

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E BIOLOGIA EVOLUTIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

ANÁLISE DE PREDACÃO INTRAGUILDA EM ALFAFA

Luis Gustavo Rodrigues Iemma

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E BIOLOGIA EVOLUTIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

ANÁLISE DE PREDACÃO INTRAGUILDA EM ALFAFA

Luis Gustavo Rodrigues Iemma

Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva
(orientador)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor Ciências com ênfase em Entomologia.

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

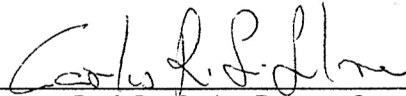
I22a Iemma, Luis Gustavo Rodrigues
Análise de predação intraguilda em alfafa / Luis
Gustavo Rodrigues Iemma. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
89 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

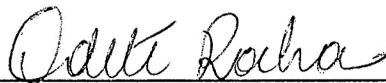
1. Parasitoides. 2. Coccinelídeos. 3. Predação
intraguilda. 4. Controle biológico. 5. Alfafa. I.
Título.

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Luis Gustavo Rodrigues lemma, realizada em 11/09/2015:



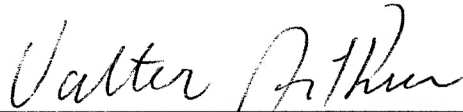
Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva
UFSCar



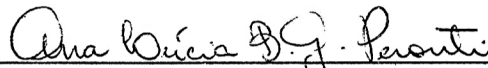
Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar



Prof. Dr. Rhauner Guillermo Nascimento Ferreira
UFSCar



Prof. Dr. Valter Arthur
CENA/USP



Profa. Dra. Ana Lúcia Benfatti Gonzalez Peronti
UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho especialmente à minha esposa Daniela que sempre me apoiou e ajudou em todos os momentos difíceis.

"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino".

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Em especial ao professor e orientador Carlos Roberto Sousa e Silva pela paciência, amizade e, principalmente, todos os ensinamentos a mim transmitidos.

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade para a realização do doutorado.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

Agradeço a doutoranda e amiga Suzan Cunha do Laboratório de Entomologia Aplicada que sempre esteve presente, ajudando em todos os passos do trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA): Keila, Wanessa, Ana, Fabiano, Arystene e Airton.

Agradeço a Embrapa Pecuária Sudeste por fornecer o campo de alfafa onde se desenvolveu a pesquisa.

Agradeço ao professor Marcelo Tavares da UFES pela identificação dos exemplares de Hiperparasitoides e pelas pranchas confeccionadas para ambas as espécies.

Agradeço às bancas de Qualificação e de Defesa pelas correções e dicas sobre o trabalho.

Agradeço meus amigos da Kit Princesa Isabel pelo carinho, apoio e risadas nos cinco anos que passamos juntos.

Agradeço minha família, em especial, minha esposa Daniela, meus pais Neusa e José Luis, minha irmã Laís, meus tios Beto, Regina, Maria e Luiz, minha sogra Fátima e meus cunhados Thiago, Vítor e Ademir e cunhadas Carol, Natália e Ingrid pela compreensão e carinho despendido.

RESUMO

Os afídeos (Hemiptera: Aphidoidea) são considerados pragas em diversas culturas, causando danos diretos e indiretos às plantas. Em campos de alfafa (*Medicago sativa*) comumente se encontram associados aos afídeos *Acyrtosiphon pisum*, *Acyrtosiphon kondoi*, *Aphis craccivora* e *Therioaphis trifolii*. Seus inimigos naturais incluem coccinelídeos e parasitoides entre outros. Neste trabalho objetivou-se analisar a flutuação sazonal de afídeos e suas relações com variáveis climáticas através de testes de correlação; em laboratório, selecionar uma espécie de afídeo que tenha sido abundante em campo, tendo parasitoides e coccinelídeos associados com o intuito de utilizá-lo em testes serológicos com o objetivo de observar uma possível predação intraguilda. A técnica serológica é baseada em reações do tipo antígeno/anticorpo onde os anticorpos são obtidos para a espécie que se quer investigar. As coletas de afídeos, predadores e parasitoides ocorreram durante os meses de março de 2013 a maio de 2014 em campos experimentais de alfafa da variedade Crioula situados na Unidade da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. *Therioaphis trifolii* foi o afídeo mais abundante no período amostrado, seguido por *Acyrtosiphon pisum*. Considerando o conjunto total de espécies, o maior pico populacional ocorreu em setembro de 2013 e o menor em janeiro de 2014. De acordo com os testes, todas as espécies de afídeos amostradas tiveram fraca correlação com a pluviosidade, sendo que nenhuma outra variável apresentou influência significativa na flutuação sazonal das populações de afídeos. Em relação aos coccinelídeos (Coleoptera: Coccinellidae), foram coletados 1208 indivíduos pertencentes a seis diferentes espécies, sendo que as três espécies mais abundantes, *Harmonia axyridis*, *Hippodamia convergens* e *Cycloneda sanguinea* respectivamente, foram separadas para posterior utilização nos testes serológicos. Observou-se também um típico padrão predador-presa entre as espécies de coccinelídeos e afídeos. Nenhuma espécie de parasitoide foi encontrada parasitando o afídeo mais abundante *T. trifolii* e uma espécie de parasitoide, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae), foi encontrada parasitando *A. pisum* sendo este afídeo, o escolhido para testes de predação intraguilda. De acordo com os resultados dos testes serológicos, dos 485 coccinelídeos testados, 52 deram resultados positivos quanto à presença de traços do parasitoide em seu conteúdo estomacal, ou seja, 10,72% dos coccinelídeos haviam se alimentado de afídeos parasitados, demonstrando predação intraguilda. Os testes de alimentação mostraram que o parasitoide *A. ervi* pode ser detectado até 72 horas após sua ingestão.

ABSTRACT

Aphids are considered as pests in several crops causing direct and indirect damage to the plants. In alfalfa fields (*Medicago sativa*), the species *Acyrtosiphon pisum*, *Acyrtosiphon kondoi*, *Aphis craccivora* and *Therioaphis trifolii* are found very often. Their natural enemies include predators and parasitoids among others. The aim of this work was to analyze the seasonal fluctuation of aphid populations and its relationship with climatic variables through correlation tests; in laboratory, to select the aphid species which were abundant in the field, having parasitoids and coccinelids predators associated with the intention of using them in serologic tests aiming to observe a possible intraguild predation. The serological technique is based on reactions as antigen/antibody where the antibodies are obtained to the specie of interest. The gathering of aphids, predators and parasitoids occurred from March 2013 to May 2014 in experimental alfalfa crioula fields located at Embrapa Pecuária Sudeste Unit, São Carlos, SP. *Therioaphis trifolii* was the most abundant aphid during the sampling period, followed by *Acyrtosiphon pisum*. Considering all species the populational peak occurred in September 2013 and the lower in January 2014. According to the tests, all species had no correlation with the rain, and no other variable presented significant influence in aphid's seasonal fluctuation. 1208 coccinelids (Coleoptera: Coccinellidae) of six species were sampled and the three with more specimens, *Harmonia axyridis*, *Hippodamia convergens* and *Cycloneda sanguinea* respectively, were separated to be part of the serological tests. A typical pattern predator-prey was observed. No species of parasitoids were found in *T. trifolii* and one species of parasitoid, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae) was found on *A. pisum*, and this led to its choice to the intraguild predation tests. According to the serological tests results, 52 among 485 coccinelids tested had traces of the parasitoid in its gut contents, that means 10,72% of the coccinelids ate parasited aphids. Feeding tests have shown that the parasitoid *A. ervi* can be detected up to 72 hours after its ingestion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ramos com inflorescências em um campo de alfafa com trinta dias de idade. [Fonte: Iemma, 2015].....	13
Figura 2. a) Campo de alfafa com vinte e nove de desenvolvimento. b) Campo de alfafa com quatro dias de desenvolvimento na Embrapa Pecuária Sudeste CPPSE, localizada no município de São Carlos, SP. [Fonte: Iemma, 2015].....	19
Figura 4. Distribuição mensal do número de afídeos coletados sobre plantas de <i>Medicago sativa</i> , na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	22
Figura 5. Frequência relativa de afídeos coletados sobre plantas de <i>Medicago sativa</i> , na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.	23
Figura 6. Número mensal de afídeos associados à pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	24
Figura 7. Variação nos números mensais de afídeos associados à coletados e da umidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	24
Figura 8. Variação nos números mensais de <i>Therioaphis trifolii</i> coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	25
Figura 9. Variação nos números mensais de <i>Acyrtosiphon pisum</i> coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	26
Figura 10. Variação nos números mensais de <i>Acyrtosiphon kondoi</i> coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.	26
Figura 11. Variação nos números mensais de <i>Aphis craccivora</i> coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	27
Figura 12. <i>Dendrocerus carpenteri</i> , a) Vista lateral mostrando em detalhes o escapo.	30
Figura 13. <i>Dendrocerus carpenteri</i> . b) Vista superior dos Notaulices convergentes.....	31
Figura 14. <i>Dendrocerus carpenteri</i> . c) Vista superior do Pterostigma.....	31
Figura 15. <i>Syrphophagus aphidivorus</i> . a) Vista lateral do escapo.....	32
Figura 16. <i>Syrphophagus aphidivorus</i> . b) Vista superior do escutelo.	33
Figura 17. <i>Syrphophagus aphidivorus</i> . c) Vista dorsal da cabeça.	33
Figura 18. Taxa de predação de espécies de Coccinellidae coletados sobre plantas de <i>Medicago sativa</i> , na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	36

Figura 19. Flutuação populacional de Afídeos e Coccinelídeos coletados sobre plantas de <i>Medicago sativa</i> , na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.	36
Figura 20. <i>Acyrtosiphon pisum</i> aparentemente saudável. [Fonte: en.wikipedia.org]	46
Figura 21. <i>Hippodamia convergens</i> se alimentando de afídeo parasitado por <i>A. ervi</i> em folha de alfafa. [Fonte: Iemma, 2015]	47
Figura 22. Dupla difusão em ágar mostrando as linhas de precipitação observadas nos testes serológicos entre os antissoros AsAe 23, AsAe 22, AsAe 21, AsAe 20, e o antígeno homólogo AgAe.....	49
Figura 23. Reações serológicas de dupla difusão em ágar entre o antissoro AsAe 22 e os antígenos AgAp 1, AgAp 2, AgAp 3 e AgAp 4 obtidos pela maceração de quatro exemplares do afídeo <i>A. pisum</i> , aparentemente saudáveis mostrando que os exemplares 1, 2 e 3 estavam parasitados por <i>A. ervi</i>	51
Figura 24. Reações serológicas de dupla difusão em ágar entre três diferentes espécies de coccinelídeos, <i>H. axyridis</i> , <i>H. convergens</i> e <i>C. sanguinea</i> , o afídeo <i>A. pisum</i> com o antissoro AsAe22.....	54
Figura 25. Testes serológicos de dupla difusão em ágar mostrando reações positivas entre o antissoro AsAe e os antígenos obtidos pela maceração de larvas de <i>Harmonia axyridis</i> - AgHax.....	56
Figura 26. Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de alimentação do coccinelídeo H1. Onde 0h, 24h, 48h e 72h é o tempo decorrido da alimentação e AsAe22 é o Antissoro feito a partir de <i>A. ervi</i>	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Número mensal de exemplares de afídeos e coccinelídeos coletados sobre plantas de <i>Medicago sativa</i> , na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	22
Tabela 2. Número mensal de múmias de <i>A. pisum</i> e <i>A. craccivora</i> coletadas sobre plantas de <i>Medicago sativa</i> , na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.....	29
Tabela 3. Ocorrência mensal de espécies de Coccinellidae coletados sobre plantas de <i>Medicago sativa</i> , na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 a maio de 2014.....	35
Tabela 4. Protocolo de inoculações e sangrias realizadas entre os meses de março e agosto de 2014 para obtenção dos antissoros para <i>A. ervi</i> (AsAe). Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = AgAe + Adjuvante Freund completo, N° do AS = número do antissoro.....	48
Tabela 5. Afídeos aparentemente saudáveis, coletados em campo de alfafa e testados serologicamente para a determinação da taxa de parasitismo por <i>A. ervi</i>	50
Tabela 6. Porcentagem de parasitismo em afídeos aparentemente saudáveis nos meses de março de 2013 e maio de 2014, obtida com o uso da serologia.....	52
Tabela 7. Porcentagens de parasitismo observadas por contagem de múmias em campo e aquela obtida analisando-se afídeos aparentemente saudáveis por meio da serologia.....	52
Tabela 8. Diferença entre a porcentagem de parasitismo observada em campo e aquela obtida por meio da serologia.....	53
Tabela 9. Reações serológicas entre os antígenos obtidos pela maceração dos coccinelídeos <i>Harmonia axyridis</i> , <i>Hippodamia convergens</i> , <i>Cycloneda sanguinea</i> , e o antissoro AsAe22..	53
Tabela 10. Formas jovens de <i>Harmonia axyridis</i> testados quanto à ocorrência de traços de <i>Aphidius ervi</i> em seu conteúdo estomacal.....	55
Tabela 11. Número de linhas de precipitação observadas nos testes serológicos com exemplares de <i>Hippodamia convergens</i> alimentados com o afídeo <i>Acyrtosiphon pisum</i> e macerados logo após a ingestão (0h), 24h após, 48h após e 72h após o consumo. Os traços (--) indicam ausência de reação. O sinal + indica um valor acima do mostrado.....	58

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	11
INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 - SAZONALIDADE DE AFÍDEOS E INIMIGOS NATURAIS EM CULTURA DE ALFAFA EM SÃO CARLOS, SP.....	16
2 - OBJETIVOS.....	18
3 – METODOLOGIA.....	18
3.1 – Área de trabalho – Coleta dos afídeos, parasitoides e predadores.....	20
3.2 - Identificação dos Afídeos	20
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 – Parasitoides e Hiperparasitoides	28
4.1.1 – Hiperparasitoides - <i>Dendrocerus carpenteri</i> (Hymenoptera: Megaspilidae).....	30
4.1.2 – Hiperparasitoides - <i>Syrphophagus aphidivorus</i> (Hymenoptera: Encyrtidae).....	31
4.2 - Coccinellidae predadores.....	34
CONCLUSÕES.....	37
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE PREDACÃO INTRAGUILDA ENTRE TRÊS ESPÉCIES DE COCCINELÍDEOS SOBRE <i>APHIDIUS ERVI</i> EM CULTURA DE ALFAFA.....	38
1 – INTRODUÇÃO	39
1.1 - Justificativa.....	43
2 - OBJETIVO	43
2.1 - Objetivos específicos.....	43
3 - HIPÓTESES	44
3.1 - Produção de antissoro para <i>Aphidius ervi</i>	44
3.2 - Determinar a ocorrência de <i>A. ervi</i> dentro de um pulgão aparentemente saudável.	44
3.3 - Analisar se, através de antissoro específico, pode-se detectar a presença de parasitoides no conteúdo estomacal de coccinelídeos.	44

4- METODOLOGIA	44
4.1 - Preparo do antissoro policlonal	44
4.2 - Reações serológicas	45
4.3 - Testes de alimentação	46
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 - Obtenção dos antissoros	47
5.2 - Testes serológicos com afídeos mumificados e aparentemente saudáveis	50
5.3 - Teste do antissoro em Coccinelídeos.....	53
5.4 - Testes de alimentação em <i>Hippodamia convergens</i>	57
6. CONCLUSÕES.....	61
7. TESTE DE HIPÓTESES	62
FECHAMENTO DA TESE	63
CONCLUSÕES FINAIS DO TRABALHO	64
PROPOSTAS PARA FUTUROS ESTUDOS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da alfafa

Aspectos gerais e importância

A alfafa (*Medicago sativa* L.) (Figura 1) se destaca não só pela produtividade, mas principalmente, pela alta qualidade e palatabilidade da forragem produzida (PAULINO *et. al.*, 2009). Normalmente, sua utilização ocorre nos sistemas de produção de leite de maior potencial genético animal, principalmente nas bacias leiteiras das Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (OLIVEIRA & LEDO, 2008). Small (1996) sugere que esta planta tem também grande potencial como alimento humano e pode reduzir os gastos da agricultura.

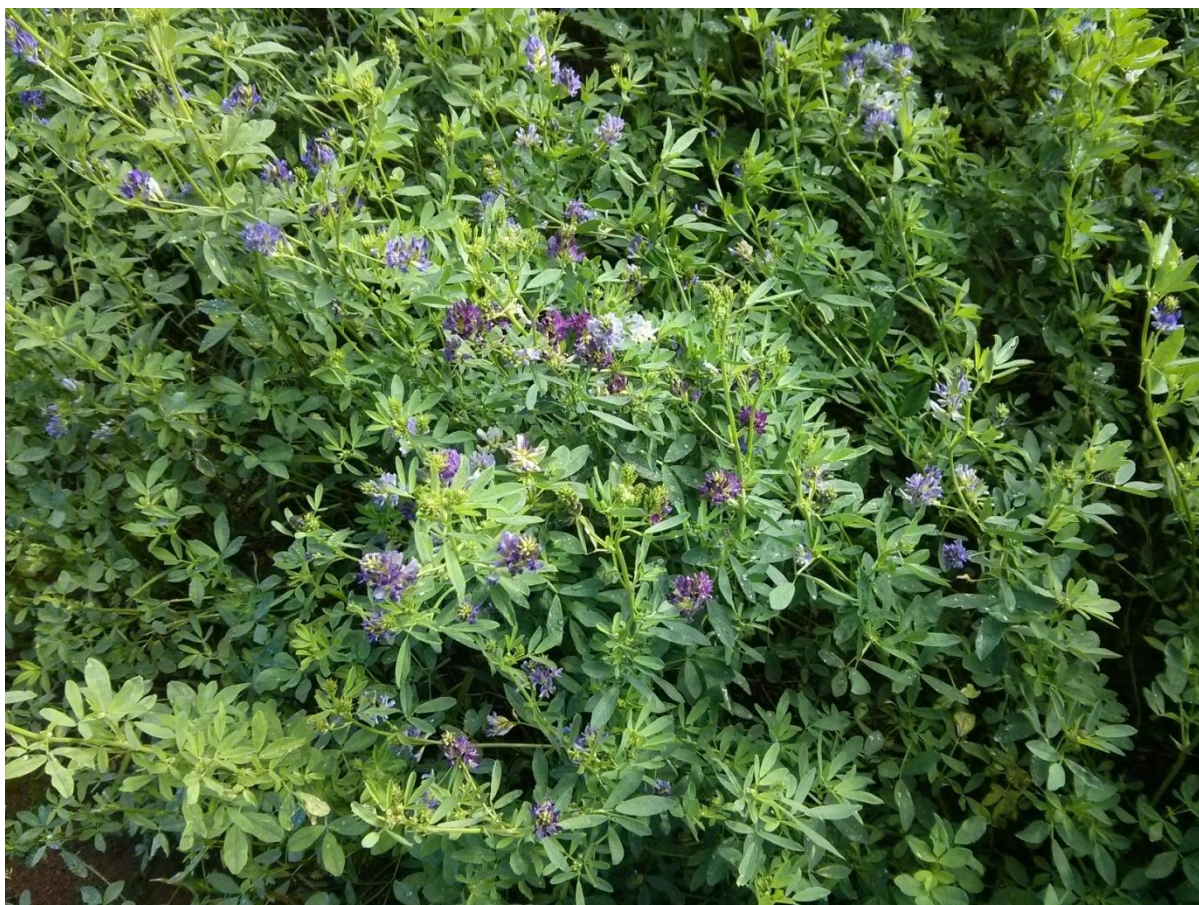


Figura 1. Ramos com inflorescências em um campo de alfafa com trinta dias de idade. [Fonte: Iemma, 2015]

A qualidade da alfafa é maior que a de gramíneas perenes no mesmo estágio de desenvolvimento, principalmente devido ao seu potencial de ingestão e alta digestibilidade (SLEUGH *et al.*, 2000). Outra importante característica dessa planta é o seu elevado valor nutritivo, com 20% a 25% de proteína bruta na matéria seca (RASSINI *et al.*, 2006) sendo indicada para rebanhos de alta produção (OLIVEIRA & LEDO, 2008, RASSINI & FREITAS, 1998). Esta planta é considerada a forrageira mais utilizada no mundo, com o maior potencial alimentar dentre as culturas de feno e com o maior nível, por hectare, de proteínas, do que quaisquer outras culturas para o gado (WALTON, 1983; HANSON & BARNES, 1988).

Um dos obstáculos à expansão da alfafa no Brasil é a pequena disponibilidade de cultivares adaptados às condições tropicais. Atualmente, a única cultivar de alfafa com boa adaptabilidade e boa estabilidade em nosso país é a Crioula e há grande demanda por novas variedades no mercado (FERREIRA *et al.*, 2004).

A herbivoria por insetos é um dos maiores problemas da alfafa (SILVA *et al.*, 2007). Dentre os insetos, os afídeos ou pulgões (Hemiptera, Aphididae) são uma das principais pragas da cultura, não só pelos danos diretos que ocasionam, ao sugarem a seiva da planta, pela melada que excretam e que assim facilitam o aparecimento de fungos nas folhas, com isso reduzindo o rendimento da planta como forragem, mas principalmente, pelos danos indiretos ao transmitirem vírus às plantas (AFONSO, 2008).

Por um longo tempo os pulgões puderam, efetivamente, ser controlados por defensivos agrícolas, porém ao desenvolverem resistência a estes compostos o controle biológico com o uso de inimigos naturais, predadores e parasitoides, tornou-se a alternativa óbvia (SIDNEY, 2013). No entanto, a possibilidade de predação intraguilda entre estes grupos pode acabar por desestabilizar o controle biológico.

Price *et al.*, (1991) observam que as plantas têm efeitos diretos e indiretos, positivos e negativos, não só sobre os herbívoros, mas também sobre o terceiro nível trófico, ou seja, parasitoides e predadores que devem ser considerados como parte da sua bateria de defesa anti herbivoria. Na maioria dos estudos, as estratégias de defesa das plantas contra os herbívoros têm sido mostradas como interações apenas entre dois níveis tróficos. O envolvimento do terceiro nível começou a ser estudado há pouco mais de trinta anos (PRICE, 1981; RODRÍGUEZ-SAONA, 2012).

Muitas vezes, a vulnerabilidade e a sobrevivência do inseto hospedeiro aos parasitoides e aos predadores estão intimamente relacionadas à espécie de planta utilizada como alimento, estabelecendo uma grande ligação entre os níveis tróficos (SCHOWALTER,

1981; GARCIA, 1991). Essas interações, denominadas tritróficas, ocorrem dentro de um ambiente físico e químico espacialmente diversificado e dinâmico e incluem todas as várias interações de ataque e defesa entre níveis tróficos, incluindo relações morfológicas, comportamentais e fisiológicas, bem como as interações inter e intraespecíficas dentro de cada nível trófico (LIMA, 2013). As interações entre esses organismos ocorrem por meio de compostos do metabolismo secundário, os aleloquímicos (TRIGO *et al.*, 2011). Parasitoides e predadores, ao longo do processo evolutivo, têm explorado os aleloquímicos liberados pelas plantas utilizando-os como sinais na localização de hospedeiros e/ou presas (METCALF & METCALF, 1992). Segundo Vilela & Della-Lucia (2001) as fêmeas adultas de parasitoides à procura de hospedeiros, muitas vezes se utilizam de semioquímicos emitidos a partir do micro-habitat do hospedeiro, transportados pelo ar. O mesmo pode-se dizer de coccinelídeos predadores em busca de sua presa. O entendimento dessas relações em uma área cultivada é uma ferramenta para o aprimoramento de programas de manejo integrado de pragas buscando-se minimizar os danos à produção agrícola (FREITAS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012).

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro trata do estudo da sazonalidade dos afídeos pragas da alfafa, do levantamento dos coccinelídeos predadores desses afídeos e possíveis parasitoides associados, em cultura de alfafa. No segundo capítulo estudou-se o consumo indireto de parasitoides por coccinelídeos predadores ao alimentarem-se de afídeos parasitados, buscando-se avaliar as possíveis consequências da competição intraguilda na cultura.



**CAPÍTULO 1 - SAZONALIDADE DE AFÍDEOS E INIMIGOS
NATURAIS EM CULTURA DE ALFAFA EM SÃO CARLOS, SP.**



1 – INTRODUÇÃO

No Brasil já foram registradas para a cultura de alfafa as espécies *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) (Aphididae: Macrosiphini), *Acyrtosiphon kondoi* (Shinji, 1938) (Aphididae: Macrosiphini), *Therioaphis trifolii* (Monell, 1882) (Drepanosiphidae: Phyllaphidini) e *Aphis craccivora* (Koch, 1854) (Aphididae: Aphidini) (SOUSA-SILVA *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 1996; MENDES *et al.*, 2000; FERRAGINE, 2003; CUNHA, 2013). As espécies *A. pisum*, *A. kondoi* e *T. trifolii* foram, também, identificadas como as maiores pragas de alfafa na Austrália (GRIMM, 1972) e na Nova Zelândia (ROHITHA *et al.*, 1985). *A. pisum* e *A. kondoi* foram considerados as mais abundantes espécies de afídeos da alfafa no Japão (TAKAHASHI & NAITO, 1984). Monajemi & Esmaili (1981) observaram que as quatro espécies de afídeos supracitadas são as mais importantes pragas da alfafa no Irã.

De acordo com SILVA *et al.* (2007) parasitoides e predadores são os principais fatores bióticos que influenciam a população de afídeos. A efetividade de parasitoides como agentes de controle foi demonstrada em vários estudos (LINS-JUNIOR *et al.*, 2011, 2013; SIDNEY *et al.*, 2010a, 2010b).

Para a maior parte dos Hymenoptera parasitica, a relação entre a seleção do hospedeiro e seu sucesso no ambiente é determinada por dois fatores: a capacidade fisiológica dos imaturos de explorar o hospedeiro e a habilidade comportamental de fêmeas para localizar e utilizar o recurso (GODFRAY, 1994). Hospedeiros variam em adequação e possibilidade de detecção (SLANSKY, 1986; VET & DICKE, 1992; GODFRAY 1994), e isso tem sido demonstrado em muitas espécies de parasitoides onde as fêmeas mostram plasticidade comportamental para a aceitação e oviposição preferencialmente no hospedeiro mais adequado. Porém, autores como Brodeur & Vet (1995), Grasswitz & Reese (1998) e Rivero, (2000), observaram uma concordância imperfeita entre a escolha do hospedeiro e o desempenho da prole dos parasitoides, isto é: nem sempre o hospedeiro mais adequado propicia condições para que o indivíduo jovem se desenvolva em seu ótimo.

Teorias recentes sobre as relações entre hospedeiro-parasitoide têm dado maior ênfase ao estado fisiológico da fêmea como também a sua oviposição, experiência prévia, percepção do ambiente e expectativa de vida mostrando que estes fatores podem influenciar a expressão dinâmica da seleção de hospedeiros pelos parasitoides (ROITBERG *et at.*, 1993; VISSER, 1995; RIVERO, 2000).

Rakhshani *et al.* (2006), investigando afídeos da alfafa no Irã, consideram que mais atenção deve ser dada aos parasitoides nesta cultura. Nos Estados Unidos da América, especificamente nos estados da Geórgia, Califórnia e Arizona o controle biológico com parasitoides é utilizado na alfafa e tem mantido afídeos e besouros herbívoros abaixo do nível de dano econômico (Berberet *et al.*, 1983).

No Brasil, Mendes (2000) estudou a diversidade de pulgões, seus parasitoides e predadores na cultura da alfafa em Lavras, MG, atentando para o importante papel desses inimigos naturais na redução das populações de pulgões na cultura. Outros trabalhos são devotados ao levantamentos de predadores e parasitoides de afídeos em campos de alfafa (Carvalho, 2007; Afonso, 2008; Cunha, 2013). O controle de pragas com a utilização de parasitoides pode ser prejudicado pela ação depressora dos hiperparasitoides, microhimenópteros de diversas famílias como: Encyrtidae, Eulophidae, Pteromalidae, Charipidae e Megaspilidae (CANO *et al.*, 1998).

Dentre os predadores mais utilizados no controle biológico encontram-se os coccinelídeos (Coleoptera, Coccinellidae) (OBRICKY & KRING, 1998), Esta família engloba cerca de 6.000 espécies descritas no mundo, das quais um terço ocorre na região Neotropical (VANDENBERG, 2002). Esses insetos se alimentam principalmente de afídeos e cocóideos (Hemiptera) (ALMEIDA & RIBEIRO-COSTA, 2009). Na Argentina, as espécies mais conhecidas são: *Eriopis connexa* Germar, *Hippodamia convergens* Guerin-Meneville, *Cycloneda sanguinea* L., *Coccinella ancoralis* Germar e *Chilocorus* sp Leach (HIJANO, 1993) e no Brasil alguns autores destacam a presença de *C. sanguinea*, *Scymnus* sp., *Diomus* sp., *Delphastus* sp. e *Hyperaspis* sp atuando principalmente na cultura de citros (GRAVENA, 1978; LARA *et al.*, 1977; PARRA *et al.*, 2003).

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram: Determinar a variação sazonal das espécies de afídeos em alfafa, inventariar as espécies de coccinelídeos predadores e parasitoides na cultura.

3 – METODOLOGIA

O presente trabalho foi conduzido no campo experimental de alfafa (variedade crioula) na Embrapa Pecuária Sudeste CPPSE, localizada no município de São Carlos, SP, nas coordenadas 21° 57' 42" (S) e 47° 50' 28" (W) e altitude de 860 m. (EMBRAPA, 2015). O

clima local é considerado como tropical de altitude, que, segundo a classificação de Koeppen, é o Cwa, clima quente com inverno seco, no qual a temperatura média do mês mais frio é inferior a 18°C e a do mês mais quente ultrapassa 22°C. O total das chuvas do mês mais seco não atinge 30 mm, e o do mês mais chuvoso atinge valores dez ou mais vezes maiores do que os do mês mais seco. Tais características, segundo critérios adotados por Thornthwaite, correspondem ao BB'w, mesotérmico úmido com deficiência de água no inverno (TOLENTINO, 1967). Segundo Nimer (1977) o período seco dura de junho a agosto, embora na prática varie num período de seis meses (EMBRAPA, 2015).

As coletas foram realizadas em uma área de 3000 m², dividida em 30 quadrados de 100 m² cada. Cada quadrado apresentava as plantas em uma fase de desenvolvimento diferente (Figura 2).



Figura 2. a) Campo de alfafa com vinte e nove dias de desenvolvimento. b) Campo de alfafa com quatro dias de desenvolvimento na Embrapa Pecuária Sudeste CPPSE, localizada no município de São Carlos, SP. [Fonte: Iemma, 2015]

Os dados de fatores climáticos foram coletados no site da Embrapa Pecuária Sudeste e juntamente com a coleta quinzenal dos afídeos, foram analisados graficamente e tabulados em planilha eletrônicas sendo trabalhados com o auxílio do software PAST versão 3.08 (HAMMER *et al.*, 2001), onde se calculou o coeficiente de correlação de Pearson (r), verificado pelo teste t com 1% e 5% de significância. Para a análise dos resultados encontrados, utilizou-se a escala proposta por Bryman & Cramer (2003), onde os valores de correlação entre 0,10 e 0,39 são considerados fracos; valores entre 0,40 e 0,69 são considerados como moderados; valores entre 0,70 e 0,89 são tratados como fortes e os valores entre 0,90 e 1 podem ser interpretados como muito elevados.

3.1 – Área de trabalho – Coleta dos afídeos, parasitoides e predadores.

Os afídeos foram coletados em plantas de Alfafa (*Medicago sativa*) variedade crioula, quinzenalmente, no período de março de 2013 a maio de 2014, totalizando 25 amostragens. Utilizou-se um retângulo de 30 cm² que era lançado ao acaso por oito vezes. A cada lançamento as plantas encerradas na área do retângulo eram vigorosamente agitadas, recolhendo-se os exemplares em uma bandeja.

Os parasitoides foram obtidos através da coleta de afídeos mumificados. As múmias foram identificadas e acondicionadas em microtubos Eppendorf até a emergência dos parasitoides. Depois de identificados e contados foram armazenados em congelador. As identificações foram realizadas sob Microscópio estereoscópico Leica M125 com ocular de 16x e um retículo de 100mm/0,1mm e luz de LED circular. As imagens foram capturadas usando-se uma câmera Leica Z16 automática e uma câmera digital Leica DFG495. As fotos obtidas foram reunidas com Helicon Focus© (v. 5.3).

Os coccinelídeos predadores foram buscados ativamente nas plantas de alfafa, sendo então congelados para posterior identificação. As chaves de identificação usuais são baseadas nas faunas australianas e americanas como Gordon (1985), Booth *et al.* (1990), Vanderberg (2002) e Slipinski (2007).

3.2 - Identificação dos Afídeos

Acyrtosiphon pisum: são afídeos grandes, com longas antenas e pernas, sífúnculos muito afilados. Coloração verde ou vermelha, encontrando-se no Brasil as formas esverdeadas. De acordo com Leclant *et al.* (1973) *A. pisum* é vetor de dois vírus persistentes de *Medicago sativa*, pea enation mosaic vírus e pea leaf-roll vírus, além do mosaico da alfafa, um vírus não-persistente. Com isso chamam a atenção para a necessidade de maiores pesquisas de campo e laboratório com esses afídeos. No Brasil a ocorrência desses vírus ainda não foi registrada.

Acyrtosiphon kondoi: apresenta coloração em tom verde azulado, ausência de pigmentação na articulação entre os antenômeros III e IV. O diâmetro dos sífúnculos, a meio comprimento, é distintamente maior do que o diâmetro do III segmento das antenas. Oliveira *et al.* (1986), em Piracicaba, SP. observaram ataques intensos desses afídeos em Dezembro de

1984 e em Maio e Dezembro de 1985 resultando no retardo do crescimento das plantas e engruvinhamento das folhas com conseqüente prejuízo na produção.

Therioaphis trifolii f. *maculata*: esses afídeos variam de 1,4 - 2,2 mm de comprimento e coloração variando desde o amarelo-pálido a verde muito claro. Diferencia-se dos outros afídeos da alfafa por apresentar o dorso do abdome com fileiras de tubérculos castanho-claros até marrom-escuros com cerdas capitadas. Lazzari *et al.* (1996) referem que o primeiro registro dessa espécie de afídeo em alfafa no Brasil foi feito em 1990, no centro-sul do Paraná. Essa espécie é uma das principais pragas da alfafa em muitos países. Atacam preferencialmente as folhas inferiores, que caem devido à ação da saliva toxicogênica, podendo levar as plantas mais jovens à morte. Blackman & Eastop (1984) mencionam sua capacidade para transmitir o alfalfa mosaic virus e o clover (red) vein mosaic, ainda não registrados para o Brasil.

Aphis craccivora: são pulgões de tamanho mediano, adultos ápteros apresentam o dorso abdominal negro e muito brilhante que contrasta com as partes esbranquiçadas das antenas e pernas. Os alados têm faixas transversais esclerotizadas no dorso do abdome, poucos sensórios secundários (3-8), restritos ao III segmento antenal. Esta espécie é considerada vetor de dois dos principais vírus da alfafa, mosaico e enações (SWENSON, 1954; LECLANT *et al.*, 1973)

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de março de 2013 a maio de 2014 foram coletados 7425 afídeos de diversos ínstares, ápteros e alados. Nesse período os meses com o maior número de afídeos foram setembro de 2013 e abril de 2014 respectivamente. Os meses de novembro, dezembro de 2013 e janeiro e fevereiro de 2014 foram os meses com menor número de afídeos (Figura 4 e Tabela 1).

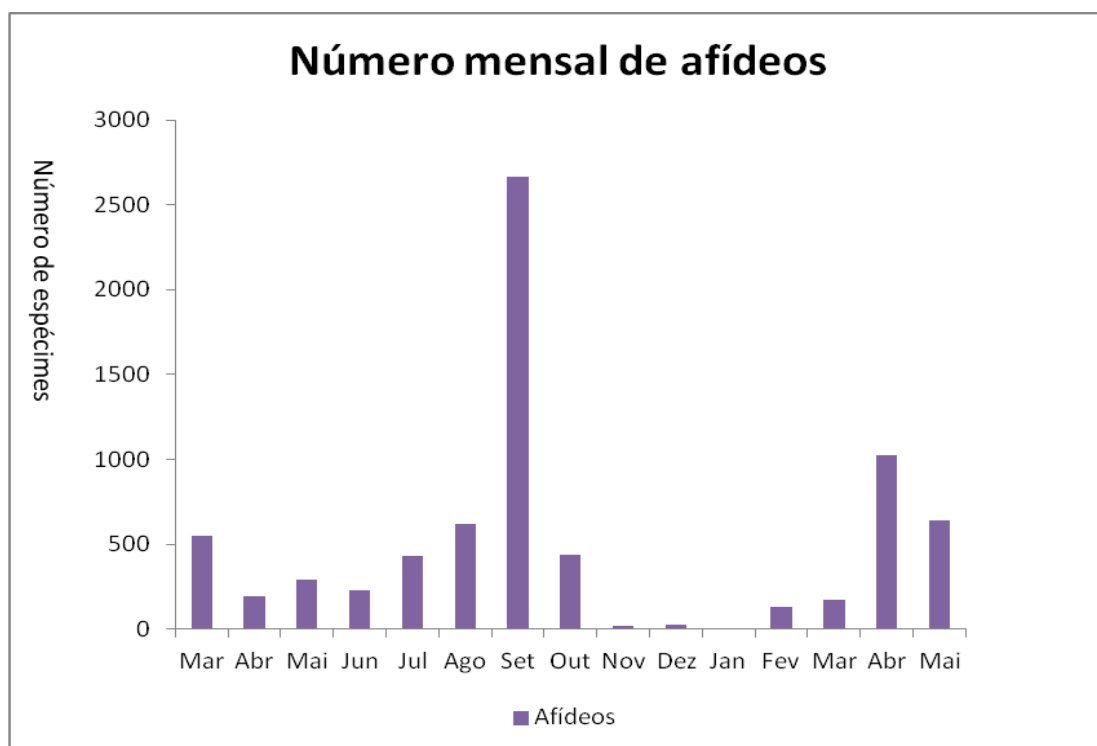


Figura 3. Distribuição mensal do número de afídeos coletados sobre plantas de *Medicago sativa*, na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.

Tabela 1. Número mensal de exemplares de afídeos e coccinelídeos coletados sobre plantas de *Medicago sativa*, na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.

Meses de coleta	<i>A. pisum</i>	<i>A. kondoi</i>	<i>T. trifolii</i>	<i>A. craccivora</i>	Coccinelídeos
mar/13	428	7	81	32	22
abr/13	160	2	28	1	40
mai/13	168	18	80	22	20
jun/13	146	1	80	0	30
jul/13	72	0	65	297	74
ago/13	148	0	472	0	111
set/13	73	6	2580	5	371
out/13	33	30	289	87	69
nov/13	18	0	0	0	24
dez/13	03	0	25	0	4
jan/14	0	0	3	0	0
fev/14	53	53	25	0	19
mar/14	76	0	87	8	18
abr/14	825	0	199	0	185
mai/14	339	88	212	0	221
Total	2542	205	4226	452	1208

No mês de dezembro de 2013 o campo de alfafa foi pulverizado com o inseticida sistêmico Tiametoxam para controlar a infestação de afídeos na cultura. O uso desse inseticida pode ter afetado as coletas inclusive no mês de janeiro/2014.

T. trifolii ocorreu em 24 das 25 coletas realizadas. Esta espécie foi a mais abundante em todo o período de coletas, com um total de 4.226 indivíduos, 56,92% do total (Figura 5). Em setembro de 2013 coletou-se o maior número de exemplares, 2.580 indivíduos. Nesse mês registrou-se a menor umidade relativa de todo o período (68,8%) (Figura 7) e uma baixa pluviosidade (Figura 6). O clima quente e seco favorece o desenvolvimento de *T. trifolii* (Messenger, 1964; Berberet *et al.*,1983). Em novembro de 2013 nenhum exemplar da espécie foi coletado. A umidade relativa, no período foi de 80% e o valor médio da temperatura de 21,9 °C. Cunha (2013) pontuou que janeiro de 2014 foi o mês em que menos coletou *T. trifolii*. Comparando-se os valores de umidade relativa e temperatura nos meses de janeiro de 2012 e novembro de 2013 observa-se que são muito próximos.

Esta espécie mostrou baixa correlação com a pluviosidade ($r = 0,499$; $p = 0,189$) (Figura 8).

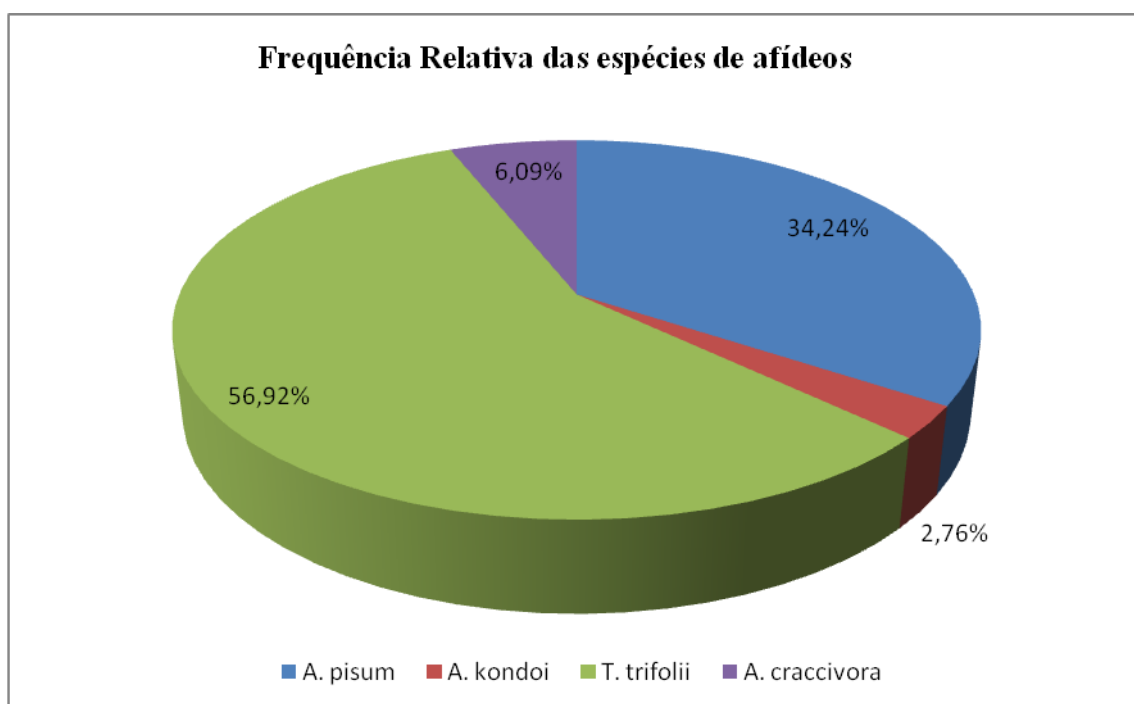


Figura 4. Frequência relativa de afídeos coletados sobre plantas de *Medicago sativa*, na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.

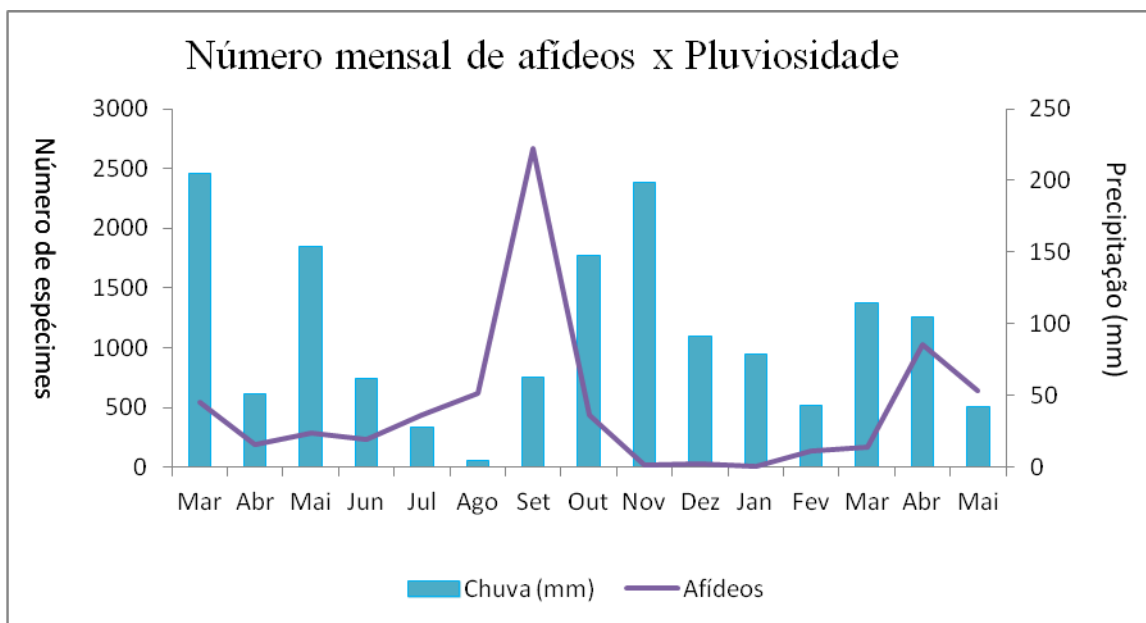


Figura 5. Número mensal de afídeos associados à pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.

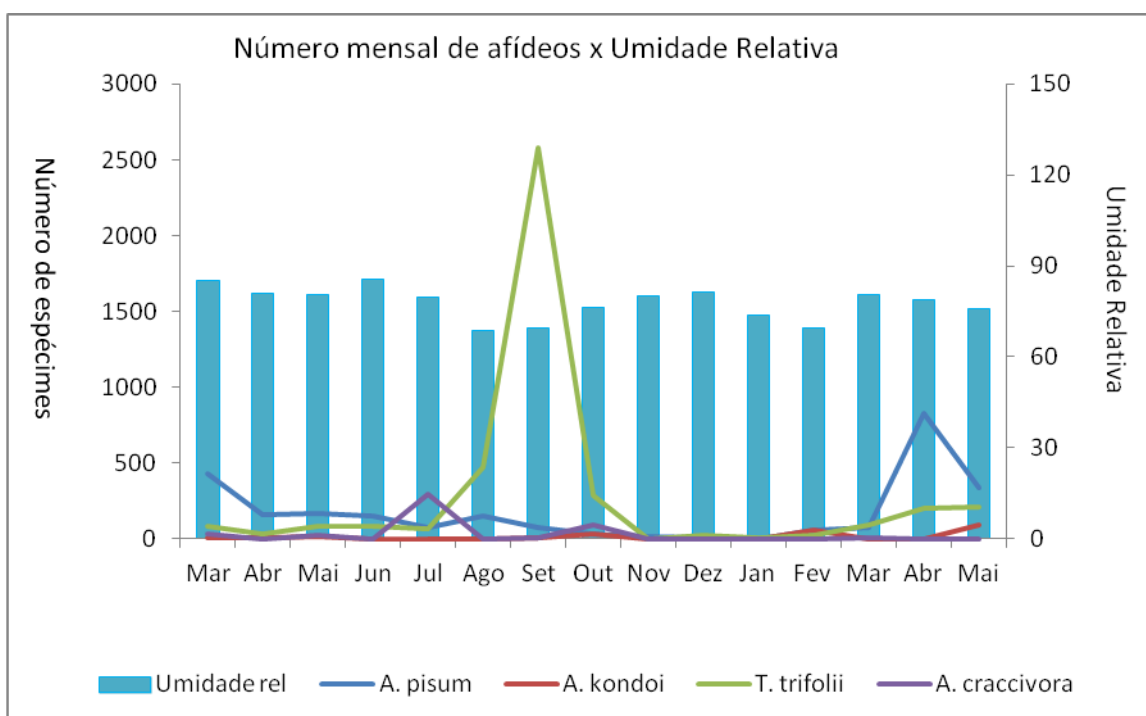


Figura 6. Variação nos números mensais de afídeos associados à coletados e da umidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.

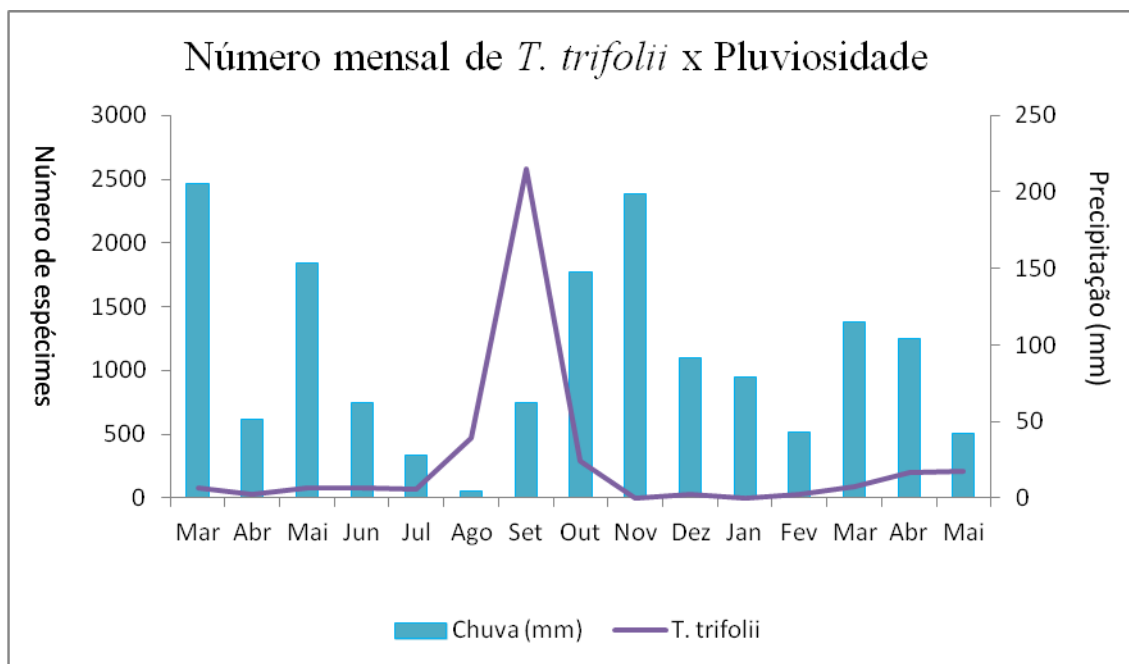


Figura 7. Variação nos números mensais de *Therioaphis trifolii* coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.

A. pisum ocorreu em 24 das 25 coletas. Foi a segunda espécie em número total de indivíduos coletados, com 34,24% (Figura 5). Seu pico de abundância ocorreu no mês de abril de 2014, com 825 indivíduos. Morgan *et al.*, (2001) observando os efeitos da temperatura sobre esta espécie, relataram que a temperatura média ideal para o seu desenvolvimento é cerca de 23,1°C. No presente trabalho o pico de *A. pisum* ocorreu a 21,4°C. Esta espécie mostrou baixa correlação com a pluviosidade, $r = 0,663$; $p = 0,123$ (Figura 9).

A. kondoi ocorreu em apenas 8 das 25 coletas, totalizando 205 espécimes, 2,76% do total (Figura 5). Teve seu ápice em maio de 2014 com 88 exemplares coletados. Esta espécie teve uma correlação baixa com a pluviosidade $r = 0,529$; $p = 0,177$, (Figura 10).

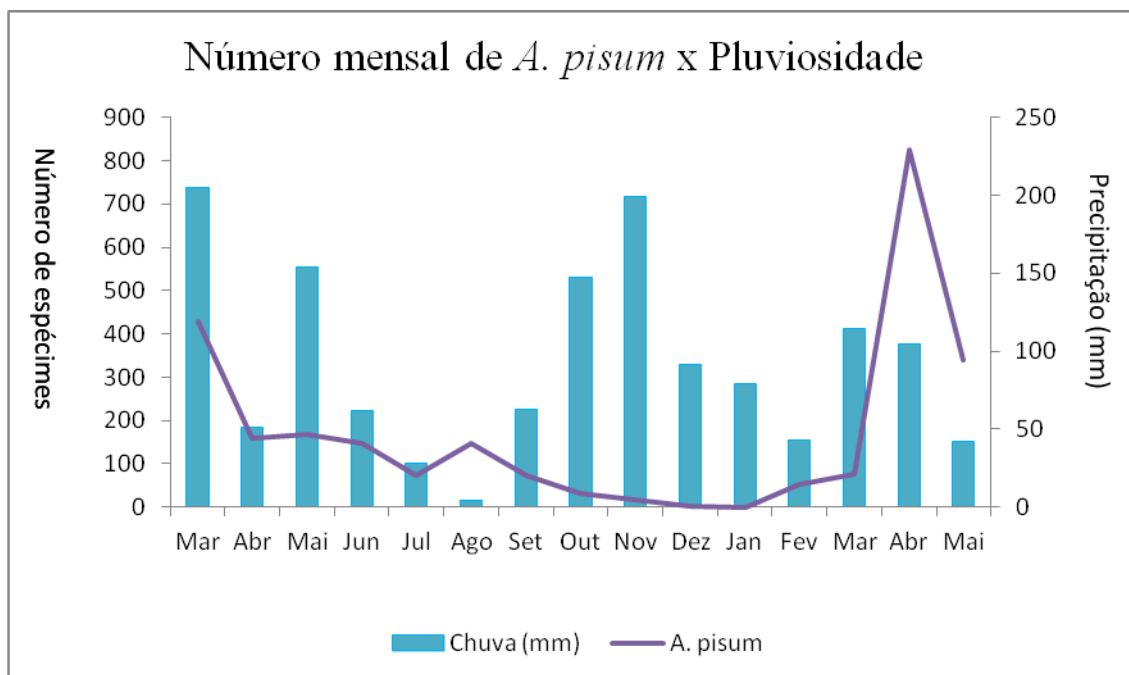


Figura 8. Variação nos números mensais de *Acyrtosiphon pisum* coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.

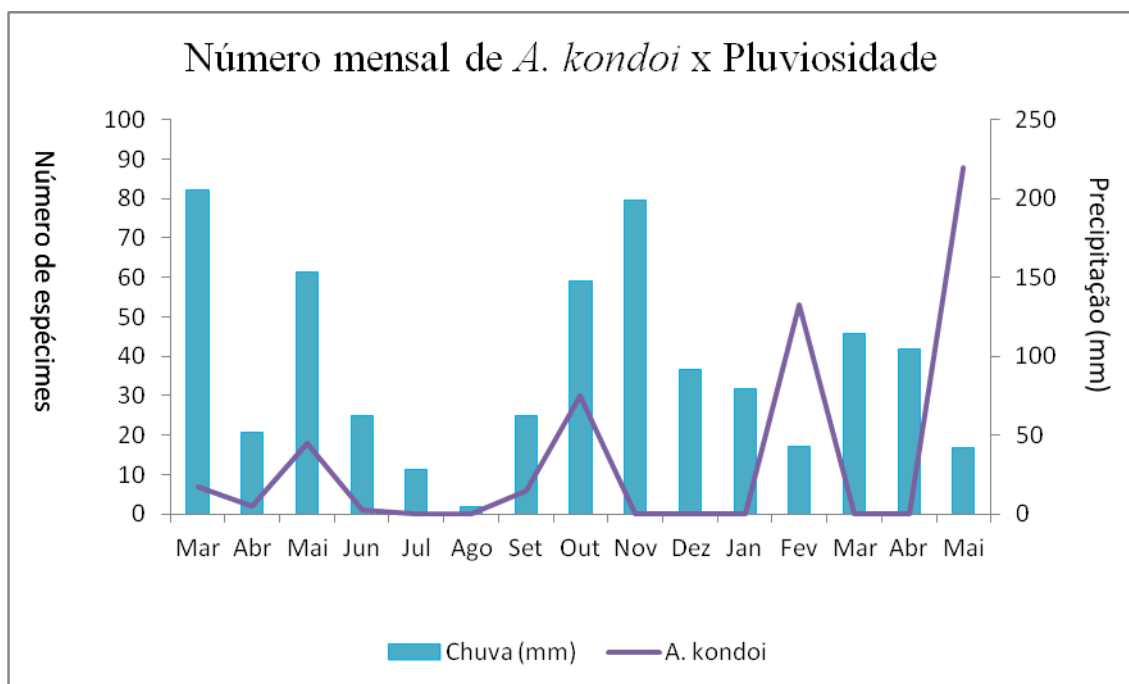


Figura 9. Variação nos números mensais de *Acyrtosiphon kondoi* coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.

A. craccivora ocorreu em apenas 7 das 25 coletas, totalizando 452 espécimes, 6,09% do total (Figura 5). O pico de coletas foi em julho de 2013 com 297 indivíduos e no restante

das coletas pouco foi coletado. Isto talvez possa ser explicado por seu hábito de colônia em reboleiras, e como a coleta foi aleatória, pode-se ter acabado evitando os pontos de concentração destes indivíduos em determinadas coletas. Outra hipótese é que o defensivo agrícola supracitado possa ter um efeito mais impactante nesta espécie, pois após sua aplicação, só foi coletada em uma (oito indivíduos) das nove coletas subsequentes.

Diferentemente de Silva *et al.* (2007) que observou ápices populacionais de *A. craccivora* nos meses de dezembro e fevereiro e em abril por Mendes *et al.* (2000), no presente trabalho o pico de coletas dessa espécies foi no mês de julho. Apesar do baixo número de exemplares coletados, sua correlação com a pluviosidade foi moderada (Figura 11).

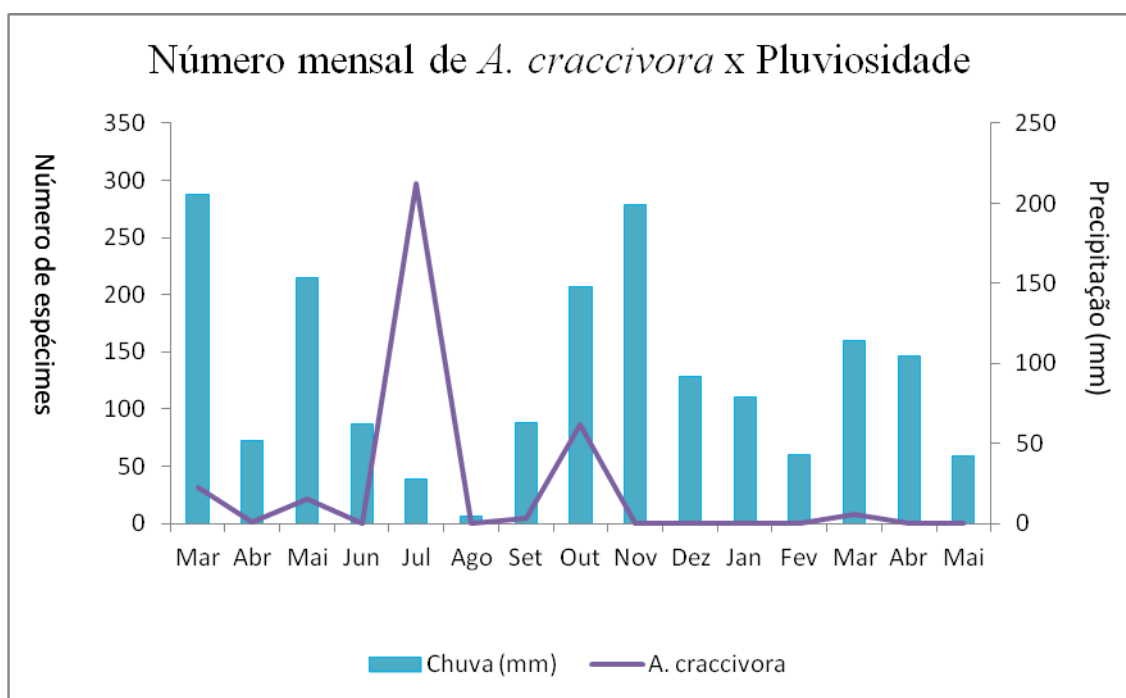


Figura 10. Variação nos números mensais de *Aphis craccivora* coletados e da pluviosidade, no período de março de 2013 à maio de 2014.

Observou-se neste trabalho que a população de afídeos tende a diminuir quando há aumento da pluviosidade. Sua influência sobre a população foi positiva e moderada ($r = 0,550$; $p = 0,168$) (Figura 6). As correlações com a umidade foram consideradas não significativas (Figura 7). Cunha (2013) e Mendes *et al.* (2000), não encontraram correlação significativa entre a flutuação dos afídeos com qualquer variável ambiental porém, consideram que estes fatores podem afetar a dinâmica populacional dos afídeos.

Berberet *et al.* (1983) estudando *T. trifolii*, *A. pisum* e *A. kondoi* afirmam que a abundância de uma espécie sobre a outra depende dos fatores climáticos.

4.1 – Parasitoides e Hiperparasitoides

Os parasitoides coletados nos campos de alfafa foram provenientes de múmias de duas espécies de afídeos, *Acyrtosiphon pisum* e *Aphis craccivora*, num total de 225 múmias. Dessas 197 eram de *A. pisum* e 28 de *A. craccivora*. Das múmias de *A. pisum* emergiram 156 parasitoides da espécie *Aphidius ervi* e 41 hiperparasitoides associados a este último; os 28 parasitoides que foram encontrados de *A. craccivora* não foram identificados. Os meses com maior abundância de múmias foram agosto de 2013 (24 indivíduos) e maio de 2014 (61 indivíduos).

Parasitoides geralmente atacam poucas espécies de hospedeiros, sendo muitas vezes limitados a apenas uma. Seu desenvolvimento deve acompanhar o tempo de vida de seu hospedeiro e normalmente dispor de fêmeas altamente fecundas que possam ovipositar em muitos hospedeiros em sua vida (SNYDER & IVES, 2003). Esta característica permite aos parasitoides crescerem rapidamente, como resposta a um grande aumento numérico de seus hospedeiros controlando assim esta população (HASSELL, 1980; HASSELL & MAY, 1986; BERRYMAN, 1992; MURDOCH, 1994; TURCHIN *et al.*, 1999).

Tabela 2. Número mensal de mummies de *A. pisum* e *A. craccivora* coletadas sobre plantas de *Medicago sativa*, na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.

Meses de coleta	Mummies de <i>A. pisum</i>	Mummies de <i>A. craccivora</i>
mar/13	18	0
abr/13	15	0
mai/13	3	0
jun/13	10	0
jul/13	6	14
ago/13	30	2
set/13	12	0
out/13	6	9
nov/13	7	3
dez/13	1	0
jan/14	0	0
fev/14	0	0
mar/14	9	0
abr/14	12	0
mai/14	68	0
Total	197	28

Na Argentina, Aragon (1990) cita *Aphidius smithi* e *A. ervi* como parasitoides eficazes de *A. pisum*. Esses microhimenópteros foram importados dos Estados Unidos, multiplicados em laboratório e posteriormente liberados em 1972 na região dos pampas. Ambos se estabeleceram e se difundiram com rapidez.

He *et al.* (2005) mostram que o parasitismo de *A. pisum* por *A. ervi* afeta significativamente o crescimento populacional do afídeo, atuando sobre a sua taxa intrínseca de crescimento, sua taxa reprodutiva e também sobre o tempo de geração.

Quarenta e uma mummies deram origem a 32 indivíduos de *Dendrocerus carpenteri* e a 9 indivíduos de *Syrphophagus aphidivorus* ambos hiperparasitoides, endoparasitoides coinobiontes solitários, emergidos de *A. ervi* no hospedeiro *A. pisum*. Provavelmente esses hiperparasitoides prejudiquem a ação dos parasitoides no controle da população de *A. pisum*.

Os hiperparasitoides foram identificados através de Noyes (1980) e Johnson & Musetti's (2004) para *D. carpenteri* e Fergusson (1980) para *S. aphidivorus*. Essas espécies representam duas novas ocorrências na alfafa; a primeira para o Brasil e a segunda para o Estado de São Paulo.

4.1.1 – Hiperparasitoides - *Dendrocerus carpenteri* (Hymenoptera: Megaspilidae)

A família Megaspilidae é considerada pequena com apenas 12 gêneros divididos em duas subfamílias e 450 espécies conhecidas, tendo uma grande quantidade de espécies ainda não descritas. Este grupo é pouco conhecido como um todo, contudo acredita-se que a maioria seja parasitoide, especialmente de Hemiptera (Sternorrhyncha), e alguns hiperparasitoides (ALEKSEEV, 1978/1987). A marcante diversidade de hospedeiros utilizados por hiperparasitoides do gênero *Dendrocerus* parece estar centrada em predadores e parasitoides de Hemiptera da subordem Sternorrhyncha (afídeos e ocasionalmente psilídeos). Seus hospedeiros incluem Hymenoptera (Aphidiidae e mais raramente Aphelinidae, Encyrtidae, Pteromalidae e Figitidae), Diptera e Coleoptera (DESSART, 1972, 1973; TAKADA, 1973; FERGUSSON, 1980).

Dendrocerus carpenteri é conhecido por ter um escapo particularmente curto (na maioria das vezes cinco vezes mais longo que grosso) (Figura 12). Notaulices apenas ligeiramente convergentes, não encontrando o sulco medial, ou se encontrar ou quase encontrar, eles convergem em curva (Figura 13). Pterostigma aproximadamente semicircular (Figura 14), com raio profundamente angulado. É uma espécie bem distribuída e é encontrada em uma grande gama de afídeos.



Figura 11. *Dendrocerus carpenteri*, a) Vista lateral mostrando em detalhes o escapo.

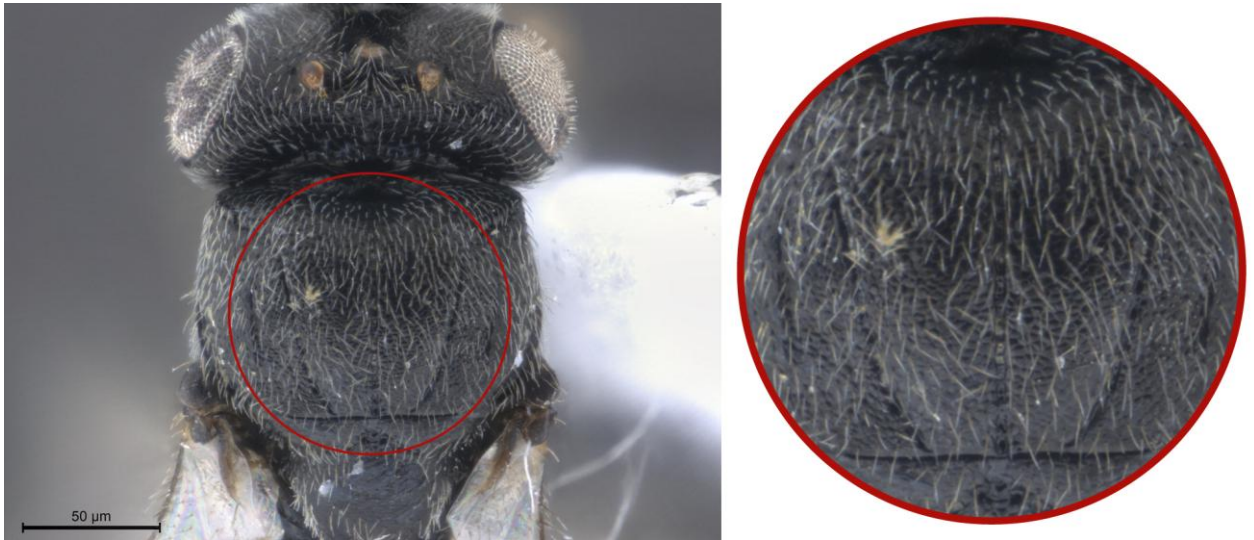


Figura 12. *Dendrocerus carpenteri*. b) Vista superior dos Notaulices convergentes.



Figura 13. *Dendrocerus carpenteri*. c) Vista superior do Pterostigma.

Tavares (1996) já havia documentado esta espécie ocorrendo sobre afídeos nas seguintes plantas: *Hibiscus rosa-sinensis*, *Asclepias curassavica*, *Solanum americanum*, *Foeniculum vulgare*, *Citrus* sp, *Schefflera* sp. e *Sessea brasiliensis*, porém esta é a primeira ocorrência em cultura de alfafa no Brasil.

4.1.2 – Hiperparasitoides - *Syrphophagus aphidivorus* (Hymenoptera: Encyrtidae)

Encyrtidae é uma grande família de vespas parasitoides, com cerca de 3000 espécies descritas divididas em 450 gêneros. A maior parte dos Encyrtidae é composta de

endoparasitoides primários de outros artrópodes ou hiperparasitoides de outros Hymenoptera (HANSON & GAULD, 1995).

Dentre os Encyrtidae coinobiontes, o comportamento de seleção de hospedeiro de *Syrphophagus aphidivorus* é atípico. As fêmeas dispõem de dois diferentes mecanismos de oviposição. Ela pode ovipositar em um afídeo ainda vivo com o objetivo de sua larva atacar a larva do parasitoide primário ou ela pode ovipositar no afídeo quando este já se encontra mumificado e, com isso, sua larva ataca a pré-pupa ou a pupa do parasitoide primário (KANUCK & SULLIVAN, 1992).

A espécie *Syrphophagus aphidivorus* tem um escapo pelo menos três vezes e meia mais longo do que largo (Figura 15). Escutelo mais ou menos esculpido uniformemente, nunca com uma escultura basal tão forte quanto a do ápice (Figura 16). O centro do propódeo é suave e a venação das asas anteriores normalmente preto-amarronzada (Figura 16). A cabeça é mais larga que longa (Figura 17) e os segmentos F1 e F2 consideravelmente menores que o restante dos segmentos funiculares.



Figura 14. *Syrphophagus aphidivorus*. a) Vista lateral do escapo.

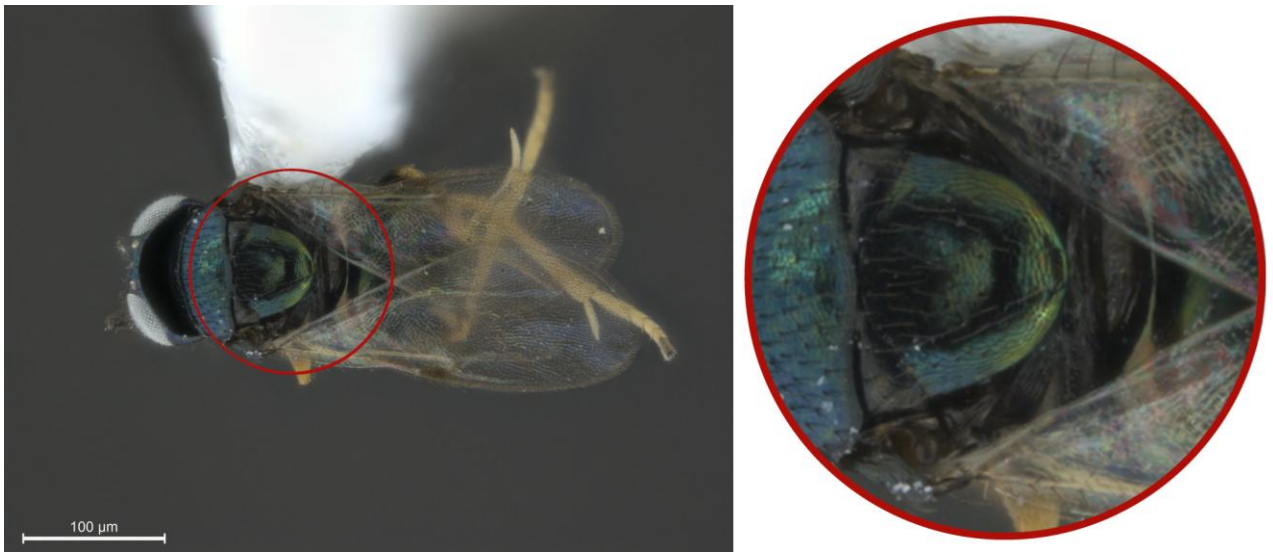


Figura 15. *Syrphophagus aphidivorus*. b) Vista superior do escutelo.



Figura 16. *Syrphophagus aphidivorus*. c) Vista dorsal da cabeça.

Esta espécie já foi relatada no Estado do Paraná em culturas de Trigo (ZANINI, 2004) e no Estado de São Paulo associada a cultivares de aveia irrigada (RONQUIM *et al.*, 2004),

porém esta é a primeira vez que esta espécie é encontrada no Estado de São Paulo associada à cultura de alfafa.

4.2 - Coccinellidae predadores

Foram coletadas seis diferentes espécies de coccinélídeos predadores de afídeos nos campos de alfafa: *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) com 52% do total de indivíduos, seguida por *Hippodamia convergens* Guérin-Meneville com 24,09% e *Cycloneda sanguinea* com 13,07% foram as mais coletadas (Tabela 3 e Figura 18). Mendes *et al.* (2000) coletaram *Cycloneda sanguinea* em 49,6% dos coccinélídeos amostrados, seguido por *E. connexa* com 26%, Cunha (2013) cita *Harmonia axyridis* e *Hippodamia convergens* com 53,27% e 29,13% respectivamente, em levantamento realizado em alfafa na cidade de São Carlos, SP.

Harmonia axyridis é nativa da Ásia, alimentando-se, principalmente, de afídeos, cochonilhas e psilídeos, é muito utilizada em programas de controle biológico (KOCH *et al.*, 2006). Segundo o mesmo autor, a provável distribuição original de *H. axyridis* estende-se desde o Sul da Sibéria, nas Montanhas de Altai, à costa do Pacífico, inclusive a Coréia e o Japão, até o Sul da China no Himalaia. Ferran *et al.* (2000) citam que esta espécie foi introduzida no Egito para controle de *Aphis craccivora*.

Hippodamia convergens de acordo com Hodek (1973), foi uma das espécies responsáveis pelo controle da população dos afídeos da alfafa, na Califórnia durante a primavera. Este fato, segundo Minks & Harrewijn (1988) propiciou a introdução desse inseto em muitas áreas do mundo. No Brasil, a maioria dos trabalhos envolvendo essa espécie apenas relata a sua ocorrência (PIMENTA & SMITH 1976, GASSEN, 1986).

No presente trabalho encontraram-se dois ápices populacionais principais de Coccinellidae, o maior em setembro de 2013 com 371 indivíduos e o segundo em maio de 2014 com 221 indivíduos. Esses picos ocorreram isolada ou juntamente com picos de afídeos (Figura 19). Resultados semelhantes também foram encontrados por Cunha (2013) e Mendes *et al.* (2000) nos levantamentos que realizaram em seus trabalhos com alfafa.

O teste de Correlação de Pearson, entre Coccinellidae e afídeos, resultou no valor de $r = 0,924$, mostrando uma forte correlação entre pragas e predadores.

Tabela 3. Ocorrência mensal de espécies de Coccinellidae coletados sobre plantas de *Medicago sativa*, na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 a maio de 2014.

Meses	<i>H. axyridis</i>	<i>H. convergens</i>	<i>C. sanguinea</i>	<i>E. connexa</i>	<i>O. v-nigrum</i>	<i>S. argentinicus</i>	Total
mar/13	13	7	2	0	0	0	22
abr/13	27	4	6	2	0	1	40
mai/13	8	3	9	0	0	0	20
jun/13	5	11	6	3	3	2	30
jul/13	23	31	7	6	7	0	74
ago/13	48	37	16	5	3	2	111
set/13	232	77	41	1	20	0	371
out/13	44	2	9	7	4	3	69
nov/13	13	8	3	0	0	0	24
dez/13	3	1	0	0	0	0	4
jan/14	0	0	0	0	0	0	0
fev/14	9	3	5	2	0	0	19
mar/14	0	11	7	0	0	0	18
abr/14	89	45	30	18	0	3	185
mai/14	112	51	17	41	0	0	221
Total	626	291	158	85	37	11	1208

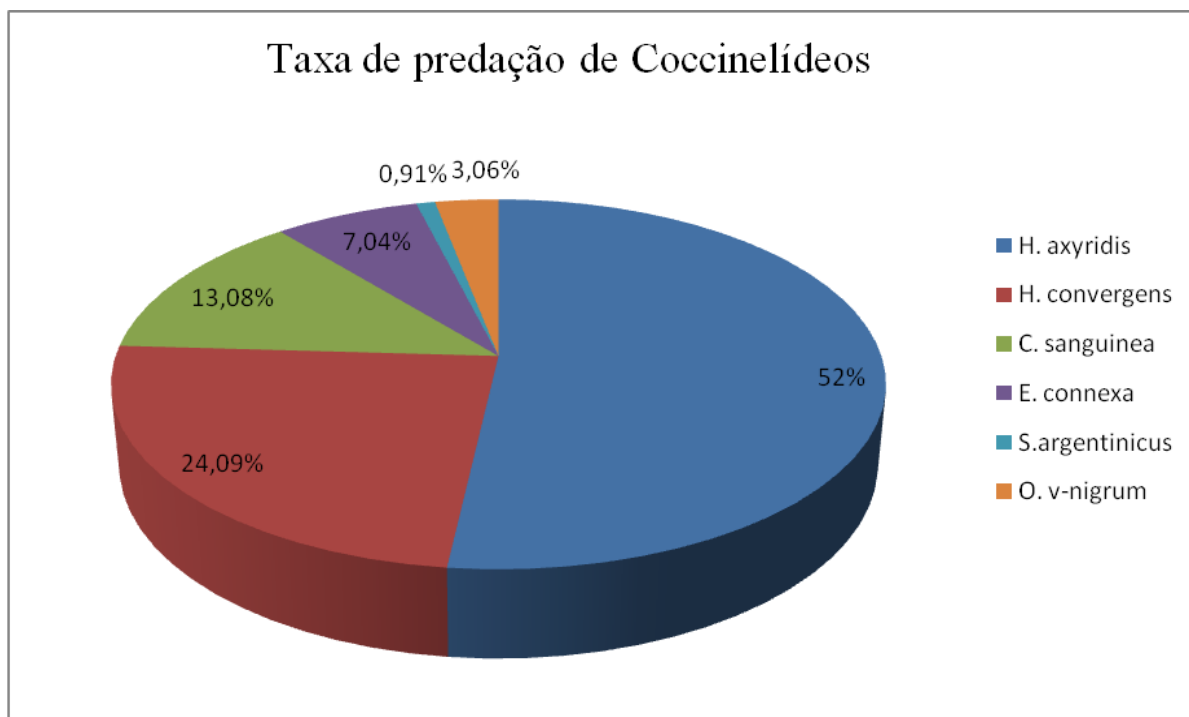


Figura 17. Taxa de predação de espécies de Coccinellidae coletados sobre plantas de *Medicago sativa*, na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.

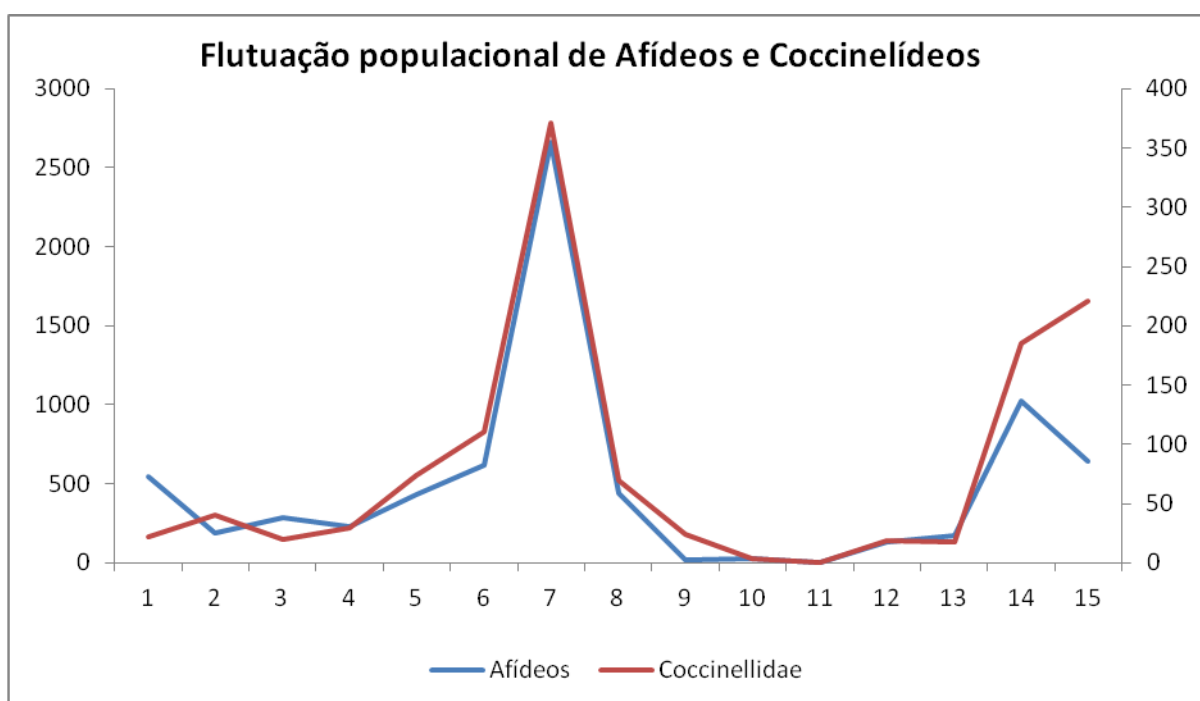


Figura 18. Flutuação populacional de Afídeos e Coccinelídeos coletados sobre plantas de *Medicago sativa*, na Embrapa Pecuária Sudeste, no período de março de 2013 à maio de 2014.

CONCLUSÕES

- Durante o período de março de 2013 à maio de 2014, coletando em cultura de alfafa em São Carlos, SP, o afídeo e o coccinelídeo mais abundantes foram *Therioaphis trifolii* e *Harmonia axyridis* respectivamente.
- A pluviosidade foi a única variável ambiental com correlação moderada com a flutuação dos afídeos.
- Houve uma forte correlação entre a ocorrência de afídeos e seus predadores (coccinelídeos) em campo, denotando um padrão típico de predador-presa.
- Houve variação sazonal entre as diferentes espécies estudadas.
- O parasitoide *A. ervi* foi obtido exclusivamente de múmias de *A. pisum*, abundante no cultivo estudado, evidenciando a especificidade deste parasitoide ao hospedeiro.
- O número de indivíduos de *H. axyridis* foi mais elevado quando *T. trifolii* atingiu seus maiores picos populacionais.



CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE PREDACÃO INTRAGUILDA ENTRE TRÊS ESPÉCIES DE COCCINELÍDEOS SOBRE *Aphidius ervi* EM CULTURA DE ALFAFA.



1 – INTRODUÇÃO

Embora se possa estudar separadamente cada componente de um sistema, na realidade eles se encontram interligados (PUTMAN, 1994), e o entendimento das relações existentes entre as espécies e suas teias alimentares deve ser usado para o aprimoramento de programas de manejo integrado de pragas buscando minimizar os prejuízos que possam provocar (FREITAS *et al.*, 2007; KNAAK *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012).

Muitas vezes, a vulnerabilidade e a sobrevivência do inseto hospedeiro aos parasitoides e aos predadores estão intimamente relacionadas à espécie de planta utilizada como alimento, estabelecendo uma grande ligação entre os níveis tróficos (SCHOWALTER, 1981; GARCIA, 1991). Essas interações, denominadas relações tritróficas, ocorrem dentro de um ambiente físico e químico espacialmente diversificado e dinâmico e, incluem todas as várias interações de ataque e defesa entre níveis tróficos (LIMA, 2013) incluindo relações morfológicas, comportamentais e fisiológicas, bem como as interações inter e intraespecíficas dentro de cada nível trófico, sendo a interação entre predador e parasitoide de fundamental importância, uma vez que pode haver influência negativa do ponto de vista do uso do mesmo recurso entre esses dois organismos. Esse fato foi percebido por Santos (2008) ao observar a possibilidade de uma influência negativa, do ponto de vista do uso do mesmo recurso, entre uma vespa parasitoide e três espécies de vespas predadoras, sendo que a primeira tinha sua população prejudicada pela predação de seu hospedeiro enquanto estava em sua fase larval.

As interações tróficas podem ser mediadas por meio de compostos do metabolismo secundário, os aleloquímicos (TRIGO *et al.*, 2011). Parasitoides e predadores, ao longo do processo evolutivo, têm explorado metabólitos liberados pelas plantas utilizando-os como sinais na localização de hospedeiros e/ou presas (METCALF & METCALF, 1992).

Contrastando com os parasitoides que normalmente são especialistas, os predadores, em sua maioria, são generalistas e, frequentemente, menos efetivos em controles direcionados. Predadores costumam ter hábitos regrados de alimentação e ciclo de vida muitas vezes superior ao de herbívoros. Nos casos de sucesso em controles biológicos utilizando-se predadores, estes normalmente eram especialistas, tendo histórias de vida muito mais parecidas com a de parasitoides do que com a de predadores típicos (SNYDER & IVES, 2003). Predadores generalistas comumente se engajam em predação intraguilda (POLIS *et al.*, 1989; POLIS & HOLT, 1992; ROSENHEIM *et al.*, 1993; 1995; ROSENHEIM, 1998) alimentando-se não somente de outros predadores, mas também de parasitoides (BRODEUR

& ROSENHEIM, 2000; ROSENHEIM, 1995; SNYDER & IVES, 2001). Em sistemas onde se encontram coccinelídeos e parasitoides, o primeiro é considerado predador intraguildd (IG) e o segundo presa IG. Desta forma, esta interação é fortemente assimétrica (quando apenas uma espécie ataca a outra) como, por exemplo, parasitoides em fase larval que são consumidos pelos coccinelídeos quando estes consomem sua presa primária (COLFER & ROSENHEIM, 1995; 2001; TAYLOR *et al.*, 1998; BRODEUR & ROSENHEIM, 2000) Nas interações simétricas, ambos os inimigos naturais se atacam mutuamente como, no caso de coccinelídeos (GAGNON *et al.*, 2011; LUCAS & ROSENHEIM, 2011). 58% a 87% das espécies animais estão envolvidas em interações de predação intraguildd (ARIM & MARQUET, 2004).

De acordo com Brodeur & Rosenheim (2000) a predação intraguildd é prevalente em diversos sistemas, podendo afetar outros níveis tróficos indiretamente. Através de predação intraguildd intensa, predadores podem desencadear ou mesmo piorar surtos das pragas e potencialmente aumentar a quantidade de dano dos herbívoros às plantas (ROSENHEIM *et al.*, 1993; SNYDER & IVES, 2001; SNYDER & IVES, 2003) como Rondoni *et al.* (2014a) observaram restos de *Adalia bipunctata* e *Oenopia conglobata* (Coleoptera: Coccinellidae), ao analisar o conteúdo estomacal de *H. axyridis* em experimento na Itália. Brown *et al.* (2015) demonstraram que o coccinelídeo *H. axyridis* pode ser considerado um predador generalista que se alimenta até mesmo de outros predadores.

A eficácia de coccinelídeos predadores em sistemas naturais ou controlados é difícil de determinar dada sua mobilidade e natureza tipicamente polífaga (FRAZER, 1998), e com isso também podem levar a uma destruição do equilíbrio biológico existente quando introduzidos em um local e isto deve ser levado em consideração (ROSENHEIM *et al.*, 1995), afinal estes predadores podem se alimentar, por exemplo, de afídeos parasitados (múrias) (COLFER & ROSENHEIM, 1995; FERGUSON & STILING, 1996; WHEELER *et al.*, 1968) afetando os parasitoides já existentes no local (OBRICKY & KRING, 1998). No entanto, tem-se mostrado em alguns sistemas que apesar do alto grau de predação intraguildd, a mortalidade per capita causada pelo parasitismo não foi afetada e a combinação de Coccinelídeos e vespas parasitoides juntos diminuíram a população local de afídeos até próximo à extinção (HOELMER *et al.*, 1993; HEINZE *et al.*, 1994; ROSENHEIM *et al.*, 1997; COLFER & ROSENHEIM, 2001). Em um primeiro momento, esta dinâmica de interação entre vespas parasitoides e coccinelídeos predadores parece afetar negativamente apenas o primeiro, porém alguns estudos sugerem que os parasitoides dentro da múria podem ter efeitos deletérios no

desenvolvimento dos coccinelídeos (TAKIZAWA *et al.*, 2000; ROYER *et al.*, 2008). De acordo com Lebusa (2004), vespas da família Aphidiidae são endoparasitoides e como resultado do hábito de alimentação do predador afidófago, a larva do parasitoide em desenvolvimento dentro do afídeo é consumida. Isto coloca uma pressão negativa na população do parasitoide, porém este tipo de impacto ainda não foi devidamente estudado (MULLINS, 2008). Como se observa, a predação de parasitoides em seu hospedeiro não se limita ao seu consumo em estágios avançados como aqueles encontrados nos afídeos mumificados; as larvas desses parasitoides, muito jovens ou mesmo seus ovos, podem ser consumidos quando da predação de presas recentemente parasitadas (COLFER & ROSENHEIM, 2001). De qualquer modo, em ambas as ocasiões, a predação intraguilida resulta na morte do parasitoide (SUNDERLAND *et al.*, 1997). Alguns estudos sugerem que os coccinelídeos predadores não discriminam afídeos parasitados e não parasitados (HAGEN & BOSCH, 1968; STARY, 1970; ROYER *et al.*, 2008), porém Colfer & Rosenheim (2001) conduzindo ensaios laboratoriais com o predador *H. convergens* e o parasitoide *L. testaceipes* observaram que os predadores preferiam afídeos não parasitados apesar do esforço maior para obtê-los, reforçando com isso a possibilidade de efeitos negativos desta alimentação.

É sabido também que alguns parasitoides são capazes de evitar predação intraguilida (IGP) (POLIS *et al.*, 1989). Estudos realizados por Meisner *et al.*, (2011) demonstraram que os mesmos podem evitar áreas onde predadores estão presentes, modificando seu comportamento. Taylor *et al.*, (1998) encontraram que o parasitoide *A. ervi* gasta menos tempo forrageando em locais previamente expostos ao predador *C. septempunctata* L. e estes resultados foram confirmados por Nakashima & Senoo (2003), porém em ensaio de laboratório, Bilu *et al.*, (2006) observaram que não acontece o mesmo com *A. colemani*. Estes parasitoides no citado estudo, não evitaram os locais com incidência maior de coccinelídeos, nem mesmo quando os encontraram em folhas.

Mullins (2008) acredita que mais estudos da interação entre predadores e parasitoides afidófagos são necessários para aumentar nosso entendimento dos efeitos combinados deste complexo predador/parasitoide.

As ações predatórias frequentemente são constatadas através de observações diretas no campo. Muitas vezes a valoração se baseia em uma correlação entre as densidades do predador e da presa, o que pode não ser muito confiável particularmente com espécies altamente polífagas (HUGHES, 1973; HATTINGH & SAMWAYS, 1994). Luck *et al.*, (1988) revisaram métodos experimentais para estimar inimigos naturais e citou seis exemplos

envolvendo coccinelídeos, sendo eles: Uso de gaiolas ou barreiras, remoção de inimigos naturais, enriquecimento da presa, observação direta e evidência química da alimentação natural de inimigos.

Para uma identificação mais acurada, podem-se utilizar métodos moleculares, como por exemplo, ácidos nucleicos e proteínas. Uma grande vantagem do uso dos ácidos nucleicos é o grande número de loci visíveis, facilitando sua identificação e uso (EDWARDS & HOY, 1993; LANDRY *et al.*, 1993). Apesar do RNA ter o potencial para análises de especificidade entre duas espécies, neste momento apenas o DNA é empregado em tais estudos (GREENSTONE, 2006). As proteínas existem em grande abundância e diversidade nos tecidos animais. Técnicas para a sua detecção e caracterização estão bem estabelecidas e têm sido utilizadas no intuito de discriminar e detectar parasitoides (GREENSTONE, 2006). Ainda de acordo com o mesmo autor, podemos destacar dois tipos de proteínas que podem ser estudadas, enzimas e proteínas. As proteínas estruturais podem ser detectadas por diversos métodos, porém o mais usual é a detecção por imunoenaios, como a serologia. Essa técnica é baseada em reações do tipo antígeno/anticorpo onde os anticorpos são obtidos para a praga que se deseja investigar e os antígenos, obtidos a partir dos vários consumidores da praga.

A maior atratividade da técnica serológica é a sua alta especificidade, permitindo o reconhecimento biológico em nível molecular (RAGSDALE *et al.*, 1981; GREENSTONE & HUNT, 1993; HAGLER *et al.*, 1995; HAGLER & NARANJO, 1997; SYMONDSON *et al.*, 1997; 1999; SUNDERLAND, 1997; HAGLER, 1998; AGUSTI *et al.*, 1999).

A serologia foi utilizada por muitos autores, dos quais se destacam Dempster (1963) que determinou como presa de *Anthocoris* spp (Heteroptera: Anthocoridae), o afídeo *Acyrtosiphon spartii* Koch, 1855 (Hemiptera: Aphididae), Sutton (1970), descobriu os predadores de *Philoscia muscorum* (Scopoli, 1763) (Crustacea: Oniscoidea: Philosciidae). Já Pettersson (1972) estabeleceu a eficiência de predadores de *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae). Outro autor que verificou os predadores de afídeos foi Vickerman & Sunderland (1975) em culturas de cereais. Ashby (1974) testou por meio da serologia artrópodes predadores de *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). Feller *et al.*, (1979) aplicaram técnicas serológicas para descrever relações alimentares em uma comunidade bentônica. Service & Elouard (1980) realizaram a identificação serológica dos predadores de *Simulium damnosum* Theobald (Diptera: Simuliidae) na Costa do Marfim, determinando seus predadores naturais. Turner (1984) utilizou a serologia para determinar a relação da dinâmica das populações de herbívoros de epífitas arbóreas e seus potenciais

predadores. Boreham & Ohiagu (1978) avaliaram pesquisas que utilizaram serologia na determinação das relações entre presa-predador e taxas de predação entre insetos de importância econômica. Boraie *et al.* (2005), analisando agroecossistemas no Egito fizeram testes serológicos como método complementar na análise das relações alimentares entre insetos praga e artrópodes predadores. Outro método utilizado por muitos autores é o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para análises tróficas e determinação de predadores e presas (LOVEI *et al.*, 1985; KAPUGE *et al.*, 1987; SOPP & SUNDERLAND, 1989; SOPP *et al.*, 1992; GREENSTONE & HUNT, 1993; SYMONDSON & LIDDELL, 1993; HAGLER & NARANJO, 1997; HAGLER *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2009).

Na presente pesquisa, o material coletado de predadores foi congelado logo após as coletas, com o intuito de preservar ao máximo as proteínas da presa em seu interior, almejando um resultado mais expressivo nas reações imunológicas. Este procedimento foi também desenvolvido por Corey *et al.* (1998), Harwood *et al.* (2004; 2005) e bem explicado por Cassaro-Silva *et al.* (2001).

1.1 - Justificativa

O entendimento das interações entre predadores e parasitoides pode beneficiar o desenvolvimento de programas de manejo integrado de pragas. Em busca desse entendimento este trabalho procurou estudar a predação do afídeo *A. pisum* parasitado por *A. ervi*, em cultura de alfafa, utilizando-se a serologia como ferramenta desta pesquisa.

2 - OBJETIVO

Estudar as interações entre os coccinelídeos: *Harmonia axyridis*, *Hippodamia convergens*, *Cycloneda sanguinea* e a vespa parasitoide *A. ervi*.

2.1 - Objetivos específicos

- 1 - Produzir antissoro para o parasitoide *Aphidius ervi*.
- 2 - Com o antissoro produzido, determinar o parasitismo em afídeos aparentemente saudáveis.
- 3 - Utilizar a serologia para estimar a taxa de parasitismo observada e a esperada em *A. pisum*.
- 4 - Estimar a predação de parasitoides por coccinelídeos.

3 - HIPÓTESES

3.1 - Produção de antissoro para *Aphidius ervi*.

H₀: A produção de antissoro para *A. ervi* não é possível.

H₁: É possível a produção de antissoro para *A. ervi*.

Se a hipótese H₁ se concretiza, temos:

3.2 - Determinar a ocorrência de *A. ervi* dentro de um pulgão aparentemente saudável.

H₀: Parasitoides não são observados, por meio da serologia, dentro de pulgões aparentemente saudáveis.

H₁: Observam-se parasitoides em pulgões aparentemente saudáveis por meio da serologia.

3.3 - Analisar se, através de antissoro específico, pode-se detectar a presença de parasitoides no conteúdo estomacal de coccinelídeos.

H₀: Não há como detectar.

H₁: Pode-se detectar.

4- METODOLOGIA

Os afídeos, parasitoides e predadores, selecionados para o estudo das associações intraguildda, com o uso da serologia, foram coletados em um campo experimental de alfafa (variedade crioula) na Embrapa Pecuária Sudeste CPPSE, localizada no município de São Carlos, SP, sob coordenadas 21° 57' 42" (S) e 47° 50' 28" (W) e altitude de 860 m.

4.1 - Preparo do antissoro policlonal

Cerca de 2.000 adultos de *Aphidius ervi* emergidos das múmias de afídeos *Acyrtosiphon pisum* coletados durante os anos de 2012, 2013 e 2014, em campo de alfafa, foram utilizados como antígeno para a obtenção de antissoro específico. Posteriormente os parasitoides foram macerados em solução salina a 0,85% e centrifugados a 7000g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e emulsionado com Adjuvante Freund completo, na proporção de 1:1 (v/v), e utilizado como antígeno imunizante (AgAe = Antígeno de *Aphidius ervi*). Para o preparo do antissoro específico imunizou-se um coelho, pesando 3 Kg, com nove injeções de 1,0 ml do AgAe, via linfonódulo, nas pernas traseiras do coelho, observando-se um intervalo de 15 dias entre cada injeção (Oliveira, 1975). Antes da 1ª inoculação do antígeno, foi

recolhida uma amostra de sangue do coelho para a obtenção do soro normal, utilizado como controle nas reações serológicas. Durante o período de imunização foram realizadas vinte e três sangrias, através de pequenas incisões longitudinais na veia marginal da orelha do coelho. O sangue obtido, entre 1 e 10 ml por sangria, permanecia por 2-3h em temperatura ambiente. A seguir, o coágulo formado era descolado das paredes do frasco e mantido em geladeira (10 °C), para em seguida, separar e retirar o plasma sanguíneo contendo o AsAe e avaliar o seu título.

4.2 - Reações serológicas

As reações serológicas foram realizadas por dupla difusão em gel de ágar a 1% (OUCHTERLONY, 1958), com tampão PBS, pH 7,0 (HOFLING, 1975) sobre lâminas de microscopia (3,0 ml da solução de ágar por lâmina de 75mm X 25mm). Nessas reações, quando antígeno e anticorpo se encontram em quantidades equivalentes, interagem e precipitam formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação (COSTA, 2011). As reações serológicas quando realizadas entre o antissoro específico e o próprio antígeno imunizante são chamadas de reações serológicas homólogas; quando essas reações são realizadas entre o antissoro específico e outros antígenos, diferentes do imunizante, por exemplo, os antígenos obtidos da maceração dos diversos predadores coletados no campo são chamados de heterólogas.

As titulações foram realizadas através de reações serológicas entre o antígeno homólogo e as frações diluídas de cada um dos antissoros obtidos. As diluições eram realizadas com solução de NaCl a 0,85%, seguindo-se uma progressão geométrica de razão 2.

As reações heterólogas foram realizadas, inicialmente, utilizando-se como antígeno o macerado de afídeos mumificados pelo parasitoide *A. ervi*, o macerado dos afídeos *A. pisum*, aparentemente saudáveis (Figura 20) para verificar a possibilidade de estarem parasitados, e o macerado de coccinelídeos predadores de *A. pisum*, nesse caso procurando-se detectar com essas reações, as predações intraguilda no campo de alfafa.

H. axyridis foi coletado abundantemente nas formas larval e pupal, e por este motivo estas fases de vida do coccinelídeo foram testadas separadamente.



Figura 19. *Acyrthosiphon pisum* aparentemente saudável. [Fonte: en.wikipedia.org]

4.3 - Testes de alimentação

Antes dos trabalhos de campo, procurou-se avaliar a possibilidade de coccinelídeos predadores rejeitarem os afídeos mumificados. Para tanto foi realizado um teste sem chance de escolha utilizando-se 40 exemplares de *H. convergens*, separados em grupos com quatro predadores e cada conjunto encerrado em um recipiente. Esses predadores eram mantidos em jejum por 48 horas. Após, para cada grupo era oferecido um, dois ou três exemplares do afídeo *A. pisum*, mumificado. Os resultados mostraram que os predadores aceitavam as presas mumificadas (Figura 21). A seguir cada indivíduo de *H. convergens* foi macerado observando-se um intervalo de 0, 24, 48 e 72 horas após ter consumido um ou mais dos afídeos oferecidos.



Figura 20. *Hippodamia convergens* se alimentando de afídeo parasitado por *A. ervi* em folha de alfafa. [Fonte: Iemma, 2015]

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Obtenção dos antissoros

Para a obtenção do antissoro de *Aphidius ervi*, foram realizadas nove inoculações do antígeno no coelho e 24 sangrias, obtendo-se com isso, 23 antissoros e um controle. (Tabela 4).

Tabela 4. Protocolo de inoculações e sangrias realizadas entre os meses de março e agosto de 2014 para obtenção dos antissoros para *A. ervi* (AsAe). Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = AgAe + Adjuvante Freund completo, N° do AS = número do antissoro.

	Data	Antígeno ml.	Sangria ml.	N° do AS
↑↓	18/3/14	1 ml	3 ml	Soro normal
↓	24/3/14		1 ml	AsAe 1
↓	27/3/14		1,4 ml	AsAe 2
↑↓	31/3/14	1 ml	1 ml	AsAe 3
↓	8/4/14		1 ml	AsAe 4
↑↓	14/4/14	1,2 ml	1 ml	AsAe 5
↓	23/4/14		1 ml	AsAe 6
↑↓	28/4/14	0,9 ml	1 ml	AsAe 7
↑↓	12/5/14	1 ml	1 ml	AsAe 8
↑↓	28/5/14	1,2 ml	1 ml	AsAe 9
↑↓	9/6/14	1,2 ml	1 ml	AsAe 10
↓	2/7/14		1 ml	AsAe 11
↑↓	14/7/14	0,8 ml	1,5 ml	AsAe 12
↓	15/7/14		0,6 ml	AsAe 13
↓	16/7/14		1 ml	AsAe 14
↓	17/7/14		0,4 ml	AsAe 15
↑↓	21/7/14	1,4 ml	3 ml	AsAe 16
↓	22/7/14		10 ml	AsAe 17
↓	23/7/14		3 ml	AsAe 18
↓	28/7/14		10 ml	AsAe 19
↓	29/7/14		10 ml	AsAe 20
↓	30/7/14		10 ml	AsAe 21
↓	31/7/14		12 ml	AsAe 22
↓	1/8/14		10 ml	AsAe 23

As primeiras reações positivas foram observadas 9 dias após o início da imunização do coelho. Os antissoros que apresentaram maior titulação foram AsAe 22, seguido por AsAe 23, AsAe 21, AsAe20, AsAe18 e AsAe19. Dentre esses a titulação máxima, 1/16, foi obtida nas reações com o antissoro AsAe 22 tendo sido este o antissoro escolhido para a realização dos trabalhos de campo (Figura 22).

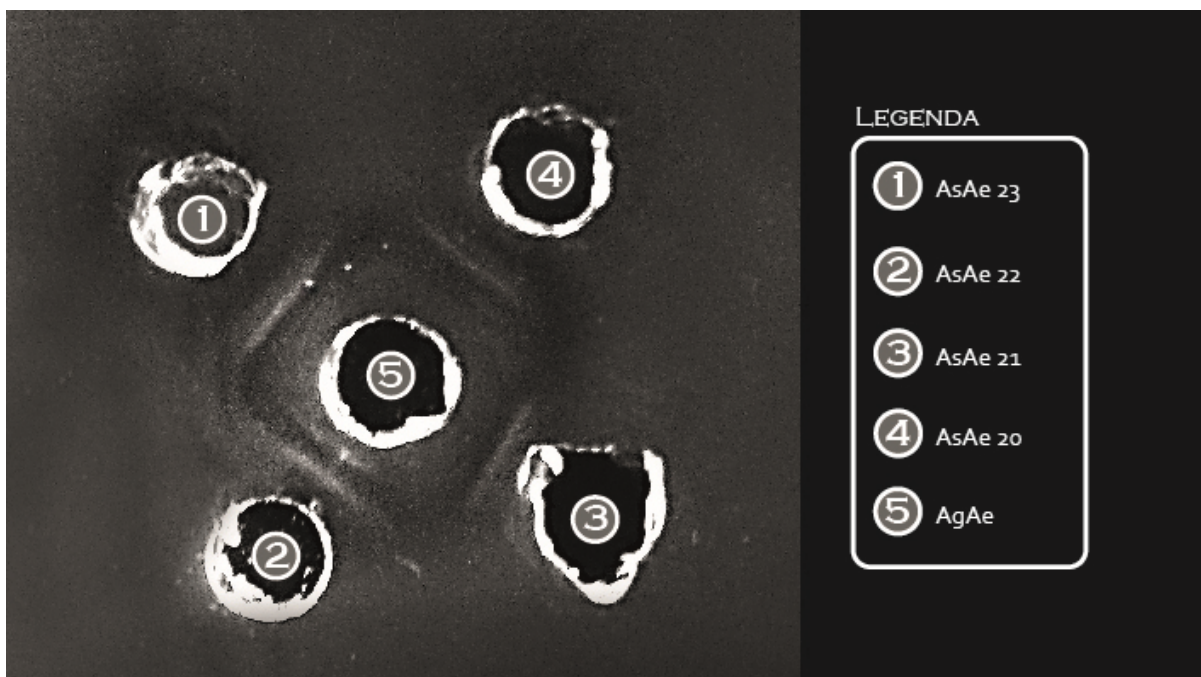


Figura 21. Dupla difusão em ágar mostrando as linhas de precipitação observadas nos testes serológicos entre os antissoros AsAe 23, AsAe 22, AsAe 21, AsAe 20, e o antígeno homólogo AgAe.

Mollet & Armbrust (1978) afirmam que o valor do título do antissoro pode variar de acordo com o poder antigênico da proteína injetada no coelho e pode haver decréscimo de especificidade conforme se aumenta o número de inoculações para a imunização dos animais. Titova (1970) obteve um antissoro contra *Eurigaster integriceps* Put (Heteroptera: Scutelleridae) com um título de 1/10.000 após várias inoculações de antígeno no coelho. Isto porém levou à perda de especificidade do antissoro. Antissoros com diferentes valores de titulação foram obtidos por diferentes autores, sem que isso tivesse limitado o uso da serologia para a determinação de predadores. Sousa-Silva (1985) obteve titulação máxima 1/32, 1/4, 1/32 para três diferentes estágios de desenvolvimento de ovos de *D. flavopicta*. Santos-Neto *et al.*, (2010) conseguiu antissoro com titulação máxima de 1/8 para detecção de predadores de *S. frugiperda*.

5.2 - Testes serológicos com afídeos mumificados e aparentemente saudáveis

Antígenos obtidos pela maceração individual de dezesseis afídeos *A. pisum* parasitados por *A. ervi* e utilizados em reações heterólogas com o antissoro AsAe22 permitiram observar, em todas as reações, pelo menos uma linha de precipitação. Após esta etapa, foram realizados testes com 345 indivíduos *A. pisum* coletados no campo em diferentes meses, todos aparentemente saudáveis. Os resultados desses testes mostraram 10,14% de parasitismo (Tabela 5). A figura 23 exemplifica alguns resultados, das reações serológicas entre o antissoro AsAe22 e o macerado de quatro exemplares do afídeo *A. pisum* aparentemente saudáveis. Nota-se, nos testes com os afídeos 1, 2 e 3, respectivamente AgAp1, AgAp2 e AgAp3, pelo menos uma linha de precipitação, indicando que esses afídeos estavam parasitados.

Tabela 5. Afídeos aparentemente saudáveis, coletados em campo de alfafa e testados serologicamente para a determinação da taxa de parasitismo por *A. ervi*.

Afídeo	Testados	Positivo	Negativo	% de parasitismo
<i>A. pisum</i>	345	35	310	10,14

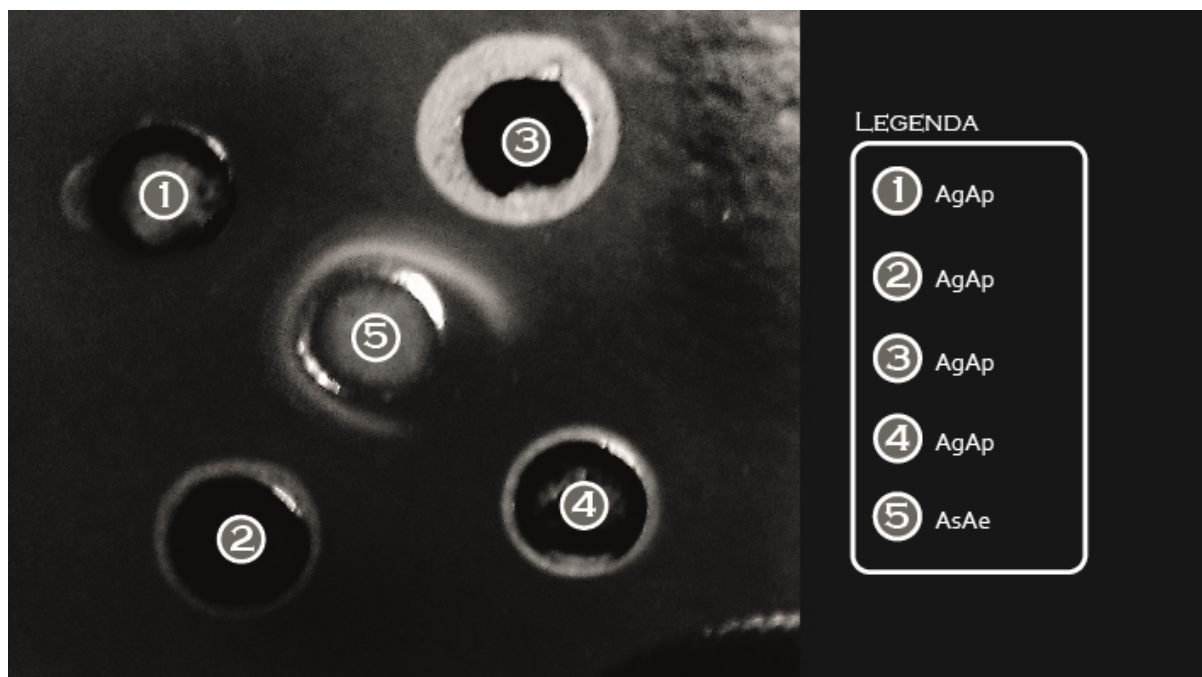


Figura 22. Reações serológicas de dupla difusão em ágar entre o antissoro AsAe 22 e os antígenos AgAp 1, AgAp 2, AgAp 3 e AgAp 4 obtidos pela maceração de quatro exemplares do afídeo *A. pisum*, aparentemente saudáveis mostrando que os exemplares 1, 2 e 3 estavam parasitados por *A. ervi*.

O resultado obtido mostra que é possível identificar um parasitoide dentro de um afídeo, mesmo quando este ainda não mostre qualquer sinal de parasitismo.

Keen *et al.* (2001) utilizando teste ELISA detectaram o parasitismo de pulgões após sete dias do parasitismo. Stuart & Greenstone (1996) utilizando antissoro monoclonal, conseguiram detectar os primeiros instares de um braconídeo (Hymenoptera: Braconidae) em uma larva de Lepidoptera. Kaldeh *et al.*, (2012) mostraram ser possível a identificação de parasitoides *Lysiphlebus fabarum* (Hymenoptera: Braconidae) em *Aphis fabae* (Hemiptera Aphididae) utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica esta também utilizada por Weathersbee *et al.*, (2004) para detecção de *Aphelinus gossypii* Timberlake (Hymenoptera: Aphelinidae) em *T. citricidus*. Persad *et al.*, (2004) desenvolveu um primer espécie-específico para a mesma espécie de afídeo diferenciando duas espécies de parasitoides: *Lysiphlebus testaceipes* e *Lipolexis oregmae*.

Em março de 2013 as observações no campo mostraram um reduzido número de múmias (18 exemplares). Nesse mês os testes serológicos utilizando-se afídeos aparentemente saudáveis, resultaram em 4,53% de parasitismo. Em maio de 2014 o número de múmias visíveis em campo foi de 68 exemplares. Nesse mês os testes serológicos utilizando-se afídeos

aparentemente saudáveis, resultaram em 28,75% de parasitismo (Tabela 6). O parasitismo detectado serologicamente em afídeos aparentemente saudáveis mostra uma variação populacional do parasitoide conforme a época. No presente trabalho essa variação não parece refletir a própria variação populacional do hospedeiro uma vez que para um maior número de afídeos testados em março de 2013 a porcentagem de parasitismo foi menor do que a observada em maio/2014 cujo número de hospedeiros testados foi menor. Provavelmente esses resultados mostrem mais a influência de fatores climáticos e/ou o estado da cultura nos períodos tratados.

Tabela 6. Porcentagem de parasitismo em afídeos aparentemente saudáveis nos meses de março de 2013 e maio de 2014, obtida com o uso da serologia.

Data	Múmias observadas em campo	Testados	Positivo	% de parasitismo
Mar/13	18	265	12	4,53
Mai/14	68	80	23	28,75

Os resultados dos testes serológicos com afídeos aparentemente saudáveis, mostram que avaliar o parasitismo observado no campo, a partir da contagem unicamente de múmias é subestimar a ação controladora de parasitoides. Na tabela 7 podem-se observar os valores de parasitismo observados e os obtidos em testes serológicos nos meses de março de 2013 e maio de 2014.

Tabela 7. Porcentagens de parasitismo observadas por contagem de múmias em campo e aquela obtida analisando-se afídeos aparentemente saudáveis por meio da serologia.

Meses de coleta	(%) Parasitismo obtido através da serologia	(%) Afídeos mumificados observados no campo	(%) Parasitismo total
Mar/13	3,38	4,53	7,91
Mai/14	15,25	28,75	44

Por outro lado, as diferenças entre as porcentagens do parasitismo determinado serologicamente e aquele obtido com a coleta de múmias no campo, pode indicar que pelo menos uma parcela de afídeos parasitados pode ter sofrido predação, indicando a competição pelo mesmo hospedeiro e, nesse caso, com prejuízo para o parasitoide (Tabela 8).

Tabela 8. Diferença entre a porcentagem de parasitismo observada em campo e aquela obtida por meio da serologia.

Meses de coleta	(%) Parasitismo obtido através da serologia	(%) Afídeos mumificados observados no campo	Diferença entre o parasitismo obtido e o observado (%)
Mar/13	4,53	3,38	1,15
Mai/14	28,75	15,25	13,5

5.3 - Teste do antissoro em Coccinelídeos.

Testes serológicos foram feitos com 485 coccinelídeos utilizando-se o antissoro AsAe22 procurando-se evidenciar o possível consumo indireto, por esses predadores, do parasitoide *A. ervi* no interior do afídeo *A. pisum*. *Harmonia axyridis* foi a espécie mais abundante com 270 exemplares testados, seguida de *Hippodamia convergens* com 123 e *Cycloneda sanguinea* com 92 exemplares. Os resultados foram positivos em 52 (10,72%) das reações, sendo 14,44% com *H. axyridis* seguido por *H. convergens* e *C. sanguinea* com 6,5% e 5,43% respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Reações serológicas entre os antígenos obtidos pela maceração dos coccinelídeos *Harmonia axyridis*, *Hippodamia convergens*, *Cycloneda sanguinea*, e o antissoro AsAe22.

Coccinelídeos	Nº de indivíduos testados	Reações positivas	% de resultados positivos
<i>H. axyridis</i>	270	39	14,44
<i>H. convergens</i>	123	8	6,5
<i>C. sanguinea</i>	92	5	5,43
Total	485	52	10,72

Na figura 24 pode-se observar as linhas de precipitação resultantes das reações serológicas entre os antígenos obtidos pela maceração de diferentes espécies de coccinelídeos, *H. axyridis* (AgHax); *H. convergens* (AgHcon), *Cycloneda sanguinea* (AgCs), o afídeo *A. pisum* (AgAp) com o antissoro AsAe22. O resultado dessas reações revela que apenas com *A. pisum* o resultado foi negativo. Provavelmente esse afídeo não estava parasitado.

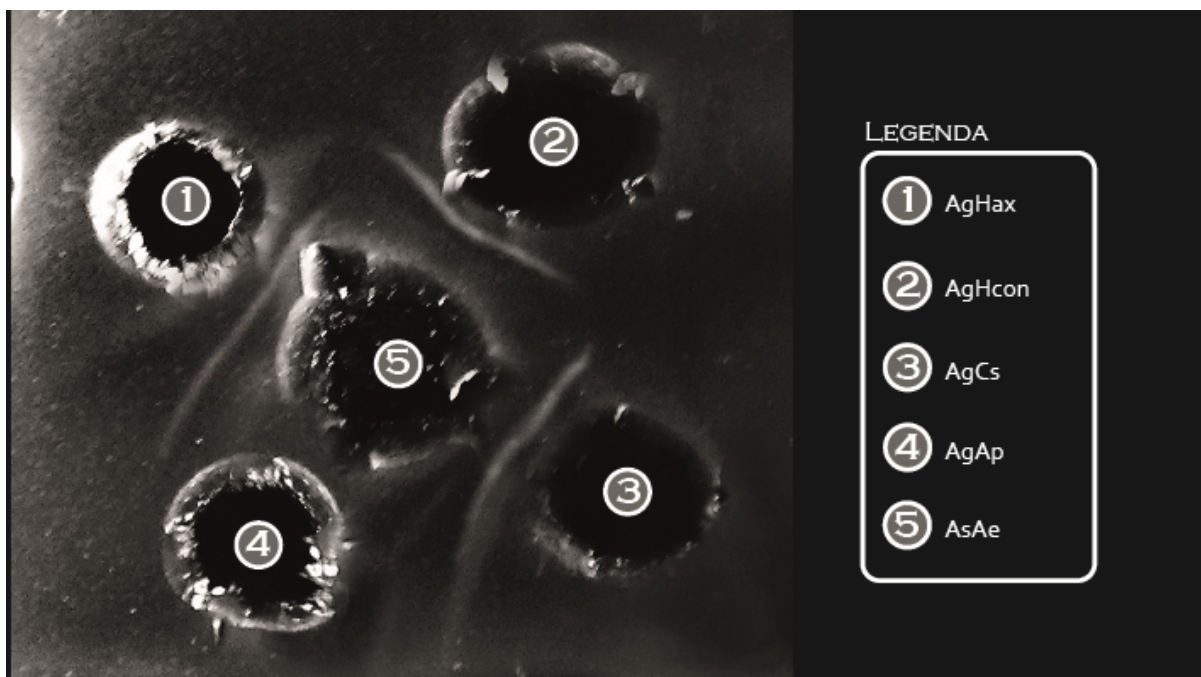


Figura 23. Reações serológicas de dupla difusão em ágar entre três diferentes espécies de coccinelídeos, *H. axyridis*, *H. convergens* e *C. sanguinea*, o afídeo *A. pisum* com o antissoro AsAe22.

Obrycki & Kring (1998) citam que muitos coccinelídeos, entre eles *H. axyridis*, *H. convergens* e *C. sanguinea*, se alimentam de diversos tipos de presas, podendo causar assim uma perturbação do controle biológico. Brown *et al.* (2015) verificaram em sua análise que *H. axyridis* se utiliza de predação intraguildda, alimentando-se de diversas outras espécies de predadores como: *A. decempunctata*, *A. bipunctata* e *E. bateatus*. No presente trabalho, observou-se também predação intraguildda entre as três espécies de coccinelídeos testadas e o parasitoide *A. ervi*.

Rondoni *et al.* (2014b) verificou o IGP entre duas diferentes espécies de coccinelídeos, *C. septempunctata* e *H. variegata* predadores de *Aphis gossypii* Glov. com o maior valor ficando com a primeira espécie. Velasco-Hernández *et al.*, (2013) analisando a interação entre o predador *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) e o parasitoide *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae), descobriram que o primeiro preda o segundo, apesar de preferir ninfas não parasitadas do Hemiptera *Tryaleuroides vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae).

A dieta dos coccinelídeos utilizados no experimento anteriormente à coleta, não foi levada em consideração, porém de acordo com Ingels *et al.*, (2015) isto pode também influenciar a capacidade de predação, sobrevivência, tempo de desenvolvimento e até mesmo a IGP dos espécimes como mostra em seu artigo com *H. axyridis*.

Discussões sobre IGP costumam assumir que as presas têm qualidades nutricionais similares para o predador IG. Bilu & Coll (2009) sugeriram que predadores generalistas não distinguem entre um afídeo saudável e um afídeo parasitado. Estudos mais recentes demonstraram que predadores podem ingerir presas com diferentes qualidades nutricionais. Componentes da mesma guilda tem maior quantidade de nitrogênio em seu corpo, sendo assim, predadores podem preferencialmente se alimentar destes para aumentar a quantidade de nitrogênio absorvido. O mesmo autor afirmou que afídeos parasitados constituíam um alimento inferior para *Cycloneda undecimpunctata* principalmente pelo tempo despendido na alimentação, que aumentava de acordo com o desenvolvimento do parasitoide, e com isso o predador se alimentava de menor quantidade de presas. Porém apesar deste resultado, o autor não distinguiu diferenças na escolha do predador por afídeos saudáveis ou parasitados.

Meisner *et al.*, (2011) encontrou resultados opostos ao anterior ao observar que *H. axyridis* preferia se alimentar de afídeos parasitados por *A. ervi* do que afídeos saudáveis. Mas em contraste, o parasitoide evita locais com traços químicos de *H. axyridis*, ovipositando muito menos em afídeos que estejam nos locais marcados, mitigando com isso os riscos de IGP por mudança comportamental. Este fato pode ter interferido nos resultados das reações serológicas observados no presente trabalho.

Os testes serológicos também foram realizados com larvas e pupas de *H. axyridis* (tabela 10). Das 58 larvas testadas, 12 reagiram positivamente com o antissoro AsAe, compreendendo 20,69% de reações serológicas positivas. A figura 25 mostra algumas dessas reações.

Tabela 10. Formas jovens de *Harmonia axyridis* testados quanto à ocorrência de traços de *Aphidius ervi* em seu conteúdo estomacal.

Coccinelídeos	Testados	Positivo	Negativo	% de resultados positivos
<i>H. axyridis</i> (L)	58	12	46	20,69
<i>H. axyridis</i> (P)	24	0	24	0,00
Total	82	12	70	14,63

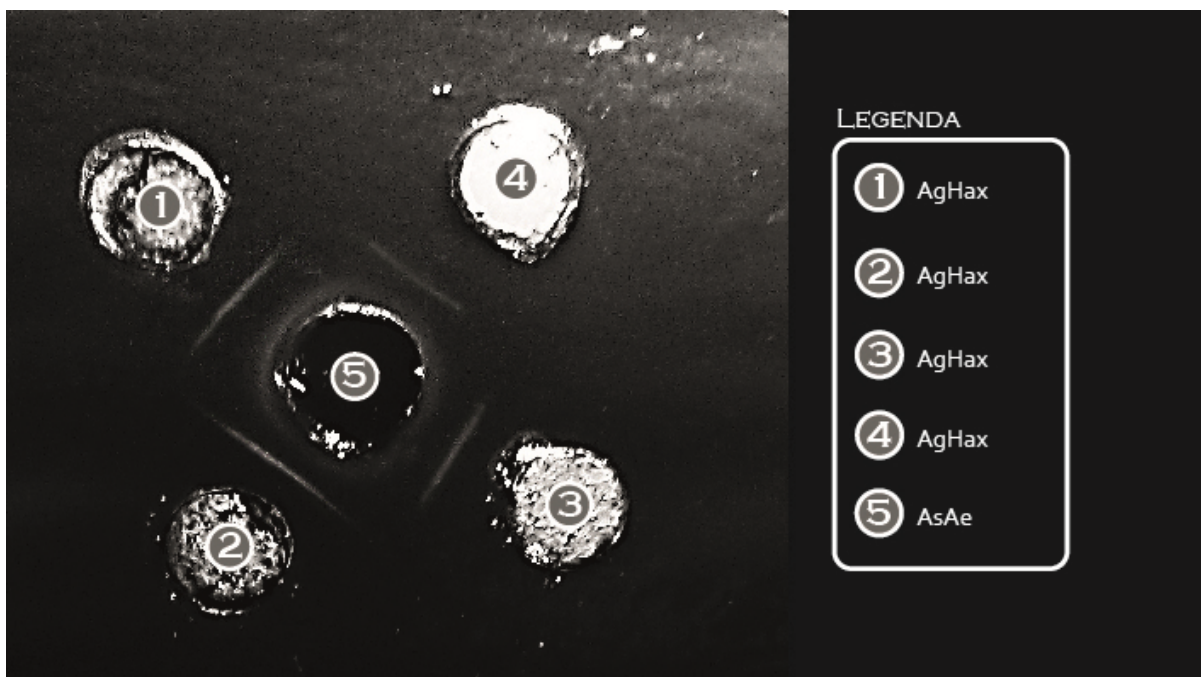


Figura 24. Testes serológicos de dupla difusão em ágar mostrando reações positivas entre o antissoro AsAe e os antígenos obtidos pela maceração de larvas de *Harmonia axyridis* - AgHax.

O resultado verificado admite inferências, como por exemplo: As larvas de coccinelídeos são predadoras mais vorazes do que os adultos, tendo assim atuação maior na IGP. Outro dado a se considerar é o fato que quando os pulgões começaram a aumentar em número, conseqüentemente parasitoides e coccinelídeos também o fizeram, porém, como mostra o estudo de Raymond *et al.*, (2000), parasitoides tendem a evitar locais que contem com a presença de grande quantidade de coccinelídeos, ou seja, a maior incidência de IGP por larvas de coccinelídeos pode ser talvez explicada por este fator; ao aumentar a quantidade de coccinelídeos, os parasitoides evitaram estes locais e a presença do parasitoide na análise estomacal de adultos de coccinelídeos foi menor do que em suas larvas. Outra hipótese plausível é que o material estomacal degrada mais rapidamente em adultos do que em larvas, fato este observado também por Ingels *et al.* (2013), em testes com *H. axyridis*.

Os resultados obtidos com larvas e adultos de coccinelídeos mostram uma predação intraguilda onde os predadores potencialmente podem exercer uma depressão na população de parasitoides. Em seu trabalho, Gardiner & Landis (2006) estudando a influência de *H. axyridis* sobre populações de predadores rivais em laboratório e no campo demonstraram que o mesmo age como um predador intraguilda e pode contribuir para o declínio de espécies predadoras e com isso afetar o controle biológico.

Quanto à porcentagem de IGP geral, considerando adultos e larvas de coccinelídeos se alimentando de afídeos parasitados, vários fatores devem ser considerados:

- Provavelmente o desenvolvimento do parasitoide irá gradualmente consumir os nutrientes do afídeo disponíveis para um predador (MULLINS, 2008), e os já citados possíveis impactos negativos à sobrevivência dos coccinelídeos ao se alimentarem de afídeos parasitados (alimentação subótima), podem advir das ferramentas bioquímicas e fisiológicas usadas pelos parasitoides ainda imaturos para regular seu hospedeiro, com os efeitos dessas ferramentas aumentando com o curso de desenvolvimento do processo de maturação do parasitoide (BECKAGE & GELMAN, 2004).

Para Mullins (2008), talvez esta adequação alterada da dieta subótima seja um mecanismo de defesa indireto do parasitoide que, em condições naturais reduz a competição e previne os coccinelídeos de eliminarem a população local de parasitoides. Este conceito é ainda novo para o estudo da dinâmica da IGP e pode ajudar a explicar o funcionamento de guildas em agroecossistemas.

Os testes com coccinelídeos mostram também que pode não ser vantajoso o emprego de coccinelídeos e parasitoides ao mesmo tempo para controle de pragas, pois como visto na tabela 9, um número expressivo de coccinelídeos se alimentou de afídeos parasitados, apesar dos possíveis efeitos deletérios desta alimentação e com isso interferindo no controle feito pelos parasitoides. Por este motivo, acredita-se que a inserção de parasitoides em ambientes com grande número de insetos praga, tende a ser menos danosa para outras espécies da mesma guilda do que a inserção de coccinelídeos.

5.4 - Testes de alimentação em *Hippodamia convergens*.

Testes de laboratório foram feitos no esforço de medir quanto tempo após a ingestão do afídeo mumificado pode ainda haver uma detecção do material componente do parasitoide dentro do coccinelídeo predador.

Os resultados dos testes de alimentação realizados em laboratório com o predador *H. convergens* foram discrepantes para os diferentes intervalos de tempo após a alimentação do predador e para as diferentes quantidades de afídeos que consumiram (Tabela 10). O coccinelídeo H1 está ilustrado na figura 26.

Tabela 11. Número de linhas de precipitação observadas nos testes serológicos com exemplares de *Hippodamia convergens* alimentados com o afídeo *Acyrtosiphon pisum* e macerados logo após a ingestão (0h), 24h após, 48h após e 72h após o consumo. Os traços (--) indicam ausência de reação. O sinal + indica um valor acima do mostrado.

Número de <i>A. pisum</i> parasitados consumidos por cada <i>H. convergens</i> /tempo após o consumo												
	1				2				3			
	0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h	0h	24h	48h	72h
H1	1	1	--	--	2	2	--	--	4+	3	3	--
H2	2	1	1	--	2	1	1	--	3	1	1	--
H3	1	1	--	--	1	1	1	--	2	2	1	1
H4	1	--	--	--	2	--	--	--	4+	4+	3	--

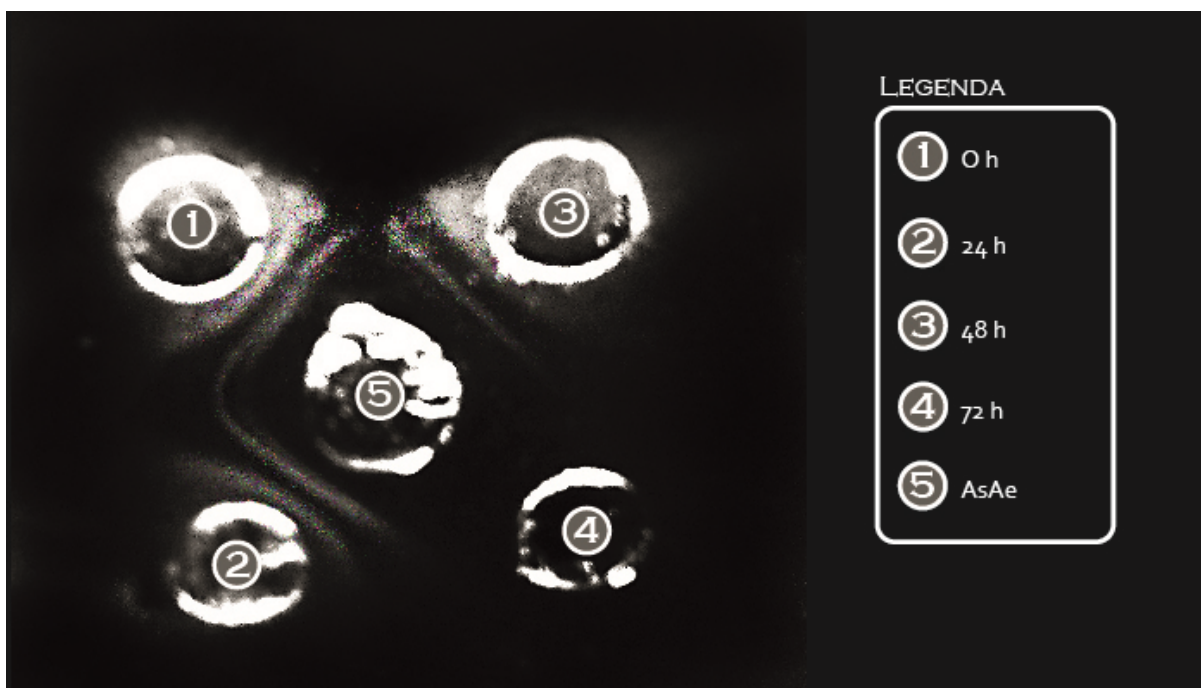


Figura 25. Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de alimentação do coccinelídeo H1. Onde 0h, 24h, 48h e 72h é o tempo decorrido da alimentação e AsAe22 é o Antissoro feito a partir de *A. ervi*.

Após 72 horas da alimentação, somente em um dos testes onde houve consumo de três afídeos houve linhas de precipitação (duas linhas em um dos testes e uma linha em outro). Com isso, o tempo máximo em que houve observação de resultados positivos foi de 72 horas.

Levando em conta este resultado, o tempo para a realização do teste após o consumo da presa pelo predador e o título do antissoro são fatores que devem ser levados em conta quando se emprega a serologia nos estudos de relações alimentares. Luck *et al.* (1988)

observa que a taxa de metabolismo e a sensibilidade do antissoro também devem ser considerados, assim como a temperatura a qual estão submetidos os predadores (MCIVER, 1981).

Ingels *et al.* (2013) observaram como tempo hábil, de oito a 52 horas para detecção do material estomacal de *H. axyridis*.

Trabalhando com Dermaptera, Dempster (1960) ainda detectou *Phytodecta olivacea* até 120 horas após ter sido ingerido, na forma de larva, por seu predador, sendo que, quando ingerida na fase de ovo ainda poderia ser detectada até 30 horas após o consumo.

Ohiagu e Boreham (1978) utilizando a serologia para estudar a predação de *A. pisum* por *Coccinella septempunctata* observaram resultados positivos até 48 horas após a ingestão da presa pelo predador.

Sousa-Silva (1980) observou reações serológicas positivas com percevejos e aranhas que se alimentaram de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) sendo que os resultados foram positivos até 96 horas depois da alimentação para percevejos e apenas 24 horas após a ingestão para aranhas. Diferentemente de McIver (1981) que notou resultados positivos em aranhas até mesmo 150 horas após a ingestão e este grande espaço de tempo pode ser devido ao baixo metabolismo de muitos dos Chelicerata. Quinlan *et al.*, (1993) encontraram traços das presas de escorpiões, até 32 dias após sua ingestão.

Diferindo dos anteriores, Cassaro-Silva *et al.* (2001) só conseguiram detectar traços da presa em aranhas nos testes realizados logo após o consumo. Leathwick e Winterbourn (1984) determinando os predadores de *A. pisum* e *A. kondoi* em cultura de alfafa na Nova Zelândia observaram resultados positivos apenas até 6 horas após a ingestão dos pulgões. Onyeka (1983) definindo os principais predadores de *Culex pipiens* L. e *Culex torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) percebeu reações positivas até no máximo 24 horas após o consumo.

Hagler & Naranjo, (1997) utilizando o método ELISA, notaram que predadores menores mantêm traços de suas presas por mais tempo que predadores maiores e que o teste ELISA decresce em qualidade de acordo com o aumento de temperatura. Explicando também o porquê das detecções em períodos apenas curtos de alguns trabalhos, Lovei *et al.*, (1985) realizou um estudo envolvendo jejum em larvas de *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae) e sua taxa de digestão e descobriu que a taxa de declínio de material reativo serologicamente parece ser logarítmica.

A pesquisa atual deparou-se com um limite já descrito por Sheppard & Harwood, (2005), que afirma que não se consegue precisar a quantidade de material que foi ingerida. No

caso específico da atual pesquisa, um coccinelídeo pode ter se alimentado de mais de um pulgão parasitado, porém o resultado mostrado pelo experimento foi o mesmo para todos que acusaram resultado positivo. Este limite foi enfrentado até mesmo por autores que utilizaram técnicas como o PCR quantitativo (IVES *et al.*, 1993; LUNDGREN *et al.*, 2009). Isto se deve principalmente ao tamanho da presa e taxa de digestão da mesma que podem variar grandemente. Dessa maneira, fica difícil estimar o valor ecológico de interações intraguilda como essas, pois não podemos comparar a quantidade predada por IGP relacionando-os a presas extraguilda. (GAGNON *et al.*, 2011).

6. CONCLUSÕES

- Foi possível a produção de antissoro para *A. ervi*, nove dias após as inoculações, à partir de indivíduos adultos.
- Os testes serológicos possibilitaram a detecção de parasitoides em pulgões aparentemente saudáveis.
- Os testes serológicos realizados entre antígenos obtidos pela maceração de diferentes espécies de coccinélídeos mostraram que esses predadores competem com o parasitoide *A. ervi* pelo mesmo recurso alimentar atuando em predação intraguilddia e essa competição deve ser levada em conta em Programas de Controle Biológico com o emprego desses controladores.
- Os testes serológicos realizados entre o antissoro AsAe e os afídeos aparentemente saudáveis coletados em alfafa mostraram que o parasitismo observado a partir da contagem de múmias em campo não reflete a total ação controladora dos parasitoides.

7. TESTE DE HIPÓTESES

Ao final deste estudo, todas as hipóteses H_0 foram rejeitadas.

Hipótese 4.1

A partir de testes serológicos foi possível a produção de antissoro para *A. ervi*.

Hipótese 4.2

Os parasitoides puderam ser mensurados, por meio da serologia, dentro de pulgões aparentemente saudáveis.

Hipótese 4.3

Ao analisar o conteúdo estomacal de coccinelídeos através de testes serológicos, pôde-se detectar *A. ervi*.

FECHAMENTO DA TESE

Os dois capítulos apresentados nesta tese permitiram a obtenção dos seguintes itens:
Conclusões finais do trabalho e Propostas para futuros estudos.

CONCLUSÕES FINAIS DO TRABALHO

- A pluviosidade ao influenciar as populações de afídeos, pode ter efeitos diretos na interação de predação intraguilha entre coccinelídeos e parasitoides.
- Os testes serológicos possibilitaram a observação de predação intraguilha entre três coccinelídeos e *A. ervi* e esta interação deve ser considerada em programas de manejo integrado.
- As análises das relações tritróficas realizadas no presente trabalho permitiram avaliar que o controle do afídeo *A. pisum* por *A. ervi* é subestimado quando esta população é avaliada apenas por contagem das suas múmias em campo.
- Os testes de laboratório realizados alimentando-se os predadores com parasitoides permitiram determinar o tempo máximo para a detecção da presa, que foi de três dias. Desta forma os resultados serológicos positivos observados no presente trabalho resultaram de atos predatórios neste intervalo de tempo.
- Provavelmente o número de afídeos parasitados consumidos pelos coccinelídeos é maior do que o avaliado no presente trabalho, já que o consumo de mais de um afídeo foi sempre contado como apenas um, uma vez que o teste serológico não é quantitativo.

PROPOSTAS PARA FUTUROS ESTUDOS

Análise de sazonalidade e fatores relacionados para todos os predadores, parasitoides e afídeos ocorrentes em diferentes campos de alfafa, correlacionando-os aos dados obtidos.

Estudos serológicos envolvendo diferentes parasitoides e coccinélídeos em outras culturas para aumento do conhecimento deste novo campo de estudos.

Medir a taxa observada e a taxa real de parasitismo em campos de alfafa objetivando inferir se é vantajosa a inserção de parasitoides e coccinélídeos juntos para controle biológico.

Testar diversos outros predadores quanto à possibilidade de predação intraguilda na alfafa e em outras culturas utilizando a técnica serológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, A. P. S. Insetos pragas da alfafa. 2008. *In: MITTELMANN, A.; LEDO, F. J. S.; GOMES, J. F. Tecnologias para produção de alfafa no Rio Grande do Sul.* EMBRAPA – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas RS/ Juiz de Fora MG, p. 18-33.

AGUSTI, N; ARAMBURU, J; GABARRA. R. Immunological detection of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ingested by heteropteran predators: time-related decay and effect of meal size. **Annals of the Entomological Society of America** 92:56–62. 1999.

ALEKSEEV, V. N., Family Megaspilidae (Megaspilids). *In: G. S. Medvedev (ed.) 1987, Keys to the Insects of the European Part of the USSR. Vol. 3 Hymenoptera, Pt. 2.* Akad. Nauk., Zool. Inst., Leningrad, SSSR. (trans. fr. Russian, Amerind. Publ. Co., Pvt. Ltd., New Delhi). 1341 p. 1978/1987.

ALMEIDA, L. M; RIBEIRO COSTA, C. S. **Coleópteros predadores** (Coccinellidae). *In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. (Ed.). Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas.* Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.931-968. 2009.

ARAGON. J. A. Manejo integrado de plagas *In: Primeiras jornadas de producción de semilla de alfalfa.* 4 - fi de Diciembre, INTA - Centro Regional de Cuyo. **Jornadas** 2: 35 - 52. 1990.

ARIM, M; MARQUET. P. A. Intraguild predation: a widespread interaction related to species biology. **Ecol Lett.** 7: 557–564. 2004.

ASHBY, J. W. A Study of Arthropod Predation of *Pieris rapae* L. using Serological and Exclusion Techniques. **Journal of Applied Ecology** 11 (2): 419- 425. 1974.

BECKAGE, N. E; GELMAN D. B. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically-based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology.** 49:299–330. 2004.

BERBERET, R. C.; ARNOLD, D. C.; SOTERES, K. M. Geographical occurrence of *Acyrtosiphon kondoi* Shinji in Oklahoma and its seasonal incidence in relation to *Acyrtosiphon pisum* (Harris), and *Therioaphis maculata* (Buckton) (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 76, n. 5, p. 1064-1068, 1983.

BERRYMAN, A. A. The origins and evolution of predator–prey theory. **Ecology**. 73: 1530–1535. 1992.

BILU, E; COLL, M. Parasitized aphids are inferior prey for a coccinellid predator: implications for intraguild predation. **Environmental Entomology**. 38(1): 153-8. 2009.

BILU, E; HOPPER, K. R; COLL, M. Host choice by *Aphidius colemani*: effects of plants, plant–aphid combinations and the presence of intra-guild predators. **Ecological Entomology**. 31, 331–336. 2006.

BLACKMAN, R. L; EASTOP, V. F. Aphids on the world's crops: an identification guide. New York: **John Wiley & Sons**, 466 p. 1984.

BOOTH, R.G; COX, M.L; MADGE. B. I. I. E. Guides to insects of importance to man: 3. Coleoptera. International Institute of Entomology, The Natural History Museum, London. 203p. 1990.

BORAEI, H. A; YOUSSEF, A. E; EL-KADY, E. M; FARAG. A. A. **Serological Studies on the Relationship between Some Egyptian Clover Insect Pests and Their Predators**. In: The Third International Conference on IPM Role in Integrated Crop management and Impacts on Environment and Agricultural Products. 26-29 November 2005, Giza, Egypt. 2005.

BOREHAM, P. F. L; OHIAGU. C. E. The use of serology in evaluating invertebrate predator-prey relationships: a review. **Bulletin of Entomological Research** 68: 171–194. 1978.

BRODEUR, J; ROSENHEIM. J. A. Intraguild interactions in aphid parasitoids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 97:93–108. 2000.

BRODEUR, J; VET, L.E.M. Relationships between parasitoid host range and host defense: a comparative study of egg encapsulation in two related parasitoid species. **Physiological Entomology**. 20:7-12. 1995.

BROWN, P. M. J; INGELS, B; WHEATLEY, A; RHULE, E. L; CLERCQ, P. D; LEEUWEN, T, V; THOMAS, A. Intraguild predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on native insects in Europe: molecular detection from field samples. **Entomological Science**. 18, 130–133. 2015.

BRYMAN, A; CRAMER, D; **Análise quantitativa dos dados para os cientistas sociais**. Routled, Chapman & Hall, Incorporated, 2003.

CANO, V. A. S; MARTINEZ, F. L; SAVAL, J. M. M. Parasitoides no afidiinos de pulgões (Chalcidoidea: Aphelinidae) e hiperparasitoides de las superfamilias Chalcidoidea, Ceraphronoidea e Cynipoidea (Hymenoptera: Apocrita: Parasitica) en la provincia de Valencia. **Boln. Asoc. esp. Ent**; 22 (1-2): p. 99-113. 1998.

CARVALHO, A. R; BUENO, V. H. P; MENDES, S; Influência de fatores climáticos e do corte na flutuação populacional de pulgões (Homoptera: Aphididae) na cultura de alfafa (*Medicago sativa* L.), em Lavras, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31. n.5, p. 317-327, 1996.

CARVALHO, F. D. **Influência de fatores ambientais e aspectos biológicos de *Hippodamia convergens* Guérin-Meneville, 1842 (Coleoptera: Coccinellidae) alimentada com *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae)**. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CASSARO-SILVA, M; SERRÃO, J. E; SOUSA-SILVA, C. R; MARQUESPACHECO, J. Identificação de predadores de *Orphulella punctata* (de Geer) (Orthoptera: Acrididae) através de serologia. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.18, n.1, p. 75-79. 2001.

COLFER R. G; ROSENHEIM J. A. Intraguild predation by coccinellid beetles on an aphid parasitoid, *Lysiphlebus testaceipes*. **Proc. Beltwide Cotton Conf.** 2:1033–36. 1995.

COLFER R. G; ROSENHEIM J. A. Predation on immature parasitoids and its impact on aphid suppression. **Oecologia** 126:292-304. 2001.

COREY, D; KAMBHAMPATI, S; WILDE, G. E. Electrophoretic analysis of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) feeding habits in field corn. **Journal of the Kansas Entomological Society** 71: 11–17. 1998.

COSTA, F. M. **Análise comparativa da predação de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) e *Aphis spiraecola* (Patch) (Hemiptera: Aphididae) por artrópodes, em cultura de citrus, através de serologia.** Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. UFSCar. 76p. 2011.

CUNHA, S. B. Z. **Estudos bioecológicos dos afídeos da alfafa.** Dissertação (Mestrado), UFSCar, São Carlos, 2013. 87p.

DEMPSTER, J. P. A quantitative study of the predators on the eggs and larvae of the broom beetle *Phytodecta olivaceae* Forster, using the precipitation test. **Journal of Animal Ecology** v. 29, p. 149-167. 1960.

DEMPSTER, J. P. The natural prey of three species of *Anthocoris* (Heteroptera: Anthocoridae) living on broom (*Sarothamnus scoparius* L.). **Entomologia Experimentalis et Applicata** 7: 149–154. 1963.

DESSART, P. 1972. **Révision des espèces européennes du genre *Dendrocerus* Ratzeburg. 1852** (Hymenoptera, Ceraphronoidea). *Memoirs de la société Royale Belged'Entomologie.* 32: 1-310.

DESSART, P. 1973. ***Dendrocerus propodialis* sp. n. (Hymenoptera, Ceraphronoidea) parasite de *Chrysopamadestes* Banks (Neuroptera, Chrysopidae) en Inde.** *Bulletin et Annals de la Société Royale d'Entomologie Belgique,* 109: 269-276.

EDWARDS, O. R; HOY, M. A. Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Biological Control**. 3, 243–257. 1993.

EMBRAPA. 2015. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em:<<http://www.cppse.embrapa.br>>. Acesso em: 16.02.2016.

FELLER, R. J., TAGHON, G. L., GALLAGHER, E. D., JUMARS, P. A. Immunological methods for food web analysis in a soft-bottom benthic community. **Mar. Biol.** 54: 61-74. 1979.

FERGUSON, K. I, STILING, P. Non-additive effects of multiple natural enemies on aphid populations. **Oecologia**. 108:375–79. 1996.

FERGUSON, N. M. D. **A revision of the british species of *Dendrocerus* Ratzeburg (Hymenoptera, Ceraphronoidea) with a review of their biology as aphid hyperparasites**. Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology) 41: 255-314. 1980.

FERRAGINE, M. D. C. **Determinantes morfofisiológicos de produtividade e persistência de genótipos de alfafa sob pastejo**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, 130p. 2003.

FERRAN, A.; EL-ARNAOUTY, S. A.; BEYSSAT-ARNAOUTY, V.; GALAL, H. Introduction and release of the coccinellid *Harmonia axyridis* Pallas for controlling *Aphis craccivora* Koch on faba beans in Egypt. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.10, p.129-136, 2000.

FERREIRA, R. P; BOTREL, M. A; RUGGIERI, A. C; PEREIRA, A. V; COELHO, A. D. F; LÉDO, F. J. S; CRUZ, C. D. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de alfafa em relação a diferentes épocas de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 265-269, jan./fev. 2004.

FRAZER, B. D. **Coccinellidae**. In *Aphids—Their Biology, Natural Enemies and Control*, ed. AK Minks, P Harrewijn, Vol. B, pp. 231–47. New York; Amsterdam: Elsevier. 364 pp. 1988.

FREITAS, J. M. S; CLERY-SANTOS, M. P; PÉREZ-MALUF, R. Abundância de himenópteros parasitoides em diferentes perfis de paisagens. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil. p. 1-2, 2007.

GAGNON, A. E; HEIMPEL, G. E; BRODEUR, J. The ubiquity of intraguild predation among predatory arthropods. **PLoS ONE**. 6: 1–7. 2011.

GARCIA, M. A. **Ecologia nutricional de parasitóides e predadores terrestres**. p. 289-311, 1991. In: PANIZZI, A. R; PARRA, J. R. P. (eds). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole.

GARDINER, M. M; LANDIS, D. A. Impact of intraguild predation by adult *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) biological control in cage studies. *Biological Control*. 40. 386–395. 2006.

GASSEN, D. N. **Parasitas, patógenos e predadores de insetos associados à cultura de trigo**. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPQ, Circ. Téc. 1, 86p. 1986.

GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology**. Princeton: Princeton University Press, 1994. 437p.

GORDON, R. D. The Coccinellidae (Coleoptera) of America North of México. *Journal of New York Entomological Society*, 93: 1-912. 1985.

GRASSWITZ, T. REESE, R. B. D. Biology and host selection behaviour of the aphid hyperparasitoid *Alloxysta victrix* in association with the primary parasitoid *Aphidius colemani* and the host aphid *Myzus persicae*. **Biocontrol**. 43:261-271. 1998.

GRAVENA, S. Ocorrência de parasitismo em *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus 1753), no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.7, n.1, p.69-70, 1978.

GREENSTONE, M. H; HUNT. J. H. Determination of prey antigen half-life in *Polistes metricus* using a monoclonal antibody-based immunodot assay. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 68:1 -7. 1993.

GREENSTONE, M. H. Molecular methods for assessing insect parasitism. **Bulletin of Entomological Research**, 96, 1–13. 2006.

GREENSTONE, M. H; HUNT. J. H. Determination of prey antigen half-life in *Polistes metricus* using a monoclonal antibody-based immunodot assay. **Entomol. Exp. App.** 68:1-7. 1993.

GRIMM, M. Learning to live with the spotted alfalfa aphid. **Journal of Agriculture**, Western Australia 20(3), 82-84. 1972.

HAGEN, K. S; VAN DEN BOSCH. R. Impact of pathogens parasites, and predators on aphids. **Ann. Rev. Entomol.** 13:325-384. 1968.

HAGLER, A. N; MENDONÇA-HAGLER, L. C; ROSA, C. A; MORAIS, P. B. Yeasts an example of microbial diversity *In*: Esteves, F.S. (Ed.), Brazilian ecosystems. **Oecologia Brasiliensis**: Estrutura, Funcionamento e Manejo de Ecossistemas Brasileiros. 1, 225-244. 1995.

HAGLER, J. R. NARANJO, S. E. Measuring the Sensitivity of an Indirect Predator Gut Content ELISA: Detectability of Prey Remains in Relation to Predator Species, Temperature, Time, and Meal Size. **Biological Control** 9:112–119. 1997.

HAGLER, J. R.; NARANJO, S. E.; ERICKSON, M. L.; MACHTLEY, S. A; WRIGHT, & S. F. Immunological Examinations of Species Variability in Predator Gut Content Assays: Effect

of Predator: Prey Protein Ratio on Immunoassay Sensitivity. **Biological Control** **9** (2): 120 - 128. 1997.

HAGLER, J. R. Variation in the efficacy of several predator gut content immunoassays. **Biol. Control** **12**, 25–32. 1998.

HAMMER, O; HARPER, D. A. T; IAN, P. D. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Version. 1.37. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 24.08.2015. 2001.

HANSON, C. H. & BARNES, D. K. **Alfalfa**. pp. 136-147 in HEATH, M. E., METCALF, D. S. & BARNES, R. F. (Eds) Forages, the science of grassland agriculture. 3rd ed. 755 pp. The Iowa State University press/Ames, Iowa, USA. 1988.

HANSON, P. GAULD, I. D. **The Hymenoptera of Costa Rica**. London Oxford University Press, 893p. 1995.

HARWOOD, J. D; SUNDERLAND, K. D; SYMONDSON. W. O. C. Prey selection by linyphiid spiders: molecular tracking of the effects of alternative prey on rates of aphid consumption in the field. **Molecular Ecology** **13**: 3549–3560. 2004.

HARWOOD, J. D; SUNDERLAND, K. D; SYMONDSON. W. O. C. A quantitative assessment using monoclonal antibodies of the potential of the Tetragnathids spider *Pachygnatha degeeri* to control aphids. **Bulletin of Entomological Research** **95**: 161–167. 2005.

HASSELL, M. P. Foraging strategies, population models and biological control: a case study. **Journal of Animal Ecology**. **49**: 603–628. 1980.

HASSELL, M. P; MAY. R. M. Generalist and specialist natural enemies in insect predator–prey interactions. **Journal of Animal Ecology**. **55**: 923–940. 1986.

HATTINGH, V; SAMWAYS, M. J. Physiological and behavioral characteristics of *Chilocorus* spp. (Coleoptera: Coccinellidae) in the laboratory relative to effectiveness in the field as biocontrol agents. **J. Econ. Entomol.** 87:31–38. 1994.

HE, X. Z; WANG, Q. TEULON, D. A. J. The effect of parasitism by *Aphidius ervi* on development and reproduction of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **New Zealand Plant Protection** 58: 202-207. 2005.

HEINZE, K. M; BRAZZLE J. R; PICKETT, C. H; NATWICK, E. T; NELSON, J. M; PARRELLA, M. P. *Delphastus pusillus* as a potential biological control agent for sweetpotato (silverleaf) whitefly. **Calif. Agric.** 48: 35-40. 1994.

HIJANO, E. H. **Alfafa, protección de la pastura**. Manfredi : Instituto Nacional de Tecnología de Alimentos-Estación Experimental Agropecuaria, 1993. 112p.

HODEK, I. **Biology of Coccinellidae**. Prague, Academic Sci., 260p. 1973.

HOELMER K. A; OSBORNE, L. S; YOKOMI, R. K. Interactions of the whitefly predator *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitized sweet potato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Environ. Entomol.** 23:136-139. 1993.

HOFLING, J. F. Reações serológicas com antígenos presentes em sementes de *Coffee arabica* L. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia. UNICAMP. 45p. 1975.

HUGHES, R. D. Quantitative evaluation of natural enemy effectiveness. **J. Appl. Ecol.** 10:321–51. 1973.

INGELS, B; AEBI, A; HAUTIER, L; VAN LEEUWEN, T; CLERCQ, P. D. Molecular analysis of the gut contents of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) as a method for detecting intra-guild predation by this species on aphidophagous predators other than coccinellids. **Eur. J. Entomol.** 110 (4): 567–576, 2013.

INGELS, B; HASSEL, P. V; LEEUWEN, T. V; CLERCQ, P. D. Feeding History Affects Intraguild Interactions between *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae). **PLoS ONE**. 2015.

IVES, A. R; KAREIVA, P; PERRY, R. Response of a predator to variation in prey density at 3 hierarchical scales - Lady beetles feeding on aphids. **Ecology**. 74: 1929–1938. 1993.

JOHNSON, N. F; MUSETTI, L. **Catalog of systematic literature of the superfamily Ceraphronoidea Hymenoptera**. *Contributions of the American Entomological Institute* 33: 1-149. 2004.

KALDEH, S. R; HOSSEINI, R. HAJIZADEH, J. SOHANI, M. M. Molecular Identification and Detection of *Lysiphlebus fabarum* (Hym.: Braconidae): A Key Parasitoid of Aphids, by Using Polymerase Chain Reaction. **J. Agr. Sci. Tech**. Vol. 14: 1453-1463. 2012.

KANUCK, M. J. D. SULLIVAN, J. Ovipositional behavior and larval development of *Aphidencyrthus aphidivorus* (Hymenoptera: Encyrtidae), an aphid hyperparasitoid. **Journal of the New York Entomological Society** 100:527-532. 1992.

KAPUGE, S. H; DANTHANARAYANA, W; HOOGENRAAD. N. Immunological investigation of prey-predator relationships for *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). **Bulletin of Entomological Research** 77: 247-254. 1987.

KEEN, D. P; KEEN, J. E; HE, Y; JONES, C. J. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the gregarious hymenopteran parasitoid *Muscidifurax raptorellus* in house fly pupae. **Biological Control**. 21, 140–151. 2001.

KNAAK, N.; AZAMBUJA, A. O.; LUCHO, A. P. R.; BERLITZ, D. L.; FIUZA, L. M. Interações de *Bacillus thuringiensis* e o controle de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 48-53, 2009.

KOCH, R. L.; VENETTE, R. C.; HUTCHISON, W. D. Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Western hemisphere: implications for South America. **Neotropical Entomology**, v.35, p.421-434, 2006.

LANDRY, B. S; DEXTRAZE, L; BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. **Genome**. 36, 580–587. 1993.

LARA, F. M; DE BORTOLI, S. A; OLIVEIRA, E. A. Flutuações populacionais de alguns insetos associados ao *Citrus* sp. e suas correlações com fatores meteorológicos. **Científica**, v.5, n.2, p.134-143, 1977.

LAZZARI, S. M; CARVALHO, R. C; FURIATTI, R. S; MELLO, M. E. The spotted alfalfa aphid, *Therioaphis trifolii* (Monell) f. *maculata* in Brazil: First record. **An. Soc. Entomol. Brasil**. 25: 153-155. 1996.

LEATHWICK, D. M; WINTERBOURN, M. J. Arthropod predation on aphids in a lucerne crop. **New Zealand Entomologist** 8: 75–80. 1984.

LEBUSA, M. M. **Suitability of greenbugs (*Schizaphis graminum*) parasitized by *Lysiphlebus testaceipes* as a food source for predatory Coccinellidae: *Coccinella septempunctata* and *Hippodamia convergens***. M. S. Thesis. Oklahoma State University, Stillwater. 2004.

LECLANT, F; ALLIOT, B; SIGNORET, P. A. Transmission et épidémiologie de la maladie a énéations de la Luzerne (LEV). Premiers résultats. **Ann. Phytopathol**. 5(4): 441-445. 1973.

LIMA, J. S; PINTO, O. R. O; HONORATO, T. B; MELO, J. G. M; PINTO, C. M. **Interações tritróficas nos agrossistemas**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 9, nº 16, p. 1347. 2013.

LINS JÚNIOR, J. C. BUENO, V. H. P; SIDNEY, L. A; SILVA, D. B; SAMPAIO, M. V; PEREIRA, J. M; NOMELINI, Q. S. S; VAN LENTEREN, J.C. Cold storage affects mortality, body mass, lifespan, reproduction and flight capacity of *Praon volucre* (Hymenoptera: Braconidae). **European Journal of Entomology**, Branisovska, 2013.

_____. *Praon volucre* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae), a natural enemy of *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae): life table and intrinsic rate of population increase. **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 108, n. 4, p. 575-580, 2011.

LÖVEI, G. L; MONOSTORI, E; ISTVÁN A. Digestion rate in relation to starvation in the larva of a carabid predator, *Poecilus cupreus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 37 (2): 123-127. 1985.

LUCAS, E; ROSENHEIM, J. A. Influence of extraguild prey density on intraguild predation by heteropteran predators: A review of the evidence and a case of study. **Biol Control**. 59: 61–67. 2011.

LUCK, R. F; SHEPARD, B. M; KENMORE, P. E. Experimental methods for evaluating arthropod natural enemies. **Annual Review Entomology**. v.33, p.367 - 91. 1988.

LUNDGREN, J. G; ELLSBURY, M. E; PRISCHMANN, D. A. Analysis of the predator community of a subterranean herbivorous insect based on polymerase chain reaction. **Ecol Appl**. 19: 2157–2166. 2009.

MCIVER, J. D. An examination of the utility of the precipitin test for evaluation of arthropod predator-prey relationships. **The Canadian Entomologist**. v. 113, n.3, p. 213-222. 1981.

MEISNER, M; HARMON, J. P; HARVEY, C.T; IVES, A. R. Intraguild predation on the parasitoid *Aphidius ervi* by the generalist predator *Harmonia axyridis*: the threat and its avoidance. **Entomol Exp Appl**. 138: 193–201. 2011.

MENDES, S.; CERVIÑO, M. N.; BUENO, V. H. P.; AUAD, A. M. Diversidade de pulgões e de seus parasitoides e predadores na cultura da alfafa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.7, p.1305-1310, jul. 2000.

MESSENGER, P. S. The influence of rhythmically fluctuating temperatures on the development and reproduction of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis maculata*. **Journal of Economic Entomology**, v.57, n.1, p.71-76. 1964.

METCALF, R.L. METCALF. E. R. **Plant kairomones in insect ecology and control**. New York, Chapman and Hall, 168p. 1992.

MINKS, A. K; HARREWIJN, P. **Aphids: their biology, natural enemies and control**. World Crop Pest, v.2B, 364p. 1988.

MOLLET, J. A; ARMBRUST, J. Age specific serological identification of adult stages of alfalfa weevil, *Hypera postica*. **Annals of the Entomological Society of America**. v.71, n.2, p.207-211. 1978.

MONAJEMI, H. ESMAILI, M. Population dynamics of lucerne aphids and their natural controlling factors in Karaj. **Journal of Entomological Society of Iran** 6, 41-63. 1981.

MORGAN, D.; WALTERS, K. F. A; AEGERTER, J. N. Effect of temperature and cultivar on pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) life history. **Bulletin of Entomological Research**, v.91, p.47-52. 2001.

MULLINS, C. B. **Intraguild predation among Coccinellidae and *Lysiphlebus testaceipes* in an Oklahoma winter wheat system**. M.S. Thesis, Oklahoma State University, Stillwater. 2008.

MURDOCH, W. W. Population regulation in theory and practice. **Ecology**. 75: 271-287. 1994.

NAKASHIMA, Y; SENOO, N. Avoidance of ladybird trails by an aphid parasitoid *Aphidius ervi*: active period and effects of prior oviposition experience. **Entomol Exp Appl.** 109: 163–166. 2003.

NIMER, E. Clima. In: IBGE, **Geografia do Brasil :Região Sudeste**, vol. 3. Rio de Janeiro: IBGE, p.51-89. 1977.

NOYES, J. S. 1980. **A review of the genera of Neotropical Encyrtidae (Hymenoptera: Chalcidoidea)**. Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology) 41: 107-253.

OBRYCKI, J. J; KRING, T. J. Predaceous Coccinellidae in biological control. **Annual Review of Entomology.** 43: 295 - 321. 1998.

OHIAGU, C. E; BOREHAM, P. F. L. A simple field test for evaluating insect prey-predator relationships. **Entomologia Experimentalis et applicata.** v.23, p.40-47. 1978.

OLIVEIRA, A. R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. **Summa Phytopathol.** 1:61-64. 1975.

OLIVEIRA, P. P. A.; LEDO, F. J. S. O uso da alfafa para pastejo bovino. In: MITTELMANN, A.; LEDO, F. J. S.; GOMES, J. F. **Tecnologias para produção de alfafa no Rio Grande do Sul.** EMBRAPA – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas RS/ Juiz de Fora MG, 208, p. 33-56. 2008.

OLIVEIRA, P. R. D; VENDRAMIM, J. D; CORSI, M. Pulgão-verde-azulado *Acyrtosiphon kondoi* Shinji, 1983 (Homoptera: Aphididae): uma nova praga da alfafa (*Medicago sativa* L.) no Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna, v.15, n.2, p.397-398, 1986.

ONYEKA, J. O. A. Studies on the natural predators of *Culex pipiens* L. and *C. torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) in England. **Bulletin of Entomological Research.** 73: 185-194. 1983.

OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. IN: S. Garger (ED). **Progress in allergy**. New York, Plenum Press., p. 1-78. 1958.

PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N.; PINTO, A. S. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos dos citros**. Piracicaba: A. S. Pinto. 140p. 2003.

PAULINO, V. T; JÚNIOR, E. F; POSSENTI, R. A. Silagem de amendoim forrageiro (arachis pintoi cv. belmonte) com diferentes aditivos. **B. Indústr. anim.** N. Odessa,v. 66, n. 1, p. 33-43, jan.mar., 2009.

PERSAD, A. B; JEYAPRAKASH, A; HOY, M. High-fidelity PCR Assay Discriminates between Immature *Lipolexis oregmae* and *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae) within Their Aphid Hosts. **Fla. Entomol.**, 87: 18-27. 2004.

PETTERSSON, J. Technical description of a serological method for quantitative predator efficiency studies on *Rhopalosiphum padi* (L.). **Swedish Journal of Agricultural Research** 2: 65–69. 1972

PIMENTA, H. R, SMITH, J. G. Afídeos, seus danos e inimigos naturais em plantação de trigo (*Triticum* sp.) no estado do Paraná, **OCEPAR**, 175p. 1976.

POLIS, G. A; HOLT, R. D. Intraguild predation: the dynamics of complex trophic interactions. **Trends in Ecology and Evolution** 7:151–154. 1992.

POLIS, G. A; MYERS, C. A; HOLT, R. D. The ecology and evolution of intraguild predation: potential competitors that eat each other. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 20:297–330. 1989.

PRICE, P.W. Semiochemicals in evolutionary time, pp. 251-279. In Norduland, JONES, D. A, R. L; LEWIS, W. J. (eds.), - Semiochemicals their role in pest control. New York, John Wiley and Sons. 487 p. 1981.

PRICE, P. W; LEWINSOHN, T. M; FERNANDES, G. W; BENSON, W. W. (eds.) **Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions**. New York: Wiley & Sons. 639p. 1991.

PUTMAN, R. J. **Community ecology**. London: Chapman & Hall, 1994. 178p.

QUINLAN, T. G; CALVER, M. C; SMITH, G. T. Immunological determination of digestive rates in the syntopic scorpions *Urodacus armatus* Pocock and *Urodacus novaehollandiae* Peters. **Oecologia**, 95: 459-462. 1993.

RAGSDALE, D; LARSON W. A; NEWSOM, D. Quantitative assessment of the predators of *Nezara viridula* eggs and nymphs within a soybean agroecosystem using and ELISA. **Environ. Entomol.** 10: 402-405. 1981.

RAKSHANI, E; TALEBI, A.A; MANZARI, S; REZWANI, A; RAKSHANI, H. An investigation on alfalfa aphids and their parasitoids in different parts of Iran, with a key to the parasitoids (Hemiptera: Aphididae; Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Journal of Entomological Society of Iran* 25(2), 1-14. 2006.

RASSINI, J. B; FERREIRA, R. P; MOREIRA, A. Recomendações para o cultivo de alfafa na região Sudeste do Brasil. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, **Circular técnica**. n°46, 10p. 2006.

RASSINI, J. B; FREITAS, A. R. Desenvolvimento da Alfafa (*Medicago sativa* L.) sob Diferentes Doses de Adubação Potássica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 487-490, 1998.

RAYMOND, B; DARBY, A. C; DOUGLAS, A. E. Intraguild predators and the spatial distribution of a parasitoid. **Oecologia**. 124:367–372. 2000.

RIVERO, A. The relationship between host selection behaviour and offspring fitness in a koinobiont parasitoid. **Ecological Entomology**. 25:467-472. 2000.

RODRÍGUEZ-SAONA, C. La Ecología Química de Interacciones Tri-Troficas, *In*: ROJAS, J. C.; MALO, E. A. (Eds.). **Temas Selectos en Ecología Química de Insectos**. Mexico: El Colegio de la Frontera Sur, 2012. p. 315-342, 2012.

ROHITHA, B. H; POTTINGER, R. P; FIRTH, A. C. Population monitoring studies of lucerne aphids and their predators in the Waikato. *Proceedings, New Zealand Weed and Pest Control Conference* 38, 31-34. 1985.

ROITBERG, B. SIRCOM, J. ROITBERG, C. VAN ALPHEN, J. MANGEL, M. Life expectancy and reproduction. **Nature**. 364: 108. 1993.

RONDONI, G; ATHEY, K. J; HARWOOD, J. D; CONTI, E; RICCI, C; OBRYCKI, J. J. Development and application of molecular gut-content analysis to detect aphid and coccinellid predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Italy. **Insect Science**. 00, 1-12. 2014a.

RONDONI, G; IELO, F; RICCI, C; CONTI, E. Intraguild Predation Responses in Two Aphidophagous Coccinellids Identify Differences among Juvenile Stages and Aphid Densities. **Insects**. 5, 974-983. 2014b.

RONQUIN, J. C. PACHECO, J. M. RONQUIN, C. C. Occurrence and parasitism of aphids (Hemiptera: Aphididae) on cultivars of irrigated oat (*Avena* spp.) in São Carlos, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 47:163-169. 2004.

ROSENHEIM, J. A. Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. **Annual Review of Entomology**. 43:421–447. 1998.

ROSENHEIM, J. A; KAYA, H. K; EHLER, L. E; MAROIS, J. J; JAFFEE. B. A. Intraguild predation among biological control agents: theory and practice. **Biological Control**. 5: 303–335. 1995.

ROSENHEIM, J. A; WILHOIT, L. R; GOODELL, P. B; GRAFTON-CARDWELL, E. E; LEIGH, T. F. Plant compensation, natural biological control, and herbivory by *Aphis gossypii* on pre-reproductive cotton: the anatomy of a non-pest. **Entomol. Exp. Appl.** 85:45-63. 1997.

ROSENHEIM, J. A; WILHOIT, L. R; ARMER, C. A. Influence of intraguild predation among generalist insect predators on the suppression of an herbivore population. **Oecologia.** 96:439–449. 1993.

ROYER, T. A; GILES, K. L; LEBUSA, M. M; PAYTON, M. E. Preference and suitability of greenbug, *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) mummies parasitized by *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae) as food for *Coccinella septempunctata* and *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). **Biol. Control.** 47:82-88. 2008.

SANTOS, M. P. **Diversidade de vespas parasitóides (Hymenoptera: Parasitica) em áreas de cultivo de café (*Coffea arabica*) e em uma área de vegetação nativa localizadas no município de Piatã, Chapada Diamantina, Bahia.** 69 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia), Departamento de Fitotecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2008.

SANTOS, S. A. P; PEREIRA, J. A; RODRIGUES, M. C; TORRES, L. M, PEREIRA, A. M. N; NOGUEIRA A. J. A. Identification of predator–prey relationships between coccinellids and *Saissetia oleae* (Hemiptera: Coccidae), in olive groves, using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Pest Science** 82:101– 108. 2009.

SANTOS-NETO, J. R; MEZENCIO, J. M. S; CHAGAS, A. T. A; MICHEREFF-FILHO, M. SERRÃO, J. E. Use of Serological Techniques for Determination of *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) Predators (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** 39 (3): 420-423. 2010.

SCHOWALTER, T. D. Insect herbivore relationship to the state of the host plant: biotic regulation of ecosystem nutrient cycling through ecological succession. **Oikos**, v. 37, n 1, p. 126-130, 1981.

SERVICE, M. W; ELOUARD, J. M. Serological identification of the predators of the complex of *Simulium damnosum* Theobald (Diptera: Simuliidae) in the Ivory Coast. **Bulletin of Entomological Research** **70**: 657-663. 1980.

SHEPPARD, S. K; HARWOOD, J. D. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. **Funct Ecol.** **19**: 751–762. 2005.

SIDNEY, L. A. **Laboratory evaluation of *Aphidius ervi* (Haliday) and *Praon volucre* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) and *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) for control of aphids.** Tese (Doutorado), UFLA, Lavras, 156p. 2013.

SIDNEY, L. A; BUENO, V. H. P., LINS, J. R. J. C; SAMPAIO M. V; SILVA D. B. Larval competition between *Aphidius ervi* and *Praon volucre* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). **Environ. Entomol** **39**: 1500–1505. 2010a.

_____. Quality of different aphid species as hosts for the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). **Neotrop. Entomol.** **39**: 709–713. 2010b.

SILVA, A. A.; VARANDA, E. M.; RASSINI, J. B. Weather, cultivar and density-dependent processes influence on aphid in alfalfa. **Bragantia**, v.66, n.2, p.285-290. 2007.

SILVA, A. G; SOUZA, B. H. S; RODRIGUES, N. E. L; BOTTEGA, D. B; BOIÇA JUNIOR, A. L. Interação tritrófica: aspectos gerais e suas implicações no manejo integrado de pragas. **Nucleus**, v. 9, n. 1, p. 35-48, 2012.

SLANSKY, F. Nutritional ecology of endoparasitic insects and their hosts: An overview. **Journal of Insect Physiology.** **32**: 255 - 261. 1986.

SLEUGH, B; MOORE, K. J; GEOREGE, J. R. Binary legume grass mixtures improve forage yield, quality and seasonal distribution. **Agronomy Journal.** v.92, p.24-29, 2000.

SLIPINSKI, A. Australian ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). Their biology and classification. Canberra, Australian Biological Resources Study, 286p. 2007.

SMALL, E. Adaptations to herbivory in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Canadian Journal of Botany**. 74, 807-822. 1996.

SNYDER, W. E; IVES, A. R. Generalist predators disrupt biological control by a specialist parasitoid. **Ecology** 82: 705-716. 2001.

SNYDER, W. E; IVES, A. R. Interactions between specialist and generalist natural enemies: parasitoids, predators, and pea aphid biocontrol. **Ecology**, 84, 91–107. 2003.

SOPP, P. I; SUNDERLAND. K. D. Some factors affecting the detection period of aphid remains in predators using ELISA. **Entomologia experimentalis et applicata** 51: 11–20. 1989.

SOPP, P. I; SUNDERLAND, K. D; FENLON, J. S; WRATTEN. S. D. An improved quantitative method for estimating invertebrate predation in the field using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Applied Ecology** 29: 295–302. 1992.

SOUSA-SILVA, C. R.; PACHECO, J. M.; RASSINI, J. B.; ILHARCO, F. A. Afídeos da alfafa no Brasil (Homoptera, Aphidoidea). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 41, n.4 p. 285-288. 1998.

SOUSA-SILVA, C. R. **Serologia aplicada ao estudo de *Deois flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae)**. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz. Universidade de São Paulo, 99p. 1985.

SOUSA-SILVA, C. R. **Uso de radiotraçador e serologia no estudo das relações alimentares entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1974) e artrópodes predadores**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz. Universidade de São Paulo, 63p. 1980.

STARÝ, P. Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control. **Series Entomologica**, Vol. 6. Dr. W. Junk, The Hague, 643 pp. 1970.

STUART, M. K; GREENSTONE, M. H. Serological diagnosis of parasitism: a monoclonal antibody-based immunodot assay for *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). pp. 301–321. in Symondson, W. O. C. LIDDELL, J. E. (Eds) **The ecology of agricultural pests**. London, Chapman & Hall. 1996.

SUNDERLAND, K. D. Pest control by a community of natural enemies. **Acta Jutland**. 72:271–326. 1997.

SUTTON, S. L. Predation on woodlice; an investigation using the precipitin test. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 13 (3): 279-285. 1970.

SWENSON, K. G. Aphid transmission of a bean yellow mosaic virus. **J. Econ. Entomol.** 47:1121-1123. 1954.

SYMONDSON, W. O. C; LIDELL, J. E. Differential antigen decay rates during digestion of molluscan prey by carabid predators. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 69: 277–287. 1993.

SYMONDSON, W. O. C; ERICKSON, M. L; LIDELL, J. E. Species-specific detection of predation by Coleoptera on the milacid slug *Tandonia budapestensis* (Mollusca, Pulmonata). **Biocontrol Sci. Tech.** 7, 457–465. 1997.

SYMONDSON, W. O. C; GASULL, T; LIDELL, J. E. Rapid identification of adult whiteflies in plant consignments using monoclonal antibodies. **Annals of Applied Biology** 134:271–276. 1999.

TAKADA, H. Studies on aphid hyperparasites of Japan. Aphid hyperparasites of the genus *Dendrocerus* Ratzeburg occurring in Japan (Hymenoptera, Ceraphronidae). **Insecta Matsumurana** (N.S.), 2: 1-37. 1973.

TAKAHASHI, K; NAITO, A. Seasonal occurrence of aphids and their predators (Col.: Coccinellidae) in alfalfa fields. **Bulletin of the National Grassland Research Institute, Japan** 29, 62-66. 1984.

TAKIZAWA, T; YASUDA, H; AGARWALA. B. Effects of parasitized aphids (Homoptera: Aphididae) as food on larval performance of three predatory ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). **Appl. Entomol. Zool.** 35: 467-472. 2000.

TAVARES, M. T. Ocorrência de *Dendrocerus carpenteri* (Curtis) (Hymenoptera: Megaspilidae) no Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 25 (2): 363-364. 1996.

TAYLOR, A. J; MULLER, C. B; GODFRAY, H. C. J. Effect of aphid predators on oviposition behavior of aphid parasitoids. **J. Insect Behav.** 11: 297-302. 1998.

TITOVA, E. V. Use of precipitin test in a study of interrelationship between *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) and predatory arthropods. **Entomological Review** 49 (2): 155-16. 1970.

TOLENTINO, M. **Estudo crítico sobre o clima da região de São Carlos**. São Carlos: Prefeitura Municipal, 1967. 78p. (Concurso de Monografias Municipais).

TRIGO, J. R. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. **Phytochem Rev:** 10: 83-98. 2011.

TURCHIN, P; TAYLOR, A. D; REEVE, J. D. Dynamical role of predators in population cycles of a forest insect: an experimental test. **Science.** 285: 1068-1071. 1999.

TURNER, B. D. Predation pressure on the arboreal epiphytic herbivores of larch trees in southern England. **Ecological Entomology** 9 (1): 91-100. 1984.

VANDENBERG, N. J. The new world genus *Cycloneda* Crotch (Coleoptera: Coccinellidae: Coccinellini) historical review, new diagnosis, new generic and specific synonyms, and a

improved key to North American Species. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**. Washington, v. 104, n. 1, p. 221-236, 2002.

VELASCO-HERNÁNDEZ, M. C; RAMIREZ-ROMERO, R; CICERO, L; MICHEL-RIOS, C; DESNEUX, N. Intraguild predation on the whitefly parasitoid *Eretmocerus eremicus* by the generalist predator *Geocoris punctipes*: a behavioral approach. **PLoS One**. journal.pone.0080679. 2013.

VET, L. E. M; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 141-172, 1992.

VICKERMAN, G. P; SUNDERLAND, K. D. Arthropods in cereal crops: nocturnal activity, vertical distribution and aphid predation. **Journal of Applied Ecology**, v.12, n.3, p. 755-766. 1975.

VILELA, E. V; DELLA-LUCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: Biologia, química e aplicação**. 2º ed, Ribeirão Preto, Holos. 206p. 2001.

VISSER, M. E. The effect of competition on oviposition decisions of *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Eucoilidae). **Anim. Behav.** 49, 1677 - 1687. 1995.

WALTON, P. D. **Production and management of cultivated forages**. 336 pp. Reston Publishing Company. 1983.

WEATHERSBEE, A. A. I; SHUFRAN, K. A; PANCHAL, T. D; DANG, P. M; EVANS, G. A. Detection and Differentiation of Parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae and Aphelinidae) of the Brown Citrus Aphid (Homoptera: Aphididae): Species-specific Polymerase Chain Reaction Amplification of 18S rDNA. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 97: 286-292. 2004.

WHEELER, A. G; HAYES, J. T; STEPHENS, J. L. Insect predators of mummified pea aphids. **Can. Entomol.** 100:221–22. 1968.

ZANINI, A. **Controle biológico do pulgão de trigo *Sitobion avenae* (Fabricius 1775) pelo parasitoide *Aphidius colemani* Viereck, 1912 em Medianeira, PR, Brasil.** Dissertação de Mestrado. UNIOESTE. 77p. 2004.