

Procedimentos para a realização das largadas do parasitoide *Torymus sinensis* e sua monitorização

Documento elaborado pelo INIAV e IPB

I – Como se deve proceder nas largadas de *Torymus sinensis*?

I.1 – Quando podem ser feitas largadas de *Torymus sinensis*?

- Apenas quando a praga (vespa-das-galhas-do-castanheiro) está presente.
- A verificação da presença da praga é feita por uma análise visual de sintomas:
 - presença de galhas secas de anos anteriores; e
 - presença de galhas verdes, em quantidade suficiente, que só são visíveis após o abrolhamento dos gomos dos castanheiros.

I.2 – Em que altura do ano devem ser feitas as largadas de *Torymus sinensis*?

- A largada deve ser realizada no início da rebentação do castanheiro e após a formação das galhas;
- Para se ter uma indicação do melhor momento para a largada, é aconselhável acompanhar o desenvolvimento vegetativo do castanheiro nas áreas previamente identificadas para a introdução do parasitoide, realizando levantamentos fenológicos semanais nos castanheiros, na altura da rebentação. Segundo Bellini et al. (2006), as largadas devem ser feitas quando cerca de 40% dos gomos estão nas fases c/d (ver figuras 1 e 2);

1



Figura 1- Estados fenológicos do castanheiro (Bellini, 2006).



Figura 2- Aspeto de desenvolvimento fenológico das galhas no momento em que devem ser realizadas as largadas.

- O estado fenológico “c/d” nos castanheiros, varia de local para local e em cada local com as variedades de castanheiro existentes, mas normalmente entre meados de abril e meados de maio;
- As largadas devem ser efetuadas, preferencialmente em dias quentes e sem vento.

I.3 – Em que locais devem ser feitas as largadas de *Torymus sinensis*?

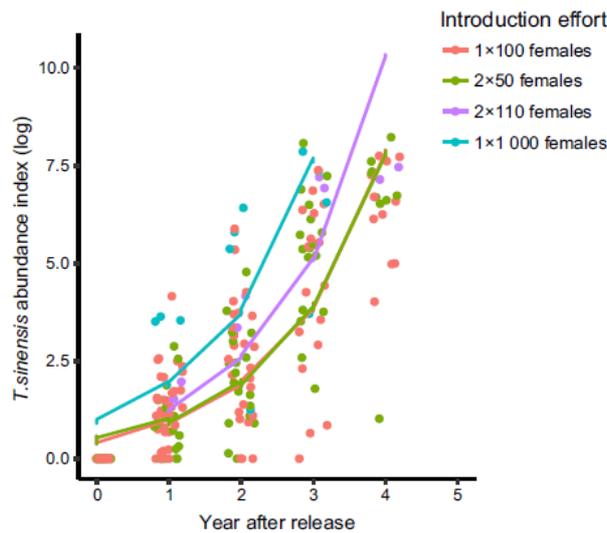
- A não mobilização dos sotos é fundamental para o estabelecimento de *T. sinensis* em ambiente natural, pois os parasitoides durante a fase adulta necessitam de se alimentar de pólen e néctar (provenientes de flores da vegetação espontânea), pelo que devem ser evitadas a realização de largadas em sotos com mobilização do solo;
- Não devem ser realizados tratamentos fitossanitários entre março a fim de junho, nomeadamente de inseticidas, em todos os castanheiros infetados pela vespa e nos quais foi introduzido o parasitoide *T. sinensis*. O uso de pesticidas químicos também afeta inevitavelmente o parasitoide.

2

I.4 – Qual a população de *Torymus sinensis* a utilizar nas largadas?

O parasitoide *T. sinensis* tem uma vida média de 30 dias. As emergências na natureza, dependente das condições climáticas do ano, começam geralmente em março, quando a temperatura média diária sobe acima de 13°C. Após o acasalamento, a fêmea deposita os ovos dentro das galhas recém-formadas, no corpo da larva da vespa ou na sua vizinhança. Cada fêmea pode depositar em média 70 ovos.

- Os resultados mostram que as **pequenas largadas (100 fêmeas e 50 machos) são tão eficientes como as grandes** (com maior quantidade de insetos) para o estabelecimento e multiplicação de populações de *T. sinensis* (Borowiec *et al.*, 2017).76

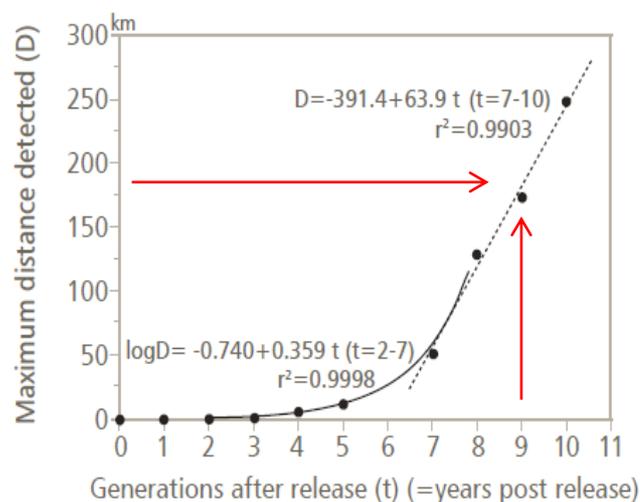


I.5 – Como devem ser feitas as largadas com *Torymus sinensis*?

I.5.1 - Distância entre largadas

- Os pontos de largada podem estar separados de 1 a 2 Km até um máximo de 4 km. (Borowiec, *et al.*, 2017);
- Cada largada, composta por 130 fêmeas e 70 machos, realizando a libertação dos insetos em quatro a cinco árvores próximas.
- Espera-se uma taxa de dispersão do parasitoide de 1 Km/ ano no início, como aconteceu no Japão, (Moriya *et al.*, 2003).

3



I.5.2 – Cuidados a ter nas largadas

- Deve ter-se em atenção os ventos dominantes, pois a dispersão do parasitoide é favorecida no mesmo sentido;
- Desde a origem ao local das largadas, os parasitoides vão acondicionados numa arca com acumuladores de frio, embora sem estarem em contacto direto com estes, para que não sofram choques térmicos que podem causar mortalidade.



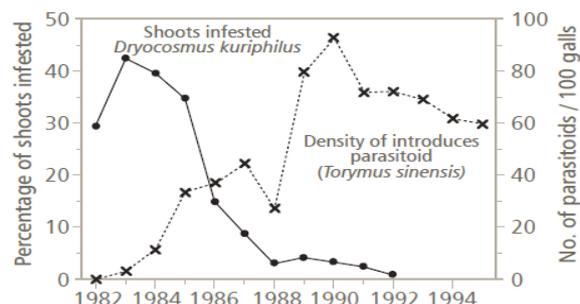
Insetos adultos de *Torymus sinensis* a sair do tubo de transporte

- Retira-se a tampa dos tubos com a abertura virada para cima, próxima de galhas e aguarda-se que os insetos saiam.
- Nos locais onde as árvores forem de grande porte e não haja ramos baixos, os insetos podem ser largados no tronco do castanheiro, sobretudo se tiverem rebentos na base.
- Não deixar os tubos nas árvores ou no chão, recolhê-los e confirmar que os insetos saíram todos.
- Durante a largada nunca colocar os tubos no chão, nem os deixar abandonados, pois as formigas e outros insetos predadores podem destruir o *Torymus*, que é um inseto frágil, de reduzidas dimensões.

I.6 - Como se dá o estabelecimento de *Torymus sinensis*?

- O estabelecimento inicial de *T. sinensis* é importante que ocorra, em primeiro lugar, na área de largada, para depois se dispersar naturalmente.
- Após o estabelecimento de *T. sinensis* só se verifica uma redução da taxa de infestação por *D. kuriphilus*, 4-5 anos após (Moriya *et al.*, 1989).
- Em França (Borowiec *et al.*, 2017), Itália (Gehring *et al.*, 2018) e Japão (Moriya *et al.*, 1989) o controlo efetivo de *T. sinensis* na população de *D. kuriphilus* verificou-se ao fim de 3 a 4 anos após a primeira largada.

4



II – Como se deve proceder para a monitorização de *Torymus sinensis*?

É importante existir uma forma simples e prática de estimar com confiança a presença de *T. sinensis* após a sua largada e monitorizar a evolução das taxas de parasitismo.

Para o efeito é necessário colher galhas secas no inverno num determinado nº de locais onde estas tenham sido realizadas largadas (para coerência estatística).

Este trabalho terá que ser feito sob condições controladas e de acordo com a metodologia descrita a seguir.

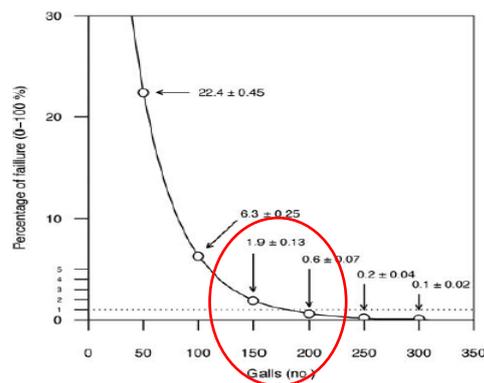
II.1 – Como deve ser feita a recolha das galhas?

II.1.1 - Onde colher as galhas

- Selecionar locais representativos de toda a área de largadas do ano anterior, no sentido de avaliar o eventual efeito da data de largada.
- Selecionar locais de largadas que incluam castinçais e soutos.
- Selecionar locais com diferente intensidade de ataque de *Dryocosmus kuriphilus*.

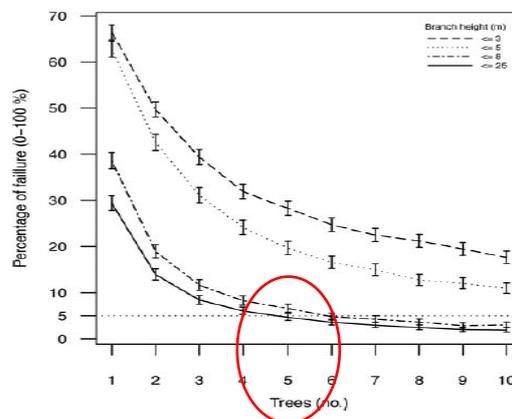
II.1.2 - Como colher as galhas

- Colher 200 galhas/local de largada (Gehring *et al.*, 2018).



- Recolher galhas de 5 ou 6 árvores, exterior e interior da copa, em todas as direções e também da sua parte superior e inferior (até 8 m de altura na copa) (Gehring *et al.*, 2018).
- As galhas colhidas têm de ser devidamente etiquetadas por local e por data

5



II.1.3 - Quando colher das galhas

- Colher as galhas de preferência antes de meados de fevereiro (de preferência na ausência de chuva), de forma a garantir que ainda não se iniciou a emergência dos adultos de *T. sinensis*.

II.1.4 - Qual a dimensão da amostra

- 1 a 2 anos após a largada - Monitorizar $\geq 25\%$ dos locais de largada, para determinar o estabelecimento de *T. sinensis* e observar a taxa inicial de parasitismo.
- 3 ou mais anos após a largada - Monitorizar $\geq 25\%$ dos locais monitorizados no 1º ano após a largada, para acompanhar a evolução das populações de *T. sinensis* e evolução da taxa de parasitismo.

II.1.5 – Como validar a presença de *T. sinensis*

A presença do parasitoide por ser validada através de um dos seguintes métodos:

- **Obtenção de insetos adultos** - As galhas secas têm que ser limpas de raminhos, folhas e eventuais predadores (aranhas, formigas, outros artrópodes) e colocadas em “caixas de emergência” (com a garantia de não estarem molhadas para não se desenvolverem fungos indesejáveis).

As caixas terão de ser estanques de cartão ou de esferovite, devidamente seladas, cada uma com dois tubos, funcionando como tubos coletores de insetos emergentes seguindo a metodologia de Quacchia et al. (2008).

Colocar as caixas de emergência em condições climáticas muito próximas das naturais, até ao início da emergência de *T. sinensis*.

Quando os insetos adultos emergem, eles são atraídos pela luz e movem-se para os tubos de falcon. Nestas situações os tubos são recolhidos e substituídos por novos.

Os insetos serão recolhidos para separação por espécie e contagem e as recolhas registadas em ficha própria (Anexo 1 - Ficha de recolha de parasitoides)

Os parasitoides serão separados por morfotipo, identificados e armazenados em álcool a 70%.

No final do período de emergência, as caixas serão abertas para remover parasitoide ou outros artrópodes não-alvo.

Nesta fase, deve ser retirada uma amostra de 20 galhas representativa, as quais são dissecadas para contabilizar o número médio de câmaras por galha e eventuais parasitoides ou *D. kuriphilus* mortas por fungos ou compressão mecânica.

Os insetos emergidos devem ser enviados aos laboratórios especializados, identificados pela DGAV, para sua posterior identificação

- **Identificação por métodos moleculares** - As larvas e pupas são extraídas de 20 galhas secas, após a análise morfológica de parasitoides (Chalcidoidea), são repartidas por morfotipos. De cada grupo, uma a duas larvas ou pupas são congeladas em azoto líquido para extração de DNA com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). O DNA obtido é quantificado utilizando o NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer e amplificada a região do gene da subunidade citocromo c oxidase I (COI) com os primers LCO 1490 e HCO 2198, seguindo-se os protocolos referidos em PM 7/129 (1), EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (3), 501–537).

II.1.6 – Como elaborar o relatório

- O relatório deve identificar os locais de largadas no concelho em estudo no ano “n”, bem como registar as datas de largadas.
- De igual modo a monitorização nos anos “n+1” e sucessivos deve ser quantificada e georreferenciada. Deve haver evidencias de cumprimento dos critérios estipulados para fins de monitorização.
- O relatório deve conter dados sobre a presença de *T. sinensis* e sobre a percentagem de parasitismo, no mínimo por concelho.
- O cálculo da taxa de parasitismo deve ter em conta o número total de câmaras de *Dryocosmus kuriphilus* nas 200 galhas (necessário abrir uma subamostra de galhas (n=20) e determinar o número médio de câmaras das galhas desse local (N° médio de câmaras = $\sum n^{\circ}$ de câmaras por galha/ n° de galhas abertas) (**Anexo 2 – Ficha de cálculo do nº de câmaras/galha**)

- Cálculo da taxa de parasitismo - % de parasitismo = (número de T.S/ total de câmaras das 200 galhas) × 100.

III - Bibliografia

- Bellini E., Giannelli G., Giordani E., Picardi E. (2006). Fenofasi del Castagno (*Castanea sativa* Mill.). Atti del «IV Convegno Nazionale-Castagno 2005», Montella (AV), 20-22 Ottobre 2005, pp. 138-142.
- Borowiec N., Thaon M., Brancaccio L., Cailleret B., Ris N. & Vercken E. (2017). Early population dynamics in classical biological control: establishment of the exotic parasitoid *Torymus sinensis* and control of its target pest, the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*, in France. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 166: 367–379.
- EPPO (2016) PM 7/129 (1) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. Bulletin OEPP/EPPO 46 (3), 501–537.
- Gehring, E., Bosio, G., Quacchia, A. & Conedera, M. (2018). Adapting sampling effort to assess the population establishment of *Torymus sinensis*, the biocontrol agent of the Chestnut gallwasp. *International Journal of Pest Management*, 64 (3): 193-203.
- Moriya, S., Inoue, K., Otake, A., Shiga, M., Mabuchi, M. (1989). Decline of the chestnut gall wasp population, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) after the establishment of *Torymus sinensis* Kamijo (Hymenoptera: Torymidae). *Applied Entomology and Zoology*, 24: 231-233.
- Moriya, S., Shiga, M. & Adachi, I. (2003). Classical biological control of the chestnut gall wasp in Japan, pp. 407-415. *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods*. USDA Forest Service, Washington DC.
- Quacchia A., Moriya S., Bosio G., Scapin G. & Alma A. (2008). Rearing, release and settlement prospect in Italy of *Torymus sinensis*, the biological control agent of the chesnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *BioControl*, 53, 829-839.

Anexo 1 – Ficha de recolha de parasitoides

VESPA DAS GALHAS DO CASTANHEIRO - Estudo e Monitorização de *Torymus sinensis*

ANO -----

Caixa de emergência N.º	CONCELHO	FREGUESIA	LOCAL	Coordenadas Geográficas	DATA COLHEITA campo

Caixa de emergência N.º	Datas Eclosão	N.º insetos

Anexo 2 – Ficha de cálculo do nº de câmaras/galha

8

VESPA DAS GALHAS DO CASTANHEIRO - Estudo e Monitorização de *Torymus sinensis*

Número de câmaras por galhas

CONCELHO	FREGUESIA	LOCAL	Coordenadas Geográficas	DATA COLHEITA	N.º DA GALHA OBSERVADA	N.º CÂMARAS ENCONTRADAS