

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

Daniela Moro

**TÉCNICAS INTEGRATIVAS DE IDENTIFICAÇÃO DE
PARASITOIDES DE *Bemisia tabaci* (GENNADIUS, 1889)**

Santa Maria, RS
2021

Daniela Moro

TÉCNICAS INTEGRATIVAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PARASITÓIDES DE *Bemisia tabaci* (GENNADIUS, 1889)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Agrobiologia**.

Orientador: Prof. Jonas André Arnemann

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Moro, Daniela
TÉCNICAS INTEGRATIVAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PARASITOIDES
DE Bemisia tabaci (GENNADIUS, 1889) / Daniela Moro.- 2021.
79 p.; 30 cm

Orientador: Jonas André Arnemann
Coorientadores: Valmir Antonio Costa, Wee Tek Tay Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas,
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2021

I. Controle Biológico I. Arnemann, Jonas André II Costa, Valmir Antonio
III. Tay, Wee Tek IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, DANIELA MORO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Daniela Moro


TÉCNICAS INTEGRATIVAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PARASITÓIDES DE *Bemisia tabaci* (GENNADIUS, 1889)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Agrobiologia**.

Aprovado em 22 de março de 2021:



Jonas André Arnemann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Jerson Vanderlei Carus Guedes, Dr. (UFSM)



Gustavo Rodrigues Alves, Dr. (Koopert do Brasil)

Santa Maria, RS
2021

DEDICATÓRIA

Dedico, aos meus pais Irineu e Marilete.

Ofereço, ao meu esposo Felipe.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por todas as pessoas que colocou no meu caminho e por ter emanado tanta luz durante estes quase 2 anos de mestrado;

Aos meus pais Irineu Luiz Moro e Marilete Carmen Dambrós Moro pela educação, amparo, compreensão e amor, nem todas as palavras seriam capazes de demonstrar o que sinto por vocês;

Ao meu companheiro de vida Felipe Augusto Reichert pelo apoio incansável, zelo e incentivo na busca dos meus sonhos, você foi o alicerce para realização desse mestrado;

As famílias Dambrós e Reichert pela torcida e apoio, incluo aqui Bella e Violeta;

Ao meu orientador Jonas André Arnemann por todos os ensinamentos de vida, pelo incentivo e parceria durante o mestrado, sinto-me honrada em ter recebido sua brilhante orientação;

Ao meu coorientador Valmir Antonio Costa pela prestatividade e conhecimentos compartilhados;

A pesquisadora Ana Wengrat minha “mãe entomológica” pela amizade e aprendizado, ao seu esposo Almir e seus filhos Guilherme e Felipe, levo vocês em meu coração;

Aos integrantes do Molecular Insect Lab minha segunda família, o meu carinho e gratidão pela ajuda na condução deste trabalho, em especial: Lauren, Sarah, Scheila e João;

As minhas irmãs de vida Julia e Dayana, pelo apoio e amizade;

Ao Professor Alberto Soares Correa e a toda equipe do Entomol, que sempre me acolheram e me oportunizaram crescimento pessoal e científico;

A EMATER em especial aos extensionistas das regionais de Santa Maria e Lajeado;

As Associações e aos produtores que sempre me receberam com apressos para as coletas;

Ao Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da UFSM pelo suporte, cito com maior carinho dos colegas: Gustavo Ugalde, Clérisson Perini e Professor Jerson Vanderlei Carus Guedes;

Aos amigos do Mais Soja, em especial Lucas e Rubens, que me fizeram olhar para agricultura de uma forma diferenciada, o que contribui em larga escala para minha identidade profissional;

As minhas colegas de estadia em Santa Maria Jaine e Vitória pela irmandade construída;

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia;

Aos professores e demais colaboradores do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria;

A UAP e CAED por toda ajuda e suporte durante minha pós-graduação;

A Capes pela concessão da bolsa;

E todos aqueles que não foram mencionados nestes agradecimentos e que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, recebam minha gratidão.

Por vezes o que nos distancia do sucesso é a insegurança de acreditarmos em nós mesmos.

Palavras de uma grande amiga

RESUMO

TÉCNICAS INTEGRATIVAS DE IDENTIFICAÇÃO DE PARASITOIDES de *Bemisia tabaci* (GENNADIUS, 1889)

AUTOR: Daniela Moro

ORIENTADOR: Jonas André Arnemann

A mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) é um sugador que causa problemas em inúmeras culturas de importância agrícola devido a sua voracidade e curto ciclo de vida. De forma geral, o controle desta praga é realizado com inseticidas químicos por estes apresentarem certas limitações (p.ex. período de carência e seleção de populações resistentes), o controle biológico com o uso de parasitoides (em sua maioria da ordem Hymenoptera) é atualmente uma importante estratégia de manejo. Vespas parasitoides da família Aphelinidae (Hymenoptera) realizam este controle tanto por meio de processos de reprodução quanto de alimentação. Identificar espécies de parasitoides nativos dentro de sistemas agrícolas afetados por espécies de mosca-branca é o primeiro passo para o desenvolvimento de diretrizes para a criação e liberação de agentes de controle biológico visando este complexo de espécies de pragas altamente prejudiciais. Análises taxonômicas e filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos e moleculares, respectivamente, confirmaram a ocorrência de *Encarsia formosa* (Gahan, 1924) mosca-branca, atacando tomates em casa de vegetação de Santa Maria, *Encarsia porteri* (Mercet, 1928) em soja, em campo aberto em Santa Maria e *Eretmocerus mundus* Mercet, 1931 em tomate em casa de vegetação em São José do Hortêncio, todos no estado do Rio Grande do Sul (Sul do Brasil). Este é o primeiro relato de *En. formosa*, *En. porteri* e *Er. mundus* parasitando *B. tabaci* no Sul do Brasil, e a primeira sequência parcial do gene mtCOI de *En. porteri* sendo relatada e caracterizada. A razão sexual das populações estudadas apontam para prevalência feminina e masculina nos gêneros *Encarsia* e *Eretmocerus*, respectivamente. O uso combinado da caracterização taxonômica e molecular permite a identificação de parasitoides de mosca-branca.

Palavras-chaves: *Encarsia*. *Eretmocerus*. Aphelinidae. Hymenoptera. Controle biológico.

ABSTRACT

INTEGRATIVE TECHNIQUES FOR IDENTIFYING *Bemisia tabaci* PARASITOIDS (GENNADIUS, 1889)

AUTHOR: Daniela Moro

ADVISOR: Jonas André Arnemann

The whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) is a sucker that causes problems in countless crops of agricultural importance due to its voracity and short life cycle. In general, the control of this pest is carried out with chemical insecticides because they have certain limitations (e.g., period of grace and selection of resistant populations), biological control with the use of parasitoids (mostly of the order Hymenoptera) is currently an important management strategy. Parasitoid wasps of the family Aphelinidae (Hymenoptera) carry out this control by means of both reproduction and feeding processes. Identifying native parasitoid species within agricultural systems affected by whitefly species is the first step in the development of guidelines for the creation and release of biological control agents aimed at this highly harmful pest species complex. Taxonomic and phylogenetic analyzes based on morphological and molecular characters, respectively, confirmed the occurrence of *Encarsia formosa* (Gahan, 1924) whitefly, attacking tomatoes in a greenhouse in Santa Maria, *Encarsia porteri* (Mercet, 1928) on soybeans, in the field. opened in Santa Maria and *Eretmocerus mundus* Mercet, 1931 in tomatoes in a greenhouse in São José do Hortêncio, all in the state of Rio Grande do Sul (Southern Brazil). This is En's first account. beautiful, *En. porteri* and *Er. mundus* parasitizing *B. tabaci* in southern Brazil, and the first partial sequence of the mtCOI gene of *En. porteri* being reported and characterized. The sex ratio of the studied populations points to a female and male prevalence in the *Encarsia* and *Eretmocerus* genders, respectively. The combined use of taxonomic and molecular characterization allows the identification of whitefly parasitoids.

Keywords: *Encarsia*. *Eretmocerus*. Aphelinidae. Hymenoptera. Biological control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo de desenvolvimento de diferentes estágios de vida e sexos, longevidade e parâmetros reprodutivos femininos de <i>Encarsia formosa</i> criada em <i>Bemisia tabaci</i> MED alimentando-se de diferentes tomateiros (média ± erro padrão).....	27
Tabela 2 – Tempo de emergência (em dias) de <i>Eretmocerus mundus</i> sobre <i>Bemisia tabaci</i> em pimentão e tomate, nas condições de 25 +/- 1°C.....	27
Tabela 3 – Characterization of the sampling sites for parasitoids of <i>Bemisia tabaci</i> nymphs (Hemiptera: Aleyrodidae). Rio Grande do Sul, Brazil. February, 2019.....	58
Tabela 4 – Primer sequences and PCR conditions.	58
Tabela 5 – Species, accession numbers, sampling localities and gene region of the GenBank sequences used to construct the phylogenetic trees.....	58
Tabela 6 – Sex ratio of parasitoids (Hymenoptera: Aphelinidae) from whitefly nymphs (Hemiptera: Aleyrodidae) collected at different crops and environments at SM and SJH, RS, Brazil, and their sex ratio. February, 2019.	59
Tabela 7 – Nucleotide composition of the mitochondrial and nuclear genes of the genera <i>Encarsia</i> and <i>Eretmocerus</i>	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Encarsia porteri</i> , antenna (female).	60
Figura 2 – <i>Encarsia porteri</i> , front view of head (female).	60
Figura 3 – <i>Encarsia porteri</i> , mid leg (female).	61
Figura 4 – <i>Encarsia formosa</i> , dorsum of mesosoma (female).	61
Figura 5 – <i>Encarsia formosa</i> antenna (female).	62
Figura 6 – <i>Encarsia formosa</i> mid tarsus (female).	62
Figura 7 – <i>Eretmocerus mundus</i> antenna (male).	63
Figura 8 – <i>Eretmocerus mundus</i> , funicle 1 and 2 (F1, F2) (male).	63
Figura 9 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (599 bp) of mtDNA (COI) region sequences of <i>Encarsia</i> species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.	60
Figura 10 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (445 bp) of mtDNA (COI) region sequences of <i>Eretmocerus</i> species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.	64
Figura 11 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (~514 bp) of D2 nuclear ribosomal region gene sequences of <i>Encarsia</i> species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.	65
Figura 12 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (~599 bp) of D2 nuclear ribosomal region gene sequences of <i>Eretmocerus</i> species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.	65
Figura 13 – Ninfas de mosca-branca com diferentes colorações. A: Ninfa de <i>Bemisia tabaci</i> parasitada por <i>Eretmocerus mundus</i> , coloração amarelada, B: Ninfa de mosca-branca parasitada por <i>Encarsia formosa</i> , coloração escura e, C: Ninfa de mosca-branca não parasitada, coloração branca.	67
Figura 14 – Folha de tomateiro com presença de ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> , imagem capturada por aparelho celular.	68
Figura 15 – Ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> com diferentes tipos de orifícios de abertura: triangular e circular, indicando a emergência de um inseto adulto de mosca-branca e parasitoide, respectivamente.	68
Figura 16 – Processo de parasitismo de <i>Eretmocerus mundus</i> em ninfas de <i>Bemisia tabaci</i> . A – Folha de soja com ninfas e adultos de <i>Bemisia tabaci</i> ; B – Parasitoide ovipositando em uma ninfa (N3); C – D Parasitoide em desenvolvimento no interior da ninfa; F – Abertura pela qual o parasitoide adulto emergiu; e F – Parasitoide adulto.	69

Figura 17 – Parasitoide e mosca-branca imobilizados após serem submetidos a temperatura de -80°C70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Temperature in São José do Hortêncio, RS, Brazil (February, 2019).....	66
Gráfico 2 – Temperature in Santa Maria, RS, Brazil (February, 2019).	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	Biochemical Oxygen Demand
CEASA	Centrais de Abastecimento do Estado
COI	Citocromo Oxidase
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
D2	Região 2
DNA	Deoxyribonucleic acid
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IPM	Integrated pest management
MEAM1	Middle East-Asia Minor 1
MED	Mediterranean
Mg	Mitochondrial genes
MIP	Manejo Integrado de Pragas
mtCOI	Cytochrome c oxidase subunit 1
mtDNA	Mitochondrial DNA
Nd	Nucleotide diversity
Ng	Nuclear genes
NW	New World
NW2	New World 2
PCR	Polymerase chain reaction
RS	Rio Grande do Sul
SAI	Sem aplicação de inseticida
SC	Santa Catarina
SJH	São José do Hortêncio
SM	Santa Maria
US	Unites States
USA	United States of America

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2.2.1	Capítulo I.....	17
2.2.2	Capítulo II	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	MOSCA-BRANCA, <i>Bemisia tabaci</i> (GENNADIUS, 1889)	18
3.2	PARASITOIDES DE <i>Bemisia tabaci</i>	19
4	MANUSCRITO I: REVISÃO DE LITERATURA: METODOLOGIA DE COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE PARASITOIDES DE <i>Bemisia tabaci</i> (GENNADIUS, 1889) DOS GÊNEROS <i>Encarsia</i> E <i>Eretmocerus</i>	22
5	MANUSCRITO II: INTEGRATIVE TAXONOMY CONFIRMS THE PRESENCE OF BEMISIA TABACI PARASITOIDES <i>Encarsia formosa</i>, <i>Encarsia porteri</i> AND <i>Eretmocerus mundus</i> (Hymenoptera: Aphelinidae) ON SOYBEAN AND TOMATOES IN SOUTH BRAZIL	38
6	DISCUSSÃO GERAL	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

A população global tem crescido consideravelmente nos últimos anos e, com ele, também tem aumentado a demanda por alimentos e fibras, a qual é fortemente ameaçada por mudanças climáticas e problemas fitossanitários, como doenças e pragas (DAS; SINGH; VENNILA, 2011). Crescente, também, mostra-se o desejo da população por uma agricultura mais sustentável, principalmente com o uso racional de defensivos agrícolas (RIGBY; CÁCERES, 2001) e implementação de controle biológico (VAN LENTEREN et al., 2018).

Considerada um dos artrópodes-praga de maior ameaça à produção de plantas, a mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889), ocorre em campos de produção de alimentos e fibras, abertos e protegidos. Por apresentar polifagia, alta capacidade de reprodução e de transmissão de viroses, pequeno tamanho e rápida velocidade na evolução de resistência a inseticidas, a mosca-branca consolidou seu *status* de ser uma das principais pragas mundiais (MAPA, 2017). Em geral, o controle da mosca-branca é feito majoritariamente com a utilização de inseticidas químicos (OLIVEIRA-FILHO, 2008). Como alternativa ao controle químico de *B. tabaci*, insetos parasitoides e predadores já são amplamente utilizados em muitos países e em diferentes culturas agrícolas, a exemplo Estados Unidos e Europa (ARNO et al., 2010; ALOMAR; RIUDAVETS; CASTANE, 2006).

O gênero *Encarsia* Forster, 1878 (Hymenoptera: Aphelinidae, Coccophaginae) apresenta grande importância no cenário econômico do controle biológico de *B. tabaci*, com destaque à espécie *En. Formosa*, haja vista que é o parasitoide mais usado mundialmente (VAN LENTEREN; VAN ROERMUND; SUTTERLIN, 1996). Até 1970, muitos indivíduos – hoje, descritos como *Encarsia* – eram alocados em grupos de outros gêneros, como *Prospaltella* Ashmead 1904 e *Aspidotiphagus* Howard 1894 (BABCOCK et al., 2001).

No intuito de separar os indivíduos em taxóns, foram empregadas características morfológicas para separação das espécies. Contudo, muitos indivíduos apresentam variações ou características em comum com outras espécies, o que gerava e ainda gera grande discussão entre pesquisadores do gênero (VIGGIANI; MAZZONE, 1979). A utilização integrada de técnicas morfológicas e moleculares para identificação de espécies permite o sequenciamento de diferentes genes para compor um banco de dados, contribuindo para otimizar o tempo de identificação de espécimes.

A pertinência da correta identificação dos parasitoides, de estudos de fauna nativa, bem como a criação e liberação em larga escala pode ser demonstrada em números: após 1970, o uso de parasitoides expandiu-se, na Europa, de 100 ha de casa de vegetação para 4800

ha (VAN LENTEREN, 1995; VAN LENTEREN; WOETS, 1988). Segundo Henneberry e Faust (2008), um marco histórico na utilização de parasitoides foi no início dos anos 1990, quando, nos Estados Unidos, *B. tabaci* tomou grandes proporções e o país intensificou a importação de parasitoides para o seu controle, incluindo o gênero *Eretmocerus*.

Embora conhecido mundialmente, o controle biológico de *B. tabaci* com parasitoides é realidade apenas no Hemisfério Norte. Na América do Sul, essa técnica representaria uma valiosa opção aos produtores, principalmente de culturas de ambiente protegido, mas permanece praticamente desconhecida em nível comercial. Além de ser uma opção eficiente de controle, essa técnica gera menor impacto na natureza, uma vez que, conforme Van Lenteren et al. (1997), quando comparado ao controle químico, o biológico é mais sustentável, não manifestando efeitos tóxicos nas plantas e necessidade de intervalo de segurança entre a aplicação e a colheita. Por isso, o conhecimento e a identificação das espécies de parasitoides existentes no Brasil é uma demanda importante a ser atendida, pois, por meio de levantamento faunístico, é possível conhecer as espécies com maior ocorrência em nossos sistemas agrícolas e, assim, delinear futuros estudos de biologia e criação massal de parasitoides para controle biológico de *B. tabaci*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as espécies de parasitoides associadas à *Bemisia tabaci* coletadas em plantas de soja, olerícolas e plantas espontâneas em localidades do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), utilizando técnicas moleculares e taxonômicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Capítulo I

- Elaborar uma revisão de literatura envolvendo os processos práticos de coleta e técnicas empregadas para identificação de parasitoides de *B. tabaci* dos gêneros *Encarsia* e *Eretmocerus*;

2.2.2 Capítulo II

- Identificar e relacionar a ocorrência das espécies de parasitoides com fatores de hospedeiro e temperatura em ambientes com aplicação de inseticidas químicos;
- Verificar a complementariedade de técnicas integrativas empregadas na identificação de parasitoides de *B. tabaci*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MOSCA-BRANCA, *Bemisia tabaci* (GENNADIUS, 1889)

A mosca-branca, *Bemisia tabaci*, é um inseto pertencente à ordem Hemiptera, Subordem Sternorrhyncha, Superfamília Aleyrodoidea e Família Aleyrodidae (COSTA LIMA, 1942). Devido ao seu hábito alimentar e à alta polifagia, é capaz de atacar mais de 600 espécies de plantas, em diversas partes do mundo (POLSTON; DE BARRO; BOYKIN, 2014).

A mosca-branca apresenta, ao longo do seu ciclo de vida, as fases de ovo, quatro ínstaes ninfais e fase adulta. As fêmeas colocam ovos na face abaxial das folhas, em que apenas as ninfas do primeiro instar apresentam movimentação, por aproximadamente 11 dias. Após esse período, fixam-se na folha e permanecem imóveis até a emergência do adulto (SUMMERS; NEWTON JUNIOR; ESTRADA, 1996). A duração do ciclo varia de acordo com as condições ambientais, principalmente temperatura (ALBERGARIA; CIVIDANES, 2002), mas, em geral, dura entre 15 a 25 dias em temperatura de 25° à 27° (TOSCANO et al., 2016). As fêmeas podem ovipositar de 100 a 300 ovos e, em condições favoráveis, a espécie pode completar de 11 a 15 gerações por ano (BROWN; BIRD, 1992). O terço superior do dossel vegetativo das plantas de soja é preferencial para oviposição, acompanhando, portanto, o crescimento das plantas, em que ninfas de 1° e 2° ínstaes localizam-se na região mediana das plantas e aquelas de 3° e 4° ínstaes situam-se no terço inferior (POZEBON et al., 2019).

Por meio da sucção de seiva, a mosca-branca compromete a fisiologia funcional da planta atacada, além de atuar na disseminação de 300 viroses, contemplando os gêneros: *Begomovirus*, *Carlavirus*, *Crinivirus*, *Ipomovirus* e *Torradovirus* (GILBERTSON et al., 2015). Outro problema causado por essa praga invasiva é decorrente da seiva extravasada durante a sua alimentação, pois tal ação favorece o aparecimento de um fungo *Capnodium* sp. (fumagina), o qual cobre as folhas e acarreta redução da superfície fotossintética da planta (NAVAS-CASTILLO; FIALLO-OLIVE; SANCHEZ-CAMPOS, 2011).

Descrita em território brasileiro pela primeira vez na Bahia por Bondar (1928) e registrada na maioria dos estados da federação (DE MORAES et al., 2018), *B. tabaci* é representada por um complexo de espécies crípticas, gerindo grupos morfologicamente indistinguíveis, mas que são distinguíveis ecologicamente e geneticamente (KANAKALA; GHANIM, 2015). Levando em consideração a ecologia comportamental da *B. tabaci*, supõe-se que diferentes espécies revelem preferência por determinadas espécies de plantas. Contudo,

a diferenciação de forma segura demanda análises moleculares com base no DNA mitocondrial, subunidade citocromo-oxidase (mtDNA - COI) (BOYKIN et al., 2013). O complexo de espécies crípticas que ocorrem no Brasil incluem: “Mediterranean” (MED), “Middle East-Asia Minor 1” (MEAM1), “New World” (NW), “New World 2” (NW2), antigamente descritos como biótipos Q, B e A, respectivamente (DE BARRO et al., 2011). Destaca-se a ocorrência de MED nos estados de Santa Catarina (DE MORAES et al., 2018; DE MORAES et al., 2017) e Rio Grande do Sul (BARBOSA et al., 2015), e MEAM1 e NW no Rio Grande do Sul (DE MORAES et al., 2018).

É comum encontrar todas as fases de vida de *B. tabaci* no mesmo cultivo, o que dificulta seu controle, o que implica em um número alto de aplicações de moléculas químicas por cultivo (ERDOGAN et al., 2008). A elevada frequência de aplicações de inseticidas químicos, aliada ao uso repetitivo do mesmo ingrediente ativo, potencializa a seleção de populações resistentes (SHADMANY; OMAR; MUHAMAD, 2013). Dângelo et al. (2018) avaliaram o controle e a suscetibilidade de MEAM1 a diferentes inseticidas registrados no Brasil para algodão, soja, fumo e diferentes olerícolas, verificando as maiores falhas de controle com a utilização de azadirachtina, espiromesifeno e lambda-cialotrina. De acordo com Mota-Sanchez e Wise (2019) (Pesticide Resistance Database, Michigan State University) foram reportados 650 casos de resistência a inseticidas no gênero *Bemisia*, em mais de 60 ingredientes ativos. Outro problema que circunda o uso de produtos químicos ocorre devido ao seu alto custo, envolvendo a aquisição e aplicação de produtos fitossanitários, contribuindo com o aumento de produtores financeiramente comprometidos (ARNEMANN et al., 2019).

Embora *B. tabaci* seja classificada como polífaga, cultivos de tomateiro, em nível nacional, manifestam sérios prejuízos econômicos decorrentes de danos causados pela praga. O tomateiro é considerado um hospedeiro preferencial de mosca-branca (HAJI et al., 2000). Além dele, outras hortaliças são hospedeiras de mosca-branca em território brasileiro, a exemplo os cultivares de abóbora, pimentão, repolho e melão (BARBOSA et al., 2015, DE MORAES et al., 2018). Na planta de soja, por muitos anos, a *B. tabaci* foi considerada praga ocasional, entretanto com a expansão da fronteira agrícola dessa cultura, modificou-se o status de ocorrência da mosca-branca em soja, colocando-a em patamares de relevância nesse cultivo (OLIVEIRA et al., 2018).

3.2 PARASITOIDES DE *Bemisia tabaci*

Utilizada desde 1920 no Hemisfério Norte, a liberação de “micro-vespas” do gênero

Encarsia e *Eretmocerus* em cultivos protegidos de olerícolas apresenta bons resultados de controle para *B. tabaci* (POLASZEK; EVANS; BENNETT, 1992). Tanto *Encarsia* quanto *Eretmocerus* são parasitoides de fases ninfais de *B. Tabaci*, em que o parasitismo ocorre tanto pela oviposição (POLASZEK; EVANS; BENNETT, 1992) quanto pela alimentação, essa última ocorrência efetiva-se quando as ninfas que não são controladas pela postura efetuada pelo parasitoide, são consumidas por eles para suprir sua demanda energética (ZANG; LIU, 2008).

O gênero *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) foi descrito por Förster em 1878 (POLASZEK; EVANS; BENNETT, 1992) e, segundo Vieira et al. (2016), trata-se do primeiro agente de controle biológico introduzido no Brasil. Esse fato remonta ao ano de 1921, por ocasião de importação norte-americana para controlar a cochonilha *Pseudaulacaspis pentagona* (Hemiptera: Diaspididae) que assolava os plantios de pêssigo da época.

Popularmente denominadas “micro-vespas”, os indivíduos do gênero *Encarsia* apresentam preferência de parasitismo pelo 3º e 4º ínstar de *B. tabaci* (BOISCLAIR; BRUEREN; VAN LENTEREN, 1990). Além disso, dispõem de facilidade de estabelecimento em culturas com menor densidade de tricomas, visto que o sistema sensorial de locomoção desse gênero de parasitoide é relativamente aleatório (GERLING, 1990). Outros parâmetros reportados correlacionam a eficiência de parasitismo com fatores como a temperatura – em que a sobrevivência de adultos de *Encarsia* situa-se entre 22º–25ºC, sendo a temperatura ótima 23º (HELGESEN; TAUBER, 1974) –, estado nutricional, variedade da planta, densidade e tipo de tricoma (HODDLE; DRIESCHE; SANDERSON, 1998). Esses e outros fatores condicionam a duração do seu ciclo em cada planta, sendo de aproximadamente 15 dias para maioria das culturas hospedeiras como tomate, melancia, pimentão (WOETS; VAN LENTEREN, 1976) e fumo (ARAKAWA, 1982).

O gênero *Eretmocerus* (Hymenoptera: Aphelinidae) foi descrito por Haldeman em 1850 (KHAN; SHAFEE, 1980). Tal gênero é caracterizado como solitário, onde a fêmea faz sua postura entre a ninfa de mosca-branca e a folha (GERLING; BLACKBURN, 2013). Embora apresente ciclo reprodutivo semelhante à *Encarsia*, variando de 12-25 dias, o *Eretmocerus* contém diferenças tanto genéticas quanto morfológicas, uma delas é referente à atividade ovipositora, revelando parasitismo em ninfas de 2º-4º ínstar, e outra é a preferência por ínstars mais jovens (GERLING; ALOMAR; ARNÓ, 2001). Esse gênero tem maior resistência à temperatura elevada quando comparado à *Encarsia*, sugerindo maior eficiência em regiões ou períodos do ano com temperaturas próximas a 31,4ºC (WANG;

HOGENDOORN; KELLER, 2018).

Identificar a presença e caracterizar o gênero e as espécies de parasitoides demanda análises taxonômicas (morfológicas) e moleculares. A identificação molecular se dá com base em genes mitocondriais, empregando comumente os segmentos do gene Citocromo Oxidase sub-unidade I (COI) (AVISE, 2000) e/ou sequências nucleares (BABCOCK et al., 2001). Já a identificação taxonômica, utiliza as características morfológicas do inseto e é realizada com base em chaves taxonômicas (ZUCCHI, 2002).

Também podem estar associadas e a complementariedade das técnicas molecular e morfológica para identificação de parasitoides. A exemplo disso, cita-se Manzari et al. (2002) que analisaram o grupo de espécies de *En. inaron*, o qual apresenta caracteres muito semelhantes e, diante desse atributo, confere difícil distinção entre as espécies. Polaszek, Quicke e Manzari (2004) empregaram a taxonomia integrativa no complexo de espécies *En. meritoria*. O complexo de espécies *En. pergandiella* foi revisado por Gebiola et al. (2016), que integralizaram dados biológicos e comportamentais, com evidências obtidas a partir de sistemática molecular.

Portanto, pesquisas como esta são relevantes para o conhecimento do potencial de controle biológico em um local de cultivo, visando viabilizar alternativas eficientes e seguras de manejo de *B. tabaci* aos produtores, que são afetados diretamente pelas perdas ocasionadas pela referida praga e intoxicações ocasionadas pelos inseticidas.

4 MANUSCRITO I: REVISÃO DE LITERATURA: METODOLOGIA DE COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE PARASITOIDES DE *Bemisia tabaci* (GENNADIUS, 1889) DOS GÊNEROS *Encarsia* E *Eretmocerus*

RESUMO

A mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) é um hemíptero sugador, causador de problemas em culturas de importância agrícola devido a sua voracidade e ciclo de vida. De forma geral, o controle dessa praga é realizado com inseticidas químicos e por esses apresentarem certas limitações (p.ex. período de carência e seleção de populações resistentes), o controle biológico com o uso de parasitoides (em sua maioria da ordem Hymenoptera) vem despontando como uma importante ferramenta de manejo. Os gêneros *Encarsia* e *Eretmoceros* são da ordem Hymenoptera, mundialmente conhecidos por sua ação de controle sobre ninfas de mosca-branca. Alguns países do Hemisfério Norte comercializam os parasitoides e os utilizam em ambientes protegidos. Conhecer a fauna de parasitoides de uma região é o primeiro passo para explorar o controle biológico e a identificação de parasitoides depende de metodologias de coleta e técnica de identificação seguras. Por esse motivo, este texto explora uma revisão bibliográfica sobre temática em questão, descrevendo os processos práticos de coleta e técnicas empregadas na identificação de parasitoides de *B. tabaci* dos gêneros *Encarsia* e *Eretmocerus*.

Palavras-chave: Hymenoptera, controle biológico, identificação, Aphelinidae.

ABSTRACT

The whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) is a sucking hemiptera that causes problems in countless crops of agricultural importance due to its voracity and life cycle. In general, the control of this grassland is carried out with chemical insecticides, and because they have certain limitations (e.g., period of grace and selection of resistant populations), biological control with the use of parasitoids (mostly of the order Hymenoptera) has emerged as an important management tool. The genera *Encarsia* and *Eretmoceros* are of the order Hymenoptera, known worldwide for their control action on whitefly nymphs. Some countries in the Northern Hemisphere market parasitoids and use them in protected environments. Knowing the parasitoid fauna of one region can be a more interesting alternative than introducing an organism from another territory. Thus, in order to carry out a correct identification of parasitoids, it is necessary to know the best form of collection and identification technique. For this reason, conducting a literature review on the subject is the first step in finding the best way to conduct subsequent works. Therefore, this chapter will aim to build a literature review involving the practical collection processes, methods and / or techniques used to identify *B. tabaci* parasitoids of the genera *Encarsia* and *Eretmocerus*.

Keywords: Hymenoptera, biological control, identification, Aphelinidae.

INTRODUÇÃO

A mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae), é uma praga sugadora com registro em quase todas as regiões do mundo, a qual, por ocasionar uma série de danos diretos e indiretos, consolidou-se como importante praga agrícola em locais de clima tropical e subtropical (HILJE, 1996). Sua ocorrência é relatada tanto em cultivos protegidos (CAPINERA, 2008) como em campos abertos, no que diz respeito àqueles, salienta-se episódios em soja, feijão e hortaliças (SILVA et al., 2017). Devido à constante ocorrência, características de ciclo de vida e voracidade, a medida geralmente empregada para manejo de *B. tabaci* é o controle químico, o qual apresenta certas limitações (p.ex. período de carência e seleção de populações resistentes). Diante disso, o controle biológico – com o uso de parasitoides (em sua maioria da ordem Hymenoptera) – vem mostrando-se uma ferramenta efetiva para manejar *B. tabaci* (GERLING; ALOMAR; ARNO, 2001), principalmente em cultivos protegidos, porém, essa possibilidade ainda é pouco explorada.

Reconhecida como uma das mais numerosas, a ordem Hymenoptera conta com mais de 100.000 espécies descritas em todo o mundo (GOULET; HUBER, 1993, GAULD; BOLTON, 1988), com aproximadamente 115.000 espécies descritas (SHARKEY, 2007). Nessa esfera, ressalta-se a Chalcidoidea, que é uma super-família de vespas integrante da ordem Hymenoptera, cujos membros são conhecidos como parasitoides. Esses insetos de tamanho diminuto são considerados de grande importância pela função que exercem no ambiente agrícola, desempenhando com êxito o controle de inúmeros insetos-praga. Em números, mais de 800 espécies estão na lista de inimigos naturais de grande eficiência no controle biológico, com destaque para a família Aphelinidae (gêneros: *Encarsia* e *Eretmocerus*) (CHAKRAVARTHY, 2020).

Os parasitoides têm ação de controle sobre a fase ninfal de *B. tabaci*, haja vista que ovipositam no interior das ninfas ou se alimentam delas. Por serem altamente eficientes realizando parasitismo de *B. tabaci*, em nível comercial, os países do Hemisfério Norte já empregam em larga escala a liberação desses organismos em ambientes protegidos, em sua maioria da espécie *Encarsia formosa* (LIU et al., 2017). Tal parasitoide foi descrito por Gahan (1924) a partir de um aleyrodídeo não identificado em gerânio (*Geranium* sp.), em uma casa de vegetação em Idaho (EUA). Desde a sua descoberta, produtores europeus têm feito uso desses agentes naturais para controlar pragas em hortaliças. Outras espécies do gênero *Encarsia* são conhecidas e utilizadas para controlar *B. Tabaci*. Além delas, espécies do gênero *Eretmocerus*, como *Er. mundus* – nativo da região mediterrânea (ZOLNEROWICH;

ROSE, 2008) – e *Er. eremicus* – nativo das áreas do deserto do sul da Califórnia e do Arizona (ROSE; ZOLNEROWICH, 1997) – têm demonstrado bons resultados para o controle de moscas-brancas.

O controle biológico utilizando organismos exóticos (não nativos) deve ser bem planejado, pois pode desordenar o ecossistema (ARNO et al., 2010, CASTANE et al., 2004, STANSLY et al., 2004). É o caso da introdução da joaninha exótica *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) nativa da Ásia e identificada no Brasil em 2002 no Paraná (ALMEIDA; SILVA, 2002). Após o registro de sua ocorrência, pesquisas quanto à diversidade da espécie começaram a ser realizadas, revelando uma diminuição na diversidade de outras joaninhas nativas e aumento da abundância de *H. axyridis*. Tal resultado pode ser reflexo do efeito de competição ou predação intraguilda (MARTINS et al., 2009), fatores prejudiciais aos ecossistemas.

Conhecer a fauna de parasitoides de uma região é fundamental para o planejamento de uma ação de controle biológico. Para realizar a identificação, é necessário conhecer os métodos de coleta, armazenamento e as técnicas utilizadas na identificação. Assim, foi construída uma revisão bibliográfica sobre essa temática, explorando os processos práticos de coleta, armazenamento e técnicas empregadas para identificação de parasitoides de *B. tabaci* dos gêneros *Encarsia* e *Eretmocerus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se uma revisão bibliográfica nas bases de dados “*Scielo*”, “*Wiley Online Library*”, “*Portal de periódicos Capes*” e “*Google Scholar*”, utilizando palavras chaves: *Bemisia parasitoids*, *Encarsia*, *Eretmocerus* e *Hymenoptera parasitoids*. Publicações dos últimos 10 anos foram compiladas, visando analisar e discutir as informações publicadas sobre o assunto.

RESULTADOS

Metodologias utilizadas para coleta e identificação de parasitoides

Estudos desenvolvidos em diversos locais do mundo que envolveram a coleta de parasitoides para realização de procedimentos, sejam eles de identificação e/ou criação

massal, mostram-se bastante diversos em suas metodologias. Inúmeros artigos foram encontrados durante a revisão bibliográfica, todavia elencou-se para integrar este estudo aqueles de maior relevância quanto ao conteúdo com relação ao objetivo do presente trabalho, os quais são explorados na sequência.

Ninfas de *B. tabaci* foram coletadas em folhas de cana-de-açúcar, pontua-se que as ninfas parasitadas foram localizadas pelos pesquisadores com auxílio de uma lupa de mão. As folhas de cana-de-açúcar contendo ninfas parasitas foram mantidas em local úmido até a emergência dos adultos. Após emergência, eles foram transferidos para um recipiente contendo álcool 70%. Empregou-se o método taxonômico para identificação de espécies (BHARGAVA et al., 2020).

Kazak et al. (2020), coletaram pupas de *B. tabaci* e alocaram-nas em recipientes de vidro para a emergência dos adultos, as quais foram mantidas em diferentes temperaturas, a fim de avaliar as taxas de sobrevivência. Em cada temperatura de armazenamento, as pupas foram mantidas por 4, 8 e 12 dias e, em seguida, transferidas para condições de criação padrão a 25 °C (70 ± 5% UR), após a incubação, o número de parasitóides adultos que emergiram das pupas foi registrado. Nas condições de trabalho, os pesquisadores afirmam que pupas de *Er. mundus* podem ser armazenadas de 8 dias a 10 °C e têm uma taxa máxima de emergência de adultos.

Francesena et al. (2017) realizaram a coleta de ninfas de *B. tabaci* em folhas de hortaliças em casas de vegetação na Argentina, permanecendo em quarentena até que os adultos (de mosca-branca ou do parasitoide) emergissem. Após emergidos, a identificação foi realizada por meio de estereomicroscopia binocular para identificar espécies através do uso das chaves taxonômicas de Viscarret (2000) para *B. tabaci* e Rose e Zolnerowich (1997) para *Er. mundus*. Atenta-se que o objetivo desse trabalho não foi propriamente a identificação das espécies de parasitoides, mas avaliar toxidez por inseticida.

Drobnjaković et al. (2016), na Sérvia, coletaram ninfas de mosca-branca aparentemente parasitadas para isolamento individual em cápsulas de gelatina. O intuito desse trabalho era a identificação taxonomica de parasitoides adultos, utilizando o guia para identificação de Polaszek, Evans e Bennett (1992).

Zhen Chen et al. (2016), removeram, com uma escova macia e individualizada, ninfas de mosca-branca parasitadas presentes em folhas de tabaco e acomodaram-nas em um frasco Erlenmeyer até que o parasitoide adulto emergisse. Para o processo de incubação, os frascos utilizados foram cobertos com gazes. Após, permaneceram em câmara de crescimento a 25 ± 1 °C, 60% umidade relativa (RH) e claro-escuro (LD) 15: 9 até a emergência de adultos.

Nesse estudo, os autores frizaram a necessidade de utilização de adultos saudáveis para as análises.

Pesquisadores mexicanos intrigados com a coloração escura de folhas de abacateiro crioulo em diversos locais do México – a qual é decorrente da presença de ninfas de 4º ínstar nessas folhas – realizaram coletas do material para identificar o autor do possível parasitismo. As regiões da folha do referido cultivar que continham a presença de ninfas eram recortadas e distribuídas de forma individual em placas de Petri e seladas com um filme plástico transparente à temperatura ambiente. Diariamente, essas placas foram monitoradas e os parasitoides emergidos foram acomodados em recipientes contendo álcool etílico 70%.

Dentre esses pesquisadores mexicanos, ressalta-se Sánchez-Flores et al. (2015), os quais determinaram o número de parasitoides emergidos em relação a adultos de mosca-branca, por meio do orifício de saída da exúvia, em que, nesse procedimento, ninfas não parasitadas mostraram a sutura ecdisial linear, de onde emergiram os adultos da mosca (exúvio). Nesse trabalho, após a montagem de lâminas, segundo Noyes (1982), foi realizada a identificação taxonômica com base nas chaves de Grisel e Schauff (1997) para família e de Woolley (1997) e Polaszek, Evans e Bennett (1992) para espécies. .

Jahan et al. (2015), em coleta de ninfas de mosca-branca em tomate e pepino, na Coreia, preservaram os imaturos de *B. tabaci* em álcool 99% para procedimentos moleculares de identificação do parasitoide. Ademais, Jahan et al. (2015) mantiveram as folhas de tomateiro e pepineiro incubadas com algodão umedecido na extremidade, a fim de observar características do ciclo de vida do parasitoide.

Populações de *En. formosa* coletadas de ninfas parasitadas de *B. tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, 1856 em diferentes plantas hospedeiras no Irã, foram mantidas em laboratório até a emergência de vespas adultas. Após emergidos, os adultos foram preservados em etanol 96% a -20°C até o uso. A confirmação da espécie ocorreu por intermédio da montagem de lâminas, conforme Noyes (1982), sendo, confirmado como grupo de espécies de *luteola*, através de seu tarso medial segmentado, considerado como um caractere morfológico confiável pelos autores (FATTAH-HOSSEINI; KARIMI; ALLAHYARI, 2014).

Karut et al. (2012) coletaram folhas de tomateiro em casas de vegetação da Turquia. As amostras das referidas folhas permaneceram conservadas à 4 ° C até serem processadas. O número de pupas parasitadas foi contabilizado em um microscópio, em que o caractere de parasitismo utilizado seguiu a metodologia de Ootidobiga, Vincent e Stewart (2002), na qual as pupas parasitadas sem mecônia foram atribuídas à *Er. mundus*, ao passo que aquelas com mecônia foram atribuídas à *En. lutea*. Gerling e Blackburn (2013) determinaram que no

intervalo de dois a cinco dias é possível detectar o parasitismo de uma ninfa.

Pirzadfard et al. (2020), buscando obter adultos de *Er. mundus* e *Er. eremicus*, coletaram pupas parasitadas e as conservaram em condições de laboratório. Para tal, usaram os seguintes parâmetros: temperatura de 25 ± 1 °C, umidade 65 ± 5 e fotoperíodo 16:8 horas, luz e escuro, respectivamente.

Hanan, He e Wang (2012), durante o processo incubatório das ninfas de *T. vaporariorum* parasitadas por *Er. warrae* em tomateiro, na Nova Zelândia, mantiveram como condições ideais para emergência de vespas adultas, temperatura de 22 ± 1 °C com $60 \pm 5\%$ UR e 16: 8 horas de claro: escuro. Li, Ding e Chu (2020) utilizaram em sua pesquisa em 26 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ UR e um fotoperíodo de 16: 8 em câmara de crescimento como parâmetros de incubação de parasitoides. Assim, nesse estudo, realizado, também em plantas de tomateiro, Li, Ding e Chu (2020) determinaram a longevidade de indivíduos de *En. formosa* (Tabela 1).

Tabela 1 – Tempo de desenvolvimento de diferentes estágios de vida, longevidade e parâmetros reprodutivos de fêmeas de *Encarsia formosa* criadas em *Bemisia tabaci* MED em tomateiros (média \pm erro padrão).

Parâmetro	Dias
Pré-adulto	17,23 \pm 0,35
Longevidade (fêmeas adultas)	17,55 \pm 0,19
Tempo de vida (fêmeas adultas)	34,77 \pm 0,43
Dias de oviposição	16,35 \pm 0,20
Fecundidade (ovos por fêmea)	81,26 \pm 1,02

Fonte: Adaptado de Li, Ding e Chu (2020). Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes representam uma diferença significativa entre os parâmetros de *Encarsia formosa* criados em *Bemisia tabaci* MED, ocorrendo em diferentes plantas de tomate (teste *bootstrap* emparelhado; $P < 0,05$).

Castro e Lopez (2010), estudando a biologia comportamental de indivíduos da criação do INTA Castelar, elencaram – como fator de identificação da correlação do parasitismo com a espécie *Er. mundus* – a mudança de coloração na ninfa de mosca-branca, a qual não mais se apresenta leitosa branca e, sim, amarela ou alaranjada. Mais um fator importante diz respeito à diferença de tempo do início do parasitismo até a emergência do himenóptero adulto em diferentes culturas, diferindo, também, entre machos e fêmeas (Tabela 2).

Tabela 2 – Tempo de emergência (em dias) de *Eretmocerus mundus* sobre *Bemisia tabaci* em

pimentão e tomate, nas condições de 25 +/- 1°C.

Sexo	Período	Pimentão	Tomate
Masculino	Ovo-pré-pupa	12,28 +/- 0,02	11,65 +/- 0,25
	Pré-pupa-adulto	5,65 +/- 0,16	6,39 +/- 0,11
	Ovo-adulto	17,93 +/- 0,16	18,04 +/- 0,29
Feminino	Ovo-pré-pupa	11,88 +/- 0,37	12,02 +/- 0,26
	Pré-pupa-adulto	4,50 +/- 0,16	6,16 +/- 0,09
	Ovo-adulto	17,38 +/- 0,53	18,18 +/- 0,34

Fonte: Adaptado de Castro; López (2010).

T. vaporariorum, *En. formosa* e *En. lycopersici* De Santis, 1957 coletados na região de produção hortícola do Uruguai foram mantidos em estufas fechadas sob condições de temperatura 22-26 ° C, 65 ± 10% UR e fotoperíodo natural, de acordo com o protocolo descrito por Scopes e Biggerstaff (1971). Pontua-se que o objetivo do estudo consistiu em conhecer a convivência entre as espécies de *Encarsia* (GRILLE et al., 2012).

Alguns trabalhos utilizaram-se da taxonomia integrada às análises moleculares para identificar a espécie correspondente ao parasitismo. Pesquisadores fizeram uso de materiais conservados em museus (lâminas), chaves dicotômicas aliados à biologia molecular para realizar o procedimento de identificação de parasitoides. Para realizar o procedimento de extração de DNA, os autores seguiram o protocolo de Gebiola et al. (2009), que, por sua vez, fez uso do Chelex. Para amplificação dos fragmentos do gene mitocondrial *Cytochrome oxidase c subunit I* (COI) e da região D2 do 28S rDNA gene (28S-D2), os marcadores moleculares usados foram C1-J-2183 ou C1-J-2195 juntamente com TL2-N-3014 (SIMON et al., 1994) e D2F e D2R (CAMPBELL; STEPHAN-CAMPBELL; WERREN, 1993), respectivamente (GEBIOLA et al., 2016). Nessa esteira, outros trabalhos reafirmam a importância da taxonomia integrativa (KLOPFSTEIN; KROPF; BAUR, 2016; GOKHMAN, 2018) e da robustez conferida aos protocolos moleculares, quando utilizados diferentes marcadores moleculares (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2012).

Yara et al. (2018), no estudo de filogenia de *En. smithi* (Silvestri, 1926), empregaram o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) para obter DNA genômico. Para obter as análises moleculares, as sequências de DNA da região ITS foram determinadas de acordo com Schmidt, Naumann e De Barro (2006). Acentua-se que tais pesquisadores analisaram a variação existente em três regiões do gene: D2, D3 e ITS-1, a fim de inferir qual a melhor variação para fins diagnósticos e filogenéticos. Como resultado, elencaram a região D2 do 28S rDNA como adequada para fins de diagnóstico e filogenéticos de espécie.

Ardeh (2013), coletou espécimes de parasitoides em campo, os quais foram

submetidos a extração de DNA por meio do protocolo Chelex. O material resultante foi empregado em conjunto com marcadores ISSR, os quais, por sua vez, segundo os resultados obtidos pela pesquisa, demonstram ser uma opção simples para estudo de diversidade de populações de *Er. mundus* (ARDEH, 2013).

Guastella et al. (2015) utilizaram-se dos caracteres taxonômicos e moleculares para distinguir *Eretmocerus* e *Encarsia*. Além da região do 28S e ITS1, nessa pesquisa foi explorado o COII, com base em Monti, Nappo e Giorgini (2005), que fizeram uso da região mtCOI para diagnose de *Encarsia*. A região COII, em conformidade com esses últimos autores, confere exatidão na identificação, visto que revela alta variação de sequência interespecífica do gene COI, juntamente com um baixo nível intraespecífico de variação, suportando o uso de PCR-RFLP como um método simples e técnica eficaz para diagnóstico molecular de espécies. Destaca-se, ainda, que os *primers* utilizados na amplificação do COII foram LCO/HCO (FOLMER et al., 1994), 28S-D2 D2F/D2R (CAMPBELL; STEPHAN-CAMPBELL; WERREN, 1993) e ITS1 EretF e EretR (De BARRO et al., 2000).

Algumas espécies do gênero *Encarsia* são morfologicamente idênticas, como é o caso da *En. formosa* e *En. luteola* (BABCOCK; HERATY 2000), o que é reafirmado por Ghahari (2018). Para realizar a identificação taxonômica é necessário previamente confeccionar lâminas, o que demanda tempo e certa expertise, além de que o espécime deve conservar-se intacto sem prejudicar nenhum caractere morfológico, sem prejuízos à identificação.

Myartseva, Evans e Coronado-Blanco (2014), revisando espécies de *Encarsia* da região Neotropical, também observaram pequenas variações morfológicas dentro de algumas espécies, o que eventualmente pode gerar equívoco na identificação do gênero mencionado.

Tay et al. (2020), em sua investigação sobre plataformas de sequenciamento de alto rendimento (HTS), fizeram uso de extração agrupada de ninfas de *B. tabaci* (Kit Quiagen). Para amplificar o material extraído, os pesquisadores em questão integraram-no a outra premissa do HTS: trabalho de análise bioinformática elaborado. Esse procedimento proporcionou o desenho de dois conjuntos de primers de PCR altamente eficientes e que têm a capacidade de amplificar o mtCOI tanto da mosca-branca quanto dos parasitóides (*Eretmocerus* e *Encarsia*). De acordo com os autores, a técnica configura-se como uma alternativa valiosa para identificação de espécies crípticas, por ser confiável, prática e rápida. Ainda nessa linha temática, outros trabalhos usaram o HTS na taxonomia integrativa (CRUAUD et al., 2017; SIGUT et al., 2017).

Fekrat, Manzari e Shishehbor (2014), sustentados na taxonomia integrativa, realizaram

a extração de DNA dos espécimes parasitoides por meio do DNeasy Tissue and Blood Kit (Qiagen), utilizando o mtCOI. No total, 422 bp foram amplificados e possibilitaram a distinção dos indivíduos de *Encarsia* que corresponderam às identificações taxonômicas. Os primers empregados na amplificação do gDNA foram os descritos por Simon et al. (1994) C1-J-1751 e C1-N-2191. Diferentemente de Jahan et al. (2015), que utilizaram para esta mesma região C1-J-2195 e L2-N3014 (SIMON et al., 1994).

O uso do gene parcial da subunidade I (mtCOI) herdado da mãe no 'DNA barcoding' é uma ferramenta empregada em diversos estudos (TAY et al., 2012; DINSDALE et al., 2010), posto que fornece informações sobre a potencial diversidade de espécies, incluindo espécies crípticas (TAY; BECKETT; DE BARRO, 2016).

Visando identificar o gênero e espécie de parasitoides de maneira mais acurada, Miura, Higashiura e Maeto (2017) testaram diferentes métodos de extração de DNA não-destrutivos, a fim de manter o mesmo espécime da extração para utilização na confecção de lâminas (taxonomia). Distintos métodos de extração foram testados como Chelex, PrepMan® Ultra Reagent, e DNeasy® Blood and Tissue Kit, em que o material obtido foi amplificado com uso do primer LCO/HCO de Folmer et al. (1994). Por meio dessa pesquisa, os autores concluíram que o método Chelex aparenta ser o mais adequado para conservação do espécime para confecção de lâminas.

DISCUSSÃO

Segundo o Chalcidoidea Data Base (listChalcids), o gênero *Encarsia* abriga 449 espécies, enquanto o *Eretmocerus* conta com 86, sendo a grande maioria delas identificada há mais de 10 anos, por meio da taxonomia morfológica. Na mesma proporção em que a maioria dos espécimes tem sua identificação realizada há bastante tempo, também é antiga a bibliografia que trata acerca da temática. O baixo número de trabalhos encontrados nos últimos 10 anos justifica tal afirmação.

Durante o período de construção desta revisão bibliográfica, constatou-se que ainda não se tem um padrão de coleta, tampouco um protocolo padrão para identificação molecular de parasitoides dos gêneros *Encarsia* e *Eretmocerus*. Além disso, no que diz respeito à coleta de espécimes, há um ligeira coincidência na coleta de ninfas com coloração alterada (escura), considerada parâmetro de identificação do parasitismo para algumas espécies, em sua maioria do gênero *Encarsia*.

Notou-se, também, que a identificação de alguns grupos ainda parece fragilizada

(HERATY; WOOLLEY; POLASZEK, 2007). Nessa esfera, pode-se apontar os seguintes atributos: tamanho dos parasitoides (HERATY; POLASZEK, 2000); existência de espécies crípticas (MONTI; NAPPO; GIORGINI, 2005); tempo demandado entre a coleta e a montagem do material para análise; tempo para treinar pessoas, por ser um trabalho meticuloso; além da percepção individual dos caracteres, a qual que está singularizada em cada pessoa. Esses são alguns dos motivos intrínsecos ao desafio da identificação taxonômica. Apesar das dificuldades existentes, a metodologia proposta por Noyes (1982) está consolidada como protocolo utilizado para montagem de lâminas, sejam elas temporárias ou permanentes.

A grande maioria dos trabalhos que envolveram a indentificação das espécies de parasitoides fazendo uso das técnicas moleculares escolheu estudar mais de uma região do gene. Cerca de 1.394 e 283 sequências do gênero *Encarsia* e *Eretmocerus*, respectivamente, estão depositadas no Genbank. Destas, para *Eretmocerus*, 29 são do gene COI e 24 são do 28S, enquanto que, para *Encarsia*, são 383 COI e 211 28S, o que indiretamente fornece material para comparação.

Os trabalhos que fizeram uso da taxonomia integrativa demonstraram maior robustez em suas identificações. Nos estudos encontrados, algumas metodologias de extração apresentam-se de caráter destrutivo, ou seja, o espécime utilizado na análise molecular não é o mesmo usado da confecção da lâmina, este último é o material base para identificação taxonômica. Devido à semelhança entre espécimes da uma mesma coleta, equívocos na identificação de espécies podem acontecer. Algumas pesquisas, embora citem a metodologia de extração do DNA, não fornecem maiores especificações, o que dificulta o entendimento e a repetibilidade de certos protocolos.

Percebe-se que a grande maioria dos trabalhos realiza a identificação da espécie do parasitoide utilizando o indivíduo adulto, à excessão do trabalho de Tay et al. (2020), o qual gerou uma discussão pertinenteem seu manuscrito, reafirmando a dificuldade de identificar o autor do parasitismo quando ele ainda está no interior da ninfa de mosca-branca. Uma técnica, como a desenvolvida pelos referidos pesquisadores, pode motivar outros estudos que adentrem nessa temática, em que, de forma otimizada, podem ser identificados rapidamente tanto a espécie do individuo parasitado quanto o responsável pelo parasitismo.

Observa-se que existe uma maior confiabilidade nos trabalhos que envolveram biologia molecular com taxonomia (GOKHMAN, 2018; KLOPFSTEIN; KROPF; BAUR, 2016). De forma semelhante, quando se trata de biologia molecular, a utilização de marcadores moleculares que estudam regiões do gene diferentes (p. ex mtCOI e DNA

nuclear) somados à morfologia externa de vespas parasitas, sugerem maior robustez nas identificações (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2012). Isso revela que nenhuma técnica se sobrepõe a outra e, sim, exibem perfeita complementariedade.

É de consenso de todas bibliografias aqui encontradas que o estudo da diversidade de espécies de parasitoides existentes no ecossistema é importante e necessário. Buscar a melhor metodologia de coleta, incubação e identificação são as premissas básicas para o desenvolvimento de um método de criação massal de parasitoides. A demanda por controle de pragas em ambientes agrícolas com a utilização de medidas de maior responsabilidade ambiental já é uma realidade no contexto global, além disso, a procura por alimentos produzidos sem o uso de pesticidas tende a aumentar. Portanto, revisões bibliográficas como esta esclarecem em que patamar da pesquisa a respeito do uso de parasitoides para controle de mosca-branca encontra-se e quais os próximos passos para intensificá-lo, principalmente em nível nacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. M.; SILVA V. B. Primeiro registro de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): um coccinélido originário da região Paleártica. **Revista Brasileira de Zoologia** 19: 941–944, 2002.
- ARDEH, M. J. The utility of ISSR-primers to make difference among populations of parasitoid, *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae). **Journal of Crop Protection**, 2 (3): 263-269, 2013.
- ARNO, J. et al. Natural enemies of *Bemisia*: predators and parasitoids, in Stansly, P.A., Naranjo S.J. (Eds.), *Bemisia, Bionomics Management of a Global Pest*, **Springer**, Dordrecht, pp 385-421, 2010.
- BABCOCK, C. S.; HERATY, J. M. Molecular Markers Distinguishing *Encarsia formosa* and *Encarsia luteola* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Volume 93, Issue 4, 1 July 2000, Pages 738–744.
- BHARGAVA C.N. et al. First report on new record of natural enemy complex on sugarcane whitefly *Aleurolobus barodensis* Mask. in Southern India. **Journal Entomol Zool Stud** 8(3):1126-1128, 2020.
- CAMPBELL, B.; STEPHAN-CAMPBELL, J.D.; WERREN, J.H. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer ITS2 and 28S-rDNA sequences. **Insect Molecular Biology**, 2, 225–237, 1993.
- CAPINERA, J.L. Greenhouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). In: Capinera J.L, editor. *Encyclopedia of entomology*. **Netherlands: Springer**. p. 1723–1726. 4346 pp, 2008.

CASTANE, C. et al. Colonization of tomato greenhouses 367 by the predatory mirid bugs *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii*. **Biological Control** 30, 591-597, 2004.

CASTRO, Y.; LÓPEZ, S. Biología de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide del complejo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), en condiciones de laboratorio. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**. 69. 45-56, 2010.

CHAKRAVARTHY, A. K. Innovative Pest Management Approaches for the 21st Century. **Harnessing Automated Unmanned Technologies**, 2020.

CRUAUD, P. et al. High-throughput sequencing of multiple amplicons 256 for barcoding and integrative taxonomy. **Scientific Reports**, 7, 41948, 2017.

DE BARRO, P.J. et al. Descriptions of three species of *Eretmocerus* Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitising *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia based on morphological and molecular data. **Austral Journal Entomol** 39:259–269, 2000.

DINSDALE, A. et al. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae): mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103, 196-208, 2010.

DROBNJAKOVIC, T. et al. Life history traits and population growth of *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) local population from Serbia. **Entomologia Generalis** Volume 35 Number 4, p. 281 – 295, 2016.

FATTAH-HOSSEINI, S.; KARIMI, J.; ALLAHYARI, H. Molecular Characterization of Iranian *Encarsia formosa* Gahan Populations with Natural Incidence of *Wolbachia* Infection. **Journal of the Entomological Research Society**. 16, 2014.

FEKRAT, L.; MANZARI, S.; SHISHEHBOR, P. Morphometric and molecular variation in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) populations on onion and tobacco in Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2014.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol Mar Biol Biotechnol**. Oct;3(5):294-9, 1994.

FRANCESENA, N. et al. Side effects of spirotetramat on pupae and adults of a Neotropical strain of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae): Effects on the life parameters and demography. **Environmental Science and Pollution Research** 24, 17719–17730, 2017.

GAHAN, A. B. Some new parasitic Hymenoptera with notes on several described forms. **Proceedings of the United States National Museum**.65:1–23, 1924.

GAULD, I.; BOLTON, B. The Hymenoptera. **Oxford University Press**, Oxford. 10 color plates, pp 332, 1988.

- GEBIOLA, M. et al. *Pnigalio agraulis* (Walker) and *Pnigalio mediterraneus* Ferrière and Delucchi (Hymenoptera: Eulophidae): two closely related valid species. **Journal of Natural History**, 43, 2465–2480, 2009.
- GEBIOLA, M. et al. A revision of the *Encarsia pergandiella* species complex (Hymenoptera: Aphelinidae) shows cryptic diversity in parasitoids of whitefly pests. **Systematic Entomology**, 42(1), 31–59, 2016.
- GERLING, D.; ALOMAR, O.; ARNO, J. Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. **Crop Protection**, England, v.20, p. 779-799, 2001.
- GERLING, D.; BLACKBURN, M. Immature development of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Arthropod structure & development**. 42, 2013.
- GHAHARI, H. Species diversity of *Encarsia* spp. (Hymenoptera: Chalcidoidea: Aphelinidae) in Golestan Province, Northern Iran. **Experimental animal Biology**, 7(3), 101-118, 2018.
- GOKHMAN, V. E. Dimensions and Borderlines of Parasitoid Hymenoptera Species: A Paradigm Shift? **Biology Bulletin Reviews**, 8(3), 227–233, 2018.
- GOULET, H.; HUBER, J.T. Hymenoptera of the world: an identification guide to families. **Research Branch, Agriculture**. Canada Publication 1894/E., Ottawa, p 668, 1993.
- GRILLE, G. et al. Parasitoides Nichos de *Encarsia formosa* e *Encarsia lycopersici* (Himenóptera: Aphelinidae) explorando *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologist** 95 (4), 1024-1030, 2012.
- GRISEL, E. E.; SCHAUFF, M. E. Chalcidoidea, pp. 45-117. In: Gibson, G.A.P., J.T. Huber & J.B. Woolley (Eds.). Claves anotadas de los géneros de neártico Chalcidoidea (Hymenoptera). Ottawa, **NCR Research Press**, 794 pp, 1997.
- GUASTELLA, D. et al. Survey on whiteflies and their parasitoids in cassava mosaic pandemic areas of Tanzania using morphological and molecular techniques. **Pest Management Science**. 71. 2015.
- HANAN, A; HE, X. Z.; WANG, Q. Host feeding and oviposition strategy of *Eretmocerus warrae* (Aphelinidae: Hymenoptera) under different host densities. **New Zealand Plant Protection**. 65. 133-137, 2012.
- HERATY, J.; WOOLLEY, J. POLASZEK, A. **Catalog of Encarsia of the world**. 87p., 2007.
- HERATY, J.M.; POLASZEK, A. Morphometric analysis and descriptions of selected species in the *Encarsia strenua* group (Hymenoptera: Aphelinidae). **Journal of Hymenoptera Research**. 9. 142-169, 2000.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A. et al. Host tracking or cryptic adaptation? Phylogeography of *Pediobius saulius* (Hymenoptera, Eulophidae), a parasitoid of the highly invasive horse-chestnut leafminer, **Evolutionary Applications**, vol. 5, no. 3, pp. 256–269, 2012.
- HILJE, L. Introdução, p. vii–xv. In: Luko, H. (ed.). Metodologias para el studio e manejo de

moscas blancas y germinivirus. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Unidade de Fitoproteccion. **Materiales de ensenanza/CATIE** n. 37, 150 p, 1996.

JAHAN, S. et al. Molecular identification of parasitoid, *Encarsia formosa* Gahan in *Bemisia tabaci* (Gennadius) and determination of its secondary endosymbionts. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, 39(4), 563-578, 2015.

KARUT, K. et al. Natural parasitism of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) by native Aphelinidae (Hymenoptera) parasitoids in tomato greenhouses in Mersin, Turkey. **Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin** Vol. 80, pp. 69-74, 2012.

KAZAK, C. et al. Effect of cold storage on performance of *Eretmocerus mundus*, larval parasitoid of *Bemisia tabaci* in a conventional tomato growing greenhouse. **Crop Protection**, Volume 137, 105293, ISSN 0261-2194, 2020.

KLOPFSTEIN, S.; KROPF, S.; BAUR, H. *Wolbachia* endosymbionts distort DNA barcoding in the parasitoid wasp genus *Diplazon* (Hymenoptera: Ichneumonidae), **Zoological Journal of the Linnean Society**, vol. 177, no. 3, pp. 541–557, 2016.

LI, J.; DING, T.; CHU, D. Differential effects of two plant viruses on performance and biocontrol efficiency of *Encarsia formosa* fed on *Bemisia tabaci*. **Biological Control**, Volume 142, 104166, ISSN 1049-9644, 2020.

LIU, X. et al. Virus-infected plants altered the host selection of *Encarsia formosa*, a parasitoid of whiteflies. **Frontiers in Physiology**. 8: 937, 2017.

MARTINS, C. B. C. et al. *Harmonia axyridis* : uma ameaça para os Coccinellidae brasileiros? **Revista Brasileira de Entomologia** 53, 663-671, 2009.

MIURA, K.; HIGASHIURA, Y.; MAETO, K. Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects. **Applied Entomology and Zoology** 52, 349–352, 2017.

MONTI, M.; NAPPO, A.; GIORGINI, M. Molecular characterization of closely related species in the parasitic genus *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. **Bulletin of Entomological Research**, 95(5), 401-408, 2005.

MYARTSEVA, S.; EVANS, G.; CORONADO-BLANCO, J. The *Encarsia noyesi* species-group (Hymenoptera, Chalcidoidea, Aphelinidae) in the Neotropical region, with a key and description of the male of *E. andrewi* from Mexico. **Journal of Hymenoptera research**. 39. 36-46, 2014.

NOYES, J. S. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Journal of Natural History**, 16: 315-334, 1982.

OTOIDOBIGA, L. C.; VINCENT, C.; STEWART, R. Susceptibility of field population of adult *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) and *Eretmocerus* sp (Hymenoptera: Aphelinidae) to cotton insecticides in Burkina Faso (West Africa). **Pest Management Science** 59: 97-106, 2002.

- PIRZADFARD, S. et al. Intraguild interactions of a generalist predator, *Orius albidipennis*, with two *Bemisia tabaci* parasitoids. **International Journal of Tropical Insect Science**, 2020.
- POLASZEK, A.; EVANS, G. A.; BENNETT, F. D. *Encarsia* parasitoids of *Bemisia tabaci* (Hymenoptera: Aphelinidae, Homoptera: Aleyrodidae): a preliminary guide to identification. **Bulletin of Entomological Research**, 82: 375-392, 1992.
- ROSE, M.; ZOLNEROWICH, G. *Eretmocerus* Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae) nos Estados Unidos, com descrições de novas espécies que atacam *Bemisia* (complexo *tabaci*) (Homoptera: Aleyrodidae). **Anais da Sociedade Entomológica de Washington** 99: 1-27, 1997.
- SANCHEZ-FLORES, O. A. et al. Parasitismo natural de Aphelinidae (Hymenoptera) sobre *Aleuropleurocelus acaudatus* Drews & Sampson (Aleyrodidae), en aguacates criollos del sur de Coahuila, México. **Acta Zoologica Mexicana** [online]. vol.31, n.2, pp.173-177. ISSN 2448-8445, 2015.
- SCHMIDT, S.; NAUMANN, I.D.; DE BARRO, P.J. *Encarsia* species (Hymenoptera: Aphelinidae) of Australia and the Pacific Islands attacking *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) - a pictorial key and descriptions of four new. **Bulletin of Entomological Research**, 91, pp. 369-387, 2001.
- SCOPES, N. E. A.; BIGGERSTAFF, S. M. The production, handling and distribution of the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and its parasite *Encarsia formosa* for use in biological control program in glasshouses. **Plant Pathology**. 20: 111-116, 1971.
- SHARKEY, MJ. Phylogeny and classification of Hymenoptera. Pages 521-548 in: Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A., eds. Linnaeus tercentenary: progress in invertebrate taxonomy. **Zootaxa** 1668:1-766, 2007.
- SIGUT, M. et al. Performance of DNA metabarcoding, 353 standard barcoding, and morphological approach in the identification of host-parasitoid interactions. **PLoS ONE**, 12(12), e0187803, 2017.
- SILVA, A. et al. Mosca-Branca, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) em feijoeiro: Características gerais, bioecologia e métodos de controle. **EntomoBrasilis**, 2017.
- SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, 87, 651-701, 1994.
- STANSLY, P.A. et al. Prospects for biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) in greenhouse tomatoes of southern Spain. **Crop Protection** 23, 701-712, 2004.
- TAY, W. T. et al. A high-throughput amplicon sequencing approach for population-wide species diversity and composition survey. **BioRxiv**, PPR: PPR225001, 2020.
- TAY, W. T. et al. Will the real *Bemisia tabaci* please stand up? **PLoS One** 7, e50550, 2012.

TAY, W. T.; BECKETT, S. J.; DE BARRO, P. J. Phosphine resistance in Australian *Cryptolestes* species (Coleoptera: Laemophloeidae): perspectives from mitochondrial DNA cytochrome oxidase I analysis. **Pest Management Science** 72, 1250–1259, 2016.

VISCARRET, M. Estudios biológicos sobre Aleyrodidae (Insecta: Hemiptera) con especial énfasis en el complejo *Bemisia tabaci* y su posible control biológico. **Tesis doctoral**, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2000.

WOOLLEY, J. B. Aphelinidae, pp. 134-150. In: Gibson, G.A.P., J.T. Huber & J.B. Woolley (Eds.). Annotated keys to the Genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). **NRC Research Press**, Ottawa, Canada. 794 pp, 1997.

YARA, K. et al. Distribution and population structure of two phylogroups of the parasitoid *Encarsia smithi* (Hymenoptera: Aphelinidae) in tea fields infested with the invasive camellia spiny whitefly *Aleurocanthus camelliae* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Shizuoka Prefecture, Japan. **Applied Entomology and Zoology**, 2018.

ZHEN CHEN, R. et al. Phototactic behaviour of the parasitoid *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Biocontrol Science and Technology**, 26:2, 250-262, 2016.

ZOLNEROWICH, G.; ROSE, M. The genus *Eretmocerus*. In: GOULD, J.; HOELMER, K.A.; GOLSBY, J.A. (Ed.). Classical Biological Control of *Bemisia tabaci* in the United States - A Review of Interagency Research and Implementation. Amsterdam: **Springer**, p.89-109, 2008.

5 MANUSCRITO II: INTEGRATIVE TAXONOMY CONFIRMS THE PRESENCE OF *Bemisia tabaci* PARASITOIDS *Encarsia formosa*, *Encarsia porteri* AND *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) ON SOYBEAN AND TOMATOES IN SOUTH BRAZIL*

**Manuscrito publicado na Revista Neotropical Entomology em 11 de abril de 2021. DOI: 10.1007/s13744-021-00873-3*

ABSTRACT

Parasitoid wasps from the Aphelinidae family (Hymenoptera) are important control agents of *Bemisia tabaci* cryptic species, both through reproduction and feeding processes. Identifying native parasitoid species within agricultural systems affected by *Bemisia* whitefly species is the first step to developing guidelines for the creation, conservation biological control and release of biological control agents aiming at this highly damaging pest species complex. Taxonomic and phylogenetic analyses based on morphological and molecular characters, respectively, confirmed the occurrence of *Encarsia formosa* (Gahan, 1924) in greenhouse tomatoes from Santa Maria, *Encarsia porteri* (Mercet, 1928) in open-field soybean from Santa Maria, and *Eretmocerus mundus* Mercet, 1931 in greenhouse tomatoes from São José do Hortêncio, all within Rio Grande do Sul state (South Brazil). This is the first report of *En. formosa*, *En. porteri* and *Er. mundus* parasitising *B. tabaci* in South Brazil, and the first *En. porteri* partial mtCOI gene sequence being reported and characterised. The high temperature inside the tomato greenhouses can be a possible cause for the predominance of *Er. mundus* in São José do Hortêncio, and sex ratios in the surveyed populations point to female and male prevalence within *Encarsia* and *Eretmocerus* genera, respectively. The combined use of morphological and molecular taxonomy characterization highlights the importance of combining both techniques approaches in the assessment of previously unidentified whitefly parasitoids.

Keywords: Chalcidoidea. Biological control. Sex ratio. Molecular. Taxonomy. Whitefly.

RESUMO

Vespas parasitóides da família Aphelinidae (Hymenoptera) são importantes agentes de controle de espécies crípticas de *Bemisia tabaci*, tanto por meio de processos de reprodução quanto de alimentação. Identificar espécies de parasitóides nativos dentro de sistemas agrícolas afetados por espécies de mosca-branca *Bemisia* é o primeiro passo para o desenvolvimento de diretrizes para a criação e liberação de agentes de controle biológico visando este complexo de espécies de pragas altamente prejudiciais. Análises taxonômicas e filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos e moleculares, respectivamente, confirmaram a ocorrência de *Encarsia formosa* (Gahan, 1924) em tomates de casa de vegetação de Santa Maria, *Encarsia porteri* (Mercet, 1928) em soja de campo aberto em Santa Maria e *Eretmocerus mundus* Mercet, 1931 em tomate em casa de vegetação em São José do Hortêncio, todos no estado do Rio Grande do Sul (Sul do Brasil). Este é o primeiro relato de *En. formosa*, *En. porteri* e *Er. mundus* parasitando *B. tabaci* no Sul do Brasil, e a

primeira sequência parcial do gene mtCOI de *En. porteri* sendo relatada e caracterizada. A alta temperatura dentro das estufas de tomate pode ser uma possível causa para o predomínio de *Er. mundus* em São José do Hortêncio, e as proporções sexuais nas populações pesquisadas apontam para prevalência feminina e masculina nos gêneros *Encarsia* e *Eretmocerus*, respectivamente. O uso combinado de caracterização taxonômica e molecular destaca a importância de combinar abordagens morfológicas e moleculares na avaliação de parasitóides de mosca-branca não identificados anteriormente.

Palavras-chave: Chalcidoidea. Controle Biológico. Razão Sexual. Molecular. Taxonomia. Mosca-branca.

INTRODUCTION

The *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) complex comprises several cryptic species of worldwide agricultural importance (De Barro *et al.* 2011). Factors such as polyphagous feeding habit (Lapidot *et al.* 2014), small size, high reproductive rate (Malumphy *et al.* 2017) and short life cycle result in severe economic damage on many crops (Sottoriva 2010). Whitefly species are ranked among the most widespread and economically important arthropod pest in the world, with over 600 cases of resistance (APRD 2019) reported for 56 different insecticides (Willis 2017). Among the affected crops, soybean stands out as the most produced and consumed oil seed in the world (Embrapa, 2019), and tomato due to its high economic value (Filgueira, 2008).

Damages resulted from whitefly feeding (i.e., sap sucking) can be of direct impact, affecting plant physiology as a whole, or indirect effect, whereby *B. tabaci* acts as a vector for over 300 plant viruses (Gilbertson *et al.* 2015) and precursor for *Capnodium* spp. (i.e. sooty mould fungi). As a result of sooty mould growth, total photosynthetic surface in the plant can be significantly reduced (Hirose *et al.* 2015). Whitefly management on tomato crops relies heavily on chemical insecticides, with overdosing favouring the selection of resistant strains (Onstad 2008). The high number of sprays per crop cycle, coupled with high insecticides costs, have significantly reduced the income of Brazilian tomato growers (Arnemann *et al.* 2019).

Tomato production is particularly important for the Vale do Caí region (Rio Grande do Sul State - RS), where most of the state's greenhouses and vegetables are grown. The whole production chain relies almost totally on smallholder farmers, who sell their goods to the supply center (Central de Abastecimento - CEASA) of Porto Alegre (state capital) and thus support countless direct and indirect jobs (Emater/RS-ASCAR 2017). By simultaneously growing several crops that are hosts to the *Bemisia* species this region has become a hotspot

for whitefly infestations and control failures, greatly increasing economic losses in tomato and other crops (Rosa 2017). Soybean remained for many years as a secondary host to whiteflies, but continuous area expansion and excessive spraying of chemical insecticides have turned the *B. tabaci* whitefly species into a key pest of the crop (Arnemann *et al.* 2019; Pozebon *et al.* 2020). Farmers from the central region of RS rely heavily on soybean cultivation as a source of income (Emater/RS-ASCAR, 2018), and thus experiencing economic losses associated with whitefly infestations.

Of the estimated 473,466 hectares of greenhouse vegetables grown globally (AgInnovators 2016), the use of predator and parasitoid species as biological control agents for the management of *B. tabaci* represent an established tool (Gerling *et al.* 2001). Europe and Russia stand out as lead users of parasitoids in greenhouse crops (van Lenteren 1995), and excellent results have been obtained in the US by combining the genera *Encarsia* Foerster, 1878 and *Eretmocerus* Haldeman, 1850 (Ciomperlik & Goolsby 2008). Out of the total area grown with greenhouse tomatoes in Denmark, 70-80% are protected with *En. formosa* releases (Hansen *et al.* 1984). Many crops besides tomatoes - *Solanum lycopersicum* are also successfully protected from *B. tabaci* by parasitoid agents, such as cucumber - *Cucumis sativus* (van Lenteren & Woets 1988), eggplant - *Solanum melongena* var. *esculentum*, gerbera - *Gerbera jamesonii* and poinsettia - *Euphorbia pulcherrima* (van Lenteren 1995).

Although updated information is available regarding parasitoids species from Brazil (Lahey 2015), would be the lack of surveys of species diversity, and their occurrence in South Brazil prevent large-scale production and commercial use of such methods, as well as our understanding of how usage of chemical insecticidal compound across broad acreage cropping landscape for control of insect pests would impact on species occurrences and on their genetic diversity. While biological control agents as *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 and *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 for eggs and larvae of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) control have been successfully used on sugarcane (Parra *et al.* 2010) and citrus crops (e.g., *Tamarixia radiata* Waterston, 1922 for the control of *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 - Paiva & Parra 2012), its employment as a pest management tool on soybean and tomato crops in Brazil remains scarce. Identifying which parasitoid species occur naturally in an agricultural environment is the first step towards developing efficient biological control programs (Zucchi 2002). Once the species diversity is known, it is possible to enhance their control activity by establishing integrated pest management (IPM) strategies (Araújo & Zucchi 2002). Such studies demand the use of integrated identification tools, combining

taxonomic characterization based on morphological traits (Zucchi, 2002) with molecular description of the cytochrome oxidase subunit I gene (COI; Avise, 2000) and/or nuclear ribosomal gene sequences (Babcock *et al.* 2001).

The combined use of taxonomic and molecular tools for parasitoid identification has been addressed in previous works. Babcock *et al.* (2001) discriminated 67 strains within 24 *Encarsia* species, by evaluating both morphological features and the nuclear ribosomal gene region D2, using the primer '28S'. Manzari *et al.* (2002) analysed species within the *En. inaron* (Walker, 1839) group, which present very similar morphological traits (Polaszek *et al.* 1999). *En. pergandiella* Howard, 1907 species complex was also reviewed by Gebiola *et al.* (2016), who ultimately distinguished it from *En. tabacivora* Viggiani, 1985 by combining biological and behavioural data with molecular evidence from characterisation of partial COI and nuclear ribosomal D2 genes.

Identifying parasitoids of *B. tabaci* in tomato and soybean crops is the first step to developing guidelines for rearing and releasing that aims at the controlling of whitefly. Similarly, confirming the presence of parasitoids on soybean contributes to the adoption of management measures that favour natural parasitism (e.g., use of selective insecticides). The goal of this study was to identify the parasitoids species that naturally occur in tomato and soybean crops in South Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites

Tomato and soybean leave naturally infested by *B. tabaci* cryptic species were sampled in February, 2019 at the localities of São José do Hortêncio and Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), Brazil (Table 3). Maximum and minimum temperatures during the month were 12°C and 37°C for Santa Maria (Santa Maria meteorological station) and 18°C and 36°C for São José do Hortêncio (Porto Alegre meteorological station), respectively (see Supplementary Material 1 and 2); tomato greenhouses in São José do Hortêncio, however, typically reach temperatures much higher than that. The Greenhouse temperatures at sampling were 34°C for Santa Maria (open field) and 52°C for São José do Hortêncio (greenhouse).

After sampling, the leaves were placed on petri dishes containing 1 ml of agar (0.2%) and Nipagin® (antifungal). The dishes were kept on a B.O.D incubator (Bio-Oxygen Demand) under 23°C ± 2°C of temperature, 70-75% of relative humidity and 14 hours of photoperiod

length (Antony *et al.* 2004), until the emergence of adult parasitoids. After emergence, each individual was placed on a glass bottle containing 70% alcohol and kept under -80°C.

DNA extraction, amplification and sequencing

Non-destructive DNA extraction of the adult parasitoids specimens was carried out following the methodology proposed by Gilbert *et al.* (2007) After extraction, the DNA samples were amplified using polymerase chain reaction (PCR) for their partial mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (mtCOI) gene (N-terminal fragment) and the D2 region of the 28S rRNA nuclear gene (Table 4). According to Simon *et al.* (1994), the regions COI and COII have the greatest conservation in insects, and can be widely used in genetic studies. Other studies have shown that the 28S-D2 region can be safely used for these same studies (Heraty *et al.* 2007; Gebiola, Bernardo and Burks, 2010).

PCR reactions comprised the following final concentrations: 1× PCR Buffer (10×), dNTP 0,2mM each (10 mM stock concentration), Primer F 0.2 uM (10 uM stock concentration), Primer R 0.2 uM (10 uM stock concentration), Platinum™ Taq DNA Polymerase (2.5 U) and DNA (30 ng) in 25µL reaction volume. Concentrations in the two PCR reactions for the mtCOI and the 28S rRNA were the same except for the MgCl₂ (50 mM stock concentration), with 2.5 mM used for the amplification of the mtCOI region and 2.0 mM used for the 28S rRNA D2 region. Amplification results were attested by electrophoresis visualization on 1.5% TAE agarose gels.

Taxonomic characterization

Parasitoid specimens were placed on microscopy slides prepared with Canada balm, following the methodology proposed by Noyes (1982) and Huber (2015). Parasitoid identification was based on female adults, using the taxonomy keys from Polaszek *et al.* (1992), Zolnerowich and Rose (1998) and Myartseva and Evans (2008).

Sequence analysis and molecular characterization

The programs Pregap and Gap4 within the Staden package (Staden *et al.* 2000) were used for editing and analyzing the DNA sequences and to generate sequence contigs. Assembled partial mtDNA COI contigs were checked for premature stop codons that could

indicate a pseudogene (e.g., nuclear mtDNA) using Geneious R8 (Biomatters Ltd., New Zealand) and BLASTp.

Nucleotide diversity between the sampled specimens and previously reported species were calculated in Arlequin (Excoffier; Laval; Schneider, 2005). Maximum likelihood phylogeny was inferred using the web-based program PhyML (Guindon *et al.* 2010), using the automatic model selection option followed by 10000 bootstrap replications to estimate node confidence. *Cocophagoides moeris* (Walker, 1839) (AY264342) and *Cocophagoides fuscipennis* (Girault, 1908) (AY599378) were used as out-group species for the phylogenetic analysis of COI mitochondrial gene and D2 nuclear ribosomal gene, respectively. We chose this outgroup because according to Polaszek and Hayat (1992), the *Cocophagoides* genera (Aphelinidae: Coccophaginae: Pteroptricini), is considered as potential brothers of *Encarsia* groups.

Photographs

Photographs were made with a Leica DM2500 microscope, equipped with a Leica MC 170 HD digital camera. Image stacks were combined using Leica Application Suite v4.0Ph to obtain final images with extended focus.

Sex ratio of parasitoids

The total number of parasitoids collected at each location was used to estimate the sex ratio according to the formula according to Silveira Neto *et al.* (1976): number of females / (number of males + number of females). The data were corrected to the Qui-quadrado test that proves the proportion of males and each species according to Fisher's theory (1:1) at 5% significance.

RESULTS

Taxonomic characterization based on morphological traits resulted in the identification of 236 individuals as *En. formosa* (from greenhouse tomatoes grown in Santa Maria), 92 as *En. porteri* (Mercet, 1928) (from soybean grown in Santa Maria) and 111 as *Er. mundus* Mercet, 1931 (from greenhouse tomatoes grown in São José do Hortêncio). According to Polaszek *et al.* (1992), females of the *En. porteri* has a light-colored head, thorax e gaster,

yellow to off-white, and may have dark spots in the mesoscutum and armpits. Clavate antennae with three segments (Fig. 1). The stematicum dark in, at least the inner edges of ocelli, in contrast to the remainder of the head (Fig. 2). Tarsal formula 5-5-5 (Fig. 3); *En. formosa*, on the other hand, has a black head and thorax. Each axilla with at least reticulate cells longitudinally and with scutellar sensillum widely separated (Fig. 4). Female funicle 2 (F2) with a sensillum (Fig. 5) and a tarsal formula 5-4-5 (Fig. 6).

A species of the genus *Eretmocerus* was also collected, *Er. mundus*. According to Zolnerowich and Rose (1998), this species females are easily recognized for having antenna with 2 funicular segments, having a total of 5 segments, with the apical segment greatly elongated (Fig. 7). The ventral surface of the first funicular segment being equal in length to the ventral surface on the second funicular segment (Fig. 8). Tarsal formula 4-4-4. The male's antenna without funicular segments. Metanotum and scutellum evenly fuscous across their widths.

Molecular analysis confirmed the characterization based on morphological traits, with both D2 and COI gene regions providing the same level of species separation. Differently from *En. formosa* and *Er. mundus*, there was no sequence available for *En. porteri* on GenBank. Morphological identification was therefore necessary in the first instance, followed by submission of its partial mtCOI and D2 sequences to GenBank. The phylogenetic trees generated for each genus are shown in Figures 9, 10, 11 and 12, with the respective GenBank accession numbers shown on Table 5.

Phylogenetic trees for COI region grouped *En. formosa* from Santa Maria and São José do Hortêncio within the same clade (AY264337; 99.53% of similarity) and together with *En. luteola* Howard, 1895 (AY264340), composing what is known as the luteola complex (Monti; Nappo; Giorgini. 2005; Fattah-Hosseini et al 2014). The same grouping was provided by the D2 nuclear ribosomal region phylogenetic tree, where *En. formosa* collected in Santa Maria showed 100% similarity with the reported *En. formosa* (AF223375) from USA by Babcock and Heraty (2000). However, there was low phylogenetic support for *En. formosa* in the ribosome region. *Er. mundus* identified from mitochondrial partial COI gene analysis was 99.61% similar to previously unpublished GenBank record for *Er. mundus* (FM210168), while the nuclear ribosomal gene showed 100% of similarity to AF273667 (De Barro *et al* 2000). The D2 region and potentially the partial mtCOI gene sequence placed our *Er. mundus* within the same clade as the other *Eretmocerus* species available within the GenBank database.

Phylogenetic analysis of *Encarsia* sequences based on the COI gene region, using the

Maximum Likelihood analyses, showed that the *En. porteri* is paraphyletic, *En. porteri* is the sister species of the clade that includes the *En. formosa* and *En. luteola* species in the two phylogenies (bootstrap support of 28S phylogeny = 100), however in mtCOI phylogenetic tree there is low bootstrap support.

The sex ratios of the specimens collected were 0.99 for *En. formosa*, 1 for *En. porteri* and 0.3 for *Er. mundus* (Table 6). Statistical analysis using the corrected Chi-Square test (Yates) showed a significant result ($p < 0.0001$), which shows that the observed values do not agree with those expected by Fisher's theory (1:1). For the two species of *Encarsia*, the proportion of females is greater than that of males, while *Eretmocerus* is the opposite result.

The descriptive analyses on genetic diversity among the species based on nucleotide diversity for *Encarsia* genera was 0.113 ± 0.069 for the D2 region of the 28S rRNA nuclear gene and 0.085 ± 0.052 for the partial mtCOI gene; 0.0302 ± 0.0205 and 0.276 ± 0.181 for *Eretmocerus* genus for the D2 region of the 28S rRNA nuclear gene and the partial mtCOI gene, respectively (shown in Table 7).

DISCUSSION

The morphological identification of the genus *Encarsia* is complicated and requires an expertise, because some species of the genus *Encarsia* are morphologically identical, is the case of *En. formosa* and *En. luteola* (Myartseva, Evans & Coronado-Blanco 2014), which may eventually lead to misunderstandings in the identification of this genus, thus the complementary use of molecular techniques served to strengthen the identification of the *Encarsia formosa* that we found. With regard to *En. porteri*, it would not be possible to identify it using only the molecular tools, since there are no sequences of this species available at Genbank to make a comparison, so the traditional taxonomy allowed us to produce the first sequence of *En. porteri*. Showing that the techniques do not overlap, but are complementary (Hernández-López *et al.* 2012).

The *Er. mundus*'s tree from the mtCOI region revealed some differences between our *Er. mundus* and that sequenced by Pasquer *et al.* (2009). The same happened with the nuclear tree, where our sequence differed from the work of De Barro *et al.* (2000). These divergences in the separation between *Er. mundus* species, both on mtCOI and nuclear DNA phylogenies, support Ardeh's (2004) suggestion of speciation occurring within the *Er. mundus* species. However, such outcome may also be the result of low sampling, inadequate molecular markers or potential existence of a species complex, demanding further studies to resolve this

issue.

Our study provided the first report of *En. formosa* and *Er. mundus* occurring in tomatoes and *En. porteri* in soybean crops at Rio Grande do Sul state, South Brazil. To date, 28 species from the genus *Encarsia* and three from the genus *Eretmocerus* have been reported in Brazil (Noyes, 2019; Lourenção *et al.* 2014). According to Parra and Pinto (2016), *Encarsia* (= *Prospaltella*) *berlesi* (Howard, 1906) was introduced in Brazil in 1921, imported from US to control *Pseudaulacaspis pentagona* (Hemiptera: Diaspididae) and representing the first biological control program established in the country. Near Brazil, *En. formosa* (De Santis, 1983), *En. porteri* (De Santis, 1967), *Er. mundus* (López and Evans, 2008) and other parasitoid species have been reported in Argentina. Also, experimental releases of *En. formosa* have been carried out in the southern region of Uruguay (Grille *et al.* 2012). The genus *Eretmocerus* has been reported in Paraguay (Michel and Prudent, 1987). The three countries share geographical borders with South Brazil, pointing to agricultural trade as one likely dissemination route for these species.

Among the biological traits surveyed through the samplings, female: male sex ratio within the same population stands out as a major factor influencing reproduction capacity of parasitoid species (Favero *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2016). Values lower than 0.5 are indicative of male predominance, which in some commercial situations are not as important due to the use of *Wolbachia* sp. (Potrich, 2014).

Er. mundus progeny was mostly male (sex ratio = 0.3) in our tomato sampling sites, similar to results found by López and Castro (2010) at 25 °C. Sharaf and Batta (2009), on the other hand, observed a sex ratio of 0.6 for this species in tomato plants. In addition, the aforementioned authors found that as temperature increases, the number of males in relation to females also increases. Ratios as low as 0.3 are good indicatives of population decrease in the subsequent generation, considering that *Er. mundus* has been reported as reproducing both through thelytokous parthenogenesis in Australia (De Barro *et al.* 2000), which would be expected to result in a female-biased sex ratio, and arrhenotokous parthenogenesis in Spain (Rodryguez *et al.* 1994), which would suggest a lack of males in the previous generation.

Hoddle *et al.* (1998) highlight that female predominance within *En. formosa* populations is likely a result of infection by endosymbiotic bacteria *Wolbachia* spp., which boosts female production from non-fertilized eggs. Similar to *En. porteri*, *En. formosa* females and males develop exclusively on whitefly nymphs and lepidopteran eggs, respectively (Hunter and Woolley, 2001; Hunter, Rose and Polaszek, 1996; Williams and Polaszek, 1996; Gerling, 1990). Since only whitefly nymphs were sampled, the sex ratio of

this species was not assessed. As a rule, the natural geographical range of insect species is directly related to environmental conditions, which may increase or decrease its reproductive capacity (Albergaria and Cividanes, 2002; Hoddle *et al.* 1998). Waage *et al.* (1985) suggest some factors that can affect the sexual proportion of parasitic wasps, such as the degree of mating, host size, agglomeration and high temperatures, in this same study the authors emphasize that some parasitic female wasps can respond to external stimuli by regulating sex of the eggs laid, where, females tend to lay male eggs in small hosts, in hosts already parasitized and in response to the physical and chemical effects of agglomeration. Also judging that male larvae tend to be competitively superior. An example of female sterility correlated with the crowding of parental females during oviposition was reported by Gerling and Fried (1997), similar to what happened in our study.

The predominance of *Er. mundus* in São José do Hortêncio may be related to the species' ability to endure high temperatures, as observed under greenhouse conditions during summer months; in the Vale do Caí region, temperatures from January to March often surpass 45 °C. Temperature is a strong modulator of adaptability between different insect species (Gonzalez-Tokman *et al.* 2020). *En. formosa* performs parasitism between 22°C and 25°C and endures lower temperatures (Helgesen and Tauber, 1974), while *Er. mundus* (native to the Mediterranean region) is better adapted to higher temperatures (Zolnerowich and Rose, 2008). Wang and Keller (2020) in their work with *Er. warrae* Naumann and Schmidt, 2000, emphasize that temperature is an important factor for both survival and fertility, also suggesting that further studies should be carried out so as to optimise this as strategies (i.e., the parasitoids' ability to control their target pest) in a protected environment.

Considering the temperature variations to which greenhouse tomatoes are exposed throughout the year, *En. formosa* and *Er. mundus* could be combined in an IPM strategy exploring their complementary traits. In this way, *En. formosa* releases could take place at the end of winter and during spring months, while *Er. mundus* would be used during summer months. The need for a companion species such as *Er. mundus* to enhance *En. formosa* activity under greenhouse conditions has been reported (Workman *et al.* 2008; Workman and Davidson, 2007; Workman and Pedley, 2007) and could be supplied by the genus *Eretmocerus*. *En. formosa* and *En. mundus* could, therefore, be successfully raised and used for *B. tabaci* control in greenhouse tomato crops of South Brazil.

Although we did not succeed in PCR-amplifying the *B. tabaci* samples to check which species are present on each collection site, Marubayashi *et al.* (2012) states that four different *B. tabaci* species are present in Brazil: Middle East - Asia Minor 1 (MEAM1), Mediterranean

(MED), New World (NW) and New World 2 (NW2). The presence of MEAM1 was confirmed in soybeans fields from Itaara, a municipality neighbouring Santa Maria (de Moraes *et al.* 2018). In Santa Maria our study confirmed the occurrence of *En. porteri* in soybean and *En. formosa* in tomatoes, indicating a possible association of *En. porteri* and MEAM1 sampled from soybeans.

In municipalities near Sao Jose do Hortêncio, we identified the presence of MEAM1 and MED *B. tabaci* species (de Moraes *et al.* 2018). In this location, on samples from greenhouse tomatoes, the presence of *En. formosa* and *Er. mundus* was confirmed. Several authors have showed the parasitism capacity of *Encarsia* and *Eretmocerus* genera in MEAM1 (*B. tabaci* B-biotype) in different parts of the world (Polaszek, 1992), and specifically in Brazil: *En. formosa* (Takahashi *et al.* 2008) and *Er. mundus* (Lourenção *et al.* 2014).

The reliability of similar programs for whitefly management in soybean (where *En. porteri* was abundantly found) is much less evident, due to the current large-scale, high-input model employed for the crop. Nevertheless, natural parasitism can help control *B. tabaci* populations resistant to insecticides (Souza *et al.* 2014) and/or reduce the amount of insecticide needed to control susceptible individuals, due to reduction in their population. Another alternative is the use of parasitoids for whitefly control in organic or pesticide-free soybean, which aims at the maintenance of ecological equilibrium and often results in higher profit due to lower input of fertilizers and agrochemicals (Hirakuri *et al.* 2011).

The nucleotide diversity (measures of genetic divergence / degree of differentiation; ND) observed between the different species of the genera *Encarsia* and *Eretmocerus* was overall low. Analysis of the genus *Encarsia* presented low ND, both for NG (0.112634 +/- 0.069082) and MG (0.084641 +/- 0.051937) analysis. The *Eretmocerus* genus presented ND = 0.0302277 +/- 0.020483 (NG), considered low, and ND = 0.27776203 +/- 0.181352 (MG), considered high, showing little evolutionary divergence across a small fraction of genes. The ND values are shown on Table 4. Low ND values can be indicative of a recent or slow population expansion (Excoffier *et al.* 2009).

Considering the increasing demand for environment-friendly, pesticide-free food (Gouveia, 2006), the use of parasitoids from the genera *Encarsia* and *Eretmocerus* presents great potential as a control strategy for *B. tabaci* in South Brazil. The success of establishing sustainable management programs, based on the IPM approach, depends heavily on the use of biological control with natural enemies (Hopkinson *et al.* 2019). Identifying native parasitoid species and understanding its dynamics within tropical agricultural systems are the first steps in developing guidelines for the raise and release of biological control agents, whether

through introduction or conservation programs. Further studies will be needed to enable large-scale creation and commercial use of these biological agents in southern Brazil, aiming to maximize crop yield and minimize production costs in an ecologically sustainable and viable way.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank agricultural extension officers Lauro Bernardi, Hector Augustus Santiago Eder, Anna Cristina Xavier, Mateus Monteavaro and Kátia Huber, from Emater/ASCAR Lajeado; agricultural extensionists Guilherme Passamani and Carlos Moro, from Emater/ASCAR Santa Maria for helping us collect whitefly nymphs; tomato grower Airton Seidel, from São José do Hortêncio for letting us collect on your farm; the Horticulture Association of Feliz for introducing us to vegetable growers harmed by whitefly attacks; the Biological Institute for support in taxonomic identifications; Dr. Alberto Soares Corrêa and Entomol research lab (USP/ESALQ) for support in molecular analysis; Dr. Roberto Antonio Zucchi (USP/ESALQ) for support in taxonomic identifications; students from Molecular Insect Lab (UFMS) for help with field collections; and CAPES for granting the authors' (Daniela and Henrique) scholarships. Thanks is due INCT-Hympar (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides, Process 465562/2014-0) for financial support to Valmir Antonio Costa.

REFERENCES

AgInnovators (2016) Greenhouse vegetable acreage up 14% globally in 2015. California, US. <https://www.aginnovators.org.au/news/greenhouse-vegetable-acreage-14-globally-2015>. Accessed 10 March 2020.

Albergaria NMS, Cividanes FJ (2002) Exigências térmicas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop Entomol* 31: 359-363. DOI:10.1590/S1519-566X2002000300003

Antony B, Palaniswami MS, Kirk AA, Henneberry TJ (2004) Development of *Encarsia bimaculata* (Heraty and Polaszek) (Hymenoptera: Aphelinidae) in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) nymphs. *Biological Control*, 30, pp. 546 – 555. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2004.01.018

Araújo EL, Zucchi RA (2002) Hospedeiros e níveis de infestação de *Neosilba pendula* (Bezzi) (Diptera: Lonchaeidae) na região de Mossoró, RN. *Arquivos do Inst. Biológico* 69:91-94.

Ardeh MJ (2004) Whitefly control potential of *Eretmocerus* parasitoids with different reproductive modes. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, Netherlands.

Arnemann JA, Bevilaqua JG, Bernardi L, da Rosa OD, da Encarnação FA, Pozebon H, Marques RP, Moro D, Ribas D, Patias LS, Forgiarini SE, Padilha G, Campos JVL, Rohrig A (2019) Integrated management of tomato whitefly under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Science*, v. 11, pp. 443. DOI:10.5539/jas.v11n5p443

Avise JC (2000) *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. DOI: 10.1093/icb/41.1.134

APRD (2019) Arthropod pesticide resistance database. <https://www.pesticideresistance.org/search.php> Accessed 14 December 2019.

Babcock CS, Heraty JM, De Barro PJ, Driver F, Schmidt S (2001) Preliminary phylogeny of *Encarsia* Förster (Hymenoptera: Aphelinidae) based on morphology and 28S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2), pp 306–323. DOI:10.1006/mpev.2000.0875

Babcock CS, Heraty JM (2000) Molecular markers distinguishing *Encarsia formosa* and *Encarsia luteola* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Annals Entomological Society of America*. 93(4): 738–744. DOI: 10.1603/0013-8746

Barbosa L, Marubayashi JM., de Marchi BR, Yuki VA, Pavan MA, Moriones E, Navas-Castillo J, Krause-Sakate R (2014) Indigenous American species of the *Bemisia tabaci* complex are still widespread in the Americas. *Pest Management Science*, 70(10), 1440–1445. DOI: 10.1002/ps.3731

Castro Y, López S (2010) Biología de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide del complejo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), en condiciones de laboratorio. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*, 69. 45-56. DOI: 10.1590/brag.2014.025

Ciomperlik MA, Goolsby JÁ (2008) Field evaluation of *Bemisia* parasitoids in Texas. In classical biological control of *Bemisia tabaci* in the United States – A Review of interagency research and implementation, ed. J Gould, KA Hoelmer, JA Goolsby, v 4, pp. 147–159. *Progress in Biological Control*, v 4. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-1-4020-6740-2_9

De Barro PJ, Liu S, Boykin LM, Dinsdale AB (2011) *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review Entomology* 56, 1–19. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085504

De Barro PJ, Hart PJ, Morton R (2000) The biology of two *Eretmocerus* spp. (Haldeman) and three *Encarsia* spp. (Hymenoptera: Aphelinidae) Forster and their potential as biological control agents of *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) in Australia. *Entomologia Experimental Applicata* 94: 93–102. DOI: 10.1046/j.1570-7458.2000.00608.x

De Barro PJ, Driver F, Naumann ID, Schmidt S, Clarke GM, Curran, J (2000) Descriptions of three species of *Eretmocerus* Haldeman (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitising *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) in Australia based on morphological and molecular data. *Australian Journal of Entomology*. 39. 259 - 269. DOI: 10.1046/j.1440-6055.2000.00194.x

De Moraes La, Muller C, Bueno R, Santos A, Bello V, De Marchi BR, Fernando L, Watanabe L, Marubayashi J, Santos B, Yuki V, Takada H, Barros D, Neves C, Da Silva F, Gonçalves M, Ghanim M, Boykin L, Agenor P, Krause-Sakate R (2018) Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. *Scientific Reports* 8, 14589. DOI: 10.1038/s41598-018-32913-1.

De Santis L (1967) Catálogo de los Himenópteros argentinos de la serie parasitica, incluyendo Bethyloidea. *Revista Peruana de Entomología* pp.131.

De Santis L (1983) Catálogo de los Himenopteros Calcidoideos de America al Sul de los Estados Unidos - Primer Suplemento. *Revista Peruana de Entomología* 24(1):27.

De Vis RMJ (2001) Biological control of whitefly on greenhouse tomato in Colombia: *Encarsia formosa* e *Amitus fuscipennis*? Wageningen, 165p.

EMATER/RS-ASCAR (2017) Regional Santa Maria.

http://www.emater.tche.br/site/multimidia/noticias/detalhenoticia.php?id=28050#.XV_PEuhKjIU>. Accessed 13 January 2020.

EMATER/RS-ASCAR (2018) Regional Lajeado. <http://www.emater.tche.br/site/emater/apresentacao.php#.XDzAxtQrKt8>. Accessed 13 January 2020.

EMBRAPA (2019) Coleção 500 Perguntas 500 Respostas: Soja. 1ª Edição (ISBN 978-85-7035-877-6). Londrina 274p,

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:4750.

Excoffier L, Foll M, Petit RJ (2009) Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 40: 481D501.

Favero K, Pereira FF, Kassab SO, De Oliveira HN, Costa DP, Zanuncio, JC (2013) Biological characteristics of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) are influenced by the number of females exposed per pupa of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Florida Entomologist*, 96: 583-589. DOI: 10.1653/024.096.0224

Fattah-Hosseini S, Karimi J, Allahyari H (2014) Molecular Characterization of Iranian *Encarsia formosa* Gahan Populations with Natural Incidence of *Wolbachia* Infection. *Journal of the Entomological Research Society*. 16.

Filgueira FAR (2008) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa-MG: UFV, 3ª ed., 421p.

Gebiola M, Monti MM, Johnson RC, Woolley JB, Hunter MS, Giorgini, M, Pedata, PA (2017) A revision of the *Encarsia pergandiella* species complex (Hymenoptera: Aphelinidae) shows cryptic diversity in parasitoids of whitefly pests. *Systematic Entomology*, 42, 31–59. DOI: 10.1111/syen.12187

Gebiola M, Bernardo U, Burks RA (2010) A reevaluation of the generic limits of *Pnigalio* Schrank (Hymenoptera: Eulophidae) based on molecular and morphological evidence.

Zootaxa, 2484, 35–44. DOI: 10.11646/zootaxa.2484.1.3

Gerling D, Alomar O, Arno J (2001) Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. *Crop Protection, England*, v.20, p. 779-799.

Gerling D, Fried R. (1997). Density-related sterility in *Eretmocerus mundus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 84, 33-39.

Gilbert MTP, Melchior L, Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PloS ONE*, 2(3), e272.

Gilbertson RL, Batuman O, Webster CG, Adkins, S (2015) Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *Annual Review of Virology*, 2, 67-93. DOI: 10.1146/annurev-virology-031413-085410.

Gonzalez-Tokman D, Córdoba-Aguilar A, Dáttilo W, Lira-Noriega A, Sánchez Guillén R, Villalobos F (2020). Insect responses to heat: physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biological Reviews*. 95. DOI: 10.1111/brv.12588

Gouveia F (2006) Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. *Revista Inovação Uniemp*. 2(5): 32-37.

Grille G, Lorenzo ME, Burla JP, Franco J, Basso C (2012) Parasitoid Niches of *Encarsia formosa* and *Encarsia Lycopersici* (Hymenoptera: Aphelinidae) exploiting *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Florida Entomologist*, 95(4), 1024-1030. DOI: 10.2307/41759152

Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, v. 59, p. 307–321. DOI: 10.1093/sysbio/syq010

Hansen LS, Jakobsen J, Reitzel J (1984) Extent and economics of biological control of *Tetranychus urticae* and *Trialeurodes vaporariorum* in Danish glasshouses. *EPPO Bulletin* 14, 393-399. DOI: 10.1111/j.1365-2338.1984.tb02058.x

Helgesen RG, Tauber MJ (1974) Biological control of greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Aleyrodidae: Homoptera) on short-term crops by manipulating biotic and abiotic factors. *Canadian Entomologist* 106:1175–88. DOI: 10.4039/Ent1061175-11

Hernández-López A, Rougerie R, Augustin S, Lees DC, Tomov R, Kenis M, Çota E, Kullaj E, Hansson C, Grabenweger G, Roques A, & López-Vaamonde C (2012). Host tracking or cryptic adaptation? Phylogeography of *Pediobius saulius* (Hymenoptera, Eulophidae), a parasitoid of the highly invasive horse-chestnut leafminer. *Evolutionary applications*, 5(3), 256–269. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2011.00220.x

Hirakuri M, De Oliveira AB, Tavares LCV, Seixas CDS, Pastore A (2011) Avaliação econômica do cultivo orgânico de soja no Estado do Paraná para a safra 2010/11. *Embrapa Soja*. Londrina, Paraná (Circular Técnica nº85). 9.p.

- Hirose E, Batista AS, Silva, MS (2015) Correlação da ocorrência de fumagina em soja com a população de ninfas de mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Congresso Brasileiro de Soja, Embrapa Soja, Cuiabá, MT: VI.
- Hoddle MS, Van Driesche RG, Sanderson JP (1998) Biology and use of the Whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. *Annual Review of Entomology*, 43, 645-669. DOI: 10.1146/annurev.ento.43.1.645
- Hopkinson J, Pumpa S, Van Brunschot S, Fang C, Frese M, Tay WT, Walsh T (2019) Insecticide resistance status of *Bemisia tabaci* MEAM1 (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australian cotton production valleys. *Austral Entomology*, 59, 202-214. DOI: 10.1111/aen.12436
- Huber JT (2015) World reclassification of the *Gonatocerus* group of genera (Hymenoptera: Mymaridae). *Zootaxa* 3967 (1): 001–184. DOI: 10.11646/zootaxa.3967.1.1.
- Hunter MS, Woolley JB (2001) Evolution and behavioral ecology of heteronomous aphelinid in the parasitoid *Encarsia porteri* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Annual Review of Entomology* 46: 251-290. DOI: 10.1146/annurev.ento.46.1.251
- Hunter MS, Rose M, Polaszeck A (1996) Divergent host relationships of males and females in the parasitoid *Encarsia porteri* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 89, 667–675. DOI: 10.1093/aesa/89.5.667
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia (2019)
http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo_sim.php?QTgwMw. Accessed 13 February 2019.
- Khan IA, Wan FH (2015) Prey consumption of *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera, Aphelinidae) un-parasitized and parasitized *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera, Aleyrodidae) biotype B prey by *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera, Coccinellidae) predator. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, Khyber, v. 3, n. 4, p. 223-228.
- Kumar A, Baitha A, Bareliya PK (2016) Some biological aspects of pupal parasitoid, *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae) on *Chilo auricilius* (Dudgeon) pupae. *Current Bioactive Compounds*, 10: 170-174.
- Lahey Z, Stansly P (2015) An updated list of parasitoid hymenoptera reared from the *Bemisia tabaci* species complex (Hemiptera: Aleyrodidae). *Florida Entomologist*, 98:456–463. DOI: 10.1653/024.098.0211
- Lapidot M, Legg J, Wintermantel W, Polston J (2014) Management of whitefly-transmitted viruses in open-field production systems advances in virus research. Elsevier, pp. 147-206. DOI: 10.1016/B978-0-12-801246-8.00003-2.
- López SN, Evans GA (2008) Nuevos registros de especies del género *Eretmocerus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoides de *Trialeurodes vaporariorum* y el complejo *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, v.67, p.185-187.

Lourenção AL, Costa VA, Pereira LS, Prado JC (2014) Occurrence of *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitizing *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) in Brazil. *Bragantia*, 73(2), 160-162. DOI: 10.1590/brag.2014.025

Malumphy C, Eyre D, Anderson H (2017) Tobacco, sweet potato or silver leaf whitefly: *Bemisia tabaci*. Planthealth Portal. <https://planthealthportal.defra.gov.uk/assets/factsheets/Bemisia-tabaci-Defra-Plant-Pest-Fact-sheet-Feb-2017-2.pdf>. Accessed 13 February 2020.

Manzari S, Polaszek A, Belshaw R, Quicke DLJ (2002) Morphometric and molecular analysis of the *Encarsia inaron* species-group (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoids of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 92(02). DOI: 10.1079/BER2001144

Marubayashi MJ, Yuki VA, Rocha KCG, Mituti T, Pelegrinotti FM, Ferreira FZ, Moura MF, Navas-Castillo J, Moriones E, Pavan MA, Krause-Sakate R (2012) At least two indigenous species of the *Bemisia tabaci* complex are present in Brazil. *Journal of Applied Entomology*. v. 137. p. 113-121. DOI:10.1111/j.1439-0418.2012.01714.x

Myartseva SN, Evans GA (2008) Genus *Encarsia* Förster of Mexico (Hymenoptera: Chalcidoidea: Aphelinidae) A revision, key and description of new species. *Serie Avispas Parasíticas de Plagas y otros Insectos No. 3*. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria, México, 320 pp.

Myartseva S, Evans G & Coronado-Blanco J (2014). The *Encarsia noyesi* species-group (Hymenoptera, Chalcidoidea, Aphelinidae) in the Neotropical region, with a key and description of the male of *E. andrewi* from Mexico. *Journal of Hymenoptera research*. 39. 36-46. DOI: 0.3897/JHR.39.7307

Michel B, Prudent P (1987) Prédateurs et parasitoïdes des ravageurs du cotonnier au Paraguay. *Coton et Fibres Tropicales*, 42 (3); pp. 165-172.

Monti MM, Nappo AG, Giorgini M (2005) Caracterização molecular de espécies intimamente relacionadas em o gênero parasitário *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) baseado no citocromo mitochondrial gene da subunidade I da oxidase. *Bulletin of Entomological Research*, 95: 401-408

Muraji M, Tachikawa S (2000) Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea) based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. *Entomological Science*. 3. 615-626.

Noyes JS (1982) Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History, Abingdon*, v. 16 p. 315-334.

Noyes JS (2019) Universal Chalcidoidea Database. <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>. Accessed 12 October 2019.

Oliveira RP, Pessoa LGA, De Souza Loureiro E, Oliveira MP (2018) Compatibilidade de inseticidas utilizados no controle da mosca branca em soja com *Beauveria bassiana*. *Revista*

de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS, v. 5, n. 4, p. 88-93. DOI: 10.32404/rean.v5i4.2416

ONSTAD DW (2008) Major issues in insect resistance management. In: ONSTAD, D. W. (Ed.). *Insect resistance management: biology, economics and prediction*. Chennai: Macmillan Company, p. 01-16. DOI: 10.1016/B978-0-12-396955-2.00001-1

Paiva PEB, Parra JRP (2012) Natural parasitism of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera, Psyllidae) nymphs by *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera, Eulophidae) in São Paulo orange groves. *Revista Brasileira Entomologia*. São Paulo, v. 56, n. 4, p. 499-503.

Parra JRP, Botelho PSM, Pinto A De S (2010) Controle biológico de pragas como um componente-chave para a produção sustentável da cana-de-açúcar. In: Barboza-Cortez LA (ed) *Bioetanol de cana-de-açúcar: P, D para sustentabilidade e produtividade*. Blucher, São Paulo, pp 441–450

Parra JRP, Pinto A De S (2016). In: VIEIRA et al. *Defensivos agrícolas naturais usos e perspectivas*. Brasília, DF: Embrapa.
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153291/1/2016LV01-1.pdf>. Accessed 16 May 2020.

Pasquer F, Pfunder M, Frey B, Frey J (2009) Microarray-based genetic identification of beneficial organisms as a new tool for quality control of laboratory cultures. *Biocontrol Science and Technology*. 19. 809-833. DOI: 0.1080/09583150903134509

Polaszek A (1992) *Encarsia* parasitoids of *Bemisia tabaci* (Hymenoptera: Aphelinidae, Homoptera: Aleyrodidae): a preliminary guide to identification. *Bulletin of Entomological Research*, London, v.82, p.375-392. DOI: 10.1017/S0007485300041171

Polaszek A, Abdrabou S, Huang J (1999) The Egyptian species of *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae): a preliminary review. *Zoologische Mededelingen*, Leiden 73, 131–163.

Polaszek A, Manzari S, Quicke DLJ (2004) Morphological and molecular taxonomic analysis of the *Encarsia meritoria* species-complex (Hymenoptera, Aphelinidae), parasitoids of whiteflies (Hemiptera, Aleyrodidae) of economic importance. *Zoologica Scripta*, 33(5), 403–421. DOI: 10.1111/j.0300-3256.2004.00161.x

Polaszek A, Evans GA, Bennett FD (1992) *Encarsia* parasitoids of *Bemisia tabaci* (Hymenoptera: Aphelinidae, Homoptera: Aleyrodidae): a preliminary guide to identification. *Bulletin of Entomological Research*, Cambridge, v. 82, n. 3, p. 375-392. DOI: 10.1017/S0007485300041171

Polaszek A, Hayat M (1992) A revision of the genera *Dirphys* Howard and *Encarsiella* Hayat (Hymenoptera: Aphelinidae). *Systematic Entomology* 17: 181–197. DOI: 10.1111/j.1365-3113.1992.tb00329. x.

Potrich M (2014) Seletividade de fungos entomopatogênicos a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e virulência a *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Ceres* v. 61 n 6.

Pozebon H, Marques RP, Padilha G, O'Neal M, Valmorbidia I, Bevilaqua JG, Tay WT, Arnemann JA (2020) Arthropod invasions versus soybean production in Brazil: a review. *Journal of Economic Entomology*. In press. DOI: 10.1093/jee/toaa108

Rodryguez D, Fernández R, Moreno R, Rodríguez M, Téllez MA (1994) *Eretmocer* mundus (Mercet), *Encarsia lutea* (Masi) *Encarsia transvena* (Timberlake) (Hym., Aphelinidae) parasitoides de *Bemisia tabaci* (Hom., Aleyrodidae) en los cultivos hortícolas protegidos almerienses. *Bulletin Sanidad Vegetal Plagas*, 20: 695–702.

Rosa DO (2017) Diagnóstico do uso e do manejo de agrotóxicos na olericultura em propriedades de agricultura familiar no município de Feliz. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

Rose M, Zolnerowich G, Hunter MS (1995) Systematics, *Eretmocer*, and biological control. En: D. Gerling y R.T. Mayer (eds), *Bemisia: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*, Intercept. Andover, UK. pp. 477–497.

Sharaf N, Batta, Y (2009) Effect of some factors on the relationship between the whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Homopt., Aleyrodidea) and the parasitoid *Eretmocer* mundus Mercet (Hymenopt., Aphelinidae). *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 99(1-5), 267–276. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1985.tb01988.x

Silveira Neto S, Nakano O, Vila Nova NA (1976) Manual de ecologia de insetos. Piracicaba-SP: Ceres. 419p.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook, P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701. DOI: 10.1093/aesa/87.6.651.

Sottoriva LDM (2010) Aspectos biológicos de *Bemisia tabaci* biótipo B em plantas infestantes. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas – São Paulo.

Souza JAB, DOS Santos JB, Batista Filho PA, Cardoso IMM, Quintela ED, Barrigossi JAF. (2014) Parasitismo de ninfas de *Bemisia tabaci* biótipo B, em cultivos de soja no estado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 25., 2014, Goiânia.

Staden, RBKF, Bonfield, JK (2000). The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology*, v. 132, p. 115.

Takahashi KM, Berti Filho E, Lourenção AL (2008) Biology of *Bemisia tabaci* (Genn.) B-biotype and parasitism by *Encarsia formosa* (Gahan) on collard, soybean and tomato plants. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 639-642. DOI: 10.1590/S0103-90162008000600011.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729.

Van Lenteren JC, Woets J (1988) Biological and integrated control in greenhouses. *Annual Review Entomology*. 33:239–69. DOI: 10.1146/annurev.en.33.010188.001323.

Van Lenteren JC (1995) Integrated pest management in protected crops. In *Integrated Pest Management: Principles and Systems Development*, ed. DR Dent, 12:311–43. London: Chapman, Hall. 356 pp.

Vet LEM, Van Lenteren JC, Woets J (1980) The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelenidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). IX A review of the biological control of the greenhouse whitefly with suggestions for future research. *Journal of Applied Entomology*, v.90, p.26-51. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1987.tb00961.x

Waage J.K (1982). Sex ratio and population dynamics of natural enemies-some possible interactions. *Annals of Applied Biology*, 101, 159-167.

Wang T, Keller MA (2020) Larger is Better in the parasitoid *Eretmocerus warrae* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insects*, 11, 39. DOI: 10.3390/insects11010039.

Williams T, Polaszeck A (1996) A re-examination of host relations in the Aphelinidae. *Biological Journal of the Linnean Society*. 19: 63-82.

Willis KJ (2017) *State of the World's Plants*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. https://stateoftheworldsplants.org/2017/report/SOTWP_2017.pdf. Accessed 15 May 2020.

Workman P, Davidson M (2007) Potential biological control agents for greenhouse pests in New Zealand. *New Zealand Institute for Crop, Food Research Limited*, pp. 1-45. DOI: 10.30843/nzpp.1996.49.11403

Workman P, Pedley R (2007) New natural enemies for greenhouse pests. *Grower* 62 (9), 54–55.

Workman P, Scott I, Drayton G (2008) *Eretmocerus warrae*: a new whitefly parasitoid found in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 61, 386-389. DOI: 10.30843/nzpp.2008.61.6855

Zolnerowich G, Rose M (2008) The genus *Eretmocerus*. In: GOULD, J.; HOELMER, K.A.; GOLSBY, J.A. (Ed.). *Classical Biological Control of Bemisia tabaci in the United States - A Review of interagency research and implementation*. Amsterdam: Springer, p.89-109.

Zolnerowich G, Rose M (1998) *Eretmocerus Haldeman* (Hymenoptera: Aphelinidae) importado e liberado nos Estados Unidos para controle do complexo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 100: 310-323.

Zucchi RA (2002) A taxonomia e o controle biológico de pragas. In: José Roberto Postali Parra; Paulo Sérgio Machado Botelho; Beatriz Spalding Corrêa-Ferreira; José Maurício Simões Bento. (Org.). *Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. 1ed. São Paulo, SP: Editora Manole, v. 1, p. 17-27.

TABLES

Tabela 3 – Characterization of the sampling sites for parasitoids of *Bemisia tabaci* nymphs (Hemiptera: Aleyrodidae). Rio Grande do Sul, Brazil. February, 2019.

Name	Municipality	Geographical coordinates	Crop	Environmental condition	Time without insecticide spray
Field	Santa Maria	29°42'48"S 53°43'59"W	Soybean	Field	no spray
Greenhouse 1	Santa Maria	29°43'06.9"S 53°43'10.6"W	Tomato	Greenhouse	100 days
Greenhouse 2	São José do Hortêncio	29°31'50"S 51°14'53"W	Tomato	Greenhouse	60 days

Fonte: a Autora (2021).

Tabela 4 – Primer sequences and PCR conditions.

		PCR Conditions					
	Primer	Pre-denaturation	Denaturation	Aneling	Extension	Cycles	
COI I ^a							
C1-J-2195	5' TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT 3'	94° / 5 min	94° / 45 sec	52° / 4 sec	72° / 1 min e 30 sec	35	
L2-N-3014	3' TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT 5'				72° / 15 min		
28S - D2 ^b							
D2-F	5' CCC GTC TTG AAA CAC GGA CCAA 3'	94° / 1 min	94° / 1 min	53° / 1 min e 30 sec	72° / 1 min e 30 sec	35	
D2-R	3' CCA CAG CGC CAG TTC TGC TTAC 4'				72° / 8 min		

Fonte: a Autora (2021). ^a(SIMON *et al.*, 1994); ^b(Muraji e Tachikawa, 2000).

Tabela 5 – Species, accession numbers, sampling localities and gene region of the GenBank sequences used to construct the phylogenetic trees.

Species	GenBank ID	Locality	Gene region
<i>En. formosa</i>	AY264337	Italy	mtCOI
<i>En. luteola</i>	AY264340	Italy	mtCOI
<i>En. lutea</i>	MH129875	Iran	mtCOI
<i>Er. mundus</i>	FM210168	Koopert/NL	mtCOI
<i>Er. eremicus</i>	FM210162	Koopert/NL	mtCOI
<i>C. moeris</i>	AY264342	Italy	mtCOI
<i>En. sophia</i>	AF254207	California	28S
<i>En. luteola</i>	AF223368	California	28S
<i>En. formosa</i>	AF254192	California	28S
<i>Er. mundus</i>	AF273667	Australia	28S
<i>Er. eremicus</i>	AY599369	California	28S
<i>Er. warrae</i>	AF273666	Australia	28S
<i>C. fuscipennis</i>	AY599378	California	28S

Fonte: a Autora (2021).

Tabela 6 – Sex ratio of parasitoids (Hymenoptera: Aphelinidae) from whitefly nymphs (Hemiptera: Aleyrodidae) collected at different crops and environments at SM and SJH, RS, Brazil, and their sex ratio. February, 2019.

Species	♀	♂	R ^b	TOTAL
	N ^a	N		
<i>Encarsia formosa</i>	234	2	0,99	236
<i>Encarsia porteri</i>	92	0	1	92
<i>Eretmocerus mundus</i>	34	77	0,3	111

Fonte: a Autora (2021).^aN= Parasitoids number and ^bR= Sexual ratio of parasitoids

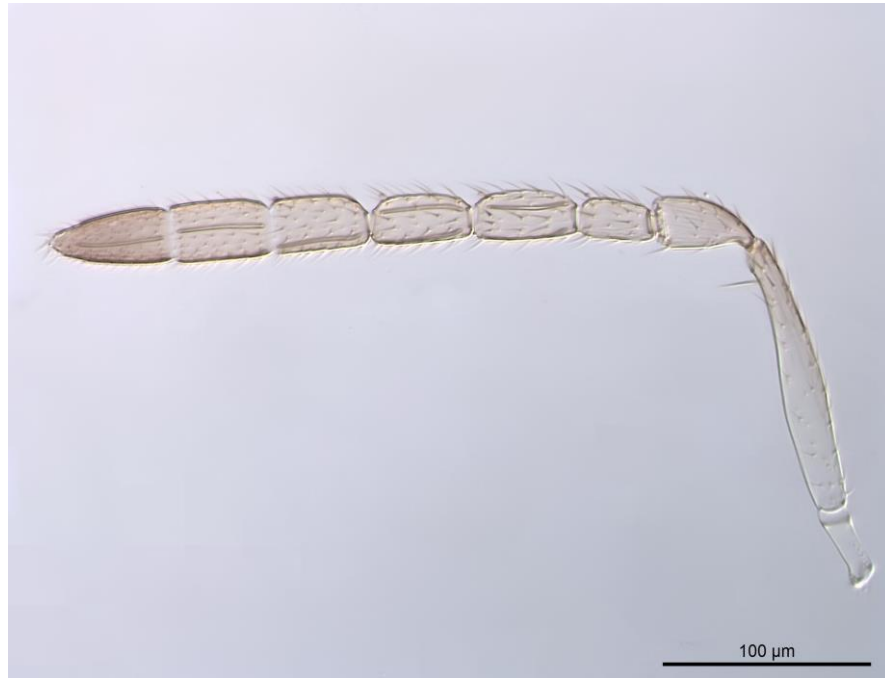
Tabela 7 – Nucleotide composition of the mitochondrial and nuclear genes of the genera *Encarsia* and *Eretmocerus*.

COII								
Genera	Number of sequences	Number of observed nucleotide sites	Number of usable nucleotide sites	Adenine (A)	Timine (T)	Cytosine (C)	Guanine (G)	Number of polimorphic sites
<i>Encarsia</i>	5	599	599	32.65%	44.71%	9.58%	13.06%	104
<i>Eretmocerus</i>	4	445	388	42.80%	32.46%	12.43%	12.31%	192
28 S - D2								
<i>Encarsia</i>	5	514	467	18.22%	25.60%	25.52%	30.66%	110
<i>Eretmocerus</i>	4	599	578	19.83%	21.78%	26.62%	31.76%	27

Fonte: a Autora (2021).

FIGURES

Figura 1 – *Encarsia porteri*, antenna (female).



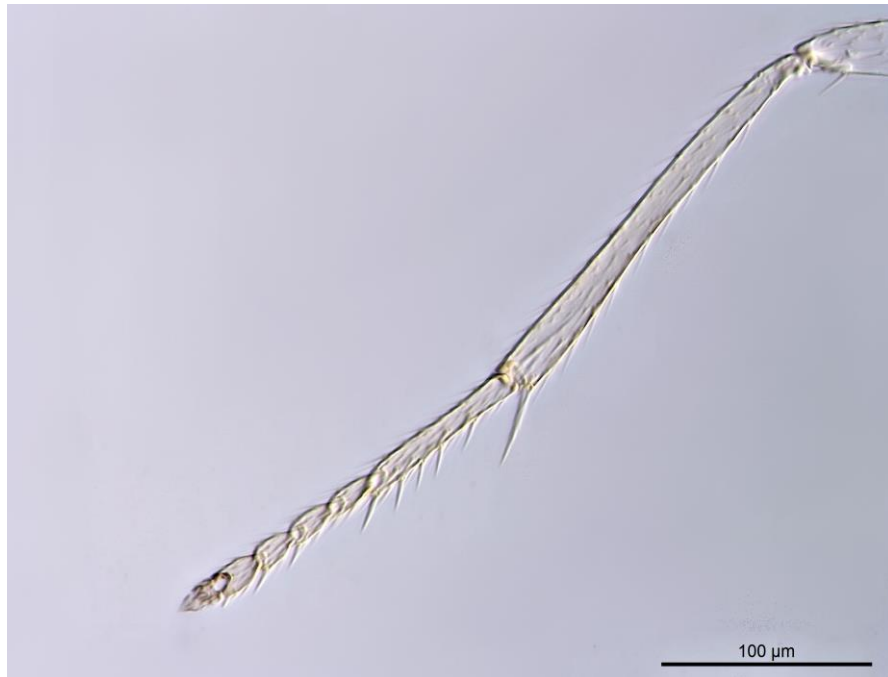
Fonte: a Autora (2021).

Figura 2 – *Encarsia porteri*, front view of head (female).



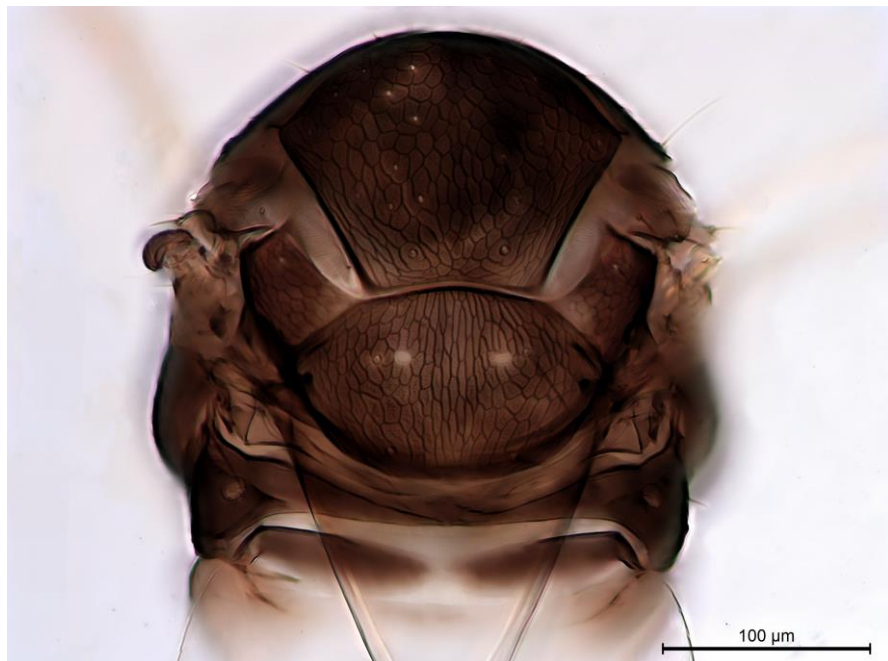
Fonte: a Autora (2021).

Figura 3 – *Encarsia porteri*, mid leg (female).



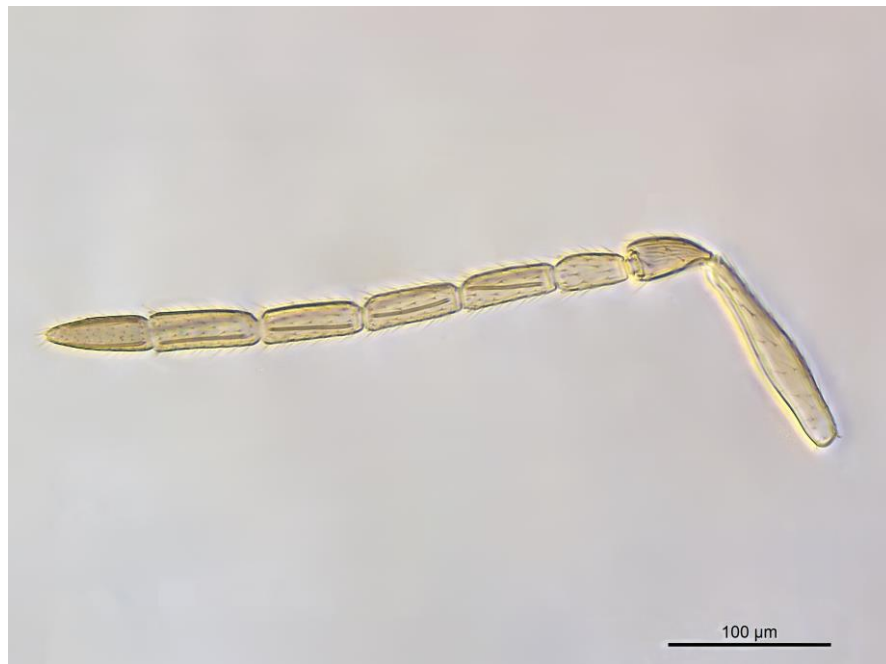
Fonte: a Autora (2021).

Figura 4 – *Encarsia formosa*, dorsum of mesosoma (female).



Fonte: a Autora (2021).

Figura 5 – *Encarsia formosa* antenna (female).



Fonte: a Autora (2021).

Figura 6 – *Encarsia formosa* mid tarsus (female).



Fonte: a Autora (2021).

Figura 7 – *Eretmocerus mundus* antenna (male).



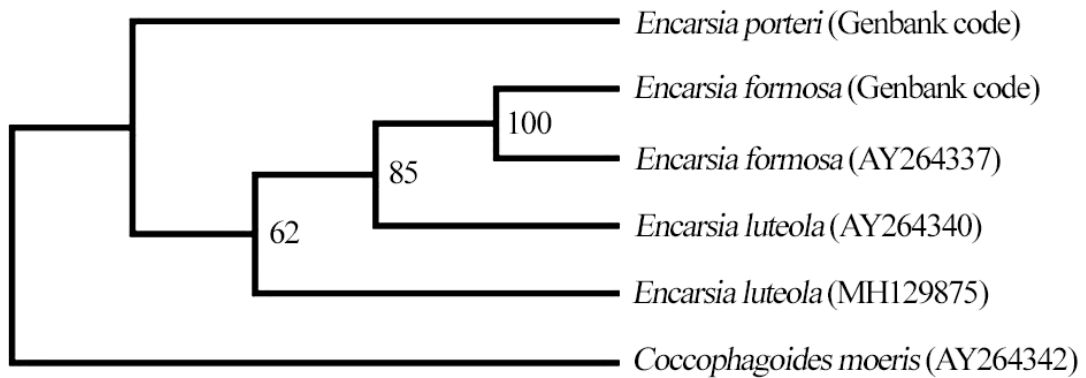
Fonte: a Autora (2021).

Figura 8 – *Eretmocerus mundus*, funicle 1 and 2 (F1, F2) (male).



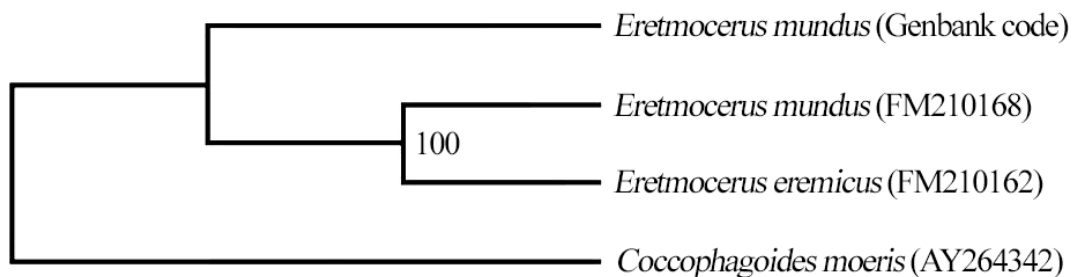
Fonte: a Autora (2021).

Figura 9 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (599 bp) of mtDNA (COI) region sequences of *Encarsia* species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.



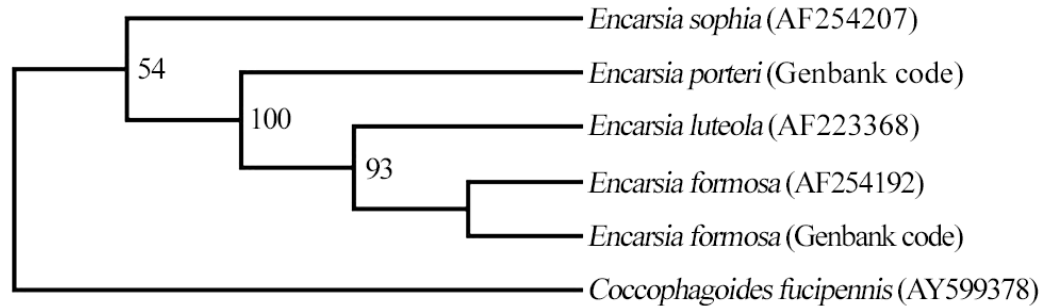
Fonte: a Autora (2021).

Figura 10 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (445 bp) of mtDNA (COI) region sequences of *Eretmocerus* species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.



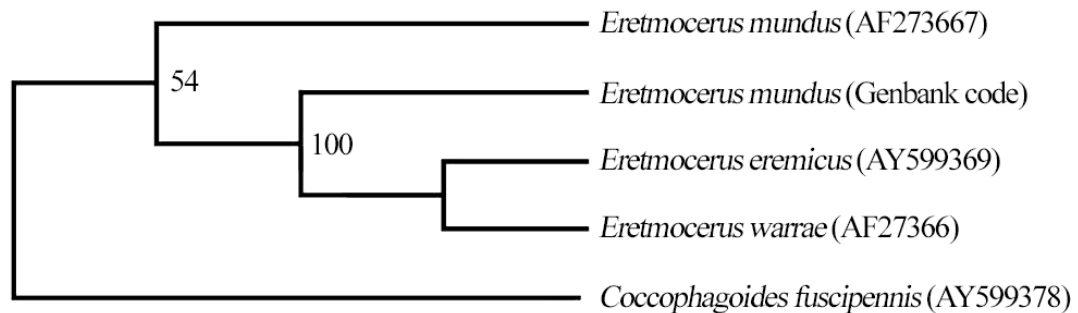
Fonte: a Autora (2021).

Figura 11 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (~514 bp) of D2 nuclear ribosomal region gene sequences of *Encarsia* species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.



Fonte: a Autora (2021).

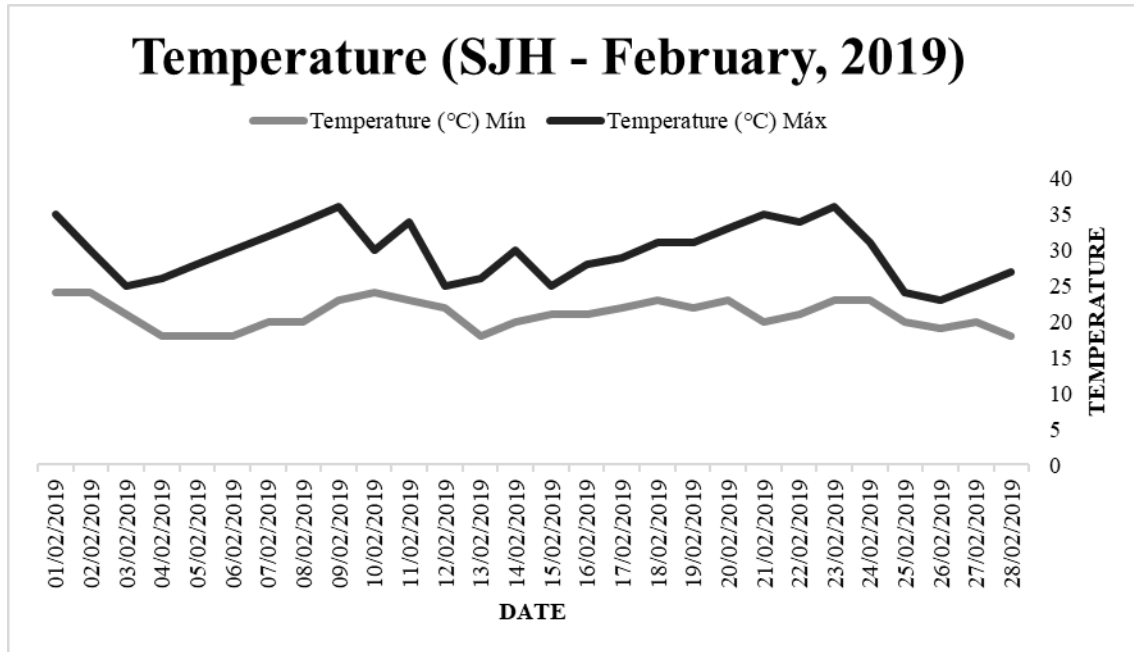
Figura 12 – Phylogenetic tree based on DNA fragment (~599 bp) of D2 nuclear ribosomal region gene sequences of *Eretmocerus* species. The numbers placed at each node indicate the bootstrap support for values >50.



Fonte: a Autora (2021).

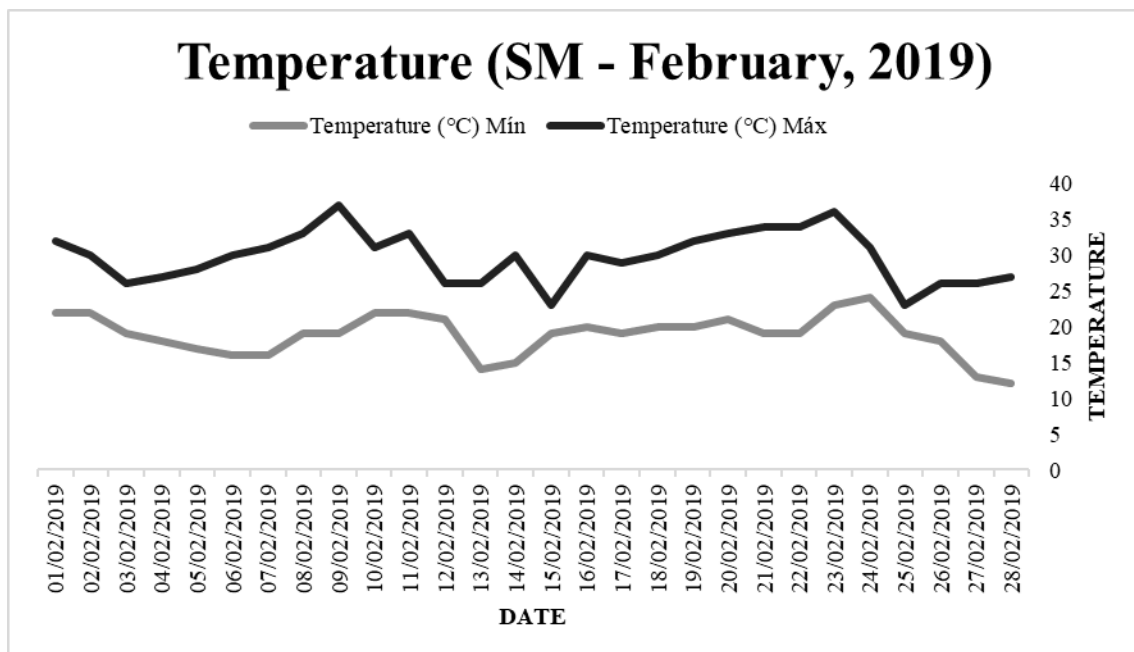
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Gráfico 1 – Temperature in São José do Hortêncio, RS, Brazil (February, 2019).



Fonte: a Autora (2021). Description: This material is about the temperatures that occurred in the month of February 2019 in the locality of São José do Hortêncio, Rio Grande do Sul State, Brazil.

Gráfico 2 – Temperature in Santa Maria, RS, Brazil (February, 2019).



Fonte: a Autora (2021). Description: This material is about the temperatures that occurred in the month of February 2019 in the locality of Santa Maria, Rio Grande do Sul State, Brazil.

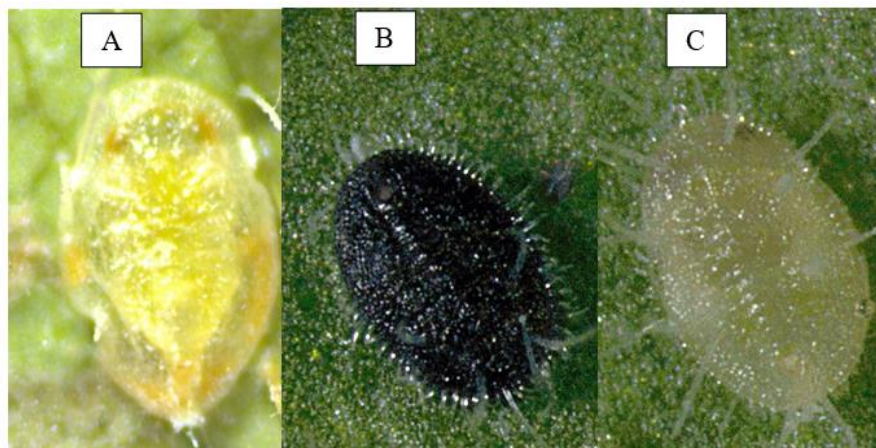
6 DISCUSSÃO GERAL

Neste espaço, realiza-se a discussão geral deste estudo, com destaque para a exploração dos resultados. Nesse sentido, antes de evidenciá-los, pontua-se que as exposições presentes no Capítulo I compõem o alicerce para determinar a metodologia base deste estudo, a qual, por sua vez, subsidiou a condução do Capítulo II.

Assim, inicia-se esta discussão pela abordagem da coleta de material a campo. Optou-se por reunir folíolos de diferentes terços das plantas de tomate e de soja, de forma aleatória, isso se deve porque é difícil detectar parasitismo das ninfas a olho nú (principalmente quando não adquirem coloração escura). Ninfas parasitadas apresentam mudanças na coloração após 3 dias de parasitismo e são detectadas facilmente em lupa, tendo em vista seu tamanho diminuto (GERLING; BLACKBURN, 2013, CASTRO; LÓPEZ, 2010).

Durante o período de realização dos pré-testes, constatou-se que alterações na coloração das ninfas parasitadas demonstravam uma conexão direta com a espécie do parasitoide. Desse modo, salienta-se-se que a coloração amarelada correspondia à parasitoides das espécies *Er. mundus* e *En. porteri* (Fig 13a), ao passo que a coloração marrom/preto diz respeito à *En. formosa* (Fig 13b), diferente das ninfas não parasitadas que apresentam coloração branca/leitosa (Fig 13c).

Figura 13 – Ninfas de mosca-branca com diferentes colorações. A: Ninfa de *Bemisia tabaci* parasitada por *Eretmocerus mundus*, coloração amarelada, B: Ninfa de mosca-branca parasitada por *Encarsia formosa*, coloração escura e, C: Ninfa de mosca-branca não parasitada, coloração branca.



Fonte: a Autora (2021).

Embora este trabalho não tenha por objetivo o estudo da biologia dos parasitoides de

mosca-branca, fatores como a coloração da ninfa parasitada podem ser extremamente úteis em trabalhos futuros. Com certo treinamento, as ninfas de *En. formosa* (escuras) podem ser detectadas facilmente à campo, a olho nu (Fig 14).

Figura 14 – Registro de folha de tomateiro com presença de ninfas de *Bemisia tabaci*, imagem capturada por aparelho celular.



Fonte: a Autora (2021).

Outro ponto observado acerca do parasitismo, trata-se do formato do orifício utilizado para emergência do parasitoide adulto, diferença clara em relação à abertura feita por uma mosca-branca. Assim, sublinha-se que quando emerge da ninfa um parasitoide, independente do gênero e espécie, a abertura apresenta um formato circular, enquanto que a abertura realizada por uma mosca-branca tem formato triangular (SÁNCHEZ-FLORES et al., 2015). Observados na Figura 15.

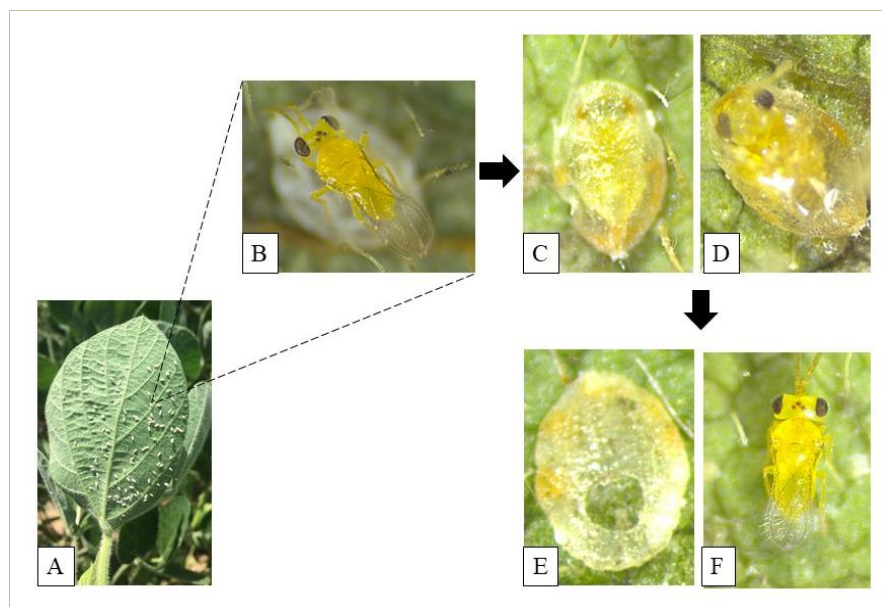
Figura 15 – Ninfas de *Bemisia tabaci* com diferentes tipos de orifícios de abertura: triangular e circular, indicando a emergência de um inseto adulto de mosca-branca e parasitoide, respectivamente.



Fonte: a Autora (2021).

O processo de incubação, em laboratório, levou em média 12 dias +/- 2, dada constatação do parasitismo em lupa. Durante esse período, foi possível acompanhar o desenvolvimento do parasitoide no interior da ninfa até a sua emergência. O processo de parasitismo registrado pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 – Processo de parasitismo de *Eretmocerus mundus* em ninfas de *Bemisia tabaci*. A – Folha de soja com ninfas e adultos de *B. tabaci*; B – Parasitoide ovipositando em uma ninfa (N3); C – D Parasitoide em desenvolvimento no interior da ninfa; E – Abertura pela qual o parasitoide adulto emergiu; e F – Parasitoide adulto.



Fonte: a Autora (2021).

Acentua-se que, a fim de que o parasitoide fosse capturado de forma íntegra das placas de Petri, optou-se por imobilizá-lo à baixa temperatura, para isso utilizou-se um

ultrafreezer de temperatura -80°C , no qual as placas permaneceram por 25 segundos (Figura 17). Após capturados, com auxílio de um pincel (previamente esterelizado), o mesmo foi colocado em um recipiente contendo álcool 80% para preservação da qualidade do DNA e integridade morfológica dos insetos (WENGRAT comunicação pessoal).

Figura 17 – Parasitoide e mosca-branca imobilizados após serem submetidos a temperatura de -80°C .



Fonte: a Autora (2021).

O protocolo desenvolvido por Noyes (1982), tradicionalmente empregado para confecção de lâminas para identificação de parasitoides é seguramente o mais utilizado nos estudos de taxonomia dos parasitoides *Encarsia* e *Eretmocerus* com algumas modificações, de acordo com cada pesquisador, temática de pesquisa e recurso disponível para confecção de lâminas.

Nesse sentido, em relação às lâminas permanentes, ressalta-se que a confecção é extremamente trabalhosa e exige um alto grau de percepção por parte de quem as elabora e analisa, considerando, ainda, o tempo despendido para sua confecção. Erros de montagem e distorção dos espécimes podem ser observados em dois momentos da confecção das lâminas. Um deles pode ocorrer no período da maceração dos exemplares, principalmente se não houver um gradiente de concentração entre as etapas do protocolo que envolve diversos reagentes (KOH, ácido acético, etanol, óleo de cravo e meio permanente). O outro pode suceder durante a montagem, na qual deve-se ter o cuidado em não dilacerar o material, não apertá-lo de forma que fique amassado, bem como, deve-se manter as estruturas alinhadas (p. ex. asas, antenas, ovipositor e/ ou tibia mediana) para que as medidas de proporções das estruturas diagnósticas fiquem corretas e não ocorram erros de identificações, uma vez que,

para *Encarsia*, várias medidas são utilizadas (WENGRAT, comunicação pessoal). Assim, acentua-se que quando não se tem recurso humano qualificado para confecção de lâminas, muitos espécimes são necessários até chegar a uma lâmina perfeita.

No caso de *En. porteri*, encontrada neste trabalho, não seria possível identificá-la utilizando somente as ferramentas moleculares, visto que não existem sequências dessa espécie disponíveis no Genbank para efetuar comparação. Portanto, a taxonomia tradicional proporcionou produzir a primeira sequência de *En. Porteri*. Isso confere base para enaltecer que as técnicas não se sobrepõem, mas completam-se. (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2012).

Das bibliografias exploradas nesta pesquisa, a maioria delas utilizou os genes mitocondriais e nucleares para a identificação/estudo de diversidade das espécies de parasitoides dos gêneros *Encarsia* e *Ertemocerus* (GEBIOLA; BERNARDO; BURKS, 2010; HERATY; WOOLLEY; POLASZEK, 2007; SIMON et al., 1994). Dessa forma, neste trabalho, as duas regiões (gene mitocondrial e nuclear) foram contempladas com uso dos marcadores moleculares C1J-21-95 e L2N3014 (SIMON et al., 1994) e D2F e D2R (MURAJI; TACHIKAWA, 2000), respectivamente.

Tanto o mtCOI (MONTI; NAPPO; GIORGINI, 2005, LOXDALE; LUSHAI; 1998) quanto o 28S (BABCOCK; HERATY, 2000) forneceram variação genética suficiente para caracterizar e distinguir os indivíduos em nível de espécie. Assim, obteve-se valores de similaridade maiores que 99%.

Quanto à análise filogenética de sequências dos gêneros *Encarsia* e *Eretmocerus*, percebeu-se que algumas sequências não apresentavam suporte na separação no cladograma, como foi o caso de *En. porteri*, tanto para mtCOI quanto nuclear. Divergências na separação de *Er. mundus*, em ambas as filogenias, colocaram o espécime encontrado neste trabalho em clado diferente dos demais, não podendo ter sua filogenia suportada. Desfechos como esses podem estar ligados a diversos fatores, como a hipótese de especiação (ARDEH, 2013), baixa amostragem, marcadores moleculares inadequados ou possível existência de um complexo de espécies, exigindo mais investigações para solucionar esse problema. Assim, estudos de diversidade dentro das espécies podem ajudar a preencher tais lacunas e proporcionar uma filogenia mais confiável. Existe um número inexpressivo de estudos acerca da identificação desses parasitoides em território nacional. Além disso, a grande maioria deles não envolve procedimentos moleculares (LOURENÇÃO et al., 2014), o que confere dificuldade afirmar que pode estar ocorrendo especiação.

Quando se ressalta a importância de trabalhar com organismos nativos – antes mesmo de adentrar as esferas do controle biológico com organismos exóticos – é imprescindível

aumentar o número de coletas em outros locais do estado e locais do país, para que a pesquisa possa atestar segurança para multiplicar e introduzir em escala comercial estes organismos (PARRA et al., 2002).

Dentro do nosso modelo de agricultura vigente, nem todos os sistemas produtivos absorveriam a utilização dos parasitoides. Assim como em países que já fazem o uso comercial desses organismos, conhecer previamente a sua reação para com os agroquímicos, sejam eles inseticidas, fungicidas ou herbicidas é fundamental (Defensor del Pueblo Prov. Bs As-UNLP, 2015). Nesse sentido, trabalhos que testem a susceptibilidade de parasitoides a defensivos agrícolas devem ser realizados de forma a integrar métodos de controle.

Compreender a biologia de um parasitoide, no contexto em que está ou vai ser inserido, permite conhecer quais são as suas capacidades, sejam elas de adaptação e/ou sobrevivência. Alguns estudos já enfatizam a capacidade do gênero *Encarsia* encontrar seu hospedeiro e, nesse sentido, Bellamy e Byrne (2001) afirmam que em média um indivíduo desse gênero se movimenta a distância de 10 metros. Por hora, ambientes protegidos seriam as melhores opções para emprego dessa tecnologia viva. O trabalho de Vafaie et al. (2020), dispõe que níveis acima de $13,7 \pm 1,7$ imaturos de *B. tabaci* por planta respondem em menor sucesso à liberação dos parasitoide. Portanto, é imprescindível que ocorra um monitoramento diário da praga para tomadas de decisões mais assertivas.

Apesar de todas essas informações, fica claro que este trabalho é a “ponta do *iceberg*” até que se possa chegar à utilização de parasitoides de mosca-branca em nível de campo. Existem outras lacunas que perpassam material científico, recurso financeiro e humano. Por trás disso, existe uma construção ideológica, que precisa enxergar a necessidade de uma agricultura mais comprometida com o meio ambiente, com os recursos naturais. É necessário, para tal, que autoridades governamentais, produtores e sociedade como um todo assumam uma atitude corresponsável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERGARIA, N. M. S.; CIVIDANES F. J. Exigências térmicas de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 359-363, 2002.
- ALOMAR, O.; RIUDAVETS, J.; CASTANE, C. *Macrolophusca liginosus* in the biological control of *Bemisiatabaci* on greenhouse melons. **Biological Control** 36, 154–162, 2006.
- ARAKAWA, R. Reproductive capacity and amount of host feeding of *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae). **Z.Ang. Entomol.** 93:175–82, 1982.
- ARDEH, M. J. The utility of ISSR-primers to make difference among populations of parasitoid, *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae). **Journal of Crop Protection**, 2 (3): 263-269, 2013.
- ARNEMANN, J. A. et al. Integrated Management of Tomato Whitefly Under Greenhouse Conditions. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, p. 443, 2019.
- ARNO, J. et al. Natural enemies of *Bemisia tabaci*: predators and parasitoids. In: Stansly PA, Naranjo SibgE (eds) *Bemisia*: bionomics and management of a global pest. **Springer**, New York, pp 385–421, 2010.
- AVISE, J.C. Phylogeography, the history and formation of species. **Harvard University Press**, Cambridge, Massachusetts, 2000.
- BABCOCK, C. S.; HERATY, J. M. Molecular Markers Distinguishing *Encarsia formosa* and *Encarsia luteola* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Volume 93, Issue 4, 1 July 2000, Pages 738–744.
- BABCOCK, C. S et al. Preliminary Phylogeny of *Encarsia Förster* (Hymenoptera: Aphelinidae) Based on Morphology and 28S rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 18(2), 306–323, 2001.
- BARBOSA, L. et al. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science**. 2015.
- BELLAMY, D.E.; BYRNE, D.N. Effects of gender and mating status on self-directed dispersal by the whitefly parasitoid *Eretmocerus eremicus*. **Ecological Entomology**, 26 (6), pp. 571-577, 2001.
- BOISCLAIR, J.; BRUEREN, G. J.; VAN LENTEREN, J. C. Can *Bemisia tabaci* be controlled with *Encarsia formosa*? **IOBC/WPRS Bull.** 13:32–35, 1990.
- BOYKIN, L. M. et al. A agricultura está impulsionando a diversificação do complexo de espécies *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae)? Datação, diversificação e evidências biogeográficas reveladas. **BMC Evolutionary Biology**. 13: 228. 10.1186 / 1471-2148-13-228, 2013.

BROWN, J. K.; BIRD, J. Whitefly: transmitted geminivirus and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n.3, p. 220-225, 1992.

CASTRO, Y.; LÓPEZ, S. Biología de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide del complejo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), en condiciones de laboratorio. **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, 69. 45-56, 2010.

COSTA LIMA, A.M. Homópteros. In: Costa Lima, A. M. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: E. N.A., v. 3, Cap. 23:176- 191, 1942.

DÂNGELO, R. A. C. et al. Insecticide resistance and control failure likelihood of the whitefly *Bemisia tabaci* (MEAM1; B biotype): a Neotropical scenario. **Annals of Applied Biology**, 172(1), 88–99, 2018.

DAS, D.K., SINGH, J., VENNILA, S. Emerging Crop Pest Scenario under the Impact 468 of Climate Change – A Brief Review. **J. Agricultural Physics** 11, 13–20. 469, 2011.

DE BARRO, P. et al. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 1-19, 2011.

DEFENSOR DEL PUEBLO, PROV. BS AS., UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA UNLP. **Relevamiento de la Utilización de Agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e Incidencia en la Salud**, 2015. Disponible em: www.defensorba.org.ar.

DE MORAES, L. A. et al. New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 4, p. 517-525, 2017.

DE MORAES, L.A. et al. Distribution and phylogenetics of whiteflies and their endosymbiont relationships after the Mediterranean species invasion in Brazil. **Scientific Reports** 8, 14589, 2018.

ERDOGAN, C. et al. Insecticide resistance and biotype status of populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) from Turkey. **Crop Protection**, v. 27, n. 3–5, p. 600–605, 2008.

GEBIOLA, M, et al. A revision of the *Encarsia pergandiella* species complex (Hymenoptera: Aphelinidae) shows cryptic diversity in parasitoids of whitefly pests. **Systematic Entomology**, 42, 31–59, 2016.

GEBIOLA, M.; BERNARDO, U.; BURKS, R. A. A reevaluation of the generic limits of *Pnigalio* Schrank (Hymenoptera: Eulophidae) based on molecular and morphological evidence. **Zootaxa**, 2484, 35–44, 2010.

GERLING, D. Natural enemies of whiteflies: Predators and parasitoids. In: GERLING, D. (Ed.). **Whiteflies: their bionomics, pest status and management**. **Incept, Andover**: p.147-158, 1990.

GERLING, D.; ALOMAR, O.; ARNÓ, J. Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. **Crop Protection**, v. 20, n. 9, p. 779–799, 2001.

- GERLING, D.; BLACKBURN, M.B. Immature development of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae). **Arthropod Structure & Development**, v.42, p.309-314, 2013.
- GILBERTSON, R. L. et al. Role of the Insect Supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the Emergence and Global Spread of Plant Viruses. **Annual Review of Virology**, 2, 67-93, 2015.
- HAJI, F. N. P. et al. Aspectos biológicos, danos e estratégias de controle da mosca branca. Petrolina: Embrapa Semi-Arido, 38 p. il. (Embrapa Semi-Árido. **Circular técnica**, 55, 2000.
- HELGESEN, R. G.; TAUBER, M. J. Biological control of greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Aleyrodidae: Homoptera) on short-term crops by manipulating biotic and abiotic factors. **Canadian Entomologist**106:1175–88, 1974.
- HENNEBERRY, T.J., FAUST, R.M. Introduction. In: Gould, J., Hoelmer, K.A., Goolsby, J. (Eds.), Classical Biological Control of *Bemisia tabaci* in the United States: A Review of Interagency Research and Implementation. **Springer Science + Business Media B.V.**, pp. 1–15, 2008.
- HERATY, J.; WOOLLEY, J. POLASZEK, A. **Catalog of Encarsia of the world**. 87p., 2007.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A. et al. Host tracking or cryptic adaptation? Phylogeography of *Pediobius saulius* (Hymenoptera, Eulophidae), a parasitoid of the highly invasive horse-chestnut leafminer. **Evolutionary Applications**, vol. 5, no. 3, pp. 256–269, 2012.
- HODDLE, M.; DRIESCHE, R. G. van.; SANDERSON, J. P. Biology and use of the whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. **Annual Review of Entomologie**, Palo Alto, v. 42, p. 645-669, 1998.
- KANAKALA, S.; GHANIN, M. Advances in the Genomics of the Whitefly *Bemisia tabaci*: An Insect Pest and Virus Vector. **Short Views on Insect Genomics and Proteomics**, v. 3, p. 19-40, 2015.
- KHAN, M. Y.; SHAFEE, S. A. Species of the genus *Eretmocerus haldeman* (Aphelinidae: Eretmocerinae) from India. **Oriental Insects**, 14(3), 363–369, 1980.
- LOURENÇÃO, A. L. et al. Occurrence of *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitizing *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) in Brazil. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 2, p. 160-162, 2014.
- LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, 88, 577–600, 1998.
- MANZARI, S. et al. Morphometric and molecular analysis of the *Encarsia inaron* species-group (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoids of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, 92(02), 2002.
- MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 26 de maio de 2019.

MONTI, M.M.; NAPPO, A.; GIORGINI, M. Caracterização molecular de espécies intimamente relacionadas em o gênero parasitário *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) baseado no citocromo mitochondrial gene da subunidade I da oxidase. **Bulletin of Entomological Research**, 95: 401-408, 2015.

MOTA-SANCHEZ D.; WISE J.C. The arthropod pesticide resistance database. Michigan State University, 2019. **Site**. Disponível em: < <https://www.pesticideresistance.org/>>. Acesso 26 de março de 2020.

MURAJI, M.; TACHIKAWA, S. Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea) based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. **Entomological Science**, 3, 615–626, 2000.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVE, E.; SANCHEZ-CAMPOS, S. Doenças virais emergentes transmitidas por moças-brancas. **Annual Review Phytopathol** 49: 219 – 248, 2011.

NOYES, J. S. Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Journal of Natural History**, Abingdon, v. 16 p. 315-334, 1982.

OLIVEIRA, R. P. et al. Compatibilidade de inseticidas utilizados no controle da mosca branca em soja com *Beauveria bassiana*. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 5, n. 4, p. 88-93, out./dez, 2018.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology** v. 3, n. 1, 2008.

PARRA, J. R. P. et al. (Org). **Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores**. Manole, 609p, 2002.

POLASZEK, A.; EVANS, G. A.; BENNETT, F.D. *Encarsian parasitoids of Bemisia tabaci* (Hymenoptera: Aphelinidae, Homoptera: Aleyrodidae): a preliminary guide to identification. **Bulletin of Entomology Res** 82:375-392, 1992.

POLASZEK, A.; QUICKE, D. L. J.; MANZARI, S. Morphological and molecular taxonomic analysis of the *Encarsia meritoria* species-complex (Hymenoptera, Aphelinidae), parasitoids of whiteflies (Hemiptera, Aleyrodidae) of economic importance. **Zoologica Scripta**, 33(5), 403–421. 2004.

POLSTON, J.E.; DE BARRO, P.; BOYKIN, L. M. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. **Pest Management Science**, p.3738, 2014.

POZEBON, H. et al. Distribution of *Bemisia tabaci* within soybean plants and on individual leaflets. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 1–10, 2019.

RIGBY, D.; CÁCERES, D. Organic farming and the sustainability of agricultural systems. **Agricultural Systems** 68, 21–40, 2001.

SANCHEZ-FLORES, O. A. et al. Parasitismo natural de Aphelinidae (Hymenoptera) sobre *Aleuropleurocelus acaudatus* Drews & Sampson (Aleyrodidae), en aguacates criollos del sur de Coahuila, México. **Acta Zoologica Mexicana** [online]. vol.31, n.2, pp.173-177. ISSN 2448-8445, 2015.

SHADMANY, M.; OMAR, D.; MUHAMAD, R. First report of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q in Malaysia. **Floryda. Entomology**. 96 (1): 280 – 282, 2013.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, 87, 651–701, 1994.

SUMMERS, C. G.; NEWTON JUNIOR, A. S.; ESTRADA, D. Intraplant and interplant movement of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae) crawlers. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 25, n. 6, p.1360-1364, 1996.

TOSCANO, L.C. et al. Biología de *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em genótipos de tomateiro em duas épocas. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 3, n. 4, p. 1-6, out./dez, 2016.

VAFÁIE, E. A. et al. Comparison of repetitive releases of single or multiple natural enemy species on the suppression of *Bemisia tabaci* infesting poinsettias. **Biological Control**. 151. 104407, 2020.

VAN LENTEREN, J. C. et al. Aphelinid parasitoids as sustainable biological control agents in greenhouses. **Journal of applied entomology**, Volume 121, Issue1-5 January/December. Pages 473-485, 1997.

VAN LENTEREN, J. C. Integrated pest management in protected crops. In *Integrated Pest Management: Principles and Systems Development*, ed. DR Dent, 12:311–43. **London: Chapman & Hall**. 356 pp, 1995.

VAN LENTEREN, J. C.; VAN ROERMUND, H. J. W.; SUTTERLIN, S.. Biological control of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) with the parasitoid *Encarsia formosa*: How does it work? **Biological Control** 6:1–10, 1996.

VAN LENTEREN, J. C.; WOETS, J. Biological and integrated control in greenhouses. **Annual Review Entomology**. 33:239–69, 1988.

VAN LENTEREN, J.C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new 743 opportunities. **BioControl** 63, 39–59, 2018.

VIGGIANI, G.; MAZZONE, P. Contributi alla conoscenza morfo-biologica delle specie del comp-lesso *Encarsia* Foerster - *Prospaltella* Ashmead (Hymenoptera, Aphelinidae). **Boll. Lab. Ent. agr. Portici** 36: 42-50, 1979.

VIEIRA, et al. **Defensivos agrícolas naturais usos e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

WANG, T.; HOGENDOORN, K.; KELLER, M. A. Os efeitos da temperatura no desenvolvimento, fecundidade e mortalidade de *Eretmocerus warrae*: A *E. warrae* é melhor adaptada a altas temperaturas do que a *Encarsia formosa*? **Ciência de Gestão de Pragas**. Ano de 2018.

WOETS, J.; VAN LENTEREN, J. C. The parasite-host relationship *between Encarsia formosa* (Hym., Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Hom., Aleyrodidae). VI. Influence of the host plant on the greenhouse whitefly and its parasite *Encarsia formosa*. **IOBC/WPRS Bull.** 4:151–64, 1976.

ZANG, L. S.; LIU, T. X. Host-feeding of three parasitoid species on *Bemisia tabaci* biotype B and implications for whitefly biological control. **Entomologia Experimental Applicata** 127:55-63, 2008.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia e o controle biológico de pragas. In PARRA, J. R. P. et al. (Org). **Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores**. Manole, 609p. Ano de 2002.