

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

Dayanna do Nascimento Machado

**DIVERSIDADE GENÉTICA E POSSÍVEIS ROTAS DE DISPERSÃO DE
Thaumastocoris peregrinus (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**

Santa Maria, RS
2020

Dayanna do Nascimento Machado

DIVERSIDADE GENÉTICA E POSSÍVEIS ROTAS DE DISPERSÃO DE
Thaumastocoris peregrinus **(HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Florestal.**

Orientador: Prof. Dr. Ervandil Corrêa Costa

Santa Maria, RS,
2020

Machado, Dayanna do Nascimento
DIVERSIDADE GENÉTICA E POSSÍVEIS ROTAS DE DISPERSÃO DE
Thaumastocoris peregrinus (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)
/ Dayanna do Nascimento Machado.- 2020.
81 p.; 30 cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2020

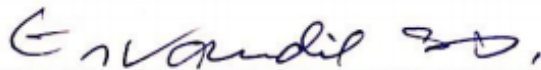
1. Espécie invasiva 2. Eucalyptus 3. Corymbia 4.
mtDNA 5. Engenharia Florestal I. Título.

Dayanna do Nascimento Machado

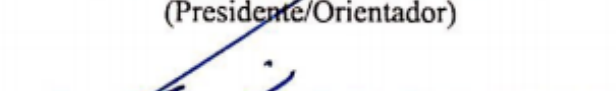
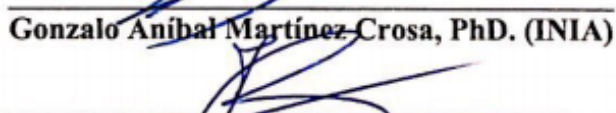
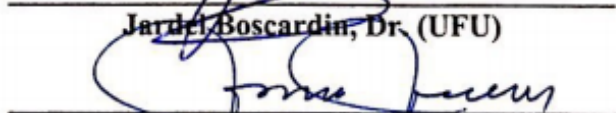
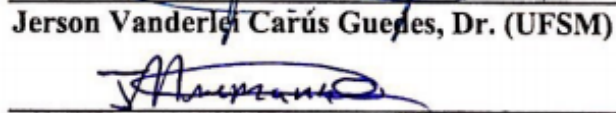
**DIVERSIDADE GENÉTICA E POSSÍVEIS ROTAS DE DISPERSÃO DE
Thaumastocoris peregrinus (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Engenharia Florestal**.

Aprovado em 09 de janeiro de 2020:



Ervandil Corrêa Costa, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Gonzalo Anibal Martínez-Crosa, PhD. (INIA)
Jardel Boscardin, Dr. (UFU)
Jerson Vanderlei Carús Guedes, Dr. (UFSM)
Jonas André Arnemann, PhD. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Com carinho, dedico este trabalho aos meus pais, Maria Lúcia dos Santos do Nascimento e Paulo Olegário dos Santos Machado que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e sempre me incentivaram a buscar novos desafios.

AGRADECIMENTOS

A consolidação deste trabalho só foi possível graças a participação e auxílio de muitas pessoas, que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese. Obrigada!

Agradeço a minha família, minha mãe Maria Lúcia dos Santos do Nascimento, meu pai Paulo Olegário dos Santos Machado pelo incentivo, ensinamentos, por serem meus exemplos de luta, coragem, perseverança, amizade, apoio emocional, principalmente quando estive fazendo o meu Doutorado Sanduíche na Universidade de Vigo, Espanha. Vocês são minha base e meu orgulho. Amo vocês!

Ao meu noivo e grande amigo Clérison Régis Perini, pela nossa amizade, parceria, pelo nosso companheirismo e apoio incondicional. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda. Obrigada e amo você! Agradeço ao meu tio Hortêncio que me deu a minha “cachorrete” Valentina, que mesmo sendo um cãozinho faz meus dias mais felizes e é uma amiga fiel e companheira.

Um agradecimento especial para minhas vovós, Alcy e Cirlei, tias Eliane e Nani que estiveram torcendo por mim e me confortando nos momentos que mais precisei, quando sai da minha zona de conforto e fui em busca de novos desafios na Espanha. Minha saudade de casa reduzia a cada palavra de vocês! Muito obrigada por fazerem parte da minha vida.

A minha amiga/irmã Larissa Burger, você foi muitíssimo importante para mim, tua amizade e nossas conversas nos domingos me mantinham confiantes, mesmo quando tudo parecia estar perdido. Obrigada pela nossa velha amizade e conte sempre comigo! Amo você amiga.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal (PPGEF), por viabilizarem a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo importante aporte financeiro, a partir da concessão de bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Dr. Ervandil Corrêa Costa, pela orientação e acima de tudo, amizade. Este trabalho só foi possível porque você acreditou e confiou na minha capacidade, além disso, me proporcionou a liberdade para aprender com novos desafios. Você é minha inspiração de professor e pesquisador, que incentiva, auxilia, acredita e defende seus orientados! Obrigada meu grande amigo!

Ao professor Adolfo Cordero Rivera, PhD., pela confiança e por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar com você, durante meu Doutorado Sanduíche realizado na Espanha.

Essa experiência fez com que eu acreditasse mais em mim mesma, na minha capacidade de viver novos desafios. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Jerson Carús Guedes por ter sugerido o desenvolvimento de um trabalho inovador na área florestal do Brasil, na qual saímos da posição de colaboradores e hoje somos os autores principais de importantes trabalhos. Obrigada por ter esse senso de trabalho em equipe e nos ceder toda a estrutura física para o desenvolvimento desse projeto!

Ao professor Jonas André Arnemann, PhD., pelos ensinamentos e por me oferecer uma oportunidade de aprender e aplicar o conhecimento na Entomologia Florestal. Obrigada por acreditar no meu potencial para desenvolver esse trabalho.

Ao professor Dr. Jardel Boscardin, por ter aceito participar da minha banca de qualificação e defesa de doutorado. Obrigada pelas contribuições. Tenho orgulho de ver teu progresso e saber que es um excelente professor na Engenharia Florestal.

Ao pesquisador Dr. Gonzalo Aníbal Martínez Crosa pelas importantes contribuições para melhorar a qualidade do trabalho. Obrigada pela oportunidade de demonstrar um pouquinho do trabalho que estava sendo desenvolvido durante a construção da minha tese, no evento sobre *Thaumastocoris peregrinus* no Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguai.

Aos pesquisadores e professores que acreditaram e confirmaram na minha pesquisa de tese e contribuíram com a coleta e envio das amostras de *T. peregrinus*. Sem a ajuda de vocês não seria possível concretizar esse trabalho. Meu muito obrigada: Ervandil C. Costa (Brasil), Jerson V. C. Guedes (Brasil), Leonardo R. Barbosa (Brasil), Gonzalo Martínez (Uruguai), Sandra I. Mayorga (Chile), Sergio O. Ramos (Argentina), Manuela R. Branco (Portugal), André Garcia (Portugal), Juan Manuel Vanegas-Rico (México), Eduardo Jiménez-Quiroz (México), Stefania Laudonia (Itália), Tanya Novoselsky (Israel), Donald R. Hodel (USA), Gevork Arakelian (US), Horacio Silva (Uruguai), Clérison R. Perini (Brasil), Ivair Valmorbida (Brasil/USA), Gustavo A. Ugalde (Brasil), Jonas A. Arnemann (Brasil).

Agradeço ao técnico de laboratório e amigo Gustavo Andrade Ugalde pelos muitos dias de extração, PCR e preparação das amostras para sequenciamento. Sem tua ajuda esse trabalho não seria concretizado! Obrigada.

Quero agradecer as minhas amigas e companheiras da “Calle Pino”, Mariana Dossin, Daniela Rodriguez e Nariane de Andrade, saibam que morar com vocês em Vigo (Espanha) foi inesquecível e único! Se eu não compartilhasse da companhia e apoio de vocês tudo seria mais difícil. Agradeço ainda, ao amigo Régis Felipe Stacke por compartilhar conosco da sua

sabedoria em inglês e seu senso de localização, os quais foram muito utilizados, durante a nossa “Eurotrip”.

A família Julie!! A amiga Julie Morriello, Noly Gómez e Ana! Sem o auxílio de vocês estaríamos totalmente perdidas e não teríamos a oportunidade de conhecer essa família linda e cheia de carinho, que nos inseriu como parte dela. Obrigada por tudo, nunca esquecerei dos momentos que desfrutamos com vocês! Gratidão por tudo.

Aos amigos Nathalia, Paula, Victor, Alberto, Hugo, Maria, Belen que fizeram nossos dias mais felizes no laboratório, durante o doutorado sanduíche na Espanha. MUITÍSSIMO obrigada a todos. Nunca olvidaré de ustedes y echo de menos vosotros!

Aos colegas de laboratório Leandra Pedron, Jéssica Maus, Camila Galvan, Mateus Alves Saldanha, Marciane Fleck, Leonardo Mortari e a nossa querida secretária Angelita Sangoi (Gel), pela companhia, incentivo, risadas, aprendizados, amizade. Tenho uma grande admiração pela nossa equipe, pois produzimos pesquisas de qualidade mesmo sem uma estrutura física adequada!

As minhas amigas e comadres Vanessa Teixeira, Bianca Costa e Franciele Terra pela compreensão, amizade, apoio, pelas vezes que não pude estar presente em nossas reuniões de amigas! Obrigada.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma e desejaram boas energias, para que este sonho, hoje, fosse concretizado!

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA E POSSÍVEIS ROTAS DE DISPERSÃO DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

AUTOR: Dayanna do Nascimento Machado
ORIENTADOR: Prof. Dr. Ervandil Corrêa Costa

O percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus*, nativo da Austrália, tornou-se uma praga invasiva em quase todo o mundo nos últimos 16 anos, e está ocasionando danos significativos em árvores dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*. A rápida disseminação de *T. peregrinus* levantou algumas questões sobre possíveis rotas utilizadas pela espécie para invadir outros continentes. Nesse sentido, os objetivos deste estudo foram: (1) investigar a diversidade genética das populações de *T. peregrinus* de 11 países do novo e do velho mundo, e (2) inferir possíveis rotas de dispersão do inseto utilizando um fragmento do gene Citocromo Oxidase, subunidade I (COI). Entre os anos de 2016 e 2019, espécimes de *T. peregrinus* foram coletados na Argentina, no Brasil, no Chile, na Espanha, nos Estados Unidos, em Israel, na Itália, no México, no Paraguai, em Portugal e no Uruguai, armazenados em tubos do tipo *Eppendorf* contendo álcool 92% ou absoluto, e enviados para o Laboratório de Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil) para a caracterização molecular das populações. Os dados de DNA mitocondrial (mtDNA) deste trabalho foram combinados com sequências depositadas no Genbank e outras não depositadas, assim sendo construída uma rede de haplótipos. Possíveis rotas de invasão de *T. peregrinus* foram sugeridas com base em: (1) eventos de invasão espaço-temporal; (2) relatos da literatura de rotas de invasão em cada país; (3) movimento de pessoas, mercadorias, madeira por rodovias e rotas marítimas entre países; e (4) sequências de mtDNA das populações de *T. peregrinus*. Foi obtido um total de 126 sequências de mtDNA de *T. peregrinus* de 29 locais, distribuídos entre os 11 países. Quando combinados os dados, totalizaram-se 423 sequências. O haplótipo A foi o mais disperso mundialmente e nove rotas de invasão foram sugeridas. Essa é a primeira caracterização molecular realizada para populações de *T. peregrinus* no Chile, no Paraguai, no México, nos Estados Unidos, em Portugal, na Espanha e em Israel. O haplótipo A de *T. peregrinus* é dominante nas populações investigadas na sua faixa invasiva. Para a Itália foi a primeira informação da presença do haplótipo A e aumento da diversidade genética de *T. peregrinus* no país. Os possíveis cenários de invasão sugeridos para esse inseto-praga podem ajudar a esclarecer alguns caminhos utilizados na sua dispersão.

Palavras-chave: Espécie invasiva. *Eucalyptus*. *Corymbia*. mtDNA. Engenharia Florestal.

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY AND POSSIBLE DISPERSION'S ROUTS OF *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

AUTHOR: Dayanna do Nascimento Machado

ADVISOR: Prof. Dr. Ervandil Corrêa Costa

The bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*, native from Australia, has become an invasive pest almost worldwide for the past 16 years and is causing significant damage to Eucalyptus and Corymbia trees. The rapid spread of *T. peregrinus* raised some questions about possible routes used by this insect to invade continents. In this sense, this study aimed to investigate the genetic diversity of 11 populations of *T. peregrinus* from the new and old world countries, and to infer possible routes of *T. peregrinus* dispersal using a fragment of the Cytochrome Oxidase subunit I (COI) gene. Specimens of *T. peregrinus* were collected between 2016-2019 from Argentina, Brazil, Chile, Spain, the United States, Israel, Italy, Mexico, Paraguay, Portugal and Uruguay, were stored in tubes containing 92% or absolute alcohol, and were sent to the Agricultural Biotechnology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) for molecular characterization. Mitochondrial DNA (mtDNA) data from these specimens were combined with sequences deposited at Genbank and non-deposited, to perform a haplotype network. Possible *T. peregrinus* invasion routes have been suggested based on: (1) space-time invasion events; (2) literature reports of invasion routes in each country; (3) movement of people, goods, timber by road and sea routes between countries; and (4) mtDNA sequences from *T. peregrinus* populations. A total of 126 *T. peregrinus* mtDNA sequences from 29 sites were obtained from 11 countries. Combined data generated a total of 423 sequences. Haplotype A was the most dispersed worldwide and nine invasion routes were suggested. This is the first molecular characterization performed for *T. peregrinus* populations in Chile, Paraguay, Mexico, United States, Portugal, Spain and Israel. *T. peregrinus* haplotype A is dominant in the populations sampled in its invasive range. For Italy we inform for the first time the presence of haplotype A and the increased of genetic diversity of *T. peregrinus* in this country. The possible invasion scenarios suggested for this insect pest can aid to clarify some paths used in its dispersal.

Keywords: Invasive species. *Eucalyptus*. *Corymbia*. mtDNA. Forest Entomology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

APRESENTAÇÃO

Figura 1 - Fêmea adulta de <i>T. peregrinus</i>	18
-------------------------------------------------------	----

ARTIGO 1

Figure 1 - (a) Eucalyptus tree in the El Retiro Park of Madrid with attack of <i>T. peregrinus</i> ; (b) Leaves with dark egg masses, aggregated as is typical of <i>T. peregrinus</i> and (c) adult of <i>T. peregrinus</i> (body length about 3 mm).....	37
Figure 2 - Possible routes of introduction de <i>T. peregrinus</i> in Spain.....	39

ARTIGO 2

Figure 1 - Locations where specimens of <i>Thaumastocoris peregrinus</i> were collected in South America, North America, Europe and Israel.	59
Figure 2 - Mitochondrial haplotype network. Circle sizes are in approximate proportion to haplotype frequencies. Each mark represents one nucleotide difference. Countries: Australia (AU); Reunion Island (RE); Argentina (AR); Brazil (BR); Chile (CL); Paraguay (PY); Uruguay (UY); Israel (IL); Mexico (MX); United States of America (US); Portugal (PT); Spain (ES); Italy (IT); South Africa (SA).....	60
Figure 3 - Haplotype distribution of <i>T. peregrinus</i> in 14 countries. Australia (AU); Reunion Island (RE); Argentina (AR); Brazil (BR); Chile (CL); Paraguay (PY); Uruguay (UY); Israel (IL); Mexico (MX); United States of America (US); Portugal (PT); Spain (ES); Spain (ES); Italy (IT); South Africa (SA).The size of pie charts is relative to the number of individuals sequenced at each locality	61
Figure 4 - Possible introduction and dispersal routes of <i>T. peregrinus</i> in the New and Old World.	62

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1 - País e ano da introdução do gênero <i>Eucalyptus</i>	15
Tabela 2 - Insetos-praga do gênero <i>Eucalyptus</i> com ocorrência fora da sua área de origem e introduzidos na África (A), Ásia (As), América do Norte (AN), América do Sul (AS), Europa (E). Período de 1870 a 2014.....	16
Tabela 3 - Relação de alguns insetos-praga invasivos que possuem informações genéticas de DNA <i>barcoding</i> disponíveis em: National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Barcode of Life Data System (BOLD Systems).....	28

ARTIGO 2

Table 1 - First records of <i>Thaumastocoris peregrinus</i> outside Australia.....	63
Table 2 - Number of individuals used/sequenced by population.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
BOLD SYSTEMS	Sistema de dados de código de barras da vida
COI	Citocromo Oxisade, subunidade I
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
IBÁ	Industria Brasileira de Árvores
INFOR	Instituto Forestal
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPEF	Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mtDNA	DNA mitocondrial
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
SISBio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	13
1.1	INTRODUÇÃO	13
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.2.1	Gênero <i>Eucalyptus</i> no mundo	15
1.2.2	Insetos-praga invasivos que têm <i>Eucalyptus</i> como hospedeiro	16
1.2.3	<i>Thaumastocoris peregrinus</i> (Hemiptera: Thaumastocoridae): taxonomia e bioecologia	18
1.2.4	<i>Thaumastocoris peregrinus</i> : dispersão e hospedeiros do gênero <i>Eucalyptus</i>	20
1.2.5	<i>Thaumastocoris peregrinus</i> : danos e manejo	22
1.2.6	Aplicações de marcadores moleculares mitocondriais em entomologia	26
1.2.7	Processo de invasão de pragas	29
1.2.8	Medidas de biossegurança	29
1.3	OBJETIVOS	32
1.3.1	Objetivo geral.....	32
1.3.2	Objetivos específicos	32
1.4	MATERIAL E MÉTODOS	33
1.4.1	Obtenção dos espécimes de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	33
1.4.2	Extração, amplificação e sequenciamento do mtDNA de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	33
1.4.3	Processamento das sequências de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	34
2	ARTIGO 1 - THE ONGOING DISPERSION OF THE EUCALYPTUS BRONZE BUG (<i>Thaumastocoris peregrinus</i>) IN SPAIN	36
3	ARTIGO 2 - ONE MATERNAL LINEAGE LEADS THE EXPANSION OF <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) IN THE NEW AND OLD WORLDS	43
4	DISCUSSÃO	66
5	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

Entre os insetos-praga invasivos do gênero *Eucalyptus*, o percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero e Dellapé; (2006) (Hemiptera: Thaumastocoridae), merece destaque, porque está amplamente distribuído ao redor do mundo, em mais de 20 países, e também porque causa significativos danos aos seus hospedeiros.

Devido ao seu hábito alimentar, tanto na fase imatura (ninfá) quanto na adulta, os espécimes se alimentam sugando a seiva das folhas, que ficam com aspecto bronzeado, podendo ocorrer a queda precoce dessas folhas, reduzindo a área fotossintética e limitando o desenvolvimento das árvores (JACOBS; NESER, 2005). Produtos inseticidas químicos foram testados para verificar a eficácia de controle sobre espécime de *T. peregrinus* (NOACK et al., 2009; MACHADO et al., 2016), porém muitos produtos não são registrados para a cultura e para o inseto. Com a descoberta do parasitoide *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae), o controle biológico passou a ser considerado uma alternativa promissora para o controle de *T. peregrinus* (LIN; HUBER; LA SALLE, 2007).

O primeiro relato de *T. peregrinus* fora da Austrália ocorreu no ano de 2003, na África do Sul, identificado erroneamente como *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (1908) (Heteroptera: Thaumastocoridae) (JACOBS; NESER, 2005). Somente em 2006, a partir do estudo de Carpintero e Dellapé (2006), ficou elucidado que se tratava da espécie *T. peregrinus*.

A caracterização morfológica de espécies de insetos necessita de especialistas com conhecimento específico em taxonomia da família e do gênero. Como forma de conferir maior precisão na identificação e na caracterização das espécies morfológicamente semelhantes, as técnicas moleculares, como o DNA *barcoding*, são uma alternativa de taxonomia molecular que, já na época do primeiro registro de *T. peregrinus*, na África do Sul, poderia ter auxiliado na confirmação correta da espécie.

O uso do fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase C, subunidade I (COI), (650 pares de bases (pb), de origem materna, permitiu determinar uma única assinatura genética para cada espécie, chamado DNA *barcoding* (HEBERT et al., 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; DEWARD, 2003) e assim estabeleceu a base da identificação de espécies em nível molecular.

A assinatura genética de *T. peregrinus* foi caracterizada em um estudo de diversidade genética com espécimes coletados em populações na Austrália, na África do Sul e na América

do Sul, onde foram encontrados oito diferentes haplótipos, isto é, oito linhagens maternas (NADEL et al., 2010). Uma observação importante realizada pelos autores foi a invasão do haplótipo A, na América do Sul, e dos haplótipos D e G, na África do Sul, que se caracterizou como eventos distintos de introdução.

Aproximadamente nove anos após a detecção da invasão do haplótipo A de *T. peregrinus* na América do Sul (NADEL et al., 2010), esperava-se que novas invasões desse inseto-praga poderiam ter ocorrido no Sul da América carregando novos haplótipos e aumentando a diversidade genética. Desse modo, novas coletas de populações poderiam constatar o atual *status* da diversidade de *T. peregrinus*, na América do Sul, além de ampliar o estudo para América do Norte, Europa e Ásia, e, com isso, inferir possíveis rotas de dispersão de *T. peregrinus* no novo e no velho mundo.

O estudo foi dividido em dois artigos:

- 1) “The ongoing dispersion of the Eucalyptus bronze bug (*Thaumastocoris peregrinus*) in Spain”.
- 2) “One maternal lineage leads the expansion of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in the New and Old Worlds”.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Gênero *Eucalyptus* no mundo

As árvores do gênero *Eucalyptus* possuem a segunda maior área plantada no mundo, ficando atrás apenas do gênero *Pinus* (REJMÁNEK; RICHARDSON, 2011). O eucalipto ocorre naturalmente na Austrália, Tasmânia e algumas ilhas da Oceania. São conhecidas mais de 700 espécies que apresentam rápido crescimento e adaptabilidade (EMBRAPA, 2017a). O gênero *Eucalyptus* adapta-se facilmente a diferentes condições climáticas e edáficas, o que resultou a introdução bem-sucedida de muitas espécies para usos como: paisagismo, lenha e madeira, fibra industrial, quebra-ventos e abrigos (DAVIDSON, 1993). Dentre os produtos e subprodutos derivados das árvores de eucaliptos, destacam-se: celulose, papel, medicamentos, cosméticos, dormentes, moirões, móveis, lenha, carvão vegetal, energia, óleos essenciais, entre outros (EMBRAPA, 2017a).

A introdução do eucalipto fora da Austrália teve início em 1774 na Europa (Tabela 1), seguindo para outros continentes.

Tabela 1 - País e ano da introdução do gênero *Eucalyptus*

País	Possível ano de introdução	Referência
Inglaterra	1774	Andrade (1939)
Chile	1823	Andrade (1939)
Brasil	1824	Andrade (1939)
África do Sul	1828	Andrade (1939)
Índia	1843	Andrade (1939)
México	1948	Fladung et al. (2015)
Estados Unidos	1849	Kellison; Lea; Marsh, (2013)
Portugal	1852	Andrade (1939)
Uruguai	1853	Andrade (1939)
Argentina	1857	Andrade (1939)
França	1857	Andrade (1939)
Argélia	1859	Andrade (1939)
Egito	1865	Andrade (1939)
Itália	1869	Andrade (1939)
Grecia	1872	Panetsos (1970)
Espanha	1874	Andrade (1939)
China	1890	Qi (2002)

Atualmente, as plantações de eucaliptos cobrem uma área de 20 milhões de hectares e estão presentes em mais de 90 países (BOOTH, 2013). No Brasil, estão localizadas as áreas mais produtivas em comparação à Austrália e aos demais países produtores, compreendendo aproximadamente 5,7 milhões de hectares no ano de 2018 (IBÁ, 2019). A segunda maior área

plantada está na China, onde as plantações ultrapassam 4,5 milhões de hectares (XIE et al., 2017) e a Índia possui a terceira maior área plantada com eucalipto, totalizando 3,9 milhões de hectares (BOOTH, 2013).

Na América do Sul, a maior área plantada com o gênero *Eucalyptus* está no Brasil (IBÁ, 2019). No Chile, a área plantada com eucalipto, no ano de 2017, foi de aproximadamente 870.000 ha, com destaque para as espécies *Eucalyptus globulus* Labill. e *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) (INFOR, 2019). No Uruguai, no mesmo ano, a área estimada foi de aproximadamente 800.000 ha (BOSCANA; BORAGNO, 2018). Na Argentina, região de Misiones, Corrientes e Entre Ríos estão as maiores áreas com plantações de eucalipto compreendendo cerca de 384.000 ha (ASOCIACIÓN FORESTAL ARGENTINA, 2019). No Paraguai, a área com plantações de *Eucalyptus* foi estimada em 85.000 ha, sendo que é considerada abaixo da real necessidade para uso como madeira e lenha (INSTITUTO FORESTAL NACIONAL, 2014).

1.2.2 Insetos-praga invasivos que têm *Eucalyptus* como hospedeiro

Plantações homogêneas, tanto florestais quanto agrícolas, acabam simplificando os ambientes onde estão inseridos, tornando-os cada vez mais suscetíveis a problemas fitossanitários com destaque para a invasão de insetos-praga, bem como a adaptação de populações naturais às culturas introduzidas, principalmente, nas regiões dos trópicos (ALTIERI; SILVA; NICHOLLS, 2003).

No período de 1870 a 2014, foram introduzidas, fora da sua faixa nativa, mais de 40 espécies de insetos-praga que possuem, como hospedeiros, árvores do gênero *Eucalyptus*, em sua maioria. Essas espécies pertencem à Ordem Hemiptera, seguida de Coleoptera, Hymenoptera e de Lepidoptera (HURLEY et al., 2016). Considerando apenas as espécies introduzidas na África, na América do Sul, na América do Norte, na Ásia e na Europa, foram 23 insetos-praga (Tabela 2), em que nove pertencem à Ordem Hemiptera, nove, à Ordem Coleoptera e cinco, à Ordem Hymenoptera. As demais espécies têm ocorrência apenas na Australásia (Nova Zelândia) (18 espécies) (HURLEY et al., 2016).

Tabela 2 - Insetos-praga do gênero *Eucalyptus* com ocorrência fora da sua área de origem e introduzidos na África (A), Ásia (As), América do Norte (AN), América do Sul (AS), Europa (E). Período de 1870 a 2014.

Espécie	Família	Hábito alimentar	Local
Ordem Hemiptera			
<i>Ctenarytaina eucalypti</i> (Maskell, 1980)	Aphalaridae	Sugador	A, As, E, AN, AS
<i>Blastopsylla occidentalis</i> Taylor, 1985	Aphalaridae	Sugador	A, E, AN, AS
<i>Ctenarytaina longicauda</i> Taylor, 1987	Aphalaridae	Sugador	AN
<i>Ctenarytaina peregrina</i> Hodkinson, 2007	Aphalaridae	Sugador	E
<i>Ctenarytaina spatulata</i> Taylor, 1997	Aphalaridae	Sugador	E, AN, AS
<i>Eucalyptolyma maideni</i> Froggatt	Aphalaridae	Sugador	AN
<i>Glycaspis brimblecombei</i> (Moore, 1964)	Aphalaridae	Sugador	A, E, AN, AS
<i>Spondylaspis c.f. plicatuloides</i> (Froggatt, 1900)	Aphalaridae	Sugador	A
<i>Thaumastocoris peregrinus</i> Carpintero e Dellapé, 2006	Thaumastocoridae	Sugador	A, E, AN, AS
Ordem Coleoptera			
<i>Phoracantha semipunctata</i> (Fabricius, 1775)	Cerambycidae	Broqueador	A, E, AN, AS
<i>Phoracantha recurva</i> Newman, 1842	Cerambycidae	Broqueador	A, E, AN, AS
<i>Gonipterus platensis</i> (Marelli, 1926)	Curculionidae	Desfoliador	E, AN, AS
<i>Gonipterus pulverulentus</i> Lea, 1897	Curculionidae	Desfoliador	SA
<i>Gonipterus</i> sp2.	Curculionidae	Desfoliador	A, E
<i>Trachymela sloanei</i> (Blackburn, 1896)	Chrysomelidae	Desfoliador	AN
<i>Trachymela tincticollis</i> (Blackburn, 1896)	Chrysomelidae	Desfoliador	A
<i>Trachymela m-fuscum</i> (Boheman, 1859)	Chrysomelidae	Desfoliador	AN
<i>Paropsisterna gloriosa</i> (Blackburn, 1899)	Chrysomelidae	Desfoliador	E
Ordem Hymenoptera			
<i>Epichrysocharis burwelli</i> Schauff	Eulophidae	Galhador	AN, AS
<i>Leptocybe invasa</i> Fisher & La Salle, 2004	Eulophidae	Galhador	A, As, E, AN, AS
<i>Ophelimus maskelli</i> (Ashmead, 1900)	Eulophidae	Galhador	A, As, E, AN
<i>Selitrichodes globulus</i> La Salle & Gates, 2009	Eulophidae	Galhador	AN
<i>Ophelimus</i> sp.	Eulophidae	Galhador	E

Fonte: Adaptado de Hurley et al. (2016).

1.2.3 *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): taxonomia e bioecologia

A descrição original realizada por Carpintero e Dellapé (2006) e a redescrição com a chave dicotômica de diagnóstico para o gênero *Thaumastocoris* desenvolvida por Noack, Cassis e Rose (2011) foram utilizadas para confirmar a espécie *T. peregrinus*. A partir dessa revisão sistemática, foi possível incluir nove novas espécies ao gênero *Thaumastocoris*, totalizando assim, 14 espécies (NOACK; CASSIS; ROSE, 2011).

Figura 1 - Fêmea adulta de *T. peregrinus*.



Fonte: Autora (2019).

Morfologicamente, *T. peregrinus* é semelhante à espécie *T. australicus*, no entanto, alguns caracteres externos permitem a diferenciação entre as espécies como, por exemplo, a presença de um tubérculo nos ângulos anterolaterais do lóbulo anterior no pronoto; os machos apresentam a genitália de maneira assimétrica com abertura para o lado direito e três espinhos escuros subapicais na margem interna das tíbias anterior e mediana em *T. peregrinus* (CARPINTERO; DELAPÉ, 2006).

O percevejo bronzeado é um inseto de aproximadamente três milímetros de comprimento, possui corpo achatado, coloração predominantemente marrom, reprodução sexuada, sendo que as fêmeas podem ovipositar em média 60 ovos (JACOBS; NESER, 2005; BUTTON, 2007), e os machos possuem comportamento de agregação que está associado ao feromônio (3-methylbut-2-enyl butanoate) (GONZÁLEZ et al., 2012). As ninfas eclodem, após 6 dias, a uma temperatura entre 20 a 25°C (MARTÍNEZ et al., 2017), a fase de ninfal compreende cinco instares, podendo ocorrer várias gerações ao longo de um ano (BUTTON,

2007; NOACK; ROSE, 2007; SOLIMAN et al., 2012) e as ninfas recém eclodidas são altamente móveis (WILCKEN et al., 2010). O ciclo biológico completo tem duração de aproximadamente 60 dias (fases de ovo até adulto), variando o período em decorrência de fatores climáticos (SOLIMAN, 2010). As fêmeas adultas sobrevivem em média 45 dias e geralmente põem ovos agrupados (MARTÍNEZ et al., 2014a). Santadino et al. (2017a) observou que *T. peregrinus* se alimenta da região do mesófilo, atingindo parênquima paliçádico das folhas de eucalipto.

Tanto a temperatura como a escolha do hospedeiro podem influenciar no ciclo biológico de *T. peregrinus* (BARBOSA et al., 2012). Na espécie *Eucalyptus scoparia* Maiden, foi observado que o período médio das fases de ninfas e da longevidade das fêmeas foram, respectivamente, de 20 e 40 dias quando mantidas a uma temperatura entre 17 a 20 °C (NOACK; ROSE, 2007). Soliman (2010) menciona que as temperaturas adequadas ao desenvolvimento e à reprodução de *T. peregrinus* compreendem 22 e 26°C e que as espécies *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake e *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden são as mais adequadas entre as espécies testadas para o desenvolvimento e para a reprodução desse inseto. O autor observou ainda que, nessas espécies, ocorreram as maiores taxas de oviposição com 75 e 71,75 ovos/fêmea, respectivamente *E. grandis* e *E. urophylla*. No Rio Grande do Sul, em condições de campo, foi possível observar que o maior pico populacional de *T. peregrinus* ocorre no período de verão (janeiro a março), com temperaturas médias de 25°C e baixa umidade relativa do ar (GARLET et al., 2012).

A partir da distribuição global potencial de *T. peregrinus*, utilizando dados de temperatura, foi possível supor que o inseto é capaz de sobreviver e se desenvolver em áreas com temperaturas variando entre 4 e 34 °C (SAAVEDRA et al., 2015), o que poderia explicar sua ampla distribuição mundial estando presente em mais de 20 países (EPPO, 2019) e prever novas invasões (SAAVEDRA et al., 2015). Nadel et al. (2015) relataram que a temperatura de 12,2 °C foi o valor térmico crítico mínimo para o desenvolvimento do ovo e de 3,8 °C ± 1,9 °C, para sobrevivência de adultos de *T. peregrinus*. Um fato importante observado pelos autores é que os adultos, após a exposição de curta duração a temperaturas dentro da faixa crítica mínima e vice-versa, conseguiram retornar e se recuperar a temperaturas mais altas. A temperatura ambiente afeta o desenvolvimento, a fertilidade, a longevidade e a mortalidade de *T. peregrinus*, uma vez que, com o aumento da temperatura, ocorrem períodos mais curtos de desenvolvimento e maiores taxas de crescimento populacional (BARBOSA et al., 2019).

A precipitação é outro fator que pode afetar diretamente o crescimento populacional de *T. peregrinus*, uma vez que lava as folhas dos hospedeiros ou, indiretamente, reduz o teor de

nitrogênio das folhas e promove o crescimento de fungos patogênicos (MARTÍNEZ et al., 2014b).

É importante ressaltar que *T. peregrinus* possui uma elevada capacidade de adaptação, visto que pode sobreviver em condições climáticas diferentes (PEREIRA et al., 2013).

1.2.4 *Thaumastocoris peregrinus*: dispersão e hospedeiros do gênero *Eucalyptus*

T. peregrinus já foi reportado em mais de 20 países (EPPO, 2019), isso demonstra o seu alto potencial invasivo e a sua capacidade de adaptação às condições ambientais e aos hospedeiros do gênero *Eucalyptus* ou *Corymbia* encontrados nos locais de invasão. Na Austrália, sua zona de origem, 14 espécies de eucaliptos foram mencionadas como hospedeiras de *T. peregrinus*, destacando-se as espécies *E. scoparia* e *Eucalyptus nicholii* Maiden & Blakely como as mais suscetíveis à infestação (NOACK; COVIELLA, 2006).

Sua primeira introdução fora da Austrália foi reportada, na África do Sul, no ano de 2003, sendo que mais de 20 espécies de eucaliptos foram citadas como suscetíveis ao ataque de *T. peregrinus* (equivocadamente identificado como *T. australicus*), entre elas: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Eucalyptus viminalis* Labill., *Eucalyptus microcorys* F. Muell, *E. nicholii*, *E. scoparia*, *Eucalyptus tereticornis* Sm., incluindo aqueles que são comercialmente utilizados como é o caso do híbrido *E. camaldulensis* × *E. grandis* (JACOBS; NESER, 2005). As áreas de dispersão dentro da África aumentaram e *T. peregrinus* foi reportado em Moçambique, Zimbábue, Malawi, Kenya, Uganda, Tanzania, Rwanda e Ilha de Reunion (EPPO, 2019).

Na América do Sul, o primeiro país que registrou a ocorrência de *T. peregrinus* foi a Argentina em 2005, encontrado em Moreno, província de Buenos Aires (NOACK; COVIELLA, 2006). Analisando a preferência alimentar e de oviposição de *T. peregrinus*, em espécies de *Eucalyptus*, na Argentina, foi possível verificar que o inseto preferiu *Eucalyptus dunnii* Maiden, entre as espécies estudadas (*E. tereticornis*, *E. viminalis*, *Eucalyptus dunnii* e *E. grandis*) para alimentação e oviposição (SANTADINO; LILJESTHROM; COVIELLA, 2009).

No Brasil, *T. peregrinus* foi reportado pela primeira vez em 2008, no município de São Francisco de Assis, Estado do Rio Grande do Sul, encontrado em hospedeiros, como: *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. urophylla*, *E. viminalis* e os híbridos de *E. grandis* × *E. urophylla*, *E. grandis* × *E. camaldulensis*, *E. urophylla* × *E. camaldulensis* (WILCKEN et al., 2010). A biologia de *T. peregrinus* foi estudada em diferentes espécies e híbridos de eucaliptos,

a partir desse estudo, verificou-se que as espécies e os clones híbridos afetam o desenvolvimento e a capacidade reprodutiva do percevejo bronzeado, sendo que *E. urophylla* e *E. grandis* são as espécies consideradas mais adequadas para o desenvolvimento e reprodução (SOLIMAN et al., 2012). Entre 10 espécies de eucalipto, *E. dunnii* foi mencionada como a melhor espécie para o desenvolvimento, a oviposição e a longevidade de *T. peregrinus*, já as espécies *Eucalyptus bicostata* (Maiden, Blakely & Simmonds) J. B. Kirkp e *Eucalyptus globulus* Labill. afetaram negativamente o desenvolvimento, a oviposição e a longevidade (SMANIOTTO et al., 2017).

No Uruguai, sua primeira ocorrência foi em 2008 (MARTÍNEZ CROSA; SIMETO; BALMELLI, 2009; MARTÍNEZ; BIANCHI, 2010) e, ao analisar a história da vida e uma nova estratégia de criação em massa de *T. peregrinus*, Martínez et al. (2014a) encontraram maiores taxas de oviposição das fêmeas em *E. terenticornis* ao invés de *E. grandis*, essas espécies são muito abundantes no Uruguai juntamente com *E. camaldulensis*. No entanto, *E. grandis* provou ser um alimento subótimo para as ninfas de *T. peregrinus*, com maiores taxas de mortalidade, principalmente, nos estádios iniciais, e maior tempo de desenvolvimento (MARTÍNEZ et al., 2017).

No Chile, em 2009, *T. peregrinus* foi encontrado em Fundo Tapihue em árvores de *E. camaldulensis* (ovos, ninfas e adultos), posteriormente, constatando a presença de espécimes adultos em uma árvore de *E. globulus*. Um ano após sua detecção, foi encontrado em quebra-vento (shelterbelts), principalmente, formados por *E. camaldulensis* e não em plantações comerciais de *E. globulus* e *E. nitens* (MAYORGA et al., 2011).

Em 2010, no Paraguai, *T. peregrinus* foi encontrado na localidade de Caaguazú em árvores de *E. camaldulensis* sugerido assim que a espécie-praga possui preferência por essa espécie de eucalipto (DÍAZ; CORONEL; GODZIEWSKI, 2013).

Na Europa, o primeiro registro de *T. peregrinus* foi na Itália, no ano de 2011, encontrado em árvores de *E. camaldulensis*, *Eucalyptus gomphocephala* DC. Tuart, *Eucalyptus bridgesiana* R.T. Baker e também em 7 híbridos, sendo seis de *E. camaldulensis* X *E. bicostata* e um de *E. camaldulensis* X *E. grandis*, nos quais foram observados todos os estágios de desenvolvimento do inseto (LAUDONIA; SASSO, 2012).

Em Portugal, no ano de 2012, *T. peregrinus* foi encontrado, no Jardim Botânico da Universidade de Lisboa, em Lisboa, em árvores de *E. camaldulensis*, no qual 19 espécies do gênero eucalipto foram atacadas pelo inseto, no entanto, a maior incidência de ataque ocorreu nas espécies *E. camaldulensis*, *E. viminalis* e *Eucalyptus pauciflora* Sieber ex Spreng. (GARCIA et al., 2013). Em 2014, ocorreu seu registro no país vizinho, Espanha, onde foi

encontrado em árvores de *E. camaldulensis*, na região de Badajoz, sul país (VIVAS; CRESPO; JACINTO, 2015).

Na Oceania, *T. peregrinus* teve sua ocorrência registrada no ano de 2012, na Nova Zelândia, encontrado em *E. nicholii* durante monitoramento experimental (SOPOW; GEORGE; WARD, 2012). Em 2014, foi reportado na Ásia (Middle East), em Israel, sendo coletado em árvores de *E. camaldulensis* (NOVOSELSKY; FREIDBERG, 2016).

Seu primeiro registro, na América do Norte, foi no México, no ano de 2015, na Cidade do México, onde as espécies de eucaliptos mais plantadas são *E. camaldulensis* e *E. globulus*, principalmente em jardins, parques e ruas da cidade (JIMÉNEZ-QUIROZ et al., 2016). No entanto, as plantações comerciais, no México, compreendem pelo menos onze espécies (*E. camaldulensis*, *E. globulus*, *Eucalyptus creba* F. Muell, *E. dunnii*, *E. grandis*, *Eucalyptus macarthurii*, *E. nitens*, *Eucalyptus pellita* F. Muell, *Eucalyptus sideroxylon* A. Cunn. ex Woolls, *Corymbia torelliana* (F.Muell.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson, *E. urophylla* x *E. grandis*), e a maioria delas foram consideradas hospedeiras adequadas para *T. peregrinus* (JIMÉNEZ-QUIROZ et al., 2016; SAAVEDRA; WITHERS; HOLWELL, 2015; SOLIMAN et al., 2012). Nos Estados Unidos, *T. peregrinus* foi encontrado no ano de 2016 em *E. globulus* e *E. grandis*, porém no sul da Califórnia muitas árvores de *E. camaldulensis* e *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson são mencionadas como possíveis hospedeiras, devido à ampla distribuição (HODEL; ARAKELIAN; OHARA, 2016). Os últimos registros de ocorrência de *T. peregrinus*, no mundo, até o momento, foram na Albânia (HEYDEN, 2017) e, na Grécia, no *E. camaldulensis* (PETRACKIS, 2018), no ano de 2017.

De acordo com Saavedra, Withers e Holwell (2015), *T. peregrinus* foi reportado em 52 diferentes espécies de *Eucalyptus* ou híbridos comerciais em todo o mundo. *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* e *E. nicholii* são consideradas as espécies de eucaliptos mais adequadas para o desenvolvimento do percevejo bronzeado.

A preferência alimentar de *T. peregrinus* por espécies de eucalipto e a relação com o perfil de terpenos em seus óleos essenciais foram analisadas por Santadino et al. (2017b), e mencionadas em uma escala de preferência pelas espécies: *E. viminalis*, *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. dunnii*, *E. maidenii*, *E. globulus*. Além disso, foi observada uma correlação significativa entre as preferências alimentares e as concentrações de 1,8-cineol como repelente e ocimeno como estimulante alimentar.

1.2.5 *Thaumastocoris peregrinus*: danos e manejo

Estimativas realizadas por produtores florestais do Estado de São Paulo (Brasil) evidenciam que, entre 2010 e 2014, o dano estimado causado pelo ataque de *T. peregrinus* foi próximo a R\$ 280 milhões, considerando apenas perdas diretas em incremento anual de madeira e produção final (EMBRAPA, 2017b).

Em decorrência do seu hábito alimentar, que insere nas folhas e ramos finos, o aparelho bucal para sugar a seiva (WILCKEN, 2008), tanto no estágio ninfal quanto adulto, permitem a visualização de sintomas nas folhas, como o prateamento (clorose), seguido do bronzeamento e queda precoce das mesmas (JACOBS; NESER, 2005; SOLIMAN, 2010). Quando há alta densidade de *T. peregrinus* nos hospedeiros, pode ocorrer a redução da área fotossintética e, em alguns casos, dependendo da intensidade da infestação pode levar as plantas à morte (JACOBS; NESER, 2005).

Para o manejo da praga o controle químico e biológico são os mais estudados para *T. peregrinus*. Foram realizados, na Austrália, testes com inseticida sistêmico, imidacloprido em árvores infestadas com o percevejo bronzeado, as quais receberam microinjeções no tronco (NOACK et al., 2009). A abundância do inseto nos eucaliptos tratados diminuiu significativamente em comparação com os não tratados e o inseticida imidacloprido testado (SilvaShield®; Bayer Environmental Science) foi registrado na Austrália para o controle de *T. peregrinus*. Machado et al. (2016) estudaram, em laboratório, a eficácia de inseticidas sobre adultos e ninfas de *T. peregrinus*, sendo que todos os produtos foram eficientes no controle do inseto. No entanto, Lambda-cialotrina + thiametoxam (piretroide + neonicotinoide), destacou-se com 100% de eficiência de controle, após 24 horas de exposição nos dois períodos de avaliação. A mortalidade de ninfas e adultos do percevejo bronzeado pelos inseticidas à base de tiametoxam, acefato e tiametoxam + lambdacialotrina foram eficientes no controle de *T. peregrinus* no Brasil (SOLIMAN, 2014). No Brasil, os inseticidas Capture 400 EC (piretroide) e Sperto (neonicotinoide + piretroide) estão registrados para controle de *T. peregrinus* (AGROFIT, 2019).

Já o controle biológico é visto como o mais indicado para o controle *T. peregrinus*, devido à descoberta de potenciais inimigos naturais da mesma zona de origem, como *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) e *Stethynium* sp. Enock (Hymenoptera Mymaridae) (LIN; HUBER; LA SALLE, 2007). O parasitoide de ovos *C. noackae* foi proposto a um programa de controle biológico e considerado promissor (NADEL et al., 2012; NADEL; NOACK, 2012). Identificado a partir de espécimes coletados em uma colônia de criação de *T. peregrinus* na Austrália, *C. noackae* é o inimigo natural, mais estudado no mundo (LIN; HUBER; LA SALLE, 2007) onde chegou a 25% no campo e 21% em

condições de laboratório; já, na África do Sul, chegou a 32% também em laboratório (MUTITU et al., 2013).

A importação e a liberação do parasitoide *C. noackae* já ocorreu na Argentina (DELL'ARCIPRETE, 2016), no Brasil (IPEF, 2012), no Chile (MAYORGA et al., 2014) e no Uruguai (MARTÍNEZ; GONZÁLEZ; DICKE, 2018). No Chile, o controle oficial de *T. peregrinus* teve início quando foi confirmada a presença do inseto pelo Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), que emitiu a Resolução nº 4.798, a qual declarou o controle obrigatório da praga, em que foram estabelecidas medidas fitossanitárias a fim de reduzir a dispersão e o estabelecimento em áreas não afetadas, especialmente entre as regiões de Maule e La Araucanía (SAG, 2009; MAYORGA et al., 2011). Esse país foi o pioneiro no mundo a realizar a liberação de *C. noackae* no ano de 2010, na localidade de Monumento a Manuel Rodríguez (região metropolitana) (MAYORGA et al., 2011). No entanto, antes da liberação, o parasitoide passou pelo processo de quarentena, de acordo com as normas de biossegurança presente na Resolução 2.229/01 Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (MAYORGA et al., 2014).

No Brasil, foi emitido para empresas florestais um alerta fitossanitário pelo Programa de Proteção Florestal (PROTEF) indicando o possível risco de invasão de *T. peregrinus* nas plantações localizadas em regiões fronteiriças (TORDIN, 2009). Em 2012, ocorreu a liberação do parasitoide em uma fazenda no município de Paraopeba (MG) (IPEF, 2012). Após um ano de sua liberação, *C. noackae* foi encontrado parasitando ovos de *T. peregrinus* em árvores de eucalipto, evidenciando que essa espécie conseguiu se reproduzir e dispersar a uma distância de mais de 10 km do seu ponto inicial de liberação (BARBOSA et al., 2017). De acordo com Sanches e Silva (2015), antes da sua invasão, o percevejo bronzeado não era regulamentado como praga quarentenária, porém a regulamentação desse inseto como praga quarentenária em nível mundial é uma tarefa quase impossível devido à rápida disseminação.

No Uruguai, no ano de 2013, houve a liberação de *C. noackae* e posterior criação do parasitoide a partir dos primeiros espécimes que foram introduzidos no Brasil pelo Programa de Proteção Florestal do Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF) (INIA, 2013) mais tarde, na Argentina, *C. noackae* foi liberado em 2014-2016 (Castelar, 25 de Mayo e Jáuregui) (CUELLO et al., 2017). O parasitoide proveniente do Uruguai foi multiplicado na Quarentena do Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA) (ANDORNO et al., 2019).

No Paraguai, Díaz, Coronel e Godziewski (2013) ponderam que a detecção de *T. peregrinus* serve de alerta para a necessidade de implementar medidas de controle fitossanitário, pois muitas pragas acompanham e se disseminam com o movimento de material vegetal introduzido sem os controles fitossanitários adequados.

No México, *T. peregrinus* foi adicionado à lista de pragas e, de acordo com Jiménez-Quiroz et al. (2016), há a necessidade de iniciar o sistema nacional de monitoramento de surtos de pragas em árvores de eucalipto a fim de identificar a sua dispersão e impacto e evitar perdas econômicas nas áreas comerciais e urbanas do país.

Em 2016, *C. noackae* foi importado para Malawi (África) e liberado em áreas infestadas por *T. peregrinus* (CHILIMA et al., 2018). No ano seguinte, em 2017, *C. noackae* foi importado da África do Sul para Israel, sendo relatados altos índices de parasitismo das colônias do inseto-praga em vários locais e pouquíssimos indivíduos foram observados no verão de 2019 (MENDEL; PROTASOV, 2019).

Além do controle com a vespa *C. noackae*, outras possibilidades de controle biológico foram avaliadas. No Brasil, foi observada a predação de ninfas e adultos de *T. peregrinus* por ninfas do percevejo *Supputius cincticeps* (Stal) (Hemiptera: Pentatomidae) (SOUZA et al., 2012). Larvas de *Chrysoperla externa* Hagen, 1861 (Neuroptera: Chrysopidae) foram alimentadas com ninfas de *T. peregrinus*, demonstrando que esse crisopídeo possui potencial no controle da praga invasiva (BARBOSA et al., 2010). Também foi observada predando ninfas e adultos de *T. peregrinus* em campo a espécie *Atopozelus opsimus* Elkins (Hemiptera: Reduviidae) (DIAS et al., 2014). Na Argentina, foram encontradas duas espécies de predadores de *T. peregrinus*, *Atachelus cinereus* Fabricius (Hemiptera: Reduviidae) e *Podisus australis* Berg, 1879 (Hemiptera: Pentatomidae) (SANTADINO; VIRGALA; COVIELLA, 2013). Em Portugal, foi reportada a predação de adultos de *T. peregrinus* por *Hemerobius bolivari* Banks, 1910 (Neuroptera: Hemerobiidae) (GARCIA et al., 2013).

Alguns fungos entomopatogênicos são citados para o controle biológico de *T. peregrinus*, como o caso de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (SOLIMAN et al., 2019) e *Zoophthora radicans* (MASCARIN et al., 2012). *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. são mencionados como patogênicos ao percevejo bronzeado e associados a epizootias em campo (SOLIMAN, 2014). O fungo *B. bassiana* foi encontrado no Brasil infectando naturalmente *T. peregrinus* (LORENCETTI et al., 2017). Alguns isolados de *B. bassiana* e *Isaria* sp. foram testados sobre adultos do percevejo bronzeado sendo patogênicos (LORENCETTI et al., 2018).

No Uruguai, fungos entomopatogênicos como *Beauveria*, *Fusarium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Purpureocillium* e *Simplicillium* que infectavam *T. peregrinus* naturalmente no campo foram isolados. O isolado FI 2403 de *B. bassiana* foi selecionado como candidato promissor ao desenvolvimento de uma formulação comercial para controlar populações de *T. peregrinus* (CORALLO et al., 2019).

Os produtos inseticidas de origem botânica Rotenat, Compostonat, Rotenat CE e Topneem apresentam efeito inseticida sobre *T. peregrinus* (LORENCETTI et al., 2015). Também foram realizados testes com os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae), *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) e *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Os óleos demonstraram efeito inseticida sobre *T. peregrinus* na fase adulta e o óleo essencial de *E. uniflora* proporcionou efeito inseticida sobre ovos, ninfas de 3º ínstar e adultos sendo seletivo ao parasitoide de ovos *C. noackae* quando aplicado pós-parasitismo (STENGER, 2017).

Em um estudo mais recente realizado no Brasil, foi testada a eficácia de inseticidas químicos vs entomopatogênicos, via aplicação aérea em plantações de eucalipto para o controle de *T. peregrinus* (WILCKEN et al., 2019). O controle de *T. peregrinus* foi semelhante com inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos, sendo que a eficiência dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, em concentrações baixas, bem como seu alto período residual mostram potencial para controlar ninfas e adultos de *T. peregrinus* em plantações de eucalipto, com baixo impacto em outros organismos (por exemplo, parasitoides e predadores).

1.2.6 Aplicações de marcadores moleculares mitocondriais em entomologia

Devido às limitações encontradas com a utilização de marcadores morfológicos, fisiológicos e citológicos para a avaliação da diversidade genética e dinâmica populacional, foram desenvolvidos os marcadores baseados em DNA (CRUICKSHANK, 2002). Um marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPLAGIA, 1998); e são neutros para o estágio de desenvolvimento, *status* fisiológico e influências ambientais (BLACK et al., 2001; HECKEL, 2003).

Os diferentes marcadores moleculares possuem capacidade de analisar, sem a influência do ambiente, genomas de interesse, desse modo, as informações obtidas sobre a diversidade genética e a frequência gênica populacional são mais precisas (HARTL; CLARK, 1989; OUBORG; PIQUOT; VAN GROENENDAEL, 1999). As principais aplicações dos marcadores moleculares na área de entomologia podem ser: identificação de pragas de agentes de controle biológico, compreensão da estrutura de populações, filogeografia e rotas de invasão de pragas exóticas, assim como conhecimento da relação praga-hospedeiro (MENDONÇA et al., 2015).

A identificação da espécie de inseto-praga, que está ocasionando danos tanto em culturas agrícolas como em plantios florestais, é fundamental para a adoção de medidas para o controle do inseto-alvo. Esse processo, comumente é realizado por especialistas, que fazem

comparação de espécimes adultos disponíveis em museus a partir da observação de características morfológicas (LIMA, 1955; CORDEIRO et al., 2019). Entretanto, o código de barra de DNA (DNA *barcoding*) é um método de taxonomia molecular, que analisa as variações na sequência de DNA da região do gene COI, do genoma mitocondrial, como um identificador único para cada espécie (ROSA; SONODA, 2010), sendo que essa foi a região considerada como código de barras (HEBERT et al., 2003). A herança do genoma mitocondrial, via de regra, é materna (com algumas exceções), o conteúdo e a ordem dos genes são extremamente conservados entre espécies e a taxa de mutação é considerada alta em relação à taxa de um gene cópia única do genoma nuclear (SOLFERINI; SELIVON, 2012).

Na área da defesa fitossanitária, o DNA *barcoding* ou código de barras é principalmente utilizado em estudos de estrutura genética de pragas invasivas, o que possibilita dar suporte técnico para a definição de estratégias de prevenção e controle desses organismos (MENDONÇA et al., 2015; ARNEMANN et al., 2016; ARNEMANN et al., 2019). Assim, os métodos moleculares podem ser uma técnica para complementar a caracterização morfológica, ampliando as possibilidades de identificação das espécies, desde sua forma imatura até adulto, assegurando maior precisão e rapidez no processo de identificação e podem esclarecer a variabilidade intra e interespecífica da espécie (MENDONÇA et al., 2015; CORDEIRO et al., 2019).

O código de barras de DNA possui uma ampla aplicabilidade podendo ser utilizado, desde a detecção de espécies invasivas e nativas no ecossistema, espécies recentemente descritas, revisões taxonômicas, detecção de cadeias alimentares e as relações entre predador-presa, combate ao comércio ilegal de espécies ameaçadas de extinção, até a detecção de madeira ilegal, entre outras (COSTION et al., 2011). Estudos filogeográficos têm sido realizados visando elucidar processos de invasão de pragas, como é o caso do ácaro *Raioella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) (DOWLING et al., 2012) e para determinar se a invasão aconteceu em apenas um ou mais eventos de introdução (TAY et al., 2017).

Na área de Entomologia Florestal, estudos de identificação, diversidade genética de populações, descoberta de espécies crípticas e de rotas de introdução de pragas-invasivas foram realizados para alguns insetos-praga utilizando DNA mitocondrial (mtDNA), tais como: para o gênero *Pinus*, destaca-se *Sirex noctilio* Fabricius (1793) (Hymenoptera: Siricidae) (BOISSIN et al., 2012); para o gênero *Eucalyptus* as espécies *L. invasa*, *Gonipterus* spp. (MAPONDERA et al., 2012), *G. brimblecombei* (SANTOS, 2019) e *T. peregrinus* (NADEL et al., 2010).

Para *L. invasa*, foi verificado que sua dispersão envolveu duas linhagens geneticamente distintas, as quais foram identificadas com base em análises molecular de espécimes e

filogenética (NUGNES et al., 2015). Analisando espécimes de *G. brimblecombei*, Santos (2019) concluiu que Brasil e Portugal possuem o mesmo haplótipo e que a rota de invasão dessa espécie nesses países está interligada.

Para *T. peregrinus*, a partir de sequências do gene COI de populações nativas na Austrália e de comparações com espécimes das plantações de eucaliptos sul-africanos e sul-americanos foi possível verificar a presença de oito haplótipos (linhagens maternas de *T. peregrinus*) entre as populações analisadas, sendo que o haplótipo A estava presente na Austrália e na América do Sul (Argentina, Brasil e Uruguai) e os haplótipos D e G estavam na Austrália e na África do Sul (NADEL et al., 2010).

A partir dos dados de DNA *Barcoding* disponíveis nas bibliotecas *online* National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Barcode of Life Data System (BOLD Systems), foi realizado um levantamento para verificar quantas espécies de insetos-praga invasivos, que têm como hospedeiro o gênero eucalipto, possuem informações depositadas do gene COI baseando-se na lista adaptada de Hurley et al. (2016) (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação de alguns insetos-praga invasivos que possuem informações genéticas de DNA *barcoding* disponíveis em: National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Barcode of Life Data System (BOLD Systems).

Insetos-praga invasivo	NCBI	BOLD Systems
	Número de sequências	Número de sequências
<i>Blastopsylla occidentalis</i> Taylor, 1985	12	9
<i>Ctenarytaina eucalypti</i> (Maskell, 1980)	26	43
<i>Ctenarytaina longicauda</i> Taylor, 1987	3	3
<i>Ctenarytaina peregrina</i> Hodkinson, 2007	0	0
<i>Ctenarytaina spatulata</i> Taylor, 1997	16	18
<i>Epichrysocharis burwelli</i> Schauff	0	0
<i>Glycaspis brimblecombei</i> (Moore, 1964)	13	13
<i>Gonipterus platensis</i> (Marelli, 1926)	42	42
<i>Gonipterus pulverulentus</i> Lea, 1897	13	13
<i>Gonipterus</i> sp.2	2	23
<i>Leptocybe invasa</i> Fisher & La Salle, 2004	692	516
<i>Ophelimus maskelli</i> (Ashmead, 1900)	12	20
<i>Ophelimus</i> sp.	34	0
<i>Paropsisterna gloriosa</i> (Blackburn, 1899)	0	0
<i>Phoracantha recurva</i> Newman, 1842	6	11
<i>Phoracantha semipunctata</i> (Fabricius, 1775)	3	10
<i>Selitrichodes globulus</i> La Salle & Gates, 2009	0	0
<i>Spondylaspis</i> c.f. <i>plicatuloides</i> (Froggatt, 1900)*	0	5
<i>Thaumastocoris peregrinus</i> Carpintero & Dellapé, 2006	22	18
<i>Trachymela m-fuscum</i> (Boheman, 1859)	0	0
<i>Trachymela sloanei</i> (Blackburn, 1896)	0	0
<i>Trachymela tincticollis</i> (Blackburn, 1896)	0	0

* Os dados encontrados foram referentes à espécie *Spondylaspis plicatuloides*. Dados pesquisados em dezembro de 2019.

1.2.7 Processo de invasão de pragas

Os impactos produzidos por invasões biológicas nos ecossistemas invadidos são substanciais e complexos (SIMBERLOFF, 2013). O conhecimento dos estágios do processo de invasão de pragas, assim como os fatores que os influenciam são importantes para a adoção de medidas que evitem o progresso do inseto-praga, além de, no mínimo, três estágios do processo de invasão por espécies não-nativas, devem ocorrer antes que elas possam causar impactos econômicos ou ecológicos, sendo eles: transporte, estabelecimento e disseminação (NAVIA, 2015).

No transporte, as invasões iniciam-se a partir de um conjunto de indivíduos ou até mesmo por um único indivíduo (organismos partenogênicos), que são retirados de sua área de ocorrência (região doadora) e, posteriormente, transportados e liberados em uma nova área (região receptora) (LOCKWOOD; HOOPES; MARCHETTI, 2007). Quanto maior o número de indivíduos da mesma espécie liberados em uma região receptora, maior será a perspectiva de sobrevivência dessa população (NAVIA, 2015).

No estágio de estabelecimento, a espécie invasiva sofre diretamente as influências dos fatores bióticos e abióticos, entretanto, quando ela consegue estabelecer uma população autossustentável, começa sua expansão da área de ocorrência, aparecendo em novos locais e interagindo com as espécies presentes na comunidade (NAVIA, 2015; LOCKWOOD; HOOPES; MARCHETTI, 2007).

Após o estabelecimento, ocorre o estágio de disseminação quando o crescimento populacional e os meios de dispersão forem fatores determinantes para esse estágio (CASWELL; LENSINK; NEUBERT, 2003; LOCKWOOD; HOOPES; MARCHETTI, 2007). Estima-se que apenas 5% a 20% das espécies não nativas tornam-se invasoras (WILLIAMSON, 1996), isto é, conseguem passar pelos três estágios e ocasionar algum dano econômico.

1.2.8 Medidas de biossegurança

A biossegurança está emergindo como uma das questões mais importantes que a comunidade internacional enfrenta (COCK, 2003), devido à aplicabilidade direta para a segurança alimentar, à conservação do meio ambiente (incluindo a biodiversidade) e à sustentabilidade da agricultura (FAO, 2001).

As medidas de biossegurança devem ser analisadas antes do processo de invasão, pois visam proteger a economia, o meio ambiente e a sociedade das introduções intencionais ou acidentais de pragas exóticas invasivas que podem colocar o sistema em risco (VENETTE, 2015). Ações apropriadas devem ser realizadas em cada estágio do processo de invasão com o intuito de barrar o avanço para o estágio sucessivo, como, por exemplo, durante o transporte, podem ser utilizadas ações de prevenção; se houver sucesso no transporte, as ações de detecção precoce e de contenção devem ser aplicadas para tentar evitar o seu estabelecimento; se a praga já estiver disseminada, ações de manejo devem ser adotadas a fim de minimizar os impactos no sistema (impactos ecológicos, socioeconômico, entre outros) (NAVIA, 2015).

Além das medidas citadas, existe a Norma Internacional de Medidas Fitossanitárias, na qual as normas são preparadas como parte do programa global de política e assistência técnica em quarentena vegetal da Organização para a Agricultura e a Alimentação (FAO) (MAPA, 2017). É uma norma internacional adotada pela Comissão de Medidas Fitossanitárias (CMF), estabelecida pela Convenção Internacional para a Proteção dos Vegetais (CIPV), que visa, a partir de um tratado internacional, evitar a introdução e a propagação e de pragas (plantas e produtos derivados), promovendo medidas apropriadas para controlá-las (MAPA, 2017; PALMA; ALENCAR, 2015). A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) reconheceu a necessidade de impedir a introdução, controle ou erradicação das espécies exóticas que ameaçam ecossistemas, habitats ou espécies e adotou um acordo suplementar à Convenção, conhecido como Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, o qual entrou em vigor em 2003 (COCK, 2003).

Em 1989, foi criado o Comité de Sanidad Vegetal (COSAVE), uma organização regional de Proteção Fitossanitária (ORPFs), que atua na resolução de problemas fitossanitários de interesse comum aos países membros e fortalece a integração regional. O convênio foi assinado pelos governos da Argentina, do Brasil, do Chile, do Paraguai e do Uruguai e, em 2013, o Peru se tornou membro da organização. A Bolívia está participando das atividades da organização e realizando os trâmites finais do processo de adesão formal (COMITÉ DE SANIDAD VEGETAL, 2017). Segundo dados da FAO (2009), na América Latina, o número de espécies de insetos-praga introduzidos é praticamente igual ao de espécies-praga nativas.

A disponibilidade de informações sobre a dispersão de espécies invasivas é importante para a predição da velocidade de expansão da mesma, esse é um fator crucial para a adoção de medidas de manejo efetivas que visa evitar sua disseminação (LARUE et al., 2011). O escopo geográfico das medidas de biossegurança também deve ser considerado, pois muitos países estão cada vez mais envolvidos no estabelecimento de estruturas regulatórias que visam

proteger bens comuns globais e responder a riscos cada vez mais globalizados (COCK, 2003) para tentar retardar a dispersão de insetos-praga.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular e avaliar a diversidade genética de populações de *T. peregrinus* de 11 países a partir do uso do primeiro fragmento do gene mitocondrial COI.

1.3.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, cita-se:

(I) informar a ampliação de ocorrência de *T. peregrinus*, na Espanha, com ocorrência em Madri a fim de inferir possíveis rotas de invasão no país;

(II) analisar a diversidade genética de *T. peregrinus* em 11 países do novo e do velho mundo, com o propósito de apresentar ao Chile, ao Paraguai, ao México, aos Estados Unidos, à Espanha, a Portugal e a Israel a primeira caracterização molecular das populações;

(III) inferir possíveis rotas de invasão de *T. peregrinus* nesses países.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 Obtenção dos espécimes de *Thaumastocoris peregrinus*

Os espécimes de *T. peregrinus* foram obtidos a partir solicitações e cooperação com pesquisadores da América do Sul, da América do Norte, da Europa e da Ásia. A coleta dos indivíduos ocorreu, na maioria das vezes, em mais de uma árvore de *Eucalyptus* spp. (principalmente em *E. camaldulensis*), localizadas em parques, em arborização urbana, às margens de rodovias, em plantações, em quebra-ventos, entre outros. Ninfas e adultos de *T. peregrinus* foram retirados das folhas de eucaliptos com auxílio de pincel e, posteriormente, armazenados em tubos do tipo *Eppendorf* contendo álcool acima de 90% ou álcool absoluto. Alguns espécimes foram coletados em criações de laboratório, porém o procedimento de retirada e armazenamento dos indivíduos foram os mesmos.

As amostras com os espécimes de *T. peregrinus* mortos e armazenados em álcool foram enviadas, via correio, para a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), localizada no município de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil e levadas para o Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Manejo Integrado de Pragas (LabMIP) da UFSM, no qual permaneceram em freezer, a uma temperatura de -20°C até a extração do DNA.

Para as coletas realizadas no Brasil, foi solicitada a licença de coleta para o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), registrada sob o número 55053-4. Ainda, de acordo com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019), as pesquisas realizadas com as espécies exóticas listadas em instruções normativas (Instrução Normativa nº 16, de 4 de junho de 2019) estão isentas do cadastro no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético (SISGEN) e os produtos desenvolvidos não têm a obrigação de repartir benefícios gerados pela exploração econômica do produto. *T. peregrinus* é mencionado na lista, assim está isento do cadastro no SISGEN. Para os demais países, foram cumpridas as normativas para coleta e envio das amostras.

1.4.2 Extração, amplificação e sequenciamento do mtDNA de *Thaumastocoris peregrinus*

O DNA genômico foi extraído de adultos (machos e fêmeas) de *T. peregrinus* utilizando o Kit QIAGEN DNeasy Blood & Tissue (protocolo do fabricante) a partir da maceração total individual de cada espécimen. A qualidade do DNA extraída foi verificada com o auxílio de

eletroforese em gel de agarose 1% com 22,2 ng μl^{-1} de marcador molecular Nancy-520 (Sigma-Aldrich).

Posteriormente, um fragmento do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial foi amplificado com o Termociclador modelo Mastercycler Pro S (Eppendorf, Germany) a partir do método de Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Para as reações de PCR, foram incluídas em cada amostra 1,25 μL de buffer; 7,0 μL de água ultra pura (H_2O UP), 0,625 μL de dntp's (Timina, Guanina, Citosina e Adenina); 1,0 μL de cada primer (5,0 μL primer + 95,0 μL de H_2O UP) Tp2390F (5'ACCCGAGCATACTTTACTTC) e Tp2937R (5'ATTGTGGCTCGTTTTGATA) desenvolvidos por Nadel et al. (2010); 0,220 μL Taq DNA Polymerase JumpStart™ (Sigma-Aldrich); 1 μL de DNA genômico. Cada amostra totalizou 12,095 μL de produto de PCR.

O ciclo da PCR foi adaptado da metodologia adotada por Nadel et al. (2010) e constou das seguintes etapas: desnaturação inicial a 98 °C por 30s; 30 ciclos de 95 °C por 30s, 48° por 45s; 72° por 45s e alongamento final de 68° por 10 min. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese e, ao término do processo, foram colocadas sob UV para a visualização do gel de agarose (2% agarose, 1% com 22,2 ng μl^{-1} de marcador molecular Nancy-520). Os produtos das PCRs foram enviados para o laboratório ACTGene Análises Moleculares LTDA (Alvorada/RS) para o sequenciamento.

1.4.3 Processamento das sequências de *Thaumastocoris peregrinus*

De posse das sequências de nucleotídeos do fragmento amplificado, as mesmas foram processadas utilizando o pacote Staden Package 2.0 (programas Pré-GAP e GAP4) (STADEN; BONFIELD, 2000) e alinhadas no software CLC Sequence Viewer versão 7. Após o alinhamento, para cada sequência, foi realizado um BLAST para confirmação da espécie e do haplótipo.

Os dados de mtDNA de *T. peregrinus* encontrados nesse estudo foram combinados com outras sequências disponíveis no GenBank para essa espécie-praga (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) e também com os dados de mtDNA gentilmente disponibilizados por Lo et al. (2019) em seu estudo de populações de *T. peregrinus* na Austrália. A partir da compilação desses dados, uma rede de haplótipos foi gerada no programa PopArt (LEIGH; BRYANT, 2015) para analisar o número e a distribuição dos haplótipos das populações dos países estudados.

Possíveis rotas de introdução de *T. peregrinus* foram inferidas a partir dos dados de mtDNA, datas de registros de ocorrência, rotas marítimas (mediterrâneo), entre outros. Mais detalhes estão inseridos nos artigos 1 e 2.

2 ARTIGO 1 - THE ONGOING DISPERSION OF THE EUCALYPTUS BRONZE BUG (*Thaumastocoris peregrinus*) IN SPAIN



Forest Systems
28 (3), eSC03, 7 pages (2019)
eISSN: 2171-9845

<https://doi.org/10.5424/fs/2019283-15353>

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

SHORT COMMUNICATION

OPEN ACCESS

The ongoing dispersion of the Eucalyptus bronze bug (*Thaumastocoris peregrinus*) in Spain

Dayanna do Nascimento-Machado (do Nascimento-Machado, D)^{1,2}, Ervandil Corrêa-Costa (Corrêa-Costa, E)^{1,2}, Clérison Régis Perini (Régis Perini, C)², Gustavo Andrade-Ugalde (Andrade-Ugalde, G)², Mateus Alves-Saldanha (Alves-Saldanha, M)², João Vitor Leitão (Vitor Leitão, J)², Tiago Lovato-Colpo (Lovato-Colpo, T)², Jonas André Arнемman (André Arнемman, J)² and Adolfo Cordero-Rivera (Cordero-Rivera, A)³

¹Postgraduate Program in Forest Engineering, Federal University of Santa Maria, Roraima avenue, 1000, building 44, room 5255, 97105-900, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. ²Crop Protection Department, Federal University of Santa Maria, Roraima avenue, 1000, building 42, room 3223, 97105-900, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. ³Laboratory of Evolutionary and Conservation Ecology, Universidade de Vigo, E.E. Forestal, Campus Universitario 36005, Pontevedra, Galiza, Spain.

Abstract

Aim of study: *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero & Dellapé, 2006) is notable for its dispersion potential, and for its damage to a wide range of hosts of the genus *Eucalyptus*. The intense movement of people and cargo between continents contributes to the success of its geographical distribution on the globe and hinders the adoption of preventive measures. The celerity and precision in the identification of *T. peregrinus*, as well as its invasion and dispersion routes are fundamental for the implementation of measures to prevent new invasions.

Area of Study: Park of Retiro in the community of Madrid, Spain, where *T. peregrinus* is present.

Material and methods: We analyzed a fragment of COI mtDNA gene in *T. peregrinus* specimens, using samples collected at a public park in Madrid urban area, to study the possible pathways of incursion of this insect in Spain. The goal was achieved using molecular tools, with PCR amplification of partial mtDNA COI and sequencing the fragment, which is used as a barcode of life for identification at species level. Species identity was confirmed using the database in GenBank.

Results: The results confirms that the specimens found in Madrid are *T. peregrinus*, and all are from the same maternal lineage.

Research highlights: We present the first molecular information of *T. peregrinus* population present in Spain, and suggest and discuss possible routes of incursion of this pest.

Additional keywords: Invasive pest; DNA Barcoding; Invasion Routes; Forest Entomology.

Authors' contributions: Conceived and designed the work: DNM, ECC, CRP, JAA, ACR. Performed the experiments and analyzed the data: DNM, ACR, CRP, JVL, MAS, GAU. Contributed materials/analysis tools: CRP, GAU, TLC. All authors assisted in writing and reviewed the article.

Citation: Nascimento-Machado, D.-do, Corrêa-Costa, E., Perini, C.-R., Andrade-Ugalde, G., Alves-Saldanha, M., Leitão, J.-V., Lovato-Colpo, T., Arнемman, J.-A., Cordero-Rivera, A. (2019). The ongoing dispersion of the Eucalyptus bronze bug (*Thaumastocoris peregrinus*) in Spain. *Forest Systems*, Volume 28, Issue 3, eSC03. <https://doi.org/10.5424/fs/2019283-15353>

Received: 24 Jun 2019. **Accepted:** 31 Oct 2019.

Copyright © 2019 INIA. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-by 4.0) License.

Funding agencies/Institutions	Project / Grant
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil	Scholarship to the first author in the Sandwich Doctorate Program Abroad - 88881.187250/2018-01
Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities	CGL-2018-096656-B-100, including FEDER funds.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Correspondence should be addressed to Dayanna do Nascimento-Machado: dayanasmac@gmail.com

Introduction

The genus *Eucalyptus* is widely used in the world for fast-growing tree plantations, covering large areas, which are increasingly attacked by a diverse array of invasive pests, most of them obviously originary from Australia (Hurley *et al.*, 2016). These insect pests produce significant reductions of the productivity

of the plantations and widespread rapidly over many regions, as is the case of *Gonipterus scutellatus* complex, including *Gonipterus platensis* (Marelli, 1926) (Coleoptera: Curculionidae) and *Gonipterus pulverulentus* Lea, 1897 (Coleoptera: Curculionidae) (Mapondera *et al.*, 2012); as well as species of Hymenoptera order *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle, 2004 (Hymenoptera: Eulophidae) (Zheng *et*

al., 2014) and species of Hemiptera order, comprising *Glycaspis brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Aphalaridae) (Karaca *et al.*, 2017) and *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero & Dellapé, 2006) (Hemiptera: Thaumastocoridae).

Thaumastocoris peregrinus stands out for causing severe damage to more than 50 species of *Eucalyptus*, including hybrids (Saavedra *et al.*, 2015b). Aspects such as its short life cycle and the high reproductive potential of females allow rapid population growth of the pest (Nadel *et al.*, 2015; Soliman *et al.*, 2012). When the infestation is severe, there is a significant reduction of leaves in the canopy and in some cases may lead to the death of the attacked trees, due to the feeding process being in chloroplasts and other cellular contents, leading to chlorosis (Santadino *et al.*, 2017). Thus, there is a reduction of the photosynthetic area of the plant and consequently its growth (Jacobs & Naser, 2005). The expansion of occurrence of *T. peregrinus* includes several countries: South Africa (Jacobs & Naser, 2005), Argentina (Carpintero & Dellapé, 2006), Zimbabwe (Chilima, 2007), Brazil (Wilcken, 2008), Uruguay (Martínez & Bianchi, 2010), Chile (Mayorga *et al.*, 2011), New Zealand (Sopow *et al.*, 2012), Paraguay (Díaz *et al.*, 2013), Italy (Laudonia & Sasso, 2012; Carapezza, 2014), Portugal (García *et al.*, 2013), Spain (Vivas *et al.*, 2015), Reunion Island (Streito *et al.*, 2016), Israel (Novoselsky & Freideberg, 2016), Mexico (Jiménez-Quiroz *et al.*, 2016), United States of America (Hodel *et al.*, 2016), Albania (Heyden, 2017) and Greece (Petrakis, 2018). In Spain, *T. peregrinus* had been recorded at Barbaño, province of Badajoz in 2014 (Vivas *et al.*, 2015). The expansion of the species continues, and in this paper, we record it from the central area of Spain, at Madrid.

Based on the potential global distribution of the Bronze bug, European countries present localities with optimal climate conditions to its occurrence and dispersion (Saavedra *et al.*, 2015a). However, there is no information about the genetic constitution of populations of *T. peregrinus* in Spain, even if this information is extremely important to know the diversity and possible routes of invasion, which are determined by the genetic signatures of the populations present on site. In this context, this work aims to report the expansion of *T. peregrinus* occurrence area in Spain and to characterize, using molecular analysis, the genetic structure and possible invasion routes of the population found in Madrid, Spain.

Materials and Methods

Specimens sampling

Bronze bug specimens were sampled around Spain from November 2018 to April 2019, in Galiza region, including Vigo, Pontevedra, Santiago de Compostela and Baiona, and also in Barcelona and in Madrid. Galiza region have optimal climate conditions to a potential distribution of *T. peregrinus* in Europe as reported by Saavedra *et al.* (2015a), but we could not find any specimens in this area. Specimens of *T. peregrinus* were found in a city park “Parque de El Retiro” at Madrid, Spain (40°25'07.8"N - 3°41'13.2"W) (Fig. 1a) (40°24'54.4"N - 3°40'52.98"W) on April 12, 2019. We examined three *Eucalyptus globulus* and two *Eucalyptus camaldulensis* trees. However, only *E. camaldulensis* presented a moderate infestation of bronze-bug, since there were symptoms of tanning

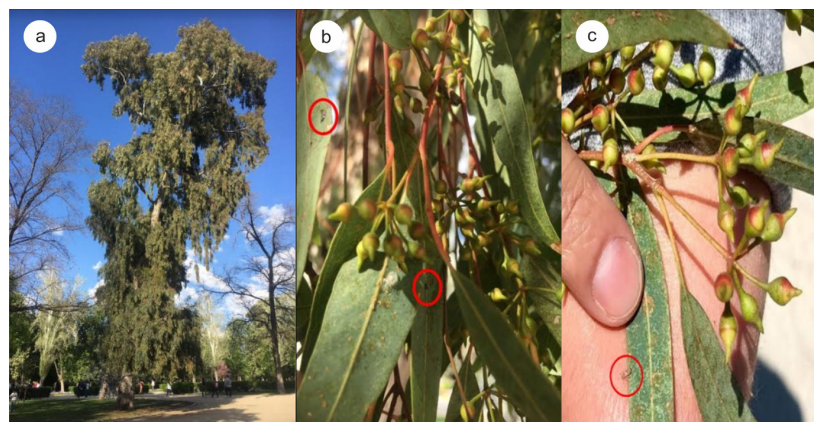


Figure 1. (a) *Eucalyptus* tree in the El Retiro Park of Madrid with attack of *T. peregrinus*; (b) Leaves with dark egg masses, aggregated as is typical of *T. peregrinus* and (c) adult of *T. peregrinus* (body length about 3 mm).

on leaves, many egg masses (Fig. 1b) and presence of nymphs and adults (Fig. 1c). *Eucalyptus* trees had a phytosanitary status of infestation by other insects, including *G. brimblecombei*. The weather during the day of sampling was between 5-19°C and had a clear sky (www.accuweather.com). We believe that the population of *T. peregrinus* sampled was in the beginning of infestation period, because we found many eggs and not many nymphs and adults on leaves.

Sampling procedure was performed on lower leaves of these trees collecting randomly the branches with bronze bug infestation. Insects were removed from leaves using a paint-brush and placed them in a plastic container (20 ml) with 96% alcohol, totalizing 10 specimens from each tree.

Samples collected in April were sent to the Laboratory of Forest Entomology - UFSM, Santa Maria, RS, Brazil, where the morphological characterization of the specimens was performed according to the morphological characters described by Carpintero & Dellapé (2006). The gDNA extraction and molecular characterization of the specimens were performed in the Laboratory of Integrated Pest Management (LabMIP-UFSM).

In August 5 of the same year with temperature around 35°C the trees were rechecked for infestation of bronze-bug and adults were found abundant, but eggs and nymphs were rare. Specimens from August were not sampled and not genetically analyzed, because the high probability of these insects to be family related.

DNA extraction, amplification and sequencing

Five insects were selected randomly from the specimens collected from each tree, for the extraction of gDNA. We used the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) to gDNA extraction of individual insects, according to the manufacturer's protocol. First of all, each adult was exposed to dry air in a paper towel in order to allow the ethanol evaporation. Then, we used 180 µL of buffer ATL and 20 µL of proteinase K to macerate the entire insect body in a 1.5 ml tube and left incubating at 56°C for 12 hours. Afterwards, gDNA was purified in a silica-based matrix and eluted in 35 µL of buffer AE. gDNA concentration was assessed using a NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Samples with a gDNA concentration over 5ng/µL were used to amplify a fragment of the mitochondrial COI gene (468 bp) by polymerase chain reaction (PCR). The primers Tp2390F (5'ACCCGAGCATACTTTACTTC) and Tp2937R (5' ATTGTGGCTCGTTTTGATA) (Nadel *et al.*, 2010) were used. The PCR reaction included: 1.25 µL of JumpStart™ 10X reaction buffer;

7,0 µL of ultra-pure water; 0.625 µL de dNTP mixture (10 nM of each); 1.0 µL of each primer (10 pM), 0.220 µL of JumpStart™ DNA Polymerase (2.5 U/ µL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 1 µL of gDNA (05-100 ng/ µL).

The PCR reaction was performed following Nadel *et al.* (2010) protocol: initial denaturation at 98°C for 30 s, followed by 30 cycles at 95°C for 30 s, 48°C for 30 s, and 72°C for 1.5 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The amplified products of mtDNA (COI fragment) were resolved on 1.0% agarose electrophoresis gel, pre-stained with Nancy-520 DNA gel stain (Sigma-Aldrich) and visualized with a gel documentation system. PCR products that were successfully amplified were sequenced by ACTGene genomics service provider (Alvorada, RS, BR), using an AB 3500 Genetic Analyzer.

Data analysis

The data from sequencing output were trimmed, edited and analyzed for each individual COI sequence, using the software Pregap and Gap4 within the Staden package (Staden & Bonfield, 2000). CLC Sequence Viewer (Version 7.8.1 - QIAGEN Aarhus A/S) was used to cut the ends, retrieve and align sequences of 468 bp long, based on a sequence model from GenBank (FJ623760). In addition, a pBlast analysis (amino acid homology confirmation) with *T. peregrinus* partial mtDNA COI genes on NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA database) was performed. The sequence of *T. peregrinus* from Madrid was deposited in GenBank under accession number MN401749.

Results

From the morphological and molecular characterization of the adult insects found in the Parque de El Retiro of Madrid, we confirm that all the sequenced specimens belong to the species *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero & Dellapé, 2006). All the specimens belong to the haplotype A, described by Nadel *et al.* (2010).

Discussion

The expansion of the area of *T. peregrinus* in Spain was already expected, since the intense traffic of people and goods (Hurley *et al.*, 2016) and because the climatic suitable conditions predicted by CLIMEX, that reports between a low and moderate potential distribution of

this pest on Madrid region (Saavedra *et al.*, 2015a). Presently this species has been widely distributed in some countries, e.g. as Brazil (Wilcken *et al.*, 2010) and Portugal (Garcia *et al.*, 2013).

Currently, it is known that only four strains of *T. peregrinus* of the eight haplotypes found by Nadel *et al.* (2010) and the 44 haplotypes found by Lo *et al.* (2019) in Australia, are scattered in different countries, two in South Africa (D and G haplotypes), one in South America (samples from Argentina, Brazil, Uruguay) (haplotype A - FJ623760) (Nadel *et al.*, 2010) and one in Italy (IT haplotype - KF437485), not yet found in the center of origin of the pest (Nugnes *et al.*, 2014).

The *T. peregrinus* population found in Madrid belongs to haplotype A, and there is no genetic diversity among the insects collected. Generally, in their area of natural occurrence, the species possess greater genetic diversity in relation to populations introduced in new environments (Puillandre *et al.*, 2008).

When analyzing the first occurrence records of *T. peregrinus* in Europe, we verified that Italy (2011) (Laudonia & Sasso, 2012) and Portugal (2012) (Garcia *et al.*, 2013) reported the presence of the insect before its detection in Spain. Therefore, we can suggest some hypothesis of introduction of *T. peregrinus* in Spain (Fig. 2), based on the genetic information of the population of Madrid. The most likely route of introduction may have been through the border with Portugal by natural dispersion (flight, hitchhiking in birds), transit of people and plant material or unintentionally by the importation of *Eucalyptus* timber from Latin America.

According to Garcia *et al.* (2013), most of the introductions of invasive alien species are mainly due to human activity, and *T. peregrinus* was probably

introduced in Portugal through the importation of eucalypt logs from a Latin American country. In fact, the populations of *T. peregrinus* from Brazil, Argentina and Uruguay belong to the same haplotype found in Spain (Nadel *et al.*, 2010). Thus, it is suggested that the haplotype present in Portugal is also haplotype A. Alternatively, it could have been introduced from Italy, however, the analysis of mtDNA from specimens of the population found in Italy have revealed the presence of a distinct haplotype, IT (Nugnes *et al.*, 2014).

An introduction from Israel would be improbable because the first record of *T. peregrinus* was dated one month earlier than in Spain (Novoselsky & Freideberg, 2016). Finally, a direct introduction from Australia would also be very unlikely. The possible routes of introduction in Spain, can be confirmed when DNA analysis of populations of Portugal became available, in order to determine which lineage(s) of *T. peregrinus* are in the country. In addition, specimens from the region of Badajoz, Spain, could confirm the presence of the same haplotype, due to the proximity to the border of Portugal, where the pest is widespread (Garcia *et al.*, 2013). We believe that an update of the genetic diversity of this species should be carried out in South America, Italy and South Africa, to find out if new introductory events with new haplotypes have occurred, thus increasing diversity in these places.

Thaumastocoris peregrinus is considered a prolific species, however, insects can go unnoticed until their abundance becomes critical. In Israel, it has been reported that these insects cause irritation and eruptions on the skin of some people who visited parks, possibly due to the direct contact of the specimens with the skin (Novoselsky & Freideberg, 2016). In this sense, the population of *T. peregrinus* found in a park in

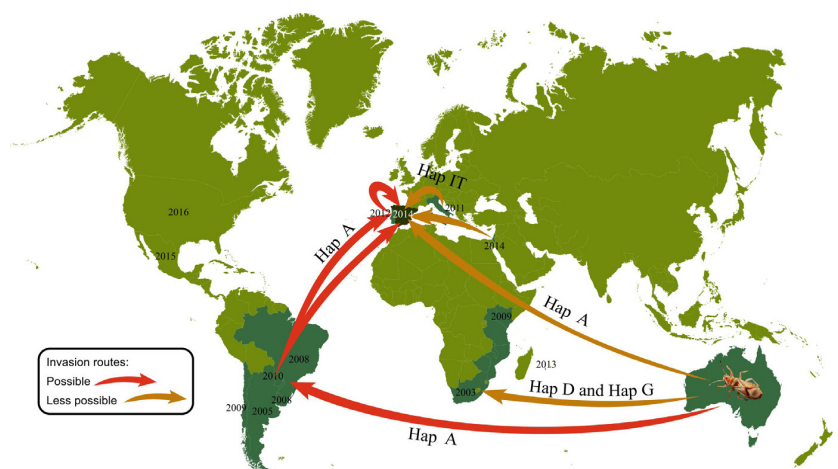


Figure 2. Possible routes of introduction of *T. peregrinus* in Spain.

Madrid, where the movement and the presence of people is intense, should be monitored. After detection, if preventive measures are not taken to control invasive species, their complete eradication will be more unlikely due to increasing population growth (Harvey & Mazzotti, 2014). It is important to highlight that eucalypt plantations in Spain comprise an area of approximately 500,000 ha (IFN, 2011; Santolamazza-Carbone *et al.*, 2019).

There are no effective strategies for controlling *T. peregrinus*. Using pesticides, however, there was a significant reduction in populations in trees treated with imidacloprid in Australia (Noack *et al.*, 2009). The results indicated that lambda-cyhalothrin + thiametoxam (1.2 + 25.8 g / ha) showed 100% control of insects after 24 hours of exposure (Machado *et al.*, 2016). On the other hand, biological control is being widely diffused for *T. peregrinus*. Two species of Mymaridae wasps, *Cleruchooides noackae* Lin et Huber and *Stethynium* sp. Enock were characterized as parasitoids of *T. peregrinus* eggs in Australia (Lin *et al.*, 2007). The species *C. noackae* was introduced in Brazil in 2012 and released in several states (Wilcken *et al.*, 2015), because the introduction and successful establishment of natural enemies is important to regulate pest populations (Gerard *et al.*, 2011; Thompson & Reddy, 2016). In addition, the species *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), was found preying nymphs of *T. peregrinus* (Wilcken *et al.*, 2010) and *Atopozelus opsimus* (Elkins, 1954) (Hemiptera: Reduviidae) (Dias *et al.*, 2014), adult insects of *T. peregrinus*.

Furthermore, there are studies with entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* Vuill and *Isaria* sp. (Lorencetti *et al.*, 2017). In addition, tests are in progress with isolates from the genera *Beauveria*, *Fusarium*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Purpureocillium* and *Simplicillium* (Corallo *et al.*, 2019) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Soliman *et al.*, 2019), which demonstrated potential for control of *T. peregrinus*.

Biosecurity measures should be intensified globally in order to hamper the rapid spread of invasive pests and possible damage to plantations. In this sense, we report the expansion of *T. peregrinus* in Spain and confirm that the population found in Madrid belongs to haplotype A. This is the same maternal lineage found in South America, being one of the probable routes of introduction of this haplotype in Spain.

Acknowledgements

Thanks are given to Mariana Ferneda Dossin and Daniela Rodrigues for the support during the collection of the specimens of *T. peregrinus* in April.

References

- Carapezza A, 2014. The arrival of one more eucalyptus pest in Sicily: *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera Heteroptera Thaumastocoridae). *Naturalista Sicil.* XXXVIII, 127-129.
- Carpintero DL, Dellapé PM, 2006. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). *Zootaxa* 1228: 61-68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1228.1.4>
- Chilima CZ, 2007. New Eucalyptus Pest Recorded from Zimbabwe. Forest Invasive Species Network for Africa (FAO). <http://www.fao.org/forestry/fisna/26061/en/>
- Corallo B, Simeto S, Martínez G, Gómez D, Abreo E, Altier N, Lupo S, 2019. Entomopathogenic fungi naturally infecting the eucalypt bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), in Uruguay. *J Appl Entomol* 143(5): 542-555. <https://doi.org/10.1111/jen.12624>
- Dias TKR, Wilcken CF, Soliman EE, Barbosa LR, Serrão JE, Zanuncio JC, 2014. Predation of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) by *Atopozelus opsimus* (Hemiptera: Reduviidae) in Brazil. *Invertebrate Surviv J* 11: 224-227.
- Díaz EAB, Coronel RS, Godziewski D, 2013. Consideraciones sobre dos nuevas plagas del eucalipto em Paraguay, El psílido de la concha o escudo *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: psyllidae) y La chinche marrón *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: thaumastocoridae). *Bol Mus Nac Hist Nat Parag* 17: 72-75.
- García A, Figueiredo E, Valente C, Monserrat VJ, Branco M, 2013. First record of *Thaumastocoris peregrinus* in Portugal and of the Neotropical predator *Hemerobius bolivari* in Europe. *B Insectol* 66: 251-256.
- Gerard PJ, Wilson DJ, Eden TM, 2011. Field release, establishment and initial dispersal of Irish *Microctonus aethiopoulos* in *Sitona lepidus* populations in northern New Zealand pastures. *BioControl* 56: 861-870. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9367-5>
- Harvey RG, Mazzotti FJ, 2014. The Invasion Curve: A Tool for Understanding Invasive Species Management in South Florida. IFAS Publication Number WEC347 University of Florida, Gainesville, FL. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/UF/UF39200.pdf>
- Heyden TVD, 2017. The first record of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Heteroptera: Thaumastocoridae) for Albania. *Rev Geditana Entomol* VIII:133-135.
- Hodel DR, Arakelian G, Ohara LM, 2016. The Bronze Bug Another New Threat to Eucalypts in California. *PalmArbor* 5:1-11.
- Hurley BP, Garnas J, Wingfield MJ, Branco M, Richardson DM, Slippers B, 2016. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts.

- Biol Invasions 18:921-933. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1081-x>
- IFN, 2011. Cuarto Inventario Forestal Nacional. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Madrid, Spain. <https://www.mapa.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/politica-forestal/inventario-cartografia/inventario-forestal-nacional/default.aspx>
- Jacobs DH, Naser S, 2005. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to Eucalyptus trees. *S Afr J Sci* 101: 233-236.
- Jiménez-Quiroz E, Vanegas-Rico JM, Morales-Martínez O, Lomeli-Flores JR, Rodríguez-Leyva E, 2016. First Record of the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Mexico. *J Agric Urban Entomol* 32: 35-40. <https://doi.org/10.3954/1523-5475-32.1.35>
- Karaca İ, Avci M, Güven Ö, 2017. *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Aphalaridae), the New Exotic Pest of Eucalyptus in Northern Cyprus. *J Agric Sci and Technol A* 7:552-556. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2017.08.005>
- Laudonia S, Sasso R, 2012. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* in Italy, damaging to Eucalyptus trees. *Bul Insect* 65:89-93.
- Lin NQ, Huber JT, LA Sallej, 2007. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Zootaxa* 1596: 1-111.
- Lo N, Montagu A, Noack A, Nahrung H, Wei H, Eldridge M, Gray KA, Rose HA, Cassis G, Johnson RN, Lawson S, 2019. Population genetics of the Australian eucalypt pest *Thaumastocoris peregrinus*: evidence for a recent invasion of Sydney. *J Pest Sci* 92(1): 201-212. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0995-8>
- Lorençetti GAT, Potrich M, Mazaro SM, Lozano ER, Gonçalves TE, Dallacor S, 2017. Ocorrência espontânea de *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. 1912 (Ascomycetes: Clavicipitaceae) sobre *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Ciência Florestal* 27(4): 1403-1407. <https://doi.org/10.5902/1980509830222>
- Machado DN, Costa EC, Garlet J, Boscardin J, Pedron L, Perini CR, Bolzan L, 2016. Avaliação de Inseticidas no Controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) Percevejo-bronzado em Condições de Laboratório. *Floram* 23(2): 245-250. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.144415>
- Mapondera TS, Burgess T, Matsuki M, Oberprieler RG, 2012. Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Aust J Entomol* 51(3): 171-188. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2011.00853.x>
- Martínez G, Bianchi M, 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia XIV*: 15-18.
- Mayorga SI, Ruiz CG, Sandoval AC, Valenzuela JE, 2011. Detection of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) associated to Eucalyptus spp. in Chile. (Detección de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) asociado a Eucalyptus spp. en Chile. *Bosque* 32: 309-313. <https://doi.org/10.4067/S0717-920-02011000300012>
- Nadel RL, Slippers B, Scholes MC, Lawson SA, Noack AE, Wilcken CF, Bouvet JP, Wingfield MJ, 2010. DNA barcoding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. *Biol Invasions* 12: 1067-1077. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9524-2>
- Nadel RL, Wingfield MJ, Scholes MC, Garnas JR, Lawson SA, Slippers B, 2015. Population dynamics of *Thaumastocoris peregrinus* in Eucalyptus plantations of South Africa. *J Insect Sci* 88: 97-106. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0558-6>
- Noack AE, Kaapro J, Bartimote-Aufflick K, Mansfield S, Roseh A, 2009. Efficacy of Imidacloprid in the control of *Thaumastocoris peregrinus* on Eucalyptus scopariain Sydney, Australia. *Arboric & Urban Forest* 35(4): 192-196.
- Novoselsky T, Freideberg A, 2016. First record of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in the Middle East, with biological notes on its relations with eucalyptus trees. *Isr J Entomol* 46: 43-55.
- Nugnes F, Caprio E, di Prisco GS, Laudonia S, Sasso R, 2014. *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Heteroptera, Thaumastocoridae): a new haplotype in Italy. In: XXIV Italian National Congress of Entomology, Orosei. https://www.researchgate.net/publication/264000885_Thaumastocoris_peregrinus_Carpintero_Dellape_Heteroptera_Thaumastocoridae_un_nuovo_aplotipo_in_Italia
- Petrakis PV, 2018. First record of the bug *Thaumastocoris peregrinus* in Greece. *Entomol Hellenica* 27:1-9. <https://doi.org/10.12681/eh.18703>
- Puillandre N, Dupas S, Dangles O, Zeddiam JL, Capdevielle-Dulac C, Barbin K, Torres Leguizamón M, Silvain JF, 2008. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biol Invasions* 10: 319-333. <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9132-y>
- Saavedra M. C, Avila G. A, Withers T. M, Holwell G, I 2015a. The potential global distribution of the Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Agric Forest Entomol* 17:375-388. <https://doi.org/10.1111/afe.12117>
- Saavedra MC, Withers TM, Holwell GI, 2015b. Susceptibility of four Eucalyptus host species for the development of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Forest Ecol Manag* 336: 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.10.024>

- Santadino M, Brentassi ME, Fanello DD, Coviella C, 2017. First evidence of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) feeding from mesophyll of eucalyptus leaves. *Environ Entomol* 46: 251-257. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw163>
- Santolamazza-Carbone S, Pérez-Rodríguez A, García-Fojo R, Cordero-Rivera A, 2019. Local augmentation efficiency of *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae), the egg parasitoid of *Gonipterus platensis* (Coleoptera, Curculionidae). *J Appl Entomol* 143: 574-583. <https://doi.org/10.1111/jen.12626>
- Soliman EP, Castro BMC, Wilcken CF, Firmino AC, Dal Pogetto MHFA, Barbosa LR, Zanuncio JC, 2019. Susceptibility of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), a Eucalyptus pest, to entomopathogenic fungi. *Sci Agric* 76(3): 255-260. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0043>
- Soliman EP, Wilcken CF, Pereira JM, Dias TKR, Zaché B, Dal Pogetto MHFA, Barbosa LR, 2012. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) in different eucalyptus species and hybrids. *Phytoparasitica* 40: 223-230. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0226-4>
- Sopow S, George S, Ward N (2012). Bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*: a new Eucalyptus pest in New Zealand. *Surveillance* 39: 43-46.
- Staden RBKF, Bonfield JK, 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* 132:115-130. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>
- Streito JC, Matocq A, Legros V, Genson G, Pierre É, Pluot-Sigwalt D, 2016. Report of the invasive species *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006, on Réunion Island (Hemiptera, Heteroptera, Thaumastocoridae). *Bul Soc Entomol France* 12: 65-72.
- Thompson BM, Reddy GVP, 2016. Status of *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) and its parasitoid, *Macroglanes penetrans* (Hymenoptera: Pteromalidae), in Montana. *Crop Protec* 84: 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.03.009>
- Vivas L, Crespo J, Jacinto V, 2015. Primer registro de la especie invasora *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 en España y nuevos datos para Portugal (Hemiptera: Thaumastocoridae). *BV News* 4: 30-35.
- Wilcken CF, 2008. Percevejo bronzeado do eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras. <http://www.ipef.br/protacao/alerta-percevejo.pdf>
- Wilcken CF, Soliman EP, de Sá LAN², Barbosa LR, Dias TKR, Ferreira-Filho PJ, Oliveira RJR, 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution. *J Plant Prot Res* 50(2): 210-205. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0034-0>
- Wilcken, CF, Barbosa LR, Soliman EP, Lima ACV, de Sá LAN, Lawson S, 2015. Percevejo-bronzeado-do-eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé. In: Vilela EF, Zucchi RA. *Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros*. Fealq, Piracicaba, pp 898-908.
- Zheng XL, Li J, Yang ZD, Xian ZH, Wei JG, 2014. A review of invasive biology, prevalence and management of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). *Afr Entomol* 22 (1): 68-79. <https://doi.org/10.4001/003.022.0133>

3 ARTIGO 2 - ONE MATERNAL LINEAGE LEADS THE EXPANSION OF *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) IN THE NEW AND OLD WORLDS

Submetido a revista Scientific reports (SREP-19-26939A)

One maternal lineage leads the expansion of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in the New and Old Worlds

Dayanna do N. Machado^{1,2*}, Ervandil C. Costa², Jerson V. C. Guedes², Leonardo R. Barbosa³, Gonzalo Martínez⁴, Sandra I. Mayorga⁵, Sergio O. Ramos⁶, Manuela R. Branco⁷, André Garcia⁷, Juan Manuel Vanegas-Rico⁸, Eduardo Jiménez-Quiroz⁹, Stefania Laudonia¹⁰, Tanya Novoselsky¹¹, Donald R. Hodel¹², Gevork Arakelian¹³, Horacio Silva¹⁴, Clérison R. Perini², Ivair Valmorbida¹⁵ Gustavo A. Ugalde², Jonas A. Arnemann²

*Corresponding author: Avenida Roraima n. 1000, prédio 42, sala 3229, Laboratório de Entomologia Florestal, Cep. 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: dayanasmac@gmail.com - telephone number: +55 999668783 - Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-9837-5369>

- ¹ Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.
- ² Departamento de Defesa Fitossanitária, Avenida Roraima n. 1000, prédio 42, sala 3223, Cep. 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.
- ³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, 83411-000, Brazil.
- ⁴ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 5 Km 386, Tacuarembó, Uruguay
- ⁵ Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Av. Presidente Bulnes 140, Santiago, Chile
- ⁶ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Ruta Nacional 14 Km 259, Concordia, Argentina
- ⁷ Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
- ⁸ Laboratorio de Control de Plagas, Unidad de Morfología y Función (UMF), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Av. de los barrios #1. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, EdoMex. CP. 54090.
- ⁹ Laboratorio de Análisis y Referencia en Sanidad Forestal, Av. Progreso 3, 04100, Coyoacán, Ciudad de México, México
- ¹⁰ Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri”, Università degli Studi di Napoli Federico II, Portici, Italy
- ¹¹ The Steinhardt Museum of Natural History, Israel National Center for Biodiversity Studies and Department of Zoology, The George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv, 69978 Israel
- ¹² University of California, Cooperative Extension, 700 W. Main Street, Alhambra, CA 91801, United States of America
- ¹³ Entomologist, Los Angeles County Agricultural Commissioner, 11012 S. Garfield Ave., South Gate, CA 90280, United States of America
- ¹⁴ Facultad de Agronomía Universidad de la República Uruguay, Ruta 3 km 363, 60000, Paysandú, Uruguay

¹⁵Department of Entomology, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.

The bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*, an Australian native, has become a nearly worldwide invasive pest in the last 16 years, and is causing significant damage to eucalypts (Myrtaceae), including *Eucalyptus* spp. and *Corymbia* spp. Its rapid spread lead to new questions about pathways and routes that *T. peregrinus* used to invade other continents and countries. We used mtDNA to characterize specimens of *T. peregrinus* collected from 10 countries where this species has become established, including six recently invaded countries: Chile, Israel, Mexico, Paraguay, Portugal and the USA. We then combined our mtDNA data with previous data available from South Africa, Australia and Europe to construct a world mtDNA network of haplotypes. Haplotype A was the most common, present in all specimens of sites sampled in the New World, Europe and Israel, besides Australia. Haplotype D was the most common from native populations in Australia. Haplotype A differs from the two major haplotypes found in South Africa (D and G), confirming that at least two independent invasions occurred, one from Australia to South Africa, and the other one from Australia to South America (A). In conclusion, Haplotype A have an invasion success over many countries in the World. Additionally, analyzing data from our work and previous reports, it is possible to raise some invasive pathways of *T. peregrinus* in order to warn and to support for preventive control measures.

Keywords: pest invasion, *Eucalyptus*, *Corymbia*, mtDNA, forest entomology

Introduction

The eucalypts represent over 20% of commercial tree plantations worldwide¹ and are also common in many landscapes. However, in recent years the significant expansion of planted areas has also increased the risk of introduction of invasive pest species^{2,3}. From 1870 to 2014, at least 42 eucalypt insect pests were introduced outside their native ecosystems, notably of the order Hemiptera (17 species)¹. Among the various invasive pests of eucalypts, the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae)⁴, has become the most widespread. In areas of recent colonization, *T. peregrinus* caused significant economic and esthetic damage to eucalypt trees. Symptoms, include leaf discoloration ranging from chlorosis to silver, bronze, and finally brown at defoliation, which can decrease photosynthetic area and lead to death of young trees^{5,6,7,8}.

Thaumastocoris peregrinus was first detected as invasive in South Africa in 2003⁹ and shortly thereafter in Argentina in 2005^{4,10}. A few years later, it was found, in other African and South American countries, and later also in North America, Europe and Israel (Table 1). The EPPO (European Plant Protection Organization) added *T. peregrinus* to the EPPO alert list in 2012, due to its invasive behavior and its potential damage to eucalypt trees¹¹.

Increasing economic globalization has facilitated dispersal of *T. peregrinus* and other invasive pests¹. The increases in intercontinental goods and passenger transport has significantly contributed to the introduction of invasive insect^{12,13,14}. DNA barcoding can support studies of invasive pests and its possible pathways of introduction as well as provide accurate species identification. Furthermore, analysis of the variability within a standard DNA barcode region can also aid to determine an invasive pest potential origin and pattern of dispersal^{15,16,17,18}. Previous analysis of mtDNA (COI partial) from populations of *T. peregrinus* from South Africa and South America revealed the presence of three haplotypes and were proposed more than one pathway of dispersal from Australia to Africa and South America¹⁶. The molecular characterization of *T. peregrinus* populations in the newly invaded areas was lacking; thus, we sequenced part of the mitochondrial gene of Cytochrome C Oxidase subunit I (COI) of *T. peregrinus* collected in different countries. Possible invasion routes for each country, based on data in the literature and collected in our work, are analyzed and discussed.

Material and Methods

Sampling procedure

Specimens of *T. peregrinus* were randomly collected from *Eucalyptus* trees in five countries in South America (Argentina, Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay), two in North America (USA and Mexico), one in the Middle East (Israel) and two in Europe (Italy and Portugal) (Fig. 1). At each site, adults of *T. peregrinus* were manually detached from branches and/or leaves using a paint brush or aspirator, and placed into 1.5 ml vials containing 98% ethanol to preserve their DNA. Approximately 300 specimens of *T. peregrinus* were collected at 28 collection sites from November 2016 to May 2018. Each vial was labelled with the municipality, date and coordinates of the collection site. Vials from all sample collection sites were sent to the Biotech Lab of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, where they were stored at -20°C until genomic DNA extraction.

DNA extraction, PCR amplification and COI-gene sequencing

Identification of all the *T. peregrinus* specimens was confirmed based on morphological characters⁴. DNA extraction was then performed individually for each specimen using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Depending on the availability of insects and the proximity of sampling sites, we used 1 to 10 insects per location for DNA extraction (Table 2). Each adult was removed from the vial with ethanol and allowed to air dry on a paper towel. The entire body was individually macerated in a 1.5 ml tube containing 180 μ L of buffer ATL and 20 μ L of proteinase K and left to incubate at 56°C for 12 hours. Subsequently, genomic DNA was purified in a silica-based matrix and eluted in 35 μ L of buffer AE. The concentration of DNA was assessed in a spectrophotometer (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

A fragment of the mitochondrial COI gene (468 bp) from 116 individuals was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers Tp2390F (5'ACCCGAGCATACTTTACTTC) and Tp2937R (5'ATTGTGGCTCGTTTTGATA)¹⁶. Each PCR mixture was performed with a final volume of 12 μ L that included: 1.25 μ L of JumpStart™ 10X reaction buffer; 0.625 μ L de dNTP mixture (10 nM of each); 1.0 μ L of each primer (10 pM), 0.220 μ L of JumpStart™ DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 1 μ L de template DNA (05-100 ng/ μ L) and 7,0 μ L of ultra-pure water.

PCRs were performed as follows¹⁶: initial denaturation at 98°C for 30 s, followed by 30 cycles at 95°C for 30 s, 48°C for 30 s and 72°C for 1.5 min, and a final extension at 72°C for 10 min. Amplified products were resolved on 1.0% agarose electrophoresis gel, pre-stained with Nancy-520 DNA gel stain (Sigma-Aldrich) and visualized with a gel documentation system. PCR products that were successfully amplified were sequenced by ACTGene genomics service provider (Alvorada, RS, BR), using an AB 3500 Genetic Analyzer.

Data analysis

Quality assessment, trimming, editing, and analysis of each DNA sequence were performed using the software Pregap and Gap4 within the Staden package¹⁹. CLC Sequence Viewer (Version 7.8.1 - QIAGEN Aarhus A/S) was used to retrieve and align sequences with a length of 468 bp. A pBlast analysis (amino acid homology confirmation) with *T. peregrinus* partial mtDNA COI genes on NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA database) was also performed.

The COI sequences generated in this study (116) were combined with 197 sequences of 16 populations from Australia^{16,20}. We also used 32 sequences from South America; 62 from South Africa¹⁶; 1 from Italy (KF437485)²¹; 10 from Spain (MN401749)²²; and 5 from Reunion Island (France) (GenBank - KT273623, KT273624, KT273625, KT273626 and KT273627)²³. The inference and visualization of genetic relationships among intraspecific sequences used to generate a haplotype network were conducted using TCS network²⁴ within the program PopART²⁵.

Results

Fragments of mtDNA from 116 individuals of *T. peregrinus* from 28 populations were amplified and sequenced, resulting in a trimmed sequence of 468 pb of COI gene. Sample of *T. peregrinus* from six countries, Chile, Paraguay, Mexico, Portugal, Israel, and USA, were sequenced for the first time. For all the sampled sites from South America (Chile, Paraguay, Argentina, Brazil and Uruguay), North America (Mexico and USA) and the Mediterranean basin (Italy, Portugal and Israel), we confirmed the presence of a unique haplotype (haplotype A).

Combining our data with sequences not deposited in GenBank²⁰ and with others previously deposited in GenBank (Table 2), produced a total of 423 *T. peregrinus* COI sequences and 45 unique haplotypes were identified. The proportions of the different haplotypes among the different countries are presented on a haplotype network (Fig. 2). This network reveals that the greatest diversity of haplotypes is from the native region of *T. peregrinus* in Australia. Haplotype D is the ancestral haplotype and all the other haplotypes radiate from it (Fig. 2). Haplotype D was the most frequent haplotype in Australia, and found at 10 sites²⁰. Haplotype A was present at three of 10 sites where haplotype D was also reported: Sydney, Coonabarabran and Cootamundra²⁰. The difference between the two haplotypes is only one base pair in the partial mtDNA COI fragment (468 bp)¹⁶ and possible represents a silent mutation.

Outside of Australia, only four haplotypes were found: D and G in South Africa¹⁶, IT in Italy²¹, and A in South America¹⁶, North America, Europe and Asia. From our work, haplotype A was the most frequent and widespread, found at 28 sites (116 sequences), in three populations from Australia (48 sequences)²⁰, six populations in South America (32 sequences)¹⁶ and one population in Spain (10 sequences)²², comprising a total of 206 sequences (Fig. 2). Based on the combined sequences, haplotype D was found in Australia (67 sequences)^{16,20}, on Reunion Island (five sequences)²³, and at nearly all the sites sampled in South Africa (46

sequences)¹⁶, making a total of 118 sequences. The third and fourth most frequent haplotypes were G and H; 31 sequences (16 for South Africa and 15 for Australia) of G and 14 sequences (all in Australia) of H, totaling 45 sequences^{16,20}. All the remained haplotypes were represented by three or fewer individuals. We note that all haplotypes found in the invaded regions were also found in their naturally occurring regions in Australia, except for the IT haplotype, which was found only in Italy (Genbank KF437485)²¹ (Fig. 2). To understand these results better, the sequences are grouped by country, resulting in a total of 14 countries and 423 sequences (Fig. 3).

Discussion

Genetic diversity

Our study updates information on the genetic diversity and mtDNA haplotype distribution of *T. peregrinus* worldwide. Samples from several locations in seven countries, including newly invaded countries in South America (Chile and Paraguay), North America (USA and Mexico) and the Mediterranean Basin (Portugal, Italy and Israel) were collected and analyzed. We also combined our mtDNA data with previously available sequences of *T. peregrinus*^{16,20,21, 22,23} (Table 1). Our results demonstrate that haplotype A is predominant in South America, North America, Europe, and Israel, indicating a low genetic diversity of *T. peregrinus* outside of its native region.

In contrast with the low genetic diversity found in the invaded areas, in its native region, the Australian populations of *T. peregrinus* revealed a high mtDNA COI haplotype diversity^{16,20}. Genetic diversity is expected to be greater in a species, native range compared with in invasive populations²⁶, possibly because of bottleneck effects during the invasion process where the newly introduced species might be reduced to a few individuals because environmental events (e.g. hurricane, forest fires) and anthropic actions, resulting in low genetic diversity²⁷. Furthermore, genetic drift also might account for the low genetic diversity of the new introduction²⁸. Selection pressure on a given population of the invasive species, that allow the survival of the fittest insects. might result in low genetic diversity during the first decades of species establishment²⁹. These evolutionary forces associated with the adaptability of haplotype A to different environment areas seems to lead the expansion of *T. peregrinus* worldwide.

Low genetic diversity has also been reported for many other forest invasive pests. For example, populations of *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Coleoptera: Cerambycidae)³⁰, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae)^{31,32}, *Solenopsis invicta* Buren (1972) (Hymenoptera: Formicidae)³³,

Solenopsis geminata (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae)³⁴, and *Sirex noctilio* Fabricius (1793) (Hymenoptera: Siricidae)³⁵ demonstrated low genetic diversity in areas where these species are considered invasive. In a new environment, invasive populations can take several years to increase their genetic diversity^{36,37}.

Possible introduction routes of *T. peregrinus* in South America, Europe, North America and Asia

Knowledge of possible ways by which an insect can invade a new area, and of its biology is essential to identify pathways of invasion and to develop and adopt effective strategies to prevent and/or manage additional introductions^{1,38}. Possible pathways of introduction of eucalypts pests include active dispersion, passive transport by biotic and abiotic agents or accidental transport³⁹. Even though our data are limited to a partial mtDNA COI fragment (468bp) from *T. peregrinus*, an invasive range can be projected using mtDNA which possesses a unique haplotype signature of a population as stated by Goldstien et al⁴⁰. The mtDNA is inherited most often only from the mother and does not undergo recombination⁴¹, and can be used to assess the number of genetically unique founder females^{42,43,44,45}. Studies of invasive species used similar methodologies, for example of *T. peregrinus*¹⁶, wood-boring beetles⁴⁶, *Melanagromyza sojae* (Zehntner) (Diptera: Agromyzidae)⁴⁷ and *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)⁴⁸.

Using data collected in our work and in the literature, we suggest nine possible invasion routes of *T. peregrinus* (Fig 4). These conclusions are based on: (1) spatio-temporal events; (2) previous report of invasion routes of each country; (3) movement of people, goods, and timber through motorways and waterways between countries; and (4) our findings that analyzed 116 sequences from specimens collected in countries in South and North Americas, Europe and Asia.

Routes 1 and 2: In 2003, *T. peregrinus*⁴ was first reported in South Africa, erroneously identified as *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy⁹. Years later, a study using DNA barcoding in specimens of *T. peregrinus* from South Africa revealed the presence of two haplotypes, D (route 1) and G (route 2), indicating that the introduction happened in two distinct invasion events, both aided by transport of people and goods primarily through airline with flights from Australia (Sydney)¹⁶. Further studies should update the *T. peregrinus* haplotypes present in Africa because its occurrence has increased throughout the continent, possibly as a consequence of new invasions or further dispersal of populations already present in the invaded area.

Route 3: *T. peregrinus* was first reported in the Americas in Argentina in 2005⁴. This introduction was an independent event of haplotype A directly from Australia and possibly from Sydney because the haplotype

was different from that of the South African invasion¹⁶. Geographical proximity, land border, surface transport of people and goods, and the presence of extensive eucalypt plantations alongside highway margins in Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay facilitated the spread of this invasive pest into South America. The monitoring data of *T. peregrinus* in Brazil suggest its entrance via airport⁸. In Chile, the invasion of *T. peregrinus* was thought to be passive and was spread by different means, including trucks, buses and ships, and other vectors, mainly birds^{49,50}. Natural dispersion by flight is also possible due to Argentina's proximity to other countries.

The geographical position of a country can influence and help to predict the quantity of invasive insects, which is related to the length and nature of borders with neighboring countries and correlations among land area, population, and gross domestic product^{1,51}. However, some factors may be likely than others, as is the case of eucalypt pest introductions into New Zealand from Australia, probably due to the proximity and frequent trade between the two countries^{1,52}.

Route 4: In Europe, the first reported occurrence of *T. peregrinus* was in Italy in 2011, possibly introduced through via the transport of timber from South America and South Africa⁵³; however, this hypothesis was not based on the population genetic signatures. In 2014, mtDNA molecular characterization of *T. peregrinus* specimens from Italy was performed, and a haplotype called IT was identified²¹. Strangely, haplotype IT has not been reported from Australia and several factors might offer an explanation, including a not yet detected, unusually low frequency in Australia or a new haplotype restricted to Italy or from an undetermined population along the invasive pathways between Australia and Italy. Additionally, our results confirm the presence of haplotype A in Italy, suggesting an invasive pathway from South America because of wood transport between the two countries. This scenario is more likely than introduction from South Africa as previously reported⁵³. Nonetheless, based on the presence of haplotype A in Portugal and recently in Spain²², we also hypothesize dispersion and incursions from many of these countries into Italy because of the short geographical distance, the land border, and the motorway connections between countries (Portugal, Spain, France and Italy), and intense movement of tourists and goods.

Route 5: The second country in Europe to report an invasion of *T. peregrinus* was Portugal in 2012⁵⁴. Based on South America status as main supplier of eucalypts wood to Europe^{55,56}, South America has been suggested as a route of invasion of *T. peregrinus* into Europe⁵⁴. Also, the genetic signature of sampled population in Portugal revealed that it is most likely an arrival from South America. The latest European countries to report *T. peregrinus* were Spain (2014)⁵⁷, Albania (2016)⁵⁸, and Greece (2017)⁵⁹. The genetic diversity in these countries remains unknown, except for Spain, where haplotype A was reported in Madrid, with

two main introduction routes being suggested: either that an invasion from South America to Portugal and then a spread to Spain; or that *T. peregrinus* invaded Spain from South America²².

For other European countries, we suggest that the bronze bug spread within the Mediterranean countries similarly to other invasive alien species that feed on eucalyptus trees. Possible invasion routes of *G. brimblecombei* into Europe were suggested from South or North America, considering the spatio-temporal events and the presence of this insect in the New World since the 20th century⁶⁰. Subsequent events demonstrated the spread of *G. brimblecombei* to Mediterranean countries⁶¹. The connections between countries, mainly motorways and waterways linking Portugal, Spain, France, Italy, Greece, Algeria and Morocco, were suggested as the main invasion routes of this pest⁶².

Route 6: The introduction of *T. peregrinus* to Reunion Island (2013)²³ may have resulted from the flow of people and goods and the island's proximity to South Africa, where haplotype D is predominant¹⁶. However, a direct introduction from Australia is also possible based on distance and the presence of haplotype D at this species site of origin.

Route 7: The introduction of *T. peregrinus* into Israel possibly occurred from a country with the bordering to the Mediterranean Sea, where this species was already present, based on connections of motorways and waterways and the intense movement of people and goods between countries^{60,62}. The recent expansion of eucalypts forestry in Asia could also influence the occurrence and detection of pests¹, including the spread of *T. peregrinus* into new countries in Asia in the near future.

Routes 8 and 9: In North America, the first report of *T. peregrinus* was in Mexico in 2015⁶³, ten years after its detection in Argentina. In 2016, this pest was found in the USA, in California in the greater Los Angeles area, specifically north Hollywood in the San Fernando Valley^{64,65}, and Heartwell Park in Long Beach⁶⁵. The first detection event might not be the actual first incursion and the establishment of a pest; therefore, because of the short distance and the short period of this pest's detection between Mexico and California (USA), it is impossible to know definitely in which country of North America *T. peregrinus* first entered. However, the presence of the same haplotype A in all areas of the Americas, suggests that a single invasion starting from South America and spreading northward to California might have occurred. Nevertheless, as before, Australia should also be considered as a source of *T. peregrinus* in North America because of the presence of haplotype A.

In general, in the USA, two invasion pathways are considered dominant in the introduction of insects and diseases. Most harmful, non-native species (62%) likely entered North America with live plants and 30% probably arrived with wood packaging material (WPM) or other wood products⁶⁶. In 2017, several specimens of

T. peregrinus were found on *Eucalyptus* twigs in a shipment of cut flowers from Mexico that was intercepted at the port of Brownsville (Texas). Because *T. peregrinus* had quarantine status, the cut flowers returned to Mexico as a safety measure⁶⁷. The twin ports of Los Angeles and Long Beach are the busiest in the USA and the international airports of San Francisco and Los Angeles are main entry points for passengers and air cargo⁶⁸; all serve as gateways for pest introductions.

Our mtDNA analysis, including temporal and geographical sequence data, provide information that suggested scenarios of invasion routes of *T. peregrinus* in South America, North America, Europe, and Asia. These scenarios are an important source of information that assist in the planning and management of biosafety measures to prevent pests like *T. peregrinus*, from invading and colonizing new sites. Further studies using nuclear markers (e.g. microsatellites) or other mtDNA region can aid to postulate new scenarios.

Factors involved in the successful invasion and establishment of *T. peregrinus*

Several insect pests of eucalypts have undergone dispersal to two or more continents, for example *L. invasa*, *Gonipterus* spp., and *Glycaspis brimblecombei* (Moore, 1964) (Hemiptera: Aphalaridae), and evidence exists that these invasive species possess and exploit mechanisms to aid in their dispersal¹. In the specific case of *T. peregrinus*, adults do not show a strong natural ability to disperse except when aided by human activities²⁰; however, nymphs are particularly mobile⁸, and could be more easily dispersed. In addition, biological factors account for the success of many invasive insects into a new location⁶⁹, and we believe that certain biological characteristics of *T. peregrinus* represent an important portion of its invasion success throughout more than 20 countries. The life cycle of *T. peregrinus* is about 60 days and has a rather high potential for breeding (fecundity of 60 eggs/female) conditioning to reproduce more than twice a year and increase its population density^{50,70}. Once this pest invade a new location, the lack of natural enemies facilitates its establishment and spread⁷¹ additionally to the wide range of host trees of *Eucalyptus* and *Corymbia* (over 52 host species) found in many countries in the world⁷². *T. peregrinus* also thrives under a wide range of temperatures, varying from 4°C to 34°C, which explains its wide distribution and possible invasion into new areas in the future⁷³. Its invasion success also are related to the small body size (\pm 3-4 mm)⁹ that facilitates its dispersal over long distances, whether actively or passively by the wind (draft)⁷⁴ or by the movement of people or any kind of goods, especially timber, where is very difficult to see because its small size.

Successful invaders are those featuring a small body size, several generations per year, long flight displacement and low incidence of diapause⁶⁹. All of which account for the rapid adaptation to new environmental conditions⁷⁵. For example, the successful invasion of *L. invasa* into new areas was suggested to be a consequence of this pest's high dispersal capabilities³², strong resistance to low temperatures, the presence of eucalypt plantations worldwide⁷⁶, and a lack of natural enemies in the invaded areas⁷⁷. Moreover, synergistic interactions among invasive species has been reported as a “meltdown” process that accelerates the impact of these species in the invaded area⁷⁸. In line with this theory, both the eucalyptus lerp psyllid *G. brimblecombei* and *T. peregrinus* display a positive interaction that benefits from the preference of bronze bug females to oviposit on leaves bearing lerps⁷⁹.

Considering the invasion success of haplotype A worldwide reported in this work and that the most common maternal lineages of *T. peregrinus* sampled in Australia, specifically in Sydney from 2001 to 2009, were haplotypes A, D, G and H^{16,20}; therefore, the most likely source of *T. peregrinus* appears to be Sydney^{16,20} or Chelmsford²⁰ for haplotypes A and D. The most common haplotypes in a given population are more likely to be sampled and eventually to spread^{16,43,80,81}, as it seems to have happened to A of *T. peregrinus*. On the contrary, haplotypes D, G and H were found restricted in some areas or not found outside of their place of origin, although individuals might have dispersed to new areas but did not adapt and establish successfully as well as haplotype A.

The rate of invasion by insect pests in eucalypt plantations has increased approximately fivefold since the 1980s¹. During our sampling of *T. peregrinus* specimens in over 28 locations nearly worldwide, we found that this insect was present in eucalypt trees along highways, and in parks, urban forests and landscapes, and commercial plantations. The growing flow of people among countries using diverse ways of transport and an ignorance of the risks of transporting plant materials, either within or outside their natural areas, favor this invasive process.

References

1. Hurley, B. P. *et al.* Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. *Biol. Invasions*. **18**, 921-933; <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1081-x> (2016).
2. Paine, T. D., Steinbauer, M. J. & Lawson, S. A. Native and exotic pests of Eucalyptus: a worldwide perspective. *Annu. Rev. Entomol.* **56**, 11-20; <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144817> (2011).
3. Branco, S., Videira, N., Branco, M. & Paiva, M. R. A review of invasive alien species impacts on eucalypt stands and citrus orchards ecosystem services: towards an integrated management approach. *J. Environ. Manag.* **149**, 17–26; <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.09.026> (2015).

4. Carpintero, D. L. & Dellapé, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). *Zootaxa* **1228**, 61-68 (2006).
5. Button, G. *Thaumastocoris peregrinus*. NCT Forestry Co-operative Limited. <http://www.nctforest.com/home.php?nav=pubs&pubtypeid=1&archive=1> (2007).
6. Soliman, E. P. *et al.* Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different eucalyptus species and hybrids. *Phytoparasitica* **40**, 223-230; <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0226-4> (2012).
7. Wilcken, C. F. Percevejo bronzeado do eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras. IPEF Programa de proteção florestal - PROTEF/IPEF. <http://www.ipef.br/rotecao/alerta-percevejo.pdf> (2008).
8. Wilcken, C. F. *et al.* Bronze bug *Thaumastocoris peregrines* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *J. Plant Protect. Resear.* **50**, 201-205; <http://dx.doi.org/10.2478/v10045-010-0034-0> (2010).
9. Jacobs, D. H. & Naser, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees: research in action. *S. Afr. J. Sci.* **101**, 233-236 (2005).
10. Noack, A. E & Coviella, C. E. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Hemiptera: Thaumastocoridae): first record of this invasive pest of *Eucalyptus* in the Americas. *Gen. Appl. Entomol.* **35**, 13-14 (2006).
11. EPPO. Global database. Addition of *Thaumastocoris peregrinus* to the EPPO Alert List. <https://gd.eppo.int/reporting/article-1974> (2012).
12. Lesieur, V. *et al.* The rapid spread of *Leptoglossus occidentalis* in Europe: a bridgehead invasion. *J. Pest Sci.* **92**, 189-200; <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0993-x> (2019).
13. Seebens, H. *et al.* No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nat. Communications* **8**, 14435; <https://doi:10.1038/ncomms14435> (2017).
14. Westphal, M. I., Browne, M., MacKinnon, K. & Noble, I. The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. *Biol. Invasions* **10**, 391-398; <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9138-5> (2008).
15. Madden, M. J. L. *et al.* Using DNA barcoding to improve invasive pest identification at U.S. ports-of-entry. *PLOS ONE*, **14**, e0222291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222291> (2019).
16. Nadel, R. L. *et al.* DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. *Biol. Invasions* **12**, 1067-1077; <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9524-2> (2010).
17. Kang, T. H., Kim, S., Hong, K. J., & Lee, H. S. DNA barcoding in quarantine inspection: a case study on quarantine insect monitoring for Lepidoptera obtained through quarantine inspection on foreign vessels. *Mitochondrial DNA Part B* **4**, 43-48. <http://doi:10.1080/23802359.2018.1536447> (2018).
18. Piper, A. M. *et al.* Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *GigaScience* **8**, 1-22; <http://doi:10.1093/gigascience/giz092> (2019).
19. Staden, R. B. K. F. & Bonfield, J. K. The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology* **132**, 115-130; <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115> (2000).
20. Lo, N. *et al.* Population genetics of the Australian eucalypt pest *Thaumastocoris peregrinus*: evidence for a recent invasion of Sydney. *J. Pest Science* **92**, 201-2012; <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0995-8> (2019).
21. Nugnes, F., Caprio, E., di Prisco, G., Laudonia, S. & Sasso, R. *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Heteroptera, Thaumastocoridae): a new haplotype in Italy. In: XXIV Italian National Congress of Entomology, Orosei, 2014, p. 98. doi:10.13140/2.1.3217.5045 (2014).
22. Machado, D. N. *et al.* The ongoing dispersion of the Eucalyptus bronze bug (*Thaumastocoris peregrinus*) in Spain. *Forest Systems* **28**, 1-7; <https://doi.org/10.5424/fs/2019283-15353> (2019).
23. Streito, J. C. *et al.* Report of the invasive species *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006, on Réunion Island (Hemiptera, Heteroptera, Thaumastocoridae). *Bul. Soc. Entomol. France* **12**, 65-72 (2016).
24. Clement, M., Posada, D. C. & Crandall, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 657-1659; <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x> (2000).
25. Leigh, J. W. & Bryant, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 1110-1116; <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410> (2015).
26. Puillandre, N. *et al.* Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biol. Invasions* **10**, 319-333 (2008).
27. Caron, V., Norgate, M., Ede, F. J., Nyman, T & Sunnucks, P. Novel microsatellite DNA markers indicate strict parthenogenesis and few genotypes in the invasive willow saw fly *Nematus oligospilus*. *Bull. Entomol. Res.* **103**, 74-88 (2013).
28. Rollins, L. A. *et al.* Invasive species can't cover their tracks: using microsatellites to assist management of starling (*Sturnus vulgaris*) populations in Western Australia. *Mol. Ecol.* **18**, 1560-1573 (2009).

29. Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1–10 (1975).
30. Carter, M., Smith, M. & Harrison, R. Genetic analyses of the Asian longhorn beetle (Coleoptera, Cerambycidae, *Anoplophora glabripennis*), in North. *Biol. Invasions* **12**, 165–1182; <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9538-9> (2010).
31. Nugnes, F. *et al.* Genetic Diversity of the Invasive Gall Wasp *Leptocybe Invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* endosymbiont, and associated sex-ratio differences. *PLoS One* **10**, e0124660; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124660> (2015).
32. Dittrich-Schröder, G. *et al.* Population genetic analyses of complex global insect invasions in managed landscapes: a *Leptocybe invasa* (Hymenoptera) case study. *Biol. Invasions* **20**, 2395–2420; <http://doi.org/10.1007/s10530-018-1709-0> (2018).
33. Ascunce, M. S. *et al.* Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Science* **331**, 1066–1068 (2011).
34. Gotzek, D. *et al.* Global invasion history of the tropical fire ant: a stowaway on the first global trade routes. *Mol. Ecol.* **24**, 374–388 (2015).
35. Boissin, E. *et al.* Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. *Mol. Ecol.* **21**, 5728–5744 (2012).
36. Dlugosch, K. M. & Parker, I. M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecology* **17**, 431–449 (2008).
37. Garnas, J. R. *et al.* Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. *Biol. Invasions* **18**, 935–952; <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1082-9> (2016).
38. Essl F. *et al.* Crossing frontiers in tackling pathways of biological invasions. *Biosci.* **65**, 769–782 (2015).
39. Lopes da Silva, M. *et al.* The Role of Natural and Human-Mediated Pathways for Invasive Agricultural Pests: A Historical Analysis of Cases from Brazil. *Agricul. Sci.* **5**, 634–646, 2014.
40. Goldstien, S. J. *et al.* Global Phylogeography of the Widely Introduced North West Pacific Ascidian *Styela clava*. *PLoS One* **6**, <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016755> (2011).
41. Townsend, C. R., Begon, M. & Harper, J. L. *Fundamentos em Ecologia*. 3 Ed. Artmed, Porto Alegre, 2010.
42. Vincek, V. *et al.* How large was the founding population of Darwin’s finches? *Proc. Biol. Sci.* **264**, 111–18 (1997).
43. Ficetola, G. F., Bonin, A. & Miaud, C. Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Mol. Ecol.* **17**, 773–782 (2008).
44. Dickey, A. M. *et al.* Population Genetics of Invasive *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Cryptic Species in the United States Based on Microsatellite Markers. *J. Econ. Entomol.* **106**, 1355–1364 (2013).
45. Tay, T W. *et al.* Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. *Scientific Reports* **7**, 45302 (2017).
46. Yunke W. *et al.* Identification of wood-boring beetles (Cerambycidae and Buprestidae) intercepted in trade-associated solid wood packaging material using DNA barcoding and morphology. *Scientific Reports* **7**, 40316; <http://doi.org/10.1038/srep40316> (2017).
47. Arnemann, J. A. *et al.* Complete mitochondrial genome of the soybean stem fly *Melanagromyza sojae* (Diptera: Agromyzidae). *Mitochondrial DNA Part A* **27**, 4534–45335 (2016).
48. Arnemann, J. A. *et al.* Multiple incursion pathways for *Helicoverpa armigera* in Brazil show its genetic diversity spreading in a connected world. *Scientific Reports* **9**, <http://doi.org/10.1101/762229> (2019).
49. Mayorga, S. I., Ruiz, C. G., Sandoval, A. C. & Valenzuela, J. E. Detection of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) associated to *Eucalyptus* spp. in Chile. (Detección de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) asociado a *Eucalyptus* spp. en Chile. *Bosque* **32**, 309–313; <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002011000300012> (2011).
50. Noack, A. E. & Rose, H. A. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. In the laboratory with some observations on behavior. *Gen. App. Entomol.* **36**, 27–34 (2007).
51. Roy, B. A. *et al.* Increasing forest loss worldwide from invasive pests requires new trade regulations. *Front. Ecol. Environ.* **12**, 457–465 (2014).
52. Withers, T.M. Colonization of eucalypts in New Zealand by Australian insects. *Aust. Ecol.* **26**, 467–476 (2001).
53. Laudonia, S. & Sasso, R. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to *Eucalyptus* trees. *Bul. Insectology* **65**, 89–93 (2012).
54. Garcia, A., Figueiredo, E., Valente, C., Monserrat, V.J. & Branco, M. First record of *Thaumastocoris peregrinus* in Portugal and of the Neotropical predator *Hemerobius bolivari* in Europe. *Bul. Insectology* **66**, 251–256 (2013).

55. UNECE, FAO. Forest products: annual market review 2004-2005, Timber Bulletin, volume 58 (2005). United Nations Economic Commission for Europe, Food and Agriculture Organization, Geneva, Switzerland. http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/FAO-forest_products-2005.pdf (2005).
56. UNECE, FAO. Forest products: annual market review 2011-2012. United Nations Economic Commission for Europe, Food and Agriculture Organization, Geneva, Switzerland. http://www.unece.org/fileadmin/DAM/timber/publications/FPAMR_2012.pdf (2012).
57. Vivas, L., Crespo, J. & Jacinto, V. Primer registro de la especie invasora *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 en España y nuevos datos para Portugal (Hemiptera: Thaumastocoridae). *BV News* **4**, 30-35 (2015).
58. Heyden, T. V. D. The first record of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Heteroptera: Thaumastocoridae) for Albania. *Rev. Gad. Entomol.* **VIII**, 133-135 (2017).
59. Petrakis, P. V. First record of the bug *Thaumastocoris peregrinus* in Greece. *Entomologia Hellenica* **27**, 1-9. <http://dx.doi.org/10.12681/eh.18703> (2018).
60. Brennan, E.B., Gill, R. J., Hrusa, G.F. & Weinbaum, S.A. First record of *Glycaspis brimblecombei* (Moore) (Homoptera: Psyllidae) in North America: initial observations and predator associations of a potentially serious new pest of Eucalyptus in California. *Pan-Pacific Entomol* **75**, 55-57 (1999).
61. Dhahri, S., Ben Jamaa, M. L., Garcia, A., Boavida, C & Branco, M. Presence of *Glycaspis brimblecombei* and its Parasitoid *Psyllaephagus bliteus* in Tunisia and Portugal. *Silva Lusit.* **22**, 99-115 (2014).
62. Reguía, K & Peris-Felipo, F. J. *Glycaspis brimblecombei* Moore, 1964 (Hemiptera Psyllidae) invasion and new records in the Mediterranean area. *Biodiversity J.* **4**, 501-506 (2013).
63. Jiménez-Quiroz, E., Vanegas-Rico, J. M., Morales-Martínez, O., Lomeli-Flores, J. R. & Rodríguez-Leyva E. First Record of the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Mexico. *J. Agric. Urban Entomol.* **32**, 35-39; <https://doi.org/10.3954/1523-5475-32.1.35> (2016).
64. BugGuide. 2016. *Thaumastocoris peregrinus*. On-line: <http://bugguide.net/node/view/1236781>. (2019).
65. Hodel, D. R., Arakelian, G. & Ohara, L. M. The Bronze Bug Another New Threat to Eucalypts in California. *PalmArbor* **5**, 1-11; <https://ucanr.edu/sites/HodelPalmsTrees/files/248430.pdf> (2016).
66. Liebhold, A. M., Brockerhoff, E. G., Garrett, L.J., Parke, J. L. & Britton, K. O Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Front. Ecol. Environ.* **10**, 135-143 (2012).
67. U. S. Department of Homeland Security. Brownsville Port of Entry CBP Agriculture Specialist Intercepts First in Port Pest in Eucalyptus Branches. <https://www.cbp.gov/newsroom/local-media-release/brownsville-port-entry-cbp-agriculture-specialist-intercepts-first-1> (2017).
68. Paine, T. D., Millar, J. G & Daane, K. M. Accumulation of Pest Insects on Eucalyptus in California: random Process or Smoking Gun. *J. Econ. Entomol.* **103**, 1943-1949 (2010).
69. EPPO. Global Database. Distribution *Thaumastocoris peregrinus*. <https://gd.eppo.int/taxon/THMCPE/distribution> (2018).
70. CABI. Invasive Species Compendium. *Thaumastocoris peregrinus* (bronze bug). [https://www.cabi.org/isc/datasheet/109741#20123208401\(2018\)](https://www.cabi.org/isc/datasheet/109741#20123208401(2018)).
71. Chilima, C. Z. New *Eucalyptus* Pest Recorded from Zimbabwe. Forest Invasive Species Network for Africa (FAO) [WWW document]. <http://www.fao.org/forestry/fisna/26061/en/> (2007).
72. Nahrung, H. F. & Swain, A. J. Strangers in a strange land: do life history traits differ for alien and native colonisers of novel environments?. *Biol. Invasions* **17**, 699-709 (2015).
73. Nadel, R. L. *et al.* (2015). Population dynamics of *Thaumastocoris peregrinus* in Eucalyptus plantations of South Africa. *J. Pest Sci.* **88**, 97-106 (2015).
74. Corallo, B. *et al.* Entomopathogenic fungi naturally infecting the eucalypt bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), in Uruguay. *J. Appl. Entomol.* 1-14; <https://doi.org/10.1111/jen.12624> (2019).
75. Saavedra, M. C., Withers, T. M. & Holwell, G. I. Susceptibility of four *Eucalyptus* host species for the development of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Forest Ecol. Manag.* **336**, 210-2016 (2015a).
76. Saavedra, M. C., Avila, G. A., Withers, T. M. & Holwell, G. I. The potential global distribution of the Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Agr. Forest Entomol.* **17**, 375-388 (2015b).
77. Osborne, J. L.; Loxdale, H. D. & Woiwod, I. P. Monitoring insect dispersal: methods and approaches. In: Bullock, J. M., Kenward, R. E and Hails, R. S. (Eds.). *Dispersal Ecology: 42nd Symposium of the British Ecological Society*, Cambridge University Press, 2002, p. 24-49

78. Whitney, K.D. & Gabler, C. A. Rapid evolution in introduced species, ‘invasive traits’ and recipient communities: challenges for predicting invasive potential. *Diversity distrib.* **14**, 569-580 (2008).
79. Zheng, X. L. *et al.* A review of invasive biology, prevalence and management of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). *Afr. Entomol.* **22**, 68-79 (2014).
80. Protasov, A., Doganlar, M., Salle J. L. & Mendel, Z. Occurrence of two local *Megastigmus* species parasitic on the eucalyptus gallwasp *Leptocybe invasa* in Israel and Turkey. *Phytoparasitica* **36**, 449-459 (2008).
81. Simberloff, D., & Holle, B. V. Positive interactions of nonindigenous species: invasional meltdown? *Biol. Invasions* **1**, 21-32, (1999).
82. Martínez, G., González, A. & Dicke, M. Effect of the eucalypt lerp psyllid *Glycaspis brimblecombei* on adult feeding, oviposition-site selection, and offspring performance of the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*. *Entomol. Experim. Appl.* **166**, 395-401 (2018).
83. Sakai, A. K. *et al.* The population biology of invasive species. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **32**, 305–332 (2001).
84. Roderick, G. K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Ann. Rev. Entomol.* **41**, 325–352 (1996).
85. Martínez, G. & Bianchi, M. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia*, **XIV**, 15-18 (2010).
86. Díaz, E. A. B., Coronel, R. S. & Godziewski, D. Consideraciones sobre dos nuevas plagas del eucalipto em Paraguay, El psílido de la concha o escudo *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: psyllidae) y La chinche marrón *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Bol. Museo Nac. Hist. Nat. Parag.* **17**, 72-75 (2013).
87. Sopow, S., George, S. & Ward, N. Bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*: a new *Eucalyptus* pest in New Zealand. *Surveillance* **39**, 43-46 (2012).
88. Carapezza, A. The arrival of one more eucalyptus pest in Sicily: *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera Heteroptera Thaumastocoridae). *Naturalista Sicil.* **XXXVIII**, 127-129 (2014).
89. Suma, P., Nucifora, S. & Bella, S. New distribution record of the invasive bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Heteroptera, Thaumastocoridae) in Italy. *Bull. OEPP/EPPO* **44**, 79–182. <https://doi.org/10.1111/epp.12122> (2014)
90. Novoselsky, T. & Freideberg, A. First record of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in the Middle East, with biological notes on its relations with eucalyptus trees. *Isr. J. Entomol.* **46**, 43-55 (2016).

Fig. 1 Locations where specimens of *Thaumastocoris peregrinus* were collected in South America, North America, Europe and Israel.

Fig. 2 Mitochondrial haplotype network. Circle sizes are in approximate proportion to haplotype frequencies. Each mark represents one nucleotide difference. Countries: Australia (AU); Reunion Island (RE); Argentina (AR); Brazil (BR); Chile (CL); Paraguay (PY); Uruguay (UY); Israel (IL); Mexico (MX); United States of America (US); Portugal (PT); Spain (ES); Italy (IT); South Africa (SA).

Fig. 3 Haplotype distribution of *T. peregrinus* in 14 countries. Australia (AU); Reunion Island (RE); Argentina (AR); Brazil (BR); Chile (CL); Paraguay (PY); Uruguay (UY); Israel (IL); Mexico (MX); United States of America (US); Portugal (PT); Spain (ES); Italy (IT); South Africa (SA). The size of pie charts is relative to the number of individuals sequenced at each locality.

Fig. 4 Possible introduction and dispersal routes of *T. peregrinus* in the New and Old World

Acknowledgments

Dayanna Machado would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting the doctoral scholarship. We also thank Nathan Lo for providing us with *T. peregrinus* mtDNA data from the Sydney, Australia.

Authors' Contribution

DNM, ECC, JVCG, CRP and JAA conceived this research and designed the experiments; DNM, IV, GAU, CRP and JAA analyzed the data; LRB, GM, SIM, SOR, MRB, AG, JMV-R, EJ-Q, SL, TN, DRH, GA and HS assisted with sample collection; DNM, IV, MRB, AG, CRP, GM and JAA wrote the paper. All authors read and commented on the information provided in the manuscript and approved the final draft.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Fig. 1 Locations where specimens of *Thaumastocoris peregrinus* were collected in South America, North America, Europe and Israel.

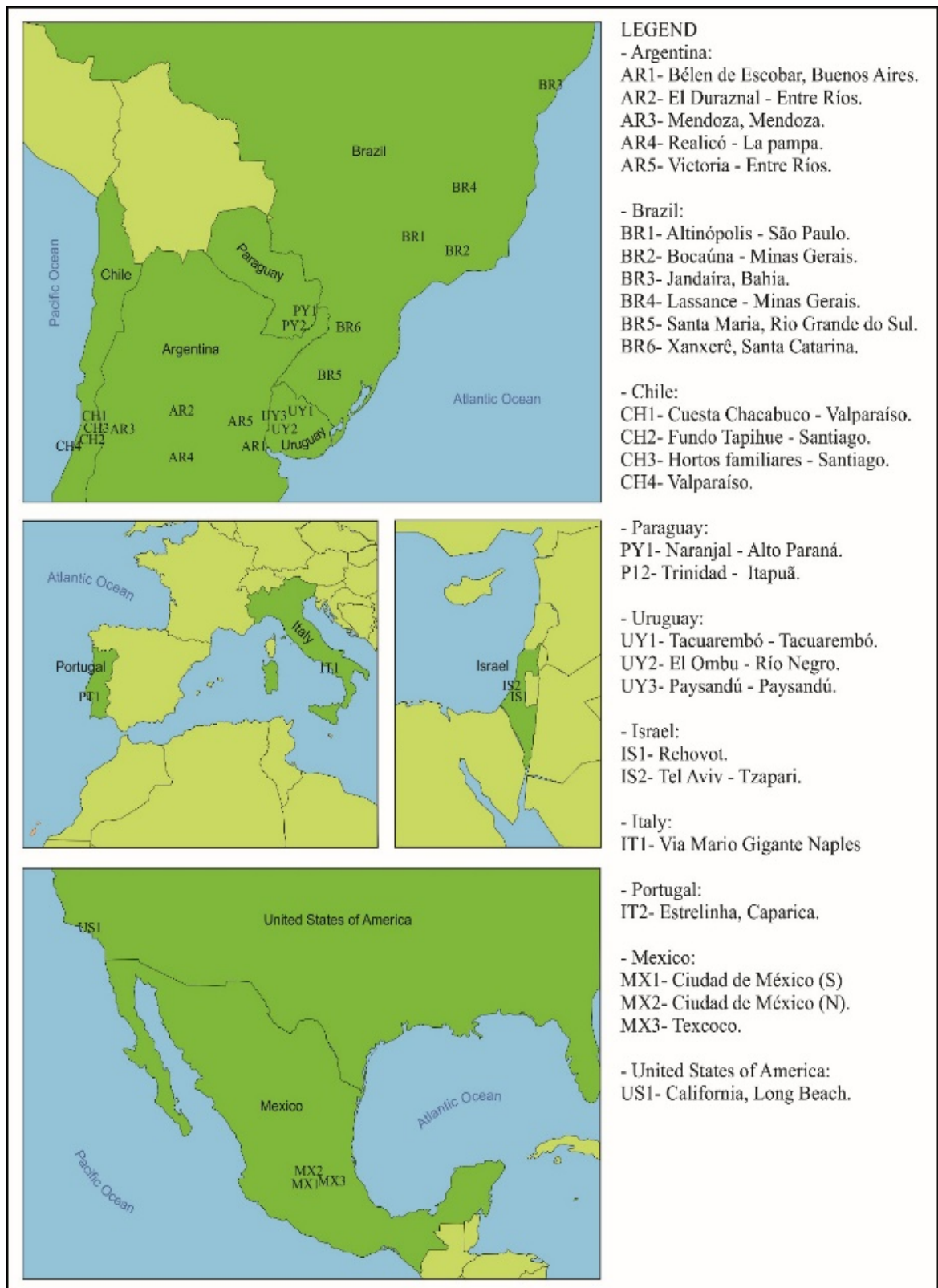


Fig. 2 Mitochondrial haplotype network. Circle sizes are in approximate proportion to haplotype frequencies. Each mark represents one nucleotide difference. Countries: Australia (AU); Reunion Island (RE); Argentina (AR); Brazil (BR); Chile (CL); Paraguay (PY); Uruguay (UY); Israel (IL); Mexico (MX); United States of America (US); Portugal (PT); Spain (ES); Italy (IT); South Africa (SA).

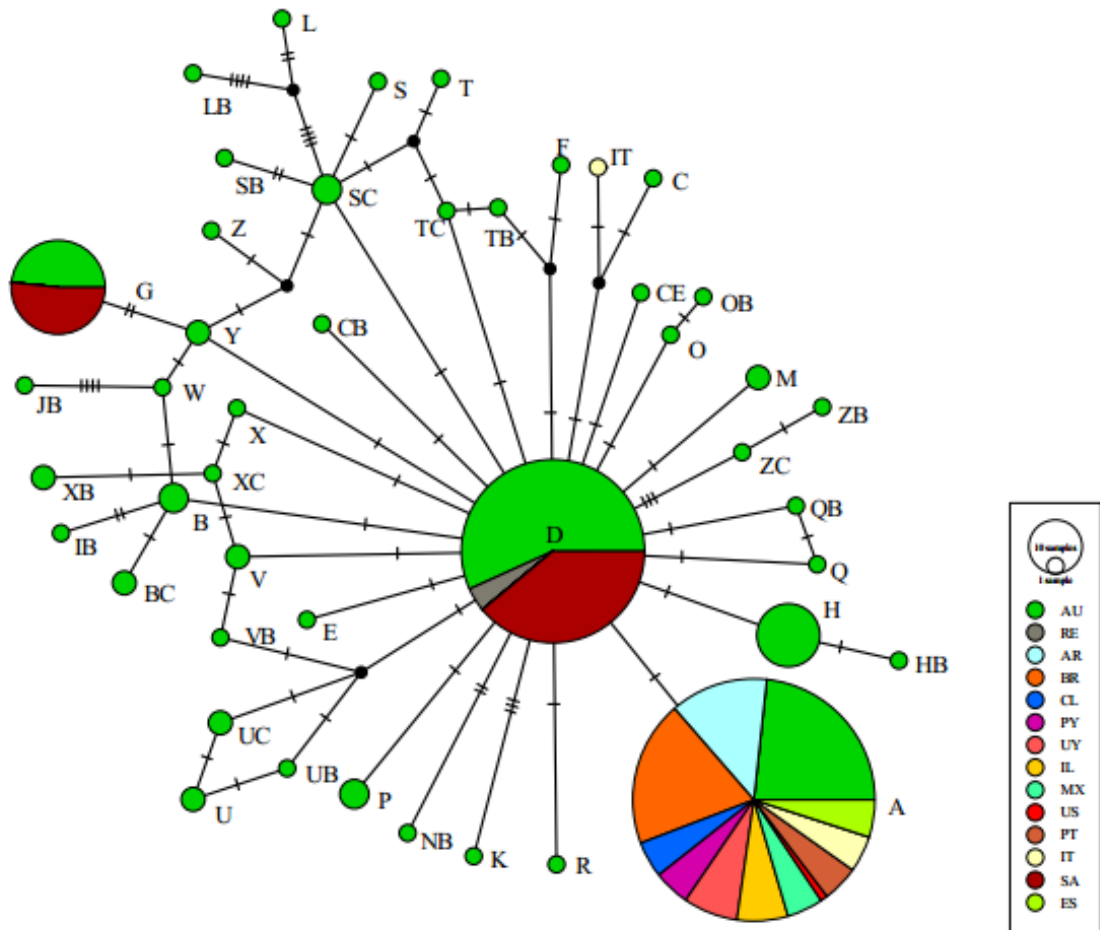


Fig. 3 Haplotype distribution of *T. peregrinus* in 14 countries. Australia (AU); Reunion Island (RE); Argentina (AR); Brazil (BR); Chile (CL); Paraguay (PY); Uruguay (UY); Israel (IL); Mexico (MX); United States of America (US); Portugal (PT); Spain (ES); Spain (ES); Italy (IT); South Africa (SA). The size of pie charts is relative to the number of individuals sequenced at each locality

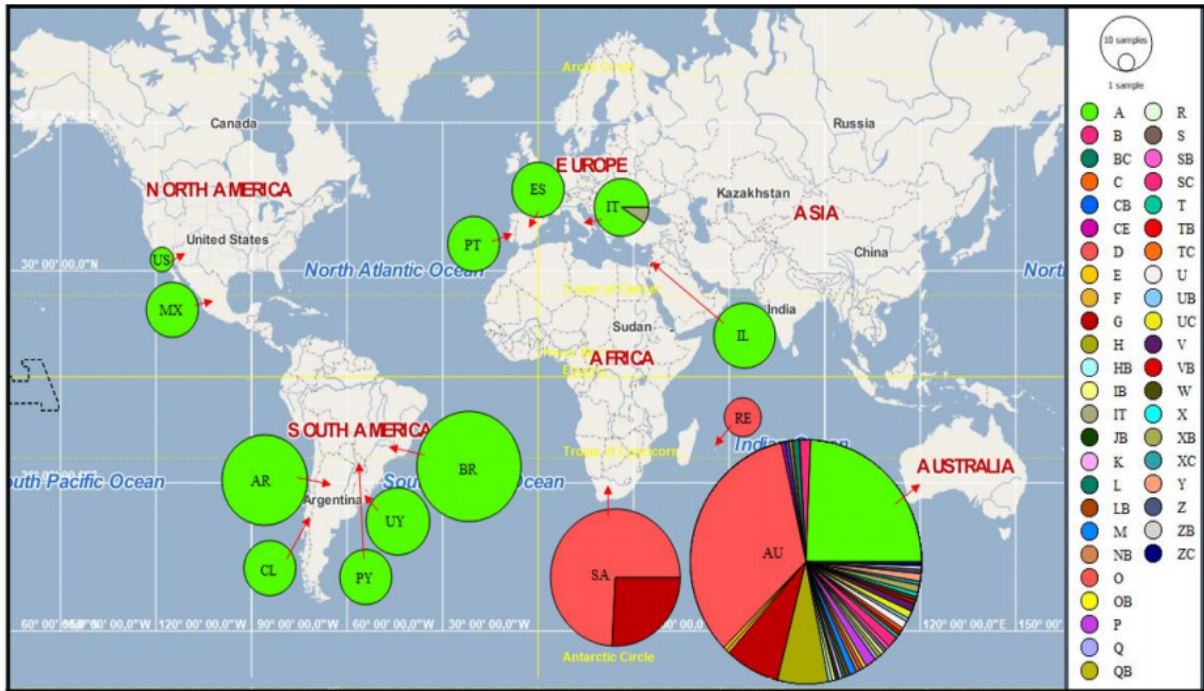


Fig. 4 Possible introduction and dispersal routes of *T. peregrinus* in the New and Old World.

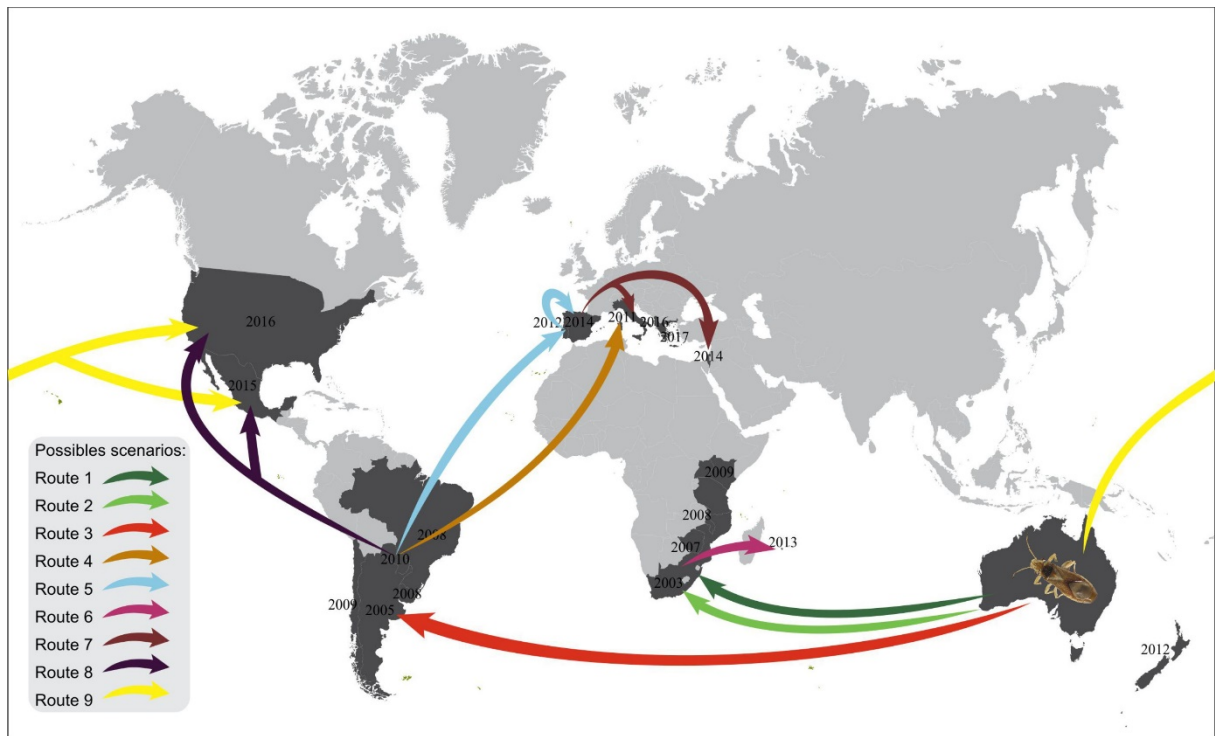


Table 1 First records of *Thaumastocoris peregrinus* outside Australia.

Country	Year	References
Africa		
South Africa	2003	9
Zimbabwe	2007	82,83,84
Malawi	2008	82
Kenya	2009	82,83
Reunion Island	2013	23
Uganda	-	82
Tanzania	-	82
Rwanda	-	82
Mozambique	-	42
South America		
Argentina	2005	4, 10
Brazil	2008	7
Uruguay	2008	85
Chile	2009	63
Paraguay	2010	86
Oceania		
New Zealand	2012	87
Mediterranean Basin		
Italy	2011	66, 88, 89
Portugal	2012	67
Israel	2014	90
Spain	2014	70
Albania	2016	71
Greece	2017	72
North America		
Mexico	2015	76
United States of America	2016	77,78

Table 2 Number of individuals used/sequenced by population.

Country	Populations	Number of individuals	Date of collection	Latitude	Longitude	Haplotypes	Reference
Australia	Sydney	118	22/06/2005	34°01'39"S	151°04'01"E	V, M, T, E, C, H, G, D, A	20
	Chelmsford	17	11/05/2008	26°15.014'S	151°49.359'E	O, TB, F, B, CB, D	20
	Coonabarabran	04	10/04/2004	31°16'S	149°17'E	M, A, D	20
	Dubbo	09	17/03/2004	32°14'38"S	148°36'32"E	VB, QB, OB, SC, B, D	20
	Nyngan	05	08/07/2010	31°33'35"S	147°11'39"E	W, P, D	20
	Cootamundra	05	23/03/2006	34°38'S	148°02'	V, Q, CE, A, D	20
	Narrandera	02	20/04/2006	34°45'S	146°33'E	X, D	20
	Canberra	11	26/07/2010	35°16'31"S	149°07'28"E	ZC, ZB, NB, XB, D	20
	Wagga Wagga	01	22/03/2006	35°07'S	147°22'E	P	20
	Seymour	03	18/07/2010	37°01'15"S	145°07'29"E	XC, SC, D	20
	Bacchus Marsh	03	16/07/2010	37°40'28"S	144°26'15"E	IB, BC	20
	Ararat	04	16/07/2010	37°16'59"S	142°55'41"E	TC, R, JB, D	20
	Renmark	06	10/07/2010	34°10'30"S	140°45'05"E	Z, SC, SB, LB, K, HB	20
	Olary	08	09/07/2010	32°16'53"S	140°19'36"E	S, UB, UC, U, Y	20
	Reunion Island	Mitcham	01	14/07/2010	34°59'20"S	138°37'39"E	L
KT273623		01	04/2015	-	-	D	23
KT273624		01	04/2015	-	-	D	23
KT273625		01	04/2015	-	-	D	23
KT273626		01	04/2015	-	-	D	23
Italy	KF437485	01	-	-	-	IT	21
	MN401749	10	04/2019	40°25'07.8"N	3°41'13.2"W	A	22
South Africa	32 localities	62	2006-2008	-	-	D, G	16
South America	Two Argentina, three Brazil, single Uruguay	32	2007-2008	-	-	A	16
Argentina	Bélen de Escobar	05	22/02/2017	34°18'52"S	58°52'11"O	A	This study
	El Duraznal	03	09/02/2017	31°16'29"S	58°14'55"O	A	
	Mendoza	03	15/02/2017	32°52'58"S	68°52'56"O	A	
	Realicó	02	21/02/2017	35°03'13"S	64°06'54"O	A	
	Victoria	02	13/02/2017	32°37'16"S	60°10'20"O	A	
Brazil	Altinópolis, SP	05	20/11/2016	21°05'25"S	47°25'37"O	A	This study
	Bocaúna, MG	01	13/01/2017	-	-	A	
	Jandaira,	05	08/02/2017	11°35'10"S	37°46'16"O	A	
	Lassance, MG	04	15/11/2016	18°02'44"S	44°48'38"O	A	
	Santa Maria, RS	05	22/12/2016	29°43'08"S	53°42'51"O	A	
Chile	Xanxerê, SC	05	15/02/2017	26°89'47"S	52°46'15"O	A	
	Cuesta	03	10/02/2017	34°29'42"L	63°54'26"N	A	This study
	Chacabuco						
	Fundo Tapihue	03	07/02/2017	32°06'03"L	63°33'50"N	A	
	Hortos familiares	02	07/02/2017	33°18'73"L	63°31'12"N	A	
Paraguay	Hahuel	02	10/02/2017	34°87'94"L	63°81'88"N	A	
	Naranjal	05	07/04/2017	25°59'30"S	55°07'17"O	A	This study
	Trinidad	05	07/04/2017	27°08'04"S	55°43'47"O	A	
Uruguay	El Ombu	02	10/02/2017	32°58'11"S	57°41'58"O	A	This study
	Paysandú	05	22/02/2017	32°22'47"S	58°03'12"O	A	
	Tacuarembó	03	22/02/2017	31°44'20"S	55°58'47"O	A	
Mexico	Mexico City (N)	04	20/08/2017	19°27'47"N	99°04'19"O	A	This study
	Mexico City (S)	03	20/08/2017	19°17'51"N	99°05'50"O	A	
	Texcoco	03	25/08/2017	19°29'38"N	98°53'37"O	A	

Country	Populations	Number of individuals	Date of collection	Latitude	Longitude	Haplotypes	Reference
The United States	Long Beach	02	17/07/2016	33°49'51"N	118°06'56"O	A	This study
Israel	Gan Le'ummi Yarqon	10	14/05/2018	32°05'59"N	34°48'26"E	A	This study
Italy	Rehovot Via Mario Gigante	04 10	14/05/2018 24/10/2017	31°52'22"N 40°50'0.8"N	34° 49'30"E 14°11'38"L	A A	This study
Portugal	Caparica	10	01/07/2017	38°38'43"N	09°12'51"O	A	This study
Total		423					

Mitochondrial DNA sequences from this study were combined with other sequences deposited in Genbank^{16,19,20,21} and some not deposited in Genbank²⁰

4 DISCUSSÃO

4.1 BAIXA DIVERSIDADE GENÉTICA NAS POPULAÇÕES DE *Thaumastocoris peregrinus*

A análise das sequências de mtDNA de populações de *T. peregrinus* da Argentina, do Brasil, do Chile, do Paraguai, do Uruguai (América do Sul); dos Estados Unidos, do México (América do Norte), da Espanha, de Portugal (Europa) e de Israel (Ásia) evidenciou que há uma baixa diversidade genética com predominância do haplótipo A. Novas análises moleculares com marcadores mais robustos permitirão conhecer e entender melhor a dinâmica da invasão e dispersão dessa praga fora da sua área endêmica.

Na Itália, já havia a presença do haplótipo IT e, com uma nova caracterização molecular do gene COI, foi possível verificar o aumento da diversidade genética no país. O haplótipo IT pode ser considerado como um haplótipo raro, porque possui baixa frequência na sua zona de origem, Austrália, uma vez, que após as amostragens realizadas por Nadel et al. (2010) e Lo et al. (2019), não foram amostrados espécimes pertencentes a esse haplótipo. Outra possibilidade bem provável é a existência de linhagens maternas ainda não amostradas na Austrália.

A variabilidade genética das populações, tanto de insetos nativos como de invasivos, são influenciadas por fatores abióticos e bióticos, tais como: características biológicas das espécies (duração do ciclo biológico, tipo de reprodução, número de descendentes, hospedeiros), ação antrópica (fragmentação de habitat) e forças evolucionárias (deriva genética, mutação, seleção natural) (AMOS; HARDWOOD, 1998), entre outros fatores. No entanto, nenhum desses processos atua como o único impulsionador de alterações que ocorrem nas populações, mas sim a interação conjunta entre as forças evolucionárias e biológicas consegue alterar a diversidade genética nas populações ao longo do tempo (SONSTHAGEN; WILSON; UNDERWOOD, 2017).

A seleção natural atua permanentemente sobre todas as populações (nativas e invasivas) podendo reduzir a diversidade genética, o que resultará em baixa diversidade durante as primeiras décadas de estabelecimento das espécies invasoras (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975). Um fator importante que pode influenciar a diversidade genética de uma população invasora é o efeito fundador, isto é, quando poucos indivíduos originam uma nova população, mesmo que essa população possa aumentar em número, os genes contidos nela são derivados desses poucos fundadores (KLUG et al., 2010). Para *T. peregrinus*, o efeito

fundador pode ter sido um dos motivos para a baixa diversidade genética no fragmento do gene COI analisado no presente trabalho.

Os dados de sequências de mtDNA da América do Sul mostram que a diversidade genética nesse local não aumentou até o momento. Novas incursões do mesmo haplótipo podem ter ocorrido e a seleção natural atuado como um fator positivo para a seleção e estabelecimento do haplótipo invasivo A, que se estabeleceu e se adaptou aos novos ambientes.

O processo de invasão e dispersão espacial a partir do ponto de introdução, muitas vezes, impõe diminuição no tamanho da população, o que reduz a variabilidade genética, como foi verificado para *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) com dois possíveis eventos de “*bottleneck*” (efeito gargalo) na Venezuela e entre Venezuela e Colômbia (PUILLANDRE et al., 2008). Embora seja difícil inferir se ocorreu algum efeito gargalo para a redução da população e da diversidade genética de *T. peregrinus*, tal fato não indica que isso afetou seu estabelecimento e a sua dispersão nas populações estudadas, mas sim que os indivíduos da linhagem materna com maior sucesso (A) conseguiram se adaptar e aumentar seus descendentes nas novas condições ambientais em que foram expostos.

4.2 SUCESSO NA DISPERSÃO E ESTABELECIMENTO DE *Thaumastocoris peregrinus*

Algumas características de *T. peregrinus* como tamanho pequeno (≈ 3 mm), ciclo biológico relativamente curto (ovo-adulto - 60 dias), capacidade reprodutiva (± 60 ovos/fêmea) e distribuição mundial de seus hospedeiros podem ser mencionadas para o seu sucesso de dispersão. Os eucaliptos estão mundialmente distribuídos, seja às margens das rodovias que conectam cidades, dentro e entre países, na arborização urbana, em parques, praças, avenidas, jardins botânicos, plantações comerciais e quebra-ventos, entre outros locais (REF). Assim, *T. peregrinus* encontrou um hospedeiro adequado em vários ecossistemas e várias das espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* são citadas como hospedeiras desse inseto-praga (SAAVEDRA; WITHERS; HOLWELL, 2015), que é a fonte ideal e disponível para alimentação, reprodução e disseminação.

Uma característica importante de *T. peregrinus* é a facilidade de adaptação a diferentes condições climáticas, como pode ser observado em um estudo realizado por Saavedra et al. (2015), no qual foi proposta uma projeção de distribuição mundial para esse inseto-praga, baseado em uma faixa de temperatura de 04-35°C. Nessa projeção, faixas de temperatura consideradas favoráveis e desfavoráveis para o desenvolvimento de *T. peregrinus* são analisadas. Um fato interessante é que espécimes do inseto foram encontrados em Mendoza, na

Argentina, durante uma das coletas realizadas para este estudo, sendo que nesse local, na projeção de Saavedra et al. (2015), aparece como não adequado para o desenvolvimento desse inseto-praga, em função das temperaturas negativas. Esse fato demonstra a elevada capacidade adaptativa dessa espécie a variações climáticas distintas.

Com o significativo aumento do fluxo de pessoas e do comércio de mercadorias em escala global (HURLEY et al., 2016), seja pelo aumento do poder aquisitivo das pessoas, pela facilidade de pagamento para realizar viagens e compras, pela necessidade de matéria-prima para processos industriais, juntamente com a diversidade dos meios de transporte [aéreo, marítimo, terrestre (ônibus, caminhões, carros, trens)], que podem ter facilitado a dispersão desse e de outros insetos-praga invasivos. No Estado de São Paulo, Brasil, *T. peregrinus* foi encontrado em árvores de eucalipto localizadas próximas aos aeroportos internacionais de Viracopos, em Campinas, e Guarulhos, em São Paulo, sugerindo que o inseto foi introduzido via transporte aéreo (WILCKEN et al., 2010).

Em decorrência do tamanho pequeno de muitos insetos, que os torna quase imperceptíveis, esses são transportados de forma não intencional, como pode ter ocorrido na dispersão do percevejo bronzeado do eucalipto. Pois, mesmo possuindo um sistema eficiente de biossegurança, muitas pragas ainda conseguem entrar e se estabelecer em novas áreas. Somado a isso, está o grande volume de materiais a serem inspecionados por fiscais agropecuários, principalmente, em portos, em aeroportos e nas fronteiras secas, além da infraestrutura precária.

Insetos não nativos chegam a Portos, nos Estados Unidos, principalmente, associados a materiais de embalagem de madeira sólida (SWPM), na maioria das vezes, em sua forma imatura, dificultando a identificação da espécie. A fim de facilitar a identificação dessas espécies interceptadas, foi adotado o código de barras DNA como uma ferramenta para auxiliar e facilitar a adoção das medidas de biossegurança (WU et al., 2017). Nesse contexto, verifica-se a necessidade de manter os postos de inspeção bem estruturados e equipados, pois eles podem evitar que insetos-pragas invasivos sejam introduzidos em áreas indenens.

Além da rápida e precisa identificação do inseto-praga, o DNA *barcoding* pode ser utilizado para mapear a origem da espécie-praga e as possíveis rotas de invasão, como realizado neste estudo para *T. peregrinus*. Para o avanço do manejo de pragas invasivas, como o percevejo bronzeado do eucalipto, são necessários constantes estudos que compreendem a rápida identificação do inseto alvo, o conhecimento de sua biologia, o comportamento, as formas de controle (químico, biológico, parasitoides, predadores), a estrutura genética, os meios de dispersão, monitoramento, os hospedeiros resistentes e as ações menos burocráticas para

importação de inimigos naturais, como *C. noackae* (amplamente estudado) para agilizar a liberação nos países com ocorrência da praga.

Como perspectivas futuras deste estudo de *T. peregrinus*, estão o sequenciamento e anotação dos genes da mitocôndria e a verificação das regiões com maior variabilidade para desenvolvimento de novos *primers* para explorar as populações e compreender melhor seu comportamento fora da região endêmica. Em vista da sua contenção e erradicação, dificilmente essas ações são possíveis, devido às características do inseto (pequeno, média capacidade reprodutiva, várias gerações ao ano, capacidade de adaptação) e do seu hospedeiro (eucalipto).

As medidas de biossegurança devem ser aprimoradas para aumentar a detecção de pragas invasivas, sendo que os postos de inspeção em todos os países poderiam ser mais bem estruturados, tanto com recursos humanos, como infraestrutura e equipamentos. Por exemplo, possuir um laboratório de biologia molecular que contenha materiais básicos para a caracterização molecular (Kit de rápida identificação (*lateral flow strip*), shaker ou termomixer, centrífuga, termociclador, cuba de eletroforese), e que o material, após a extração, possa ser enviado para sequenciamento. Tais medidas poderão precisar a identificação e evitar novas invasões de pragas agrícolas e florestais.

Além disso, deve haver maior colaboração dos órgãos de fiscalização dos países para realizar monitoramentos de forma contínua, em plantios monoespecíficos, áreas urbanas, ao longo das rodovias, seja com armadilhas adesivas, luminosas, feromônios; pela observação visual de sintomas nas árvores; pela observação das fases do ciclo biológico da praga (ovos, ninfas e adultos); pela intensificação da fiscalização nas fronteiras, aeroportos e portos buscando impedir ou mitigar as possibilidades de novas incursões.

5 CONCLUSÃO

O haplótipo A é o único presente (com base no fragmento do mtDNA utilizado neste estudo) nas populações estudadas de *T. peregrinus* da Argentina, do Brasil, do Chile, do Paraguai, do Uruguai, do México, dos Estados Unidos, de Portugal, de Espanha, de Israel, pois é o haplótipo dominante na faixa invasiva.

Na Itália, foi confirmada a presença do haplótipo A e o aumento da diversidade genética de *T. peregrinus*. Essa é a primeira caracterização molecular realizada para populações de *T. peregrinus* no Chile, no Paraguai, no México, nos Estados Unidos, em Portugal, na Espanha e em Israel.

Nove rotas de invasão são sugeridas para o sucesso da dispersão e estabelecimento de *T. peregrinus* nos países estudados.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2019. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- ALTIERI, M. A.; SILVA, E. do N.; NICHOLLS, C. I. **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 226 p.
- AMOS, W.; HARDWOOD J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B**, v. 353, p. 177–186, 1998.
- ANDORNO, A. V. et al. **Producción y uso del parasitoide *Cleruchoides noackae* como biocontrolador de la “chinche del eucalipto**. 2019. Disponível em: <<https://inta.gob.ar/noticias/produccion-y-uso-del-parasitoide-cleruchoides-noackae-como-biocontrolador-de-la-chinche-del-eucalipto>>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- ANDRADE, E. N. **O eucalipto**. 1. ed. Chácaras e Quintais, 1939. 118 p. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/navarro/>> Acesso em: 17 dez. 2019.
- ARNEMANN J. A. et al. Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. **Genet. Mol. Res.**, v.15, n. 2, gmr.15028292, 2016.
- ARNEMANN, J. A. et al. Multiple incursion pathways for *Helicoverpa armigera* in Brazil show its genetic diversity spreading in a connected world. **Scientific RepoRts** 9, 19380, 2019.
- ASOCIACIÓN FORESTAL ARGENTINA. **Folleto AFoA**. 2019. Disponível em: <https://www.foa.org.ar/web/folleto_foa_interactivo.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- BARBOSA, L. R. et al. Biological parameters, life table and thermal requirements of *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) at different temperatures. **Scientific Reports**, n. 9, 10174, 2019.
- BARBOSA, L. R. et al. Establishment in the field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an exotic egg parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Florida Entomologist**, v.100, n.2, p. 372-374, 2017.
- BARBOSA, L. R. et al. **Percevejo-bronzeado do eucalipto: reconhecimento, danos e direcionamentos para o controle**. Colombo: Embrapa Florestal, 2012. 27 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/937204/1/PercevejoBronzeadoDoc.239Leonardo.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2019.
- BARBOSA, L. R. et al. **Predação de *Thaumastocoris peregrinus* por *Chrysoperla externa***. Colombo: Embrapa Floresta, [s.n.], 2010. 4 p. (Comunicado Técnico, 257).
- BLACK, W. C. et al. Population genomics: genome-wide sampling of insect populations. **Annu. Rev. Entomol**, v. 46, p. 441–469, 2001.

BOISSIN, E. et al. Retracing the routes of introduction of invasive species: the case of the *Sirex noctilio* woodwasp. **Mol. Ecol.**, v. 21, p. 5728-5744, 2012.

BOLD SYSTEMS. **Barcode of Life Data System**. 2019. Disponível em: <<http://www.boldsystems.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

BOOTH, T. H. Eucalypt plantation and climate change. **Forest Ecol. Manag.** v. 301, p. 28-34, 2013.

BOSCANA, M.; BORAGNO, L. Actualidad del sector forestal. 2018. Disponível em:<http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/13_anuario_2018_-_forestal.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2020.

BUTTON, G. *Thaumastocoris peregrinus*. **NCT Forestry Co-operative Limited**, v. 63, p. 16-17, 2007. Disponível em: <<http://www.nctforest.com/upload/Publications/NV%202007%20April.pdf>>. Acesso em: 15 Jul. 2019.

CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, v.1228, p. 61-68, 2006.

CASWELL, H.; LENSINK, R.; NEUBERT, M. G. Demography and dispersal: life table response experiments for invasion speed. **Ecology**, v.84, n. 8, p. 1968-1978, 2003.

CHILIMA, C. et al. Insect outbreaks in the Lake Chilwa Basin: threats and opportunities in the basin social-ecosystem. In: CHIOTHA, S. et al. (Eds.). **Socio-Ecological Resilience to Climate Change in a Fragile Ecosystem: The Case of the Lake Chilwa Basin, Malawi**. 1. Ed. New York: Routledge, 2018. Cap 10.

COCK, M. J. W. **Biosecurity and Forests: an Introduction - with particular emphasis on forest pests**. Rome, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/J1467E/J1467E00.htm>>. Acesso em 20 dez. 2019.

CORALLO, B. et al. Entomopathogenic fungi naturally infecting the eucalypt bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), in Uruguay. **J. Appl. Entomol.**, v. 143, n. 5, p. 542-555, 2019.

CORDEIRO, G. et al. Molecular identification of three species of *Oncideres* (Coleoptera: Cerambycidae) using RAPD markers. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 3, e20180209, 2019.

COMITÉ DE SANIDAD VEGETAL. **Bienvenidos al Comité de Sanidad Vegetal – COSAVE**. Santiago, 2017. Disponível em: <<http://www.cosave.org/pagina/bienvenidos-al-comite-de-sanidad-vegetal-cosave>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

COSTION, C. et al. Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. **Plos One**, v.6, p.e26841, 2011.

CRUICKSHANK, R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **System. Appl. Acar.**, v. 7, n. 1, p. 3–14, 2002.

CUELLO, E. M. Plagas de *Eucalyptus* spp. en Argentina: situación actual y avances para su control. **7º congreso Forestal Español**. 2017. Disponível em: <<http://7cfe.congresoforestal.es/sites/default/files/comunicaciones/83.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

DAVIDSON, J. “**Ecological Aspects of Eucalyptus Plantations**” FAO Corporate Document Repository. Proceedings of Regional Expert Consultation on Eucalyptus. 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ac777e/ac777e06.htm#bm06>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

DELL'ARCIPRETE, V. **Combate perceiverjo Eucalyptus**. Argentina, 2016. Disponível em: <<http://inta.gob.ar/noticias/combatiedo-la-chinche-del-eucalipto>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

DIAS, T. K. R., et al. Predation of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) by *Atopozelus opsimus* (Hemiptera: Reduviidae) in Brazil. **ISJ-Invertebrate Survival Journal**, v. 11, p. 224–227, 2014.

DÍAZ, E. A. B.; CORONEL, R. S.; GODZIEWSKI, D. Consideraciones sobre dos nuevas plagas del eucalipto em Paraguay, El psílido de la concha o escudo *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: psyllidae) y La chinche marrón *Thaumastocoris peregrinus* (hemiptera: thaumastocoridae). **Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Parag.**, v.17, n. 1, p. 72-75, 2013.

DOWLING, A. P. G. et al. Phylogenetic investigation of the genus *Raoiella* (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity distribution and word invasions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 3-4, p. 257-269, 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **O eucalipto**. Brasília, 2017a. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/eucalipto>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesquisa estabelece controle biológico para principal praga exótica do eucalipto**. 2017b. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20806194/pesquisa-estabelece-controle-biologico-para-principal-praga-exotica-do-eucalipto>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

EPPO Global Database. *Thaumastocoris peregrinus*. Disponível em: <<https://gd.eppo.int/taxon/THMCPE>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

FAO. **A global review of forest pests and diseases**. Rome: FAO, 2009. 235 p.

FAO. **Biosecurity in food and agriculture**. 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/003/X9181E.HTM>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220 p.

FLADUNG, M. et al. Differentiation of six Eucalyptus trees grown in Mexico by ITS and six chloroplast barcoding markers. **Silvae Genetica**, v. 64, n. 3, p. 121-130, 2015.

GARCIA, A. et al. First record of *Thaumastocoris peregrinus* in Portugal and of the Neotropical predator *Hemerobius bolivari* in Europe. **Bulletin of Insectology**, v. 66, n. 2, p. 251–256, 2013.

GARLET, J. et al. Flutuação populacional de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em plantio clonal de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em Alegrete, RS, Brasil. **Anais... VII Congresso de Medio Ambiente**. La Plata, Argentina, 2012. p. 1-10.

GONZÁLEZ, A. et al. A male aggregation pheromone in the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Thaumastocoridae). **Psyche**, v. 2012, 2012.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 2 ed. Cary: Sinauer Associates, 1989. 682 p.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London - **Biological Sciences** (Series B), v. 270, n. 1512, p. 313–322, 2003.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society – **Biological Sciences** (Series B), v. 270, n. 1512, p. 96–99. 2003.

HECKEL, D. G. Genomics in pure and applied entomology. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 48, p. 235–260, 2003.

HEYDEN, T. V. D. The first record of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Heteroptera: Thaumastocoridae) for Albania. **Rev Gaditana Entomol.**, v. VIII, p. 133-135, 2017.

HODEL, D. R.; ARAKELIAN, G.; OHARA, L. M. The Bronze Bug Another New Threat to Eucalypts in California. **PalmArbor**, v. 5, p. 1-11, 2016.

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

IBÁ. Industria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual 2019**. Disponível em: <<https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

INFOR. Instituto Forestal. **Anuario Forestal 2019**. Boletín Estadístico N° 168. 2019. Disponível em: <<https://wef.infor.cl/publicaciones/publicaciones.php>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

INIA. Instituto Nacional de Investigación Agropecuária. **Lanzamiento de importante herramienta para combatir plagas forestales: avispa parasitoide**. Montevideo, 2013. Disponível em: <<http://www.inia.org.uy/online/site/1131094I1.php>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

INSTITUTO FORESTAL NACIONAL. **Rentabilidad de la inversión en plantación de eucalyptus com fines maderables**. 2016. Disponível em: <http://www.infona.gov.py/application/files/8514/3204/8894/Rentabilidad_de_la_inversion_forestal_220414.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2019.

IPEF. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. **PROTEF realiza primeira liberação do inimigo natural do percevejo-bronzeado no Brasil**. 2012. Disponível em: <<http://www.ipef.br/ipefexpress/nr050.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

JACOBS, D. H.; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to Eucalyptus trees: research in action. **South African Journal of Science**, v. 101, n. 5-6, p. 233-236, 2005.

JIMÉNEZ-QUEIROZ, E. et al. First Record of the Bronze Bug, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Mexico. **J. Agric. Urban Entomol.**, v. 32, n. 1, p. 35-39, 2016.

KELLISON, R. C.; LEA, R.; MARSH, P. Introduction of Eucalyptus spp. into the United States with Special Emphasis on the Southern United States. **International Journal of Forestry Research**, v. 2013, Article ID 189393, 9 p., 2013.

KLUG, S. W. et al. **Conceitos de genética**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 896 p.

LAUDONIA, S; SASSO, R. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to Eucalyptus trees. **Bulletin of Insectology**, v.65, n.1, p. 89-93, 2012.

LARUE, E.A. et al. Population genetic structure of the round goby in Lake Michigan: implications for dispersal of invasive species. **Hydrobiologia**, v.663, n. 1, p.71-82, 2011.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, n. 6, p. 1110–1116, 2015.

LIMA, A. C. **Insetos do Brasil: Coleópteros**. 9º Tomo, 3ª Parte. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1955. 289 p. (Série Didática, 11).

LIN, N. Q.; HUBER J. T.; LA SALLE, J. The Australian Genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Zootaxa**, v. 1596, p. 1-111, 2007.

LO, N. et al. Population genetics of the Australian eucalypt pest *Thaumastocoris peregrinus*: evidence for a recent invasion of Sydney. **J. Pest Science**, v. 92, p. 201-2012, 2019.

LOCKWOOD, J. L.; HOOPES, M. F.; MARCHETTI, M. P. **Invasion Ecology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 304 p.

LORENCETTI, G. A. T. et al. Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Isaria* sp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 403-411, 2018.

LORENCETTI, G. A. T. et al. Ocorrência espontânea de *Beauveria bassiana* Vuill. 1912 (Ascomycetes: Clavicipitaceae) em *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Ciência Florestal**, 27, 1403 – 1407, 2017.

LORENCETTI, G. A. T. et al. Produtos Alternativos para Controle de *Thaumastocoris peregrinus* e Indução de Resistência em Plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 4, p. 541-548, 2015.

MACHADO, D. N. et al. Avaliação de inseticidas no controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) percevejo-bronzeado em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 23, p. 245-250, 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Acordos e Convenções internacionais**. Brasil, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/acordos-convencoes>>. Acesso em: 24 set. 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa atualiza lista de espécies animais exóticas para facilitar a pesquisa**. 2019. Disponível em: <agricultura.gov.br/noticias/mapa-atualiza-lista-de-especies-animais-exoticas-para-facilitar-a-pesquisa>. Acesso em: 23 dez. 2019.

MAPONDERA, T. S. et al. Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). **Aust. J. Entomol.**, v. 51, n. 3, p. 171-188, 2012.

MARTÍNEZ, G.; BIANCHI, M. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). **Agrociencia**, v. 14, p. 15-18, 2010.

MARTÍNEZ, G. et al. Life-history analysis of *Thaumastocoris peregrinus* in a newly designed mass rearing strategy. **Bulletin of Insectology**, v. 67, p. 199– 205, 2014a.

MARTÍNEZ, G. et al. Oviposition preference but not adult feeding preference matches with offspring performance in the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 163, p. 101–111, 2017.

MARTÍNEZ, G. et al. Seasonal dynamics of the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* on *Eucalyptus* spp. plantations after four years of monitoring. **XXIV IUFRO World Congress**, Salt Lake City, Estados Unidos da América, 2014b.

MARTÍNEZ, G.; GONZÁLEZ, A.; DICKE, M. Rearing and releasing the egg parasitoid *Cleruchoides noackae*, a biological control agent for the Eucalyptus bronze bug. **Biological Control**, v. 123, p. 97-104, 2018.

MARTÍNEZ, G.; SIMETO, S.; BALMELLI, G. La chinche del eucalipto en Uruguay: panorama de la investigación a un año de su detección oficial. **Revista INIA**, n. 18, p. 33-35, 2009.

MASCARIN, G. M. et al. Natural occurrence of *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), an invasive pest recently found in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, n. 3, p. 401-404, 2012.

MAYORGA, S. I et al. Detection of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) associated to *Eucalyptus* spp. in Chile. (Detección de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) asociado a *Eucalyptus* spp. en Chile. **Bosque**, v. 32, n. 3, p. 309-313, 2011.

MAYORGA, S. I. et al. **Detección y Control del “Chinche de los eucaliptos” *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) em Chile.** Santiago: Servicio Agrícola y Ganadero: División Protección Agrícola y Forestal, 2014, 32 p.

MENDEL, Z.; PROTASOV, A. The entomofauna on Eucalyptus in Israel: A review. **Eur. J. Entomol.**, v.116, p. 450-460, 2019.

MENDONÇA, R. S. et al. Diagnóstico molecular na identificação de pragas agrícolas. In: SUGAYAMA, R. L. et al. (Eds). **Defesa vegetal - Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectivas.** 1. ed. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2015. cap. 8, p.135-164.

MUTITU, E. K. et al. Biology and rearing of *Cleruchoidea noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for the biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 5, p.1979–1985, 2013.

NADEL, R. L. et al. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. **Biological Invasions**, v. 12, n. 5, p. 1067–1077, 2010.

NADEL, R. L. et al. Mitochondrial DNA diversity of *Cleruchoidea noackae* (Hymenoptera: Mymaridae): a potential biological control agent for *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **BioControl**, v.57, n. 3, p. 397-404, 2012.

NADEL, R. L. et al. Population dynamics of *Thaumastocoris peregrinus* in Eucalyptus plantations of South Africa. Population dynamics of *Thaumastocoris peregrinus* in Eucalyptus plantations of South Africa. **J. Insect Sci.**, v. 88, p. 97-106, 2015.

NADEL, R. L.; NOACK, A. E. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. **International Journal of Pest Management**, v. 58, n. 3, p. 257-266, 2012.

NAVIA, D. Biologia da invasão. In: SUGAYAMA, R. L. et al. (Eds). **Defesa vegetal - Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectivas.** 1 ed. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, p. 27-55, 2015.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information.** 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 01 dez. 2019.

NEI, M., MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v. 29, p. 1–10, 1975.

NOACK, A. E.; COVIELLA, C. E. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Hemiptera: Thaumastocoridae): first recor of this invasive pest of Eucalyptus in the Americas. **General and Applied Entomology**, v. 35, p. 13-14, 2006.

NOACK, A. E.; CASSIS, G.; ROSE, H. A. Systematic revision of *Thaumastocoris* Kirkaldy (Hemiptera: Heteroptera: Thaumastocoridae). **Zootaxa**, v. 3121, p. 1-60: p. 38-41, 2011.

NOACK, A. E. et al. Efficacy of imidacloprid in the control of *Thaumastocoris peregrinus* on *Eucalyptus scoparia* in Sydney, Australia. **Arboriculture & Urban Forestry**, v.35, n.4, p. 192-196, 2009.

NOACK, A. E.; ROSE, H. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. in the laboratory with some observations on behavior. **General and Applied Entomology**, v. 36, p. 27-33, 2007.

NOVOSELSKY, T.; FREIDEBERG, A. First record of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in the Middle East, with biological notes on its relations with eucalyptus trees. **Israel Journal of entomology**, v. 46, p. 43-55, 2016.

NUGNES, F. et al. Genetic Diversity of the Invasive Gall Wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* Endosymbiont, and Associated Sex-Ratio Differences. **Plos One**, 1-19, 2015.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispensal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, n. 4, p. 551-568, 1999.

PALMA, A. M.; ALENCAR, M. A. A. Normas Internacionais de Medidas Fitossanitárias. In: SUGAYAMA, R. L. et al. (Eds.). **Defesa Vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectivas**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, p. 309-332. 2015.

PANETSOS, C. P. **Publications**. Forest Research Institute, Ministry of Agriculture, Athens 1970. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19700604107>>. Acesso em: 17 dez. 2019.

PEREIRA, J. M. et al. Ocorrência de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v.43, n.2, p. 254-257, 2013.

PETRAKIS, P. V. First record of the bug *Thaumastocoris peregrinus* in Greece. **Entomol Hellenica**, v. 27, p.1-9, 2018.

PUILLANDRE, N. et al. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. **Biol Invasions** v. 10, n. 3, p. 319–333, 2008.

QI, S. **Eucalyptus in China**. Chinese Forestry Publications, Beijing, China, 2002, 517 p.

ROSA, A. J. M.; SONODA, K.C. **Aplicação de DNA Barcoding no levantamento de espécies de insetos**. 2010. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=22386&secao=Artigos%20Especiais>>. Acesso em: 08 nov. 2019.

REJMÁNEK, M.; RICHARDSON, D. M. Eucalypts. In: SIMBERLOFF, D.; REJMÁNEK, M (Eds). **Encyclopedia of Biological Invasions**. Berkeley, CA: University of California. 2011. p. 203-209.

SAAVEDRA, M. C. et al. The potential global distribution of the Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Agricultural and Forest Entomology**, v. 17, p. 375-388, 2015.

SAAVEDRA, M. C.; WITHERS, T. M.; HOLWELL, G. I. Susceptibility of four Eucalyptus host species for the development of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Forest Ecol. Managem.**, v. 336, p. 210-216, 2015.

SAG. Servicio Agrícola y Ganadero. **Resolución N° 4798: Declara el control obligatorio de la plaga, chinche de los Eucalyptus, *Thaumastocoris peregrinus***. Santiago: Diario Oficial de la República de Chile N° 39.450, 2009. 56 p.

SANCHES, M. M.; SILVA, M. L. Meios de disseminação de pragas agrícolas. In: SUGAYAMA, R. L. et al. (Eds). **Defesa vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectivas**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, 2015. p. 56-77.

SANTADINO, M. et al. Feeding preference of *Thaumastocoris peregrinus* on several Eucalyptus species and the relationship with the profile of terpenes in their essential oils. **Phytoparasitica**, v. 45, p. 395-406, 2017b.

SANTADINO, M. et al. First evidence that *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) feeds from mesophyll of Eucalyptus leaves. **Environ Entomol.**, v. 46, n. 2, p. 251-257, 2017a.

SANTADINO, M.; LILJESTROM, G.; COVIELLA, C. Preferencia alimentaria y de oviposición de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellapé (Heteroptera: Thaumastocoridae), chinche del eucalipto, sobre distintas especies de *Eucalyptus* spp. en Argentina. In: CONGRESO FORESTAL MUNDIAL, 2009, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: 2009, CD-ROM.

SANTADINO, M. V.; VIRGALA, M. B. R.; COVIELLA, C. E. First record of native predators on the invasive species *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in Eucalyptus in Argentina. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 72, n. 3-4, p. 219-222, 2013.

SANTOS, F. A. **Filogeografia molecular de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Aphalaridae) e seu parasitoide *Psyllaephagus bliteus* (Hymenoptera: Encyrtidae) no Brasil**. 2019. 39 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Botucatu, São Paulo, 2019.

SIMBERLOFF, D. Biological invasions: Much progress plus several controversies. **Contrib. Sci.** v. 9, p. 7–16, 2013.

SMANIOTTO, M. A. et al. Biologia de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero e Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) em dez espécies de eucalipto. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 2, p. 679-685, 2017.

SOLFERINI, V. N.; SELIVON, D. Polimorfismos de isozimas. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. (Eds.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. p.165-169.

SOLIMAN, E. P. **Bioecologia do percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) em eucalipto e prospecção de inimigos naturais**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônômicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP, 2010.

SOLIMAN, E. P. **Controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos**. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014.

SOLIMAN, E. P. et al. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different eucalyptus species and hybrids. **Phytoparasitica**, v. 40, n. 3, p. 223-230, 2012.

SOLIMAN, E. P. et al. Susceptibility of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), a Eucalyptus pest, to entomopathogenic fungi. **Scientia Agricola**, v.76, n.3, p.255-260, 2019.

SONSTHAGEN, S. A.; WILSON, R. E; UNDERWOOD, J. G. Genetic implications of bottleneck effects of differing severities on genetic diversity in naturally recovering populations: An example from Hawaiian coot and Hawaiian gallinule. **Ecol Evol.**, v. 7, n. 23, p. 9925-9934, 2017.

SOPOW, S.; GEORGE, S.; WARD, N. Bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*: a new Eucalyptus pest in New Zealand. **Surveillance**, v. 39, p. 43-46, 2012.

SOUZA, G. K. et al. First record of a native heteropteran preying on the introduced eucalyptus pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 2, p. 517-520, 2012.

STADEN R. B. K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden package, 1998. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 115-130, 2000.

STENGER, L. D. **Toxicidade dos óleos essenciais sobre *Thaumastocoris peregrinus*, *Cleruchoides noackae* e na indução de resistência em *Eucalyptus benthamii***. 2017. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistema) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná. 2017.

TAY et al. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, 45302, 2017.

TORDIN, C. **Instituições de pesquisa buscam soluções para combater o percevejo-bronzeado, praga exótica do eucalipto**. Jaguariúna, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/nova/mostra2.php3?id=547>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

VENETTE, R.C. **The challenge of modelling and mapping the future distribution and impact of invasive alien species**. 2015. Disponível em: <http://www.fs.fed.us/nrs/pubs/jrnl/2015/nrs_2015_venette_001.pdf> Acesso em: 06 nov. 2019.

VIVAS, L.; CRESPO, J.; JACINTO, V. Primer registro de la especie invasora *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 en España y nuevos datos para Portugal (Hemiptera: Thaumastocoridae). **BV News**, v. 4, n. 48, p. 30-35, 2015.

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

WILCKEN, C. F. et al. Chemical vs entomopathogenic control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) via aerial application in eucalyptus plantations. **Scientific Reports**, v. 9, p. 9416, 2019.

WILCKEN, C. F. **Percevejo-bronzeado do eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras**. Programa de Proteção Florestal - PROTEF/ IPEF - Alerta PROTEF, 2008. 11 p. Disponível: <<http://www.ipef.br/protecao/alerta-percevejo.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

WILLIAMSOM, M. **Biological invasions**. London, UK: Chapman & Hall, v. 15, 1996, 244 p.

XIE et al. Advances in eucalypt research in China. **Advances in eucalypt research in China. Front. Agr. Sci. Eng.**, v. 4, n. 4, p. 380-390, 2017.

WU, Y. et al. Identification of wood-boring beetles (Cerambycidae and Buprestidae) intercepted in trade-associated solid wood packaging material using DNA barcoding and Morphology. **Scientific Reports**, v., 40316, 2017.