

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

Ana Carolina Maciel Redoan

**USO DA SEROLOGIA NA AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE**  
**PREDADORES PELAS PRINCIPAIS PRAGAS DA CULTURA DO MILHO**  
*(Zea mays L.)*

**São Carlos - SP**

**2016**

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

**USO DA SEROLOGIA NA AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE  
PREDADORES PELAS PRINCIPAIS PRAGAS DA CULTURA DO MILHO**

*(Zea mays L.)*

**Orientador: Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

**São Carlos - SP**

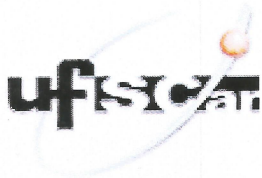
**2016**

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

R319u Redoan, Ana Carolina Maciel  
Uso da serologia na avaliação da preferência alimentar de predadores pelas principais pragas da cultura do milho (*Zea mays* L.) / Ana Carolina Maciel Redoan. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
80 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Spodoptera frugiperda. 2. Helicoverpa armigera. 3. Helicoverpa zea. 4. Antígenos. 5. Inimigos naturais. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ana Carolina Maciel Redoan, realizada em 03/06/2016:

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva  
UFSCar

---

Profa. Dra. Alaide Aparecida Fonseca Gessner  
UFSCar

---

Profa. Dra. Odete Rocha  
UFSCar

---

Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam  
IB-SP

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Benfatti Gonzalez Peronti  
UNESP

## **Dedicatória**

“Dedico este trabalho aos meus pais **Ailton e Terezinha Redoan**, pelo apoio incondicional, ao meu marido **Denio de Freitas**, pela paciência, companheirismo e amor.”

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e presença constante durante essa caminhada.

Ao orientador Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva e ao coorientador Dr. Ivan Cruz pela paciência, amizade e, principalmente, todos os ensinamentos a mim transmitidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade para a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA– Centro nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) pela infraestrutura e recursos indispensáveis para execução desse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Entomologia Aplicada do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Ufscar (LEA): Airton, Keila, Suzan e Wanessa.

Aos técnicos do laboratório e campo da Embrapa- Milho e Sorgo: Geraldo, Isaías, Taquinho, Márcio, Ademilson, Ismael, Carlinhos pelo apoio durante a jornada de trabalho.

Aos Bolsistas do Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo (Lacri): Ana Luísa, Débora, Guilherme, Isamara, Nayara, Paula e Sabrina. Em especial a Dra. Maria de Lourdes e ao Dr. Rafael que me acompanharam na minha jornada acadêmica da graduação ao doutorado.

Agradeço minha família, meu marido Dênio e em especial, meus pais Ailton e Terezinha por todo amor e apoio.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO GERAL.....	13
2.1. Objetivos Específicos.....	13
3. HIPÓTESES.....	14
4. REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
4.1 Serologia.....	14
4.2. Cultura do Milho ( <i>Zea mays</i> ) no Brasil .....	18
4.3. Principais pragas da cultura do milho .....	20
4.3.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	20
4.3.2. <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae).....	22
4.3.3. <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).....	25
4.3.4. <i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae).....	27
4.4. Predadores .....	29
4.4.1. <i>Doru luteipes</i> (Scudder,1876) (Dermaptera: Forficulidae).....	29
4.4.2. <i>Euborellia annulipes</i> (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae).....	31
4.4.3. <i>Chrysoperla externa</i> (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae).....	33
4.4.4. Coccinelídeos .....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
5.1. Produção dos antígenos imunizantes (Ag) antissoros (As):.....	38
5.2. Testes Serológicos.....	40
5.2.1. Testes serológicos homólogos.....	40
5.2.1. Titulação dos antissoros .....	42
5.2.2. Testes serológicos heterólogos (testes de alimentação) .....	42
5.2.3. Especificidade .....	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
6.1. Testes serológicos homólogos (testes de alimentação) .....	44
6.2. Testes serológicos heterólogos.....	54
7. CONCLUSÃO .....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo identificar a diversidade alimentar dos predadores através do uso da serologia produzindo os antissoros específicos para as principais pragas encontradas na cultura do milho *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Rhopalosiphum maidis*. Amostras das pragas foram maceradas em solução salina NaCl (0,85%). Os macerados foram centrifugados, e os sobrenadantes, utilizados como antígenos imunizantes para obtenção do antissoro. Para esse propósito um coelho foi imunizado com 3,0 ml do antígeno imunizante na região do linfonódulo. Testes serológicos homólogos foram realizados em dupla difusão em ágar. Reações serológicas homólogas foram positivas após sete dias após da imunização do antígeno. A técnica tem sensibilidade para detectar predação de das quatro pragas estudadas nesse trabalho. Os testes foram positivos para uma presa no trato digestivo do predador até 96hs de sua ingestão. Com relação ao número de presas ingeridas não houve diferença nas linhas de precipitação, apenas ficaram mais fortes e nítidas. Em laboratório a preferência alimentar de *Doru luteipes*, *Olla v-nigrum* e *Chrysoperla externa* apresentaram preferência alimentar por *R. maidis* e *Euborellia annulipes* por *S. frugiperda*. Nos testes onde os predadores foram coletados no campo os testes serológicos mostraram que houve uma preferência alimentar de *D. luteipes* e *O. v-nigrum* por *S. frugiperda*. *E. annulipes*, *H. axyridis*, *E. connexa*, e *C. externa* por pulgão. Concluiu-se que após uma única injeção do antígeno na região do linfonódulo do coelho, foi possível obter-se antissoro específico para as pragas do milho.



## ABSTRACT

This study objective to identify the diversity of predators through the use of serology producing specific antisera for the main pests found in maize, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera* and *H. zea*, *Rhopalosiphum maidis* and uses it to determine their predators. Pest samples were macerated in 0.85% saline solution. The macerated were centrifuged and the supernatants used as immunizing antigens for obtaining antiserum. For this purpose, a rabbit was immunized with 3.0 ml of the immunizing antigen on the lymph node region. Homologous serological tests were performed in double diffusion in agar. Homologous serological reactions were positive after seven days of antigen inoculation. The technique has sensitivity to detect predation of the four pests studied in this paper. The tests were positive for a prey in the digestive tract of the predator to 96 hours of ingestion. Regarding the number of preys, there was no difference in the lines, they only grew stronger and sharper. In laboratory, *D. luteipes*, *O. v-nigrum* and *C. externa* presented preference for *R. maidis* and *E. annulipes* for *S. frugiperda*. In tests where predators were collected in the field, serological tests showed that there was a certain food preference of *D. luteipes* and *O. v-nigrum* by *S. frugiperda*. *E. annulipes*, *H. axyridis*, *E. connexa* and *C. externa*, by the aphid. After a single injection of antigen in rabbit's lymph node region, it was possible to get an antiserum specific for pests of corn.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Larvas; (B) Pupa; (C) Adulto de *Spodoptera frugiperda*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....21
- Figura 2.** (A) Ovos; (B) Lagarta, (C) Adulto de *Helicoverpa zea*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....23
- Figura 3.** (A e B) Lagartas; (C) Macho e Fêmea de *Helicoverpa armigera*, escala de 3,0 cm. [Foto: (A e B) Embrapa Milho e Sorgo; (C) Cecília Czepak].....25
- Figura 4.** (A) Adultos e ninfas; (B) Planta de milho infestada com *Rhopalosiphum maidis*; (C) Planta doente. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....28
- Figura 5.** (A) Macho de *Doru luteipes*; (B) Fêmea de *Doru luteipes*; (C) Fêmea com ninfas. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....30
- Figura 6.** (A) Macho de *Euborellia annulipes*; (B) Fêmea de *Euborellia annulipes*; (C) Fêmea com ovos. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....32
- Figura 7.** *Chrysoperla externa*: (A) Ovo (B) Larva (C) Adulto. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....34
- Figura 8.** (A) Ovos; (B) Larva; (C) Pupa; (D) Adulto de *Eriopsis connexa*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....36
- Figura 9.** (A) *Coleomegilla maculata*; (B) *Hippodamia convergens* (C) *Cycloneda sanguinea*; (D) *Olla v-nigrum*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].....36
- Figura 10.** Procedimento para a coleta de cada antissor produzido das espécies *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* e *Rhopalosiphum maidis*.....39
- Figura 11.** Solução de ágar em lâminas para microscopia. [Fotos: Redoan, A.C.].....40
- Figura 12.** Processo para corar as lâminas. (A) Lâmina com papel de sulfite, (B) Recipiente com as lâminas sem o papel, (C) Solução para corar as lâminas, (D) Solução para lavar as lâminas. [Fotos: Redoan, A. C.].....41
- Figura 13.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de titulação dos antissoros: (A) *Spodoptera frugiperda*; (B) *Helicoverpa zea*; (C) *Helicoverpa armigera* e de (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.....49
- Figura 14.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação 24, 48 e 96hs após a alimentação de *Doru luteipes* e *Euborellia annulipes* e *Chrysoperla externa* com uma larva de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* e (C) *Helicoverpa armigera* e uma ninfa de (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.....51

**Figura 15.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação 24, 48 e 96hs após a alimentação de *Olla V-nigrum* com uma larva de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* e (C) *Helicoverpa armigera* e uma ninfa de (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.....51

**Figura 16.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de após a alimentação de *Doru luteipes*, *Euborellia annulipes*, *Chrysoperla externa* e *Olla v-nigrum* com 1,2, 3 e 4 lagartas de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* e (C) *Helicoverpa armigera* e ninfas de (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.....52

**Figura 17.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação após a alimentação dos predadores com ovos de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* e (C) *Helicoverpa armigera*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas..... 55

**Figura 18.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando de linhas de precipitação após as reações heterólogas com os antissoros específicos. (A) Reação positiva do antissoro de *Spodoptera frugiperda* com seu antígeno, (B) Reação positiva do antissoro de *Helicoverpa armigera* com seu antígeno, (C) Reação positiva do antissoro de *Helicoverpa zea* com seu antígeno, (D) Reação positiva do antissoro de *Rhopalosiphum maidis* com seu antígeno. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.....54

**Figura 19.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando de linhas de precipitação após as reações do antígeno de *Doru luteipes* (AgDI) com os antissoros específicos. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.....56

**Figura 20.** Reações de dupla difusão em ágar mostrando linhas de precipitação após as reações de 6 antígenos (predadores coletados no campo) com os antissoros específicos de *Rhopalosiphum maidis* e *Spodoptera frugiperda*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.....59

## INDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de outubro a novembro de 2014, para obtenção dos antissoros homólogos de *Helicoverpa armigera* (AsHa), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação .....45
- Tabela 2.** Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de outubro a novembro de 2014, para obtenção dos antissoros homólogos de *Helicoverpa zea* (AsHz), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação.....46
- Tabela 3.** Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de fevereiro a março de 2015, para obtenção dos antissoros homólogos de *Spodoptera frugiperda* (AsSf), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação, \* = ausência de sangria.....47
- Tabela 4.** Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de outubro e novembro de 2015, para obtenção dos antissoros homólogos de *Rhopalosiphum maidis* (AsRm), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação .....48
- Tabela 5.** Testes de absorção dos antissoros *Spodoptera frugiperda* (AsSf), *Helicoverpa armigera* (AsHa), *Helicoverpa zea* (AsHz) e *Rhopalosiphum maidis* (AsRm) e reações com seu antígeno homólogo e heterólogo. Siglas= Reações positivas (+) e Reações negativas (-) .....55
- Tabela 6.** Porcentagem de reações positivas através de testes serológicos (%) ( $\pm$ EP) dos predadores confinados em gaiolas alimentados com *Rhopalosiphum maidis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa armigera* por 24hs .....57
- Tabela 7.** Resultado dos testes serológicos (%) ( $\pm$ EP) de predadores coletados em cultura de milho orgânico da cultivar BRS1030.....59

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é cultivado em praticamente todo o território brasileiro com produção de grãos de 206,34 milhões de toneladas, safra de 2014/2015, 6,6% maior quando comparada a safra anterior onde foram produzidas 193,62 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2015). Embora, o alto insumo tecnológico aumente a produção dos grãos, a alta incidência de pragas como *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a ocorrência de lagartas da subfamília Heliothinae, *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) e *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) e o afídeo *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Homoptera: Aphididae) é responsável por grandes danos a cultura do milho no Brasil (CZEPAK et al., 2013).

Considerada a principal praga da cultura do milho a *S. frugiperda*, pode reduzir de 17 a 54,49% da produção dos grãos onde os danos ocorrem preferencialmente no cartucho da planta de milho, e pelo consumo de grande parte da área foliar (FIGUEIREDO et al., 2006ab). Quando o ataque ocorre nos primeiros estágios da cultura, pode provocar a morte das plantas e reduzir o número de plantas por hectare. A larva alimenta-se também do colmo; pode atacar o pedúnculo da espiga, impedindo a formação dos grãos; danificar diretamente os grãos; ou alimentar-se da ponta da espiga (CRUZ, 1995, 2008).

A *Helicoverpa zea*, conhecida como lagarta-da-espiga, causa perdas diretas por atacar os grãos e indiretas pelo seccionamento dos estilos-estigma, o que provoca o abortamento dos grãos. O dano que o inseto faz na semente favorece a entrada do gorgulho *Sitophilus* sp. (Coleoptera: Curculionidae), da traça *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) e da mosca *Euxesta* sp. (Diptera: Otitidae) (GRÜTZMACHER et al., 2000). Quando a produção é destinada à indústria ou a venda "in natura", os danos são mais significativos, pois estão relacionados mais ao aspecto visual da espiga do que à perda de peso dos grãos (CRUZ et al., 1990). *H. armigera*, até o momento era considerada praga quarentenária, a sua primeira ocorrência no Brasil foi

relatada por Czepak et al. (2013). Essa praga causou prejuízos estimados em R\$ 2 bilhões, nas duas últimas safras do milho com incidência média relatada de até 96% de infestação nas espigas. Isso se deve a sua habilidade em atacar grande número de hospedeiros, associada com a capacidade em causar danos nas partes reprodutivas das culturas (CUNNINGHAM et al., 1999).

Apesar das perdas de produtividade por ataques de lagartas serem as que causam mais danos econômicos para os produtores, nos últimos anos esses mesmos produtores de milho vêm sendo surpreendidos por altas infestações do *R. maidis* (pulgão-do-milho), inseto até então considerado de pouca importância para esta cultura por raramente causar impacto econômico negativo (CRUZ et al., 2012). As altas infestações do afídeo nesse período podem ter sido desencadeadas principalmente pela estiagem que predominou nos últimos anos. Esta condição, combinada com altas temperaturas, beneficia o rápido desenvolvimento e a dispersão deste inseto. Além disto, a carência de água é benéfica para os afídeos, porque propicia um aumento na concentração de nutrientes nos tecidos vegetais, principalmente aminoácidos, até o ponto no qual a redução da pressão osmótica seja o fator limitante para a ingestão de seiva pelo inseto (VAN ENDEN et al., 1968)

Na tentativa de conter essas pragas, o aumento excessivo e uso inadequado de produtos químicos tem desencadeado uma série de impactos ambientais negativos. Por isso pesquisadores e agricultores têm buscado o controle biológico, principalmente com o uso de predadores e parasitoides, como uma alternativa ambientalmente correta e economicamente sustentável para o desenvolvimento dessa cultura (WAQUIL et al., 2002).

O reconhecimento desses controladores no ambiente é realizado, principalmente, por meio da observação direta do ato predatório. No entanto, essa constatação pode ser limitada devido há várias dificuldades, como a interferência do próprio pesquisador na área amostral, pela possibilidade de escape dos predadores noturnos e mesmo em não se observar aqueles predadores alojados em locais de difícil acesso para o pesquisador. Essas dificuldades podem ser minimizadas com a utilização de técnicas que permitam a identificação segura desses

controladores naturais, como por exemplo, a técnica serológica. A serologia baseia-se em reações específicas que são realizadas entre um antissoro obtido para uma determinada fonte alimentar e, antígenos, resultantes da maceração de possíveis consumidores dessa fonte. Dessa forma, minimiza-se a interferência do pesquisador na área de trabalho e o escape de predadores devido aos seus hábitos noturnos ou, pelas dificuldades de serem encontrados quando escondidos.

Através das reações específicas é possível identificar qual é a dieta do predador em seu ambiente 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 sanitários (BUENO, 2000). Assim o presente trabalho teve como objetivo produzir antissoros específicos para as principais pragas encontradas na cultura do milho *S. frugiperda*, *H. armigera*, *H. zea* e *R. maidis* e sua utilização na determinação de seus possíveis predadores.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Identificar a diversidade alimentar dos predadores através do uso da serologia produzindo os antissoros específicos para as principais pragas do milho.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- 1- Produzir antissoro específico para a *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera* e *Rhopalosiphum maidis*.
- 2- Avaliar a sensibilidade do teste ao número de pragas ingeridas pelo predador.
- 3- Avaliar a sensibilidade do teste para detecção da presa (horas) após a alimentação do predador.
- 4- Determinar em campo o tipo de alimentação dos principais predadores encontrados na cultura do milho na Embrapa Milho e Sorgo- Sete Lagoas-Minas Gerais.

### **3. HIPÓTESES**

**3.1.** É possível a produção de antissoros específicos para *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera* e *Rhopalosiphum maidis*.

**3.2.** É possível determinar o tempo (horas) para detecção da presa após a alimentação do predador.

**3.3.** O teste tem sensibilidade para detectar o número de presas ingeridas.

**3.4.** Pode-se detectar a presença de *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera* e *Rhopalosiphum maidis* no conteúdo estomacal de predadores coletados no campo.

### **4. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **4.1 Serologia**

Os testes serológicos são o método mais usado pelos fitopatologistas na detecção de agentes patogénicos, principalmente vírus, mas também, por vezes, para fungos e bactérias por se tratar de técnicas simples e práticas que se baseiam na reação específica entre antígenos e anticorpos (CLARK & ADAMS, 1977). Um antígeno é qualquer substância capaz de induzir uma resposta imunológica quando introduzida num animal vertebrado (VAN REGENMORTEL, 1982; MERNAUGH et al., 1990). A resposta imunológica de um animal vertebrado à presença de antígenos estranhos é a produção de anticorpos (MATTHEWS, 1991).

Os anticorpos são proteínas pertencentes ao grupo das imunoglobulinas capazes de se ligar aos antígenos por reconhecimento do determinante do antígeno que lhe deu origem (VAN REGENMORTEL, 1982; MERNAUGH et al., 1990). Assim, os anticorpos encontrados num



antissoro (soro após imunização) formam uma população heterogênea de imunoglobulinas, que se distinguem pelas suas propriedades físicas, químicas e serológicas (MATTHEWS, 1991).

Os antissoros são produzidos através da imunização de animais com antígenos (por exemplo vírus) total ou parcialmente purificados (BERCKS et al, 1972) ou com moléculas (proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas e carboidratos) que sejam estranhas ao animal (GIBBS & HARRISON, 1976).

A técnica serológica baseia-se na possibilidade de reações específicas entre antígenos e antissoros. Nos estudos de predação, o antissoro é obtido para a praga que se quer investigar, e os antígenos, para os agentes controladores dessa praga. Estes inimigos naturais são frequentemente determinados por observação direta no campo. Por outro lado, técnicas de imunoensaio como Sorologia mostram-se vantajosas sobre a observação direta porque minimizam a interferência do pesquisador no ambiente e não descartam predadores noturnos. Por sua vez serologia é mais barata, pois não exige equipamentos sofisticados, fornece resultados estáveis e conteúdo ilimitado de anticorpos que permitem a investigação de um grande número de inimigos naturais, tem alta especificidade, permitindo o reconhecimento biológico em nível molecular (RAGSDALE et al., 1981; GREENSTONE & HUNT, 1993; HAGLER et al., 1995; HAGLER & NARANJO, 1997; SYMONDSON et al., 1997; 1999; SUNDERLAND, 1997; HAGLER, 1998; AGUSTI et al., 1999).

Os primeiros testes serológicos foram baseados na precipitação direta dos antígenos por mistura com anticorpos específicos (teste de precipitina). Mais tarde verificou-se que a precipitação podia ser feita por mistura de gotas de antígeno e antissoros em lâminas de vidro, sendo o aparecimento de flocos típicos da reação, facilmente observados ao microscópio de luz, em fundo escuro (SEQUEIRA, 1992). Leone (1947) utilizou testes de precipitina através do método de titulação e medições eletroforéticas da turbidez das reações, usando macerados de insetos. Assim pode relacionar a posição sistemática das espécies comparadas com a intensidade

das reações de precipitina e discutir a validade do uso de macerados de organismos vivos inteiros.

O uso da dupla difusão em gel de ágar foi introduzido por Ouchterlony (1948), nesse processo antígenos e anticorpos difundem-se no gel de Agar e, quando se encontram em proporções ótimas para reagir, formam-se linhas de precipitação, constituídas pelo complexo antígeno-anticorpo. Atuam como barreira imunoespecífica permitindo apenas a difusão de antígenos e anticorpo não relacionados. Se vários antígenos regirem com soro contendo anticorpos específicos para um deles, a formação de uma linha contínua de precipitação traduz identidade serológica entre antígenos enquanto que, se formar um esporão ou porção que se destaca da linha principal de precipitação, há relação serológica, mas não identidade (SEQUEIRA, 1992).

Por se tratar de uma técnica altamente sensível e específica a serologia tem se mostrado viável para a determinação das relações alimentares entre presa e predador e vem sendo utilizada por diversos autores para a determinação de predadores de uma determinada presa. DEMPSTER (1960) estudou a relação alimentar dos predadores do *Phytodecta olivácea* Foster (Coleoptera: Chrysomelidae), em 1963 o mesmo autor determinou as presas naturais de três espécies de *Anthocoris* (Heteroptera: Anthocoridae). Rothschild (1966) tentou relacionar o parasitismo e a predação com a mortalidade de ninfas e adultos de *Conomelus anceps* Germar (Hemiptera: Delohacidae).

Titova (1970) observou as interações entre *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) e outros artrópodes. Sutton (1970) utilizou-se do 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). Murray & Solomon (1978) determinaram as relações alimentares entre invertebrados predadores

e obtiveram vestígios de *Panonychus ulmi* (Koch) (Acarina: Phytoseiidae) e de *Phopalosiphum insertum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) presentes em predadores anthocorídeos.

Ohiagu & Borehan (1978) utilizaram a serologia para determinar as relações presa-predador em insetos, e determinaram o tempo de detecção de *Acyrtophon pisum* (Hemiptera: Aphididae) presentes no estômago do coccinelídeo *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Ressaltaram a simplicidade e eficácia dos testes serológicos de precipitina na avaliação das relações presa-predador, chamando a atenção para a possibilidade de estabilidade dos reagentes por até três semanas a 4°C.

Sousa-Silva (1980) utilizou a serologia para estudar os predadores da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Hance & Grégoire-Wibo (1983) relataram o regime alimentar de carabídeos (Coleoptera: Carabidae) através de testes serológicos estudando *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. Estudos sobre a utilização de *Deois flavopicta* (Stall, 1954) (Homoptera: Cercopidae) no preparo de antissoros específicos e a determinação de predadores de *D. flavopicta* foram realizados por Sousa-Silva et al. (1988, 1990). Boraie et al. (2005) estudaram no Egito as relações alimentares entre insetos praga e os artrópodes predadores utilizando a serologia como método complementar.

Santos-Neto et al. (2010) obtiveram antissoros específicos capazes de indicar os principais predadores de *Spodoptera frugiperda*. Dentre as espécies coletadas do milho: *Lagria villosa* Fabricius (Coleoptera: Lagriidae) e *Lygaeidae* (Hemiptera) foram identificadas como possíveis predadores da lagarta-do-cartucho.

## 4.2. Cultura do Milho (*Zea mays*) no Brasil

Atualmente o Brasil é o 3º maior produtor de milho no mundo e segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos a estimativa para produção mundial do grão na safra 2014/15 é de 999,4 milhões de toneladas. Se confirmadas as previsões para a safra que se encerra, entre os ciclos 2004/05 e 2014/15 o crescimento de produção da cultura será de 39,4%. Os três maiores produtores mundiais são EUA, China e Brasil, nessa ordem. O consumo mundial de milho estimado para a safra 2014/15 é de 970,8 milhões de toneladas, com os três maiores consumidores também sendo EUA, China e Brasil. Estima-se que 60% do consumo mundial de milho seja destinado para fabricação de rações, utilizadas na alimentação animal (USDA, 2015).

A produção de milho no Brasil tem sido dividida em duas épocas de plantio. A primeira safra, ou plantios de verão, onde são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso. Varia entre fins de agosto na região Sul até os meses de outubro/novembro no Sudeste e Centro-Oeste (no Nordeste este período ocorre no início do ano). Contudo, tem aumentado a produção obtida na chamada "safrinha", ou segunda safra. A "safrinha" se refere ao milho de sequeiro, plantado extemporaneamente, em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo (CONAB, 2013).

Sua importância econômica está relacionada às várias formas de utilização, da alimentação animal a indústria de alta tecnologia. Seu uso em grão na alimentação animal representa a maior parte do consumo, sendo que no Brasil varia de 70% a 90% da produção total. Embora o percentual destinado à alimentação humana não seja tão grande em relação a sua produção, o milho é um cereal de grande importância, principalmente para a população de baixa renda. Também possui grande importância social, principalmente porque no Brasil a maioria dos seus produtores não utiliza novas tecnologias, não possui grandes extensões de terras e depende de sua produção para viver (CRUZ et al., 2011).

Apesar de estar entre os três maiores produtores de milho do mundo, o Brasil não se destaca na produtividade média. Dentre os inúmeros fatores que interferem na produção, como tipo e fertilidade do solo, clima, armazenamento e transporte, o que causa maior dano econômico é o ataque de insetos-praga durante praticamente todo o ciclo da cultura (SANTOS et al., 2006). Nesse cenário, um dos fatores que contribui para as altas produtividades é o manejo adequado das pragas e doenças que assume grande importância durante as fases vegetativa e reprodutiva da cultura. Atualmente, há mais de 40 espécies de insetos-praga e 25 doenças associadas à cultura do milho no Brasil (AGROFIT, 2010). Dentre os insetos-praga que atacam a cultura destacam-se *S. frugiperda*, considerada a praga de maior dano econômico para o milho. Mas atualmente as lagartas *H. armigera* e *H. zea* e o afídeo *R. maidis* tem causado também grandes danos a cultura do milho no Brasil (CRUZ et al., 2006; CZEPAK et al., 2013).

O método de controle mais usado pelos produtores são os inseticidas (produtos químicos sintéticos), que além de agressivos ao meio ambiente, não apresentam eficiência quando não aplicados corretamente (VENDRAMIM, 1997; ROEL et al., 2000). Assim seu uso incorreto tem diminuído sua eficiência, forçando os produtores a aumentar o número de aplicações desses produtos e como consequência, o surgimento de populações de insetos resistentes a esses inseticidas.

O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais, enquanto no mundo são usados aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas anualmente cerca de 130 mil toneladas no país; representando um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (SPADOTTO et al., 2004).

Nas vendas totais de defensivos, a participação percentual dos inseticidas aumentou de 37% em 2012 para 40% em 2013, atingindo a casa dos US\$ 4,554 bilhões. Já o mercado de herbicidas cresceu 19%, ou US\$ 3,739 bilhões, e os fungicidas registraram aumento de 5%

totalizando US\$ 2,592 bilhões. Os acaricidas e outros produtos somaram crescimento de 18% e 13%, movimentando, respectivamente, US\$119 milhões e US\$ 450 milhões (SINDIVEG, 2014).

Assim emprego de estratégias de manejo integrado deve ser inserido nos programas de controle da lagarta-do-cartucho, com a finalidade de obtenção de resultados econômicos e ecológicos favoráveis. Dentre essas estratégias, a utilização de plantas resistentes é bem conhecida pelas suas vantagens biológicas e ambientais (HAMM & WISEMAN, 1986). E o controle biológico com a utilização de parasitoides, predadores e entomopatógenos, que podem de forma eficiente controlar o inseto no campo abaixo do nível de dano econômico, se usado de forma adequada. Algumas características que os tornam tão eficientes no controle biológico são a especificidade, compatibilidade com os outros inimigos naturais e segurança aos humanos (ENTWISTLE & EVANS, 1985).

### **4.3. Principais pragas da cultura do milho**

#### **4.3.1. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* é conhecida como praga de milho desde 1797, na Geórgia, Estados Unidos, e foi descrita originalmente como *Phalaena frugiperda* e teve seu nome científico alterado várias vezes (CRUZ, 1995). É considerada praga de importância mundial, por atacar diferentes plantas de interesse agrícola, como o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), o arroz (*Oryza sativa* L.), o sorgo e o milho (YU et al., 2003; ROJAS et al., 2004), sendo a principal praga dessa última cultura, no Brasil. Em condições favoráveis, pode reduzir de 17 a 54,49% da produção dos grãos desse cereal (FIGUEIREDO et al., 2006b).

Com 35mm de envergadura o adulto de *S. frugiperda* possui coloração cinza e asas posteriores de coloração clara, circundadas por linhas marrons. Dependendo das condições ambientais, as fêmeas podem ovipositar em torno de 13 posturas, com 100 ovos, sendo os ovos

colocados em grupos (CRUZ, 2008). A lagarta de *S. frugiperda*, com coloração que pode variar de verde a quase preta, apresenta seis estádios e até 35 mm de comprimento. O ciclo total dura cerca de 30 dias no verão, podendo atingir 50 dias nos meses mais frios; o período larval e a fase de pupa duram, aproximadamente, 14 e 10 dias, respectivamente (CRUZ, 1995, 2008) (Figura 1).



Figura 1. (A) Larvas; (B) Pupa; (C) Adulto de *Spodoptera frugiperda*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].

O ataque por *S. frugiperda* ocorre preferencialmente no cartucho da planta de milho, pelo consumo de grande parte da área das folhas antes da abertura destas. Se o ataque ocorrer nos primeiros estágios da cultura, poderá provocar a morte das plantas e reduzir o número de plantas por hectare (WAQUIL et al., 1982). A larva de *S. frugiperda* pode, ainda, alimentar-se do colmo; seccionar a base da planta; atacar o pedúnculo da espiga, impedindo a formação dos grãos; danificar diretamente os grãos; ou alimentar-se da ponta da espiga (CRUZ, 1995, 2008). A importância de *S. frugiperda* deve-se não somente aos danos provocados, mas especialmente à dificuldade de seu controle. Por isso, torna-se imprescindível o conhecimento dos parâmetros populacionais da praga, como seu padrão de dispersão na cultura, a fim de se desenvolverem táticas mais econômicas e sustentáveis de controle (SANTOS et al., 2004).

O controle da lagarta-do-cartucho, tem sido por meio de pulverização de inseticidas, com granulados aplicados no cartucho (WAQUIL et al., 1982; CRUZ & SANTOS, 1984) ou via tratamento de sementes (CRUZ et al., 1999). O controle cultural, através do revolvimento do solo, também é recomendado, pois pode promover mortalidade de 35 a 50% de pupas deste lepidóptero (CRUZ, 1995), cuja fase de pupa ocorre no solo.

Atualmente há um aumento da procura por novas alternativas de controle da lagarta-do-cartucho. O Controle Biológico visa encontrar na própria natureza, insetos denominados de inimigos naturais que, além de não prejudicarem as lavouras, alimentam-se de ovos e larvas dessa praga. Usado de maneira correta faz o mesmo efeito que o método químico, com a vantagem de ser permanente, não poluir o meio ambiente e não oferecer risco ao aplicador. Mas para isso é preciso conhecer a relação alimentar predador-presa, pois existem predadores generalistas e específicos (CRUZ, 1995).

#### **4.3.2. *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae)**

*Helicoverpa zea*, conhecida como lagarta-da-espiga-do-milho, é também considerada uma das pragas de maior importância econômica para a cultura do milho em nível mundial. Espécie polífaga, incluindo como hospedeiros além do milho, outras gramíneas, solanáceas, leguminosas, frutíferas e hortaliças, o que dificulta a implantação de um programa de manejo integrado do inseto (GIOLO et al., 2006). No Brasil, a importância da praga para a cultura do milho, pode ser verificada com incidência média relatada de até 96% de infestação nas espigas. Carvalho (1980) constatou que as infestações de *H. zea* são de até 96,3% das espigas, causando danos de até 8,4%, com 2,1% em consequência de grãos consumidos, 2,0% de grãos podres e 4,3% de falhas na granação das espigas (Figura 2).



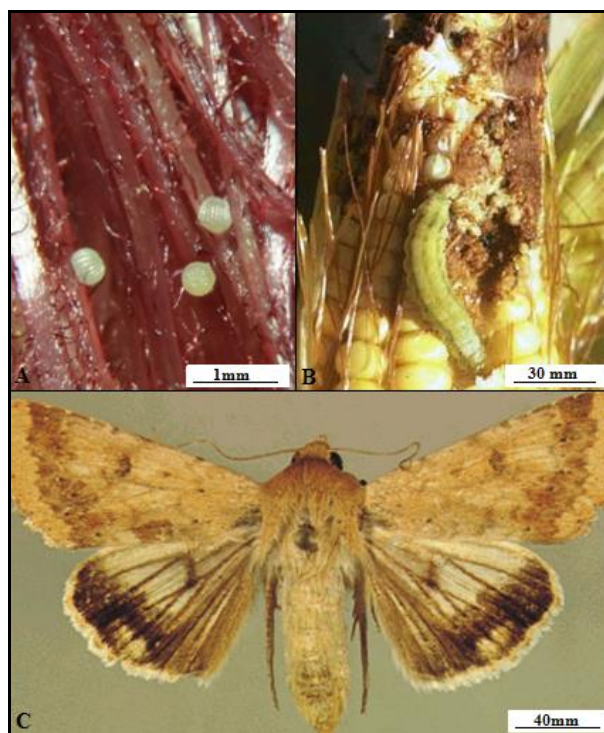


Figura 2. (A) Ovos; (B) Lagarta, (C) Adulto de *Helicoverpa zea*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].

O adulto de *H. zea* é uma mariposa com as asas anteriores amarelo-parda, com uma faixa transversal mais escura, apresentando também manchas escuras dispersas sobre as asas. As asas posteriores são mais claras, com uma faixa nas bordas externas. A fêmea fecundada põe o ovo de preferência nos estilos-estigma. Os ovos, esféricos e com saliências laterais (1 mm de diâmetro) são depositados individualmente até 15 por espiga (CRUZ, 2009). A eclosão das lagartas ocorre em um período de três a quatro dias, e imediatamente começam a alimentar-se dos estilos-estigmas.

À medida que se desenvolvem, penetram no interior da espiga e iniciam a destruição dos grãos ainda em formação. A lagarta completamente desenvolvida mede 35 mm e possui coloração entre verde-claro, rosa, marrom ou quase preta, com partes mais claras. O período larval varia entre 13 e 25 dias dependendo da temperatura. Findo o período larval, as lagartas saem da espiga e vão para o solo, onde se transformam na fase de pupa (10 a 15 dias) (CRUZ, 2009).

*H. zea* é conhecida por três formas de ataque na cultura: destruição dos estilo-estigmas, impedindo a fertilização e, como consequência, falhas na produção de grãos do ponteiro das espigas. Quando desenvolvida, alimenta-se de grãos leitosos, destruindo-os e, finalmente, os orifícios deixados pela saída das lagartas das espigas, por ocasião da empupação no solo, facilitam a penetração de microrganismos que podem causar podridões (GASSEN, 1996). Causa perdas diretas por atacar os grãos e indiretas pelo seccionamento dos estilos-estigma, o que provoca o abortamento dos grãos. Os prejuízos ocasionados por esse inseto são ainda mais elevados, em milho semente, pois são genótipos altamente suscetíveis por serem materiais homozigóticos não apresentarem heterose, e terem baixa produtividade (RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE et al., 2012).

O controle de *H. zea* se faz quase que exclusivamente mediante emprego de inseticidas, sendo esse método antieconômico e de muito baixa eficiência. Isto se deve ao fato das lagartas encontrarem-se protegidas no interior das espigas. Além disso, provoca um efeito negativo no equilíbrio biológico existente entre o inseto-praga e seus inimigos naturais, e o mau uso dos agrotóxicos acaba também por forçar a seleção de populações mais resistentes (CRUZ, 2002).

Em áreas de produção de milho semente, o controle químico é ainda mais dificultado. O processo de despendoamento coincide com o período de aplicações de inseticidas para controle da praga, o que limita a entrada de trabalhadores para a realização desta operação. A não aplicação ocasiona perdas no rendimento final de sementes. Seu controle é difícil uma vez que ao eclodirem dos ovos, penetram nas espigas pelo conjunto de estilo-estigmas. Na maioria dos casos, as perdas causadas pelo seu ataque nas espigas são inevitáveis devido a baixa eficiência de medidas de controle, tornando esta prática antieconômica (RUMMEL et al., 1986). Em milho doce, o nível de dano econômico aceitável é mínimo, já que a qualidade visual do produto é primordial, e os produtores chegam a aplicar inseticidas a intervalos de 24 ou 48 horas, até os estiloestigmas estarem todos secos (PITRE et al., 1979; MATRANGOLO et al., 1998)

#### 4.3.3. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

No Brasil, a *H. armigera* já causou danos significativos para os produtores rurais, ocasionando prejuízos estimados em R\$ 2 bilhões, nas duas últimas safras com incidência média relatada de até 96% de infestação nas espigas. Czepak et al., (2013) relataram a primeira ocorrência de lagarta no Brasil, que até o momento era considerada uma praga quarentenária. Foram observadas primeiramente nos Estados de Goiás, Bahia e Mato Grosso, nas culturas da soja e algodão.

É um inseto holometábolo (Figura 3), as fêmeas realizam a oviposição normalmente durante o período noturno e colocam seus ovos, de coloração branco-amarelado, de forma isolada ou em pequenos agrupamentos na face adaxial das folhas ou sobre os talos, flores, frutos e brotações terminais com superfícies com pelos (MENSAH, 1996). O período de incubação dos ovos é, em média, de 3,3 dias e o período larval com seis instares podem durar de 3 a 4 semanas (EPPO,1981).



Figura 3. (A e B) lagartas; (C) Macho e Fêmea de *Helicoverpa armigera*, escala de 3,0 cm. [Foto: (A e B) Embrapa Milho e Sorgo; (C) Cecília Czepak].

O período larval de *H. armigera* é de seis distintos instares onde os primeiros apresentam coloração que pode variar de branco-amarelada a marrom-avermelhada. À medida que as larvas crescem, apresentam listras de coloração marrom lateralmente no tórax, abdômen e na cabeça, podendo o tipo de alimentação utilizado pela lagarta influenciar na sua coloração (ALI &

CHOUDHURY, 2009). De acordo com Karim (2000), *H.armigera* pode entrar em diapausa dependendo das condições climáticas e sua fase de pupa ocorre no solo. O adulto apresenta uma linha com sete a oito manchas sobre as margens das asas anteriores e uma faixa marrom ampla, irregular e transversal logo acima, tendo ainda, na parte central, uma marca em forma de vírgula. As asas posteriores são mais claras, apresentando na extremidade apical uma borda marrom escura, com uma mancha clara no centro. O dimorfismo sexual é detectado nos machos no primeiro par de asas de cor cinza esverdeado e nas fêmeas pardo alaranjado (EPPO 1981, 1996).

*H. armigera* é uma espécie que apresenta boa mobilidade e alta capacidade de sobrevivência, mesmo em condições adversas (FITT, 1989). Possui grande poder de dispersão onde os adultos apresentam movimentos de longo alcance, podendo chegar a 1.000 km de distância (PEDGLEY, 1985). Altamente polífaga, a *H. armigera* apresenta a capacidade de se desenvolver em diversas plantas hospedeiras. Há registros de danos da lagarta em mais de 100 espécies de plantas, cerca de 45 famílias, incluindo Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (ALI & CHOUDHURY, 2009; FITT,1989; POGUE, 2004).

No Brasil, as maiores taxas de ataque da *H. armigera* e danos econômicos causados, têm sido observadas nas culturas de algodão, milho, soja, feijão, tomate e sorgo. As lagartas podem se alimentar de folhas e hastes das plantas, botões florais, frutos, maçãs, espigas e inflorescências. Podendo a planta apresentar deformações ou podridões nestas estruturas ou até mesmo a sua queda em consequência do ataque. A associação de dois importantes fatores: a habilidade de atacar grande número de hospedeiros e a capacidade de *H. armigera* causar danos nas partes reprodutivas das culturas faz com que essa praga tenha grande importância econômica (CUNNINGHAM et al., 1999)

Um grande surto *H. armigera* foi registrado na safra 2011/2012, região oeste da Bahia, especialmente no algodoeiro, com perdas de até 80% da produção desta cultura. Culturas como a soja e o milho, também foram atacadas por essa praga na ocasião. Na safra 2012/2013 também houve grande ataque da *H. armigera*, nos cultivos da Bahia, lavouras de soja irrigada, algodão e

feijão, quando os produtores tiveram que realizar várias aplicações de inseticidas para o seu controle. Faz-se necessário conhecer a dinâmica populacional do inseto, entender os principais fatores ambientais ou biológicos que podem interferir positivamente ou negativamente no seu desenvolvimento para se tentar um controle eficiente de lagartas de *H. armigera* nos sistemas de produção. Uma das estratégias de manejo dessa praga seria o monitoramento efetivo de ovos, lagartas, pupas e de adultos de *H. armigera*, o uso de plantas resistentes, o controle cultural e o controle biológico (FATHIPOUR & SEDARATIAN, 2013).

*H. armigera* é uma praga exótica para o Brasil e pesquisas deveriam ser direcionadas com o objetivo de buscar inimigos naturais que sejam eficientes para serem utilizados como agentes biológicos de controle nos sistemas de produção agrícolas. Fathipour e Sedaratian (2013), relataram 36 parasitoides, 23 predadores e 9 patógenos associados as formas imaturas de *H. armigera*, sendo constatados níveis de controle biológico natural por estes inimigos naturais, variando de 5% a 76%, dependendo da cultura e do estágio de desenvolvimento da praga. No Estado do Paraná foi observada uma elevada ocorrência de parasitismo em lagartas de *Helicoverpa*, em milho safrinha de 2013. Cerca de 50% das lagartas coletadas apresentarem-se parasitadas por moscas da família Tachinidae. Os resultados evidenciam o alto potencial de controle biológico natural que pode ser explorado, especialmente quando se utilizam métodos de controle seletivos para o manejo de *H. armigera* (ÁVILA et al., 2013).

#### **4.3.4. *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae)**

A liberação comercial, a introdução da tecnologia dos transgênicos e o plantio de milho Bt têm contribuído para uma mudança na redistribuição da importância econômica das espécies-pragas no milho. São as lagartas, especialmente a lagarta-do-cartucho, o principal alvo das cultivares de milho Bt no Brasil. Com ação imediata a população de lagartas é reduzida em seus primeiros instares. No entanto a ausência de competição intraespecífica oferece condições propícias para a ocupação e permanência de outras espécies na cultura como o afídeo

*Rhopalosiphum maidis*, que pode se transformar em praga chave da cultura do milho Bt (CRUZ et al., 2012).

Esse afídeo (Figura 4) pode ocasionar grandes perdas à cultura, pois ao sugar a seiva provoca o definhamento geral da planta, resultando em folhas encarquilhadas, amareladas, enroladas e recobertas por “honeydew”, o que favorece o desenvolvimento de fumagina, afetando, assim, a atividade fotossintética da planta (CRUZ et al., 2006). Em plantas isoladas inicia-se a infestação por esse afídeo, dispersando-se em reboleiras na lavoura durante o período vegetativo e, principalmente, próximo ao lançamento do pendão (GASSEN, 1996).



Figura 4. (A) Adultos e ninfas de *R. maidis*; (B) Planta de milho infestada com *Rhopalosiphum maidis*; (C) Planta doente. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].

Possui uma coloração verde-amarela para verde oliva escuro, por vez verde azulada, polvilhados com cera, com sífúnculos escuros curtos. As formas ápteras medem cerca de 1,5 mm de comprimento e as formas aladas são menores e possuem dois pares de asas. Com seu aparelho bucal picador-sugador tem preferência por folhas mais novas das plantas de milho. Vivem

principalmente no cartucho das plantas, em colônias e, quando em grande número, podem se espalhar por outras partes, desde o colmo até aos órgãos reprodutivos. As formas ápteras e aladas são constituídas por fêmeas, com reprodução partenogênica telítoca (OLIVEIRA et al., 2003).

O pulgão também é vetor do “potyvirus”, agente causal do mosaico comum, que pode provocar grandes prejuízos à cultura do milho (OLIVEIRA et al., 2003; WAQUIL et al., 1996) A transmissão do vírus pelo afídeo é do tipo não persistente, ou seja, é liberado com a secreção salivar durante a alimentação (OLIVEIRA et al., 2003). Os sintomas dessa virose normalmente apresentam-se em padrão do mosaico, caracterizando-se pela presença, nas folhas, de manchas verdes entremeadas por manchas amareladas, que podem ser observadas na lâmina e bainha de todas as folhas, e na palha das espigas que se desenvolvem após a infecção. Algumas vezes as plantas podem se apresentar levemente enfezadas. Esses sintomas são claramente visíveis em plantas jovens e tendem a desaparecer à medida que elas se tornam adultas.

No que se refere às medidas de controle, pesquisas mostram que a aplicação de inseticida para o controle dos pulgões não é uma medida eficiente para o controle da doença. Porém, a utilização de cultivares resistentes é considerada uma eficiente alternativa de controle (OLIVEIRA et al., 2003).

#### **4.4. Predadores**

##### **4.4.1. *Doru luteipes* (Scudder,1876) (Dermaptera: Forficulidae)**

As “tesourinhas” receberam esse nome por possuírem cercos grandes em forma de pinça. Em algumas espécies, as pinças dos machos oferecem variações consideráveis no tamanho e na forma, observando-se assim, dimorfismo sexual. Além disso, os cercos são utilizados como armas de defesa e de ataque, facilitam a arrumação das asas sob os élitros e a aproximação dos insetos na cópula. As peças bucais são do tipo mastigador, os adultos geralmente têm quatro



asas; sendo as anteriores curtas, coriáceas e sem nervuras, e as posteriores (quando presentes) são membranosas, arredondadas e com nervuras, e quando em repouso são dobradas para cima sob as asas anteriores. Os tarsos possuem três segmentos, sendo que há algumas espécies completamente ápteras (TRIPLEHORN & JONNISON, 2010).

*Doru luteipes* é de pequeno porte, variando pouco mais de 13 mm. O abdome é preto, com 11 segmentos, sendo oito visíveis. A cabeça e o pronoto são pretos com margens laterais amarelas (Figura 5). O período ninfal dura em média 44 dias, passando por quatro instares, sendo a fase adulta a mais longa com mais de 300 dias em laboratório (REIS et al., 1988). Ninfas e adultos de *D. luteipes* têm demonstrado alto potencial como agente de controle biológico de *S. frugiperda*, *H. zea* e de afídeos que são pragas de importância econômica na cultura do milho (PICANÇO et al., 2003).



Figura 5. (A) Macho de *Doru luteipes*; (B) Fêmea de *Doru luteipes*; (C) Fêmea com ninfas. [Foto: Redoan, A. C.].

Reis et al. (1988), relataram que a tesourinha é capaz de predar na fase de ninfa, 13 ovos e 12 lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda* e que durante todo o ciclo pode consumir 496 ovos, 424 lagartas na fase ninfal e 2.109 lagartas na fase adulta. Cruz (1995) também relatou sobre a importância do predador no controle de *S. frugiperda* pelo grande consumo da presa,



estimado em 21 ovos por dia para adultos e 12 para as ninfas. Para ovos de *H. zea* seu consumo era de 39 ovos por dia. Assim de acordo com Waquil et al. (2002), a presença do predador em 70% plantas de milho seria o suficiente para manter a lagarta do cartucho abaixo do nível de dano econômico.

Alvarenga et al. (1995) estudaram aspectos biológicos do predador *D. luteipes* alimentado com *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae) e encontraram um consumo diário de pulgões durante a fase ninfal do predador variou de 1,93 a 3,09 no primeiro instar chegando a 19,5 a 33,2 no quarto instar. Pedroso et al. (2010) avaliaram o consumo diário de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) por *D. luteipes* e constatou que durante a fase ninfal que foi de 27 dias, houve o consumo de 4.600 ovos de *P. xylostella*. Guerreiro et al. (2005) constataram que a distribuição espacial, na cultura do milho, de *D. luteipes* é semelhante à de *S. frugiperda*. Assim, no campo, é possível notar que o predador é encontrado sempre próximo do local de ocorrência de sua presa, o que para o controle biológico representa uma grande vantagem, pois neste ambiente a predação pode ocorrer de forma mais acentuada, implicando na diminuição da população da *S. frugiperda* (FARIAS et al., 2001).

#### **4.4.2. Euborellia annulipes (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae)**

*E. annulipes* (Figura 6) é encontrada em regiões temperadas, apresenta hábitos onívoros e caracteriza-se por apresentar coloração escura, não possui asas fórceps curtos, sendo que nos machos é assimétrico. As ninfas são muito semelhantes aos adultos, sendo que os primeiros estágios podem ser diferenciados pelo número de segmentos das antenas. As ninfas no primeiro estágio apresentam oito; no segundo onze; no terceiro treze; no quarto catorze; no quinto e sexto de 14 a 17 segmentos (GUIMARÃES et al., 1992).



Figura 6. (A) Macho de *Euborellia annulipes*; (B) Fêmea de *Euborellia annulipes*; (C) Fêmea com ovos. [Foto: Redoan, A. C.].

Os estudos da biologia demonstraram que a oviposição geralmente ocorre à noite e, em média, são depositados 23 ovos em cada postura. Algumas fêmeas realizam quatro posturas em noites sucessivas (BHARADWAJ, 1966). A fêmea cuida dos ovos até o momento da eclosão das ninfas e, quando se encontram dispersos, os reúne numa pilha, onde são cuidados, sendo assim, similar ao cuidado parental descrito por Marucci (1955), Knabke & Grigarick (1971), Shepard et al. (1973), Ammar & Farrag (1974) e Guimarães et al. (1992), para outras espécies de tesourinhas. Sempre que os ovos são removidos de local, as fêmeas procuram reorganizá-los na posição original, geralmente posicionam o corpo ao redor ou sobre os ovos, manipulando-os com as mandíbulas, rodando-os com movimentos rápidos, sendo este comportamento interpretado por Bharadwaj, (1966) e Knabke & Grigarick (1971) como uma forma de assepsia ou limpeza, tendo em vista que, na ausência da fêmea, os ovos podem ser atacados por fungos ou ácaros. Os ovos inférteis ou danificados são devorados pela fêmea. Após a eclosão das ninfas a fêmea cessa os cuidados maternos (GUIMARÃES et al., 1992).

*E. annulipes* apresenta grande diversidade de habitats e um alto consumo de diversas pragas como *Crambus bonifatellus* (Hulst) (Lepidoptera: Crambidae) e *Anagasta kuehniella*

(Zeller,1879) (Lepidoptera: Pyralidae) o que valida seu potencial para uso em programas de controle biológico (PINTO et al., 2005). Silva et al. (2009a) estudaram a capacidade de predação de *E. annulipes* sobre *S. frugiperda* em laboratório. O inimigo natural pelos resultados demonstrou ser predador potencial de ovos e lagartas de *S. frugiperda*, chegando um adulto a consumir 1.481,2; 89,20 e 48,6 ovos e lagartas de 1º e 2º instares, respectivamente, nos dez dias de consumo. Em outro trabalho com *E. annulipes*, Silva et al. (2009b) observaram que o 5º instar foi o que mais predou, consumindo 375, 251,3 e 182,3 ovos com 1, 2 e 3 dias de desenvolvimento, respectivamente.

#### **4.4.3. *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)**

Devido a sua voracidade e plasticidade ecológica em diferentes agoecossistemas e sua associação às mais diversas pragas os crisopídeos são considerados predadores importantes. Constituem a segunda maior família de insetos da ordem Neuroptera com 75 gêneros, 11 subgêneros e 1200 espécies (BROOKS & BARNARD, 1990). São polífaros encontrados em muitas culturas de interesse econômico, exercendo importante papel no controle biológico de pragas (ADAMS & PENNY, 1985). Suas mandíbulas funcionam como pinça e como peças sugadoras onde possuem a capacidade de injetar uma poderosa toxina que imobiliza a presa, o que permite a sua alimentação sem maiores problemas. Após o desenvolvimento completo, as larvas tecem casulo com o fluido secretado pelos tubos de Malpighi e colocado ao meio externo através do ânus (LIMA,1942; BERTI FILHO,1980; FIGUEIRA et al., 2000) (Figura 7).



Figura 7. *Chrysoperla externa*: (A) Ovo (B) Larva (C) Adulto. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].

Os ovos são pedicelados, com comprimento de 4 a 8mm, forma elipsoidal, com a cor variando de verde-clara a amarelo-esverdeada, sendo que vão escurecendo próximo da eclosão. O pedicelo é composto de substância gelatinosa, exsudada na ocasião da postura, que endurece em contato com o ar. As larvas são do tipo campodeiforme, com cabeça triangular, prognata, aparelho bucal sugador mandibular, pernas ambulatórias, corpo com várias cerdas (LIRA & BATISTA, 2006). Com três instares larvais e um período larval de 10,4 dias a 24°C, com período de pupa de 10,23 e o período médio de incubação dos ovos 3,7 dias, sendo que o terceiro exibe maior voracidade, pode ser considerado dos mais eficientes predadores de pulgões, cochonilhas e outros pequenos artrópodes que vivem sobre as plantas.

De forma geral, as larvas de crisopídeos podem chegar a consumir 405 ovos de *Sitotroga cerealella* (Oliver), 553 ovos de *Anagasta kuhniella* (Zeller), 2000 pulgões, 3780 cochonilhas (ADAMS & PENNY, 1985). Os crisopídeos não são considerados consumidores primários de ácaros, porém algumas espécies podem se alimentar exclusivamente deles (PUTMAN & HERNE, 1966). RIBEIRO et al. (1991) verificaram que larvas de *Chrysoperla externa* alimentadas com pulgão *Aphis gossypii* Glover completaram o desenvolvimento em 10,3 dias

com 93% de viabilidade, ao passo que as larvas alimentadas com *Toxoptera citricidus* Kirkaldy não sobreviveram além do segundo ínstar.

SANTA-CECÍLIA et al. (1997) relataram que larvas de *Ceraeochrysa cubana* (Hagen) alimentadas com ovos de *A. kuehniella* completaram o desenvolvimento em 25,7 dias, com 75% de viabilidade, porém quando foram alimentadas com *Pinnaspis* sp., o ciclo durou 28,0 dias, com viabilidade de apenas 5%. Em casa de vegetação e laboratório Boregas et al. (2003) alimentaram larvas de *C. externa* com ovos de *A. kuehniella*. Constataram a maior capacidade predatória (2.630,0±224,8 ovos) foi obtida para larvas de terceiro ínstar mantidas em tubos de vidro, constatando-se um consumo de 1.919,9±151,6 ovos quando mantidas em gaiolas plásticas fixadas em folhas do algodoeiro. Deve ser levado em consideração além da alta voracidade do predador, a facilidade com que esses predadores podem ser criados em laboratório. O que permite o incremento das técnicas para a sua produção massal para a implementação do predador em programas de controle biológico (CARVALHO & SOUZA, 2000).

#### 4.4.4. Coccinelídeos

Os coccinelídeos, mais conhecidos como “joaninhas”, variam de 4 a 5,9 mm e são predadores de grande importância no controle das populações de algumas pragas como pulgões, cochonilhas, ácaros fitófagos ovos e larvas de lepidópteros. Atuam tanto na fase de larva quanto na fase adulta e apresentam grande atividade de busca, ocupando todos os ambientes de suas presas (STATHAS, 2000). Como predadores generalistas têm sido utilizados com sucesso em programas de controle biológico, visando controlar um complexo de pragas presente no agroecossistema (PERVEZ & OMKAR, 2006; DE CLERCQ et al., 2003).

As espécies *Eriopis connexa* (Gemmar, 1824) (Figura 8), *Coleomegilla maculata* (Degeer), *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763), *Hippodamia convergens* (Guerin-Meneville, 1842), e *Olla v-nigrum* (Mulsant, 1866) como outros coccinelídeos afidófagos, passam por quatro instares larvais, pupa e adulto (HODEK & HONEK, 1996) (Figura 9).

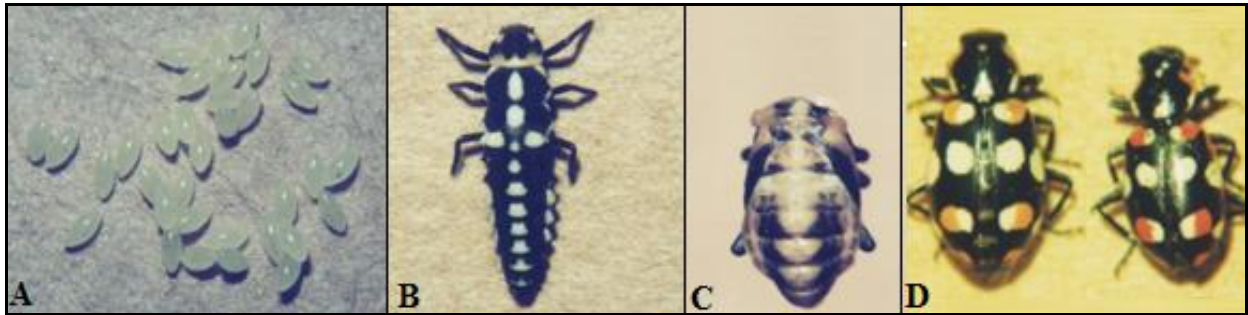


Figura 8. (A) Ovos; (B) Larva; (C) Pupa; (D) Adulto de *Eriopis connexa*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].

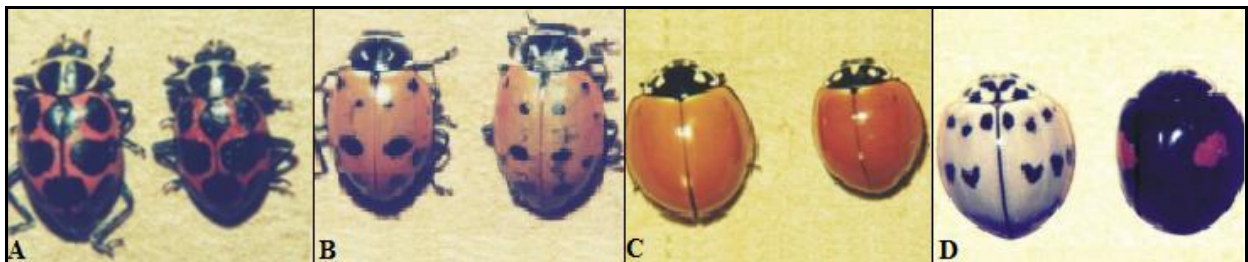


Figura 9. (A) *Coleomegilla maculata*; (B) *Hippodamia convergens* (C) *Cycloneda sanguinea*; (D) *Olla v-nigrum*. [Foto: Embrapa Milho e Sorgo].

O número de ovos produzidos é muito variável entre as espécies, bem como entre de uma mesma espécie. Muitos coccinelídeos afidófagos depositam seus ovos em grupos de 10 a 110 ovos, enquanto que os coccinelídeos coccidófagos depositam grupos de menor número de ovos. As larvas recém eclodidas, normalmente, permanecem sobre os ovos por cerca de um dia, podendo levar ao canibalismo (IPERTI, 1999). As larvas são do tipo campodeiforme, caracterizada por apresentar três pares de pernas torácicas alongadas, que lhes permitem movimentarem-se, como os adultos, com relativa facilidade. Os adultos vivem de 30 a 90 dias, dependendo da temperatura que pode influenciar tanto na taxa de desenvolvimento, quanto no peso adulto, sendo que sob a influência de temperaturas mais altas produzem adultos menores (SOARES et al., 2004).

Santa-Cecília et al. (2001) estudaram alguns aspectos biológicos e a resposta funcional das fases imaturas de *C. sanguinea* em função de diferentes densidades de ninfas de *S. graminum*. A capacidade predatória do 1º, 2º, 3º e 4º ínstaes dos machos foi de 31,2; 74,7;

107,0 e 393,5 pulgões, respectivamente, e das fêmeas foi de 24,3; 75,5; 89,0 e 423,5 pulgões. Boiça Júnior et al. (2004) estudaram a capacidade predatória de *C. sanguinea* e *H. convergens* alimentadas com o pulgão *A. gossypii* em plantas de algodoeiro em casa de vegetação. A *C. sanguinea* reduziu em média 93,5% a população do pulgão na cultura, enquanto que *H. convergens* causou uma redução populacional de 86,9%.

Hoballah et al. (2004) observaram espécies de *Coleomegilla* alimentando - se de lagartas jovens de *S. frugiperda* em plantas de milho. Já em laboratório Pereira (1997) alimentou *C. maculata* com diferentes densidades de massas de ovos de *S. frugiperda* distribuídas em plantas de milho, o predador consumiu totalmente a primeira massa de ovos dessa presa ou até à saciedade, mas preferiu aquelas com maior número de ovos. Koch (2003) relatou a importância da *H. axyridis* no controle biológico de afídeos. Onde um adulto é capaz de consumir de 90 a 270 afídeos por dia, enquanto cada larva, de 600 a 1200, durante todo o seu desenvolvimento (OSAWA, 1993). No entanto essa espécie é também conhecida em relação à sua polifagia. A *H. axyridis* é capaz de consumir mais de 77 espécies de presas diferentes, encontradas em cerca de 85 espécies de plantas em 35 famílias (GUEDES & ALMEIDA, 2013).

No controle biológico de pragas o primeiro relato da utilização dos coccinelídeos foi em 1889, com a joaninha *Rodolia cardinalis* (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae). Foi importada da Austrália para controlar a cochonilha *Icerya purchasi*, praga de citros da Califórnia - EUA. O controle foi tão eficaz, que até nos dias atuais este é considerado como o marco do controle biológico clássico no mundo. Principalmente pelos efeitos científicos, econômicos e políticos sem precedentes no mundo. A partir desta primeira utilização, a joaninha *R. cardinalis* foi introduzida em mais de 33 países, obtendo sucesso no controle biológico da cochonilha *I. purchasi*. Apesar da grande importância dos coccinelídeos como reguladores ambientais, pouco se conhece sobre as espécies que ocorrem no Brasil e o comportamento apresentado por estes insetos (GUERREIRO, 2004).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo), Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda*, *H. zea*, *H. armigera* e exemplares do afídeo *R. maidis* no preparo de antissoros que posteriormente foram empregados em testes serológicos homólogos e heterólogos com possíveis predadores.

### 5.1. Produção dos antígenos imunizantes (Ag) antissoros (As):

Para obter os respectivos antígenos imunizantes (Figura 10) foram utilizadas três lagartas de quarto instar de cada uma das espécies *S. frugiperda* (AgSf), *H. armigera* (AgHa) e *H. zea* (AgHz) e ninfas e adultos do pulgão-do-milho *R. maidis* (AgRm). As lagartas e os afídeos foram deixados em jejum por 24h; posteriormente cada conjunto específico foi macerado, separadamente, em solução salina (0,85%) e centrifugado a 6000 g por 10 minutos.

Os sobrenadantes 1,5ml, emulsionados com Adjuvante Freund completo 1,5ml foram utilizados como antígenos imunizantes para obtenção dos diferentes antissoros (As) para as pragas do milho selecionadas. Para a produção de cada antissoro foi utilizado um coelho da raça Nova Zelândia, com 5 kg e um ano de idade. Cada coelho foi imunizado com 3,0 ml do antígeno imunizante (AgSf, AgHa, AgHz ou AgRm) na região do linfonodo da sua perna posterior (OLIVEIRA, 1975). Antes da primeira imunização foi recolhida uma amostra de sangue para ser utilizada como controle (C) nas reações serológicas. Após a imunização sangrias diárias foram realizadas em cada coelho por 30 dias, para o recolhimento dos antissoros (Figura 10).



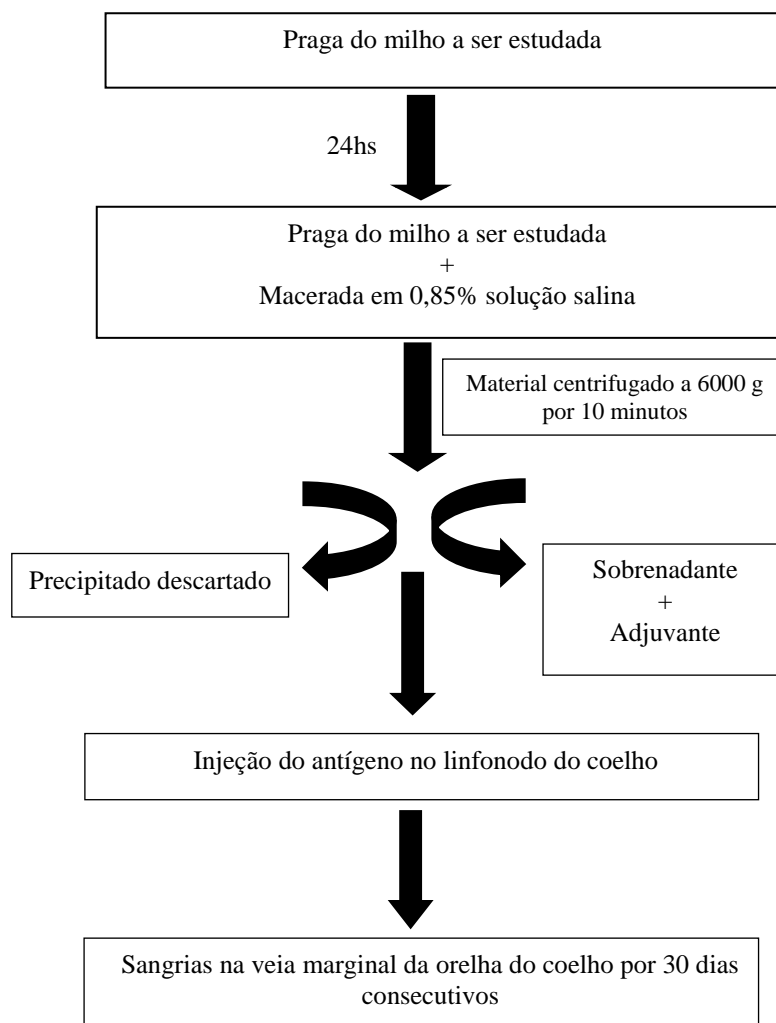


Figura 10. Procedimento para a coleta de cada antissoro produzido das espécies *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* e *Rhopalosiphum maidis*.

As sangrias (10 ml) eram realizadas por meio de cortes transversais na veia marginal da orelha do coelho e o sangue recolhido era, inicialmente, mantido em repouso por duas horas em temperatura ambiente (23°C) e, posteriormente, em geladeira (4°C) por 24 horas. O coágulo formado era descartado e o sobrenadante correspondente a cada espécie de lagarta *S. frugiperda* (AsSf), *H. armigera* (AsHa), *H. zea* (AsHz) e ao afídeo *R. maidis* (AsRm) foram armazenados em congelador a -2°C, para a determinação de seus respectivos títulos e uso nos testes serológicos.

## 5.2. Testes Serológicos

Os testes serológicos foram realizados utilizando-se a técnica de dupla difusão em Ágar a 1%, contendo 0,02% de azida de sódio, 0,85% de cloreto de sódio, 2% de cloreto de magnésio e 0,5 ml de uma solução de azul tripano a 1%, sobre lâminas para microscopia (3,0 ml de solução de ágar por lâmina de 75 x 25mm) de acordo com metodologia descrita por Schaad et al. (1990) (Figura 11).



Figura 11. Ágar em lâminas para microscopia [Fotos: Redoan, A. C.]

### 5.2.1. Testes serológicos homólogos

Os antissoros obtidos em cada uma das sangrias realizadas foram testados contra os seus antígenos homólogos. Observou-se o início do aparecimento das linhas de precipitação e a quantidade dessas linhas nas diferentes reações. Os antissoros que permitiram os maiores números de linhas foram titulados. Avaliou-se também as reações de cada um dos antissoros com

os diferentes estágios e/ou instares de seus antígenos homólogos: ovos, lagartas pequenas (1º instar), lagartas médias (2º a 3º instares), lagartas grandes (4º a 5º instares), pupas de *S. frugiperda*, *H. zea* e *H. armigera*, ninfas e adultos do afídeo *R. maidis*, macerados em solução salina 0,85%. As lâminas com os resultados positivos foram submersas por 1h em água destilada e, coberta com papel de sulfite molhado deixando secar por 24h a 25°C. 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 do corante foi removido por lavagens em ácido acético (Figura 12).

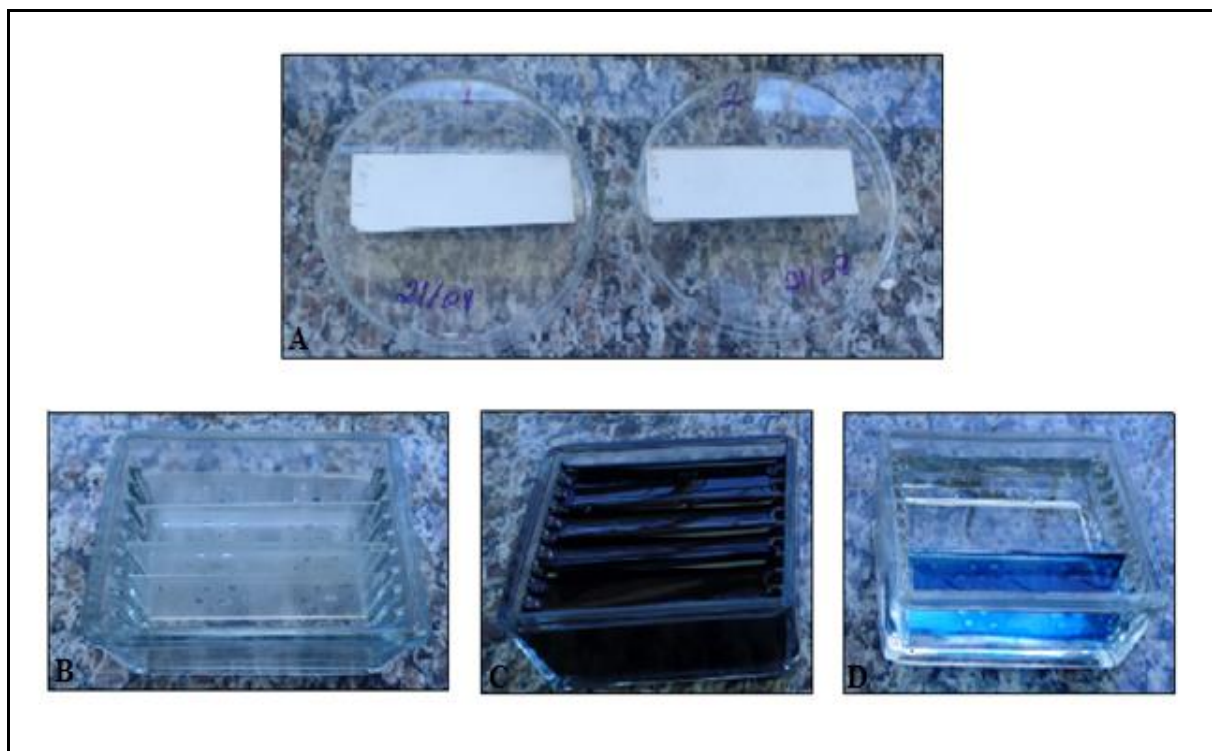


Figura 12. Processo para corar as lâminas. (A) Lâmina com papel de sulfite, (B) Recipiente com as lâminas sem o papel, (C) Solução para corar as lâminas, (D) Solução para lavar as lâminas. [Fotos: Redoan, A. C.].

### 5.2.1. Titulação dos antissoros

Os títulos dos respectivos antissoros AsSf (*S. frugiperda*), AsHa (*H. armigera*), AsHz (*H. zea*) e AsRm (*R. maidis*), foram determinados utilizando-se suas frações diluídas em solução de NaCl a 0,85% numa progressão geométrica de razão 1/2 em reações serológicas com seus respectivos antígenos homólogos. Os antissoros que proporcionaram o maior número de linhas de precipitação foram selecionados para serem utilizados nos testes serológicos posteriores.

### 5.2.2. Testes serológicos heterólogos (testes de alimentação)

Os experimentos citados abaixo foram conduzidos isoladamente para cada predador, sendo que os predadores utilizados foram retirados da criação do laboratório de Criação de Insetos (LACRI) da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais. Dos predadores adultos foram utilizados os abdomens para realização dos testes (*D. luteipes*, *E. annulipes*), as larvas de predadores (*C. externa* e *O. v-nigrum*) foram maceradas e utilizadas integralmente, evitando-se maior diluição do material.

**-Medição do tempo em horas para detecção da presa após a alimentação do predador.** Para se avaliar o tempo em que a presa ingerida pelo predador ainda poderia ser detectada serologicamente, utilizou-se 10 exemplares de *D. luteipes*, *E. annulipes*, *O. v-nigrum*, *C. externa*. Inicialmente esses predadores foram mantidos em jejum por 24 h. Após esse período *D. luteipes* e *E. annulipes* foram alimentados com um exemplar de lagarta de sete dias de idade de *S. frugiperda*. As larvas *C. externa* e *O. v-nigrum* foram alimentadas com lagartas de quatro dias de idade de *S. frugiperda*. Após 24h, 48h e 96h da alimentação os predadores foram testados contra o antissoro homólogo. O mesmo experimento foi conduzido separadamente para *H. armigera*, *H. zea* e *R. maidis*.

**-Sensibilidade do teste para o número de presas ingeridas.** Para se determinar o número mínimo de presas ingeridas pelo predador e que ainda poderia ser detectado pela serologia, 10 exemplares de cada um dos predadores *D. luteipes*, *E. annulipes*, *O. v-nigrum* e *C. externa* foram mantidos em jejum por 24 h. Após esse período cada predador foi alimentado com 1, 2, 3, 4 exemplares de lagartas de *S. frugiperda*. Após a alimentação foram testados contra o antissoro homólogo. O mesmo experimento foi conduzido separadamente para *H. armigera*, *H. zea* e *R. maidis*.

**-Uso dos antissoros na detecção da predação por ovos das lagartas pragas do milho.**

Dez exemplares de cada um dos predadores: *D. luteipes*, *E. annulipes*, *O. v-nigrum* e *C. externa* foram mantidos em jejum por 24 h. Após esse período foi fornecido para cada predador 50 ovos de *S. frugiperda*, *H. armigera* e *H. zea*. Após o consumo total dos ovos cada predador foi testado contra o antissoro homólogo. Ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) foram testados para se observar possíveis reações cruzadas.

### 5.2.3. Especificidade

Testes serológicos com cada um dos antissoros em reações heterólogas com os respectivos macerados das lagartas *S. frugiperda*, *H. armigera*, *H. zea* e do afídeo *R. maidis* foram realizados para se avaliar a especificidade dos antissoros uma vez que similaridade das espécies de lagartas utilizadas como antígenos permite o aparecimento de reações cruzadas, isto é, antissoro obtido para um antígeno, reagir com um antígeno diferente.

**- Predadores confinados em gaiolas com 24hs de alimentação a vontade “ad libitum”.**

Quarenta exemplares de *D. luteipes*, deixados em jejum por 24hs, foram acondicionados em gaiolas acrílicas com medidas de (25x25x25cm). No interior de cada da gaiola foram colocados

ovos de *S. frugiperda*, *H. armigera*, *H. zea* e larvas e adultos de *R. maidis*. Os predadores tiveram 24hs de alimentação a vontade. Após esse período os insetos foram testados com os diferentes antissoros. O teste foi conduzido separadamente com os predadores *E. annulipes*, *C. externa* e *O. v-nigrum*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott & Knott a 5% (Scott & Knott, 1974), utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2007).

**-Testes serológicos com predadores coletados no campo.** Testes de campo foram realizados com predadores coletados manualmente em área de milho orgânico da cultivar BRS1030 na Embrapa - Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais. Após as coletas os mesmos foram levados ao laboratório, identificados e armazenados em freezer a -2°C, para serem usados posteriormente contra os antissoros específicos das pragas *S. frugiperda*, *H. armigera*, *H. zea* e *R. maidis*.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Testes serológicos homólogos (testes de alimentação)

Com apenas uma inoculação dos antígenos nos coelhos, foi possível observar linhas de precipitação nas reações serológicas sete dias após o processo de imunização. Os testes serológicos homólogos mostraram reações positivas da 7<sup>a</sup> a 30<sup>a</sup> sangria. Para *H. armigera* as reações positivas apresentaram de uma a quatro linhas de precipitação. Sendo que os antissoros que apresentaram maior título foram AsHa 18<sup>a</sup>, AsHa 19<sup>a</sup>, AsHa 21<sup>a</sup> e AsHa 22<sup>a</sup> (Tabela 1).

Para *H. zea* os antissoros que apresentaram os maiores títulos foram AsHz 19<sup>a</sup>, AsHz 20<sup>a</sup>, AsHz 21<sup>a</sup> (Tabela 2), onde as linhas de precipitação também variaram de 1 a 4. Na tabela 3 foram registrados os resultados das sangrias para a *S. frugiperda*. As linhas de precipitação variaram de 1 a 2 e os antissoros de maiores títulos foram AsSf 14<sup>a</sup> ao AsSf 21<sup>a</sup>. Diferindo dos

demais o antissoros do pulgão do milho apresentou apenas uma linha de precipitação (tabela 4). Os antissoros foram capazes de reagir positivamente com o seu antígeno homólogo em todos os seus estágios de desenvolvimento (ovo, lagarta e pupa), no entanto não se notou diferença no número de linhas de precipitação

Tabela 1. Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de outubro e novembro de 2014, para obtenção dos antissoros para *Helicoverpa armigera* (AsHa), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação.

↑ ↓	Data	Antígeno + adjuvante (ml)	Sangria (ml)	Antissoros (ml)	Antissoros obtidos	Reações serológicas Homólogas
↑ ↓	29/10/2014	3	10	5	Soro Normal	-
↓	30/10/2014		10	5	AsHa 1	-
↓	31/10/2014		10	5	AsHa 2	-
↓	01/11/2014		10	5	AsHa 3	-
↓	02/11/2014		10	5	AsHa 4	-
↓	03/11/2014		10	5	AsHa 5	-
↓	04/11/2014		10	5	AsHa 6	-
↓	05/11/2014		10	5	AsHa 7	+
↓	06/11/2014		10	5	AsHa 8	+
↓	07/11/2014		10	5	AsHa 9	+
↓	08/11/2014		10	5	AsHa 10	+
↓	09/11/2014		10	5	AsHa 11	+
↓	10/11/2014		10	5	AsHa 12	+
↓	11/11/2014		10	5	AsHa 13	+
↓	12/11/2014		10	5	AsHa 14	++
↓	13/11/2014		10	5	AsHa 15	++
↓	14/11/2014		10	5	AsHa 16	++
↓	15/11/2014		10	5	AsHa 17	++
↓	16/11/2014		10	5	AsHa 18	++++
↓	17/11/2014		10	5	AsHa 19	++++
↓	18/11/2014		10	5	AsHa 20	++
↓	19/11/2014		10	5	AsHa 21	+++
↓	20/11/2014		10	5	AsHa 22	+++
↓	21/11/2014		10	5	AsHa 23	+
↓	22/11/2014		10	5	AsHa 24	+
↓	23/11/2014		10	5	AsHa 25	+
↓	24/11/2014		10	5	AsHa 26	+
↓	25/11/2014		10	5	AsHa 27	+
↓	26/11/2014		10	5	AsHa 28	+
↓	27/11/2014		10	5	AsHa 29	+
↓	28/11/2014		10	5	AsHa 30	+

Tabela 2. Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de outubro e novembro de 2014, para obtenção dos antissoros homólogos de *Helicoverpa zea* (AsHz), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação.

↑↓	Data	Antígeno + adjuvante (ml)	Sangria (ml)	Antissoros (ml)	Antissoros obtidos	Reações serológicas Homólogas
↑↓	29/10/2014	3	10	5	Soro Normal	-
↓	30/10/2014		10	5	AsHz 1	-
↓	31/10/2014		10	5	AsHz 2	-
↓	01/11/2014		10	5	AsHz 3	-
↓	02/11/2014		10	5	AsHz 4	-
↓	03/11/2014		10	5	AsHz 5	-
↓	04/11/2014		10	5	AsHz 6	-
↓	05/11/2014		10	5	AsHz 7	+
↓	06/11/2014		10	5	AsHz 8	+
↓	07/11/2014		10	5	AsHz 9	+
↓	08/11/2014		10	5	AsHz 10	+
↓	09/11/2014		10	5	AsHz 11	+
↓	10/11/2014		5	3	AsHz 12	+
↓	11/11/2014		5	3	AsHz 13	+
↓	12/11/2014		10	5	AsHz 14	++
↓	13/11/2014		10	5	AsHz 15	++
↓	14/11/2014		10	5	AsHz 16	++
↓	15/11/2014		10	5	AsHz 17	+++
↓	16/11/2014		10	5	AsHz 18	+++
↓	17/11/2014		5	3	AsHz 19	++++
↓	18/11/2014		5	3	AsHz 20	++++
↓	19/11/2014		5	3	AsHz 21	++++
↓	20/11/2014		10	5	AsHz 22	++
↓	21/11/2014		10	5	AsHz 23	++
↓	22/11/2014		10	5	AsHz 24	+
↓	23/11/2014		10	5	AsHz 25	+
↓	24/11/2014		10	5	AsHz 26	+
↓	25/11/2014		10	5	AsHz 27	+
↓	26/11/2014		10	5	AsHz 28	+
↓	27/11/2014		10	5	AsHz 29	+
↓	28/11/2014		10	5	AsHz 30	+



Tabela 3. Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de fevereiro e março de 2015, para obtenção dos antissoros homólogos de *Spodoptera frugiperda* (AsSf), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação, \* = ausência de sangria.

↓↑	Data	Antígeno + adjuvante (ml)	Sangria (ml)	Antissoros (ml)	Antissoros obtidos	Reações serológicas Homólogas
↓	12/02/2015	3	0	5	Soro Normal	-
↓	13/02/2015		10	5	AsSf 1	-
↓	14/02/2015		10	5	AsSf 2	-
↓	15/02/2015		10	5	AsSf 3	-
↓	16/02/2015		10	5	AsSf 4	-
↓	17/02/2015		10	5	AsSf 5	-
↓	18/02/2015		10	5	AsSf 6	-
↓	19/02/2015		10	5	AsSf 7	+
↓	20/02/2015		10	5	AsSf 8	+
↓	21/02/2015		10	5	AsSf 9	+
↓	22/02/2015		10	5	AsSf 10	+
↓	23/02/2015		10	5	AsSf 11	+
↓	24/02/2015		10	5	AsSf 12	+
*	25/02/2015	*	*	*	*	*
↓	26/02/2015		10	5	AsSf 14	++
↓	27/02/2015		10	5	AsSf 15	++
↓	28/02/2015		10	5	AsSf 16	++
↓	01/03/2015		5	3	AsSf 17	++
↓	02/03/2015		5	3	AsSf 18	++
↓	03/03/2015		10	5	AsSf 19	++
↓	04/03/2015		10	5	AsSf 20	++
↓	05/03/2015		10	5	AsSf 21	++
↓	06/03/2015		10	5	AsSf 22	+
↓	07/03/2015		10	5	AsSf 23	+
↓	08/03/2015		10	5	AsSf 24	+
↓	09/03/2015		10	5	AsSf 25	+
↓	10/03/2015		10	5	AsSf 26	+
↓	11/03/2015		10	5	AsSf 27	+
↓	12/03/2015		10	5	AsSf 28	+
↓	13/03/2015		10	5	AsSf 29	+
↓	14/03/2015		10	5	AsSf 30	+

Tabela 4. Imunização e sangrias em coelhos feitas entre os meses de outubro e novembro de 2015, para obtenção dos antissoros homólogos de *Rhopalosiphum maidis* (AsRm), Siglas: ↑ = inoculação, ↓ = sangria, Antígeno = Ag + Adjuvante Freund completo (antígeno imunizante), + = formação de linhas de precipitação.

↑ ↓	Data	Antígeno + adjuvante (ml)	Sangria (ml)	Antissoros (ml)	Antissoros obtidos	Reações serológicas Homólogas
↑ ↓	22/10/2015	3	3	1,5	Soro Normal	-
↓	23/10/2015		3	1,5	AsRm 1	-
↓	24/10/2015		3	1,5	AsRm 2	-
↓	25/10/2015		3	1,5	AsRm 3	-
↓	26/10/2015		3	1,5	AsRm 4	-
↓	27/10/2015		3	1,5	AsRm 5	-
↓	28/10/2015		3	1,5	AsRm 6	-
↓	29/10/2015		3	1,5	AsRm 7	+
↓	30/10/2015		5	3	AsRm 8	+
↓	31/10/2015		5	3	AsRm 9	+
↓	01/11/2015		5	3	AsRm 10	+
↓	02/11/2015		5	3	AsRm 11	+
↓	03/11/2015		5	3	AsRm 12	+
↓	04/11/2015		5	3	AsRm 13	+
↓	05/11/2015		5	3	AsRm 14	+
↓	06/11/2015		5	3	AsRm 15	+
↓	07/11/2015		5	3	AsRm 16	+
↓	08/11/2015		5	3	AsRm 17	+
↓	09/11/2015		5	3	AsRm 18	+
↓	10/11/2015		5	3	AsRm 19	+
↓	11/11/2015		5	3	AsRm 20	+
↓	12/11/2015		5	3	AsRm 21	+
↓	13/11/2015		5	3	AsRm 22	+
↓	14/11/2015		5	3	AsRm 23	+
↓	15/11/2015		5	3	AsRm 24	+
↓	16/11/2015		5	3	AsRm 25	+
↓	17/11/2015		5	3	AsRm 26	+
↓	18/11/2015		5	3	AsRm 27	+
↓	19/11/2015		5	3	AsRm 28	+
↓	20/11/2015		5	3	AsRm 29	+
↓	21/11/2015		5	3	AsRm 30	+

A rapidez no tempo de respostas positivas, das reações serológicas demonstram a eficiência do processo de imunização através de inoculações via linfonódulo. Tempos de respostas semelhantes foram observados por OLIVEIRA (1975); HOFLING (1975) e SOUSA-SILVA (1980, 1985, 1988) em seus trabalhos. Mollet & Ambrust (1977) imunizaram coelhos, com injeções intramusculares e endovenosas do antígeno obtido para *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae), neste caso os resultados positivos só foram observados após 40 dias da primeira inoculação na cobaia. Cassaro-Silva et al. (2001) e Costa et al. (2009) observaram respostas positivas para reações serológicas após duas semanas utilizando inoculações via linfonódulo para obtenção de antissoros específicos para *Orphulella punctata* (De Geer, 1773) (Orthoptera: Acrididae) e *Ascia monuste orseis* (Latreille, 1819) (Lepidoptera: Pieridae) respectivamente.

Neste trabalho dos quatro antissoros produzidos, três deles (AsHa, AsHz e AsSf) apresentaram titulação máxima de 1/32, ou seja, o teste é capaz de detectar o inseto no intestino do predador diluído até 32 vezes, já o antissoro para o pulgão-do-milho (AsRm) apresentou titulação de 1/128 (Figura 13).

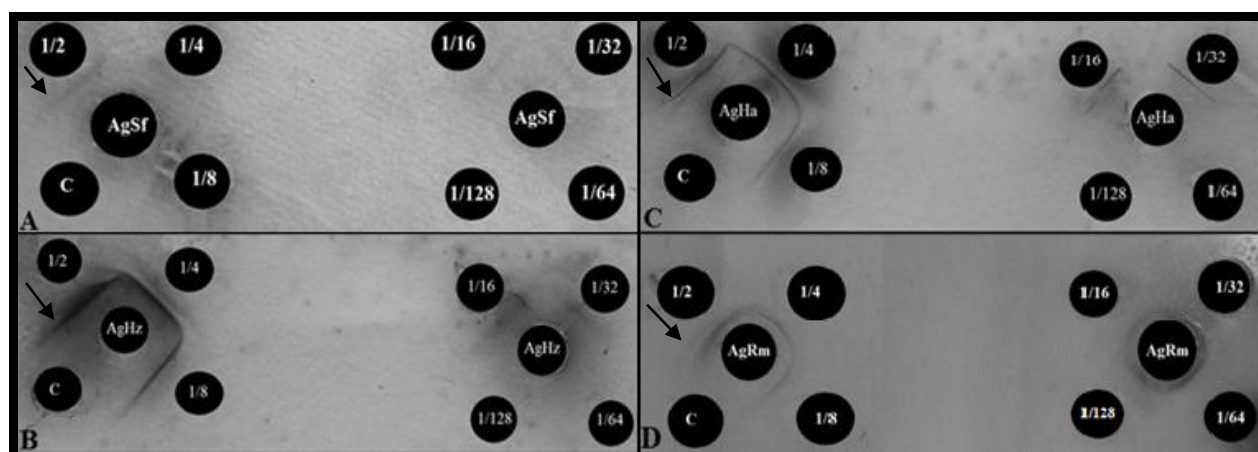


Figura 13. Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação observadas nos testes de titulação dos antissoros: (A) *Spodoptera frugiperda*; (B) *Helicoverpa zea*; (C) *Helicoverpa armigera* e de (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

Para Dempster (1960) o número de inoculações que são realizadas no coelho e o poder antigênico da proteína injetada pode ter ação direta no título do antissoro. Antissoros com altos títulos podem levar ao aparecimento de reações cruzadas. Sousa-Silva (1980) utilizou um antissoro com título máximo de 1/32 para determinar predadores de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Em 1988 o mesmo autor, procurando qualificar os predadores de *Deois flavopicta* (Stall, 1954) (Homoptera: Cercopidae) utilizou ovos do inseto, em diferentes fases de desenvolvimento, como antígeno para a produção de antissoros específicos. O autor observou que mesmo as reações com o antissoro de menor título, 1/4, foi possível a qualificação de predadores.

Santos-Neto et al. (2010) obtiveram um antissoro para ovos de *S. frugiperda* com título de 1/8, tendo sido suficiente para reconhecer predadores da lagarta. Titova (1970) obteve um antissoro contra *Eurigaster integriceps* Put (Heteroptera: Scutelleridae) com um título de 1/10.000 após várias inoculações de antígeno no coelho. Porém isto levou também à uma perda de especificidade do antissoro.

Os ensaios realizados no presente trabalho foram utilizados apenas os abdomens dos predadores adultos, procurando-se evitar maior diluição do material. Através dos testes serológicos foi possível observar reações positivas às 24, 48 e 96h após a alimentação dos predadores (Figura 14). Os exemplares de *D. luteipes*, *E. annulipes*, *C. externa* que foram alimentados com um exemplar de cada praga (*S. frugiperda*, *H. armigera*, *H. zea*) apresentaram de uma a duas linhas de precipitação, mostrando que foi possível identificações até o máximo de horas testados, 96h, após a ingestão de uma presa pelo predador. Nos testes com *O. V-nigrum* obteve-se reações positivas até 48hs após a ingestão da presa. Quando o predador foi alimentado com o pulgão-do-milho os testes serológicos foram positivos até 96h após a alimentação do predador (Figura 15).

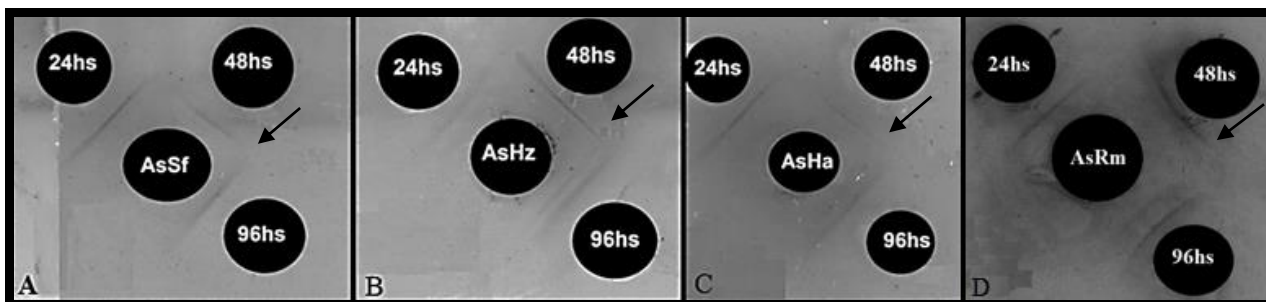


Figura 14. Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação 24, 48 e 96h após a alimentação de *Doru luteipes* e *Euborellia annulipes* e *Chrysoperla externa* com uma larva de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* (C) *Helicoverpa armigera* e uma ninfa de (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

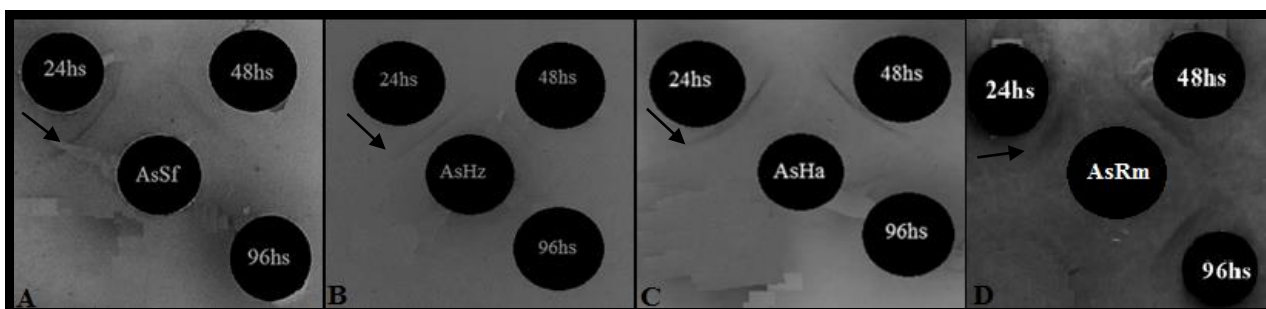


Figura 15. Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação 24, 48 e 96h após a alimentação de *Olla V-nigrum* com uma larva de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* (C) *Helicoverpa armigera* e (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

Com relação ao número de presas ingeridas, o teste tem sensibilidade para reagir positivamente apresentando uma linha de precipitação com a ingestão de uma lagarta (*S. frugiperda*, *H. zea* ou *H. armigera*). O número de linhas de precipitação não foi diferente para os predadores que se alimentaram de 1 a 4 lagartas, no entanto mostraram-se mais fortes e nítidas (Figura 16).

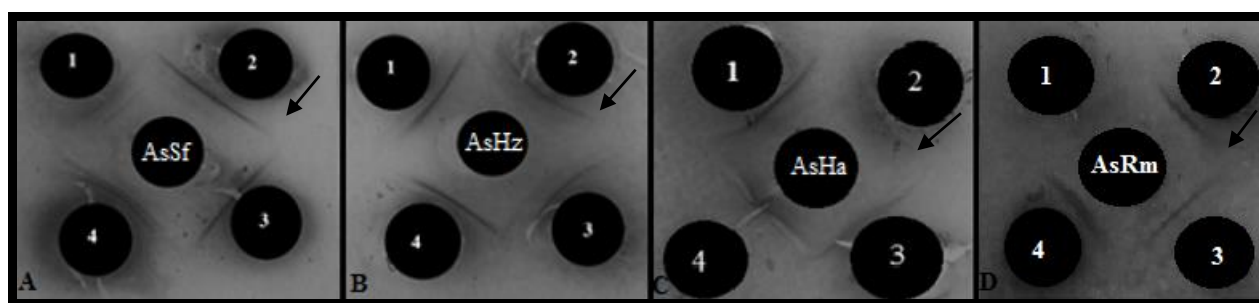


Figura 16. Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de após a alimentação de *Doru luteipes*, *Euborellia annulipes*, *Chrysoperla externa* e *Olla V-nigrum* com 1, 2, 3 e 4 lagartas de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* e (C) *Helicoverpa armigera* e (D) *Rhopalosiphum maidis*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

A detecção de uma presa no intestino de um predador depende de vários fatores como o tamanho da presa e do predador, tempo após a ingestão, a estratégia de alimentação (sucção contra mastigação), a abundância de presas, e a sensibilidade do teste (Luck et al., 1988). Em pesquisas com serologia diferenças na velocidade de processamento da presa pelos diversos predadores devem ser levadas em conta. O congelamento dos predadores pode influenciar nos resultados positivos das reações serológicas. Os testes devem ser realizados de preferência logo após a captura do predador. Quando isto não for possível, para evitar a continuidade do processo digestivo e, preservar as características proteicas da presa o material deve ser congelado o mais rápido possível (CASSARO-SILVA et al., 2001).

Corey et al. (1998) e Harwood et al. (2004, 2005) para diminuir o processo metabólico de insetos coletados no campo, os resfriaram rapidamente na tentativa de preservar o material e garantir o maior número de resultados positivos nas reações imunológicas em estudo de relações presa/predador. De acordo com Hagler & Naranjo (1997) há um declínio muito rápido no intervalo de detecção de presas a uma temperatura acima de 30°C, corroborando com esses resultados Sopp & Sunderland (1989) confirmaram que a alta temperatura prejudica a sensibilidade da análise do conteúdo estomacal de predadores.

Pelo método de dupla difusão em ágar, Titova (1970) obteve reações específicas até três dias após ter alimentado aranhas com uma única ninfa do 5º instar de *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). Sousa-Silva (1980) observou respostas positivas nos testes serológicos até 24 h após a alimentação de aranhas com uma única lagarta do 5º estágio de *D. saccharalis*. 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*.

Onyeka (1983), utilizando a serologia para determinar os principais predadores de *Culex pipiens L.* e *Culex torrentium Martini* (Diptera: Culicidae) observou reações positivas nos testes serológicos com o predador *Ischnura elegans* (van der Linden) (Odonata: Coenagrionidae) até 24 h após terem sido ingeridos. McIver (1981) obteve respostas positivas em aranhas 150 horas após a ingestão e este grande espaço de tempo pode ser explicado devido ao baixo metabolismo de muitos dos Chelicerata. Quinlan et al. (1993) encontraram traços das presas de escorpiões, até 32 dias após sua ingestão.

Diferindo dos anteriores, Cassaro-Silva et al. (2001) só conseguiram detectar traços da presa em aranhas nos testes realizados logo após o consumo. Leathwick e Winterbourn (1984) determinando os predadores de pulgões em cultura de alfafa na Nova Zelândia, observaram resultados positivos apenas até 6 horas após a ingestão dos pulgões.

Com os antissoros produzidos também foi possível detectar a predação de ovos das pragas estudadas neste trabalho (Figura 17). Os predadores *D. luteipes*, *E. annulipes*, *C. externa* e *O. v-nigrum* que foram alimentados separadamente com 50 ovos de *S. frugiperda*, *H. zea* e *H. armigera* tiveram resultados positivos nas reações homólogas. Isso comprovou a especificidade do antissoro na detecção de ovos das pragas estudadas quando ingeridas por predadores. Santos-Neto et al., (2010) produziram antissoros através de ovos macerados de *S. frugiperda* que

identificaram *Lagria villosa* (Coleoptera: Lagriidae) e uma espécie de percevejo *Lygaeidae* (Hemiptera) como possíveis predadoras de ovos de *S. frugiperda*.

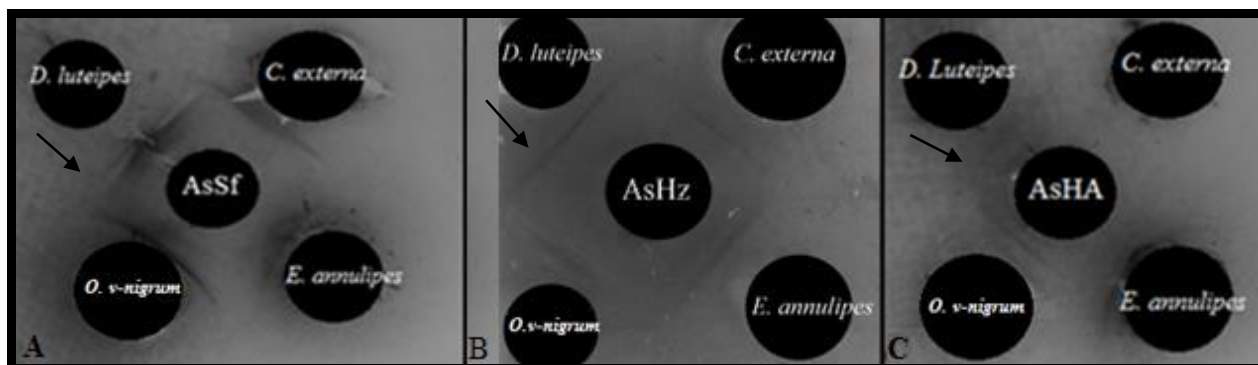


Figura 17. Reações de dupla difusão em ágar mostrando o número de linhas de precipitação após a alimentação dos predadores com ovos de (A) *Spodoptera frugiperda*, (B) *Helicoverpa zea* e (C) *Helicoverpa armigera*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

## 6.2. Testes serológicos heterólogos

Os testes serológicos com cada um dos antissoros AsSf (*S. frugiperda*), AsHa (*H. armigera*), AsHz (*H. zea*) e AsRm (*R. maidis*) em reações cruzadas com os antígenos AgSf, AgHa, AgHz e AgRm foram positivos, mostrando inespecificidade. O antissoro do pulgão-do-milho (*R. maidis*) teve reação positiva com os antígenos *S. frugiperda*, *H. armigera* e *H. zea*, mas os antissoros das lagartas não detectaram o antígeno do pulgão-do-milho. Diante dos resultados, procurou-se neutralizar as frações contaminantes, responsáveis pela inespecificidade dos antissoros adicionando-lhes alíquotas dos antígenos não homólogos em diferentes proporções (Tabela 5).



Tabela 5. Testes de absorção dos antissoros *S. frugiperda* (AsSf), *H. armigera* (AsHa), *H. zea* (AsHz) e *R. maidis* (AsRm) e reações com seu antígeno homólogo e heterólogo. Siglas= Reações positivas (+) e Reações negativas (-).

Antissoros	Antigenos				Antissoros	Antigenos			
	AgSf	AgHz	AgHa	AgRm		AgSf	AgHz	AgHa	AgRm
AsSf - 0,5 (AgHz)	+	+	+	-	AsHa - 0,5 (AgHz)	-	+	+	-
AsSf - 1,0 (AgHz)	+	+	+	-	AsHa - 1,0 (AgHz)	-	+	+	-
AsSf - 1,5 (AgHz)	+	-	+	-	AsHa - 1,5 (AgHz)	-	-	+	-
AsSf - 2,0 (AgHz)	-	-	-	-	AsHa - 2,0 (AgHz)	-	-	-	-
AsSf - 0,5 (AgHa)	+	+	+	-	AsHa - 0,5 (AgSf)	+	+	+	-
AsSf - 1,0 (AgHa)	+	+	+	-	AsHa - 1,0 (AgSf)	+	+	+	-
<b>AsSf - 1,5 (AgHa)</b>	+	-	-	-	AsHa - 1,5 (AgSf)	-	+	+	-
AsSf - 2,0 (AgHa)	-	-	-	-	<b>AsHa - 2,0 (AgSf)</b>	-	-	+	-
Antissoros	Antigenos				Antissoros	Antigenos			
	AgSf	AgHz	AgHa	AgRm		AgSf	AgHz	AgHa	AgRm
AsHz - 0,5 (AgHa)	-	+	+	-	AsRm - 0,5 (AgSf)	+	-	-	+
AsHz - 1,0 (AgHa)	+	+	-	-	AsRm - 0,5 (AgHa)	-	+	+	+
AsHz - 1,5 (AgHa)	+	-	+	-	AsRm - 0,5(AgHz)	-	+	+	+
AsHz - 2,0 (AgHa)	-	-	-	-					
AsHz - 0,5 (AgSf)	+	+	+	-					
AsHz - 1,0 (AgSf)	+	-	+	-	<b>AsRm - 0,5 (AgSf+AgHa)</b>	-	-	-	+
AsHz - 1,5 (AgSf)	+	-	+	-	AsRm - 0,5 (AgSf+AgHz)	-	+	-	+
<b>AsHz- 2,0 (AgSf)</b>	-	+	-	-	AsRm- 0,5 (AgHa+AgHz)	+	-	-	+

As mudanças na especificidade dos antissoros foram observadas após as seguintes combinações:

- uma parte do antissoro Sf com 1,5 parte do antígeno Ha (AsSf-1,5AgHa) resultou em um antissoro específico para o AgSf.

- uma parte do antissoro Ha mais 2 partes do antígeno Sf (AsHa-2,0AgSf) resultou em um antissoro específico para o AgHa;

- uma parte do antissoro Hz mais 2 partes do antígeno Sf (AsHz-2,0AgSf) resultou em um antissoro específico para o antígeno Hz;

- uma parte do antissoro Rm mais 0,5 parte dos antígenos Sf e Ha (AsRm-0,5AgHa+Sf) resultou em um antissoro específico para o AgRm.

Para obter a especificidade desejada os antissoros foram deixados reagir por 24hs em geladeira, aproximadamente 10 °C, e só depois foram transferidos para o freezer (-2° C). Os resultados das reações estão representados na figura 18.

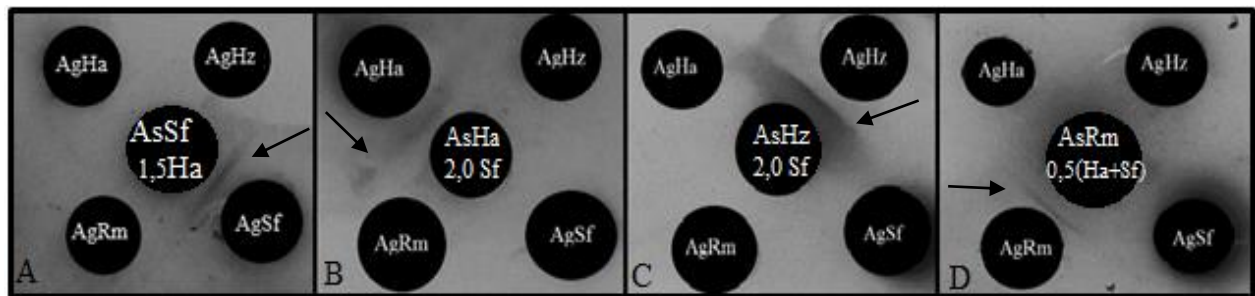


Figura 18. Reações de dupla difusão em ágar mostrando de linhas de precipitação após as reações heterólogas com os antissoros específicos. (A) Reação positiva do antissoro de *Spodoptera frugiperda* com seu antígeno, (B) Reação positiva do antissoro de *Helicoverpa armigera* com seu antígeno, (C) Reação positiva do antissoro de *Helicoverpa zea* com seu antígeno, (D) Reação positiva do antissoro de *Rhopalosiphum maidis* com seu antígeno. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

As inespecificidades iniciais dos antissoros podem ser atribuídas às semelhanças das proteínas utilizadas. As três lagartas estudadas pertencem a mesma família, Noctuidae; duas ao mesmo gênero (*H. armigera* e *H. zea*). A inespecificidade do afídeo também pode ser explicada pela semelhança das proteínas, sendo que as proteínas que originaram o AsRm são também proteínas presentes nas lagartas. Mas, também é verdade que cada espécie tem uma proteína característica, como se fosse a sua identidade. Acontece que essa proteína característica pode não ser tão antigênica e o sistema imunológico do coelho não ter respondido a sua presença, pelo menos com a quantidade de inoculações que foram feitas. Acontece que como mostrado por diversos autores se aumentaram as inoculações, diminuí-se ainda mais a especificidade do antissoro.

Após fazer as absorções dos antissoros com alíquotas dos antígenos heterólogos foi possível observar no mínimo uma linha de precipitação com os antissoros AsSf-1,5(AgHa); AsHa-2,0(AgSf); AsHz-2,0(AgSf) e AsRm-0,5(AgHa+Sf). Para validar esses resultados antes das coletas em campo, foi feito em laboratório um teste de alimentação com os predadores. Onde 40 adultos de *D. luteipes* em jejum por 24hs foram confinados em gaiola de acrílico com alimentação *ad libitum* de ovos de *S. frugiperda*, *H. armigera*, *H. zea* e ninfas de *R. maidis* por 24hs. O teste foi conduzido separadamente para *E. annulipes*, *O. v-nigrum* e *C. externa*. Após esse período de alimentação os predadores foram macerados em solução salina e colocados para reagir com cada antissoro produzido. As porcentagens de reações positivas através dos testes serológicos mostraram a taxa de predação de *D. luteipes*, *H. axyridis*, *C. externa* e *E. annulipes* (Tabela 6).

Tabela 6: Porcentagem de reações positivas através de testes serológicos (%) ( $\pm$ EP) dos predadores confinados em gaiolas alimentados com *R. maidis*, *S. frugiperda*, *H. zea* e *H. armigera* por 24hs.

Predadores	Reações Positivas (%) <sup>1</sup>			
	<i>S. frugiperda</i>	<i>H. zea</i>	<i>H. armigera</i>	<i>R. maidis</i>
<i>Doru luteipes</i>	8,3 $\pm$ 0,05 Bb	4,2 $\pm$ 0,04 Ab	8,3 $\pm$ 0,05 Ab	75 $\pm$ 0,09 Ba
<i>Olla v-nigrum</i>	0,0 $\pm$ 0,0 Bb	0,0 $\pm$ 0,0 Ab	0,0 $\pm$ 0,0 Ab	100 $\pm$ 0,0 Aa
<i>Chrysoperla externa</i>	4,17 $\pm$ 0,04 Bc	20,8 $\pm$ 0,08 Ab	8,3 $\pm$ 0,05 Ac	66,67 $\pm$ 0,09 Ba
<i>Euborellia annulipes</i>	37,5 $\pm$ 0,10 Aa	16,7 $\pm$ 0,07 Ab	12,5 $\pm$ 0,06 Ab	29,2 $\pm$ 0,09 Ca
<b>CV (%)</b>	<b>12,51</b>			

1Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas ou minúsculas nas linhas, para cada predador, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (SCOTT e KNOTT, 1974) a 5% de significância.

*Doru luteipes* apresentou 75% de reações positivas para *R. maidis*, 8,3% para *H. zea* e *armigera* e 4,2% para *S. frugiperda*. *O. v-nigrum* se alimentou somente do pulgão *R. maidis* com 100% de reações positivas para a praga. *C. externa* teve 66,67% de reações positivas para o *R. maidis*, 20,8% para *H. zea*, 4,3% para a *armigera* e 4,17% para *S. frugiperda*. Já a *E. annulipes* apresentou predação de 37,5% para *S. frugiperda*, 29,2% para *R. maidis*, 16,7 e 12,5% para *H. zea* e *armigera*, respectivamente. De acordo com esses resultados as tesourinhas e o crisopídeo apesar de se alimentaram de todas as pragas ofertadas, tiveram preferência alimentar pelo pulgão *R. maidis* (Figura 19).

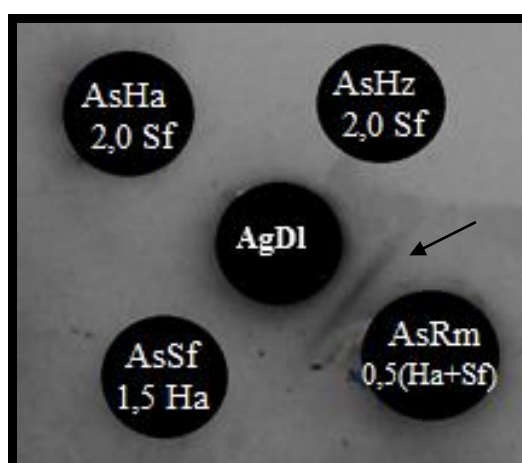


Figura 19. Reações de dupla difusão em ágar mostrando de linhas de precipitação após as reações do antígeno de *Doru luteipes* (AgDI) com os antissoros específicos. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

Para os testes em campo, em milho orgânico de cultivar BRS1030 foram coletados 1050 insetos manualmente. Desses insetos coletados foram triados 741 predadores, que foram congelados para preservar ao máximo o seu conteúdo estomacal. Os predadores foram macerados com solução salina (0,85%) e colocados para reagir com os antissoros específicos pelo método de dupla difusão em ágar (Figura 20).

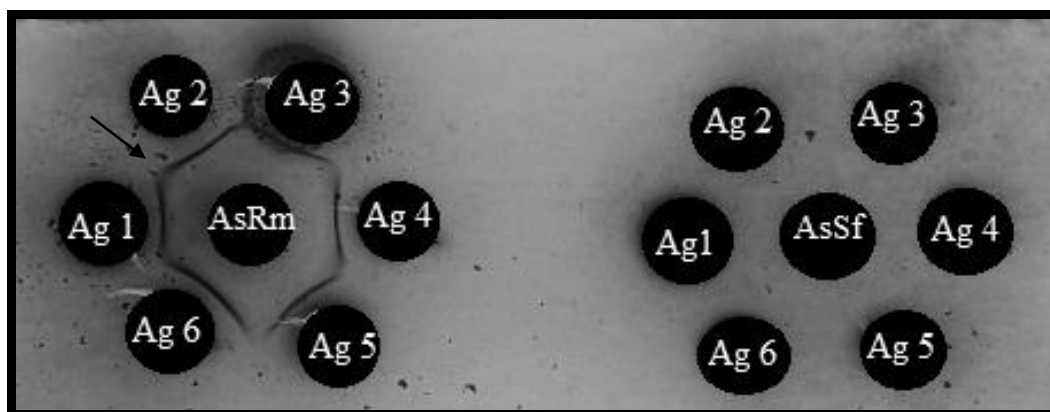


Figura 20. Reações de dupla difusão em ágar mostrando linhas de precipitação após as reações de 6 antígenos (predadores coletados no campo) com os antissoros específicos de *Rhopalosiphum maidis* e *Spodoptera frugiperda*. As setas nas figuras indicam as linhas de precipitação formadas pelas reações positivas.

Os resultados (tabela 7), mostram que dos 741 predadores analisados 477, ou seja 64,37%, apresentaram resultados positivos com um dos 4 antissoros testados.

Tabela 7: Resultado dos testes serológicos (%) ( $\pm$ EP) de predadores coletados em cultura de milho orgânico da cultivar BRS1030.

Predadores	Número de predadores testados	Número de reações positivas	Porcentagem (%) de reações positivas			
			<i>R. maidis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>H. zea</i>	<i>H. armigera</i>
<i>Doru luteipes</i>	538	312	26,07 $\pm$ 0,01	32,03 $\pm$ 0,02	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Euborellia annulipes</i>	2	2	100 $\pm$ 0,00	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Harmonia axyridis</i>	141	118	79,43 $\pm$ 0,03	4,37 $\pm$ 0,01	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Eriopis connexa</i>	29	28	82,75 $\pm$ 0,07	13,79 $\pm$ 0,06	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Olla v-nigrum</i>	9	5	11,11 $\pm$ 0,13	44,4 $\pm$ 0,21	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Cycloneda sanguinea</i>	4	1	25,0 $\pm$ 0,20	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Chrysoperla externa</i>	4	4	100 $\pm$ 0,00	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Carabidae</i>	6	2	33,33 $\pm$ 0,20	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Zellus sp</i>	8	5	83,33 $\pm$ 0,18	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Total</b>	741	477	-	-	-	-

Dos predadores coletados a “tesourinha” *D. luteipes* com 538 indivíduos, apresentou 312 reações positivas (58%), onde 26,7% foi com *R. maidis* e 32,03% com *S. frugiperda*. Quanto a *E.*

*annulipes* só foram coletados no campo 2 indivíduos, mas com 100% de reações positivas para *R. maidis*. *D. luteipes* é um dos inimigos naturais mais importantes na supressão de pragas na cultura do milho, pois as ninfas podem consumir diariamente cerca de 10 ovos e/ou lagartas de *S. frugiperda*, e os adultos podem consumir diariamente 20 lagartas de primeiro e segundo ínstar.

Além de *S. frugiperda*, *D. luteipes* pode também preda ovos e lagartas de *H. zea*, assim como ninfas e adultos de pulgões (ALVARENGA et al., 1995ab e 1996; CRUZ, 2007). Silva et al. (2009a) mencionaram que *E. annulipes*, nos cinco instares de sua fase ninfal, demonstrou ser um predador potencial de ovos e lagartas de *S. frugiperda*. Sendo que quanto mais desenvolvidas as tesourinhas, maior a capacidade de predação sobre a praga, chegando um adulto a consumir até 1.481,2; ovos e 89,20 e 48,6 lagartas de 1º e 2º instares de *S. frugiperda*, respectivamente. Foi observado que tesourinhas de 4º e 5º instares predaram os ovos e as lagartas em maior quantidade. Bastos e Torres (2005) e Saran et al. (2007) consideram os dermápteros importantes controladores de afídeos e mosca branca, sendo que o período de busca pela presa em geral é realizada no período noturno.

As espécies de joaninhas encontradas foram *H. axyridis*, *E. connexa*, *O. v-nigrum* e *C. sanguinea*. Das 4 espécies, apenas a *O. v-nigrum* apresentou maior taxa de resultados positivos para *S. frugiperda* 44,4%. *E. connexa* e *H. axyridis* com 82,75 e 79,43 %, respectivamente, reagiram positivamente em maior porcentagem para *R. maidis*. Diferente das demais joaninhas *C. sanguinea* reagiu somente com *R. maidis*. Vários fatores, como a disponibilidade da presa no ambiente, o tamanho da presa e do predador e a palatabilidade, podem influenciar na escolha da presa a ser consumida, mas para Giori et al. (2009) algumas espécies de joaninhas exibem preferências alimentares claramente definidas e, a seleção do recurso alimentar pode estar relacionada com a disponibilidade de presas no ambiente, como já observado por outros autores.

Para Hodek (1967) as presas podem ser classificadas como alternativas e essenciais, onde os coccinelídeos aceitam um alimento alternativo na ausência do alimento essencial. Essa escolha servirá apenas como fonte de energia, no entanto não permitirá seu pleno

desenvolvimento que será alcançado a partir do consumo de presas essenciais que garantam o desenvolvimento larval e a oviposição do predador.

*C. externa*, *Zelus* sp e *Carabideos* também reagiram positivamente apenas com o antissoro *R. maidis*, com porcentagens de 100; 83,3 e 50%, respectivamente. Dos predadores coletados, não houve reação com os antissoros com as espécies *H. armigera* e *H. zea*. Pode ser devido ao fato da ausência dessas duas pragas na cultura do milho na época em que as coletas foram feitas, uma vez que em laboratório houve reação positiva dos predadores com essas duas pragas confirmando a especificidade do antissoro produzido.

Silva et al. (2009) estudaram a capacidade predatória e a resposta funcional de larvas de *C. externa* alimentadas com ninfas de segundo e terceiro instares do pulgão *R. maidis*, em cinco densidades. O consumo aumentou proporcionalmente em função do estágio de desenvolvimento da larva, sendo maior no terceiro instar, com 279,1 pulgões, representando aproximadamente 82,0% do consumo total. Bastos e Torres (2005) apresentaram dados que confirmam que os crisopídeos predam preferencialmente afídeos e que durante toda a sua fase larval podem consumir de 100 a 600 afídeos mesmo sendo capazes de predação vários insetos.

Neste trabalho tanto nos testes com *C. externa*, em gaiola quanto nas coletadas em campo, apresentaram maior porcentagem de resultados positivos nas reações serológica com o antissoro para o pulgão-do-milho (AsRm) confirmando a preferência desse predador por esses afídeos em detrimento das lagartas disponíveis. Os trabalhos em campo sobre a preferência alimentar dos predadores são de extrema importância para maior entendimento da alimentação do predador em seu ambiente natural, assim como de outros fatores relacionados, tais como a flutuação populacional das espécies de pragas e da diversidade de predadores, fornecem subsídios importantes para a escolha de espécies que possam ser utilizadas em programas de controle biológico.

Vale salientar que os estudos envolvendo a serologia são utilizados para qualificar a relação predador-presa, pois estimar a quantidade de presas consumidas por um predador,

por exemplo, não é possível sem levar em conta a temperatura, a taxa de digestão da presa e a influência do tempo decorrido após a alimentação do predador (MCIVER, 1981). Provavelmente esse conjunto de fatores pode ter influenciado os resultados das reações serológicas com o material coletado em campo neste trabalho. Essas influências podem contribuir para resultados falso negativos, pois devido ao decréscimo do antígeno no intestino do predador este pode não ser detectado pelo antissoro (SANTOS et al.,2009). Assim resultados negativos podem não significar que o predador testado não consumiu a presa, mas sim pode ser o resultado da influência de qualquer um dos fatores citados.

Embora a quantificação seja influenciada por vários fatores, foi observado neste trabalho que existe a preferência alimentar por *R. maidis* e *S. frugiperda* dos predadores tanto nos resultados em laboratório quanto em campo, confirmando a importância desses estudos para a escolha de predadores eficazes em programas de controle biológico.

## 7. CONCLUSÃO

- Após uma única injeção do antígeno na região do linfonódulo do coelho, é possível obter-se antissoro específico para as pragas do milho *S. frugiperda*, *H. armigera*, *H. zea* e *R. maidis*.
- As reações serológicas positivas são detectadas até 96 horas após consumo da presa pelo predador.
- Com relação ao número de presas ingeridas, o teste tem sensibilidade para reagir positivamente a ingestão de uma lagarta de primeiro instar (*S. frugiperda*, *H. zea* ou *H. armigera*) e um afídeo.
- A quantidade de insetos predados não influencia o número de linhas de precipitação resultantes das reações serológicas entre antissoros e antígenos.
- Os testes serológicos em campo mostram a preferência alimentar de *D. luteipes* e *O. v-nigrum* por *S. frugiperda*, e de *E. annulipes* e *C. externa* pelo pulgão *R. maidis*
- A Serologia é uma ferramenta simples, de baixo custo e altamente eficiente no estudo para a qualificação de predadores.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. A.; PENNY, N. D. Neuroptera of the Amazon Basin. Part IIa. Introduction and Chrysopini. **Acta Amazônica Manaus**, v. 15, p. 413-479, 1985.

AGROFIT: **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Online. Acesso em: 10 jul. 2010.

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

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v.4, n. 1, p. 99-106, 2009.

ALVARENGA, C. D.; VENDRAMIM, J. D.; CRUZ, I. Biologia e predação de *Doru luteipes* (Scud.) sobre *Schizaphis graminum* (Rond.) criado em diferentes genótipos de sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 3, p. 523-531, 1995a.

ALVARENGA, C. D.; VENDRAMIM, J. D.; CRUZ, I. Controle integrado de *Schizaphis graminum* (Rondani) em sorgo através de genótipos resistentes e do predador *Doru luteipes* (Scudder). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v.24, n.3, p.507-516, 1995b.

ALVARENGA, C. D.; VENDRAMIM, J. D.; CRUZ, I. Efeito do predador *Doru luteipes* (Scudder) sobre o crescimento populacional de *Schizaphis graminum* (Rondani) em diferentes genótipos de sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p.137-140, 1996.

AMMAR, E. D.; FARRAG, S. M. Studies of the behavior and biology of the earwig *Labidura riparia* Pallas (Dermatero, Labiduridae). **Journal of Applied Entomology**, v.75, p.189-196, 1974.

ÁVILA, J. C.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. **Circular técnica** 23. 2013. Disponível

em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/90758/1/CT201323-cpao.pdf>>. Acesso em: 19 de julho 2015.

BASTOS, C. S.; TORRES, J. B. Controle biológico e manejo de pragas do algodoeiro. Embrapa. Campina Grande, PB. **Circular técnica 72**. 63p., 2005.

BERCKS, R.; KOENIG, R.; QUERFURTH, G., 1972. Plant Virus Serology. **In Principles and Techniques in Plant Virology**. Edited by Kado/Agrawal, p. 467-490, 1972.

BERTI FILHO, E. Multiplicação de insetos predadores em laboratório. **In Congresso Brasileiro de Entomologia Campinas, 6**. Anais...Campinas, Fundação Cargill, p.141-155. 1980.

BHARADWAJ, R. M. Observation on the bionomies of *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Labiduridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.59, n.3, p.441-450, 1966.

BOIÇA JUNIOR, A. L.; SANTOS, T. M. DOS.; KURANISHI, A. K. Desenvolvimento larval e capacidade predatória de *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) e *Hippodamia convergens* (Guérin-Meneville, 1842) alimentadas com *Aphis gossypii* Glover, 1877 sobre cultivares de algodoeiro. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, p. 239-244, 2004.

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

BOREGAS, K. G. B.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em casa-de-vegetação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.7-16, 2003.

BROOKS; S. J.; BARNARD, P. C. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). **Bulletin British Museum Natural History (Entomology)**, Londres, v. 59, n. 2, p. 117–286, 1990.

BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**, (Ed.) Lavras: UFLA, 207p., 2000.

CALVER, M. C. A review of ecological applications of immunological techniques for diet analysis. **Austral Ecology**, v. 9, n.1, p.19-25, 1984.

CARVALHO, R. L. P. Pragas do milho. In Paterniani, E. (ed.), **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba, Fundação Cargill, p. 505-570,1980.

CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Métodos de criação e produção de crisopídeos, p. 91–109 In: Bueno V. H. P. (ed.). **Controle Biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras, Ufla, 429 p., 2000.

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

CLARK, M.; ADAMS, A. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 457-483, 1977.

CONAB – (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2013/ Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília–DF. 2013. Disponível em:< [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_09\\_10\\_16\\_05\\_53\\_boletim\\_portugues\\_setembro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_10_16_05_53_boletim_portugues_setembro_2013.pdf)>. Acesso em: 14 de Junho 2015.

CONAB– (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Décimo levantamento - Julho/2015. Disponível em: [http:// www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br). Acesso em: 16 julho, 2015.

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

COSTA, F., LOFFREDO, A. P., ONODY, H. C.; SOUSA-SILVA, C. R. Utilização da serologia na identificação de *Ascia monuste orseis* (Latreille,1819) (Lepidoptera: Pieridae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.31, n. 2, p: 149-151, 2009.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: CNPMS: EMBRAPA, 45 p. 1995. (Circular Técnica 21).

CRUZ, I. Resistência de Spodoptera a inseticidas. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 37, p.12-14, 2002.

CRUZ, I. Controle biológico de pragas na cultura de milho para produção de conservas (Minimilho), por meio de parasitóides e predadores. Sete Lagoas: CNPMS- Embrapa Milho e Sorgo. **Circular Técnica 91**, v.91, 16p., 2007.

CRUZ, I. (ed.). **Manual de Identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 192p. 2008.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: SIMPÓSIO GRANDES CULTURAS: MILHO, 2, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá. Capítulo 12, 2009.

CRUZ, I.; SANTOS, J. P. Diferentes bicos do tipo leque no controle da lagarta-do-cartucho em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.1-7. 1984.

CRUZ, I.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. Manejo de pragas na cultura do milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 164, p. 21-26,1990.

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, **Circular Técnica 31**, 39p., 1999.

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Pragmas da fase vegetativa e reprodutiva. **Comunicado Técnico - Embrapa Milho e Sorgo**, 49. 8p. Disponível em:<<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/prvegetativa.htm>> Acesso em 25 jul. 2015.

CRUZ, I.; PEREIRA FILHO, I. A.; PIMENTEL, M. A. G.; COELHO, A. M.; KARAM, D.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MOREIRA, J. A. A.; OLIVEIRA, M. F. DE; GONTIJO NETO, M. M.; ALBUQUERQUE, P. E. P. de; VIANA, P. A.; MENDES, S. M.; COSTA, R. V. DA; ALVARENGA, R. C.; MATRANGOLO, W. J. R. **Produção de milho na agricultura familiar. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo**, 45 p., 2011.

CRUZ, I; MENDES, S. M; VIANA, P. A. Importância econômica e manejo de insetos sugadores associados à parte aérea de plantas de milho Bt. **Circular Técnica 175**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 14p. 2012.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behavior and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 89, n. 3, p. 201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M., GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.110-113,2013.

DE CLERCQ, P.; PETTERS, I.; VERGAUWE, G. THAS, O. Interaction between *Podisus maculiventris* and *Harmonia axyridis*, two predators used in augmentative biological control in greenhouse crops. **Biocontrol**, v.48, n.1, p.39-55, 2003.

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

ENTWISTLE, P. F.; EVANS, H. F. Viral control. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, p. 347-412, 1985.

EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Data sheets on quarantine organisms n. 110: *Helicoverpa armigera*. Paris: EPPO, 1981. **Bulletin 11**, 1981.

EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. *Helicoverpa zea*. In: SMITH, I. M. et al. (Eds.). Quarantine pests for Europe. 2. ed. Wallingford: CAB International, p.1-6,1996.

FARIAS, P. R. S., BARBOSA, J. C., BUSOLI, A. C. Distribuição espacial da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na cultura do milho. **Neotropical Entomology**, v. 30, n.4, p. 681-689, 2001.

FATHIPOUR, Y.; SEDARATIAN, A. Integrated Management of *Helicoverpa armigera* in Soybean Cropping Systems. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. cap 9. 2013. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.5772/54522> > Acesso: 10 de outubro de 2014.

FERREIRA, D. F. SISVAR: programa estatístico: versão 5.0. Lavras: UFLA, 2007. Software.

FIGUEIRA, G. K.; CARVALHO; C. F.; SOUZA, B. Biologia e exigências térmicas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com ovos de *Alabama argillacea* (Hubner,1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p.319-326, 2000.

FIGUEIREDO, M. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. *Exasticolus fuscicornis* em lagartas de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1321-1323, 2006a.

FIGUEIREDO, M. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1693-1698, 2006b.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 34, p. 17-52, 1989.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 134 p., 1996.

GIBBS, A.; HARRISON, B. **Plant Virology**. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London, 292 p., 1976.

GIOLO, F. P.; BUSATO, G. R.; GARCIA, M. S.; MANZONI, C. G.; BERNADI, O.; ART, M. Biologia de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p.167-171, 2006.

GIORGI, J. A.; VANDENBERG, N. J.; MCHUNG, J. V.; FORRESTER, J. A.; SLIPINSKI, A.; MILLER, K. B.; SHAPIRO, L. R.; WHITING, M. F. The evolution of food preferences in coccinellidae. **Biological Control**, v.51, p.215-231, 2009.

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

GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. DA S.; CUNHA, U. S. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea, p.87-102. In J.M.B Parfitt, (ed.), **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, (Documentos,74), 146p.,2000.

GUEDES, C. F. C.; ALMEIDA, L. M. The potential of different fruit species as food for *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.1025 -1031, 2013.

GUERREIRO, J. C. A Importância das Joaninhas no Controle Biológico de Pragas no Brasil e Mundo. **Revista científica eletrônica de agronomia**, v.3, n. 5, 2004. Disponível em [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/6xRKHS59mQ0AipM\\_2013-4-26-14-30-29.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/6xRKHS59mQ0AipM_2013-4-26-14-30-29.pdf)> Acesso: 10 de outubro de 2015.

GUERREIRO, J. C.; VERONEZZI, F. R.; ANDRADE, L. L.; BUSOLI, A. C.; BARBOSA, J. C.; BERTI FILHO, E. Distribuição espacial do predador *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: forficulidae) na cultura do milho. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n.7, 11p., 2005.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; GOMES, J. P. C. Dermaptera (Insecta) associados a aviários industriais no estado de São Paulo e sua importância como agentes de controle biológico de pragas avícolas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.36, n.3, p.527-534, 1992.

HAGLER, J. R. Variation in the efficacy of several predator gut content immunoassays. **Biological Control**, v.12, p.25-32, 1998.

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

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

HAMM, J. J.; WISEMAN, B. R. Plant resistance and nuclear polyhedrosis virus for suppression of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 69, n. 3, p. 541-549, 1986.

HANCE, T.; GRÉGOIRE-WIBO. Étude Du regime alimentaire dès Carabidae par voie sérologique. *In: Lebrun P., André H., De Medts A., Grégoire-Wibo G. (eds): **New Trends In Soil Biology***. Imprimeirie Dieu Bricart, Ottignies-Louvain, Belgium, p.620-622, 1983.

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

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



HOBALLAH, M. E.; DEGEN, T.; BERGVINSON, D.; SAVIDAN, A. & TAMO, C. Occurrence and direct contrail potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical Lowlands of Mexico. **The Agricultural and Forest Entomology**, v.6, p.83-88, 2004.

HODEK, I. Bionomics and ecology of predaceous Coccinellidae. **Annual Review of Entomology**, n. 12, p. 79-104, 1967.

HODEK, I.; HONEK, A. **Ecology of Coccinellidae**. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. 464p.1996.

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

IPERTI, G. Biodiversity of predaceous Coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 323-342, 1999.

KARIM, S. Management of *Helicoverpa armigera*: a review and prospectus for Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Murree, v. 3, n. 8, p. 1213-1222, 2000.

KNABKE, J. J.; GRIGARICK, A. A. Biology of the African earwig, *Euborellia cincticollis* (Gerstaecker) in California and comparative notes on *Euborellia annulipes* (Lucas). **Hilgardia**, v.41, p.157-194, 1971.

KOCH, R. L. The Multicolored Asian Lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control and non-target impacts. **Journal of Insect Science**, v. 32, p.1-16, 2003.

LEATHWICK, D. M.; WINTERBOURN, M. J. Arthropod predation on aphids in Lucerne crop. **New Zealand Entomologist**, v.8, p.75-80, 1984.

LEONE, C. A. A serological study of some Orthoptera. **Annals of the Entomological Society of America**, n.40, p.417-433, 1947.

LIMA, A. DA C. Insetos do Brasil. Rio de Janeiro: **Escola Nacional de Agronomia, Neuropteros**, v.3, p. 73-108, 1942.

LIRA, R. S.; BATISTA, J. L. Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* alimentados com pulgões de erva-doce. **Revista de Biologia e Ciências da terra**. Campina Grande UEPB, v.6, n.2, p.234-236, 2006.

LUCK, R. F.; SHEPARD, B. M.; KENMORE, P. E.; Experimental methods for evaluating arthropod natural enemies. **Annual Reviews Entomology**. v.33, p.67-391, 1988.

MARUCCI, P.E. Notes on the predatory habits and life cycle of two Hawaiian earwigs. **Proceedings of Hawaiian Entomological Society**, v.15, p. 565-569,1995.

MATRANGOLO, W. J. R.; CRUZ, I.; DELLA LUCIA, T. M. C. Densidade populacional de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) nas fases de ovo, larva e adulto em milho. **Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 21-28, 1998.

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

MATTHEWS, R. **Plant Virology**, 3<sup>o</sup> Ed. Academic Press, NY, 835 p., 1991.

MENSAH, R. K. Supresssion of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. **Australian Journal of Entomology**, Canberra, v. 35, n. 4, p. 323-329, 1996.

MERNAUGH, R., MERNAUGH, G.; KOVACS, G. The immune response: antigens, antibodies, antigen-antibodies interactions, p. 3-14. In: **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual**. Ed. R. HAMPTON, E. BALL, S. DE BOER. APS Press, St. Paul, Minnessota, USA, 1990.

MOLLET, J. A.; ARMBRUST, E. J. Age specific serological identification of adult stages of alfafa weevil, *Hypera postica*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.71, n. 2, p: 207-211, 1977.

MURRAY, R. A.; SOLOMON, M. G. A rapid technique for analyzing diets of invertebrate predators by electrophoresis. **Annals of Applied Biology**, v. 90, p. 7–10, 1978.

OHIAGU, C. E.; BOREHAM, P. F. L. A simple field-test for evaluating insect prey-predator relationships. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 23, p.40-70, 1978.

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

OLIVEIRA, E. DE; FERNANDES, F. T.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, C. M. de; CRUZ, I. Enfezamento, viroses e insetos vetores em milho – Identificação e controle. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, **Circular Técnica 26.**, 10 p., 2003.

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

OSAWA, N. Population field studies of the aphidophagous ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): life tables and key factor analysis. **Researches on Population Ecology**, v. 35, p. 335-348, 1993.

OSAWA, N. Population field studies on the aphidophagous ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): resource tracking and population characteristics. **Population Ecology**, v.42, p.115-127, 2000.

OUCHTERLONY, O. In vitro method for testing toxin-producing capacity of difteria bacteria. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 25, p.186-191, 1948.

PEDGLEY, D. E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, Wallingford, v. 36, n. 1, p. 15-20, 1985.

PEDROSO, E. C.; OTUKA, A. K.; VEIGA, A. C. P; MAGALHÃES, G. O; DE BORTOLI, S. A. Consumo e desenvolvimento de *Doru luteipes* (Scudder) alimentado com ovos de *Plutella xylostella* (L.). 2010. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p.672-675.

PEREIRA, C. J. Respuesta agregativa de adultos de *Coleomegilla maculata* a la densidad y distribución de los huevos del cogollero del maíz. **Bioagro**, v.9, p. 35-42, 1997.

PERVEZ, A.; OMKAR. Ecology and biological control application of multicoloured Asian ladybird, *Harmonia axyridis*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v.16, n.2, p.111-128, 2006.

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

PICANÇO, M. C.; MOURA, M. F.; MOTTA MIRANDA, M. M.; GONTIJO, L. M.; FERNANDES, F. L. Seletividade de inseticidas a *D. luteipes* (Scudder, 1876) (Dermoptera: Forficulidae) e *Cotesia* sp. (Hymenoptera: Braconidae) inimigos naturais de *Ascia monuste orseis* (Godart, 1818) (Lepidoptera: Pieridae). **Ciência Rural**, v.33, p.183-188, 2003.

PINTO, D. M.; STORCH, G.; COSTA, M. Biología de *Euborellia annulipes* (Dermoptera: Forficulidae) em laboratório. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 4, n. 8, p. 01-07, 2005.

PITRE, H. N.; MISTREIC, W. J.; LINCOLN, C. G. Economic thresholds: Concepts and techniques. In: STERLING, W. L. Economic threshold and sampling of Heliothis species on cotton, corn, soybeans and other host plants. Texas: Texas A & M University, **Department of Agricultural Communications**, 159 p., 1979.

POGUE, M. G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

PUTMAN, W. L.; HERNE, D. C. The role of predators and other biotic factors in regulation the population density of phytophagous mites in Ontario peach orchards. **The Canadian Entomologist**, v.98, p.808-820, 1966.

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

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

REIS, L. L.; OLIVEIRA, L. J.; CRUZ, I. Biologia e potencial de *Doru luteipes* no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.333-342, 1988.

RIBEIRO, M.J.; CARVALHO, C. F.; MATIOLI, J. C. Influência da alimentação larval sobre a biologia de adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em diferentes dietas. **Ciência e Prática**, v.15, p. 349-54, 1991.

RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, L. A.; CANTUALMAGUER, M. A.; REYES-MENDEZ, C. A. Larval competition between *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on corn ears in Northern Mexico. **Journal of Entomological Science**, College Park, v. 47, n. 2, p. 185-187, 2012.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R. T. S.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p. 799-808, 2000.

ROJAS, J.C.; VIRGEN, A.; MALO, E. A. Seasonal and nocturnal flight activity of *Spodoptera frugiperda* males (Lepidoptera: Noctuidae) monitored by pheromones traps in the coast of Chiapas, Mexico. **Florida Entomologist**, v.87, p.496-503, 2004.

ROTHCHILD, G. H. L. A study of a natural population of *Conomelus anceps* (Germar) (Homoptera, Delphacidae) including observations on predation using the precipitin test. **Journal of Animal Ecology**, v.35, n.3, p.413-434, 1966.

RUMMEL, D. R.; LESER, J. F.; SLOSSERS, J. E.; PUTERKA, G. J.; NEEB, C. W.; WALTER, J. H.; BENEDICT, M. D.; HEILMAN, L. N.; NAMKEN, L. N.; NORMAN, J. W.; YOUNG, J.

H. Theory and tactics of *Heliothis* population management. USDA. **Cultural and Biological Control**, v. 316, 38 p.,1986.

SANTA-CECÍLIA, L.V.C., SOUZA, B.; CARVALHO, C.F. Influência de diferentes dietas em fases imaturas de *Ceraeochrysa cubana* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p.309-314, 1997.

SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R.TÔRRES, R. M. S.; NASCIMENTO, F. R. DO. Aspectos biológicos e consumo alimentar de larvas de *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Coccinellidae) alimentadas com **Schizaphis graminum** (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae). **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1273-1278, 2001.

SANTOS, L. M.; REDAELLI, L. R.; DIEFENBACH, L. M.; EFROM, C. F. S. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v.34, p.345-350, 2004.

SANTOS, M. L.; CARVALHO, M. P.; RAPASSI, R. M. A.; MURAISHI, C. T.; MALLER, A.; MATOS, F. A. Correlação linear e espacial entre produtividade de milho (*Zea mays L.*) e atributos físicos de um latossolo vermelho distroférico sob plantio direto do Cerrado Brasileiro. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n.3, p.313-321, 2006.

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

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

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

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

SARAN, E. D.; THOMAZONI, D.; SERRA, A. P.; DEGRANDE, P. Manual dos insetos benéficos do algodoeiro. **FMC- Química do Brasil- Campinas**, v.1, 227p, 2007.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, v. 30, n.3, p. 507-512, 1974

SCHAAD, N. W.; SULE, S.; VAN VUURDE, J.W.L.; VRUGGINK, H.; ALVAREZ, A.M.; BENEDICT, A.A; DE WAEL, L.; VAN LAERE, O. Serology. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D. C., ed. **Methods in Phytobacteriology**. Budapest. Akadémiai Kiadó, p.153-190, 1990.

SEQUEIRA, J. C. Técnicas serológicas e bio-moleculares de diagnóstico de vírus e de viróides em plantas. **Summa Phytopathologica** v.18, p.80-110, 1992.

SHEPARD, M., WADDIL, V. H.; KLOFT, W. Biology of the predaceous earwig *Labidura riparia* (Dermaptera: Labiduridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.66, p. 837-841, 1973.

SILVA, A. B. DA; BATISTA, J. L.; BRITO, C. H. DE. Capacidade predatória de *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 7-11, 2009a.

SILVA, A. B. DA; BATISTA, J. L.; BRITO, C. H. DE. Aspectos Biológicos de *Euborellia annulipes* sobre ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v.6, n. 3, p. 482-495, 2009b.

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. <http://www.sindiveg.org.br/noticia.php?ed=5&cod=2416>. Publicada em 15/07/2014. Disponível em: <http://www.sindiveg.org.br/noticia.php?ed=5&cod=2416>. Acesso em: 02 de Agosto de 2015.

SOARES, A. O; CODERRE, D.; SCHANDERL, H. Dietary self-selection behavior by the adults of the aphidophagous ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Animal Ecology**, v.73, p.478-486, 2004.

SOPP, P. I. & SUNDERLAND, K. D. Some factors affecting the detection period of aphid remains in predators using ELISA. **Entomologia Experimentalis et applicata**, v.51, p. 11-20, 1989.

SOUSA-SILVA, C. R. **Uso de radiotraçador e serologia no estudo das relações alimentares entre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabri., 1974) e artrópodes predadores.** Tese de mestrado. CENA/ESALQ/USP, 63p. Piracicaba,1980.

SOUSA-SILVA, C. R. Serologia aplicada ao estudo de *Deois flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae). Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, USP, Piracicaba,1985.

SOUSA-SILVA, C. R.; OLIVEIRA, A. R.; PACHECO, J. M. Diferenciação serologica dos estágios fisiológicos de *Deois flavopicta* (Stal, 1854) (Homoptera: Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.17, p.61-65, 1988.

SOUSA-SILVA, C. R.; OLIVEIRA, A. R.; PACHECO, J. M. Serologia aplicada à determinação de predadores de *Deois flavopicta* (Stall, 1854) (Homóptera: Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 19, p.121-125, 1990.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 29 p., **Documentos 42**, 2004.

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

SUTTON, S. L. Predation on woodlice; an investigation using the precipitin test. **Entomologia Experimentalis st Applicata**, v.13, n.3, p.279-285, 1970.



STATHAS, G. J. *Rhyzobius lophanthae* prey consumption and fecundity. **Phytoparasitica**, v. 28, p. 1-9, 2000.

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

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

TITOVA, E V. Use of precipitin test in a study of interrelationship between *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) and predatory arthropods. **Entomological Review**, v.49, n.2, p.155-162, 1970.

TRIPLEHORN, C. A.; JONNISON, N. F. **Estudo dos insetos**. São Paulo: Cengage Learning, 263 p. Tradução de: Introduction to the study of insects, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE–USDA. Grain: **World Markets and Trade**, 57p. 2015. Disponível em:< <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>>. Acesso em 14 de agosto de 2015.

VAN ENDEN, H. F.; EASTOP, V. F.; HUGHES, R. D.; WAY, M. J. The ecology of *Myzus persicae*. **Annual Review of Entomology**, v. 13, p. 197-243, 1968.

REGENMORTEL, M. Serology and Immunichemistry of Plant Viruses. **Academic Press**, New York, 205, p. 1982.

VENDRAMIN, J. D. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: ciclo de palestras sobre agricultura orgânica, n.2., 1997, São Paulo. Resumos... Campinas: Fundação Cargill, 1997.

YU, S. J., NGUYEN, S. N.; ABO-ELGHAR, G. E. Biochemical characteristics of insecticid resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.77, p.1-11,2003.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; LORDELO, A. I.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, A. C. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.163-166, 1982.

WAQUIL, J. M.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; CORRÊA, L. A. Efeito na produção e incidência de viroses em híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p. 460-63, 1996.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I. Cultivo do milho: manejo integrado de pragas (MIP). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. **Comunicado técnico 50**, 16 p., 2002.