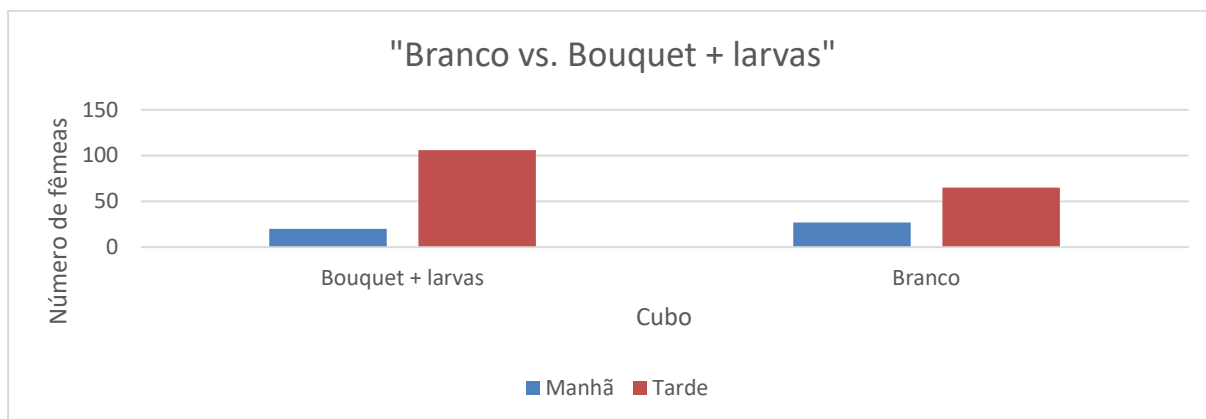


Figura 12 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Bouquet + larvas"

O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo “Branco vs. Bouquet + larvas” totalizou 27 fêmeas a escolher o cubo “Branco” no período da manhã, (representando 57% das escolhas para este tipo de ensaio) e 20 a escolher o cubo “Bouquet + larvas” no mesmo período (43%). No período da tarde 106 fêmeas escolheram o cubo “Bouquet + larvas” (62%) e 65 preferiram

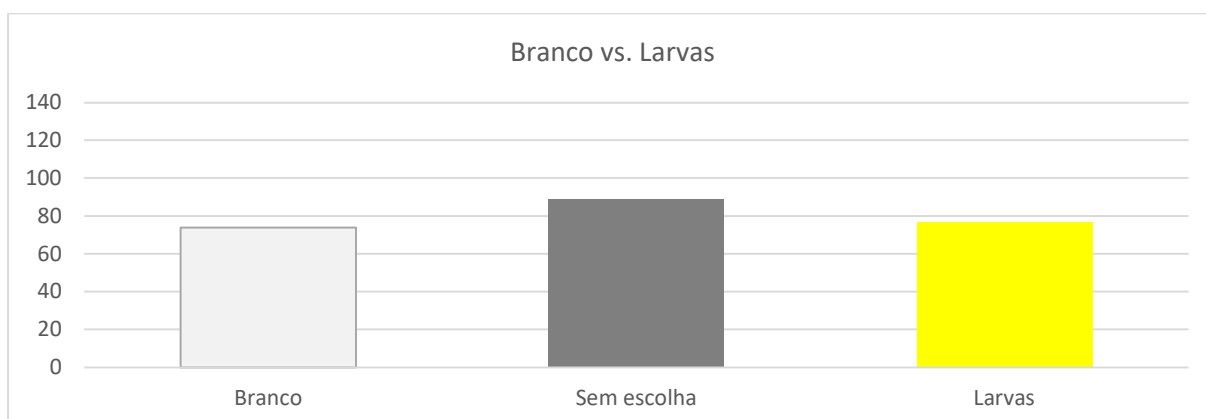
o “Branco” (38%), representado na Figura 13. O modelo GLM Binomial foi **significativo** para ambas as variáveis, conteúdo do cubo e período do dia, 0,05 e 0,17 respectivamente.



**Figura 13 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs Bouquet + larvas".**

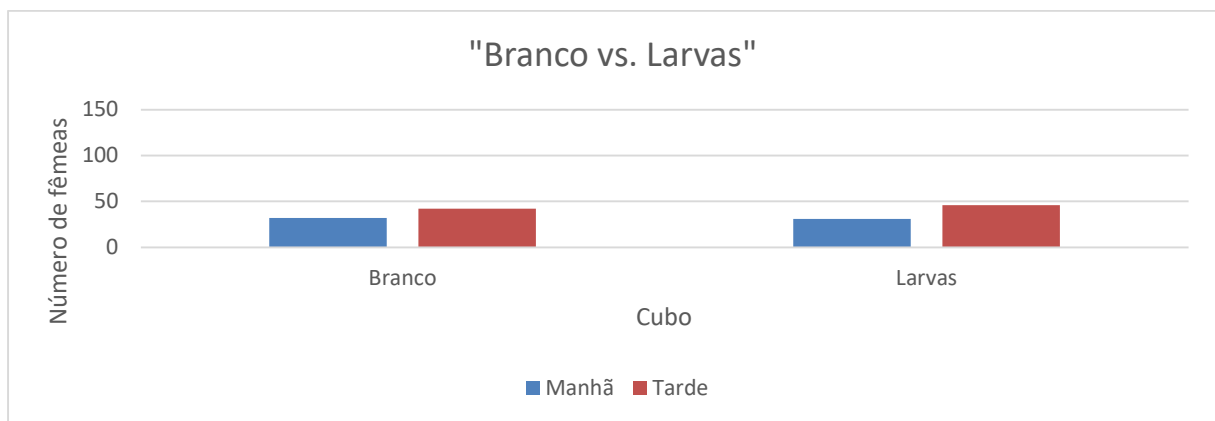
- “Branco vs. Larvas”

Os ensaios de preferência do conteúdo do cubo do tipo “Branco vs. Larvas” totalizaram 77 fêmeas a escolher o cubo que continha as larvas (32%), 74 a escolher o cubo vazio (31%) e 89 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos (37%), como mostra a Figura 14. Quando aplicado o teste binomial para o modelo GLM binomial para a escolha dos cubos o resultado foi **não significativo** com o valor de P de 0,871, ou seja, as fêmeas de *A. lasiophthalma* não demonstram atração pelos odores emitidos pelas larvas de *G. platensis* na ausência da planta hospedeira.



**Figura 14 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Larvas"**

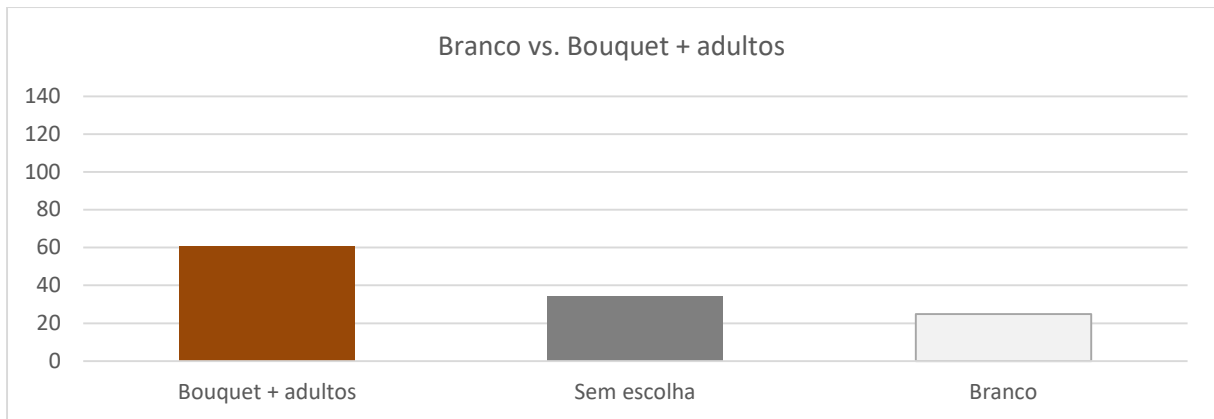
O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo “Branco vs. Larvas” totalizou 32 fêmeas a escolher o cubo “Branco” no período da manhã (representando 51% das escolhas para este tipo de ensaio) e 31 a escolher o cubo “Larvas” no mesmo período (49%). No período da tarde 46 fêmeas escolheram o cubo “Larvas” (52%) e 42 preferiram o “Branco” (48%), apresentado na Figura 15. O teste de modelo de efeitos e o modelo GLM Multinomial para as variáveis de escolha do cubo e período do dia também **não foram significativas** para qualquer das variáveis.



**Figura 15 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Larvas"**

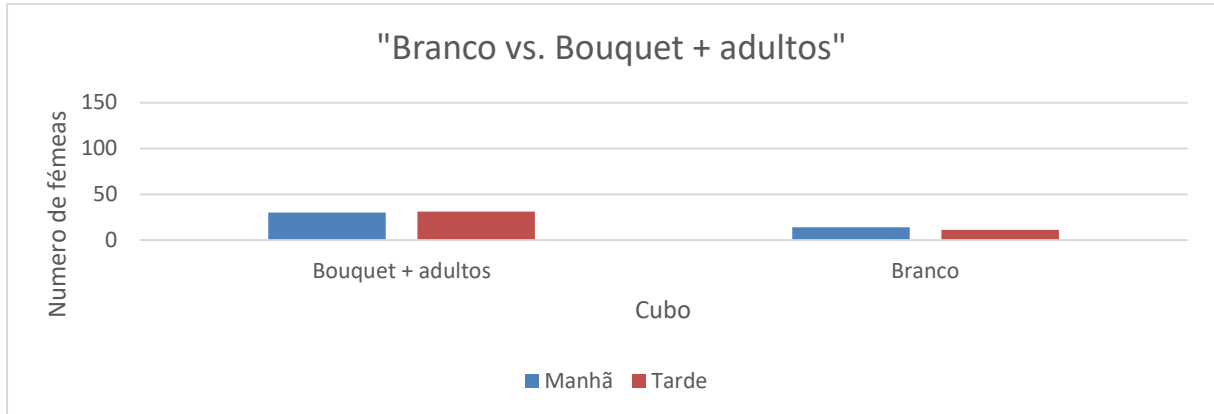
- “Branco vs. Bouquet + adultos”

O conjunto de ensaios de preferência do tipo “Branco vs. Bouquet + adultos” totalizou 61 fêmeas a escolher o cubo que continha o bouquet mais os indivíduos adultos de *G. platensis* (51%), 25 a escolher o cubo vazio (21%) e 34 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos (28%), como indica a Figura 16. O teste binomial para a escolha do cubo **foi significativo**, sendo o P inferior a 0,001, o que indica atração das fêmeas de *A. lasiophthalma* por bouquets de eucalipto atacados por adultos de *G. platensis*.



**Figura 16 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Branco vs. Bouquet com adultos"**

O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo “Branco vs. Bouquet + adultos” totalizou 14 fêmeas a escolher o cubo “Branco” no período da manhã (representando 32% das escolhas para este tipo de ensaio) e 30 a escolher o cubo “Bouquet + adultos” no mesmo período (68%). No período da tarde 31 fêmeas escolheram o cubo “Bouquet + adultos” (74%) e 11 preferiram o “Branco” (26%), representado na Figura 17. **Não foi possível estimar a significância** para a variável do período do dia.



**Figura 17 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Branco vs. Bouquet + adultos"**

- “Bouquet vs. Bouquet + larvas”

O conjunto de ensaios de preferência do conteúdo do cubo do tipo “Bouquet vs. Bouquet + larvas” totalizou 45 fêmeas a escolher o cubo que continha o bouquet (38%), 38 a escolher o cubo com o bouquet e larvas (32%), e 37 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos (31%), como demonstra a Figura 18. O teste binominal aplicado foi **não significativo** com o valor de

P de 0,510, o que sugere que a presença de larvas no bouquet de eucalipto não terá aumentado significativamente a atratividade para *A. lasiophthalma*.

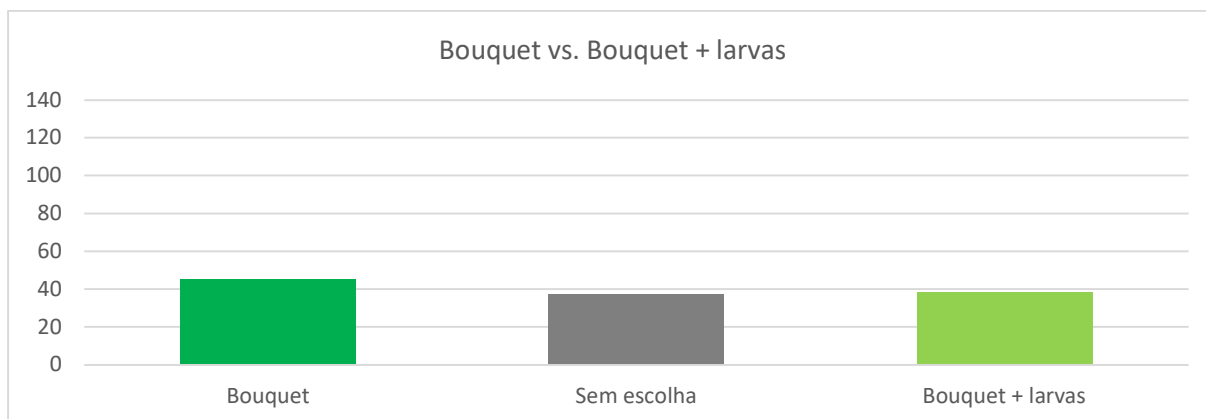


Figura 18 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + larvas"

O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo "Bouquet vs. Bouquet + larvas" totalizou 17 fêmeas a escolher o cubo "Bouquet", no período da manhã (representando 37% das escolhas para este tipo de ensaio) e 29 a escolher o cubo "Bouquet + larvas" no mesmo período (63%). No período da tarde 9 fêmeas escolheram o cubo "Bouquet + larvas" (24%) e 28 preferiram o "Bouquet" (28%), apresentado na Figura 19. O teste GLM binominal aplicado foi significativo para a escolha dos cubos, mas não para o período do dia.

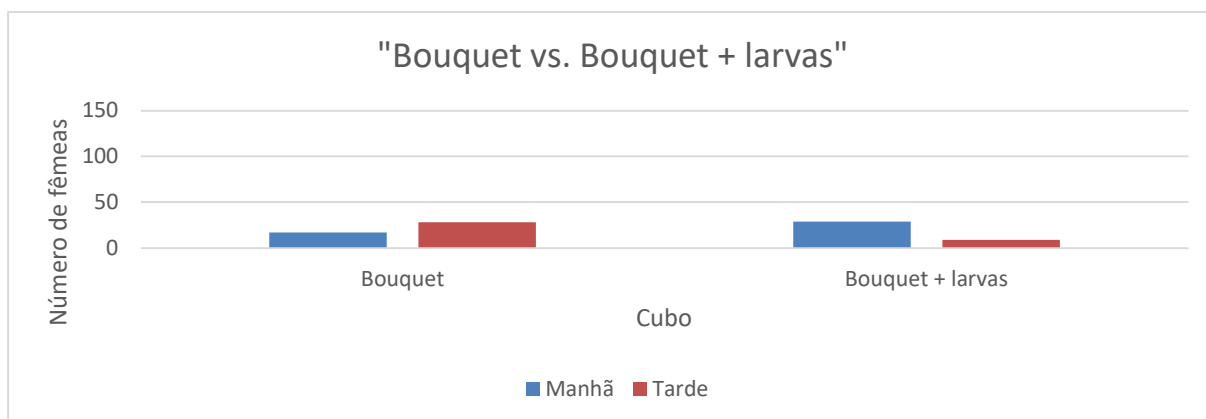
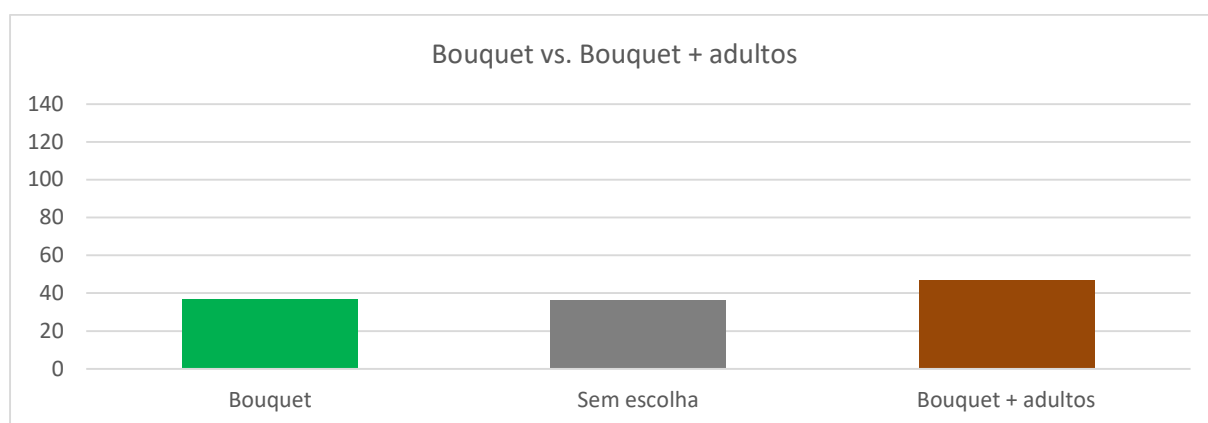


Figura 19 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + larvas"

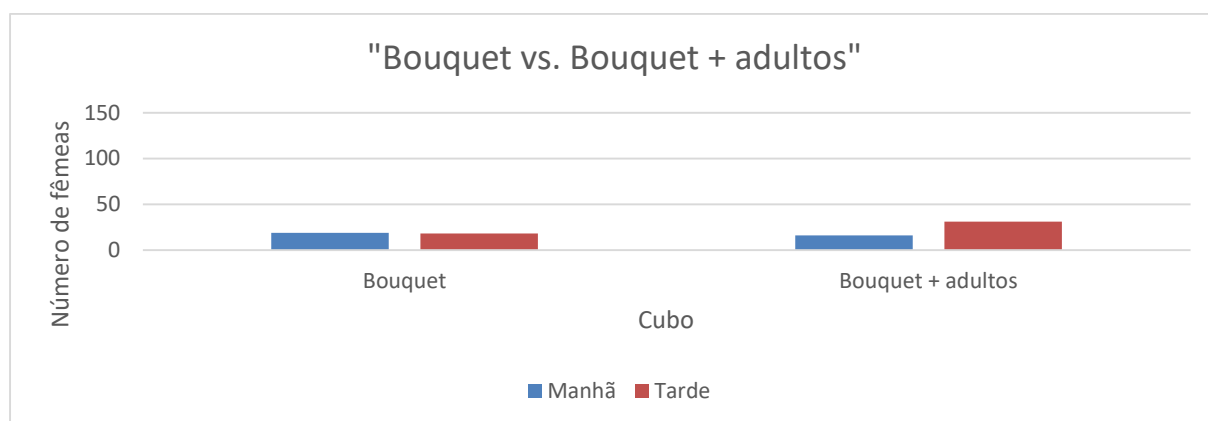
- "Bouquet vs. Bouquet + adultos"

Os ensaios de preferência do tipo “Bouquet vs. Bouquet + adultos” totalizaram 37 fêmeas a escolher o cubo que continha o bouquet (31%), 47 a escolher o cubo com o bouquet e adultos (39%) e 36 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos (30%), como mostra a Figura 20. O teste binominal aplicado apresentou um P de 0,326 sendo **não significativo**, o que indica que a presença de adultos no bouquet não terá aumentado a sua atratividade para *A. lasiophthalma* de forma significativa.



**Figura 20 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + adultos"**

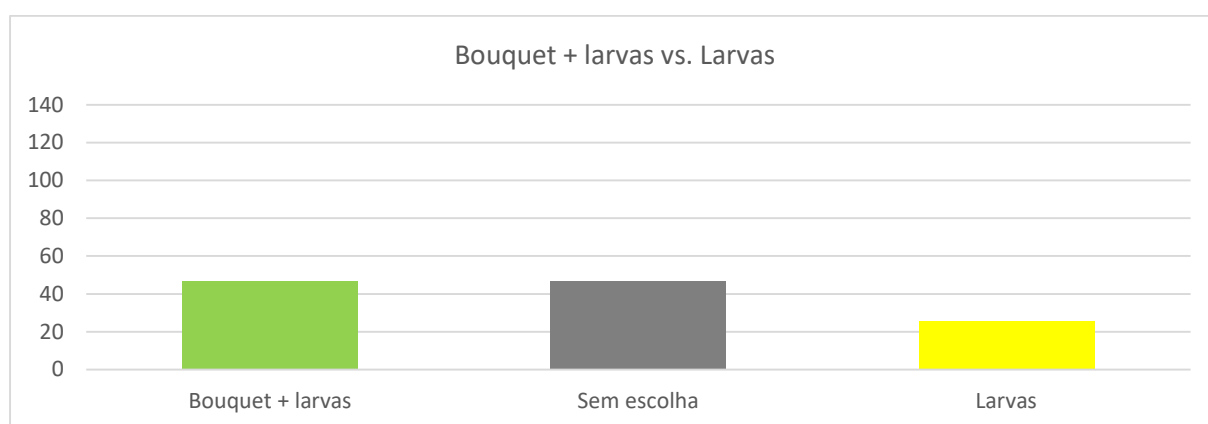
O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo “Bouquet vs. Bouquet + adultos” totalizou 19 fêmeas a escolher o cubo “Bouquet”, no período da manhã (representando 54% das escolhas para este tipo de ensaio) e 16 a escolher o cubo “Bouquet + adultos” no mesmo período (46%). No período da tarde 31 fêmeas escolheram o cubo “Bouquet + adultos” (63%) e 18 preferiram o “Bouquet” (37%), representado na Figura 21. Os modelos GLM binominal foi **não significativo** para ambas as variáveis (a escolha do cubo e o período do dia).



**Figura 21 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet vs. Bouquet + adultos"**

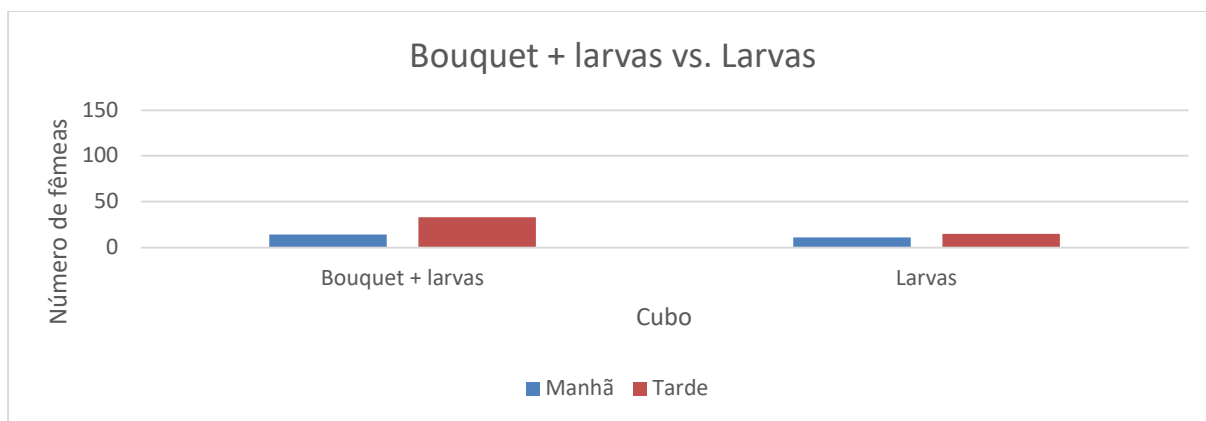
- “Bouquet + larvas vs. Larvas”

Os ensaios de preferência do conteúdo do cubo do tipo “Bouquet + larvas vs. Larvas” totalizaram 47 fêmeas a escolher o cubo que continha o bouquet com larvas (39%), 26 a escolher o cubo com larvas (22%) e 47 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos (39%), como indica a Figura 22. O teste binomial aplicado apresentou o P com o valor de 0,019, sendo **significativo**, o que indica que as fêmeas de *A. lasiophthalma* são mais atraídas pelos odores do bouquet de eucalipto do que pelos odores emitidos pelas larvas.



**Figura 22 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Larvas"**

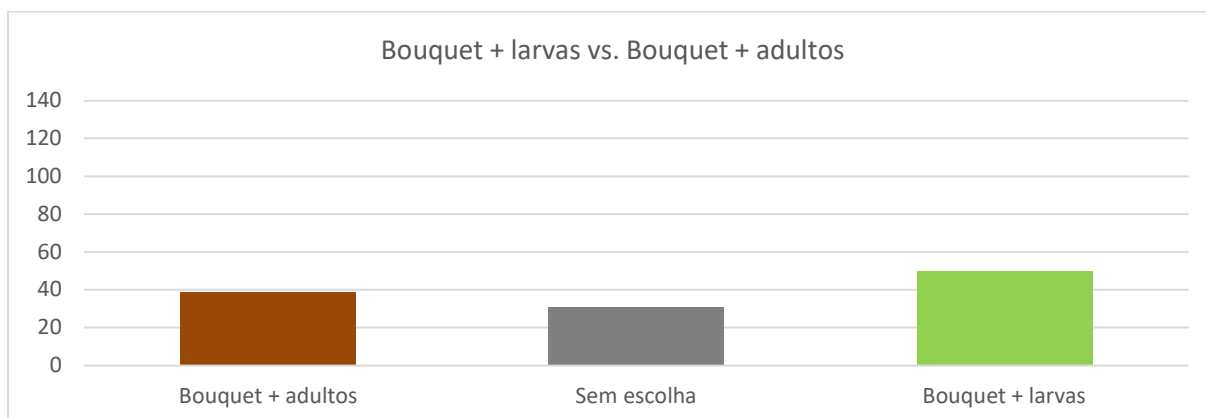
Os ensaios para o período do dia do tipo “Bouquet + larvas vs. Larvas” totalizaram 14 fêmeas a escolher o cubo “Bouquet + larvas”, no período da manhã (representando 56% das escolhas para este tipo de ensaio) e 11 a escolher o cubo “Larvas” no mesmo período (44%). No período da tarde 33 fêmeas escolheram o cubo “Bouquet + larvas” (69%) e 15 preferiram o “Larvas” (31%), apresentado na Figura 23. Com o modelo GLM binominal **nenhuma das variáveis** (escolha dos cubos e período do dia) **são significativas**.



**Figura 23 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Larvas"**

- “Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos”

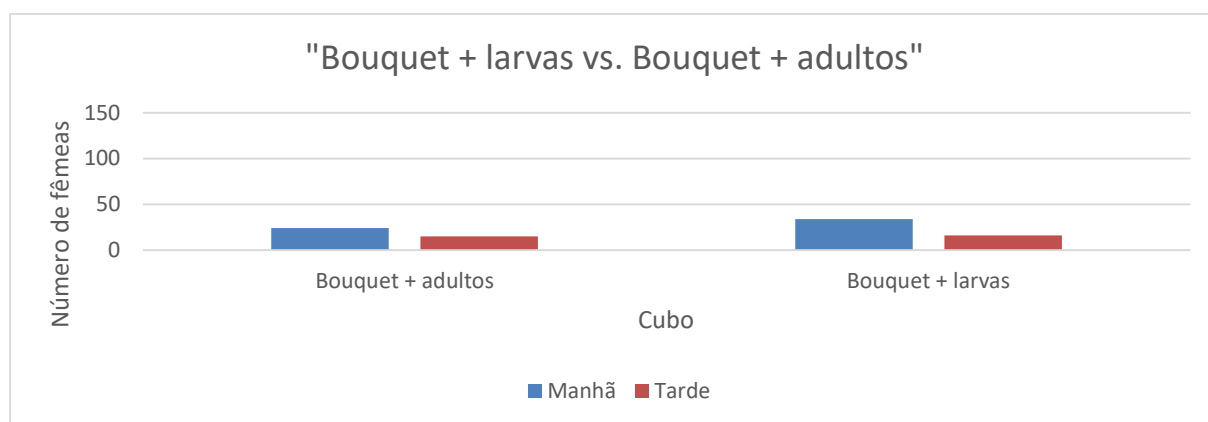
Os ensaios de preferência do tipo “Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos” totalizaram 50 fêmeas a escolher o cubo que continha o bouquet com larvas (42%), 39 a escolher o cubo com o bouquet e adultos (33%) e 31 a manterem-se no tubo de ligação dos cubos (26%), como demonstra a Figura 24. O teste binomial **não significativo** com P de 0,397. Apesar da ligeira preferência das fêmeas de *A. lasiophthalma* por bouquets com larvas de *G. platensis*, estes não foram significativamente mais atrativos do que bouquets com adultos.



**Figura 24 - Gráfico dos resultados de preferência obtidos para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos"**

O conjunto de ensaios para o período do dia do tipo “Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos” totalizou 34 fêmeas a escolher o cubo “Bouquet + larvas”, no período da manhã (representando 59% das escolhas para este tipo de ensaio) e 24 a escolher o cubo “Bouquet + adultos” no mesmo período (41%). No período da tarde 16 fêmeas escolheram o cubo “Bouquet + larvas”

(52%) e 15 preferiram o “Bouquet + adultos” (48%), representado na Figura 25. Os modelos GLM binomial é **não significativo** para as variáveis escolhas de cubo e período do tempo.

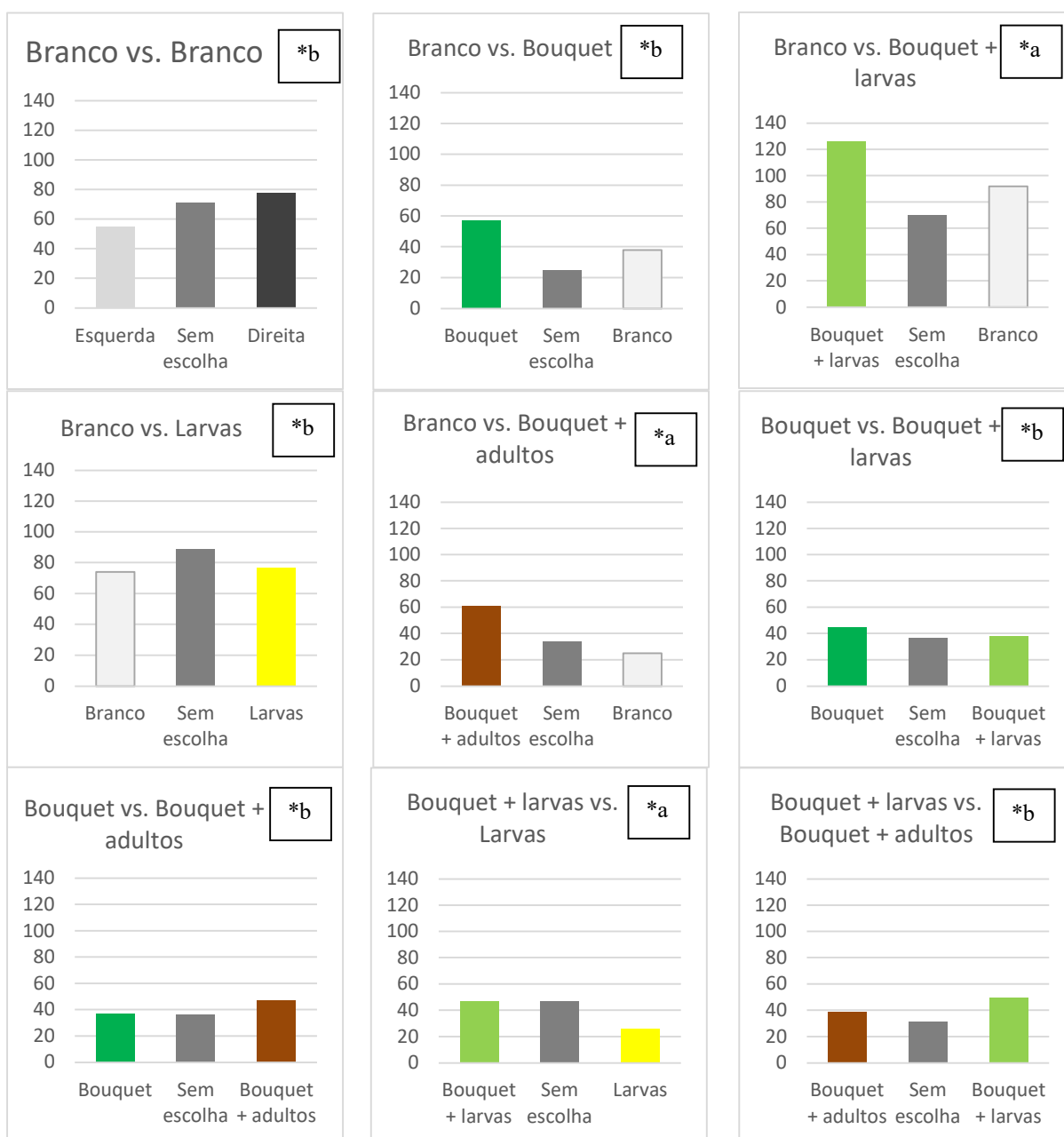


**Figura 25 - Gráfico dos resultados obtidos para o período do dia para o ensaio "Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos"**

Os resultados obtidos por contagem do número de fêmeas de *A. lasiophthalma* por ensaio estão sintetizados na Tabela 3 e na Figura 26 e 27.

**Tabela 3 - Síntese dos resultados obtidos nos ensaios de preferência**

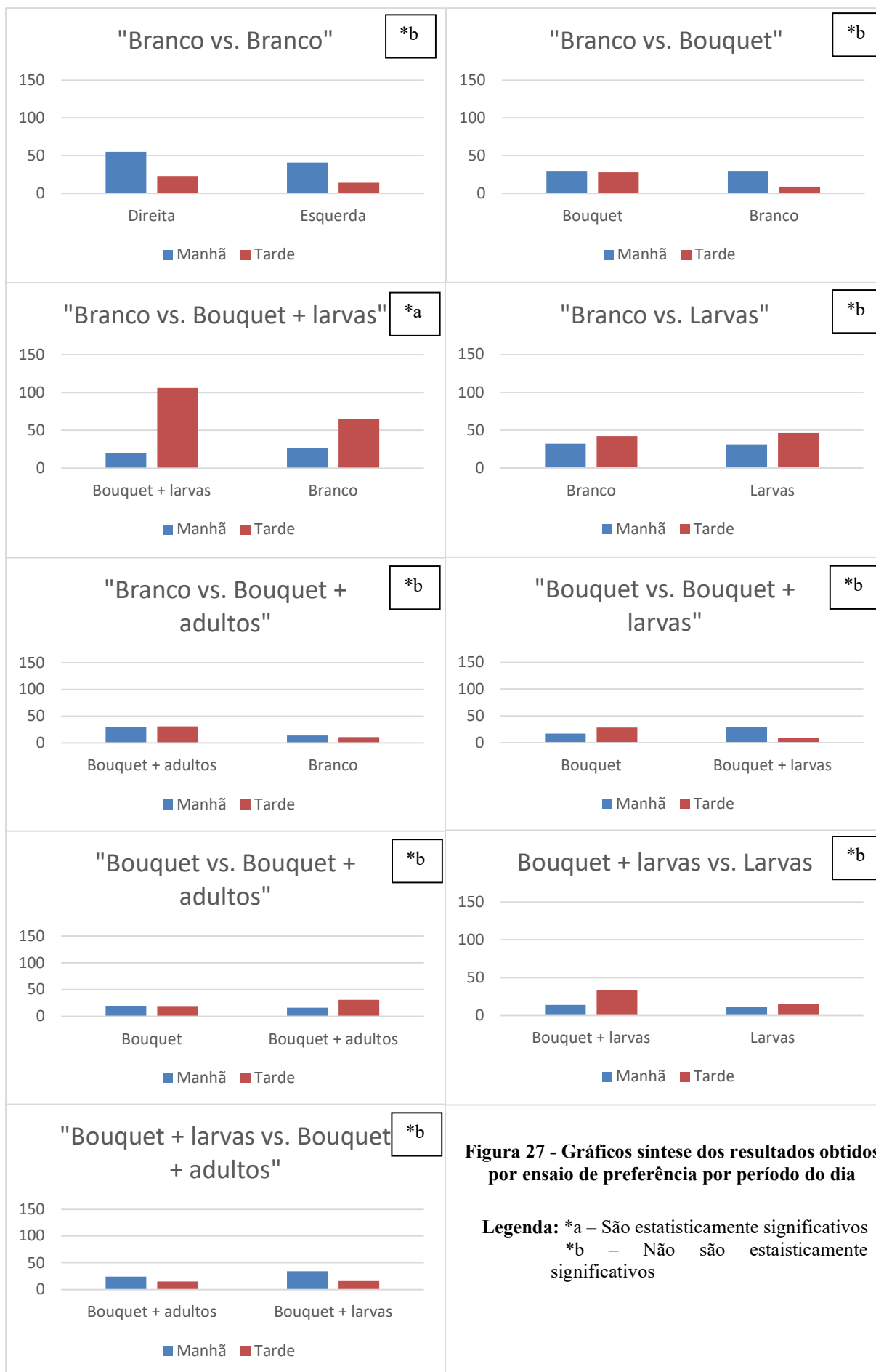
Combinação		Resultados							
Opção 1	Opção 2	Opção 1		Empate		Opção 2			
		N.º de fêmeas	% de fêmeas	N.º de fêmeas	% de fêmeas	N.º de fêmeas	% de fêmeas	N.º de fêmeas	% de fêmeas
Branco à esquerda	Branco à direita	55	27%	71	35%	78	38%		
Branco	Bouquet	38	32%	25	20%	57	48%		
Branco	Bouquet + larvas	92	32%	70	24%	126	44%		
Branco	Larvas	74	31%	89	37%	77	32%		
Branco	Bouquet + adultos	25	21%	34	28%	61	51%		
Bouquet	Bouquet + larvas	45	38%	37	31%	38	32%		
Bouquet	Bouquet + adultos	37	31%	36	30%	47	39%		
Bouquet + larvas	Larvas	47	39%	47	39%	26	22%		
Bouquet + larvas	Bouquet + adultos	50	42%	31	26%	39	33%		



**Figura 26 - Gráficos síntese dos resultados obtidos por ensaio de preferência**

**Legenda:** \*a – São estatisticamente significativos  
 \*b – Não são estatisticamente significativos

A distribuição dos ensaios e escolhas pelos períodos do dia estão representadas na Figura 27.



**Figura 27 - Gráficos síntese dos resultados obtidos por ensaio de preferência por período do dia**

**Legenda:** \*a – São estatisticamente significativos  
 \*b – Não são estatisticamente significativos

## 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho procurou-se testar a resposta de fêmeas de *A. lasiophthalma* a diferentes combinações de odores libertados pelo eucalipto e por *G. platensis* em diferentes estádios do seu ciclo de vida.

Com base na análise estatística dos resultados, pode-se concluir que os ensaios de preferência “Branco vs. Bouquet + larvas”, “Branco vs. Bouquet + adultos” e “Bouquet + larvas vs. Larvas” são estatisticamente significativos e todos os outros não são.

Os ensaios estatisticamente significativos têm um fator em comum: as fêmeas de *A. lasiophthalma* preferiram os cubos com bouquets de eucalipto em herbivoria causada pela presença de *G. platensis*. Este fenômeno pode ser explicado como atração dos inimigos naturais por compostos voláteis induzidos por herbivoria, como é descrito no estudo de McCormick *et al.* (2012). Os compostos voláteis induzidos por herbivoria desempenham vários papéis ecológicos ao nível das interações planta - planta, planta - herbívoro e planta – inimigo natural dos herbívoros. A atratividade destes compostos para os inimigos naturais depende da especificidade dos inimigos, quanto maior a especificidade dos mesmos maior a sua capacidade de interpretar as combinações de compostos voláteis existentes no ar (Gebreziher, 2018). Allmann & Baldwin (2010) demonstraram que os insetos herbívoros podem modificar os perfis dos compostos voláteis das folhas verdes que as plantas libertam proporcionando informações específicas sobre os herbívoros que as desencadeiam, o estágio de desenvolvimento em que se encontram e inclusivamente o momento do dia em que a folha está a ser consumida. Esta informação também é lida pelas fêmeas dos insetos herbívoros da mesma espécie que podem evitar atacar / por ovos em plantas infestadas de forma a reduzir a competição por recursos; e por plantas nas imediações que se podem prevenir de um ataque iminente.

O ensaio “Branco vs. Branco” serviu para verificar se existia alguma preferência dos indivíduos em estudo, por algum dos lados do olfatómetro, uma vez que a tendência de se deslocarem para o cubo da direita foi notada na fase de teste (embora não seja estatisticamente significativa) e que levou, por precaução, a que se alternasse a localização dos bouquets.

O ensaio “Bouquet vs. Bouquet + adultos”, apesar de não ser estatisticamente significativo, apresenta uma leve tendência das fêmeas de *A. lasiophthalma* preferirem os cubos com “Bouquet + adultos”, o que sugere que a planta possa estar a libertar compostos voláteis induzidos por herbivoria mais atrativos que os compostos voláteis de *E. globulus* sem estar em stress por herbivoria, no entanto, a possibilidade dos compostos voláteis poderem indicar o

estado de desenvolvimento de *G. platensis* como não adequado ao parasitismo, pode ter reduzido a intensidade da resposta de atratividade pela *A. lasiophthalma*. No entanto o ensaio “Bouquet vs. Bouquet + larvas” também não foi significativo estatisticamente, mas a tendência é de que as fêmeas de *A. lasiophthalma* preferiram os cubos com o bouquet, indicando que os odores do eucalipto, podem ser familiares e atrativos para este parasitoide.

Os ensaios “Branco vs. Bouquet” não foram estatisticamente significativos, embora estejam no limite, e mostram a tendência das fêmeas de *A. lasiophthalma* serem atraídas pelos odores do eucalipto por si só. É importante considerar o modelo de localização de hospedeiros por parasitoides, que se divide hierarquicamente em: localização do habitat do hospedeiro, localização do hospedeiro, aceitação do hospedeiro, adequação do hospedeiro e regulação do hospedeiro (Godfray, 1994). Esse modelo explica por que geralmente as fêmeas parasitoides procuram inicialmente um habitat com condições adequadas para a procriação e, em seguida, procuram por mais pistas de hospedeiros (podendo ser ou não diretas) para circunscrever cada vez mais a área de procura do hospedeiro (Valente *et al.*, 2017).

No caso específico de *G. platensis*, foram identificados 51 compostos voláteis de *E. globulus* que são detetados e provocam a uma resposta das antenas de *G. platensis* (Branco *et al.*, 2018). Entre esses compostos, oito funcionam como atrativos e dois como repelentes para *G. platensis*, no entanto, as respostas variam conforme o tipo de indivíduo (sexo, e maturidade sexual). A ampla gama de compostos identificados pelo *G. platensis* sugere que sejam capazes de distinguir plantas hospedeiras de não hospedeiras (Branco *et al.*, 2018).

Em um estudo, um inimigo natural de *G. platensis*, *A. nitens*, demonstrou responder a compostos voláteis emitidos pelo eucalipto e a compostos voláteis exclusivos ao *G. platensis* e/ou às suas ootecas e/ou fezes. A última categoria de compostos voláteis apresenta compostos de eucalipto inalterados (Branco *et al.*, 2021).

Essa preferência por cubos com Bouquet pode demonstrar uma capacidade observada em alguns parasitoides: a aprendizagem. A aprendizagem é uma vantagem adaptativa que melhora a eficiência do parasitoide. As memórias químicas (olfativas) podem ser adquiridas em diferentes estágios do desenvolvimento dos parasitoides. Essa capacidade de aprendizagem depende do grau de especialização do parasitoide em relação ao hospedeiro e à planta hospedeira, do seu estado fisiológico (como se as fêmeas foram ou não fecundadas e se já fizeram ou não oviposição) e da sua origem genética (Giunti *et al.*, 2015).

Quando se compara “Bouquet + larvas vs. Bouquet + adultos”, os resultados não são estatisticamente significativos, mas a preferência é pelos cubos que contêm o bouquet e as larvas, o que pode indicar que os compostos voláteis induzidos por herbivoria podem conter

informações sobre o estado de desenvolvimento dos indivíduos que estão a atacar. A informação passada pelos compostos voláteis indicando o estado de desenvolvimento de *G. platensis* pode ser mais atrativa para as fêmeas de *A. lasiophthalma*, que utilizam essa informação para localizar potenciais hospedeiros.

Nos ensaios “Branco vs. Larvas” não existe uma clara preferência pelas larvas. Existe a possibilidade de que o conjunto de odores do hospedeiro, bem com odores dos seus subprodutos (fezes e saliva), não sejam suficientemente atrativos para os parasitoides ou que, em algumas espécies, esse conjunto de odores se torne atrativo pelo processo de aprendizagem em que as fêmeas parasitoides estão expostas a esses estímulos (Giunti et al. 2015). Neste trabalho, não houve a distinção entre fêmeas de *A. lasiophthalma* que estiveram em contacto com estímulos de odores de hospedeiro ou não, pois todas eram experientes, portanto, não é possível concluir se a atratividade do odor emitido pelas larvas seja um comportamento inato ou adquirido. A resposta a estes compostos depende da fiabilidade e da detetabilidade. Os estímulos derivados de hospedeiros são geralmente mais fiáveis, mas tendem a ser menos detetáveis (Vet & Dicke, 1992).

Com base na análise estatística dos resultados por períodos do dia, pode-se concluir que apenas o ensaio do tipo “Branco vs. Bouquet + larvas” é estatisticamente significativo, enquanto todos os outros não são, embora haja uma tendência de maior atividade no período da tarde. Embora, não seja possível concluir que o período do dia influencie a atividade de *A. lasiophthalma*, a tendência verificada pode refletir a aclimatização pois as fêmeas de *A. lasiophthalma* durante a noite eram mantidas a uma temperatura mais baixa que os 20°C. Poderia existir uma pressão para a oposição no período da tarde justificada por um período de abstinência e acumulação de ovos, no entanto este período não se verificou, pois as fêmeas estiveram em contacto com os machos momentos antes de serem utilizadas em ensaios logo não foi possível perceber as fêmeas de *A. lasiophthalma* se comportam á semelhança do estudo de Nakamura (1997).

Os resultados obtidos são muito interessantes e permitem a compreensão das relações tritróficas entre *E. globulus*, *G. platensis* e *A. lasiophthalma*, pois não existem até ao momento quaisquer estudos sobre o comportamento de localização do hospedeiro em *A. lasiophthalma*. Nesta tese, comprovou-se o efeito dos compostos voláteis induzidos por herbivoria na *A. lasiophthalma*, que já foi observado em outros parasitoides (Stireman III, J. O., 2002; Turlings & Erb, 2018), evidenciando a especificidade deste parasitoide enquanto agente de biocontrolo. Stireman III, verificou a preferência de fêmeas de *Exorista mella* Walker (Diptera: Tachinidae) por pistas de movimento do hospedeiro e odores de plantas (as fêmeas de *E. mella* responderam de forma fraca aos odores diretamente associados aos hospedeiros) (Stireman III, J. O., 2002)

Neste estudo apenas se considerou como planta hospedeira estudada *E. globulus*. Seria interessante estudar várias outras espécies de plantas autóctones que podem ocorrer junto aos povoamentos de *E. globulus*, como várias espécies de pinheiro, psedotsuga, sobreiro e azinheira.

Outra questão que estudos futuros poderiam abordar seria a importância dos odores aprendidos pelas fêmeas de *A. lasiophthalma* e como a fecundação ou não pode condicionar o seu comportamento na procura do hospedeiro.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese aborda análise das relações tri-tróficas entre *E. globulus*, *G. platensis* e *A. lasiophthalma*, com o objetivo de testar a eficácia da resposta de *A. lasiophthalma* a diferentes combinações de odores libertados pelo *E. globulus* e pelo *G. platensis* em diferentes estádios de desenvolvimento do seu ciclo de vida.

Os resultados demonstraram que as fêmeas de *A. lasiophthalma* preferiram os cubos onde estavam os bouquets de eucalipto em stress por herbivoria causada pela presença de *G. platensis*, proporcionando novas compreensões sobre a importância dos estímulos odoríferos na localização do hospedeiro por parte das fêmeas de *A. lasiophthalma*. Foi possível determinar como os odores isolados e a combinação dos mesmos podem fornecer pistas sobre a localização e o estado de maturidade do hospedeiro. A pesquisa contribui significativamente para a área do biocontrolo, especialmente ao fornecer evidências da resposta de *A. lasiophthalma* às combinações de odores para localizar potenciais hospedeiros.

Do ponto de vista teórico, os resultados expandem o conhecimento sobre *A. lasiophthalma*, uma espécie pouco estudada, e sugerem a importância do papel dos compostos voláteis induzidos por herbivoria na localização dos hospedeiros. Em termos práticos, os resultados podem ser aplicados em fundamentar a especificidade e a eficácia de *A. lasiophthalma* para o hospedeiro *G. platensis*, oferecendo maior segurança na utilização de *A. lasiophthalma* como agente de biocontrolo no combate à praga *G. platensis*.

No entanto, o estudo efetuado possui algumas limitações. A planta hospedeira estudada foi apenas *E. globulus*. Seria interessante estudar várias outras espécies de plantas autóctones que podem ocorrer junto aos povoamentos de *E. globulus*, como várias espécies de pinheiro, psedotsuga, sobreiro e azinheira. Logo, os resultados obtidos não consideram como *A.*

*lasiophthalma* se comporta com estímulos odoríferos de outras plantas, evidenciando a necessidade de continuar a estudar a *A. lasiophthalma*.

Seria interessante estudar de que forma a fecundação pode condicionar o comportamento de *A. lasiophthalma* na procura do hospedeiro. Isso poderiam aprofundar a compreensão sobre o papel da aprendizagem de estímulos na *A. lasiophthalma* e explorar se existem outros potenciais hospedeiros.

Em conclusão, este trabalho valida a especificidade do hospedeiro de *A. lasiophthalma* e a importância da planta hospedeira, *E. globulus*, para a localização do hospedeiro. *A. lasiophthalma* pode tornar-se um agente de biocontrole capaz de colmatar a lacuna no combate à praga com os agentes existentes, aumentando a produção dos povoamentos afetados. Com o desenvolvimento deste estudo espera-se contribuir positivamente para o conhecimento entomológico.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Adame, P., Alberdi, I., Canellas, I., Hernández, L., Aguirre, A., Ruano, A., Moreno-Fernández, D., Gonzáles, A. I., Torres, M. B., & Montes, F. (2022) Drivers and spread of a non-native pest in forests: The case of *Gonipterus platensis* in Spanish Eucalyptus plantations. *Forest Ecology and Management*, 510, 120075. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120075>
- Afonso, C., Caldeira, F., Gonçalves, C. I., Vasconcelos, T., & Branco, M. (2023) Clues from cues: Inferring *Anagonia lasiophthalma* safety from a simple experimental design.
- Allmann, S., & Baldwin, I. T. (2010) Insects betray themselves in nature to predators by rapid isomerization of green leaf volatiles. *Science*, 329, 1075–1078.
- Alves, A. M., Pereira, J. S., & Silva, J. M. N. (2007) A introdução e a expansão do eucalipto em Portugal. In A. M. Alves, J. S. Pereira, & J. M. N. Silva (Eds.), *O eucalipto em Portugal: Impactes ambientais e investigação científica* (pp.13–24). ISA Press.
- Branco, S., Mateus, E. P., Gomes da Silva, M. D. R., Mendes, D., Rocha, S., Mendel, Z., Schutz, S., & Paiva, M. R. (2018) Electrophysiological and behavioural responses of Eucalyptus weevil, *Gonipterus platensis*, to host plant volatiles. *Journal of Pest Science*, 91(4), 1239–1248. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0986-1>
- Branco, S., Mateus, E. P., Gomes da Silva, M. D. R., Mendes, D., Pereira, M. M. A., Schutz, S., & Paiva, M. R. (2021) Olfactory responses of *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) to host and habitat cues. *Journal of Applied Entomology*, 145(1–2), 108–117. <https://doi.org/10.1111/jen.12847>
- Ceia, R. S., Faria, N., Lopes, P. B., Alves, J., Alves da Silva, A., Valente, C., Gonçalves, C. I., Mata, V. A., Santos, S. A. P., Azevedo-Pereira, H. M. V. S., Sousa, J. P., & Silva, L. P. (2021) Local and landscape effects on the occurrence and abundance of the Eucalyptus weevil *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Forest Ecology and Management*, 500, 119596. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119596>
- Cerasoli, S., Caldeira, M. C., Pereira, J. S., Caudullo, G., & de Rigo, D. (2016) *Eucalyptus globulus* and other eucalypts in Europe: Distribution, habitat, usage and threats. In J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, & A. Mauri (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*. European Commission. <http://forest.jrc.ec.europa.eu/european-atlas-of-forest-tree-species/>, Accessed date: 14 August 2023.
- Crespo, J. E., & Castelo, M. K. (2018) The ontogeny of host-seeking behaviour in a parasitoid dipteran. *Journal of Insect Physiology*, 54(5), 842–847.
- Gebrezihir, H. G. (2018) The role of herbivore-induced plant volatiles (HIPVs) as indirect plant defense mechanism in a diverse plant and herbivore species: A review. *International Journal of Agricultural, Environment and Food Sciences*, 2(4), 139-147.
- Giunti, G., Canale, A., Messing, R. H., Donati, E., Stefanini, C., Michaud, J. P., & Benelli, G. (2015) Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biological Control*, 90, 208–219.
- Godfray, H. C. J. (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press.
- Gonçalves, C. I., Valente, C., Afonso, C., Martins, C., Reis, A. R., Garcia, A., & Branco, M. (2020) New challenges on the journey to control an old pest: Can a tachinid come to the rescue? *The Tachinid Times*, 33.
- Huffaker, C. B., Simmonds, F. J., & Laing, J. E. (1976) The theoretical and empirical basis of biological control. In *Theory and Practice of Biological Control*. <https://books.google.com.br>, Consulted 20 August 2023.

- ICNF. (2015a) 6.º Inventário Florestal Nacional – Relatório Final.
- ICNF. (2015b) \*Manual de boas práticas Gorgulho-do-eucalipto (*Gonipterus platensis*).
- Mapondera, T. S., Burgess, T., Matsuki, M., & Oberprieler, R. G. (2012) Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Australian Journal of Entomology*, 51, 175–188.
- Mansilla, J. P., & Pérez-Otero, R. (1996) El defoliador del eucalipto *Gonipterus scutellatus*. *Phytoma España*, 81, 36–42.
- Martins, C., Afonso, C., Valente, C., Reis, A. R., O’Hara, J., Lumbers, J., & Branco, M., & Gonçalves, C. I. (2023) Biology and potential efficacy of *Anagonia cf. lasiophthalma* (Diptera: Tachinidae), a new biological control agent of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae).
- McCormick, A. C., Unsicker, S. B., & Gershenzon, J. (2012) The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Special Issue: Specificity of Plant-Enemy Interactions*, 17(5), 303–310.
- Morales-Ramos, J., Rojas, G., & Shapiro-Ilan, D. I. (2014) Mass Production of Beneficial Organisms.
- Nakamura, S. (1997). Ovipositional behaviour of the parasitoid fly, *Exorista japonica* (Diptera: Tachinidae), in the laboratory: diel periodicity and egg distribution on a host. *Applied entomology and zoology*, 32(1), 189-195.
- O’Hara, J. E. (2008) Tachinid flies (Diptera: Tachinidae). In J. L. Capinera (Ed.), *Encyclopedia of Entomology*. Springer Science & Business Media.
- Pekas, A., & Wäckers, F. L. (2020) Bottom-up effects on tri-trophic interactions: Plant fertilization enhances the fitness of a primary parasitoid mediated by its herbivore host. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2619–2626.
- Reis, A. R., Ferreira, L., Tomé, M., Araujo, C., & Branco, M. (2012) Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. *Forest Ecology and Management*, 270, 216–222.
- Sarmiento, A. M. P. (2015) A first approach to the development of an innovative trapping system for *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae, Gonipterini).
- Sousa, E., & Ferreira, L. (1996) *Gonipterus scutellatus* Gyll., uma nova praga do eucalipto em Portugal. *Revista Florestal*, IX, 4–7.
- Steidle, J. L. M., & van Loon, J. J. A. (2003) Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: Testing a concept. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 108(3), 133–148.
- Stireman, J. O., III. (2002) Host location and selection cues in a generalist tachinid parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103, 23–34.
- Stireman, J. O., III, O’Hara, J. E., & Wood, D. M. (2006) Tachinidae: Evolution, behavior, and ecology. *Annual Review of Entomology*, 51, 525–555.
- Tooke, F. G. C. (1953) The eucalyptus snout-beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll: A study of its ecology and control by biological means. Government Printer.
- Turlings, T. C. J., & Erb, M. (2018) Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: Mechanisms, ecological relevance, and application potential. *Annual Review of Entomology*, 63, 433–452. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043507>
- Valente, C., Vaz, A., Pina, J., Manta, A., & Sequeira, A. (2004) Control strategy against the eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera, Curculionidae), by the Portuguese cellulose industry. In N. M. Borralho, J. S. Pereira, C. Marques, J.

- Coutinho, M. Madeira, & M. Tomé (Eds.), IUFRO Conference “Eucalyptus in a Changing World” (pp. 622–627). Aveiro, Portugal.
- Valente, C., Machado, H., & Silva, M. (2008) Pragas e doenças do eucalipto. In C. Valente & M. R. Paiva (Eds.), Pragas e doenças em pinhal e eucalipto: Desafios para a sua gestão integrada (pp. 37–51). ISA Press.
- Valente, C., Afonso, C., & Gonçalves, C. I. (2017). Environmental risk assessment of the egg parasitoid *Anaphes inexpectatus* for classical biological control of Eucalyptus snout beetle, *Gonipterus platensis*. *BioControl*. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9815-2>
- Valente, C., Gonçalves, C. I., Monteiro, F., Gaspar, J., Silva, M., Sottomayor, M., Paiva, M. R., & Branco, M. (2018). Economic outcome of classical biological control: A case study on the eucalyptus snout beetle, *Gonipterus platensis*, and the parasitoid *Anaphes nitens*. *Ecological Economics*, *149*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2018.02.020>
- Valente, C., Gonçalves, C., Vasques, J., Manta, A. C., Bragança, H., & Branco, M. (2021). Pragas e doenças associadas aos eucaliptos. In As plantações de eucalipto e recursos naturais em Portugal: Avanços recentes e desafios (pp. 159–175).
- Van Driesche, R. G., & Bellows, T. S. Jr. (1996). Biological control. Kluwer Academic Publishers.
- Vet, L. E. M., & Dicke, M. (1992). Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology*, *37*, 141–172. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001041>.
- Vinson, S. B., Nordlund, D. A., & Lewis, W. J. (1980). Role of chemical cues in host finding by parasitic insects. *Annual Review of Entomology*, *25*(1), 397-419.

## ANEXOS

- Branco vs Branco

		Binomial Test				
		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
Escolha_num_bin	Group 1	2	55	.41	.50	.056
	Group 2	1	78	.59		
	Total		133	1.00		

**Modelo GLM Binomial** (só com escolha 1 ou 2) com o fator tempo –

### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
(Intercept)	3.965	1	.046
Tempo	.261	1	.610

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), tempo

- Branco vs Bouquet de eucalipto

Teste Binomial – Escolha Branco - Bouquet – NS (mas no limite)

Binomial Test						
	Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)	
Escolha_num_bin	Group 1	2	57	.60	.50	.064
	Group 2	1	38	.40		
	Total		95	1.00		

### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
(Intercept)	5.970	1	.015
Cubo	.a	.	.
Tempo	.a	.	.

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Unable to compute due to numerical problems

**Modelo GLM Binomial** (só com escolha 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – S; Tempo – não foi possível estimar

### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	-1.135	.3832	-1.886	-.384	8.774	1	.003
[cubo=0]	1.135	.4645	.225	2.045	5.970	1	.015
[cubo=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

**Modelo GLM Multinomial** (com 0, 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – não foi possível estimar; Tempo – não foi possível estimar

- Branco vs Bouquet de eucalipto + larvas de Gorgulho-do-Eucalipto

Teste Binomial – Escolha larvas +bouquet ou branco – Sig.

Binomial Test						
	Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)	
Escolha_num_bin	Group 1	92	.42	.50	.025	
	Group 2	126	.58			
	Total	218	1.00			

**Modelo GLM Binomial** (só com escolha 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – Sig; Tempo – Sig.

### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
(Intercept)	.265	1	.607
Cubo	7.978	1	.005
Tempo	5.726	1	.017

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	Df	Sig.
(Intercept)	-.898	.2207	-1.330	-.465	16.536	1	.000
[cubo=.00]	.802	.2840	.246	1.359	7.978	1	.005
[cubo=1.00]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	.818	.3416	.148	1.487	5.726	1	.017
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

**Modelo GLM Multinomial** (com 0, 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – NS; Tempo –NS.

### Tests of Model Effects

Source	Type III
--------	----------

	Wald Chi-Square	Df	Sig.
Cubo	1.895	1	.169
Tempo	1.043	1	.307

Dependent Variable: Escolha\_num\_mul

Model: (Threshold), cubo, tempo

### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
Threshold [Escolha_num_mul=.00]	-1.358	.1922	-1.734	-.981	49.931	1	.000
[Escolha_num_mul=1.00]	.041	.1730	-.298	.380	.055	1	.814
[cubo=.00]	-.303	.2198	-.733	.128	1.895	1	.169
[cubo=1.00]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	-.266	.2607	-.777	.245	1.043	1	.307
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_num\_mul

Model: (Threshold), cubo, tempo

- a. Set to zero because this parameter is redundant.
- b. Fixed at the displayed value.

- Branco vs Larvas de Gorgulho-do-Eucalipto

Teste Binomial – Escolha larvas ou branco - NS

Binomial Test						
		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
Escolha_bin	Group 1	1.00	74	.49	.50	.871
	Group 2	2.00	77	.51		
	Total		151	1.00		

**Modelo GLM Binomial** (só com escolha 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – Sig; Tempo – NS

### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
(Intercept)	.241	1	.624
Cubo	14.146	1	.000
Tempo	.000	1	.997

Dependent Variable: Escolha\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	-.735	.2840	-1.292	-.179	6.703	1	.010
[cubo=.00]	1.300	.3457	.623	1.978	14.146	1	.000
[cubo=1.00]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	-.001	.3491	-.685	.683	.000	1	.997
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

Modelo multinomial (com três níveis 0, 1 e 2) com os fatores cubo e tempo –

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
			(Intercept)	1.047	.0869	.876	1.217
[cubo=.00]	-.070	.1072	-.280	.141	.421	1	.517
[cubo=1.00]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	-.138	.1078	-.349	.073	1.634	1	.201
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	.683 <sup>b</sup>	.0623	.571	.817			

Dependent Variable: Escolha\_num\_mul

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Maximum likelihood estimate.

Cubo – NS; Tempo – NS

- Branco vs Bouquet de eucalipto + adultos de Gorgulho-do-Eucalipto

**Binomial Test**

		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
Escolha_num_bin	Group 1	2	61	.71	.50	.000
	Group 2	1	25	.29		
	Total		86	1.00		

- Bouquet de eucalipto vs Bouquet de eucalipto + larvas de Gorgulho-do-Eucalipto

Teste Binomial – Escolha Bouquet ou Bouquet + larvas - NS

Binomial Test						
		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
Escolha_num_bin	Group 1	2.00	45	.54	.50	.510
	Group 2	1.00	38	.46		
	Total		83	1.00		

**Modelo GLM Binomial** (só com escolha 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – Sig; Tempo – NS

#### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Df	Sig.
(Intercept)	.801	1	.371
Cubo	4.347	1	.037
Tempo	.329	1	.566

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

#### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	Df	Sig.
(Intercept)	-1.244	.3944	-2.017	-.471	9.954	1	.002
[cubo=.00]	1.590	.7625	.095	3.084	4.347	1	.037
[cubo=1.00]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	.445	.7761	-1.076	1.966	.329	1	.566
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

**Modelo GLM Multinomial** (com 0, 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – NS; Tempo –NS.

**Tests of Model Effects**

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
Cubo	2.326	1	.127
Tempo	.006	1	.938

Dependent Variable: Escolha\_num\_mul

Model: (Threshold), cubo, tempo

**Parameter Estimates**

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
Threshold [Escolha_num_mul=.00]	-1.289	.3065	-1.890	-.689	17.692	1	.000
[Escolha_num_mul=1.00]	.080	.2814	-.472	.631	.080	1	.777
[cubo=.00]	-.772	.5059	-1.763	.220	2.326	1	.127
[cubo=1.00]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	-.040	.5101	-1.040	.960	.006	1	.938
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_num\_mul

Model: (Threshold), cubo, tempo

- a. Set to zero because this parameter is redundant.
- b. Fixed at the displayed value.

- Bouquet de eucalipto vs Bouquet de eucalipto+ adultos de Gorgulho-do-Eucalipto

### Binomial Test

		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
Escolha_num_bin	Group 1	1	47	.56	.50	.326
	Group 2	2	37	.44		
	Total		84	1.00		

**Modelo GLM Binomial** (só com escolha 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – NS; Tempo – NS

### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Df	Sig.
(Intercept)	.652	1	.419
Cubo	.710	1	.400
Tempo	1.707	1	.191

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	.293	.4175	-.526	1.111	.492	1	.483
[cubo=0]	.391	.4637	-.518	1.300	.710	1	.400
[cubo=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	-.611	.4676	-1.527	.305	1.707	1	.191
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

**Modelo GLM Multinomial** (com 0, 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo –

**Tests of Model Effects**

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
Cubo	.109	1	.741
Tempo	.000	1	.993

Dependent Variable: Escolha\_num\_mul

Model: (Threshold), cubo, tempo

- Bouquet de eucalipto + larvas de Gorgulho-do-Eucalipto vs Larvas de Gorgulho-do-Eucalipto

### Binomial Test

		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
Escolha_num_bin	Group 1	2	26	.36	.50	.019
	Group 2	1	47	.64		
	Total		73	1.00		

Modelo GLM Binomial (só com escolha 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – NS; Tempo – NS

### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
(Intercept)	5.435	1	.020
Cubo	1.791	1	.181
Tempo	.016	1	.899

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	.154	.5563	-.936	1.245	.077	1	.782
[cubo=0]	.907	.6776	-.421	2.235	1.791	1	.181
[cubo=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[tempo=m ]	.087	.6869	-1.259	1.433	.016	1	.899
[tempo=t ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: Escolha\_num\_bin

Model: (Intercept), cubo, tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

- Bouquet de eucalipto + larvas de Gorgulho-do-Eucalipto vs Bouquet de eucalipto+ adultos de Gorgulho-do-Eucalipto

Teste Binomial – Escolha Bouquet +adultos ou Bouquet + larvas – NS

Binomial Test						
		Category	N	Observed Prop.	Test Prop.	Exact Sig. (2-tailed)
choice_bin	Group 1	2	40	.45	.50	.397
	Group 2	1	49	.55		
	Total		89	1.00		

**Modelo GLM Binomial** (só com escolha 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – NS; Tempo – NS

#### Tests of Model Effects

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
(Intercept)	1.353	1	.245
Cub	2.789	1	.095
Tempo	.286	1	.593

Dependent Variable: choice\_bin

Model: (Intercept), cub, Tempo

#### Parameter Estimates

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
(Intercept)	-.065	.3594	-.769	.640	.032	1	.857
[cub=0]	1.030	.6166	-.179	2.238	2.789	1	.095
[cub=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Tempo=m]	-.341	.6379	-1.591	.909	.286	1	.593
[Tempo=t]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: choice\_bin

Model: (Intercept), cub, Tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.

**Modelo GLM Multinomial** (com 0, 1 ou 2) com os fatores cubo e tempo – Cubo – NS; Tempo –NS.

**Tests of Model Effects**

Source	Wald Chi-Square	Type III	
		Df	Sig.
Cub	3.215	1	.073
Tempo	.786	1	.375

Dependent Variable: choice

Model: (Threshold), cub, Tempo

**Parameter Estimates**

Parameter	B	Std. Error	95% Wald Confidence Interval		Hypothesis Test		
			Lower	Upper	Wald Chi-Square	df	Sig.
Threshold [choice=0]	-1.240	.3246	-1.876	-.604	14.598	1	.000
[choice=1]	.513	.3050	-.085	1.111	2.827	1	.093
[cub=0]	-.919	.5124	-1.923	.086	3.215	1	.073
[cub=1]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
[Tempo=m]	.478	.5392	-.579	1.535	.786	1	.375
[Tempo=t]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.	.	.
(Scale)	1 <sup>b</sup>						

Dependent Variable: choice

Model: (Threshold), cub, Tempo

a. Set to zero because this parameter is redundant.

b. Fixed at the displayed value.