

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Análise comparativa da predação de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) e *Aphis spiraecola* (Patch) (Hemiptera: Aphididae) por artrópodes, em cultura de citros, através da serologia

FABIANO DE MELLO COSTA

SÃO CARLOS – SP
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Análise comparativa da predação de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) e *Aphis spiraecola* (Patch) (Hemiptera: Aphididae) por artrópodes, em cultura de citros, através da serologia

FABIANO DE MELLO COSTA

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 em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS – SP
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C837ac

Costa, Fabiano de Mello.

Análise comparativa da predação de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) e *Aphis spiraecola* (Patch) (Hemiptera : Aphididae) por artrópodes, em cultura de citros, através da serologia / Fabiano de Mello Costa. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
76 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Entomologia. 2. Análise serológica. 3. Aphidoidea. 4. Predadores. I. Título.

CDD: 595.7 (20^a)

Fabiano de Mello Costa


Análise comparativa da predação de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) e *Aphis spiraecola* (Patch) (Hemiptera: Aphididae) por artrópodes, em cultura de citros, através da serologia

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 31 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Presidente



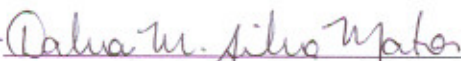
Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva
(Orientador)

1º Examinador



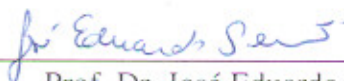
Profa. Dra. Susana Trivinho Strixino
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



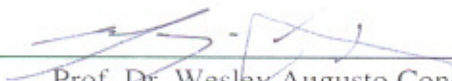
Profa. Dra. Dalva Maria da Silva Matos
PPGERN/UFSCar

3º Examinador



Prof. Dr. José Eduardo Serrão
UFV/Viçosa-MG

4º Examinador



Prof. Dr. Wesley Augusto Conde Godoy
USP/ESALQ/Piracicaba-SP

“Estou convencido das minhas próprias limitações –
e esta convicção é minha força”.

Mahatma Gandhi

Aos meus pais Agnaldo e Noeme, meus avós,

Aos meus irmãos e sobrinhos.

Ofereço

A Cláudia e família.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG – ERN) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, pela oportunidade de realização deste curso, em especial aos professores: Dr. José Eduardo dos Santos, Dr. José Roberto Verani e Dra Odete Rocha.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva – DEBE/UFSCAR, pela orientação e amizade;

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG – ERN) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar;

A CAPES pela bolsa de doutorado concedida;

A todos os amigos do Laboratório de Entomologia Econômica do DEBE – UFSCar São Carlos-SP;

A toda a minha família, amigos que muito me ajudaram durante todo o trabalho;

Agradeço a Deus por tudo que tem nos proporcionado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 A citricultura no Brasil	4
3.2 Os Afídeos	6
3.2.1 Os afídeos dos citros <i>T. citricidus</i> e <i>A. spiraecola</i>	8
3.3 Os Inimigos naturais dos afídeos	10
3.3.1 Predadores	11
3.4 Serologia.	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Características climáticas da região de São Carlos, SP	19
4.2 Localização da área de estudo	19
4.3. Coleta de predadores.....	20
4.4 Antígenos Imunizantes.....	20
4.5 Obtenção do antissoro para <i>T. citricidus</i> (ASTc).....	20
4.6 Obtenção do antissoro para <i>A. spiraecola</i> (ASAs).....	21
4.7 Testes serológicos.....	22
4.8 Análises estatísticas	23
5 RESULTADOS	25
5.1 Reações serológicas com o ASTc.....	25
5.2. Reações Serológicas com o ASAs.....	27
6 DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÕES.....	38
8 REFERÊNCIAS	39
9- FIGURAS.....	59
10 – TABELAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Vista panorâmica da Propriedade Agrícola Terra Roxa, São Carlos-SP, que tem como principal atividade o cultivo de citros variedade “Valencia”.....60
- Figura 2. Talhão de citros na Propriedade Agrícola Terra Roxa, São Carlos-SP, localizado entre as coordenadas: 21° 47' 144`` S e 47° 55' 426``W e altitude de 710 m.60
- Figura 3. Obtenção do antissoro para *T. citricidus* (ASTc). Cronograma de sangrias e inoculações do antígeno (AGTc) na região do linfonódulo de um coelho conforme técnica descrita por Oliveira (1975). SN: Soro Normal.....61
- Figura 4. Reações serológicas homólogas entre os antissoros para *Toxoptera citricidus* ASTc1, ASTc2, ASTc3, ASTc4, ASTc5, ASTc6, ASTc7, ASTc8, ASTc9 e ASTc10 antissoros, respectivamente, obtidos com a 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a, 8^a, 9^a e 10^a sangrias e o macerado de *Toxoptera citricidus* AGTc; C: controle. As setas na figura indicam as linhas de precipitação.....62
- Figura 5. Reações serológicas de dupla difusão em agar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de titulação do antissoro ASTc9.....62
- Figura 6. A) Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de verificação de reação cruzada entre o ASTc, o antígeno homólogo AGTc e os antígenos de *Aphis spiraecola* (AGAs), *Aphis gossypii* (AGAgp) e *Toxoptera aurantii* (AGTa). A seta na figura mostra o esporão obtido, indicando identidade antigênica parcial; B) Reações serológicas de dupla

difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de absorção entre o ASTc e antígenos de *Toxoptera aurantii* (AGTa), *Toxoptera citricidus* (AGTc), *Aphis spiraecola* (AGAs) e *Aphis gossypii* (AGAgp).....63

Figura 7. Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nas reações serológicas homólogas entre o ASTc e o macerado de adultos alados (AGTcalad); ninfas de alados (AGTcnfal), ápteros adultos (AGTcaptad) e ninfas de ápteros (AGTcninfapt) de *Toxoptera citricidus*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação resultantes de reações positivas.....63

Figura 8. Reações serológicas heterólogas entre ASTc e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de *Cycloneda sanguinea* (AGCsang) e *Hippodamia convergens* (AGHconv). As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação.....64

Figura 9. Reações serológicas homólogas entre os antíseros para *Aphis spiraecola* ASAs1, ASAs2, ASAs3, antíseros, respectivamente, obtidos com a 1^a, 2^a, 3^a sangrias e o macerado de *Aphis spiraecola* AGAs; C: controle.64

Figura 10 Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de titulação do antissoros ASAs.....65

Figura 11. Reações serológicas heterólogas entre ASAs e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de *Hippodamia convergens* (AGHconv), *Cycloneda sanguinea* (AGCsang) e *Harmonia axyridis* (AGHax).....65

Figura 12. Gráficos de caixa indicando a taxa de predação de *Toxoptera citricidus* e *Aphis spiraecola* por *Cycloneda sanguinea* (a), *Hippodamia convergens* (b), e *Harmonia axyridis* (c). Letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas na taxa de predação entre os afídeos (Mann-Whitney – $p > 0,05$). No gráfico a, as barras delimitam o intervalo de variação e as caixas 50% dos valores, enquanto em b e c o intervalo é indicado pelas caixas e os valores mais comuns pelas cruces. Em ambos as linhas horizontais correspondem à mediana, e os quadrados pequenos à média.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de antissoros para <i>Toxoptera citricidus</i> (ASTc).....	68
Tabela II. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de antissoros para <i>Aphis spiraecola</i> (ASAs).....	69
Tabela III. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de antissoros; antissoros obtidos e número de linhas de precipitação observadas nos testes serológicos.....	70
Tabela IV. Testes serológicos realizados entre o ASTc e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de <i>Cycloneda sanguinea</i> alimentados 24 h após a alimentação, em laboratório, com adultos ápteros de <i>Toxoptera citricidus</i>	71
Tabela V. Testes serológicos realizados entre o ASTc e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de <i>Cycloneda sanguinea</i> 48 h após a alimentação, em laboratório, com adultos ápteros de <i>Toxoptera citricidus</i>	72
Tabela VI – Abundância dos predadores coletados em cultura de <i>Citrus</i> , na propriedade agrícola Terra Roxa, São Carlos – SP, em cada uma das amostragens no período de 2007 a 2009.....	73

Tabela VII – Eficiência de predação (%) de *Toxoptera citricidus* obtida a partir do número de resultados positivos nos testes sorológicos em relação à abundância total de predadores coletados na propriedade agrícola Terra Roxa, São Carlos – SP, no período de 2007 a 2009.....74

Tabela VIII. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de Antissoros; Antissoros obtidos e Número de linhas de precipitação observadas nos testes serológicos (ASAs X AGAs).....75

Tabela IX – Eficiência de predação (%) de *Aphis spiraecola* obtida a partir do número de resultados positivos nos testes sorológicos em relação à abundância total de predadores coletados na propriedade agrícola Terra Roxa, São Carlos – SP, no período de 2007 a 2009.....76

RESUMO

A citricultura é uma das mais importantes atividades agrícolas do Brasil, sendo a sua produção voltada especialmente para a exportação de suco concentrado, gerando lucros que ultrapassam um bilhão de dólares/ano. Neste trabalho pela primeira vez antissoros específicos para *Aphis spiraecola* (Patch) e *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) foram produzidos e potenciais predadores destas pragas foram identificados. A serologia baseia-se na possibilidade de reações específicas entre um antissoro obtido para a presa que se deseja investigar e antígenos obtidos pela maceração de potenciais predadores capturados no campo. Amostras dos afídeos *A. spiraecola* e *T. citricidus* foram maceradas em solução salina 0,75%. Os macerados foram centrifugados e os sobrenadantes utilizados como antígenos imunizantes para obtenção do antissoro específico. Para esse propósito dois coelhos foram imunizados com doses de antígenos na região do linfonodos. Testes serológicos homólogos e heterólogos foram realizados através do método de dupla difusão em ágar. Reações serológicas homólogas foram positivas logo após sete dias da primeira inoculação do antígeno para ambos os antissoros. O título máximo entre os antissoros foi de 32. Reações heterólogas positivas foram observadas para os Coccinellidae *Azia luteipes* Mulsant, *Cycloneda conjugata* (Mulsant), *Cycloneda sanguinea* Linnaeus, *Harmonia axyridis* (Pallas), *Hippodamia convergens* (Guérin-Meneville), *Olla v-nigrum* (Mulsant) e *Scymnus* spp; larvas de, larvas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), larvas de *Pseudodorus clavatus* (Fabricius, 1794) (Diptera: Syrphidae); um heteróptero (Hemiptera: Heteroptera) e um aracnídeo (Araneae). Não houve diferenças significativas entre *C. sanguinea*, *H. convergens* e *H. axyridis* quanto as suas eficiências de predação. Os predadores *C. sanguinea*, *H. convergens* e *H. axyridis* não apresentaram diferenças na preferência alimentar para *A. spiraecola* ou *T. citricidus*. A partir dos

resultados obtidos pode-se concluir que os predadores encontrados nos cultivos de citros são potenciais predadores de *A. spiraecola* e/ou *T. citricidus* e podem atuar como eficientes agentes de controle biológico desses afídeos, diminuindo a sua população e reduzindo seus danos. A técnica serológica utilizada foi eficaz na detecção de predadores desses afídeos no campo.

ABSTRACT

Citriculture is one of the most important agricultural activities in Brazil, and its production, specially directed to the export of concentrated juice, generates profits that surpass one billion dollars a year. In the present work, specific antisera for *Aphis spiraecola* (Patch) and *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) were produced, and potential predators of these pests were identified. Serology is based on the possibility of specific reactions between an antiserum obtained for the prey that is going to be investigated and the antigens obtained through the maceration of the possible predators captured in the fields. Samples of the *A. spiraecola* and *T. citricidus* aphids were macerated in a 0.75% salt solution. The macerated samples were centrifuged, and the floating ones were used as immunizing antigens for the attainment of the specific antiserum. For that purpose, two rabbits were immunized with doses of antigens in the region of the lymph nodes. Homologous and heterologous serological tests were performed through the method of double diffusion in agar. Homologous serological reactions were positive for both antisera as soon as seven days after the first antigen inoculation. The maximum titre between both antisera was of 32. Positive heterologous reactions were observed as for Coccinellidae *Azia luteipes* (Mulsant), *Cycloneda conjugata* (Mulsant), *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus), *Harmonia axyridis* (Pallas), *Hippodamia convergens* (Guérin-Meneville), *Olla v-nigrum* (Mulsant) and *Scymnus* spp; *Chrysoperla externa* larvae (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), *Pseudodorus clavatus* larvae (Fabricius, 1794) (Diptera: Syrphidae); one heteropterous (Hemiptera: Heteroptera) and one arachnid (Araneae). No significant differences were observed between *C. sanguinea*, *H. convergens* e *H. axyridis* as for their predatory efficiency. The predators *C. sanguinea*, *H. convergens* and *H. axyridis* did not present differences in their food preference for *A. spiraecola* or *T. citricidus*. From the obtained

results, one can infer that the predators found in citrus cultivations are potential predators of *A. spiraecola* and/or *T. citricidus* and may act as efficient agents of biological control of those aphids, reducing their populations and the damages caused by them. The serological technique used was effective in the detection of predators of those aphids in the fields.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais importantes atividades agrícolas no Brasil, sendo a sua produção voltada especialmente para a exportação de suco concentrado. A produção brasileira ultrapassa 20 milhões de toneladas, tendo como principal pólo produtor o Estado de São Paulo, com quase 80% da produção nacional de frutos cítricos (IBGE, 2005). O Brasil produz mais de 30% da laranja cultivada no mundo e 59% do suco de laranja concentrado congelado consumido no mundo (FAO, 2008).

A cultura de citros [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é alvo constante de inúmeras pragas e doenças, que encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento são capazes de causar danos irreversíveis. Entre os diversos insetos praga que podem ocasionar prejuízos econômicos à citricultura encontram-se os afídeos (Hemiptera: Aphididae). Esses hemípteros podem causar danos diretamente pelo depauperamento da planta, motivado pela sucção contínua da seiva e enrolamento das folhas. Os danos indiretos são motivados pela transmissão de vírus às plantas (ILHARCO, 1992; NAULT, 1997).

Segundo BARBAGALLO & PATTI (1986) aproximadamente 20 espécies de afídeos atacam a cultura dos citros no mundo. HALBERT & BROWN (1996) observaram 21 espécies de afídeos colonizando brotos vegetativos e florais em diversas espécies de cítricos. MORA *et al.* (1997) e PENÃ *et al.* (1998) observaram 10 espécies de afídeos atacando citros no México. Dados compilados por SOUSA-SILVA & ILHARCO (1995) mostram que, no Brasil, as plantas cítricas são colonizadas pelos seguintes afídeos: *Aphis gossypii* (Glover, 1887), *Aphis spiraecola* (Patch, 1914), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Foscolombe, 1841) e *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy,

1907), uma das pragas mais daninhas ao *Citrus*, sendo o principal vetor do vírus da tristeza dos citros.

A ocorrência de “pragas” em diversas culturas é uma consequência de um desequilíbrio que acaba piorando com o uso indiscriminado de inseticidas. A aplicação segura e eficiente de qualquer medida de controle deve ser baseada no conhecimento da dinâmica da população da praga, especificamente, dos fatores que regulam a sua densidade populacional, como por exemplo, os inimigos naturais (patógenos, parasitóides e predadores) (SUNDERLAND *et al.*, 1997), que contribuem significativamente para o controle de suas populações. Uma premissa fundamental para o uso de predadores no controle biológico é a sua capacidade de consumir grande quantidade de uma determinada praga. O reconhecimento desses agentes controladores no ambiente é realizado, principalmente, por meio da observação direta. No caso do parasitismo essa relação é fácil de ser visualizada uma vez que o hospedeiro se mantém, mumificado após a emergência do parasitóide. O predador, ao contrário, consome toda a presa e, neste caso, a relação é definida pela constatação do ato predatório. As dificuldades para essa constatação justificam a aplicação de métodos que permitam a identificação segura desses controladores naturais. Uma metodologia que vem sendo utilizada por diversos pesquisadores para a determinação de predadores é a serologia. Esta técnica baseia-se em reações específicas que são realizadas entre um antissoro obtido para uma determinada fonte alimentar e os vários consumidores dessa fonte, como antígenos.

2. OBJETIVOS

A partir do exposto os objetivos do presente estudo visaram responder as seguintes questões:

1) É possível produzir antissoros específicos para os afídeos *T. citricidus* e *A. spiraecola*?

2) Os antissoros podem ser utilizados na determinação dos predadores dos afídeos *T. citricidus* e *A. spiraecola*?

3) Através de testes serológicos é possível determinar, em condições de campo, se há preferência alimentar aos afídeos *T. citricidus* e *A. spiraecola* pelos predadores?

4) É possível comparar, através da serologia, os diversos predadores, quanto a sua eficiência em predação dos afídeos *T. citricidus* e *A. spiraecola*?

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A citricultura no Brasil

A citricultura possui potencial econômico no âmbito nacional e internacional. No Brasil é caracterizada como uma das mais importantes atividades agro-industriais. No ano de 2007 os lucros com a exportação de suco de laranja chegaram a US\$2,3 bilhões, representando 80% do mercado mundial de suco de laranja (BRASIL, 2008 *apud* ADAMI, 2010). A produção de suco de Laranja concentrado congelado – SLCC brasileiro detem quase 60% da produção mundial e mais de 80% de participação nas vendas do mercado mundial. O setor da laranja movimenta R\$9 bilhões por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos; investe fortemente em inovações e em pesquisa e tecnologia (NEVES *et al.*, 2006).

Apesar do impacto na economia brasileira a citricultura passa por muitos problemas, na maioria das vezes relacionada à ocorrência de doenças, veiculadas principalmente por insetos. Nesse aspecto, em 2003, os gastos chegaram a US\$141 milhões com defensivos agrícolas e US\$150 milhões ao ano provocado pela queda da produção e perdas de plantas na área citrícola (NEVES & LOPES, 2005 *apud* ADAMI, 2010).

A maior ameaça à citricultura brasileira ocorreu em 1937 com o aparecimento do vírus da “tristeza dos citros”. Seu patógeno é o *Citrus Tristeza Virus* – CTV, tendo como principal vetor o afídeo *T. citricidus* (MENECHINI, 1946). Também é transmitido por enxertia desde que ocorra o contato entre o floema da fonte de inóculo e o floema da planta receptora. Os afídeos, *T. aurantii*, *A. gossypii* e *A. spiraeicola*, também podem transmiti-lo às plantas de modo semipersistente (BLACKMAN & EASTOP, 1984; HUGHES & GOTTFELD, 1999; LEE & BAR-JOSEPH, 2000;

WHITESIDE *et al.*, 1993).

Em 1957 o “cancro cítrico” foi introduzido do Japão para o Estado de São Paulo. Estimam-se perdas de 1,2 milhões de plantas devido à sua ocorrência (MASSARI, 2001 *apud* ADAMI, *op. cit.*). Em 1999 uma erradicação mais severa foi adotada ocasionando a retirada de 1,8 milhões de árvores entre 2000 e 2004 (FIGUEIREDO, 2008 *apud* ADAMI, *op. cit.*).

Em 1987 surgiu uma nova doença denominada “Clorose Variegada dos Citros” (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* 1987 (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) e transmitida por diversas espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Esta doença provocou em 2003 perdas de US\$100 milhões com incidência em 43% das plantas cultivadas em São Paulo e no Sul de Minas Gerais (LOPES *et al.* 2004 *apud* ADAMI, 2010).

A Leprose dos citros outra importante doença que afeta a citricultura brasileira (BASSANEZI & LARANJEIRA, 2007) é causada pelo vírus da leprose dos citros (CiLV) e transmitida pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). A leprose ocorre principalmente na América do Sul e foi encontrada mais recentemente, na América Central (MÜLLER *et al.*, 2005 *apud* BASSANEZI & LARANJEIRA, 2007). No Brasil, além de São Paulo, ocorre principalmente nos estados do sul e sudeste sendo pouco encontrada em outras regiões (MÜLLER *et al.*, 2005 *apud* BASSANEZI & LARANJEIRA, 2007).

Em 2001 foi detectada em pomares do sul do Triângulo Mineiro uma nova doença, a Morte Súbita dos Citros (MSC) (GIMENES FERNANDES & BASSANEZI, 2001), assim denominada em virtude da rapidez com que as plantas morrem na fase final da doença (MACHADO *et al.* 2004). É uma doença que pode causar definhamento e morte súbita das plantas, principalmente em pomares de laranja Valencia,

enxertadas sobre limoeiros Cravo, que é suscetível à doença. A MSC já provocou no Brasil prejuízos na ordem de US\$40 milhões (FUNDECITRUS, 2005). Por apresentar aspectos semelhantes aos da ‘tristeza dos citros’, especula-se que o agente causal seja um variante do CTV. Em relação à etiologia e informações epidemiológicas sobre a MSC, o padrão espacial da doença é compatível com aquele de uma doença infecciosa transmitida provavelmente por afídeos (BASSANEZI *et al.*, 2002, 2003). Pesquisas recentes indicaram *A. gossypii* e *A. spiraecola* como os principais vetores envolvidos. Pelo tipo de alastramento da doença nos pomares e pelos aspectos semelhantes ao CTV, *T. citricidus* também é apontado, como um dos possíveis vetores envolvidos na disseminação da MSC nos pomares (FUNDECITROS, *op. cit.*).

Atualmente o “*Greening*”, doença que tem como agente causal bactérias e como vetores os psilídeos, vem trazendo prejuízos aos produtores de cítricos (FUNDECITRUS, *op. cit.*). Estima-se que aproximadamente três milhões de plantas já foram eliminadas desde que a doença apareceu nos pomares paulistas. Estima-se que para os próximos anos, mais três milhões de novas plantas sejam eliminadas (GARCIA, 2009 *apud* ADAMI, 2010).

3.2 Os afídeos

Os afídeos (Hemiptera: Aphidoidea) são insetos fitófagos que em sua maioria evoluíram na flora das regiões temperadas estando bem adaptados às mudanças estacionais que condicionam a vegetação lá encontrada. Aproveitam com muita eficiência o meio em que vivem e possuem um alto grau de especificidade ao hospedeiro (HOLMAN, 1974). Aphididae é a família mais numerosa e com maior número de espécies de importância econômica.

Nos afídeos a alta fecundidade, onde partenogênese, viviparidade e polimorfismo, conjuntamente, favorecem o potencial de suas gerações e, conseqüentemente, possibilita-lhes altas taxas de reprodução; uma divisão de trabalho entre as formas: umas concentradas na reprodução e outras na dispersão; o desenvolvimento de ciclos de vida complexos, e interações especializadas com as plantas hospedeiras têm contribuído para o êxito do grupo (CARVER, 1989).

As principais características que os situam entre as pragas mais abundantes e importantes das culturas são: a sua forma de alimentação, o alto ritmo de reprodução e a habilidade dos alados para se dispersarem a grandes distâncias (HOLMAN, 1974). Apresentam desenvolvimento hemimetábolo (BORROR & DELONG, 1998), onde quase todas as espécies passam por quatro estádios ninfais, tornando-se adultos após a quarta muda. A partir do terceiro estágio é possível diferenciar os adultos alados através da presença ou não de tecas alares. Podem ocupar diferentes partes da planta ao longo de seu ciclo biológico (BLACKMAN & EASTOP, 1994), sendo um dos grupos de insetos com maior potencial de danos nas espécies hospedeiras, tanto danos diretos causados pela sua alimentação quanto indiretos (ILHARCO, 1992).

Os principais danos diretos se devem à retirada de substâncias nutritivas do hospedeiro, e a transmissão de substâncias tóxicas através da saliva, provocando encarquilhamento, deformações, galhas, necrose, queda de flores e frutos, manchas nas folhas e frutos, e redução do crescimento (ZUCCHI *et al.* 1993). A melada ou “honeydew” que excretam constitui um atrativo para formigas, queimam as folhas das plantas, facilitam a proliferação de fungos negros saprófitas (fumaginas), que acabam por revestir a superfície foliar, prejudicando a fotossíntese, ocorrendo redução na área fotossintética, e com isso, dificultando os processos de respiração e evapotranspiração da planta (ILHARCO, *op. cit.*).

O principal dano é indireto, devido à transmissão de vírus às plantas e, nesse caso, um só inseto é suficiente para contaminar várias plantas. Uma espécie de afídeo pode transmitir apenas um, ou diversos vírus e, também, um vírus pode ser transmitido por uma só espécie de afídeo ou por várias. Os vírus podem ser persistentes fazendo do inseto um vetor permanente, ou não persistente, perdendo-se com as mudas ou com as primeiras picadas na planta (ILHARCO, *op. cit.*). *T. citricidus*, *T. aurantii*, *A. gossypii* e *A. spiraecola* transmitem o vírus da “tristeza dos citros” de modo semipersistente (BLACKMAN & EASTOP, 1984; HUGHES & GOTTWALD, 1999; LEE & BAR- JOSEPH, 2000; WHITESIDE *et al.*, 1993). EASTOP (1966) observou que 200 espécies de afídeos são vetoras de vírus em plantas; por exemplo *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) é vetor de mais de 100 espécies de vírus vegetais.

3.2.1 Os afídeos dos citros *T. citricidus* e *A. spiraecola*

Toxoptera citricidus, conhecido como o “pulgão preto dos citros” é o vetor primário do vírus causador da doença “tristeza dos citros” (MENEHINI, 1946; COSTA & GRANT, 1951), que praticamente eliminou 10 milhões de plantas enxertadas em laranja azeda, atrasando o desenvolvimento da citricultura brasileira em mais de uma década. Para se ter uma visão geral do poder devastador desta doença, na Argentina entre 1930 e 1940, foram destruídas mais de 10 milhões de árvores enxertadas sobre porta-enxerto de laranja azeda (*Citrus aurantii* L.); na Espanha, desde sua chegada em 1957, matou cerca de 6 milhões de árvores (MORENO *et al.*, 1982). ROCHA-PEÑA *et al.* (1995) descreveram que desde o aparecimento de *T. citricidus* na Venezuela, no período de 1976 até 1987, morreram 6 milhões de árvores de cítricos. *T. citricidus* possui como principais hospedeiros as Rutaceas, principalmente *Citrus*, por

vezes outras plantas. No Brasil já foram encontradas colônias de *T. citricidus* em: *Aglaia odorata*, *Citrus reticulata*, *C. sinensis*, *C. sp.*, *Coffea sp.*, *Evodia hupehensis*, *Ilex paraguariensis*, *Malus sylvestris*, *Prunus persica*, *Pyrus communis*, *Salix babylonica*, *Zanthoxylon rhoifolium*, errantes (SOUSA-SILVA & ILHARCO, 1995).

A distribuição geográfica de *T. citricidus* inclui o Sudeste da Ásia (CARVER, 1978; TAO & TAN, 1961), Espanha e Portugal (SOUSA-SILVA & ILHARCO, 2009) e outras áreas do mediterrâneo, África ao Sul do Sahara, Austrália, Nova Zelândia, Ilhas do Pacífico, América do Sul, México, Porto Rico, Flórida (HALBERT & BROWN, 1996), Japão (KOMAZAKI, 1981). No Brasil, encontram-se distribuídos pelo Pará, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Linhares-ES, Rio de Janeiro, São Paulo, São Carlos-SP e Rio Grande do Sul (SOUSA-SILVA E ILHARCO, 1995).

Aphis spiraecola é uma espécie polífaga, e como já relatado, possivelmente envolvida com a morte súbita dos citros. Apresenta como hospedeiros primários rosáceas principalmente do gênero *Spiraea*, também sendo encontrados em compostas, pomóideas e rutáceas do gênero *Citrus* (HOLMAN, 1974; BLACKMAN & EASTOP, 1984). Seu desenvolvimento é holocíclico em regiões temperadas e anolocíclico nos trópicos (BLACKMAN & EASTOP, 1984). No Brasil já foram encontradas colônias de *A. spiraecola* em: *Arracacia xanthorrhiza*, *Baccharis sp.*, *Cordia sp.*, *Coriandrum sativum*, *Cydonia oblonga*, *Gardenia jasminoides*, *Kalanchoe sp.*, *Ludwigia sp.*, *Malus sylvestris*, *M. sp.*, *Persea americana*, *Pittosporum tobira*, *Psidium sp.*, *Rosa sp.*, *Solanum mauritianum*, *S. tuberosum*, *Spiraea hypericifolia*, *Tibouchina granulosa*. A distribuição geográfica de *A. spiraecola* inclui a América, região mediterrânica, Suíça, Sul da Ásia, China, Oriente Médio, Japão, Filipinas, Indonésia, Nova Guiné, África, Austrália, Nova Zelândia. No Brasil encontra-se distribuído pelo Ceará, Linhares – ES, Atibaia – SP, Campinas – SP, Campos do Jordão – SP, Piracicaba – SP, São Carlos –

SP, Tambaú – SP, Tremembé – SP, Contenda – PR, Curutiba – PR, Morretes – PR, Palmas – PR, Santa Maria – RS (SOUSA-SILVA & ILHARCO, 1995).

3.3 Os inimigos naturais dos afídeos

Os prejuízos que grandes populações de afídeos podem provocar nas culturas levam os agricultores a utilizar produtos fitossanitários visando a garantir uma melhor produção. O uso de químicos tornou-se extremamente difícil no controle de afídeos devido à resistência destes aos organofosforados, carbamatos e piretróides. Geralmente estes compostos não são utilizados da forma mais racional, portanto, as espécies de afídeos, principalmente as de ciclo curto, em pouco tempo manifestam maior resistência a estes produtos, suportando aplicações sucessivas (DELORME, 1996), enquanto os seus inimigos naturais são eliminados (ILHARCO, 1992). O conhecimento não só da praga como também de seus inimigos naturais torna-se essencial para diminuir a utilização de meios químicos que podem quebrar equilíbrios biológicos existentes e imprescindíveis para a limitação natural. Uma vez que um bom inimigo natural tenha sido identificado, ele pode ser utilizado, sem provocar os problemas de resistência, como acontece com o uso de produtos fitossanitários (BUENO, 2000).

Um aspecto do controle biológico que não pode ser negligenciado é o controle natural através de inimigos naturais que ocorrem no campo. Estima-se que mais de 90% de todas as pragas agrícolas sejam mantidas sob controle natural (De BACH & ROSEN, 1991). Sem a existência dos inimigos naturais as perdas causadas pelas pragas seriam catastróficas e os custos do controle químico aumentariam enormemente (PIMENTEL *et al.*, 1992).

3.3.1 Predadores

Os principais predadores de afídeos repartem-se pelas seguintes ordens de insetos, enumeradas de acordo com o grau de eficácia dos seus representantes, de acordo com ILHARCO (1992): Diptera (Syrphidae, Cecidomyiidae, Chamaemyiidae), Coleoptera (Coccinellidae) e Neuroptera (Chrysopidae e Hemerobiidae). Alguns Heteroptera (Reduviidae e Anthocoridae), Mecoptera (*Panorpa*), Hymenoptera (*Pemphredon*) e Lepidoptera, também atuam como predadores de afídeos.

Os Syrphidae são considerados os mais freqüentes e simultaneamente os mais ativos predadores de afídeos e de outros pequenos insetos (COULSON *et al.*, 1984). Os adultos alimentam-se do pólen e do néctar das flores, da melada dos afídeos e de outras substâncias açucaradas da natureza. Desempenham a função de polinizadores, especialmente no caso da polinização cruzada. As larvas são predadoras de afídeos, podendo devorar centenas de afídeos durante o seu desenvolvimento. *Pseudodorus clavatus* (Fabricius), *Ocyptamus notatus* e *Salpingogaster conopida* (Diptera: Syrphidae), são predadores de afídeos encontrados no Brasil em plantações de citros (NASCIMENTO *et al.*, 1988).

Os coccinelídeos apresentam grande atividade de busca, ocupando todos os ambientes de suas presas (STATHAS, 2000; ISIKBER & COPLAND, 2002; HOBALLAH *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2009; OMKAR & SINGH, 2006; OZGOHÇE *et al.*, 2006). Nenhuma espécie de Coleoptera é exclusivamente afidófaga, mas a maioria dos coccinelídeos alimenta-se de afídeos. Os coccinelídeos são predadores tanto na fase de larva como na adulta, tendo grande importância na limitação das populações de afídeos (ILHARCO, *op citi.*). As espécies *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763),

Pentilia egenea e *Scymnus* spp., são predadores de pulgões, encontrados em plantações de citros no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, *op cit.*).

Os crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) atuam fundamentalmente no estágio de larva, alimentando-se, os adultos, de pólen e de substâncias açucaradas, como a melada dos afídeos. Espécies como *Chrysoperla externa* (Hagen) são essencialmente predadoras tanto no estágio de larva como no de imago. Destaca-se como uma espécie promissora em controle biológico pela sua ocorrência em diversos habitats onde, geralmente, um elevado número de espécimes pode ser encontrado. As larvas de *Chrysoperla* consomem cerca de 500 afídeos durante o seu desenvolvimento e o adulto aproximadamente 1000 afídeos em 15 dias (STELZL & DEVETAK, 1999).

Os hemerobiídeos (Neuroptera: Hemerobiidae) são predadores tanto no estágio de larva como no de imago, mas, nem por isso são mais eficazes do que os crisopídeos. No Brasil, trabalhos sobre a espécie *Nusalala uruguayana* (Návas) foram realizados por SOUSA *et al.* (1989; 1990) e SOUSA & CIOCIOLA (1994; 1995).

Diversos autores registraram os principais inimigos naturais de *T. citricidus*, como coccinelídeos, sirfídeos e crisopídeos (SYMES, 1924; KATO, 1968,1969; CATLING, 1970; SCHMITT & SMITH, 1974; GONÇALVES & GONÇALVES, 1976; BARTOSZECK, 1976, 1980;. KOMAZAKI, 1981; CHAGAS *et al.*, 1982; NASCIMENTO *et al.*, 1982; ABATE, 1988; MICHAUD, 1998, 2000, 2001; MICHAUD & BELLIURE, 2001; SOUZA & CARVALHO, 2002; PARRA *et al.*, 2003; GUERREIRO *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2008).

Trabalhos sobre a voracidade e o desenvolvimento de predadores têm sido avaliados, principalmente, em estudos laboratoriais (MAELZER, 1978), mas para serem úteis tais estudos necessitam também de extensas interpretações de observações de campo (FRAZER & GILBERT, 1976; CARROLL & HOYT, 1984; MICHAUD, 2000,

2001; MICHAUD & BELLIURE, 2001; SOUZA & CARVALHO, 2002; PARRA *et al.*, 2003; GUERREIRO *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2008). Os estudos de laboratório muitas vezes ignoram ou necessariamente eliminam muitos fatores de importância para a eficácia do controle biológico no campo, principalmente para determinar a eficiência de predação, como a abundância do predador, as taxas de predação, o sucesso do desenvolvimento no campo e predação intra-guilda, dentre outros.

3.4 Serologia

A serologia tem se mostrado viável para a determinação das relações alimentares entre presa e predador por se tratar de uma técnica altamente sensível e específica.

As primeiras técnicas serológicas eram baseadas na precipitação direta (teste de precipitina) dos antígenos por mistura com os anticorpos específicos. Essa precipitação era de início, feita em tubos, o que obrigava a dispor de grandes quantidades de anticorpos e de antígenos. Posteriormente, verificou-se que a precipitação podia ser feita por mistura de gotas em lâminas de vidro, sendo os flocos típicos da reação facilmente observados ao microscópio de luz, em fundo escuro (SEQUEIRA, 1992). LEONE (1947) usando macerados de insetos inteiros utilizou testes de precipitina, através de dois métodos: método de titulação, usando a técnica do anel e medições eletroforéticas da turbidez das reações. Com este trabalho LEONE (*op. cit.*) relacionou a intensidade das reações de precipitina com a posição sistemática das espécies comparadas. A validade do uso de macerados de organismos inteiros, como base para a classificação sistemática foi discutida pelo autor. WEST (1950) ressalta a importância do teste de precipitina, na determinação das relações entre presa e predador. FOX *et al.* (1956)

através dos testes de precipitina, identificaram a predação de elaterídeos, em campo, por espécies de carabídeos e de staphylinídeos.

OUCHTERLONY (1948) introduziu uma técnica de grande interesse no diagnóstico e que ainda hoje é muito utilizada. Trata-se da dupla difusão em ágar, onde antígenos e anticorpos difundem-se no gel de ágar e, quando se encontram em proporções ótimas para reagir, formam-se linhas de precipitação, constituídas pelos complexos antígeno-anticorpo. Essas linhas atuam como barreira imuno-específica permitindo apenas a difusão de antígenos e anticorpos não relacionados. Se vários antígenos reagirem com soro contendo anticorpos específicos para um deles, a formação de uma linha contínua de precipitação traduz identidade serológica entre os antígenos enquanto que, se formar um esporão ou porção que se destaca da linha principal de precipitação, há relação serológica, mas não identidade (SEQUEIRA, *op. cit.*).

Diversos autores utilizaram a serologia para a determinação de predadores de uma determinada presa. DEMPSTER (1960) estudou os predadores do besouro *Phytodecta olivacea* Foster (Coleoptera: Chrysomelidae). DEMPSTER (1963) determinou as presas naturais, como o afídeo *Acyrtosiphon spartii* Koch, 1855 (Hemiptera: Aphididae), de três espécies de *Anthocoris* (Heteroptera: Anthocoridae) que vivem em *Sarothamnus scoparius* L. (Fabales: Fabaceae). ROTHSCILD (1966) fez uma tentativa para relacionar a mortalidade de ninfas e adultos de *Conomelus anceps* Germar (Hemiptera: Delphacidae) com o parasitismo e a predação.

TITOVA (1970) estudou as interações entre *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) e outros artrópodes. SUTTON (1970) utilizou o teste de precipitina (Ouchterlony) para determinar os predadores de *Philoscia muscorum* (Scopoli, 1763) (Crustacea: Oniscoidea: Philosciidae). PETTERSSON (1972) utilizou técnicas serológicas para estudos quantitativos da eficiência dos predadores de

Rhopalosiphum padi (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae). ASHBY (1974) realizou um estudo dos artrópodes predadores de *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) utilizando técnicas serológicas e de exclusão.

VICKERMAN & SUNDERLAND (1975) através da serologia determinaram os principais predadores de afídeos em culturas de cereais. MURRAY & SOLOMON (1978) utilizaram a eletroforese para determinar as relações alimentares entre invertebrados predadores, obtiveram vestígios de *Panonychus ulmi* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) no intestino de ácaros predadores *Typhlodromus pyri* Sheuten (Acarina: Phytoseiidae) e de *Rhopalosiphum insertum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) presentes em anthocorídeos predadores. BOREHAN & OHIAGU (1978) fizeram uma revisão e avaliação das pesquisas que utilizaram técnicas serológicas para determinação das relações entre presa-predador e taxas de predação em insetos de importância econômica. OHIAGU & BOREHAN (1978) utilizaram a serologia para determinar as relações presa-predador em insetos, e como resultados determinaram o tempo de detecção de *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea) presentes no estômago do coccinelídeo *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Discorrem sobre os detalhes da simplicidade e eficácia do testes serológicos de precipitina na avaliação das relações presa-predador, chamando a atenção para a possibilidade da estabilidade dos reagentes, antissoro e antígeno por até três semanas se mantidos a 4°C. Ressaltam, ainda as qualidades de especificidade e sensibilidade do teste, e a simplicidade dos equipamentos necessários, além da rapidez na obtenção dos resultados, em torno de 2 – 3 minutos.

SOUSA-SILVA (1980) utilizou a serologia para estudar os predadores da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). SUNDERLAND & SUTTON (1980) realizaram um estudo serológico para determinar os artrópodes

predadores de *Philoscia muscorum* (Scopoli, 1763) (Philosciidae) e *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Isopoda: Armadillididae) em ecossistema de dunas. SERVICE & ELOUARD (1980) realizaram a identificação serológica dos predadores do complexo *Simulium damnosum* Theobald (Diptera: Simuliidae) na Costa do Marfim, determinando os predadores naturais de larvas e pupas de *S. damnosum*. ONYEKA (1983) realizou estudos sobre os predadores naturais de *Culex pipiens* L. e *C. torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) na Inglaterra, presentes em recipientes artificiais e lagoas usando técnicas sorológicas.

HANCE & GRÉGOIRE-WIBO (1983) estudaram o regime alimentar de carabídeos (Coleoptera: Carabidae) através da serologia tendo como presas *Megoura viciae* e *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). CALVER (1984) realizou uma revisão dos métodos imunológicos para a determinação das dietas alimentares para a identificação de animais e plantas ingeridos por vertebrados e invertebrados. FELLER (1984) utilizou métodos sorológicos através de anticorpos taxon-específicos para identificar as conexões tróficas na teia alimentar da meiofauna de invertebrados bentônicos na Carolina do Sul (EUA). TURNER (1984) utilizou a serologia para determinar a relação da dinâmica das populações de herbívoros de epífitas arbóreas e seus potenciais predadores. LEATHWICK & WINTERBOURN (1984) utilizaram o teste de precipitina (Ouchterlony) para determinar os predadores de *Acyrtosiphon* sp. (Hemiptera: Aphididae) na cultura de alfafa (*Medicago sativa* L., Fabaceae). GOOD & GILLER (1988) através de análises eletroforéticas estudaram as relações alimentares entre Staphylinidae (Coleoptera) predadores e o afídeo *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae).

HAGLEY & ALLEN (1989; 1990) através de imunoelctroforese estudaram a predação de *Aphis pomi* DeGeer (Hemiptera: Aphididae) por aranhas da espécie

Dictyna annulipes (Araneae: Dictynidae) em folhagem de macieira; e pelos predadores polívoros: carabídeos, crisopídeos, coccinélídeos, forficulídeos, formicídeos, mirídeos e reduvíídeos. EL BANHAWY *et al.* (1993) estudaram através de eletroforese as relações alimentares entre *Sitobium avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae) e os predadores das famílias Anystidae e Mesostigma (Acari) em culturas de cereais. COREY *et al.* (1998) analisaram os hábitos alimentares de *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) em cultura de milho encontrando como presas *Rhopalosiphum maidis* Fitch, 1856 (Hemiptera: Aphididae). BORAEI *et al.* (2005) utilizaram a serologia como método complementar na análise das relações alimentares entre insetos praga e os artrópodes predadores em agroecossistemas no Egito.

No Brasil estudos sobre a utilização de ovos de *Deois flavopicta* Stål (Homoptera Cercopidae) no preparo de antissoros específicos e a determinação de predadores de *D. flavopicta* foram realizados por SOUSA-SILVA *et al.* (1988, 1990). SERRÃO *et al.* (1997) e CASSARO-SILVA *et al.* (2001) utilizaram a serologia para a identificação de predadores de *Orphulella punctata* (de Geer) (Orthoptera: Acrididae). COSTA *et al.* (2009) utilizaram a serologia para identificação de *Ascia monuste orseis* (Latreille, 1819) (Lepidoptera: Pieridae) visando à determinação de seus principais predadores. SANTOS-NETO *et al.* (2010) obtiveram antissoro específico capaz de indicar os principais predadores de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

Além da serologia outras duas técnicas vem sendo utilizadas por diversos autores, para os estudos de relações tróficas, como por exemplo os testes ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), (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; NARANJO & HAGLER, 2001; HARWOOD *et al.*, 2001; CALDER *et al.*, 2005; HAGLER, 2006; MORRIS & CAMPOS, 2006; UNRUH *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009); e os testes moleculares – PCR (Polymerase Chain Reaction) (WALKER, 1998; CHEN *et al.*, 2000; SYMONDSON, 2002; GREENSTONE & SHUFFRAN, 2003; SHEPPARD *et al.*, 2004; SHEPPARD & HARWOOD, 2005; HARPER *et al.*, 2005; HAGLER, 2006). Embora as técnicas como PCR estejam se tornando comuns, o teste serológico é o método mais acessível para a detecção de predadores em estudos de campo (BOUCHARD *et al.*, 2003 *apud* SANTOS-NETO *et al.*, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características climáticas da região de São Carlos, SP.

O município de São Carlos, SP localiza-se na região central do estado, entre as coordenadas 22° 01'S e 47° 53'W. A topografia da região é pouco ondulada e a altitude média é de 845 m. O clima é tropical de altitude com inverno seco, com temperatura média anual de 22°C, sendo a média das máximas de 35°C e a média das mínimas de 10°C. Destaca-se o mês de julho como o mais frio, com temperatura média de 16,3°C, e o de fevereiro como o mais quente, com temperatura média de 23°C. A precipitação pluvial anual é, em média, de 1502 mm, sendo agosto o mês mais seco, com 32 mm e o de dezembro, o mais chuvoso, atingindo 262 mm. O período seco, de maneira geral, inicia-se em abril, estendendo-se até setembro, e o período chuvoso, de outubro a março (BRASIL, 1987).

4.2 Localização da área de estudo

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP. O trabalho de campo foi realizado na Propriedade Agrícola Terra Roxa no município de São Carlos, SP. A propriedade possui 56 ha., e tem como principal atividade o cultivo de citrus (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), variedade “Valencia” (Figura 1). A área de plantio é formada por 9 talhões, cada um com 6 ha. Selecionou-se um talhão com plantas de nove anos e, em média, com 2,05 m de altura; localizado no

ponto de coleta: 21° 47' 144" S e 47° 55' 426" W e 710 m de altitude (Figura 2).

4.3 Coleta de predadores

As coletas dos predadores foram realizadas entre dezembro de 2007 a maio 2009, no período de 9:00 h até 14:00 h analisando-se, mensalmente, 40 plantas de citros de forma aleatória.

Os predadores foram coletados diretamente nas colônias de afídeos presentes nas plantas de citros e infestantes do campo de cultura. Predadores adultos, larvas e, ou ninfas foram levadas ao laboratório, para serem testados por dupla difusão contra o antissoro para os afídeos. Exemplares em duplicata dos predadores adultos testados serologicamente foram montados em alfinete entomológico e as larvas ou ninfas fixadas em álcool 75%, e enviados aos especialistas para identificação.

4.4 Antígenos Imunizantes

Amostras dos afídeos *T. citricidus* e *A. spiraecola* coletadas diretamente sobre as plantas de citros foram armazenadas em frascos e levadas ao laboratório. Após triagem sob microscópio estereoscópico, ninfas e adultos de cada espécie foram macerados em solução salina (0,75%) e centrifugados a 6000rpm durante 5 min. Os sobrenadantes, emulsionados com Adjuvante Freund completo (v/v) foram utilizados como antígenos na imunização de coelhos para a obtenção de antissoros específicos (Figura 3).

4.5 Obtenção do antissoro para *T. citricidus* (ASTc)

Ninfas e adultos de *T. citricidus* foram macerados em solução salina (0,75%), centrifugados a 6000rpm durante 5 min. Os sobrenadantes, emulsionados com Adjuvante Freund completo (v/v) foram utilizados como antígenos imunizantes (AgTc).

Imunizou-se um coelho macho pesando 2,5 Kg com três inoculações de 2,0 ml do antígeno AgTc. Observou-se um intervalo de quinze dias entre a primeira e a segunda inoculação, e vinte e seis dias entre a segunda e a terceira. Antes de qualquer inoculação recolheu-se uma amostra de sangue do coelho para ser utilizada como controle (C) das reações serológicas. Para obtenção do antissoro (Tabela I), recolhia-se 10 ml de sangue do animal em um frasco de vidro, através de pequenas incisões na veia marginal da sua orelha. O frasco era deixado em repouso por 2 horas, à temperatura ambiente, aproximadamente 23°C e, posteriormente, em geladeira (10°C) por 24 horas. O coágulo formado era descartado e o antissoro, recolhido e armazenado em freezer a -2°C para uso posterior nos testes serológicos homólogos e heterólogos.

4.6 Obtenção do antissoro para *A. spiraeicola* (ASAs)

Ninfas e adultos de *A. spiraeicola* foram macerados em solução salina (0,75%) e centrifugados a 6000rpm durante 5 min. Os sobrenadantes, emulsionados com Adjuvante Freund completo (v/v), foram utilizados como antígenos imunizantes (AgAs).

Imunizou-se um coelho macho pesando 2,5 Kg, com uma dose de 3,0 ml do antígeno AgAs, na região do linfonódulo (Oliveira, 1975). Antes da primeira inoculação, recolheu-se uma amostra de sangue do coelho para ser utilizada como controle (C) nas reações serológicas. Após a inoculação realizou-se uma sangria semanal no animal, durante três semanas (Tabela II). As sangrias foram realizadas

através de cortes longitudinais na veia marginal da orelha do animal, recolhendo-se, em média, 10ml de sangue em um frasco de vidro. O sangue foi mantido em repouso por 2 horas em temperatura ambiente (23° C), posteriormente, em geladeira (4 °C) por 24 horas. O coágulo formado no frasco foi descartado, e o antissoro armazenado em freezer a -2° C, para uso posterior nos testes serológicos.

4.7 Testes serológicos

Utilizou-se a técnica de dupla difusão em ágar a 1% (Ouchterlony, 1958) em tampão PBS 0,01 M, pH 7,0 (Hofling 1975) sobre lâminas para microscopia (3,0 ml de solução de ágar por lâmina de 75x25 mm). Nesse teste quando antígeno e anticorpo se encontram em concentrações equivalentes interagem e se precipitam formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação. As lâminas com os resultados positivos foram submersas por 1 h em água destilada e, posteriormente, coberta com papel de sulfite molhado deixando secar por 24 h a 25° C. Após foi fixada e corada por 5 min em amido-black 0,6% dissolvido em metanol 45%, 10% ácido acético, 45% de água destilada. O excesso de corante foi removido por quatro lavagens de 15 min em ácido acético.

Os testes homólogos foram realizados com o ASTc e extratos salinos obtidos pela maceração conjunta de formas jovens e adultas de *T. citricidus* e com o ASAs e extratos salinos obtidos pela maceração conjunta de formas jovens e adultas de *A. spiraecola*.

Os testes heterólogos foram inicialmente realizados com cada um dos antissoros e os diferentes afídeos dos citros para verificação de possíveis reações cruzadas. Posteriormente, com cada antissoro e os diferentes predadores jovens ou adultos

capturados em plantas de citros na propriedade estudada. Dos predadores adultos foram utilizados os abdômens para a realização dos testes serológicos, as ninfas e/ou larvas de predadores foram maceradas e utilizadas integralmente.

No Laboratório 40 exemplares de *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) foram mantidos em jejum por 24h. Posteriormente, esses coccinelídeos foram alimentados com 1 a 5 exemplares adultos de *T. citricidus*, e testados contra o antissoro ASTc, em duas etapas, 20 exemplares por etapa, 24h e 48h após a alimentação, respectivamente.

Predadores coletados no campo e armazenados em freezer a -2°C por um período de até 3 meses também foram testados serologicamente, para se observar a influência do período de congelamento dos antígenos nos resultados dos testes.

O título de cada um dos antissoros ASTc e ASAs foi determinado através de suas frações diluídas em solução de NaCl a 0,85% numa progressão geométrica de razão 2, em reações com os respectivos antígenos homólogos AGTc e AGAs.

4.8 Análises estatísticas

A eficiência de predação em cada amostragem mensal foi obtida a partir da razão entre o número de indivíduos de cada espécie de predador que apresentaram resultados serológicos positivos, sobre o número total de indivíduos. Para evitar uma subestimativa da eficiência de predação de espécies menos frequentes, a eficiência foi estimada apenas a partir das amostragens em que cada um dos predadores estava presente.

Os valores de porcentagem de predação foram testados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em caso positivo, os valores para os principais predadores, para as duas espécies de afídeos, foram comparados por meio do teste do

ANOVA, e em caso negativo foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Da mesma forma, para avaliação da preferência alimentar das principais espécies de predadores, em relação aos afídeos *A. spiraecola* e *T. citricidus*, foi utilizado o teste t ou o teste de Mann-Whitney. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%

5. RESULTADOS

5.1 Reações serológicas com o ASTc

As reações homólogas foram positivas já a partir do sétimo dia após a primeira inoculação do antígeno no coelho (Tabela III e Figura 4).

A titulação máxima dos antissoros foi de 1/32 (Figura 5).

Reações cruzadas foram observadas entre o ASTc e ninfas e adultos de *A. spiraecola* (Figura 6A). A partir desse resultado esse antissoro foi purificado através da adição de macerado de ninfas e adultos de *A. spiraecola*, na proporção de duas partes do antissoro para uma parte do macerado (Figura 6B).

As reações homólogas realizadas com os exemplares de *T. citricidus*, em diferentes estágios de desenvolvimento resultaram em duas linhas de precipitação com adultos alados, três linhas com adultos ápteros, duas linhas com ninfas de alados e uma linha com ninfas de ápteros (Figura 7).

Os resultados dos testes serológicos realizados entre o ASTc e exemplares de *C. sanguinea* alimentados em laboratório com adultos ápteros de *T. citricidus* foram diferentes para os intervalos de tempo após a alimentação do predador e para as quantidades de afídeos predados. Observou-se um máximo de 2 linhas de precipitação nos testes realizados até 24 h após a alimentação com predadores que consumiram apenas um afídeo. Nos testes com predadores que se alimentaram de 2 afídeos foram observadas um máximo de 2 linhas de precipitação; predadores alimentados com 3 afídeos mostraram apenas uma linha de precipitação nos testes serológicos (Tabela IV). Nas reações serológicas realizadas 48 h após a alimentação do predador nenhuma linha

de precipitação foi observada após o consumo de 1 afídeo; predadores alimentados com 2 afídeos mostraram apenas 1 linha de precipitação e predadores alimentados com 3 afídeos não mostraram linhas de precipitação (Tabela V).

Reações serológicas positivas também foram observadas com os macerados de exemplares de *C. sanguinea* (28 exemplares coletados em campo, seis reagiram positivamente ao ASTc e ao ASAs) e *H. axyridis* (um exemplar coletado reagiu positivamente ao ASTc e ao ASAs), referentes as coletas de agosto de 2008 e armazenados a -2°C durante 3 meses.

Foram capturados no campo, junto às colônias de afídeos e testados em laboratório, 404 exemplares de artrópodes dentre coccinelídeos (Coleoptera: Coccinellidae), crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae), sirfídeos (Diptera: Syrphidae), heterópteros (Heteroptera: Reduviidae) e aracnídeos (Araneae: Salticidae). A maioria, dos predadores capturados e testados, 91%, foi representada pelos coccinelídeos (Tabela VI).

As reações serológicas desses predadores com o ASTc foram positivas com os coccinelídeos *Azya luteipes* (Mulsant), *Cycloneda conjugata* (Mulsant 1850), *C. sanguinea*, *Harmonia axyridis* (Pallas), *H. convergens*, *Olla v-nigrum* (Germ. 1824) e *Scymnus* sp.; larvas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861); larvas de *Pseudodorus clavatus* (Fabricius, 1794); ninfas de reduviídeos e exemplares de salticídeos. Dentre esses *C. sanguinea* foi a mais freqüente, com 316 exemplares e 25% dos resultados positivos. Para *H. convergens* e *H. axyridis* foram capturados 24 e 19 exemplares, observando-se 37,5% e 36,8% de reações positivas, respectivamente (Tabela VII e Figura 8). Foram capturados três exemplares de *Azya luteipes*, dois de *C. conjugata* e um de *Olla v-nigrum* e *Scymnus* sp., apresentando, respectivamente, 66.7%, 100%,

100% e 100% de reações positivas. Foram coletadas e testadas 11 larvas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861), oito reagiram positivamente ao ASTc. Dos 11 exemplares de reduvídeos dois mostraram reações serológicas positivas. Foram coletadas sete larvas de *P. clavatus*, dessas, três reagiram positivamente ao ASTc. Dentre os nove salticídeos capturados e testados, dois reagiram positivamente.

Apesar de *C. sanguinea* ter sido o predador mais abundante, e com maior número de resultados serológicos positivos, quando se comparou sua eficiência de predação com *H. convergens* e *H. axyridis* não se observou diferença significativa entre elas (Kruskall-Wallis: $H=0,440$; $p=0,803$).

5.2 Reações Serológicas com o ASAs

Reações positivas foram observadas nos testes serológicos homólogos a partir do sétimo dia após a primeira inoculação do antígeno no coelho permitindo observar duas linhas de precipitação (Tabela VIII e Figura 9).

A titulação máxima dos antissoros foi de 1/32 (Figura 10).

Não foram observadas reações cruzadas com os afídeos *A. gossypii*, *T. aurantii* e *T. citricidus*.

As reações serológicas de predadores com o ASAs foram positivas para os coccinelídeos *A. luteipes* (Mulsant), *C. sanguinea*, *H. axyridis* (Pallas), *H. convergens* e *Scymnus* sp.; larvas de *C. externa*; larvas de *P. clavatus*; um reduvídeo e um salticídeo.

Setenta e cinco exemplares de *C. sanguinea* reagiram positivamente com o ASAs; em menores números *H. convergens*, e *H. axyridis*, com 6 e 10 exemplares, respectivamente (Tabela VIII e Figura 11). Dos três exemplares de *A. luteipes* coletados, dois, foram positivos nos testes serológicos. O único exemplar de *Scymnus* sp. coletado apresentou reação positiva com o ASAs. Dentre as larvas de crisopídeos apenas um exemplar de *C. externa* reagiu positivamente. Para as larvas de sirfídeos coletadas, duas de *P. clavatus* reagiram positivamente. Dos 11 reduvídeos, apenas um reagiu positivamente ao ASAs. Dentre os salticídeos capturados, apenas um exemplar reagiu positivamente.

Apesar de *C. sanguinea* ter sido o predador mais abundante, e com maior número de resultados serológicos positivos, quando se comparou sua eficiência de predação com *H. convergens* e *H. axyridis* não se observou diferença significativa entre elas (Kruskall-Wallis: $H= 0,520$; $p= 0,773$).

Os predadores *C. sanguinea* (Mann-Whitney $U=113$, $p=0,584$), *H. convergens* ($U= 42$, $p=0,522$) e *H. axyridis* ($U=57$, $p=0,828$) não apresentaram diferenças estatísticas significativas na preferência pelo *A. spiraecola* ou *T. citricidus* (Figura 12).

6. DISCUSSÃO

Os resultados positivos observados nas reações serológicas homólogas, a partir do sétimo dia após a primeira inoculação do antígeno no coelho, demonstram a eficiência do processo de imunização através de inoculações via linfonódulo. A rapidez no tempo de respostas positivas para reações serológicas também foram observadas por OLIVEIRA (1975); HOFLING (1975); SOUSA-SILVA (1980, 1985, 1988); CASSARO-SILVA (2001) e COSTA *et al.* (2009) quando utilizaram inoculações via linfonódulo para obtenção de antissoros específicos. MOLLET & AMBRUST (1977) empregando injeções intramusculares e endovenosas para a imunização de coelhos, com antígeno de *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae) só observaram resultados positivos após 40 dias da primeira inoculação.

Os títulos máximos dos antissoros para *T. citricidus* (ASTc) e *A. spiraecola* (ASAs) foram, ambos, 1/32, ou seja, partículas dos afídeos predados puderam, ainda, ser detectadas no interior do predador, mesmo diluídas 32 vezes, permitindo com as condições de especificidade e sensibilidade necessárias, determinar predadores dos afídeos *T. citricidus* e *A. spiraecola*, analisar preferências alimentares dos predadores em relação a esses afídeos e estudos de eficiência de predação.

O valor do título dos antissoros pode variar de acordo com o poder antigênico da proteína injetada no coelho e, também, com o número de inoculações que são realizadas. Entretanto, antissoros com altos títulos podem levar ao aparecimento de reações cruzadas, como enfatiza DEMPSTER (1960). TITOVA (1970) obteve um antissoro contra *Eurigaster integriceps* Put (Heteroptera: Scutelleridae) com um título de 1:10.000 após repetidas injeções do antígeno em coelho. Entretanto, como observado pela própria autora, o elevado título acarretou perda da especificidade do antissoro.

Outros autores realizaram estudos de relações alimentares utilizando antissoros com títulos menores. SANTOS-NETO *et al.* (2010) obtiveram um antissoro para *S. frugiperda* com título de 1/8, tendo sido suficiente para reconhecer predadores da lagarta. SOUSA-SILVA (1980) utilizou um antissoro para lagartas do 5^o estágio de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1774 (Lepidoptera: Pyralidae), com título máximo de 1/32, para determinar predadores da mariposa. O mesmo autor, em 1985, obteve antissoros específicos para três diferentes estágios de desenvolvimento de ovos de *D. flavopicta*; recém ovipositados, com presença de opérculo e em diapausa, com títulos de 1/32, 1/4 e 1/32, respectivamente, para estudar as relações alimentares deste inseto e seus predadores.

Em relação aos resultados observados nos testes serológicos comparando-se os estágios fisiológicos de *T. citricidus*, as variações observadas no número de linhas de precipitação podem estar relacionadas às diferenças qualitativas e quantitativas das composições protéicas presentes em cada uma das formas aladas ou ápteras; jovens ou adultas, uma vez que o processo de metamorfose dos insetos é acompanhado por alterações na sua morfologia e fisiologia. SOUSA-SILVA (1985) observa que diferenças no número de linhas de precipitação nas reações serológicas refletem o conjunto de proteínas inerentes a fase de desenvolvimento do inseto que foi utilizado como antígeno e mostram a importância de ser considerada no preparo de antissoros específicos, porém para os estudos aqui realizados é importante que se tenha maior espectro de antígenos imunizantes. Da mesma maneira, LEVENBOOK (1985) observa que os estágios fisiológicos dos insetos são refletidos pelas proteínas presentes em sua hemolinfa, como lipoforinas, arilforinas e hexamerinas. SOUSA-SILVA *et al.* (1988) observaram respostas diferentes no número de linhas de precipitação em reações serológicas realizadas com antígenos para ovos, ninfas e adultos de *D. flavopicta* e o

antissoro homólogo. COSTA *et al.* (2009) encontraram diferenças no número de linhas de precipitação nas reações serológicas homólogas realizadas entre o antissoro obtido para *Ascia monustes* (Lepidoptera: Pieridae) e os macerados dos diferentes estágios do inseto. Lagartas do quarto e quinto estádios, pupas e adultos apresentaram maior número de linhas de precipitação do que lagartas do primeiro, segundo e terceiro estádios, possivelmente pelas diferenças de componentes antigênicos nos diversos estádios, capazes de reagir ao antissoro. KRAMER *et al.* (1980) observam que durante os últimos estádios juvenis, quando o consumo de alimentos é máximo, uma classe de proteínas, denominadas proteínas de armazenamento, acumula-se na hemolinfa do inseto. CHAN *et al.* (2006) realizaram um estudo proteômico quantitativo e qualitativo da hemolinfa de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e encontraram diferenças significativas na sua composição protéica, especialmente para larva, operária, zangão e rainha.

Os resultados positivos observados nos testes serológicos entre *C. sanguinea* e o antissoro ASTc mostram um número variável de linhas de precipitação relacionado com o tempo decorrido após a alimentação do predador, número de presas consumidas, e com o próprio título do antissoro. DEMPSTER (1960) obteve reações específicas em testes de precipitina até 24 h após a alimentação de mirídeos (Heteroptera: Miridae) e antocorídeos (Heteroptera: Anthocoridae) com um adulto de *P. olivacea*, enquanto forfícula (Dermaptera: Forficulidae) reagiu até 30 h após ter comido um ovo do inseto e, até 5 dias, após ter comido uma larva do último instar de *P. olivacea*. TITOVA (1970) obteve reações específicas pelo método de dupla difusão em agar, até três dias, após ter alimentado aranhas com uma única ninfa do 5º. instar de *E. integriceps*. Algumas vezes os processos metabólicos ocorrem com muita rapidez, prejudicando a determinação dessas relações alimentares. MOLLET & ARMBRUST (1977) obtiveram um antissoro

contra *H. postica* inadequado para os estudos de predação específica devido à rápida degradação do antígeno pelo predador. OHIAGU & BOREHAM (1978), a partir de teste serológico de aglutinação, detectaram a presença de *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em macerados do conteúdo estomacal de *Coccinella septempunctata* (Linnaeus, 1758) em 50% dos predadores testados até 24 h após a ingestão do afídeo e, em 25% dos testes até 48 h após. SOUSA-SILVA (1980) a partir de um antissoro específico para *D. saccharalis* observou respostas positivas nos testes serológicos até 24 h após a alimentação de aranhas com uma única lagarta do 5º estágio da lagarta. McIVER (1981) estudando os hábitos alimentares da aranha *Pardosa sternalis* (Thorell, 1877) (Araneae: Lycosidae) observou que as respostas dos testes serológicos foram significativamente influenciadas pela quantidade da presa consumida, pelo tempo decorrido da alimentação, e pela temperatura na qual a aranha era mantida após ter se alimentado. O tempo máximo de detecção do antígeno na aranha alimentada com várias presas foi de 200 h. ONYEKA (1983) utilizando a serologia para determinar os principais predadores de *Culex pipiens* L. e *Culex torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) observaram reações positivas nos testes serológicos com o predador *Ischnura elegans* (van der Linden) (Odonata: Coenagrionidae) até 24 h após terem sido ingeridos. LEATHWICK & WINTERBOURN (1984) através da serologia determinaram os principais artrópodes predadores de *Acyrtosiphon kondoi* Shinji e *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae) em cultura de alfafa, *Medicago sativa* L. (Fabaceae). As reações foram positivas até 6 h após as coletas; observaram reações muito fracas ou ausentes após 12 h, sendo este período o tempo máximo para a detecção da presa no predador. Além do tempo após a alimentação, outra variável importante que influencia o tempo para a determinação de predadores é a velocidade com que o predador metaboliza a presa, após passar por um período de jejum. LOVEI *et al.* (1985)

realizaram estudos correlacionando taxa de digestão e jejum em larvas de *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae) e observaram que o consumo de presas aumentou exponencialmente após um período de 7 dias de jejum do predador e que a taxa de declínio do material imunoreativo parece ser logarítmica. SOUSA-SILVA *et al.* (1990) utilizando a serologia para determinação de predadores de *D. saccharalis* realizaram testes de laboratório com aranhas e percevejos alimentados com lagartas do inseto, e observaram reações positivas com percevejos até 96 h após a alimentação e com aranhas, no máximo após 24 h. Diferentemente do resultado observado por SOUSA-SILVA *et al.* (*op. cit.*) ANDERSON (1970) *apud* GREENSTONE & HUNT (1993), observam que nas aranhas, o jejum diminui sua taxa metabólica, digerindo suas presas mais lentamente do que muitos outros predadores (HARWOOD *et al.*, 2001). Estes resultados mostram que as diferenças na velocidade de processamento da presa pelos diversos predadores devem ser levadas em conta em pesquisas com serologia. O congelamento dos predadores pode ter influenciado na quantidade de resultados positivos das reações serológicas, durante a amostragem realizada no período de agosto de 2008. De acordo com CASSARO-SILVA, *et al.* (2001) os testes, preferencialmente, devem ser realizados logo após a captura do predador. Quando isto não for possível, o material deve ser congelado, evitando-se a continuidade do processo digestivo e, dessa maneira, preservando-se as características protéicas da presa. Esse procedimento foi realizado por COREY *et al.* (1998) e HARWOOD *et al.* (2004, 2005) resfriando rapidamente predadores coletados em campo para diminuir o processo metabólico e, dessa maneira, buscando preservar a qualidade da presa em seu interior e garantindo maior número de resultados positivos nas reações imunológicas em estudo de relações presa/predador.

Além das taxas metabólicas de cada predador, do período de jejum e do tempo decorrido para a realização dos testes serológicos após o predador ter consumido a presa, do rápido resfriamento dos predadores para conservação da presa consumida, também, a temperatura em que o teste é realizado pode influenciar os resultados observados. SOPP & SUNDERLAND (1989) constataram que a alta temperatura prejudicou a sensibilidade da análise do conteúdo estomacal de seus predadores. HAGLER & NARANJO (1997) concluíram que há um declínio muito rápido no intervalo de detecção de presas a uma temperatura acima de 30°C.

Os coccinelídeos, aracnídeos, heterópteros, sirfídeos e neurópteros coletados no presente trabalho e que responderam positivamente aos testes serológicos realizados, também são citados por diferentes autores como predadores de *T. citricidus* e *A. spiraecola* em diversas partes do mundo, mas a frequência com que cada grupo é coletado e a ação predatória que desempenham, quando comparados, podem diferir para diferentes regiões. No presente trabalho o predador mais frequente durante as coletas realizadas foi *C. sanguinea*. Estes dados diferem daqueles encontrados por GUERREIRO *et al.* (2005) que relatam para o interior do estado de São Paulo, *Diomus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae) como a espécie mais abundante e constante no agroecossistema citrícola, seguida de *C. sanguinea* e *Scymnus* sp., sendo *Scymnus* sp. classificada como uma espécie acessória e de relação secundária com o *T. citricidus*. RODRIGUES *et al.* (2008) observaram a presença de 11 espécies de coccinelídeos em culturas de citros no estado do Rio de Janeiro, com destaque para as espécies *A. luteipes*, *C. sanguinea*, *O. v-nigrum*, *Scymnus* sp. e *Pentilia egena* (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae), sendo esta última, constatada pelos autores como a espécie com maior média populacional.

Durante as coletas de predadores observou-se que os coccinelídeos apresentavam grande atividade de busca, onde *C. sanguinea* era a mais abundante, mas como demonstrado pelos testes estatísticos, não houve diferenças estatísticas significativas entre as espécies comparadas, *H. convergens* e *H. axyridis* em relação as suas eficiências predatórias, constatadas pelos testes serológicos. MICHAUD (1999), na Flórida, observou que *C. sanguinea* e *H. axyridis*, foram os coccinelídeos mais eficientes no controle de *T. citricidus*.

Em relação a *C. sanguinea* todas as outras espécies de coccinelídeos foram coletadas em número reduzido, o que poderia estar relacionado a diversos fatores como a interferência específica de químicos utilizados na área estudada, a baixa população inerente àquelas espécies, a possibilidade de coletas direcionadas, uma vez que *C. sanguinea* com sua coloração avermelhada se destaca das outras espécies, ou mesmo a existência de competição entre as espécies. Nesse aspecto, como observado por MICHAUD (2002) e ARAÚJO-SIQUEIRA & ALMEIDA (2006) a presença de *H. axyridis* influencia o deslocamento de espécies nativas, ocasionando a diminuição da abundância de coccinelídeos e a redução de suas populações, principalmente de *C. sanguinea*. Em relação a *H. convergens* MICHAUD (2000) relata que as larvas dessa espécie não completam o seu desenvolvimento em colônias de *T. citricidus* e que as fêmeas produzem ovos inférteis quando mantidas em colônias deste afídeo. Este fato envolvendo diretamente a sobrevivência do predador pode, também, explicar o reduzido número de outros coccinelídeos em áreas com abundância de *T. citricidus*, como a do presente trabalho.

Na predação de *A. spiraecola*, *C. sanguinea* também foi à espécie com o maior número de resultados serológicos positivos, mas também não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação à *H. convergens* e *H. axyridis*. BRUNER *et al.*

(1975) relataram *C. sanguinea*, *H. convergens* e larvas de sirfídeos como inimigos naturais em trabalhos realizados em citricultura cubana. Entretanto, para o mesmo país, PEREZ (1980) menciona *Chilocorus stigma* (Say) (Coleoptera: Coccinellidae) e larvas pertencentes à família Chrysopidae como os principais inimigos naturais de *A. spiraecola*.

Dos onze exemplares de *C. externa* capturados no presente trabalho, aproximadamente 73% responderam positivamente aos testes serológicos com o ASTc mostrando que são eficientes predadores de *T. citricidus*. No Brasil SOUZA & CARVALHO (2002) destacam que *C. externa* apresenta potencial para o controle de afídeos em diversas culturas, dentre estas nos citros. MICHAUD (2001) relatou que os crisopídeos podem reduzir colônias de *T. citricidus* antes do surgimento das formas aladas evitando a dispersão e a possível formação de uma nova colônia. A abundância de crisopídeos na cultura de citros também está relacionada a disponibilidade de pólen e abrigos, fornecidos por plantas infestantes muito freqüentes neste tipo de agroecossistema como por exemplo, espécies da família Compositae (Asteraceae) (ALTIERI & WHITCOMB, 1979; COSTA, 2006).

Embora com apenas três resultados serologicamente positivos para o ASTc e dois para o ASAs dentre as sete larvas de *P. clavatus* coletadas os sirfídeos são considerados os mais eficientes predadores de afídeos em diversas culturas. Desempenham um papel importante no controle das populações de *T. citricidus*, sendo *P. clavatus* na Flórida, e *Ocyptamus fuscipennis* em Porto Rico (MICHAUD & BELLIURE, 2001). Estes autores constataram a predação de *A. spiraecola* por larvas de *P. clavatus* e, ao avaliarem o impacto da predação na produção de alados em colônias de *T. citricidus* verificaram uma redução significativa na densidade populacional desses afídeos. No Brasil as espécies de sirfídeos relatadas como predadoras de *T. citricidus*

são: *Allograpta exotica* (Wiedemann, 1830), *Ocyptamus* sp., *O. gastrostactus* (Wiedemann, 1830), *O. notatus* (Coquillett, 1902), *P. clavatus* (Fabricius, 1794), *Salpingogaster conopida* (Philippi, 1865) e *Syrphus phaeostigma* (Wiedemann, 1830) (SCHMITT & SMITH, 1974; BARTOSZECK, 1976; NASCIMENTO *et al.*, 1988).

A predação de afídeos por reduvídeos na citricultura foi relatada apenas para *Zelus* sp. (Heteroptera: Reduviidae) por LEON (2005), provavelmente possa ser essa espécie que reagiu positivamente aos testes serológicos com o ASTc e com o ASAs. Uma outra citada pelo mesmo autor é *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae).

As aranhas estão presentes em quase todo o tipo de cultura e são consideradas importantes agentes de controle biológico. No presente trabalho resultados positivos foram observados com salticídeos, entretanto Linyphidae (Araneae) e Thomisidae (Araneae) são consideradas as famílias mais importantes na predação de afídeos em geral (UETZ *et al.* 1999). LANG *et al.* (1999) estudou a predação de insetos herbívoros na cultura do milho por coleópteros e aranhas de solo e relatou a importância da redução populacional de afídeos causada pelas aranhas.

Algumas vezes com a técnica da observação direta constata-se a presença do predador nas colônias dos afídeos, sem, no entanto verificar-se o ato predatório. Com o uso da técnica serológica as reações positivas entre os antígenos e os antissoros indicam, efetivamente, a predação aos afídeos estudados. Outro aspecto importante proporcionado pela técnica é a possibilidade de expressar valores absolutos do número de predadores que efetivamente se alimentaram da presa, em relação ao total capturado ou simplesmente observado. Essa é uma informação valiosa uma vez que pode auxiliar nas decisões de escolha ou de estímulo ao desenvolvimento de inimigos naturais mais indicados em programas de controle biológico.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que foi possível obter antissoro para *T. citricidus* e *A. spiraeicola* e esse antissoro mostrou-se adequado para qualificar seus predadores. O número de linhas de precipitação observado nas reações serológicas reduz-se com o passar do período de alimentação do predador. Não houve diferenças significativas entre *C. sanguinea*, *H. convergens* e *H. axyridis* quanto as suas eficiências de predação. Os predadores *C sanguinea*, *H convergens* e *H axyridis* não apresentaram diferenças na preferência alimentar para *A. spiraeicola* ou *T. citricidus*.

8. REFERÊNCIAS

- ABATE, T. 1988. The identity and bionomics of insect vectors of tristeza and greening diseases of *Citrus* in Ethiopia. **Tropical Pest Management** **34**: 19–23.
- ADAMI, A.C.O. 2010. **Risco e retorno de investimento em citros no Brasil**. 150p. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”(USP), Piracicaba.
- ALTIERI, M. A. & W. H. WHITCOMB. 1979. The potential use of weeds in the manipulation of beneficial insects. **HortScience** **14** (1): 12-18.
- ANDERSON, J. F. 1970. Metabolic rates of spiders. **Comparative Biochemistry and Physiology** **33**: 51-72.
- ARAÚJO-SIQUEIRA, M. & L. M. ALMEIDA. 2006. Estudo das espécies brasileiras de *Cycloneda* Crotch (Coleoptera, Coccinellidae). **Revista Brasileira de Zoologia** **23** (2): 550-568.
- ASHBY, J.W. 1974. A Study of Arthropod Predation of *Pieris rapae* L. using Serological and Exclusion Techniques. **Journal of Applied Ecology** **11** (2): 419-425.
- BARBAGALLO, S. & I. PATTI. 1986. The citrus aphids: Behavior, damage and integrated control. In: “**Commission of the European Communities Proceeding. Expert Meeting**, Acreale, Italy, March 6-9, 1986”, pgs. 67-75.
- BARTOSZECK, A. B. 1976. Afídeos de laranjeira (*Citrus sinensis* Osb.) e mimoseira (*Citrus reticulata* B.), seus predadores e parasitas. **Acta Biologica Paranaense** **5** (12): 15-48.
- BARTOSZECK, A.B., 1980. The occurrence of *Toxoptera citricidus* (Homoptera: Aphididae) and its natural enemies in Imperatriz, Maranao, Brazil. **Dusenía** **12**: 9–13.

- BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R. & BOVÉ, J. M. 2003. Spatial and temporal analyses of Citrus Sudden Death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology** **93**: 502-512,.
- BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T. & GIMENES-FERNANDES, N. 2002. Progresso dos sintomas de “morte súbita” em pomares de laranjeiras ‘Valência’ e ‘Pêra’. *In*: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 25, 2002, Espírito Santo do Pinhal. **Programa e resumos...** Espírito Santo do Pinhal, Sociedade Paulista de Fitopatologia, p.80.
- BASSANEZI, R.B. & F.F. LARANJEIRA. 2007. Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. **Plant Pathology** **56**: 97–106.
- BECK, J. B. & S. TOFT. 2000. Artificial selection for aphid tolerance in the polyphagous predator *Leptopyphantes tenuis*. **Journal of Applied Ecology** **37** (4): 547-556.
- BLACKMAN, R.L. & V.F. EASTOP. 1984. **Aphids on the World’s Crops: An identification guide**. Wallingford, CAB INTERNATIONAL, 986 p
- BLACKMAN, R.L. & V.F. EASTOP. 1994. **Aphids on the World’s Trees: An Identification and Information Guide**. Wallingford, CAB INTERNATIONAL, 986.
- BORAEI, H.A.; YOUSSEF, A. E.; EL-KADY, E.M. & A. A. FARAG. 2005. 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.

- BOREHAM, P.F.L. & C.E. OHIAGU. 1978: The use of serology in evaluating invertebrate predator-prey relationships: a review. **Bulletin of Entomological Research** **68**: 171–194.
- BORROR, D. J. & M. D. DELONG. 1988. **Introdução ao estudo dos insetos**. Edgard Blucher Ltda. 653 p.
- BOUCHARD, E; MICHAUD, D & C. CLOUTIER. 2003. Molecular interactions between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine proteinase inhibitor from rice. **Molecular Biology** **12**: 2429-2437.
- BRASIL. 1987. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Informações Básicas Municipais. Município de São Carlos, São Paulo, 10 p.
- BRASIL. 2008. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – Comércio exterior. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br>>.
- BRUNER, S.C., SCARAMUZZA, L.C. & A.R. OTERO. 1975. Catálogo de los insectos que atacan las plantas económicas de Cuba. Segunda edición. Academia de Ciencias de Cuba. Ciudad de la Habana. p 394.
- BUENO, V.H.P. 2000. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**, (ed.) Lavras: UFLA, 207 p.
- CALDER, C.R., J.D. HARWOOD & W.O.C. SYMONDSON. 2005. Detection of scavenged material in the guts of predators using monoclonal antibodies: a significant source of error in measurement of predation? **Bulletin of Entomological Research** **95**: 57-62.
- CALVER. M. C. 1984. A review of ecological applications of immunological techniques for diet analysis. **Austral Ecology** **9** (1): 19-25.

- CARROL, D.P. & S.C. HOYAT. 1984. Natural Enemies and their effects on apple aphid *Aphis pomi* De Geer (Homoptera: Aphididae), colonies on young apple trees in central Washington. **Environmental Entomology** **13**: 469-481.
- CARVER, M. 1989. Biological control of aphids. In A. K. Minks & P. Harrewijn (eds.), **Aphids, their biology, natural enemies and control**. Série World Crop Pests, vol 2C, pp. 141-165. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- CARVER, M. 1978. The Black citrus aphids, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) and *T. aurantii* (Boyer de Foscolombe) (Homoptera: Aphididae). **Journal of the Australian Entomological Society** **17**:263-270.
- CASSARO-SILVA, M.; SERRÃO, J. E.; SOUSA-SILVA, C. R. & J. M. PACHECO. 2001. Identificação de predadores de *Orphulella punctata* (de Geer) (Orthoptera: Acrididae) através da serologia. **Revista Brasileira de Zoologia** **18**: 75–79.
- CATLING, H.D. 1970. The bionomics of the South African citrus psylla *Trioza erytrae* (DelGuercio) (Homoptera: Psyllidae) 4. The influence of predators. **Journal of the Entomological Society of South Africa** **33**: 341–348.
- CHAGAS, E.F.D.; NETO, S.S.; BRAZ, A.J.B.P.; MATEUS, C.P.B. & I.P. COELHO. 1982. Population fluctuations of pest and predator insects in citrus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **17**: 817–824.
- CHAN, Q.W.T; HOWES, C.G & L. J. FOSTER. 2006. Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. **Molecular & Cellular Proteomics** **5**: 2252-2262.
- CHEN, Y.; GILES, K. L.; PAYTON, M. E. & M. H. GREENSTONE. 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. **Molecular Ecology** **9**: 1887–1898.

- COREY, D.; KAMBHAMPATI, S. & G.E. WILDE. 1998: Electrophoretic analysis of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) feeding habits in field corn. **Journal of the Kansas Entomological Society** **71**: 11–17.
- COSTA, A.S. & T.J. GRANT. 1951. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. **Phytopathology** **16**: 105-133.
- COSTA, F.; LOFFREDO, A.P.; ONODY, H.C. & C.R. SOUSA-SILVA. 2009. Utilização da serologia na identificação de *Ascia monuste orseis* (Latreille, 1819) (Lepidoptera: Pieridae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** **31** (2): 149-151.
- COSTA, F. 2006. Ocorrência de espécies de afídeos em citros (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) seus predadores e parasitóides. Universidade Federal de São Carlos São Carlos/SP. 2006. 79P. Tese de Mestrado.
- COULSON, R.N. & J.A. WITTER. 1984. Principles of population modification and regulation using artificial and natural agents. *In* **Forest entomology: ecology and management**. New York: John Wiley & Sons. p. 193-251.
- De BACH, P. & D. ROSEN. 1991. **Biological control by natural enemies**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 440 p.
- DELORME, R. 1996. Résistance aux insecticides chez les pucerons. **PHM Revue Horticole** **369**: 29-33.
- DEMPSTER, J.P. 1960. 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** **29**: 149-167.
- DEMPSTER, J.P. 1963: The natural prey of three species of *Anthocoris* (Heteroptera: Anthocoridae) living on broom (*Sarothamnus scoparius* L.). **Entomologia Experimentalis et Applicata** **7**: 149–154.

- EASTOP, V.F. 1966. A taxonomic study of Australian Aphidoidea (Homoptera). **Australian Journal of Zoology 14**: 399-592.
- EL BANHAWY, E.M., CARTER, N. & I.R. WYNNE.1993: Preliminary observations on the population development of anystid and free-living mesostigmatic mites in a cereal field in southern England. **Experimental and Applied Acarology 17**: 541–549.
- FAO. Citrus commodity notes: developments in international citrus trade 2005-2006. Disponivel em: [http://www.fao.org/es/esc/en/20953/20990/highlight 28187 en.htm](http://www.fao.org/es/esc/en/20953/20990/highlight%2028187%20en.htm).
- FELLER, R.J.1984. Serological tracers of meiofaunal food webs. **Hydrobiologia 118 (1)**: 119-125.
- FIGUEIREDO, M.G. 2008. **Retorno econômico dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P & D) na citricultura paulista**. 153 p. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz, USP, Piracicaba.
- FOX, C.J.S. & C.R. MacLELLAN. 1956. Some Carabidae and Staphylinidae shown to feed on a wireworm, *Agriotes sputator* (L.), by the precipitin test. **Canadian Entomologist 88**: 228-231.
- FRAZER, B.D. & N. GILBERT. 1976. Coccinellids and aphids: a quantitative study of the impact of adult ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) preying on field populations of pea aphids(Homoptera: Aphididae). **Journal of the Entomological Society of British Columbia 73**: 33–56.
- FUNDECITRUS. 2005. Pragas e doenças dos citros. Disponível em www.fundecitrus.com.br
- GARCIA, S. 2009. Doença do Greening ameaça o futuro da citricultura brasileira. Notícias. Disponível em: <http://www.gtacc.com.br/>.

- GIMENES-FERNANDES, N. & BASSANEZI, R.B. 2001. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopatologica** 27: 93.
- GONCALVES, C.R. & A.J.L. GONCALVES, 1976. Observations on syrphid flies as predators of homopterous insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 5: 3–10.
- GOOD, J.A. & P.S. GILLER. 1988: Impact of crop management on staphylinid diet variability: a preliminary evaluation of electrophoretic prey detection. **Ecological Bulletins** 39: 94–96.
- GREENSTONE, M. H. & J.H. HUNT. 1993. Determination of prey antigen half-life in *Polistes metricus* using a monoclonal antibody-based immunodot assay.. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 68:1 -7.
- GREENSTONE, M.H. & K.A. SHUFRAN. 2003: Spider predation:species-specific identification of gut contents by polymerase chain reaction. **Journal of Arachnology** 31: 131–134..
- GUERREIRO, J. C.; BUENO, P. R. R.; BERTI, E. & A.C. BUSSOLI. 2005. Ocorrência Estacional das principais espécies de Coccinellidae predadores de *Toxoptera citricida* nos citros. **Revista científica eletrônica de agronomia** 7: 1–14.
- HAGLER, J.R. & S.E. NARANJO. 1997. 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.
- HAGLER, J.R.; NARANJO, S.E.; ERICKSON, M.L.; MACHTLEY, S.A. & S.F. WRIGHT. 1997. 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.

- HAGLER, J.R. 2006. Development of an immunological technique for identifying multiple predator–prey interactions in a complex arthropod assemblage. **Annals of Applied Biology** **149** (2): 153-165.
- HAGLEY, E.A.C. & W.R. ALLEN. 1989: Prey of the cribellate spider, *Dictyna annulipes* (Araneae, Dictynidae), on apple tree foliage. **Journal of Arachnology** **17**: 366–367.
- HAGLEY, E.A.C. & W.R. ALLEN. 1990: The green aphid, *Aphis pomi* DeGeer (Homoptera: Aphididae), as prey of polyphagous arthropod predators in Ontario. **Canadian Entomologist** **122**:1221–1228.
- HALBERT, S.E. & L.G. BROWN. 1996. *Toxoptera citricidus* (Kirkald), brown citrus aphid. Identification, biology, and management strategies. FL. Dep. Agric. and Cons. Serv. Div. Plant Industry. **Entomology cir. n. 374**.
- HANCE, T. & C. GRÉGOIRE-WIBO. 1983: Étude du régime alimentaire des Carabidae par voie sérologique. In: Lebrun P., André H., De Medts A., Grégoire-Wibo C. & Wauthy G. (eds): **New Trends In Soil Biology**. Imprimerie Dieu Brichart, Ottignies-Louvain, Belgium, pp. 620–622.
- HARPER G.L., KING R.A., DODD C.S., HARWOOD J.D., GLEN D.M., BRUFORD M.W. & SYMONDSON W.O.C. 2005: Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. **Molecular Ecology** **14**: 819–828.
- HARWOOD, J.D.; S.W. PHILLIPS; K.D., SUNDERLAND & W O.C. SYMONDSON 2001: Secondary predation: quantification of food chain errors in an aphid-spider-carabid system using monoclonal antibodies. **Molecular Ecology** **10**: 2049-2057.
- HARWOOD, J.D.; SUNDERLAND, K.D. & W.O.C. SYMONDSON. 2004. 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.

- HARWOOD, J.D.; SUNDERLAND, K.D. & W.O.C. SYMONDSON. 2005. 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.
- HOBALLAH, M.E., DEGEN, T; BERGVINSON, D; SAVIDAN, A & C. TAMÒ. 2004. Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical Lowlands of Mexico. **Agricultural and Forest Entomology** **6**: 83-88.
- HOFLING, J. F. 1975. **Reações serológicas com antígenos presentes em sementes de *Coffea arabica* L.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia UNICAMP. 45p.
- HOLMAN, J. 1974. **Los áfidos de Cuba.** La Habana, Instituto del Libro, 304 p.
- HUGHES, G. & T. R. GOTTWALD. 1999. Survey methods for assessment of citrus Tristeza virus incidence when *Toxoptera citricidus* (Homoptera: Aphididae) is the predominant vector. **Phytopatology** **89**: 487-494.
- HUGHES, G. & T.R. GOTTWALD. 1999. Survey methods for assessment of citrus Tristeza virus incidence when *Toxoptera citricidus* (Homoptera: Aphididae) is the predominant vector. **Phytopatology** **89**: 487-494.
- ILHARCO, F. A. 1992. **Equilíbrio ecológico de afídeos.** Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 300p.
- ILHARCO, F.A. 1992. **Equilíbrio ecológico de afídeos.** Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 300p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2005. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: www.ibge.gov.br
- ISIKBER, A.A. & M.J.W. COPLAND (2002) Effects of various aphid foods on *Cycloneda sanguinea*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **102**: 93-97.

- KAPUGE, S.H.; DANTHANARAYANA, W. & N. HOOGENRAAD. 1987. Immunological investigation of prey-predator relationships for *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). **Bulletin of Entomological Research** 77: 247-254.
- KATO, T. 1968. Outbreaks of aphids and the role of natural enemies in citrus orchards. **Odökon Chûgoku** 10: 19-23.
- KATO, T. 1969. Specific relation between aphids and their natural enemies in citrus. **Odökon Chûgoku** 11: 20-23.
- KOMAZAKI, S. 1987. Growth and reproduction in the first two and summer generations of two citrus aphids, *Aphis citricola* van der Goot and *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae), under different thermal conditions. **Applied Entomology and Zoology** 23: 220-227.
- KOMAZAKI, S., 1981. Life cycles and population fluctuations of aphids on citrus. **Proceeding International Society of Citrus** 2: 692-695.
- KRAMER, S; MUNDALL, E & J. LAW 1980. Purification and properties of manducin, an amino acid storage protein of the harmolymp of larval and pupal *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry** 10: 279-288.
- LANG, A.; FILSER, J. & J. R. HENSCHL. 1999. Predation by ground beetles and wolf spiders on herbivorous insects in a maize crop. **Agriculture, Ecosystems & Environment** 72: 189-199.
- LEATHWICK, D.M. & M.J. WINTERBOURN. 1984: Arthropod predation on aphids in a Lucerne crop. **New Zealand Entomologist** 8: 75-80.
- LEE, F. R. & M. BAR-JOSEPH. 2000. Tristeza. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). **Compendium of Citrus Diseases**, 2. ed., St. Paul: APS Press, p. 61-63.

- LEON, M. G. 2005. La diversidad de insectos en cítricos y su importancia em los programas de manejo integrado de plagas. **Manejo Integrado de plagas y Agroecología 74**: 85-93.
- LEONE, C.A. 1947. A serological study of some Orthoptera. **Annals of the Entomological Society of America. 40**: 417-433.
- LEVENBOOK, L. 1985. Insect storage proteins. *In*: G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Editors, *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology 10*: 307-346.
- LOPES, S.A.; LARANJEIRA, F.F. & A. BERGAMIM-FILHO. 2004. Clorose Variegata: perdas anuais de US\$100 milhões. **Visão Agrícola. 2** (1): 40-43.
- LÖVEI, G.L.; E, MONOSTORI & ISTVÁN ANDÓ . 1985. Digestion rate in relation to starvation in the larva of a carabid predator, *Poecilus cupreus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata 37** (2): 123-127.
- MACHADO, M.A.; M.L.P.N., TARGON, H. DELLA COLETTA-FILHO & G.W. MÜLLER. 2004. MORTE SÚBITA DOS CITROS. **LARANJA 25** (1): 69-79.
- MAELZER, D.A. 1978. The growth and voracity of larvae of *Leis conformis* (Boisd.) (Coleoptera:Coccinellidae) fed on the rose aphid *Macrosiphum rosae* (L.) (Homoptera: Aphididae) in the laboratory. **Australian Journal of Zoology 26**: 293-304.
- MASSARI, C.A. 2001. **Cancro cítrico**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 26.
- MCIVER, D. J. 1981. An examination of the utility of the precipitation test for the evaluation of arthropod predator-prey relationship. **Canadian Entomologist 113**: 213-222.
- MENEGHINI, M. 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença “Tristeza dos citros”. **O Biológico 12**: 285-287.

- MICHAUD, J.P., 1998. A review of the literature on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). **Florida Entomologist** **81**: 37–60.
- MICHAUD, J.P. 1999. Sources of mortality in colonies of brown citrus aphids *Toxoptera citricida*. **Biological Control** **44**: 347-367.
- MICHAUD, J.P. 2000. Development and reproduction of ladybeetles (Coleoptera: Coccinellidae) on the citrus aphids *Aphis spiraecola* Patch and *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Biological Control** **18**: 287-297.
- MICHAUD, J.P. 2001. Evaluation of green lacewings, *Chrysoperla plorabunda* (Fitch) (Neurop., Chrysopidae), for augmentative release against *Toxoptera citricida* (Hom., Aphididae) in citrus. **Journal of Applied Entomology** **25** (7): 383-388.
- MICHAUD, J. P. 2002. Invasion of the Florida citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguinea*. **Environmental Entomology** **31**: 827-835.
- MICHAUD, J.P. & B. BELLIORE. 2001. Impact of syrphid predation on production of migrants in colonies of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae). **Biological Control** **21**: 91-95.
- MOLLET, J.A. & ARMBRUST, E.J. 1977. Age specific serological identification of adult stages of alfalfa weevil, *Hypera postica*. **Annals of the Entomological Society of America**. 71 (2):207-211.
- MORA, G., H.J. CISNEROS, M. R. PEÑA & ALATORRE. 1997. Áfidos vectores del virus de la tristeza de los Cítricos presentes em México. In: Memórias Del II Curso Internacional de Citricultura. Manejo Integral de Fitosanitario. Union Agrícola Regional de Citricultores Tamaulipas. CD. Victoria, Tamaulipas, México. 165 -178 p.

- MORENO, P.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; FERNÁNDEZ-MONTES, J.; PINA, J.A; BALLESTER, J.F. & J. JUÁREZ, 1982. Incidência y características de la Tristeza de los agrios en el área citrícola de Sevilla.
- MORRIS, T.I. & M. CAMPOS. 2006. Estudio de la tasa de digestión de larvas de *Chrysoperla carnea* (Insecta, Planipennia) con inmunoensayos (ELISAs). **Zoologica baetica 17**: 3-10.
- MÜLLER, G.W; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, A.S.; SOUZA, A.A. & J.C.V RODRIGUES. 2005. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. *In*: Mattos Junior D, DeNegri JD, Pio RM, Pompeu Junior J, eds. **Citros**. Campinas, Brazil: Instituto Agrônômico e Fundag, 569–604.
- MURRAY, R.A. & M.G. SOLOMON 1978: A rapid technique for analyzing diets of invertebrate predators by electrophoresis. **Annals of Applied Biology 90**: 7–10.
- NARANJO, S.E. & J.R. HAGLER. 2001: Toward the quantification of predation with predator gut immunoassays: a new approach integrating functional response behavior. **Biological Control 20**: 175–189.
- NASCIMENTO, F. N.; R. J. BUENO & C. R. CASSINO. 1988. **Ocorrência dos Principais inimigos naturais das plantas cítricas no Brasil**. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Entomologia, Rio de Janeiro, RJ. Livro 1, p. 6.
- NAULT, L.R. 1997. Arthropod transmission of plant Viruses: a new synthesis. Arthropods in Relation to plant disease. **Annals of the Entomological Society of America 90**: 521-541.
- NEVES, M.F.; JANK, M.S. (Org.). 2006. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil**.
- NEVES, M.F.; LOPES, F.F. 2005. **Estratégias para laranja no Brasil** . 1. ed São Paulo: Atlas, 225 p.

- OHIAGU C.E. & BOREHAM P.F.L. 1978: A simple field test for evaluating insect prey-predator relationships. **Entomologia Experimentalis et Applicata** **23**: 40–47.
- OLIVEIRA, A. R. 1975. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. **Summa Phytopathologica** **1**: 61-64.
- OMKAR, M. G. & S.K. SINGH. 2006. Optimal number of matings in two aphidophagous ladybirds. **Ecological Entomology** **31**: 1-4.
- ONYEKA, J.O.A. 1983. Studies on the natural predators of *Culex pipiens* L. and *C. torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) in England. **Bulletin of Entomological Research** **73**: 185-194.
- OUCHTERLONY, O. 1948. In vitro method for testing toxin-producing capacity of difteria bactéria. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica** **25**: 186-191.
- OUCHTERLONY, O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. IN: S. Garger (ED). **Progress in allergy**. New York, Plenum Press., p. 1-78.
- OZGOKÇE, MS, ATLIHAN, R. & I, KARAÇA (2006) The life table of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) after different storage periods. **Journal of Food, Agriculture & Environment** **4**: 282-287.
- PARRA, J.R.P.; OLIVEIRA, H.N. & A.S. PINTO. 2003. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos dos citros**. Piracicaba: A.S. Pinto. 140 p.
- PEÑA, M.R., N. VILLEGAS-JIMÉNEZ & M. ROCHA. 1998. **Listado de los áfidos (Homoptera: Aphididae) de la region citricola de General Terán, Nuevo León**. VI Encuentro de Entomólogos del IPN. Yauatepec, Morelos, México, 1998.
- PÉREZ, F., PONCE DE LEÓN, N., LLANES, F. & J. PÉREZ, 1980. Estudio de la dinámica de población de *Aphis spiraecola* en el plana citrícola de Victoria de Girón. **Revista Ciencia y Técnica en la Agricultura** **3**: 1-2.

- PETTERSSON, J. 1972: Technical description of a serological method for quantitative predator efficiency studies on *Rhopalosiphum padi* (L.). **Swedish Journal of Agricultural Research** **2**: 65–69.
- PIMENTEL, D.; STACHOW, U.; TAKACS, D. A.; BRUBAKER, HANS W.; DUMAS, A. R. & J. MEANEY. 1992. Conserving biological diversity in agricultural/forest systems. **BioScience** **42** (5): 354-362.
- ROCHA-PEÑA, M.A.; LEE, R.F.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA, F.M.; GARNSEY, S.M. & R.Y. YOKOMI. 1995. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida* Kirkaldy. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. **Plant Disease** **79**: 437-445.
- RODRIGUES, W.C.; CASSINO, P.C.R.; ZINGER, K. & M.V. SPOLIDORO. 2008. Riqueza de espécies de Inimigos Naturais de Pragas associadas ao Cultivo de Tangerina Orgânica em Seropédica – Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis** **1** (1): 6-9.
- ROTHSCHILD, G.H.L. 1966. A study of a natural population of *Conomelus anceps* (Germar) (Homoptera, Delphacidae) including observations on predation using the precipitin test. **Journal of Animal Ecology** **35** (3): 413-434.
- SANTOS, S.A.P; PEREIRA, J.A.; RODRIGUES, M.C.; TORRES, L.M.; PEREIRA, A.M.N. & A.J.A. NOGUEIRA. 2009. 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.
- SANTOS-NETO, J.R; MEZENCIO, J.M.S; CHAGAS, A.T.A; MICHEREFF-FILHO, M. & J.E SERRÃO. 2010. Use of Serological Techniques for Determination of

- Spodoptera frugiperda* (J E Smith) Predators (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** **39** (3): 420-423
- SCHMITT, A. T. & J. C. SMITH. 1974. Espécies de Syrphidae (Diptera) predadores de afídeos, encontrados nas laranjeiras (*Citrus* sp.) e macieiras (*Pyrus malus*). **Ciência e Cultura** **26** (7): 353.
- SEQUEIRA, J. C. 1992. Técnicas serológicas e bio-moleculares de diagnóstico de vírus e de viróides em plantas. **Summa Phytopathologica** **18**: 80-110
- SERRÃO, J.E.; SILVA, M. SOUSA-SILVA, C.R. & J.M. PACHECO. 1997. Uso de serologia na identificação de predadores de *Orphulella punctata* (de Geer) (Orthoptera: Acrididae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **26** (2): 375-378.
- SERVICE, M. W. & J. M. ELOUARD. 1980. Serological identification of the predators of the complex of *Simulium damnosum* Theobald (Diptera: Simuliidae) in the Ivory Coast. **Bulletin os Entomological Research** **70**: 657-663.
- SHEPPARD, S. K. & J. D. HARWOOD. 2005. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. **Functional Ecology** **19**: 751-762.
- SHEPPARD, S.K., HENNEMAN, M.L.; MEMMOTT J. & W.O.C. SYMONDSON 2004: Infiltration by alien predators into invertebrate food webs in Hawaii: a molecular approach. **Molecular Ecology** **13**: 2077-2088.
- SILVA, R.B.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E.; LIMA, E.R.; FIGUEIREDO, M.L.C. & I. CRUZ. 2009. Suitability of different artificial diets for development and survival of stages of predaceous ladybird beetle *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Phytoparasitica** **37**: 115-123.

- SOPP, P.I. & K.D. SUNDERLAND. 1989: Some factors affecting the detection period of aphid remains in predators using ELISA. **Entomologia experimentalis et applicata** **51**: 11–20.
- SOPP, P.I.; SUNDERLAND, K.D.; FENLON, J.S. & S.D. WRATTEN. 1992: 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.
- SOUSA, B. & A.I. CIOCIOLA. 1994. Efeito do acasalamento sobre a reprodução e longevidade de *Nusalala uruguaia* (Návas, 1923) (Neuroptera: Hemerobiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **23** (3).
- SOUSA, B. & A.I. CIOCIOLA. 1995. Aspectos comportamentais de *Nusalala uruguaia* (Návas, 1923) (Neuroptera: Hemerobiidae), em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **24** (1).
- SOUSA, B.; CIOCIOLA, A.I. & J.C. MATIOLI. 1989. Biologia comparada de *Nusalala uruguaia* (Návas, 1923) (Neuroptera: Hemerobiidae) alimentada com diferentes espécies de afídeos. II. Fases de pré-pupa, pupa e adulta. **Separata dos Anais da sociedade Entomológica do Brasil, ano 18**.
- SOUSA, B.; MATIOLI, J.C. & A.I. CIOCIOLA. 1990. Biologia comparada de *Nusalala uruguaia* (Návas, 1923) (Neuroptera: Hemerobiidae) alimentada com diferentes espécies de afídeos. I. Fase de larva. **Anais da ESALQ, Piracicaba**, **47** (parte 2): 283-300.
- SOUSA-SILVA, C. R. & F. A. ILHARCO. 1995. **Afídeos do Brasil e suas plantas hospedeiras**. Ed. UFSCar, 85p.
- SOUSA-SILVA, C.R. 1980. **Uso de radiotraçador e serologia no estudo das relações alimentares entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)**

- e artrópodes predadores. Piracicaba, CENA/ESALQ/USP, 1980. 63P. Tese de mestrado.
- SOUSA-SILVA, C.R. 1985. **Serologia aplicada ao estudo de *Deois flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae)**. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, USP, Piracicaba.
- SOUSA-SILVA, C.R.; A.R. OLIVEIRA & J.M. PACHECO 1990. Serologia aplicada à determinação de predadores de *Deois flavopicta* (Stål, 1854) (Homoptera: Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 17**: 61-65.
- SOUSA-SILVA, C.R.; A.R. OLIVEIRA & J.M. PACHECO. 1988. Diferenciação serologica dos estágios fisiológicos de *Deois flavopicta* (Stal, 1854) (Homóptera: Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 17**: 61-65.
- SOUSA-SILVA, C. R; & F. A. ILHARCO. 2009. *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphidoidea) the tropical citrus aphid in continental Portugal. **Revista de Agricultura 84** (1): 71 – 80.
- SOUZA, B. & C. F. CARVALHO. 2002. Population dynamics and seasonal occurrence of adults of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) in a citrus orchard in Southern Brazil. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 48** (2): 301-310.
- STATHAS, G.J. 2000. *Rhizobius lophanthae* prey consumption and fecundity. **Phytoparasitica 28**: 1-9.
- STELZL, M. & D. DEVETAK. 1999. Neuroptera in agricultural ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment 74**: 305-321.
- SUNDERLAND, K.D. & S.L. SUTTON. 1980. A Serological Study of Arthropod Predation on Woodlice in a Dune Grassland Ecosystem. **Journal of Animal Ecology 49** (3): 987-1004.

- SUNDERLAND, K.D.; AXELSEN, J.A.; DROMPH, K.; FREIER, B.; HEMPTINNE, J.-L.; HOLST, N.H.; MOLS, P.J.M.; PETERSEN, M.K.; POWELL, W.; RUGGLE, P.; TRILTSCH, H. & L. WINDER. 1997: Pest control by a community of natural enemies. **Acta Jutlandica 72**: 271–326.
- SUTTON, S.L. 1970. Predation on woodlice; an investigation using the precipitin test. **Entomologia Experimentalis et Applicata 13** (3): 279-285.
- SYMES, C.B., 1924. Notes on the black citrus aphid. **Rhodesia Agricultural Journal 11**: 612–626.
- SYMONDSON, W.O.C. & J.E. LIDDELL 1993: Differential antigen decay rates during digestion of molluscan prey by carabid predators. **Entomologia Experimentalis et Applicata 69**: 277–287.
- SYMONDSON, W.O.C. 2002: Molecular identification of prey in predator diets. **Molecular Ecology 11**: 627–641.
- TAO, C.C. & M.F. TAN. 1961. Identification, seasonal population and chemical control of citrus aphids of Taiwan. **Journal of Agricultural research 10**: 41-53.
- TAYLOR, D.L. 2004. Immunological detection of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) eggs and juveniles in the stomach contents of crustacean predators. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 301**: 55-73.
- TITOVA, E. V. 1970. Use of precipitin test in a study of interrelationship between *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) and predatory arthropods. **Entomological Review 49** (2): 155-16.
- TURNER, B.D. 1984. Predation pressure on the arboreal epiphytic herbivores of larch trees in southern England. **Ecological Entomology 9** (1): 91–100.
- UETZ, G. W.; HALAJ, J. & A. B. CADY. 1999. Guild structure of spiders in major crops. **Journal Arachnology 27**: 270-280.

- UNRUH, T. R.; T., YU; L.S., WILLET; S. F., GARCZYNSKI & D.R. HORTON. 2008. Development of Monoclonal Antibodies to Pear Psylla (Hemiptera: Psyllidae) and Evaluation of Field Predation by Two Key Predators. **Annals of the Entomological Society of América** **101(5)**: 887-898.
- VICKERMAN G.P. & K.D. SUNDERLAND. 1975: Arthropods on cereal crops: nocturnal activity, vertical distribution and aphid predation. **Journal of Applied Ecology** **12**: 755–766.
- WALKER, A.J.; FORD, L.; MAJERUS, M.E.N.; GEOGHEGAN, I. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A. & A. M.R. GATEHOUSE. 1998. Characterisation of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **28**: 173–180.
- WEST, A.S. 1950. The precipitin test as an entomological tool. **Canadian Entomologist** **82**: 241-244.
- WHITESIDE, J. O.; S. M. GARNSEY & L. W. TIMMER. 1993. (Ed.) **Compendium of Citrus Diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press. 80p.
- ZUCCHI, R.A., SILVEIRA-NETO, S. & O. NAKANO. 1993. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba, FEALQ.

9- FIGURAS



Figura 1. Vista panorâmica da Propriedade Agrícola Terra Roxa, São Carlos-SP, que tem como principal atividade o cultivo de citros variedade “Valencia”.



Figura 2. Talhão de citros na Propriedade Agrícola Terra Roxa, São Carlos-SP, localizado entre as coordenadas: $21^{\circ} 47' 14''$ S e $47^{\circ} 55' 426''$ W e altitude de 710 m.

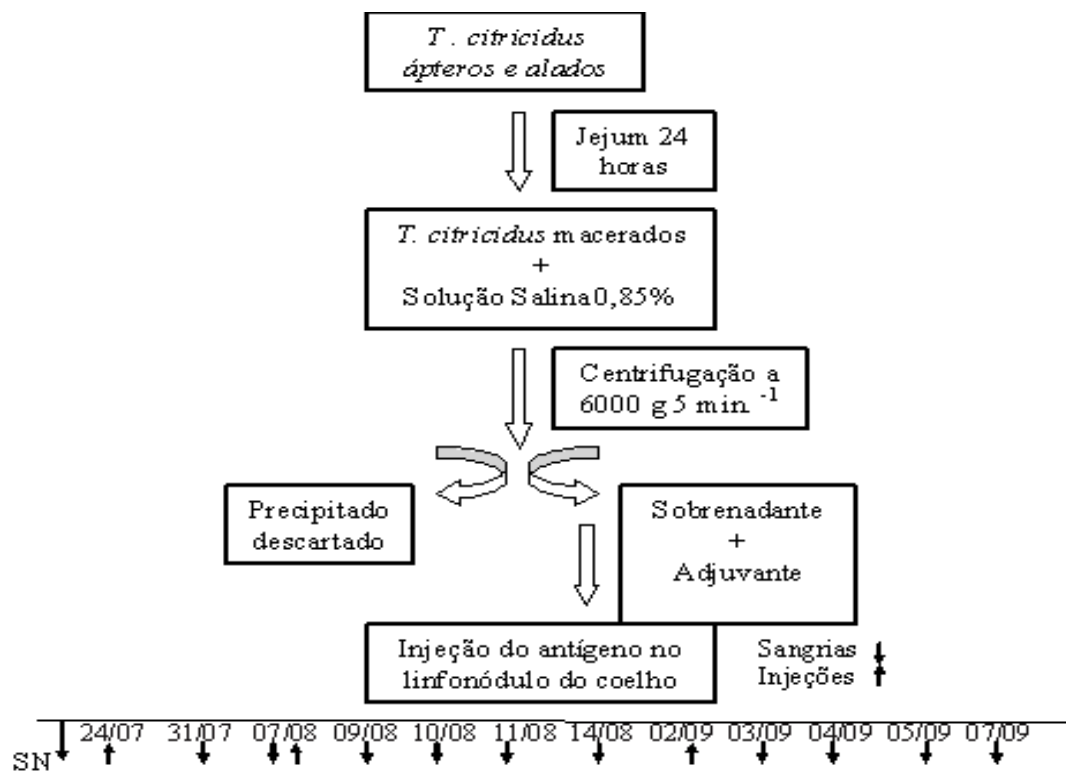


Figura 3. Obtenção do antissoro para *T. citricidus* (ASTc). Cronograma de sangrias e inoculações do antígeno (AGTc) na região do linfonódulo de um coelho conforme técnica descrita por Oliveira (1975). SN: Soro Normal.

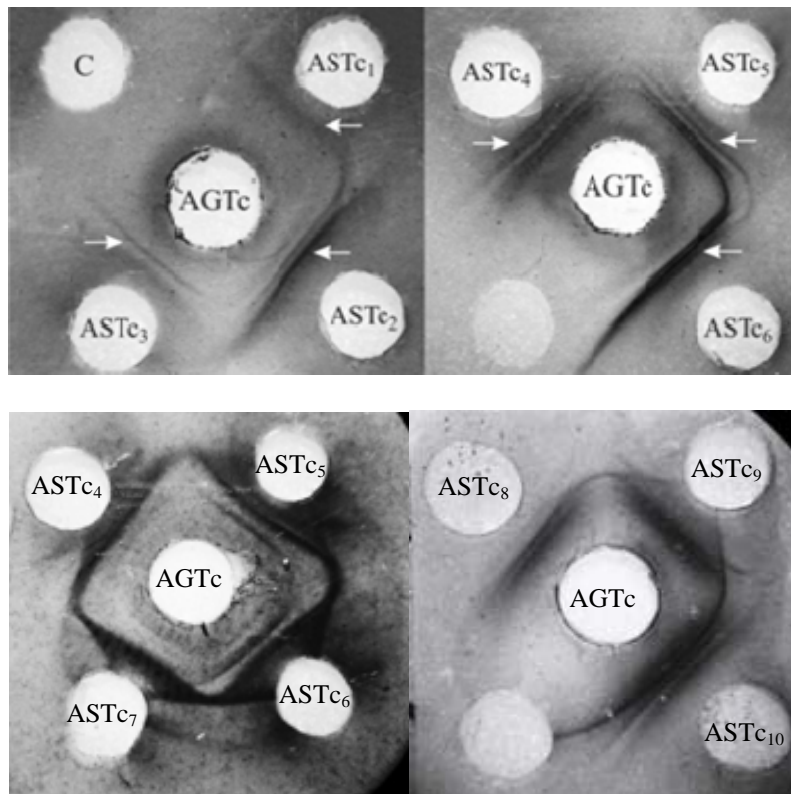


Figura 4. Reações serológicas homogêneas entre os antissoros para *Toxoptera citricidus* ASTc1, ASTc2, ASTc3, ASTc4, ASTc5, ASTc6, ASTc7, ASTc8, ASTc9 e ASTc10 antissoros, respectivamente, obtidos com a 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a, 8^a, 9^a e 10^a sangrias e o macerado de *Toxoptera citricidus* AGTc; C: controle. As setas na figura indicam as linhas de precipitação.

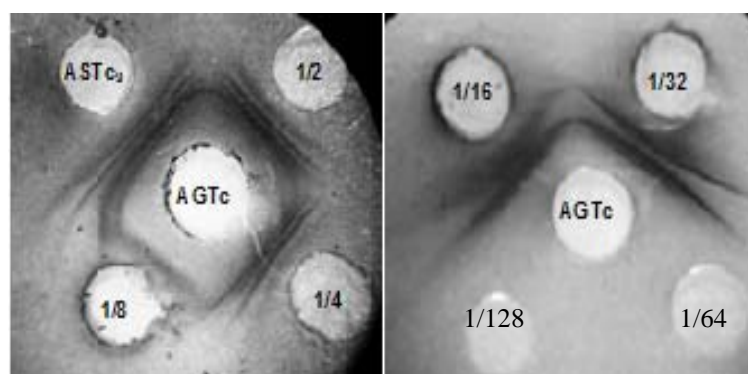


Figura 5. Reações serológicas de dupla difusão em agar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de titulação do antissoro ASTc9.

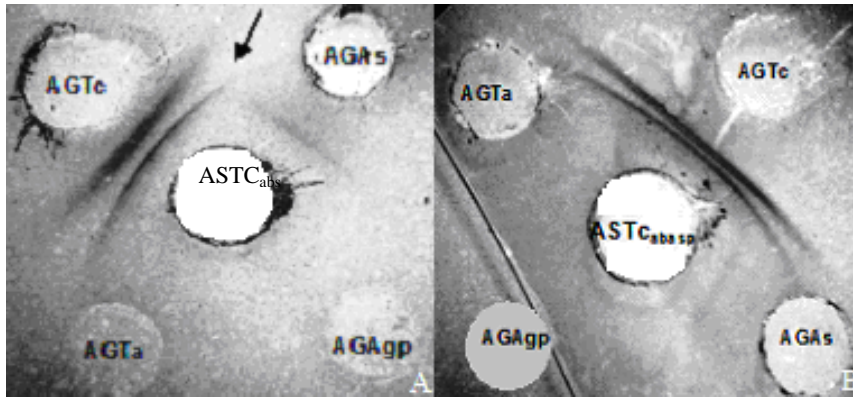


Figura 6. A) Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de verificação de reação cruzada entre o ASTc, o antígeno homólogo AGTc e os antígenos de *Aphis spiraecola* (AGAs), *Aphis gossypii* (AGAgp) e *Toxoptera aurantii* (AGTa). A seta na figura mostra o esporão obtido, indicando identidade antigênica parcial; B) Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de absorção entre o ASTc e antígenos de *Toxoptera aurantii* (AGTa), *Toxoptera citricidus* (AGTc), *Ahis spiraecola* (AGAs) e *Aphis gossypii* (AGAgp).

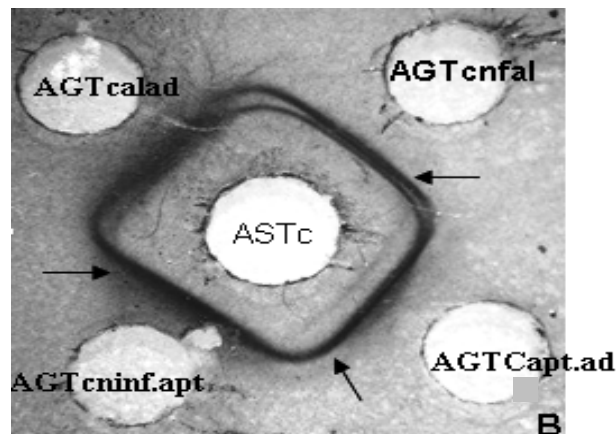


Figura 7. Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nas reações serológicas homólogas entre o ASTc e o macerado de adultos alados (AGTcalad); ninfas de alados (AGTcnfal), ápteros adultos (AGTcaptad) e ninfas de ápteros (AGTcninfapt) de *Toxoptera citricidus*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação resultantes de reações positivas.

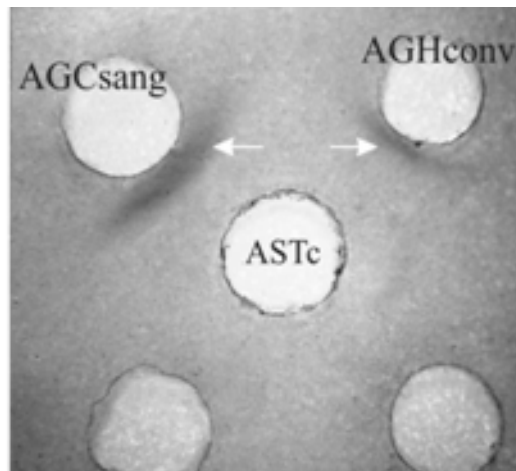


Figura 8. Reações serológicas heterólogas entre ASTc e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de *Cycloneda sanguinea* (AGCsang) e *Hippodamia convergens* (AGHconv). As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação.

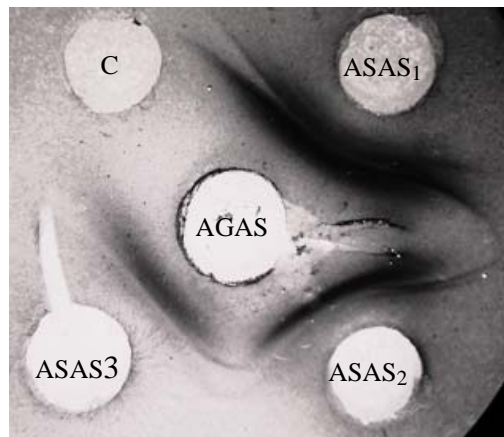


Figura 9. Reações serológicas homólogas entre os antissoros para *Aphis spiraecola* ASAs1, ASAs2, ASAs3, antissoros, respectivamente, obtidos com a 1^a, 2^a, 3^a sangrias e o macerado de *Aphis spiraecola* AGAs; C: controle.

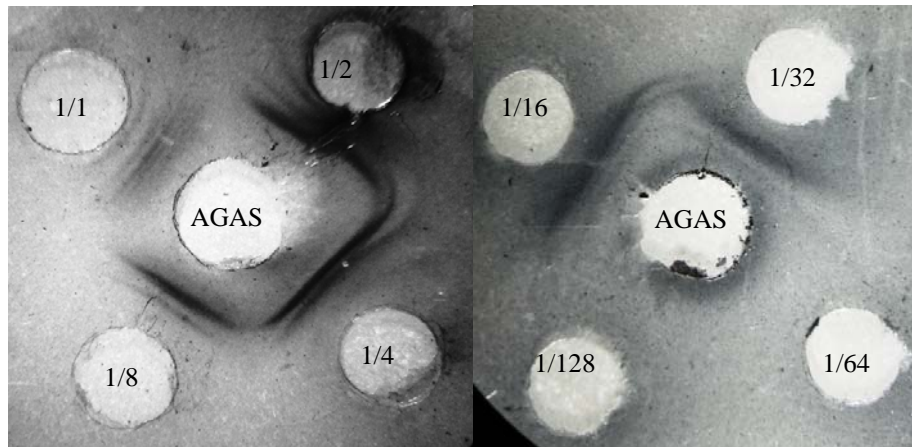


Figura 10 Reações serológicas de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de titulação do antissor ASAs.

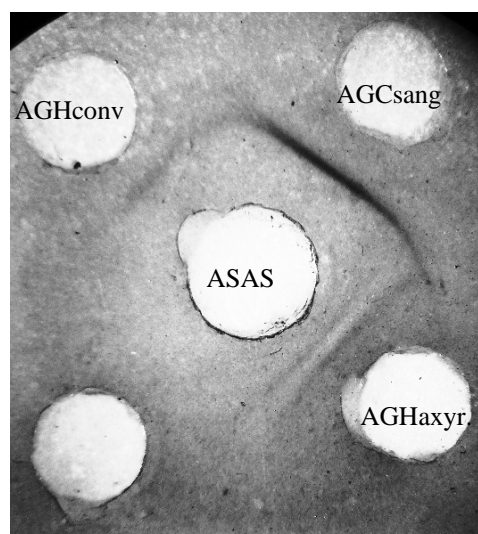


Figura 11. Reações serológicas heterólogas entre ASAs e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de *Hippodamia convergens* (AGHconv), *Cycloneda sanguinea* (AGCsang) e *Harmonia axyridis* (AGHax).

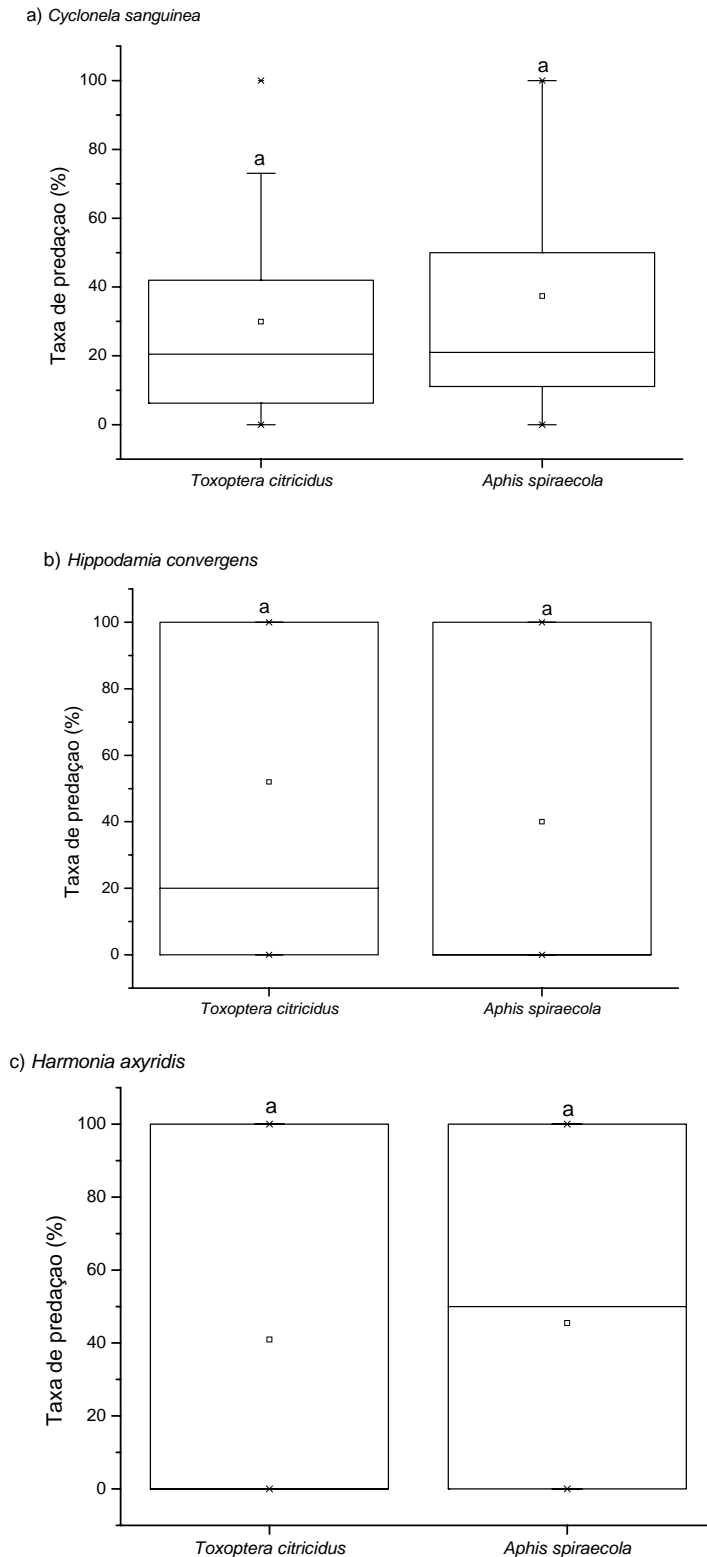


Figura 12. Gráficos de caixa indicando a taxa de predação de *Toxoptera citricidus* e *Aphis spiraecola* por *Cycloneda sanguinea* (a), *Hippodamia convergens* (b), e *Harmonia axyridis* (c). Letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas na taxa de predação entre os afídeos (Mann-Whitney – $p > 0,05$). No gráfico a, as barras delimitam o intervalo de variação e as caixas 50% dos valores, enquanto em b e c o intervalo é indicado pelas caixas e os valores mais comuns pelas cruces. Em ambos as linhas horizontais correspondem à mediana, e os quadrados pequenos à média.

10. Tabelas

Tabela I. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de antissoros para *Toxoptera citricidus* (ASTc).

Datas das Inoculações	Datas das Sangrias	Antissoros obtidos
	31/07/07	ASTc ₁
1 ^a . – 24/07/07	07/08/07	ASTc ₂
	09/08/07	ASTc ₃
	10/08/07	ASTc ₄
2 ^a . – 07/08/07	11/08/07	ASTc ₅
	14/08/07	ASTc ₆
	03/09/07	ASTc ₇
3 ^a . – 02/09/07	04/09/07	ASTc ₈
	05/09/07	ASTc ₉
	07/09/07	ASTc ₁₀

Tabela II. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de antissoros para *Aphis spiraecola* (ASAs).

Data das inoculações	Datas das sangrias	Antissoros obtidos
	17/10/07	AS-AS ₁
1a.10/10/07	24/10/07	AS-AS ₂
	31/10/07	AS-AS ₃

Tabela III. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de antissoros; antissoros obtidos e número de linhas de precipitação observadas nos testes serológicos.

Data das inoculações	Datas das sangrias	Antissoros obtidos	Linhas de precipitação nas reações com o antígeno homólogo
1 ^a - 24/07/07	31/07/07	ASTc ₁	+
	07/08/07	ASTc ₂	+++
	09/08/07	ASTc ₃	+++
2 ^a - 07/08/07	10/08/07	ASTc ₄	++++
	11/08/07	ASTc ₅	+++++
	14/08/07	ASTc ₆	++++
	03/09/07	ASTc ₇	++++
3 ^a - 02/09/07	04/09/07	ASTc ₈	+++
	05/09/07	ASTc ₉	+++++
	07/09/07	ASTc ₁₀	++++

(+) 1 Linha de precipitação; (++) duas linhas de precipitação; (+++) três linhas de precipitação; (++++) quatro linhas de precipitação; (+++++) cinco linhas de precipitação; ASTc1, ASTc2, ASTc3, ASTc4, ASTc5 e ASTc6, ASTc7, ASTc8, ASTc9, ASTc10, antissoros, respectivamente, obtidos com a 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a., 8^a., 9^a., e 10^a sangrias.

Tabela IV. Testes serológicos realizados entre o ASTc e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de *Cycloneda sanguinea* alimentados 24 h após a alimentação, em laboratório, com adultos ápteros de *Toxoptera citricidus*.

<i>C. sanguinea</i>	<i>T. citricidus</i> ingeridos	Linhas de precipitação 24 h após a alimentação
<i>C. sangüinea</i>	1	+
<i>C. sangüinea</i>	1	++
<i>C. sangüinea</i>	2	+
<i>C. sangüinea</i>	2	++
<i>C. sangüinea</i>	3	+

(+) 1 linha de precipitação

(++) 2 linhas de precipitação

Tabela V. Testes serológicos realizados entre o ASTc e antígenos obtidos pela maceração de exemplares de *Cycloneda sanguinea* 48 h após a alimentação, em laboratório, com adultos ápteros de *Toxoptera citricidus*.

<i>C. sanguinea</i>	<i>T. citricidus</i> ingeridos	Linhas de precipitação 48 h após a alimentação
<i>C. sangüinea</i>	1	-
<i>C. sangüinea</i>	2	+
<i>C. sangüinea</i>	2	-
<i>C. sangüinea</i>	3	-

(+) 1 Linha de precipitação

Tabela VIII. Inoculações de antígeno no coelho; Datas das sangrias realizadas para obtenção de Antissoros; Antissoros obtidos e Número de linhas de precipitação observadas nos testes serológicos (ASAs X AGAs).

Data das inoculações	Datas das sangrias	Antissoros obtidos	Linhas de precipitação
1 ^a .10/10/07	17/10/07	AS-AS ₁	++
	24/10/07	AS-AS ₂	++
	31/10/07	AS-AS ₃	++

(++) 2 Linhas de precipitação; ASAs₁, ASAs₂, ASAs₃, antissoros, respectivamente, obtidos com a 1^a, 2^a, 3^a. sangrias.

