

CAMILA BORGES DA CRUZ MARTINS

***Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): flutuação populacional, relações tritróficas em Curitiba, PR e evidências moleculares sobre sua origem no Brasil**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

**Orientador: Dra. Lúcia Massutti de Almeida**

**Co-orientadores: Dra. Regina C. Zonta de Carvalho**

**Dr. Walter Antonio Pereira Boeger**

CURITIBA

2008

“If you stay focused on your journey  
and get through all of the different obstacles and over any fears,  
at the end you will see a ray of sunshine.  
You will reach the light.”

Marion Licchiello

DEDICO

Aos meus pais Thais, Máximo e Tio Vê e aos meus avós maternos, Edith e Juca.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná e ao curso de Pós-Graduação de Entomologia pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Massutti de Almeida, pelos anos de amizade, orientação, pelos ensinamentos, puxões de orelha, paciência, dedicação e por acreditar no meu potencial.

A minha co-orientadora, Dra. Regina C. Zonta de Carvalho do Laboratório Marcos Enrietti – SEAB pela paciência, dedicação incondicional e identificação dos afídeos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger, do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE), do Departamento de Zoologia da UFPR e do Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais.

Ao Prof. Dr. Renato Goldenberg e Mestrando Marcelo Reginatto, do Departamento de Botânica da UFPR, pela identificação das plantas.

A Profa. Dra. Cibele Stramare Ribeiro-Costa pelos conselhos.

A Dra. Carla de Lima Bicho pelo incentivo.

Ao amigo sempre presente Geovan Henrique Corrêa, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFPR, pelos conselhos, paciência e amizade.

Ao amigo Kleber Makoto Mise, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFPR, pela amizade e conselhos.

A bióloga Camila Fediuk de Castro, pela amizade e auxílio nas coletas e organização do material estudado.

A MSc. Rosylaine Aparecida Pereira pelo auxílio nas coletas.

A Doutoranda Elaine Della Giustina Soares do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFPR, juntas descobrimos arduamente o universo da biologia molecular.

A Amanda Ciprandi Pires e Jana Magaly Tesserolli de Souza, Mestrandas do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFPR, pela amizade e companheirismo.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva: José Francisco de Oliveira Franco, Marlus Bueno Silva, Leticia Zagonel, Maria

Wilhermina Pil (Lua) e Marcel Tschá, pelos ensinamentos, paciência e em especial à Luciana Patella.

Ao Dr. Thibaut Malausa, INRA – Universidade de Nice Sophia Antipolis, França; Dr. Tederson Luiz Galvan, do Departamento de Entomologia da Universidade de Minnesota; Dr. Paulo Roberto Valle da Silva Pereira, da EMBRAPA, Passo Fundo, RS; Dra. Terezinha Monteiro dos Santos da APTA, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Regional do Extremo Oeste, Andradina, SP; Profa. Dra. Sônia Maria Noemberg Lazzari, do Departamento de Zoologia da UFPR; Doutoranda Janaína De Nadai, do Programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, MG, a Doutoranda Adelita Maria Linzmeier do Programa de Pós-graduação em Entomologia da UFPR e a Ana Maria Martins Driessen pelo envio de material.

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Bioecologia de Coleoptera: Adelita Maria Linzmeier, Daniel Pessoa, Kleber Makoto Mise, Fernando W. Leivas e Edilson Caron, pelas brincadeiras, amizade e conselhos.

Aos amigos de curso: Crisleide Maria Lazzarotto e Jonny Edward Duque Luna, pelos ensinamentos.

Aos meus pais e minha família pela paciência, entendimento e incentivo.

Agradeço a Deus.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO GERAL.....	xi

### CAPÍTULO I

*Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): flutuação populacional e relações tritróficas

RESUMO.....	02
ABSTRACT.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	04
2. OBJETIVOS.....	06
2.1. Objetivos específicos.....	06
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Locais de coletas.....	07
3.1.1. Flutuação populacional.....	07
3.1.2. Relações tritróficas.....	07
3.2. Coleta, montagem e identificação dos insetos e plantas.....	08
3.3. Análises estatísticas.....	09
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	09
4.1. Levantamento das espécies de coccinélidos, afídeos e plantas hospedeiras .....	09
4.2. Flutuação populacional de <i>H. axyridis</i> , na área do Capão do Tigre, Curitiba, Paraná, no período de outubro de 2006 a setembro de 2007.....	11
4.3. Relações tritróficas entre <i>H. axyridis</i> , seu alimento e as plantas hospedeiras.....	14
4.4. Número de gerações encontradas em um ano de observação de <i>H. axyridis</i> em Curitiba.....	27
4.5. Ocorrência das espécies de Coccinellidae nativas ou estabelecidas, antes e após a introdução de <i>H. axyridis</i> no Brasil.....	28
4.6. Predação intraguilda e aspectos gerais de introdução de <i>H.</i> <i>axyridis</i> .....	29

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
6. REFERÊNCIAS.....	35

## CAPÍTULO II

Evidências moleculares sobre a origem de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) no Brasil

RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. OBJETIVOS.....	50
2.1. Objetivos específicos.....	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Coleta e armazenamento dos exemplares coletados.....	51
3.2. Extração e quantificação do DNA genômico.....	52
3.3. Primers e amplificação do DNA.....	53
3.4. Análise das Sequências de DNA.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Análises filogeográficas.....	58
4.2. Análise haplotípica.....	62
4.3. Heteroplasmia.....	66
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	68

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1. Fotografia aérea do Capão do Tigre, Curitiba, Paraná. Em destaque área amostrada (Imagem adquirida do Google Earth em julho de 2007).....08
- Figura 2. Flutuação populacional de *Harmonia axyridis* (Pallas), no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná, Brasil. Período - outubro de 2006 a setembro de 2007.....11
- Fig. 3. Flutuação populacional de *Harmonia axyridis* (Pallas) e relação com os fatores abióticos (UR, T MED e PREC), Capão do Tigre, Curitiba, Paraná, Brasil. Período - outubro de 2006 a setembro de 2007. Os valores foram modificados para log.....12

### CAPÍTULO II

- Figura 1. Mapa dos Estados Unidos indicando os haplótipos de *Harmonia axyridis* provenientes de Denver, Colorado, obtidas através do GenBank.....56
- Figura 2. Pontos de *Harmonia axyridis* amostrados e proporção dos haplótipos encontrados na Europa Continental, Inglaterra, Brasil e Paraguai. Nos gráficos os números e cores indicam os mesmos haplótipos.....57
- Figura 3. Cladograma de Neighbour Joining não enraizado de espécimes de *Harmonia axyridis* provenientes de diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos.....58
- Figura 4. Cladogramas de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, não enraizados, de espécimes de *Harmonia axyridis* provenientes de diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos. Esquerda: uma das 550 árvores de MP e consenso estrito. Direita: uma das 476 árvores de MV e consenso estrito.....61



Figura 5. Inferência Bayesiana de espécimes das populações de *Harmonia axyridis* provenientes de localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos.....62

Figura 6. Eletroferogramas de amostras de seqüências de *Harmonia axyridis* com picos sobrepostos: A e B posição 181 (G ou A nos espécimes Ca6: A – FR1: B); C e D posição 196 (G ou A nos espécimes Ca1: C – Ca6: D); E e F posição 616 (C ou T nos espécimes GUA1: E - Ca6: F).....67

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela I. Relação do número de espécimes coletados das espécies de Coccinellidae e os meses de coletas, no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná. Período - outubro de 2006 e setembro de 2007.....10

Tabela II. Relação entre o número de espécimes coletados das espécies de Coccinellidae e as estações do ano entre outubro de 2006 e setembro de 2007, no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná.....13

Tabela III. Relação entre o valor médio dos fatores abióticos por estação e o número de espécimes de *Harmonia axyridis* (Pallas) capturados no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná. Período - outubro de 2006 a setembro de 2007.....14

Tabela IV. Plantas hospedeiras e recursos alimentares associados à *Harmonia axyridis* em diferentes localidades do Paraná. Período - agosto de 2005 a novembro de 2007.....15

Tabela V. Correlação entre as fases de desenvolvimento de *H. axyridis* e suas plantas hospedeiras encontradas sem fonte alimentar, coletados em Curitiba, PR, Brasil. Período - agosto de 2005 a novembro de 2007.....18

Tabela VI. Plantas hospedeiras e presas associadas utilizadas por *Harmonia axyridis*.  
Modificada de Koch *et al.* (2006). (\* Novo registro de planta hospedeira; # Relação  
tritrófica; + Presas ofertadas como alimento em experimentos de  
laboratório).....22

Tabela VII. Relação entre as espécies e o número de espécimes de Coccinellidae em  
diferentes períodos de coletas: 1999-2002 e 2006-2007, no Capão do Tigre, Curitiba,  
Paraná.....29

## CAPÍTULO II

Tabela I. Amostras das populações de *Harmonia axyridis* para as análises de  
seqüenciamento do fragmento do gene mitocondrial COI.....51

Tabela II. Lista dos haplótipos encontrados nos espécimes analisados de *H. axyridis*  
provenientes de diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos. A  
nomenclatura das amostras está indicada na Tabela I.....55

*Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): flutuação populacional, relações tritróficas em Curitiba, PR e evidências moleculares sobre sua origem no Brasil

*Harmonia axyridis* é uma espécie polífaga de Coccinellidae de origem asiática utilizada em controle biológico de afídeos. Compete com espécies nativas (predação intraguilha), podendo desalojá-las. Foi introduzida nos Estados Unidos, em 1916, na França em 1990, na Argentina na década de noventa e no Brasil, foi detectada em 2002. Em função da falta de conhecimento sobre as presas e plantas hospedeiras, comportamento, potencial de predação e provável origem de introdução, este trabalho tem como objetivos determinar sua flutuação populacional, reconhecer as relações tritróficas, comparar sua ocorrência e abundância com as das espécies nativas e estabelecidas e estimar a variabilidade genética de amostras do Brasil, Estados Unidos, Europa e Paraguai, analisando filogeograficamente as populações com base no seqüenciamento de um fragmento do gene COI. As coletas foram realizadas por um ano, no Capão do Tigre, Curitiba-PR, e em diferentes locais de Curitiba e região metropolitana (2005 e 2007). Três protocolos de extração foram utilizados e seqüências dos Estados Unidos obtidas no GenBank. *H. axyridis* foi encontrada em 39 espécies de plantas, das quais 20 são novos registros, alimentando-se de 20 espécies de afídeos, dos quais oito são registrados pela primeira vez. É fornecida uma tabela de plantas hospedeiras e recursos alimentares associados, de diferentes localidades do Brasil. Entre 2006 e 2007, oito espécies de Coccinellidae foram coletadas no Capão do Tigre, sendo *H. axyridis*, a mais abundante (91,23%). Seu pico ocorreu em agosto e setembro de 2007, influenciado pela umidade relativa e temperatura. Desde 1999 até 2007, observou-se redução e variação na diversidade de espécies, o que indica o possível desalojamento destas espécies. Foram detectados 18 haplótipos a partir das 47 seqüências, os quais divergiram de zero a seis nucleotídeos entre si, sendo o 2 e o 7 compartilhados pelo Brasil e Europa. As análises de NJ e IB mostram um grupo unindo os espécimes do Brasil, Paraguai e Europa. Assim, conclui-se que estas populações de *H. axyridis* pertencem a uma mesma linhagem e que a introdução no Brasil ocorreu com as oriundas da Europa ou da Argentina. Existem possíveis pontos de heteroplasmia nas posições 181, 196 e 616 dos fragmentos de COI, em indivíduos da Bélgica, França, Inglaterra, Paraguai e Brasil.

Palavras-chave: Afídeos, controle biológico, predação intraguilha, variabilidade genética.

***CAPÍTULO I***

***Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): flutuação  
populacional e relações tritróficas**

## RESUMO

*Harmonia axyridis* é uma espécie de Coccinellidae de origem asiática muito utilizada em programas de controle biológico de afídeos em todo o mundo. É considerada polífaga, pois se alimenta também de coccídeos, psilídeos, larvas de Coleoptera, Diptera e Lepidoptera, frutos danificados, pólen e néctar. Destaca-se por competir por alimento com coccinelídeos nativos (predação intraguilda), podendo desalojá-los. No Brasil foi detectada pela primeira vez em 2002, introduzida provavelmente de maneira acidental. Em função da falta de conhecimento sobre as presas e plantas hospedeiras utilizadas, comportamento, bem como seu potencial de predação, este trabalho tem como objetivos: determinar a flutuação populacional de *H. axyridis*, reconhecer suas relações tritróficas e comparar seus dados de ocorrência e abundância com os das espécies nativas e estabelecidas na nova região de ocorrência. Foram realizadas coletas semanais no Capão do Tigre, Curitiba-PR, por um ano e em diferentes locais de Curitiba e região metropolitana (2005 e 2007). *H. axyridis* foi encontrada em 39 espécies de plantas, das quais 20 são novos registros, alimentando-se de 20 espécies de afídeos, dos quais oito são registrados pela primeira vez. É fornecida uma tabela de plantas hospedeiras e recursos alimentares associados, de diferentes localidades do Brasil, além de quadro comparativo com observações de outros autores. Entre 2006 e 2007, oito espécies de Coccinellidae foram coletadas no Capão do Tigre, sendo *H. axyridis* a mais abundante (91,23%). Seu pico de abundância ocorreu em agosto e setembro de 2007, influenciado pela umidade relativa e temperatura. Desde 1999 até 2007, observou-se redução e variação na diversidade de espécies de Coccinellidae coletadas, com o predomínio de *H. axyridis*, o que indica o possível desalojamento destas espécies no local.

## ABSTRACT

*Harmonia axyridis* is an Asian Coccinellidae species well-known as an aphid classical biological control agent around the world. It is a polyphagous species that feeds also on Coccidae, Psyllidae, Coleoptera, Diptera and Lepidoptera, damaged fruits, pollen and nectar. It is an important intraguild predator, competing for food with other native coccinellids and sometimes managing to displace them. In Brazil it was detected for the first time in 2002, probably introduced accidentally. Because of the lack of knowledge on prey and host plants used, its behavior, and its predatory potential, this work has as objectives: to determine the population fluctuation of *H. axyridis*, to recognize its tritrophic relations and to compare its data of occurrence and abundance with other native and established species in the new occurrence region. For one year, weekly sampling were carried in the Capão do Tigre, Curitiba-PR and in different places of Curitiba and the metropolitan region (2005-2007). *H. axyridis* was found in 39 plant species, 20 of which are new records, feeding on 20 aphid species, of which eight are registered for the first time. A table of host plants and prey resources of different localities of Brazil and also a comparative table with other authors data are supplied. Between 2006 and 2007, eight species of Coccinellidae were collected in the Capão do Tigre, being *H. axyridis* the most abundant one (91,23%). Its peak of abundance occurred in August and September of 2007, influenced by the relative humidity and temperature. Since 1999 up to 2007, reduction and variation in the diversity of collected species of Coccinellidae were observed, with the predominance of *H. axyridis*, which indicates the possible displacement of these species.

## 1. INTRODUÇÃO

*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) é uma espécie asiática utilizada em controle biológico de pulgões (Hemiptera, Aphididae) considerados praga em diversas culturas de importância econômica. Tan (1946) descreveu sua distribuição original, que se estende desde o sul da Sibéria (Montanhas Altai) até a Manchúria, Coréia, Japão e China. Este coccinelídeo que se alimenta principalmente de pulgões, cochonilhas e psilídeos, é considerado um excelente agente de controle biológico na sua região de origem e, na China é um dos principais predadores de afídeos do algodão (Zhang 1992).

A espécie é holometábola e, similarmente a outros coccinelídeos afidófagos, iniciam seu desenvolvimento pelo estágio de ovo, passando por quatro instares larvais, pupa e adulto (Hodek & Honek 1996), os quais vivem cerca de 30 a 90 dias dependendo da temperatura (Soares *et al.* 2004). Segundo Kawauchi (1979) a temperatura influencia não somente a taxa de desenvolvimento, mas também o peso do adulto, sendo que larvas criadas em temperaturas mais altas produzem adultos menores. As espécies de afídeos utilizadas como alimento e as espécies de plantas nas quais os afídeos se desenvolvem também podem afetar o tempo de desenvolvimento da larva, longevidade e fecundidade do adulto (Hukusima & Kamei 1970 *apud* Koch 2003).

Os coccinelídeos mostram uma variação intraespecífica considerável nas máculas dos élitros, assim como na cabeça e pronoto. Estes padrões servem como cores de advertência e alertam os predadores dos fluidos desagradáveis que estes insetos liberam quando perturbados (Komai 1956). A dieta da larva e a temperatura na qual a pupa de *H. axyridis* fica exposta podem influenciar no padrão de coloração dos adultos (Grill & Moore 1998). Para esta espécie, os padrões de coloração dos élitros e do pronoto são extraordinariamente variáveis, tanto que alguns deles foram descritos como pertencentes a diferentes espécies e gêneros (Tan 1946), de tal forma que sua variabilidade de coloração levou a descrição de mais de 100 formas (Chapin & Brou 1991).

O canibalismo representa um importante papel na dinâmica da população de *H. axyridis* (Osawa 1993) e sua intensidade aparenta ser inversamente proporcional à densidade de afídeos (Burgio *et al.* 2002).

*Harmonia axyridis* parece possuir uma alta capacidade de localizar populações de afídeos no espaço e tempo (Osawa 2000). Diversas espécies de afídeos podem servir como alimento para esta espécie, assim como algumas espécies de Tetranychidae (Lucas

*et al.* 1997), Psyllidae (Michaud 2002a; Michaud 2001), Coccoidae e larvas de Chrysomelidae (Yasumatsu & Watanabe 1964 *apud* Koch 2003), Curculionidae (Kalaskar & Evans 2001; Stuart *et al.* 2002) e Lepidoptera (Koch 2003). Alguns autores ainda apontam que este coccinelídeo pode eventualmente consumir pólen e néctar (Koch *et al.* 2004). A capacidade de consumo das larvas de *H. axyridis* pode variar de 90 a 370 espécimes dependendo da espécie utilizada como presa (Hukusima & Kamei 1970 *apud* Koch 2003).

Diversos tipos de parasitóides podem atacar *H. axyridis*, como Braconidae (Hymenoptera), Phoridae e Tachinidae (Diptera), e dentre os predadores são apontados Pentatomidae (Hemiptera), além de formigas, aranhas e pássaros (Koch 2003).

*Harmonia axyridis* foi introduzida como agente de controle biológico em diferentes períodos nos Estados Unidos: Califórnia em 1916, 1964 e 1965; Washington em 1978 e 1982; Nova Escócia, Connecticut, Geórgia, Louisiana, Maryland, Washington D. C., Delaware, Maine, Mississipi, Ohio, Pensilvânia e Carolina do Norte em 1978 e 1981 (Gordon 1985). Entretanto, segundo Chapin & Brou (1991) o primeiro estabelecimento de uma população de *H. axyridis* ocorreu em 1988. Neste período, muitas espécies de afídeos foram controladas, como por exemplo, as de pecan, pinus vermelho, pragas de hortaliças, citros, soja, milho, alfafa, algodão, tabaco e trigo (Burgio *et al.* 2002). *H. axyridis* também foi liberada no México, em Chihuahua (Quiñones *et al.* 2001 *apud* Koch *et al.* 2006), Colima e Yucatán (Koch *et al.* 2006), e se encontra estabelecida no Canadá (Koch 2003) e, em diferentes países da Europa como: Grécia (Katsoyannos *et al.* 1997), sudeste da França (Iperti & Bertand 2001), Alemanha (Klausnitzer 2002), Bélgica (Adriaens *et al.* 2003) e Inglaterra (Majerus *et al.* 2006).

Na América do Sul foi introduzida na Argentina, província de Mendoza, no final da década de noventa a fim de atuar no controle biológico dos pulgões em cultura de pêssegos (Saini 2004). No Brasil, *H. axyridis* foi detectada pela primeira vez em 2002, em Curitiba, estado do Paraná, provavelmente introduzida acidentalmente. A espécie foi encontrada alimentando-se de *Tinocallis kahawaluokalani* (Kirkaldy, 1907) (Drepanosiphinae) em estremosa, *Largerstroemia indica* L. (Lythraceae), espécie muito utilizada na arborização urbana da cidade, e sobre *Pinus* spp. (Pinaceae) jovens, alimentando-se de *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) e *Cinara pinivora* (Wilson, 1919) (Lachninae) (Almeida & Silva 2002). Recentemente, *H. axyridis* foi relatada com



aparecimento ocasional no Chile (González 2006) e também no Peru (González & Vandenberg 2007).

Por ser uma espécie exótica, *H. axyridis* pode causar impactos negativos, que incluem a supressão competitiva ou deslocamento de inimigos naturais nativos e a supressão ou extinção de espécies de presas não alvo, algumas delas benéficas (Elliot *et al.* 1996). Nos Estados Unidos, foi observada competindo com *Coleomegilla maculata* DeGeer, 1775, que é uma espécie nativa e predadora polífaga importante, pois se alimenta de muitas espécies de afídeos, além de ovos de outros insetos e artrópodes (Hodek & Honek 1996). No Brasil, desde 2002, *H. axyridis* tem sido acompanhada no campo e parece competir com *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763), que é a principal espécie nativa e de grande potencial no controle biológico de afídeos.

## **2. OBJETIVOS**

Tendo em vista a recente introdução de *Harmonia axyridis* no Brasil e o escasso conhecimento sobre o seu comportamento, incluindo o seu potencial como predador, este trabalho tem por objetivo geral:

- Determinar a flutuação populacional de *Harmonia axyridis*, reconhecer suas relações tritróficas e comparar seus dados de ocorrência e abundância com os das espécies nativas e estabelecidas.

### **2.1. Objetivos específicos:**

- Inventariar as espécies de coccinelídeos, de afídeos e suas plantas hospedeiras;
- Analisar a flutuação populacional de *H. axyridis* no período de um ano na área do Capão do Tigre, Curitiba, Paraná;
- Estudar as relações tritróficas de *H. axyridis*, enfocando cada uma das fases de desenvolvimento e a ocorrência do número de gerações em um ano, comparando com dados da literatura.
- Comparar a ocorrência das espécies nativas ou estabelecidas de Coccinellidae, antes (1999 até 2002) e depois (2006 a 2007) da introdução de *H. axyridis* no Brasil e avaliar sua interferência sobre essas espécies.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Locais de coletas**

##### **3.1.1. Flutuação populacional**

De outubro de 2006 a setembro de 2007 foram realizadas coletas semanais em uma área no Capão do Tigre, localizada no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, no bairro Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, entre as coordenadas 25°26'50'' – 25°27'33''S e 49°14'16'' - 49°14'33''W e a aproximadamente 900m de altitude. Os coccinelídeos encontrados nas plantas inspecionadas foram capturados, levados ao laboratório e contabilizados, assim como as plantas e afídeos onde estes eram coletados. A área total do capão é estimada em 15,24 ha sendo 12,96 ha de floresta com Araucária (Floresta Ombrófila Mista Montana) e 2,28 ha de capoeira e capoeirão, com predomínio de taquaras (Fig. 1). O clima da região é subtropical úmido mesotérmico de verões frescos, inverno com geadas frequentes, sem estação seca, portanto do tipo Cfb na classificação de Köppen. As temperaturas médias anuais nos meses quentes e frios são inferiores a 22° e 18° C, respectivamente e a temperatura média anual é 17° C. As respectivas médias anuais de umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica nesta região é 85% e 1.300 a 1.500mm, com um índice hídrico variando entre 60 e 100, sem ocorrência de deficiência hídrica ao longo do ano. A área caracteriza-se por apresentar floresta secundária com predominância de samambaias nas zonas primitivamente habitadas por *Araucaria* sp. (Maack 1981). Atualmente predominam no local, espécies de *Pinus* e *Baccharis*.

##### **3.1.2. Relações tritróficas**

De agosto de 2005 a novembro de 2007, diversas espécies vegetais foram inspecionadas para coleta das plantas, afídeos e observação dos coccinelídeos. As coletas foram realizadas semanalmente em diferentes logradouros de Curitiba [Bairro Jardim das Américas, Campus Centro Politécnico, da Universidade Federal do Paraná] e áreas na região metropolitana: Araucária [Latitude 25°35'35''S; Longitude 49°24'37''W; pomares comerciais de pessegueiros “Chimarrita” e de pereiras] e Quatro Barras [Latitude 25°23'30''S; Longitude de 49°07'30''W; Fazenda Experimental do Cangüiri da Universidade Federal do Paraná]. Os dados de plantas hospedeiras e afídeos encontrados na mesma planta que *H. axyridis*, assim como suas fases de

desenvolvimento e demais informações obtidas em campo foram tabuladas para posterior análise.



Fig. 1 - Fotografia aérea do Capão do Tigre, Curitiba, Paraná. Em destaque área amostrada (Imagem adquirida do Google Earth em julho de 2007)

### 3.2. Coleta, montagem e identificação dos insetos e plantas

As coletas foram realizadas com auxílio de guarda-chuva e aspirador entomológico, podão para alcançar os galhos mais altos dos *Pinus* sp., frascos para armazenar os exemplares de Coccinellidae e tesoura de poda para amostrar as plantas, as quais eram armazenadas em sacos plásticos juntamente com os afídeos. Os coccinélídeos foram levados ao laboratório, mortos em frascos com acetato de etila, contabilizados, montados, etiquetados e identificados com auxílio de chaves de identificação, por comparação ou por especialistas e incorporados na Coleção de Entomologia P. J. S. Moure do Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

Os afídeos foram acondicionados em frascos contendo álcool 70% e posteriormente montados em lâminas e identificados pela Dra. Regina Célia Zonta de Carvalho, do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Secretaria da Agricultura e do

Abastecimento do Paraná, em Curitiba. As plantas foram previamente preparadas em exsicatas e identificadas pelo Dr. Renato Goldenberg e mestrando Marcelo Reginatto, do Departamento de Botânica da UFPR.

### 3.3. Análises estatísticas

Durante o período do estudo de flutuação populacional de *H. axyridis* foram tabulados dados de temperatura máxima (T MAX), média (T MED) e mínima (T MIN) em °C, precipitação (PREC) em mm, e umidade relativa do ar (UR) em %. Os dados foram obtidos junto ao Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR), localizado no Centro Politécnico, em Curitiba.

Os testes estatísticos, realizados no programa Statistica 7.0, foram baseados no número total de *H. axyridis* coletados por mês e nos valores médios dos fatores abióticos. Para verificar as relações significativas entre os fatores abióticos e a abundância de *H. axyridis* foram realizadas as análises de regressão e correlação e as médias testadas através do teste de Tuckey, todas ao nível de 5% de significância.

As estações do ano em 2006 e 2007 foram consideradas entre as datas: primavera (23 de setembro a 20 de dezembro), verão (21 de dezembro a 19 de março), outono (20 de março a 20 de junho) e inverno (21 de junho a 22 de setembro). Nas análises referentes às estações do ano, a coleta de 25 de setembro de 2007 foi desconsiderada.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Levantamento das espécies de coccinelídeos, afídeos e plantas hospedeiras

Entre outubro de 2006 e setembro de 2007 foram coletados 1038 exemplares de oito espécies de Coccinellidae. Durante todo o período, *H. axyridis* foi encontrada em maior quantidade (91,23%) do que as espécies nativas e/ou estabelecidas como: *Olla v-nigrum* (Mulsant, 1866) (3,08%), *Cycloneda sanguinea* (2,02%), *Coccidophilus citricola* Bréthes, 1905 (1,83%), *Scymnus* sp. (0,96%), *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville, 1842 (0,48%), *Cycloneda pulchella* (Klug, 1829) (0,29%) e *Curinus coeruleus* (Mulsant, 1850) (0,10%) (Tabela I).

*Olla v-nigrum* e *H. convergens* foram registradas pela primeira vez no Brasil em 1985, a partir do estudo de espécimes de museus e trabalhos científicos relacionados aos

Coccinellini (Coccinellidae) que ocorrem no Rio Grande do Sul, e também foi indicada a presença de *C. pulchella* para o estado (Arioli 1985). Em Santa Maria (RS), entre abril de 1985 e agosto de 1986, 23 espécies de 18 gêneros de Coccinellidae foram capturadas em pomares de *Citrus* spp., sendo a subfamília Scymninae a mais abundante, tanto no número de espécies quanto em espécimes (Arioli & Link 1987).

Em inventário da fauna de Coleoptera para o Bioma Araucária realizado em Vila Velha, Ponta Grossa (PR), entre setembro de 1999 e agosto de 2000, foram capturadas através de armadilha Malaise, 53 espécies de Coccinellidae de um total de 1.659, sendo esta família o oitavo grupo mais coletado (Ganho & Marinoni 2005).

As espécies de Coccinellidae, *H. axyridis*, *O. v-nigrum*, *C. sanguinea*, *C. citricola*, *Scymnus* sp. e *H. convergens* foram coletadas sobre *Pinus* spp., juntamente com os afídeos *C. atlantica*, *C. pinivora* e *Essigella californica* (Essig, 1909). *H. axyridis*, *C. pulchella*, *C. coeruleus*, *C. sanguinea* e *H. convergens* foram coletadas sobre *Baccharis* sp.1 e sp.2 juntamente com *Aphis spiraecola* Patch, 1914 e em *Baccharis* sp.1 com cochonilha (não identificada). Em *Baccharis* sp.3 observou-se apenas *H. axyridis* e cochonilhas (não identificada).

Tabela I. Relação do número de espécimes coletados das espécies de Coccinellidae e os meses de coletas, no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná. Período - outubro de 2006 e setembro de 2007.

Espécies de Coccinellidae	out/06	nov	dez	jan/07	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	Total	%
<i>Harmonia axyridis</i>	28	2	15	3	24	103	36	52	133	81	197	273	947	91,23
<i>Hippodamia convergens</i>				1	2						1	1	5	0,48
<i>Cycloneda sanguinea</i>					3	6	6	3	2		1		21	2,02
<i>Olla v-nigrum</i>	3				2			1			24	2	32	3,08
<i>Cycloneda pulchella</i>	1		1					1					3	0,29
<i>Curinus coeruleus</i>	1												1	0,10
<i>Scymnus</i> sp.			3					7					10	0,96
<i>Coccidophilus citricola</i>								3	16				19	1,83
Total													1038	100%

#### 4.2. Flutuação populacional de *H. axyridis*, na área do Capão do Tigre, Curitiba, Paraná, no período de outubro de 2006 a setembro de 2007

*Harmonia axyridis* alcançou seu pico de abundância entre agosto e setembro (Fig. 2). Em oito coletas, 470 espécimes foram capturados, representando 45,28% do total. A menor abundância de *H. axyridis* ocorreu nos meses de novembro, dezembro e janeiro e nos meses de março e junho houve um aumento do número de espécimes coletados.

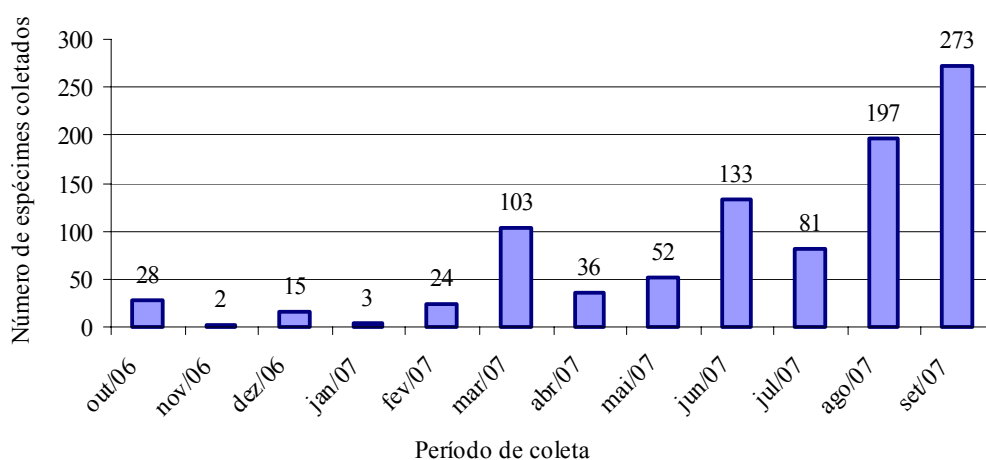


Fig. 2. Flutuação populacional de *Harmonia axyridis* (Pallas), no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná, Brasil. Período - outubro de 2006 a setembro de 2007.

Através de análise de regressão verificou-se que a abundância de *H. axyridis* está significativamente relacionada ( $R^2=71,76\%$ ) com as temperaturas média ( $p=0,0004$ ) e máxima ( $p=0,0006$ ). A análise de correlação entre a abundância de *H. axyridis* foi significativa e inversamente proporcional à umidade relativa ( $p=0,002$ ) (Fig. 3).

A umidade relativa (UR) média mais baixa registrada para o período foi de 73% em junho, seguido dos meses de setembro, julho, agosto e março, respectivamente com UR de 75,2%, 76,23%, 76,55% e 76,81%. Nestes meses a média da T MED foi de 16,5°C, 18,84°C, 13,8°C, 15,75°C e 22,9°C, respectivamente.

Nos meses de menor abundância de *H. axyridis* (outubro a fevereiro), os fatores climáticos foram homogêneos, sendo que a UR variou somente 3,23%. Em março, quando houve um aumento na média de espécimes capturados (103 espécimes), a UR diminuiu em 5,6% em relação ao mês anterior. Em junho, o número de *H. axyridis*

aumentou (de 52 espécimes coletados em maio para 133 em junho) e uma diminuição no valor de UR em relação ao mês anterior, foi de 12,04%.

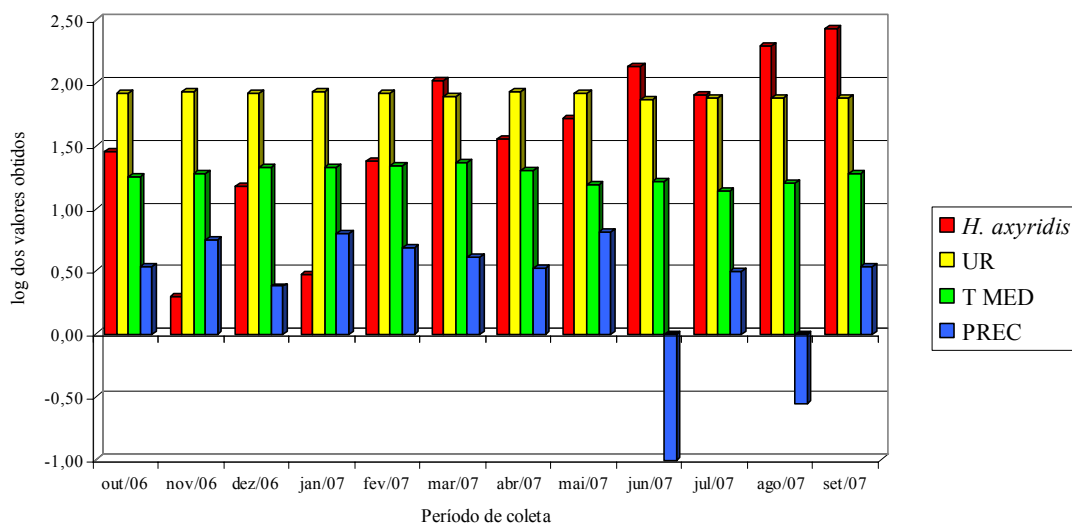


Fig. 3. Flutuação populacional de *Harmonia axyridis* (Pallas) e relação com os fatores abióticos (UR, T MED e PREC), Capão do Tigre, Curitiba, Paraná, Brasil. Período - outubro de 2006 a setembro de 2007. Os valores foram modificados para log.

Nos meses de agosto e setembro, quando ocorreu o pico de abundância, a UR permaneceu na faixa entre 75 e 76%, mas as temperaturas (T MÍN, T MÁX e T MED) aumentaram e a precipitação pluviométrica também foi maior. Assim, pode-se constatar que em temperaturas médias acima de 13°C e umidade relativa entre 75,2 e 76,81%, ocorreu maior abundância de *H. axyridis* (Fig. 3).

Em condições naturais de temperatura e umidade, Ongagna *et al.* (1993), concluíram que *H. axyridis* cessa a reprodução em épocas de dias curtos e temperatura média menor que 12°C. Segundo estes autores, temperaturas médias entre 13,2°C e 23,3°C permitem o desenvolvimento dos estágios imaturos. Por outro lado, temperaturas acima de 23°C alteram ou inviabilizam a incubação dos ovos e o desenvolvimento larval. Entretanto, na Argentina, sob condições experimentais, utilizando-se temperatura média de  $23 \pm 2,8^\circ\text{C}$ , *H. axyridis* completou o seu ciclo em 20 dias (Saini 2004). Em Curitiba, durante todo o período de coleta, a média da T MED não ultrapassou 22,9°C, indicando que de maneira geral a região permite o desenvolvimento de *H. axyridis* durante o ano todo, sendo, portanto multivoltina.

Através da análise de variância constataram-se diferenças significativas entre a abundância de *H. axyridis* e as estações do ano ( $F=5,00689$ ;  $p\text{-level}=0,00516$ ). No

inverno o número médio de *H. axyridis* capturados por coleta (48,92 espécimes) foi significativamente maior do que nas demais estações, as quais não diferiram significativamente entre si (Tabela II); o número médio de *H. axyridis* no outono, verão e primavera foi de 15,08, 13,88 e 5,38 espécimes, respectivamente. A média T MÁX no inverno foi de 22,19°C e a UR foi de 76,65% (Tabela III).

Tabela II. Relação entre o número de espécimes coletados das espécies de Coccinellidae e as estações do ano entre outubro de 2006 e setembro de 2007, no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná.

<b>espécies de Coccinellidae</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verão</b>	<b>Outono</b>	<b>Inverno</b>	<b>Total</b>
<i>Harmonia axyridis</i>	43	111	196	587	937
<i>Hippodamia convergens</i>		3		2	5
<i>Cycloneda sanguinea</i>		9	9	3	21
<i>Olla v-nigrum</i>	3	2	1	26	32
<i>Cycloneda pulchella</i>	2		1		3
<i>Curinus coeruleus</i>	1				1
<i>Scymnus</i> sp.	3		7		10
<i>Coccidophilus citricola</i>			19		19
Nº total de coccinélideos coletados por estação	52	125	233	618	1031
Média de <i>H. axyridis</i> coletadas por estação	5,38 a	13,88 a	15,08 a	48,92 b	

Além dos fatores climáticos, o desenvolvimento dos Coccinellidae, assim como o de outros insetos, é dependente da qualidade do alimento (Dixon 2000). Osawa (2000) a partir dos seus estudos no Japão concluiu que o ciclo de vida de *H. axyridis* coincide com o dos afídeos. Este autor também evidenciou que as mudanças sazonais do número de espécimes de *H. axyridis* coletados variaram conforme o número de afídeos disponíveis, de tal forma que as gerações de *H. axyridis* variaram de acordo com a diminuição das gerações de afídeos. Da mesma forma, a quantidade e qualidade das presas influenciam na quantidade de *H. axyridis* coletada diariamente e, os padrões de movimento de adultos são possivelmente determinados pelos padrões de distribuição dos recursos no habitat. Podemos concluir, portanto, que o inverno, além de proporcionar as condições climáticas necessárias para o desenvolvimento de *H. axyridis*, provavelmente proporcionou uma maior quantidade e qualidade de alimento, o que justifica o maior número médio de indivíduos capturados por coleta (48,92 espécimes) nesta estação.



Tabela III. Relação entre o valor médio dos fatores abióticos por estação e o número de espécimes de *Harmonia axyridis* (Pallas) capturados no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná. Período - outubro de 2006 a setembro de 2007.

	T MIN	T MED	T MAX	PRE	UR	<i>H. axyridis</i>	Tuckey
Primavera/06	14,91	19,15	24,65	3,02	82,97	5,38	a
Verão/07	18,05	21,86	27,39	5,29	82,19	13,88	a
Outono/07	13,93	18,24	23,58	3,39	79,23	15,08	a
Inverno/07	10,98	15,87	22,19	2,08	76,65	48,92	b

Em Santa Maria (RS), a abundância dos Coccinellidae coletados em *Citrus* spp. variou conforme a disponibilidade de alimento no campo (Arioli & Link 1987).

Entre 2006 e 2007, no Capão do Tigre *H. axyridis* foi coletada em árvores de *Pinus* sp. alimentando-se dos afídeos *C. atlantica*, *C. pinivora* e *E. californica*, em *Baccharis* sp.1 e sp.2 da espécie *A. spiraecola* e em *Baccharis* sp.3 alimentando-se em cochonilhas, as quais não foram identificadas. Na região sul do Brasil, *Cinara* spp. têm tido seus picos populacionais nos meses mais frios, quando a média de temperatura é de aproximadamente 15°C (Cardoso 2001). Este afídeo pode ter sido o alimento mais consumido no inverno. Já *A. spiraecola* desenvolve-se melhor em temperaturas mais quentes, entre 20°C e 30°C (Wang & Tsai 2000) e pode ter sido a fonte de alimento utilizada na primavera e verão.

#### 4.3. Relações tritróficas entre *H. axyridis*, seu alimento e as plantas hospedeiras

De agosto de 2005 a novembro de 2007, *H. axyridis* foi encontrada alimentando-se de 20 espécies de afídeos em 39 espécies de plantas pertencentes a 15 famílias vegetais (Tabela IV).

Dentre as espécies de afídeos, oito são novos registros alimentares para *H. axyridis*: *Aphis coreopsidis* (Thomas, 1878), *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach, 1843), *E. californica*, *Hyperomyzus lactucae* (Linnaeus, 1758), *Macrosiphoniella yomogifoliae* (Shinji, 1924), *Neophyllaphis podocarpini* Carrillo, 1980, *Neotoxoptera formosana* (Takahashi, 1921) e *Uroleucom sonchi* (Linnaeus, 1767) e em Psyllidae um novo registro foi estabelecido, *Triozoida* sp. em *Psidium guajava* L. (Tabela VI).

Tabela IV. Plantas hospedeiras e recursos alimentares associados à *Harmonia axyridis* em diferentes localidades do Paraná. Período - agosto de 2005 a novembro de 2007.

Plantas Hospedeiras - Família	Presas	Fase de vida de <i>H. axyridis</i>
<b>Apiaceae</b>		
<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	<i>Aphis fabae</i> Acopoli, 1763 - Aphididae	Adulto
<b>Araliaceae</b>		
<i>Schefflera arboricola</i> (Hayata) Merr.	<i>Aphis</i> sp. - Aphididae	Adulto
<b>Asteraceae</b>		
<i>Baccharis</i> sp.1	<i>Aphis spiraeicola</i> Patch, 1914 - Aphididae e cochonilha (não identificada)	Ovos, Larva, Pupa e Adulto
<i>Baccharis</i> sp.2	<i>Aphis spiraeicola</i> Patch, 1914 - Aphididae	Adulto
<i>Baccharis</i> sp.3	cochonilha (não identificada)	Adulto e Larva
<i>Bidens pilosa</i> L. * <sup>01</sup>	<i>Aphis coreopsidis</i> (Thomas, 1878); <i>Uroleucon sonchi</i> (Linnaeus, 1767); <i>Hyperomyzus lactucae</i> (Linnaeus, 1758) - Aphididae	Adulto
<i>Bidens pilosa</i> L.	<i>Aphis coreopsidis</i> (Thomas, 1878) - Aphididae	Adulto e Larva
<i>Bidens sulphurea</i> (Cav.) Sch. Bip.	<i>Macrosiphoniella yomogifoliae</i> (Shinji, 1924) - Aphididae	Adulto e Larva
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i> L.	<i>Brachycaudus helichrysi</i> (Kaltenbach, 1843) - Aphididae	Adulto
<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Aphis fabae</i> Acopoli, 1763 - Aphididae	Adulto e Ovos
<i>Hypochoeris radicata</i> L.	<i>Uroleucon ambrosiae</i> (Thomas, 1878) - Aphididae	Adulto
<i>Lactuca sativa</i> L.	<i>Uroleucon ambrosiae</i> (Thomas, 1878); <i>Uroleucom sonchi</i> (Linnaeus, 1767) - Aphididae	Larva e Adulto
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	<i>Uroleucom sonchi</i> (Linnaeus, 1767) - Aphididae	Adulto
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	afídeo (não identificado)	Ovos, Larva, Pupa e Adulto
<b>Bignoniaceae</b>		
<i>Tabebuia</i> sp.	Ninfas de Psyllidae (não identificadas)	Adulto
<b>Brassicaceae</b>		
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer, 1776); <i>Lipaphis erysimi</i> (Kaltenbach, 1843) - Aphididae	Pupa
<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>capitata</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i> (Linnaeus, 1758) - Aphididae	Larva
<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>leucocephala</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i> (Linnaeus, 1758) - Aphididae	Adulto e Ovos
<b>Fabaceae</b>		
<i>Spartium junceum</i> L.	<i>Aphis craccivora</i> (Koch, 1854) - Aphididae	Adulto e Ovos
<i>Tipuana tipu</i> (Benth.)Kuntze	Psyllidae (não identificado)	Adulto
<b>Liliaceae</b>		
<i>Allium schoenoprasum</i> L.	<i>Neotoxoptera formosana</i> (Takahashi, 1921) - Aphididae	Ovos, Larva e Adulto
<b>Lythraceae</b>		
<i>Lafoensia pacari</i> L.	Psyllidae (não identificado)	Ovos, Larva, Pupa e Adulto
<i>Lagerstroemia indica</i> L.	<i>Toxoptera aurantii</i> (Boyer de Fonscolombe, 1841) - Aphididae	Adulto, Pupa e Ovos

Tabela IV. Continuação

<b>Malvaceae</b>		
<i>Hibiscus rosa sinensis</i> L.	Ninfas de <i>Toxoptera</i> sp.; <i>Aphis</i> sp. - Aphididae	Adulto e Ovos
<b>Myrtaceae</b>		
<i>Myrciaria cauliflora</i> (Mart.) O. Berg	larvas de Curculionidae (não identificadas)	Larva, Pupa e Adulto
<i>Psidium guajava</i> L. * <sup>02</sup>	<i>Triozoida</i> sp. - Psyllidae	Adulto
<b>Pinaceae</b>		
<i>Pinus</i> sp.	<i>Cinara pinivora</i> (Wilson, 1919); <i>Cinara atlantica</i> (Wilson, 1919); <i>Essigella californica</i> (Essig, 1909) - Aphididae	Ovos, Larva, Pupa e Adulto
<b>Podocarpaceae</b>		
<i>Podocarpus</i> sp.	<i>Neophyllaphis podocarpini</i> Carrilo, 1980 - Aphididae	Adulto e Ovos
<b>Rosaceae</b>		
<i>Rosa</i> sp.	<i>Macrosiphum rosae</i> (Linnaeus, 1758) - Aphididae	Adulto
<b>Rutaceae</b>		
<i>Citrus</i> sp. (limão)	<i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy, 1907) - Aphididae	Adulto, larva
<i>Citrus</i> sp. (laranja)	afídeo (não identificado)	Ovos, Larva, Pupa e Adulto
<i>Citrus</i> sp. (limão)	<i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy, 1907) - Aphididae	Ovos, Larva, Pupa e Adulto
<i>Citrus</i> sp. (mexirica)	afídeo (não identificado)	Ovos, Larva, Pupa e Adulto
<b>Verbenaceae</b>		
<i>Duranta repens</i> L.	cochonilha (não identificada)	Adulto

\*<sup>01</sup> Passo Fundo, Rio Grande do Sul; \*<sup>02</sup> Viçosa, Minas Gerais.

Em geral os adultos, ovos e imaturos de *H. axyridis* co-ocorreram, com exceção das plantas: *Chrysanthemum leucanthemum* L., *Duranta repens* L., *Foeniculum vulgare* Miller (erva-doce), *Hipochoeris radicata* L., *P. guajava* L., *Rosa* sp., *Schefflera arboricola* (Hayata) Merr., *Tabebuia* sp. e *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze, nas quais apenas adultos foram observados durante todo o período experimental. O mesmo foi relatado por LaMana & Miller (1996) em levantamento realizado no Oregon, Estados Unidos, onde somente adultos desta espécie de coccinelídeo foram coletados nas plantas *Acer saccharum* Marsh, *Medicago sativa* L., *Prunus* sp. (Plum) e *Salix* sp..

As relações tritróficas relatadas foram baseadas na observação da ocorrência de *H. axyridis* em suas diferentes fases de desenvolvimento e afídeos na mesma planta. Hodek & Honek (1996), salientam que apenas as observações de ocorrência mútua entre coccinelídeos e insetos presas em uma planta, não necessariamente refletem essa relação predador-presa, porém, *H. axyridis* faz sua postura antes ou durante o pico de população de afídeos (Hironori & Katsuhiko 1997; Osawa 2000). Desta forma, considerou-se que a presença de ovos, larvas e pupas de *H. axyridis* nas plantas com a presença de afídeos

era indicativo do desenvolvimento do coccinélídeo naquela planta, estabelecendo-se a relação tritrófica, uma vez que predador e presa co-habitavam o mesmo hospedeiro.

No entanto, Osawa (1993) enfatiza que mesmo que as fêmeas façam a postura em locais onde o pico de afídeos está próximo, as larvas podem não ter alimento suficiente na planta, pois a taxa de consumo de alimento aumenta conforme as larvas vão se desenvolvendo e conseqüentemente ocorre redução do número de afídeos, além da dispersão natural das suas formas aladas.

Em algumas coletas realizadas em Curitiba, *H. axyridis* foi observada em plantas sem a presença de afídeos ou qualquer outro tipo de presa (Tabela V). Em *Zea mays* L. (milho) apenas adultos foram coletados e nenhuma fonte alimentar foi encontrada. Entretanto, sabe-se que *H. axyridis* alimenta-se de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) e faz posturas regularmente nesta espécie de planta (Musser & Shelton 2003). *Rhopalosiphum padi* (L. 1758) também serviu como fonte alimentar de *H. axyridis* em plantações de *Triticum* spp. (trigo) no estado da Carolina do Norte, Estados Unidos (Nault & Kennedy 2003). Da mesma forma, *Aphis gossypii* Glover, 1877 já foi coletado sobre as espécies, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (ipê amarelo) (Peronti & Souza-Silva 2002), *Sechium edule* Swartz (chuchu) (Neupane *et al.* 2006), *Cucumis sativus* L. (pepino) (Steenis & El-Khawass 1995), *Cucumis melo* L. (melão) (Klinger *et al.* 1998) e *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench (quiabo) (Leite *et al.* 2007). Entretanto, em Curitiba, não foram encontradas fontes alimentares aparentes. Porém, se larvas e pupas estavam presentes nestes hospedeiros, significa que havia uma fonte alimentar no local que possibilitou o desenvolvimento de *H. axyridis* até o estágio de pupa, ou possibilitou a alimentação das larvas e dos adultos, porém este alimento não foi encontrado.

Tabela V. Correlação entre as fases de desenvolvimento de *H. axyridis* e suas plantas hospedeiras encontradas sem fonte alimentar, coletados em Curitiba, PR, Brasil. Período - agosto de 2005 a novembro de 2007.

Coccinellidae				Planta hospedeira
ovo	larva	pupa	adulto	
	x			<i>Cucurbita pepo</i> L. var. <i>melopepo</i> - Cucurbitaceae
	x		x	<i>Cucumis sativus</i> L. - Cucurbitaceae
	x		x	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench - Malvaceae
	x		x	<i>Cucumis melo</i> L. - Cucurbitaceae
			x	<i>Zea mays</i> L. - Poaceae
			x	<i>Odontonema strictum</i> Kuntze - Acanthaceae
				<i>Tabebuia chrysotricha</i> (Mart. Ex Dc.) Standl. -
x		x	x	Bignoniaceae
	x	x		<i>Sechium edule</i> Swartz - Cucurbitaceae

*Harmonia axyridis* foi coletada junto com muitas espécies de presas (dentre afídeos, cochonilhas, psílídeos e curculionídeos) que podem lhe servir de alimento, pois apesar de ser primariamente afidófaga, na falta de afídeos, pode se alimentar de diferentes presas (Tetranychidae, Psyllidae, Coccoidea, Chrysomelidae, Curculionidae e Lepidoptera) e de material vegetal (frutas danificadas, pólen e néctar) (Koch 2003). Sabe-se que a presença de afídeos no Capão do Tigre não foi constante e provavelmente este fato contribuiu para que *H. axyridis* procurasse essas outras fontes alimentares no capão ou em locais próximos, justificando a coleta de espécimes mesmo quando a quantidade de afídeos encontrava-se reduzida. Sabe-se que a substituição da alimentação de afídeos por produtos originários da plantas, como néctar e pólen, pode ser uma fonte alternativa de alimento por um tempo quando a presa encontra-se escassa, reduzindo a mortalidade e mantendo a população abundante mesmo sem a presa (Hodek e Honek 1996). Hagen (1962) enfatiza que os coccinelídeos predadores de maneira geral podem se alimentar eventualmente destes produtos, e que estes podem ainda proporcionar o aumento do volume das reservas dessas espécies. Segundo LaMana & Miller (1996), *H. axyridis* pode eventualmente consumir pólen e néctar e já foi observada, em Minnesota, alimentando-se de *Cucurbita* sp. (abóbora) (Koch *et al.* 2004).

Em Curitiba, *H. axyridis* foi observada alimentando-se de *Aphis fabae* Scopoli, 1763, *A. coreopsidis*, *H. lactucae*, *B. helichrysi*, *M. yomogifoliae* e *Uroleucon ambrosiae* (Thomas, 1878) e *U. sonchi* nas plantas pertencentes à família Asteraceae e dentre estes afídeos, cinco são novos registros alimentares para a espécie (Tabela VI). *U. ambrosiae* já havia sido registrada em Curitiba (Almeida & Silva 2002). *H. lactucae* já tinha sido identificada como alimento de *Coccinella septempunctata* L., 1758 (Mills 1981). LaMana & Miller (1996) também encontraram larvas e adultos de *H. axyridis* em *Cirsium arvense* L. (Asteraceae) alimentando-se de *A. fabae*.

Em Brassicaceae, *H. axyridis* foi encontrada alimentando-se de *Myzus persicae* Sulzer, 1776, *Lipaphis erysimi* (Kalt, 1843) e *Brevicoryne brassicae* L., 1758. *B. brassicae* já foi utilizado como alimento de *H. axyridis* em um experimento que avaliou o efeito de diferentes dietas para esta espécie. Neste caso o afídeo foi criado sobre *Brassica rapa* L. e se mostrou tóxico ou não apropriado para larvas de primeiro instar (Tsaganou *et al.* 2004). LaMana & Miller (1996) encontraram todas as fases de desenvolvimento de *H. axyridis* em *Nasturtium* sp. (Brassicaceae) alimentando-se de *A. fabae*. Zhang *et al.* (2007) também encontraram *M. persicae* infestando *Brassica oleraceae* L. var. *capitata* (repolho), porém em um experimento que avaliava o nível de resíduos de pesticidas na planta, e os autores não fazem nenhuma menção à presença de predadores durante o experimento.

Em Fabaceae, *H. axyridis* foi encontrada alimentando-se de *Aphis craccivora* (Koch, 1854) em *Spartium junceum* L.. Este coccinelídeo já tinha sido encontrado nesta família vegetal em: *Vicia faba* L. (Harmon *et al.* 1998) e *M. sativa* (alfafa), alimentando-se do afídeo *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) (LaMana & Miller 1996); *Pisum sativum* L. alimentando-se de *M. persicae* (Burgio *et al.* 2002, Lanzoni *et al.* 2004); e *Glycine max* (L.) (soja) alimentando-se de *Aphis glycines* Matsumura, 1917 (Costamagna & Landis 2007; Gardiner & Landis 2007).

Em Malvaceae, *H. axyridis* foi encontrada alimentando-se de *Aphis* sp. e ninfas de *Toxoptera* sp.. Este coccinelídeo já havia sido relatado em outras malváceas *Gossypium* sp. (Yasuda *et al.* 2001) e *Hibiscus syriacus* L. (Kindlmann *et al.* 2000) alimentando-se de *A. gossypii*.

Nas rosáceas, *H. axyridis* foi encontrada alimentando-se do afídeo *Macrosiphum rosae* (Linnaeus, 1758), espécie já citada como alimento por Saini (2004) na Argentina e LaMana & Miller (1996) nos Estados Unidos. *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878), outra espécie do gênero, também foi relatada como fonte alimentar deste

coccinelídeo, em *Rosa hybrida* L. (Snyder *et al.* 2004). Foram descritas também como fonte alimentar de *H. axyridis* em Rosaceae: *Aphis pomi* DeGeer, 1773 (Brown 2003, Coderre *et al.* 1995) e *A. spiraecola* (Brown & Miller 1998, Chapin & Brou 1991) em *Malus* sp. (maçã); *A. spiraecola* em *Spirea thunbergii* Sieb. Ex Bl. (Osawa 2000) e *Hyalopterus pruni* (Geoffrey, 1762) e *Mysus varians* Davidson, 1912, em *Prunus persica* (L.) Batsch (pêssego) (Osawa 2000).

Em Curitiba, *H. axyridis* foi encontrada alimentando-se de *Toxoptera citricida* (Kirkaldy, 1907) em *Citrus* sp. (limão) (Rutaceae). Além deste afídeo são citados *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Psyllidae) (Michaud 1999) e *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe, 1841) (Katsoyannos *et al.* 1997) em várias espécies de *Citrus*. Michaud (2004) relata que os psílideos dos citros, podem ser eficientemente controlados com a introdução de *H. axyridis*. Testes de preferência apontam que *T. citricida* e *A. spiraecola* são presas aceitáveis para diversos coccinelídeos. Porém, apenas *C. sanguinea* e *H. axyridis* completam o desenvolvimento apresentando taxas de sobrevivência de 60 e 70% respectivamente para *A. spiraecola*, e 100 e 95% para *T. citricida* (Michaud 2000). As várias espécies e cultivares de citros são habitats adequados para o desenvolvimento de *H. axyridis* (Katsoyannos *et al.* 1997).

Sobre *Pinus* sp. foram encontrados os afídeos *E. californica*, *C. atlantica* e *C. pinivora*, como fonte alimentar de *H. axyridis*. Em Pinaceae foi relatado na literatura o maior número de presas de *H. axyridis* de diferentes famílias de Insecta: *C. atlantica*, *C. pinivora*, *Eulachnus agilis* (Kaltenbach, 1843) e *Mindarus abietinus* Koch, 1857 (Hemiptera, Aphididae); *Matsucoccus thunbergiana* Miller & Park, 1987 e *Matsucoccus matsumurae* (Kuwana, 1905) (Hemiptera, Margarodidae); *Adelges tsugae* Annand, 1924 (Hemiptera, Adelgidae) e *Thecodiplosis japonensis* Ushida & Inouye, 1955 (Diptera, Cecidomyiidae) (Tabela VI).

As famílias Bignoniaceae, Araliaceae, Liliaceae e Verbenaceae, não haviam sido citadas na literatura como hospedeiras de *H. axyridis*. Porém, em Curitiba, na espécie *Allium schoenoprasum* L. (Liliaceae), o afídeo *N. formosana* foi registrado como nova fonte alimentar de *H. axyridis*. Blackman & Eastop (1994) relataram a ocorrência desta espécie de afídeo em plantas do gênero *Allium* no Japão, China, Taiwan, Coréia, Austrália, Nova Zelândia, Hawaii e América do Norte.

Na família Lythraceae foram observados psílideos (não identificados) e a espécie de afídeo *T. aurantii*. Além deste afídeo, *T. kahawaluokalani*, já tinha sido relatado

como alimento de *H. axyridis* nesta família vegetal (Almeida & Silva 2002; Chapin & Brou 1991).

Na literatura, são registradas para *H. axyridis* cerca de 77 espécies de presas encontradas em aproximadamente 82 espécies de plantas pertencentes a 36 famílias botânicas, das quais Asteraceae, Pinaceae, Fabaceae e Rosaceae são as com o maior número de relações tritróficas (*H. axyridis* x presa x hospedeiro) (Tabela VI).



Tabela VI. Plantas hospedeiras e presas associadas utilizadas por *Harmonia axyridis*. Modificada de Koch *et al.* (2006). (\* Novo registro de planta hospedeira; # Relação tritrófica; + Presas ofertadas como alimento em experimentos de laboratório).

Plantas Hospedeiras	Presas	Referências	OBS:
<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill. - Pinaceae	<i>Mindarus abietinus</i> Koch - Aphididae	Berthiaume <i>et al.</i> 2007	
<i>Abies procera</i> Rehder	<i>Cinara</i> sp. - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Acacia</i> spp. - Leguminosae	<i>Psylla uncatoides</i> (Ferris & Klyver) - Psyllidae	Leeper & Beardsley 1974	
<i>Acer negundo</i> L. - Aceraceae	<i>Periphyllus negundinis</i> (Thomas) - Aphididae	Koch & Hutchinson 2003	
<i>Acer saccharum</i> Marsh.	<i>Drepanaphis idahoensis</i> Smith & Dilley - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Acer saccharum</i> Marsh.	<i>Drepanosiphum platanoides</i> (Schranck) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Acer saccharum</i> Marsh.	<i>Periphyllus testudinaceus</i> (Ferne) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Allium schoenoprasum</i> L. - Liliaceae	<i>Neotoxoptera formosana</i> (Takahashi) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Ampelamus albidus</i> (Nutt) - Asclepiadaceae	<i>Toxoptera aurantii</i> (Boyer de Fonscolombe) - Aphididae	Snyder <i>et al.</i> 2000	
<i>Baccharis</i> sp.1 - Asteraceae	<i>Aphis spiraecola</i> Patch - Aphididae e cochonilha (não identificada)	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Baccharis</i> sp.2	<i>Aphis spiraecola</i> Patch - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Baccharis</i> sp.3	cochonilha (não identificada)	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Betula pendula</i> Roth - Betulaceae	<i>Euceraphis betulae</i> (Koch) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Betula pendula</i> Roth	<i>Callipterinella calipterus</i> (Hartig) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Bidens pilosa</i> L. - Asteraceae	<i>Hyperomyzus lactucae</i> (L.) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Bidens pilosa</i> L.	<i>Uroleucom sonchi</i> (L.) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Bidens pilosa</i> L.	<i>Aphis coreopsidis</i> (Thomas) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Bidens sulphurea</i> (Cav.) Sch. Bip.	<i>Macrosiphoniella yomogifoliae</i> (Shinji, 1924) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> - Brassicaceae	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	<i>Lipaphis erysimi</i> (Kaltenbach) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i> (L.) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>leucocephala</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i> (L.) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>leucocephala</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i> (L.) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #

Tabela VI. Continuação

<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch - Juglandaceae	<i>Melanocallis caryaefoliae</i> Davis - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994	
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch	<i>Monellia caryella</i> (Fitch) - Aphididae	Saini 2004; Cottrell 2005	+
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch	<i>Monelliopsis pecanis</i> Bissel - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994	
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch	<i>Monelliopsis pecanis</i> Bissel - Aphididae	Cottrell 2005	+
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch	<i>Monellia caryella</i> (Fitch) - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994	
<i>Castanea crenata</i> Sieb. & Zucc. - Fagaceae	<i>Diaspidiotus</i> (=Comstockaspis) <i>macroporanus</i> (Takagi) - Diaspididae	Choi <i>et al.</i> 1995a	
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i> L. - Asteraceae	<i>Brachycaudus helichrysi</i> (Kaltenbach) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Cirsium arvense</i> (L.) - Asteraceae	<i>Aphis fabae</i> Acopoli - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Rafinesque - Rutaceae; <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Osbeck - Rutaceae	<i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy) - Aphididae	Michaud 2000	+
<i>Citrus</i> sp.	<i>Toxoptera aurantii</i> (Boyer de Fonscolombe) <i>Aphis spiraeicola</i> Patch <i>Aphis gossypii</i> Glover - Aphididae	Katsoyannos <i>et al.</i> 1997	+
<i>Citrus</i> spp.	<i>Diaphorina citri</i> Kuwayama - Psyllidae	Michaud 1999, 2002a, 2003	
<i>Citrus</i> spp.	<i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy) - Aphididae	Michaud 1999, 2000, 2002a	+ 2000
<i>Cucumis sativus</i> L. - Cucurbitaceae	<i>Aphis gossypii</i> Glover - Aphididae	Lee & Kang 2004 Kuroda & Miura 2003 Gil <i>et al.</i> 2004	+
<i>Cucurbita maxima</i> Duch. - Cucurbitaceae	<i>Dysaphis crataegi</i> (Kaltenbach) - Aphididae	Katsoyannos <i>et al.</i> 1997	+
<i>Dipsacus sylvestris</i> Huds. - Dipsacaceae	<i>Macrosiphum rosae</i> (L.) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Duranta repens</i> L. - Verbenaceae	cochonilha (não identificada)	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Fagus sylvatica</i> L. - Fagaceae	<i>Phyllaphis fagi</i> (L.) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Foeniculum vulgare</i> Miller - Apiaceae	<i>Aphis fabae</i> Acopoli - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Glycine max</i> (L.) - Fabaceae	<i>Aphis glycines</i> Matsumura - Aphididae	Costamagna & Landis 2007	
<i>Glycine max</i> (L.)	<i>Aphis glycines</i> Matsumura - Aphididae	Gardiner & Landis 2007	+
<i>Gossypium</i> sp. - Malvaceae	<i>Aphis gossypii</i> Glover - Aphididae	Yasuda <i>et al.</i> 2001;	
<i>Helianthus annuus</i> L. - Asteraceae	<i>Aphis fabae</i> Acopoli - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Hibiscus rosa sinensis</i> L. - Malvaceae	<i>Aphis</i> sp. - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Hibiscus rosa sinensis</i> L.	Ninfas de <i>Toxoptera</i> sp. (não identificadas) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #

Tabela VI. Continuação

<i>Hibiscus syriacus</i> L.	<i>Aphis gossypii</i> Glover - Aphididae	Yasuda & Ishikawa 1999	+
<i>Hibiscus syriidis</i> L.	<i>Aphis gossypii</i> Glover - Aphididae	Kindlmann <i>et al.</i> 2000	
<i>Hipochoeris radicata</i> L.- Asteraceae	<i>Uroleucon ambrosiae</i> (Thomas) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Hoya</i> sp. - Asclepiadaceae	<i>Aphis nerii</i> Boyer de Fonscolombe - Aphididae	Koch <i>et al.</i> 2005	
<i>Humulus lupulus</i> L. - Canabinaceae	<i>Phorodon humuli</i> (Schrank) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Juglans regia</i> L. - Juglandaceae	<i>Chromaphis juglandicola</i> (Kaltenbach) - Aphididae	Li 1992	
<i>Juniperus</i> L. sp. - Cupressaceae	<i>Cinara juniperi</i> (De Geer) - Aphididae	Saini 2004	
<i>Lactuca sativa</i> L. - Asteraceae	<i>Uroleucom sonchi</i> (L.) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Lactuca sativa</i> L.	<i>Uroleucon ambrosiae</i> (Thomas) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Lafoensia pacari</i> L. - Lythraceae	Psyllidae (não identificado)	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Lagerstroemia indica</i> L. - Lythraceae	<i>Tinocallis kahawaluokalani</i> (Kirkaldy) - Aphididae	Almeida & Silva 2002	
<i>Lagerstroemia indica</i> L.	<i>Toxoptera aurantii</i> (Boyer de Fonscolombe) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	#
<i>Lagerstroemia</i> sp.	<i>Tinocallis kahawaluokalani</i> (Kirkaldy) - Aphididae	Chapin & Brou 1991	
<i>Lathyrus odoratus</i> L. - Fabaceae	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris) - Aphididae	Mondor & Roitberg 2000	+
<i>Liriodendron tulipifera</i> L. - Magnoliaceae	<i>Illinoia liriodendri</i> (Monell) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Magnolia macrophylla</i> Michaux - Magnoliaceae	Não identificado	Tedders & Schaefer 1994	
<i>Malus</i> sp.	<i>Aphis pomi</i> DeGeer - Aphididae	Coderre <i>et al.</i> 1995	
<i>Malus</i> sp.	<i>Aphis spiraecola</i> Patch - Aphididae	Brown & Miller 1998	
<i>Malus</i> sp.	<i>Aphis spiraecola</i> Patch - Aphididae	Brown 2003	
<i>Malus</i> sp.	<i>Aphis spiraecola</i> Patch - Aphididae	Chapin & Brou 1991	
<i>Malus</i> sp. - Rosaceae	<i>Aphis pomi</i> DeGeer - Aphididae	Brown 2003	
<i>Medicago sativa</i> L. - Fabaceae	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris) - Aphididae	LaMana & Miller 1998 Saini 2004	
<i>Mentha piperita</i> L. - Lamiaceae	<i>Ovatus crataegarius</i> (Walker) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Myrciaria trunciflora</i> Berg - Myrtaceae	larvas de Curculionidae (não identificados)	Novo registro de relação tritrófica	* #
Não especificado	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris) - Aphididae	Agarwala <i>et al.</i> 2003	+
Não especificado	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris) - Aphididae	Kalaskar & Evans 2001	+
Não especificado	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris) - Aphididae	Satto & Dixon 2004	
Não especificado	<i>Aphis citricola</i> van der Goot - Aphididae	Lucas <i>et al.</i> 1997	+
Não especificado	<i>Aphis craccivora</i> Koch - Aphididae	Takizawa <i>et al.</i> 2000	+
Não especificado	<i>Aphis gossypii</i> Glover - Aphididae	Abdel-Salam & Abdel-Baky 2001	+
Não especificado	<i>Diuraphis noxia</i> (Mordvilko ex Kurdjumov) - Aphididae	Snyder & Cleverger 2004	+

Tabela VI. Continuação

Não especificado	<i>Macrosiphoniella sanborni</i> (Gilette) - Aphididae	Yasuda & Ishikawa 1999	+
Não especificado	<i>Myzus nicotianae</i> (Blackman) - Aphididae	Grill & Moore 1998	+
Não especificado	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer) - Aphididae	Soares <i>et al.</i> 2004	+
Não especificado	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer) - Aphididae	Soares & Serpa 2007	+
Não especificado	<i>Sitobion avenae</i> (Fabricius) - Aphididae	Snyder & Cleverger 2004	+
Não especificado	<i>Aphis fabae</i> Acopoli - Aphididae	Soares <i>et al.</i> 2004	+
Não especificado	<i>Aphis fabae</i> Acopoli - Aphididae	Soares & Serpa 2007	+
<i>Nasturtium</i> sp. - Brassicaceae	<i>Aphis fabae</i> Acopoli - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Pinus densiflora</i> Siebold & Zucc. - Pinaceae	<i>Matsucoccus matsumurae</i> (Kuwana) - Margarodidae	Miura <i>et al.</i> 1986; McClure 1986a e 1987	
<i>Pinus densiflora</i> Siebold & Zucc.	<i>Thecodiplosis japonensis</i> Ushida & Intuye - Cecidomyiidae	Miura <i>et al.</i> 1986; McClure 1986a e 1987	
<i>Pinus massonia</i> Lamb.	<i>Matsucoccus matsumurae</i> (Kuwana)	Chai 1999	
<i>Pinus resinosa</i> Ait.	<i>Matsucoccus resinosa</i> Bean & Goodwin - Margarodidae	McClure 1986a e 1987	
<i>Pinus</i> sp.	<i>Essigella californica</i> (Essig) - Aphididae	Novo registro alimentar	#
<i>Pinus</i> spp.	<i>Cinara atlantica</i> (Wilson) - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994; Almeida & Silva 2002	#
<i>Pinus</i> spp.	<i>Cinara pinivora</i> (Wilson) - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994; Almeida & Silva 2002	#
<i>Pinus</i> spp.	<i>Eulachnus agilis</i> (Kaltenbach) - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994; Almeida & Silva 2002	
<i>Pinus taeda</i> L.	<i>Eulachnus agilis</i> (Kaltenbach) - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994	
<i>Pinus thunbergiana</i> Franco	<i>Matsucoccus matsumurae</i> (Kuwana) - Margarodidae	Choi <i>et al.</i> 1995b; McClure 1986a e 1988	
<i>Pinus thunbergiana</i> Franco	<i>Matsucoccus thunbergiana</i> Miller & Park - Margarodidae	Choi <i>et al.</i> 1995b; McClure 1986a e 1987	
<i>Pisum sativum</i> L.	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer) - Aphididae	Burgio <i>et al.</i> 2002	+
<i>Pisum sativum</i> L. - Fabaceae	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer) - Aphididae	Lanzoni <i>et al.</i> 2004	+
<i>Podocarpus</i> sp.	<i>Neophyllaphis podocarpini</i> Carrillo - Aphididae	Novo registro alimentar	#
<i>Podocarpus</i> sp. - Podocarpaceae	<i>Neophyllaphis podocarpi</i> Takahashi - Aphididae	Tedders & Schaefer 1994	
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch - Rosaceae	<i>Mysus varians</i> Davidson - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	<i>Hyalopterus pruni</i> (Geoffrey) - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Prunus</i> sp.	<i>Hyalopterus occultus</i> Richards - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Prunus</i> sp.	<i>Hyalopterus pruni</i> (Geoffrey) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Psidium guajava</i> L. - Myrtaceae	<i>Triozoida</i> sp. - Psyllidae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Quercus rubra</i> L. - Fagaceae	<i>Myzocallus occultus</i> Richards - Aphididae	LaMana & Miller 1996	

Tabela VI. Continuação

<i>Rhamnus</i> sp. Buckthorn - Rhamnaceae	<i>Aphis glycines</i> Matsumura - Aphididae	Hesler <i>et al.</i> 2004	
<i>Rosa hybrida</i> L. - Rosaceae	<i>Macrosiphum euphorbie</i> (Thomas) - Aphididae	Snyder <i>et al.</i> 2004;	+
<i>Rosa</i> sp.	<i>Macrosiphum rosae</i> (L.) - Aphididae	LaMana & Miller 1997; Saini 2004	
<i>Rosa</i> sp.	<i>Macrosiphum rosae</i> (L.) - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Salix koriyanagi</i> Kimura - Salicaceae	<i>Tuberolachnus salignus</i> (Gmelin) - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Salix koriyanagi</i> Kimura	<i>Chaitophorus horii</i> Takashashi - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Salix sieboldiana</i> Blume	<i>Aphis farinosa yanagicola</i> Matsumura - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Salix sieboldiana</i> Blume	<i>Tuberolachnus salignus</i> (Gmelin) - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Salix</i> sp. - Salicaceae	<i>Tuberolachnus salignus</i> (Gmelin) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Sambucus sieboldiana</i> Blume - Adoxaceae	<i>Aulacorthum magnolie</i> (Essig & Kuwana) - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Sambucus sieboldiana</i> Schwer	<i>Aulacorthum magnolie</i> (Essig & Kuwana) - Aphididae	Fukunaga & Akimoto 2007	+
<i>Schefflera arboricola</i> (Hayata) Merr. - Araliaceae	<i>Aphis</i> sp. - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Solanum tuberosum</i> L. - Solanaceae	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris) - Aphididae	Snyder & Cleverger 2004	+
<i>Solidago</i> sp. - Asteraceae	<i>Uroleucon</i> spp. - Aphididae	Snyder <i>et al.</i> 2000	
<i>Sonchus oleraceus</i> L. - Asteraceae	<i>Uroleucom sonchi</i> (L.) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	<i>Aphis coreopsidis</i> (Thomas) - Aphididae	Novo registro alimentar	* #
<i>Spartium junceum</i> L. - Fabaceae	<i>Aphis craccivora</i> Koch - Aphididae	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Spirea blumei</i> G. Don - Rosaceae	<i>Aphis spiraecola</i> Patch - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Spirea douglasii</i> Hook.	Pólen e néctar	LaMana & Miller 1996	
<i>Spirea thunbergii</i> Sieb. Ex Bl.	<i>Aphis spiraecola</i> Patch - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Tabebuia</i> sp. - Bignoniaceae	Ninfas de Psyllidae (não identificadas)	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Tilia americana</i> L. - Tiliaceae	<i>Eucalypterus tiliae</i> (L.) - Aphididae	LaMana & Miller 1996	
<i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze - Fabaceae	Psyllidae (não identificado)	Novo registro de relação tritrófica	* #
<i>Triticum</i> spp. - Poaceae	<i>Macrosiphum avenae</i> (Fabricius) <i>Rhopalosiphum padi</i> (L.) - Aphididae	Nault & Kennedy 2003	
<i>Tsuga</i> spp. - Pinaceae	<i>Adelges tsugae</i> Annand - Adelgidae	Wallace & Hain 2000	
<i>Typha angustifolia</i> - Thyphaceae	<i>Schizaphis acori</i> (Shinji) - Aphididae	Osawa 2000	
<i>Ulmus americana</i> L. - Ulmaceae	<i>Tinocallis ulmifolii</i> (Monell)- Aphididae	Hesler 2003	
<i>Vicia faba</i> L. - Fabaceae	<i>Aphis fabae</i> Acopoli - Aphididae	Katsoyannos <i>et al.</i> 1997	+
<i>Vicia faba</i> L.	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris) - Aphididae	Harmon <i>et al.</i> 1998 Kagata & Katayama 2006 Mondor & Roitberg 2000	+

Tabela VI. Continuação

<i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maxim. - Rutaceae	<i>Phenacoccus azaleae</i> Kuwana - Pseudococcidae	Xie <i>et al.</i> 2004
<i>Zea mays</i> L. - Poaceae	<i>Rhopalosiphum padi</i> (L.) - Aphididae	Nault & Kennedy 2003
<i>Zea mays</i> L.	<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch) - Aphididae	Musser & Shelton 2003
<i>Zea mays</i> L. var. Jubilee	<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch) - Aphididae	Hoogendoorn & Heimpel 2004 +

#### 4.4. Número de gerações de *H. axyridis* encontradas em um ano de observação em Curitiba

Em relação ao número de gerações em um ano, em Curitiba, *H. axyridis* mostrou-se multivoltina, pois todas as suas fases de vida foram encontradas em todo o período (2006-2007). Isso provavelmente deve-se ao clima da região, onde não ocorrem invernos rigorosos como no Hemisfério Norte e as temperaturas encontram-se numa faixa em que seu desenvolvimento é promovido. Desde a data da detecção em Curitiba (Almeida & Silva 2002) verificou-se em coletas não sistematizadas a presença das diferentes fases de desenvolvimento de *H. axyridis* no campo (dados não publicados).

LaMana e Miller (1996) relatam para o estado do Oregon, Estados Unidos, duas gerações por ano. *H. axyridis* também é bivoltina no sudoeste da França (Antibes) (Ongagna *et al.* 1993). Em Atenas (Grécia) este coccinelídeo teve quatro gerações por ano em avaliações feitas entre 1994 e 1995 (Katsoyannos *et al.* 1997) e no Japão, região nativa, de duas a três gerações (Osawa 1993).

A cidade de Curitiba caracteriza-se por possuir clima temperado, o que poderia prejudicar a reprodução de *H. axyridis*, já que em T MED abaixo de 12°C esta espécie não se reproduz (Ongagna *et al.* 1993). Provavelmente o número de gerações de *H. axyridis* pode ser maior nas regiões do Brasil onde as temperaturas são mais amenas no inverno.

#### 4.5. Ocorrência das espécies de Coccinellidae nativas ou estabelecidas, antes e após a introdução de *H. axyridis* no Brasil

Avaliação da fauna de Coccinellidae realizada entre 1999 e 2002 no Capão do Tigre serviu como base para os dados de comparação de ocorrência e abundância das espécies nesta área, e ainda para analisar as possíveis interferências na fauna local geradas pela introdução de *H. axyridis*. Neste período foram coletadas as seguintes espécies: *C. pulchella*, *C. sanguinea*, *C. coeruleus*, *Eriopsis connexa* (Germar, 1824), *H. axyridis*, *H. convergens*, *Hyperaspis festiva* Mulsant, 1850, *Scymnus sp.*, *O. v-nigrum*, *Psyllobora gratiosa* Mader, 1958 e *Rodolia cardinalis* (Mulsant, 1850) (dados não publicados).

Antes da introdução de *H. axyridis* (1999-2000), foram registradas nove espécies de Coccinellidae, sendo capturados 539 exemplares das seguintes espécies: *C. sanguinea* (58%); *H. convergens* (20,59%); *Scymnus sp.* (9,65%); *P. gratiosa* (4,82%); *E. connexa* (2,97%); *C. pulchella* (1,85%); *O. v-nigrum* (1,48%); *H. festiva* (0,18%); *R. cardinalis* (0,37%). Já entre 2001 e 2002, 586 exemplares de oito espécies foram coletadas sendo *C. sanguinea* novamente a espécie dominante (84,98%), seguida por *H. axyridis* (10,24%); *O. v-nigrum* (1,71%); *H. convergens* (10,24%), *E. connexa* (0,85%); *C. coeruleus* (0,68%); *Scymnus sp.* (0,34%) e *C. ocelligera* (0,17%) (Tabela VII). Neste último ano registrou-se a presença de *H. axyridis*.

Entre 2006 e 2007, 1038 espécimes de Coccinellidae, de oito espécies, foram coletados. De um total de 13 espécies capturadas no Capão do Tigre entre 1999 e 2007, cinco (*P. gratiosa*, *E. connexa*, *R. cardinalis*, *H. festiva* e *C. ocelligera*) não estão mais sendo coletadas. Apenas uma espécie, *C. citricola*, foi encontrada pela primeira vez após o registro de *H. axyridis*.

Algumas espécies possuem uma probabilidade maior de se encontrar e interagir que outras, pois pode existir uma sobreposição entre os habitats preferidos entre elas (Dixon 2000). Acredita-se que as espécies *C. citricola* e *O. v-nigrum* não estão sendo influenciadas diretamente por *H. axyridis*, provavelmente por se alimentarem de coccídeos (Silva *et al.* 2005) e psilídeos, respectivamente, que são fontes secundárias de alimento utilizadas por *H. axyridis*. Por se alimentarem de presas diferentes, estas espécies e *H. axyridis* podem ocupar habitats diferentes na planta.

Tabela VII. Relação entre as espécies e o número de espécimes de Coccinellidae em diferentes períodos de coletas: 1999-2002 e 2006-2007, no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná.

Espécies de Coccinellidae	set.99 - set.00	Freq. Rel.	set.01 - ago.02	Freq. Rel.	out.06 - set.07	Freq. Rel.
<i>Harmonia axyridis</i>	0		60	10,24%	947	91,23%
<i>Olla v-nigrum</i>	8	1,48%	10	1,71%	32	3,08%
<i>Cycloneda sanguinea</i>	313	58,07%	498	84,98%	21	2,02%
<i>Coccidophilus citricola</i>	0		0		19	1,83%
<i>Scymnus sp.</i>	52	9,65%	2	0,34%	10	0,96%
<i>Hippodamia convergens</i>	111	20,59%	6	1,02%	5	0,48%
<i>Cycloneda pulchella</i>	10	1,85%	0		3	0,29%
<i>Curinus coeruleus</i>	0		4	0,68%	1	0,09%
<i>Psyllobora gratiosa</i>	26	4,82%	0		0	
<i>Eriopis connexa</i>	16	2,97%	5	0,85%	0	
<i>Rodolia cardinalis</i>	2	0,37%	0		0	
<i>Hyperaspis festiva</i>	1	0,18%	0		0	
<i>Coccinella ocelligera</i>	0		1	0,17%	0	
Total	539	99,98%	586	99,99%	1038	99,98%

#### 4.6. Predação intraguilda e aspectos gerais de introdução de *H. axyridis*

Alguns autores têm indicado os impactos negativos da introdução de espécies exóticas, como por exemplo, a supressão competitiva ou o desalojamento do inimigo natural nativo ou ainda a extinção de espécies predadoras, potencialmente benéficas, ainda não utilizadas para essa finalidade (Elliot *et al.* 1996). A disponibilidade de recursos e fatores espaciais e temporais, causando efeitos de sobreposição de habitat entre as espécies, pode determinar a incidência de predação intraguilda (Cottrell 2005). Este tipo de predação (Intraguild Predation – IGP) pode ser definido como “uma associação de espécies competidoras que matam e predam para se alimentar e se utilizam dos mesmos recursos”. Essa interação predador-predador pode reduzir a eficácia do controle biológico (Rosenheim *et al.* 1995). Tem-se observado que *H. axyridis* é um predador eficiente na guilda de insetos afidófagos, pois além de utilizar de maneira eficiente os recursos alimentares disponíveis, competindo pelo alimento com outras espécies afidófagas, pode também preda essas espécies na ausência de sua presa preferencial.

Cottrell (2005) ressaltou que *H. axyridis* pode gerar um efeito potencialmente prejudicial de predação intraguilda sobre as espécies nativas, sendo a predação de ovos um dos meios pelo qual esta espécie pode impactar os coccinelídeos nativos. Em seus



experimentos laboratoriais de predação de ovos, este autor evidenciou que as espécies nativas, *O. v-nigrum* e *C. maculata*, são mais susceptíveis a sofrerem predação total se ovos estão em contato com coccinelídeos adultos exóticos e nativos e, por outro lado, ovos de *H. axyridis* são mais susceptíveis ao canibalismo.

No Japão, Yasuda *et al.* (2001) relataram que 80% das larvas de *C. septempunctata* eram consumidas por larvas de quarto instar de *H. axyridis* enquanto que o oposto era raro. Segundo estes autores, as larvas de *H. axyridis* possuem pêlos rígidos e uma estrutura de sucção que contribuem para o escape desta espécie quando do ataque dos predadores.

Segundo Dixon (2000), para cada habitat existe uma espécie dominante e para esta espécie a maior ameaça será o canibalismo. A dinâmica populacional de *H. axyridis* é influenciada por diversos fatores, dentre os quais o canibalismo nos seus diversos estágios de desenvolvimento (Osawa 1993), que parece ser inversamente proporcional à densidade de presas disponíveis (Burgio *et al.* 2002; Hironori & Katsuhiko 1997) e adaptativo, pois aumenta a chance de sobrevivência (Burgio *et al.* 2002). Em diferentes graus os coccinelídeos são protegidos contra a predação interespecífica (Burgio *et al.* 2002). Outros importantes reguladores dessas populações são os parasitóides das famílias Braconidae (Hymenoptera), Phoridae e Tachinidae (Diptera) e os predadores das famílias Pentatomidae (Hemiptera), Formicidae (Hymenoptera), além de aranhas e pássaros (Koch 2003).

A predação intraguilda e o canibalismo são significantes e muito praticados pelos muitos taxa predadores de artrópodes (Yasuda *et al.* 2001). No entanto, a predação intraguilda não é a única maneira de um inimigo natural exótico competir com as espécies nativas. Outros fatores, como a polifagia, o potencial predador e outras características biológicas estão envolvidos. Estes fatores determinam o potencial predador de um coccinelídeo em um ecossistema agrícola e, por essas razões, é difícil prever os efeitos de espécies introduzidas para o controle biológico em populações de coccinelídeos nativos (Burgio *et al.* 2002).

Alguns estudos indicam que *H. axyridis* não demonstra IGP contra *Adalia bipunctata* (L., 1758) em níveis muito mais altos do que o seu próprio canibalismo (Burgio *et al.* 2002). Por outro lado, o IGP não é o único fator relacionado à diminuição das populações das espécies nativas onde espécies exóticas estão presentes. Evans (2000) sugere que o desalojamento das espécies predadoras nativas, em plantações de alfafa, em Utah, nos Estados Unidos, pela espécie exótica *C. septempunctata*,

provavelmente ocorre devido a uma troca de habitat das espécies nativas. Isso teria ocorrido devido à espécie exótica consumir e causar a diminuição do alimento disponível nas plantações de alfafa. Segundo este autor, as espécies nativas voltaram a ser coletadas com o aumento no número de afídeos disponíveis no campo, entretanto, com a diminuição do recurso alimentar pela presença de *C. septempunctata*, as espécies nativas voltaram a se deslocar para outras regiões, enquanto que *C. septempunctata* permaneceu em grandes quantidades, mesmo quando a densidade de afídeos disponível era baixa.

Além do aumento da taxa de canibalismo e predação intraguildda quando a presa comum está escassa (Dixon 2000), a substituição da alimentação de afídeos por produtos originários da plantas, como néctar e pólen, pode ser uma fonte alternativa de alimento por um tempo, reduzindo a mortalidade e mantendo a população do coccinelídeo abundante mesmo sem a presa (Hodek & Honek 1996). Isto também pode ter ocorrido no Capão do Tigre onde *H. axyridis* poderia estar se alimentando de fontes alternativas, como o pólen e néctar, na falta de afídeos disponíveis, uma vez que *H. axyridis* foi encontrada em várias plantas hospedeiras, mas sem a presença de presas (Tabela V.) Já as espécies nativas, sem esta variedade alimentar podem ter se deslocado para outras áreas do capão ou proximidades em busca de alimento.

Saini (2004) estudando a abundância das espécies predadoras do afídeo *Monellia caryella* (Fitch, 1855) em pecan, na Argentina, verificou que *H. axyridis* representou 51% e *C. sanguinea* 20% (ano 2001-2002); 67% e 15% (ano 2002-2003) e 74% e 13% (ano 2003-2004), respectivamente, enquanto que *O. v-nigrum*, *E. connexa*, *Coccinella quadrifasciata* (Schoenherr, 1808) e *A. bipunctata* foram menos representativas. No presente estudo, antes da detecção de *H. axyridis* (1999-2000) as espécies de Coccinellidae que predominaram foram *C. sanguinea* (58,07%), *H. convergens* (20,59%) e *Scymnus* sp. (9,65%); no período de 2001-2002, *C. sanguinea* ocorreu com um porcentual de 84,98% e *H. axyridis* com 10,24%; em 2006-2007 a espécie que predominou foi *H. axyridis* com 91,23% e *C. sanguinea* obteve apenas 2,02%.

Aparentemente tanto no Brasil quanto na Argentina, *H. axyridis* vem deslocando as espécies nativas e causando a redução de suas populações, especialmente de *C. sanguinea*, que é cosmopolita e reconhecida como a principal espécie de Coccinellidae com potencial para o controle biológico de afídeos no Brasil (Araújo-Siqueira & Almeida 2006). Outras espécies de coccinelídeos que exploraram a mesma fonte alimentar podem estar competindo diretamente com *H. axyridis*, como: *H. convergens*,

que também é predadora de afídeos e já foi utilizada em programas de controle biológico na agricultura e em jardins (Bjornson 2008); *C. coeruleus* que é uma espécie neotropical que, apesar de preferir alimentar-se de coccídeos, também pode ser encontrada alimentando-se em colônias de afídeos e de psílido do citros (Michaud *et al.* 2002). Outros estudos nos Estados Unidos ressaltam a diminuição da abundância de espécies de coccinélidos nativos ou estabelecidos em função da presença de *H. axyridis* (Colunga-Garcia & Gage 1998; Michaud 2002b).

Os fatores chave no processo de invasão de uma espécie são o crescimento e o desenvolvimento dos imaturos para o estágio adulto e a sobrevivência dos adultos (Marco *et al.* 2002). No entanto, para avaliar o risco de introdução de espécies exóticas utilizando controle biológico inundativo, especialmente para predadores polípagos como *H. axyridis*, a tabela de vida deve ser integrada com outras informações como a capacidade de estabelecimento, habilidades de dispersão, variedade de hospedeiros e efeitos diretos e indiretos em insetos não alvos (Van Lenteren *et al.* 2003). Van Lenteren *et al.* (2008) concluíram a partir deste tipo de estudo que *H. axyridis* oferece um grande risco para as espécies nativas, que não existem meios fáceis e confiáveis de se conter ou diminuir a liberação desta espécie e que, portanto, não deveria ser liberada como agente de controle no noroeste da Europa.

Brown *et al.* (2008) também baseado nos estudos de Van Lenteren *et al.* (2003) destaca que *H. axyridis* alcançou o segundo maior índice de risco, em uma pesquisa para inventariar 31 espécies exóticas utilizadas em controle biológico na Europa. Soares & Serpa (2007) salientam que a presença de *H. axyridis* poderia ameaçar a abundância da população de *Coccinella undecimpunctata* L. 1758 ou induzir o deslocamento dessa espécie nativa no ecossistema do arquipélago de Açores, Portugal.

*Harmonia axyridis* possui algumas características que podem explicar o sucesso do seu estabelecimento como espécie invasora. É um predador efetivo, em função do seu grande tamanho e por isso possui maior taxa de consumo, capaz de reduzir a abundância de afídeos, além da atitude agressiva que contribui para o deslocamento de outras espécies de coccinélidos e para sua dominância dentro deste grupo de insetos (Yasuda *et al.* 2001). Além disso, esta espécie é quimicamente protegida contra a predação das espécies afidófagas norte americanas de Coccinellidae (Sato & Dixon 2004), possui alta taxa de fecundidade (Iablokoff-Khnzorian 1982) e rápido desenvolvimento das fases imaturas, em relação às espécies nativas (Lanzoni *et al.* 2004).

Majerus *et al.* (2006) relatou que o possível sucesso do estabelecimento de *H. axyridis* na Inglaterra, ocorreu em função da capacidade de se dispersar rapidamente para novos ambientes, colonizando grande variedade de habitats e adaptando-se fenotipicamente a estas novas condições, além de ser um predador generalista voraz que domina em interações agressivas de predação intraguilda. Segundo (Osawa 2000), *H. axyridis* possui alta mobilidade que lhe permite agilidade para refugiar em situações desfavoráveis e na procura por alimentos, além da baixa susceptibilidade a patógenos (Hoogendoorn & Heimpel 2004).

A estratégia de busca é outro fator que pode determinar o sucesso de um predador, em relação à resposta funcional (Osawa 2000). Nesse aspecto supõe-se que uma espécie invasora deve possuir melhores estratégias de busca que resultam em uma maior eficiência de predação em relação às espécies nativas (Kimberling 2004).

Soares *et al.* (2008), hipotetizaram que *H. axyridis* possuiria vários atributos biológicos tais como: características morfológicas, fisiológicas e comportamentais que permitiram a espécie ser bem sucedida em qualquer novo ambiente. Além disso, estes autores enfatizam que o sucesso de *H. axyridis* também estaria relacionado à atividade humana, pois sua introdução foi intencional em muitos países. Outro ponto a ser considerado pelos autores é o grande número de estudos relacionados a esta espécie e o escasso conhecimento sobre o potencial de invasão de outras espécies afidófagas de Coccinellidae.

Historicamente, a maioria dos pesquisadores considera o processo de controle biológico como eficiente, de baixo custo e ambientalmente seguro para o uso no controle de pragas (De Bach & Rosen 1991). Existem vários casos relatados do uso bem sucedido no controle biológico por *H. axyridis* em culturas como: pecan (Teddars & Schaefer 1994), morangos (Sun *et al.* 1996) e rosas (Ferran *et al.* 1996). Nos Estados Unidos, *H. axyridis* tornou-se espécie dominante em plantações de maçã, substituindo e/ou deslocando *C. septempunctata*, apresentando melhores resultados no controle biológico de afídeos, naquela cultura (Brown & Miller 1998). Contudo, a introdução de inimigos naturais não nativos pode trazer impactos negativos (Howarth 1991).

Atualmente sabe-se que invasões biológicas causam grandes impactos ao ambiente e se tornam a segunda causa da perda de biodiversidade (Pimentel *et al.* 2000). A falta de dieta específica, no caso de *H. axyridis*, pode trazer efeitos negativos pela predação de insetos nativos benéficos. Além disso, recentemente nos Estados Unidos, *H. axyridis* tem sido registrada atacando frutíferas, como maçãs, pêras e uvas. Nas

vinícolas os insetos se agrupam nos cachos de uvas causando problemas na produção do vinho em função da alteração do sabor pela presença de alcalóides (Koch *et al.* 2004). Em períodos mais frios esta espécie tem invadido casas e prédios a procura de abrigo podendo ainda pousar em alimentos e bebidas (Knodel & Hoebeke 1996) e, em algumas pessoas, o contato direto, tem causado reações alérgicas e provocado sintomas como rinite, conjutivite, tosse crônica e asma (Yarbrough *et al.* 1999).

Koch *et al.* (2006) discutindo a introdução de *H. axyridis* na América do Sul, sugere que devido à similaridade climática com a região nativa, é possível o estabelecimento desta espécie, no continente sul-americano. Da mesma forma, em função dos mesmos tipos de biomas, grandes áreas podem vir a se tornar habitats adequados. Além disso, a disponibilidade da presa não deve ser um fator limitante para o estabelecimento de *H. axyridis* nesta região, pois possui a capacidade de se disseminar pelo vôo e também por meios associados às atividades do homem.

Na Europa, *H. axyridis* já foi coletada em diversos países, introduzida intencionalmente ou não: Áustria, Belarus, Bélgica, República Tcheca, Dinamarca, França, Alemanha, Grécia Holanda, Itália, Liechtenstein, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Espanha, Suécia e Suíça (Soares *et al.* 2008). Brown *et al.* (2008) prevêem que a dispersão de *H. axyridis* pela Europa continue principalmente ao norte e a leste.

Segundo o modelo “Climex” de distribuição, *H. axyridis* possui o potencial de se estabelecer em diversos países da América Latina. São citados como locais de possível ocupação, além no Brasil e da Argentina, o Paraguai, Uruguai, Chile, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (Poutsma *et al.* 2008).

Características consideradas vantajosas no controle biológico, como a capacidade de replicação própria, aumento rápido e alta dispersão, são também características que aumentam a probabilidade de efeitos ecológicos não esperados. Após a proliferação das espécies exóticas, surge uma pressão para controlá-las, aumentando a necessidade de se entender os efeitos ecológicos do controle biológico. Existe, portanto, uma necessidade real de aumentar a atenção científica para a medição e previsão dos impactos em espécies alvo e não alvo (Louda *et al.* 2003). Uma atenção especial deve ser tomada em relação aos efeitos negativos de agentes de controle biológicos introduzidos nas espécies nativas (Soares *et al.* 2008).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No Brasil, até o momento, *Harmonia axyridis* foi encontrada em 39 espécies de plantas, das quais 20 são registros novos, alimentando-se de 20 espécies de afídeos, dos quais oito são registrados pela primeira vez.

- Oito espécies de Coccinellidae foram coletadas no Capão do Tigre, de outubro de 2006 a setembro de 2007, sendo *H. axyridis* a mais abundante (91,23%).

- *H. axyridis* teve seu pico de abundância populacional no final de agosto e começo de setembro de 2007.

- Desde 1999 até 2007 ocorreram redução e variação na diversidade de espécies de Coccinellidae coletadas no Capão do Tigre, Curitiba, Paraná, com a predominância de *H. axyridis*, indicando um possível desalojamento das espécies nativas e/ou já estabelecidas.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abdel-Salam A. H. & N. F. Abedl-Baky. 2001. Life table and biological studies of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) reared on the grain moth eggs of *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera, Gelechiidae). **Journal of Applied Entomology**. 125:455-462.
- Adriaens, T., E. Branquart & D. Maes. 2003. The Multicoloured Asian Ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium? **Belgium Journal of Zoology**. 133(2):195-196.
- Agarwala, B. K., H. Yasuda & Y. Kajita. 2003. Efecte of conspecific and heterospecific on foraging and oviposition of two predatory ladybirds: role of fecal cues in predator avoidance. **Journal of Chemical Ecology**. 29(2):357-376.
- Almeida, L. M & V. B. Silva. 2002. Primeiro registro de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): um coccinelídeo originário da região Paleártica. **Revista Brasileira de Zoologia**. 19(3):941-944.
- Araújo-Siqueira, M. & L. M. Almeida. 2006. Estudo das espécies brasileiras de *Cycloneda* Crotch (Coleoptera, Coccinellidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 23(2):550-568.
- Arioli, M. C. S. 1985. Coccinellini no Rio Grande do Sul, Brasil (Coleoptera, Coccinellidae). **Revista do Centro de Ciências Rurais**. 15(1):5-35.

- Arioli, M. C. S. & D. Link. 1987. Ocorrência de joaninhas em pomares cítricos na região de Santa Maria, RS. **Revista Centro de Ciências Rurais**. 17(3):213-222.
- Bjornson, J. 2008. Natural enemies of the convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville: Their inadvertent importation and potential significance for augmentative biological control. **Biological Control**. 53(1). doi:10.1016/j.biocontrol.2007.10.001. Online.
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop. 1994. **Aphids on the world's trees: an identification and information guide**. Wallingford: CAB International/Natural History Museum, 1994. 987p.
- Brown, M. W. 2003. Intraguild responses of aphid predators on apple to the invasion of an exotic species, *Harmonia axyridis*. **BioControl**. 48:141-153.
- Brown, M. W. & S. S. Miller. 1998. Coccinellidae (Coleoptera) in apple orchards of eastern West Virginia and the impact of invasion by *Harmonia axyridis*. **Entomological News**. 109:136-142.
- Brown, P. M. J., T. Adriaens, H. Bathon, J. Cuppen, A. Goldarazena, T. Hägg, M. Kenis, B. E. M. Klausnitzer, I. Kovář, A. J. M. Loomans, M. E. N. Majerus, O. Nedved, J. Pedersen, W. Rabitsch, H. E. Roy, V. Ternois, I. A. Zakharov & D. B. Roy. 2008. *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. **BioControl**. 53(1). doi:10.1007/s10526-007-9132-y. Online.
- Burgio, G., F. Santi & S. Maini. 2002. On intra-guild predation and cannibalism in *Harmonia axyridis* (Pallas) and *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). **Biological Control**. 24:110-116.
- Cardoso, J. T. 2001. **Biologia e capacidade de consumo de insetos predadores do pulgão-do-pinus *Cinara* spp. (Homoptera, Aphididae)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal do Paraná. 55p.
- Chapin, J. B. & V. A. Brou. 1991. *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**. 93(3):630-635.
- Coderre, D., É. Lucas & I. Gagné. 1995. The occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in Canada. **Canadian Entomologist**. 127:609-611.

- Colunga-Garcia, M & S. Gage. 1998. Arrival, establishment, and habitat use of the multicolored Asian ladybeetle (Coleoptera: Coccinellidae) in a Michigan landscape. **Environmental Entomology**. 27:1574–1580.
- Costamagna, A. C. & D. A. Landis. 2007. Quantifying predation on soybean aphid through direct field observations. **Biological Control**. 42(1):16-24.
- Cottrell, T. E. 2005. Predation and cannibalism of lady beetle eggs by adult lady beetles. **Biological Control**. 34:159–164.
- De Bach, P. & D. Rosen. 1991. Biological Control by Natural Enemies. **Cambridge University Press**, 440p.
- Dixon, A. F. G. 2000. **Insect predator – prey dynamics**. Ladybirds Beetles & Biological Control. Cambridge University Press, 257p.
- Elliot, N., R. Kieckhefer & W. Kauffman. 1996. Effects of an invading coccinellid on native coccinellids in an agricultural landscape. **Oecologia**. 105: 537-544.
- Evans, E. W. 2000. Habitat displacement of North American ladybirds by an introduced species. **Ecology**. 85(3):637-647.
- Ferran, A., H. Niknam, F. Kabiri, J. L. Picart, G. Iperti & L. Lapchin. 1996. The use of *Harmonia axyridis* larvae (Coleoptera: Coccinellidae) against *Macrosiphum rosae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) on rose bushes. **European Journal of Entomology**. 93:59-67.
- Fukunaga, Y. & S-I. Akimoto. 2007. Toxicity of the aphid *Aulacorthum magnolie* to the predator *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) and genetic variance in the assimilation of the toxic aphids in *H. axyridis* larvae. **Entomological Science**. 10:45-53.
- Ganho, N. G. & R. C. Marinoni. 2005. A diversidade inventarial de Coleoptera (Insecta) em uma paisagem antropizada do Bioma Araucária. **Revista Brasileira de Entomologia**. 49:535–543.
- Gardiner, M. M. & D. A. Landis. 2007. Impact of intraguild predation by adult *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) on *Aphis glycines* (Hemiptera, Aphididae) biological control in cage studies. **Biological Control**. 40:386-395.
- Gil, L., A. Ferran, J. Gambier, S. Pichat, R. Boll & M. Salles. 2004. Dispersion of flightless adults of the Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*, in greenhouses containing cucumbers infested with the aphid *Aphis gossypii*: effect of the presence of conspecific larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 112:1-6.



- Google Earth. Disponível em: (<http://earth.google.com/intl/pt/>). Acessado em: julho de 2007.
- González, G. 2006. **Los Coccinellidae de Chile** [online]. Disponível em: (<http://www.coccinellidae.cl/>). Acessado em: 07 de dezembro de 2007.
- González, G. & N. Vandenberg. 2007. **Los Coccinellidae de Perú** [online]. Disponível em: (<http://www.coccinellidae.cl/paginasWebPeru>). Acessado em: 07 de dezembro de 2007.
- Gordon, R.D. 1985. The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. **Journal of New York Entomology Society**. 93:1-912.
- Grill, C. P. & A. J. Moore. 1998. Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. **Oecologia**. 114: 274-282.
- Hagen, K. S. 1962. Biology and ecology of predaceous Coccinellidae. **Annual Review of Entomology**. 7:289-326.
- Harmon, J. P., J. E. Losey & A. R. Ives. 1998. The role of vision and color in the close proximity foraging behavior of four coccinellid species. **Oecologia**. 115:287-292.
- Hironori, Y. & S. Katsuhiko. 1997. Cannibalism and interspecific predation in two predatory ladybirds in relation to prey abundance in the field. **Entomophaga**. 42: 153-163.
- Hodek, I. & A. Honek. 1996. **Ecology of Coccinellidae**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 464p.
- Hoogendoorn, M. & G. E. Heimpel. 2004. Competitive interactions between an exotic and a native ladybeetle: a field cage study. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 111:19-28.
- Howart, F. G. 1991. Environmental impacts of classical biological control. **Annual Review of Entomology**. 36:485-509.
- Iablokoff-Khinzorian, S. M. 1982. **Les coccinelles, Coléoptères-Coccinellidae**. Société Nouvelle des Éditions Boubée, Paris, 568 pp.
- Iperti, G. & E. Bertand. 2001. Hibernation of *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) in South-Eastern France. **Acta Societas Zoologicae Bohemicae**. 65: 207-210.
- Kagata, H. & N. Katayama. 2006. Does nitrogen limitation promote intraguilda predation in an aphidophagous ladybird? **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 119:239-246.

- Kalaskar, A. & E. W. Evans. 2001. Larval responses of aphidophagous lady beetle (Coleoptera, Coccinellidae) to weevil larvae versus aphids as prey. **Annals of the Entomological Society of America**. 94:76-81.
- Kawauchi, S. 1979. Effects of temperatures on the aphidophagous Coccinellids. **Kurume University Journal**. 28:47-52.
- Katsoyannos P., D. C. Kontodimas, G. J. Stathas & C. T. Tsartsalis. 1997. Establishment of *Harmonia axyridis* on citrus and some data on its phenology in Greece. **Phytoparasitica**. 25:183-191.
- Kimberling, D. N. 2004. Lessons from history: predicting successes and risks of intentional introductions for arthropod biological control. **Biological Invasion**. 6: 310-318.
- Kindlmann, P., H. Yasuda, S. Sato & K Shinya. 2000. Key life stages of two predatory ladybird species (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**. 97:495-499.
- Kingler, J., G. Powell, G. A. Thompson & R. Isaacs. 1998. Phloem specific aphid resistance in *Cucumis melo* line AR5 effects on feeding behaviour and performance of *Aphis gossypii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 86:79-88.
- Klausnitzer, B. 2002. *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) in Deutschland (Coleoptera, Coccinellidae). **Entomologische Nachrichten und Berichte**. 46:177-183.
- Knodel, J. J. & R. E. Hoebeke. 1996. **Multicolored Asian Lady Beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas), Coleoptera: Coccinellidae**. Cornell University. (<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/predators/harmonia.html>)  
Acessado em: 13 de junho de 2007.
- Koch, R. L. 2003. The multicolored Asian beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. **Journal of Insect Science**. 32(3):1-16.
- Koch, R. L., E. C. Burkness, S. J. Burkness & W. D. Hutchison. 2004. Phytophagous Preferences of the Multicolored Asian Lady Beetle (Coleoptera, Coccinellidae) for Autumn-Ripening Fruit. **Journal of Economic Entomology**. 97: 539-544.
- Koch, R. L., R. C. Venette & W. D. Hutchinson. 2006. Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) in the Western Hemisphere: Implications for South America. **Neotropical Entomology**. 35(4):421-434.
- Komai, T. 1956. Genetics of ladybeetles. **Advances in Genetics**. 8:155-189.

- Kuroda, T. & K. Miura. 2003. Comparison of the effectiveness of two methods for releasing *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) against *Aphis gossypii* Glover (Homoptera, Aphididae) on cucumbers in a greenhouse. **Applied Entomology and Zoology**. 38(2):271-274.
- LaMana, M. L & J. C. Miller. 1996. Field observations on *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in Oregon. **Biological Control**. 6:232-237.
- Lanzoni, A., G. Accinelli, G. G. Bazzocchi & G. Brugio. 2004. Biological traits and life table of the exotic *Harmonia axyridis* compared with *Hippodamia varegata*, and *Adalia bipunctata* (Coleoptera, Coccinellidae). **Journal of Applied Entomology**. 128:298-306.
- Lee, J-H. & T-J. Kang. 2004. Functional response of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) to *Aphis gossypii* Glover (Homoptera, Aphididae) in the laboratory. **Biological Control**. 31:306-310.
- Leite, G. L. D., M. Picanço; J. C. Zanuncio & M. R. Gusmão. 2007. Factors affecting colonization and abundance of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera, Aphididae) on okra plantations. **Ciência e Agrotecnologia**. 31(2):337-343.
- Louda, S. M., R. W. Pemberton, M. T. Johnson & P. A. Follett. 2003. Nontarget effects: The Achille's Heel of biological control? Retrospective Analyses to Reduce Risk Associated with Biocontrol Introductions. **Annual Review of Entomology**. 48:365-396.
- Lucas, E., D. Coderre & C. Vincent. 1997. Voracity and feeding preferences of two aphidophagous coccinellids on *Aphis citricola* and *Tetranychus urticae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 85:151-159.
- Maack, R. 1981. **Geografia Física do Paraná**. 2 ed. Rio de Janeiro: J. Olympio. Secretaria da Cultura e do Esporte do Governo do Estado do Paraná. 450p.
- Majerus, M., V. Strawson & H. Roy. 2006. The potential impacts of the arrival of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae), in Britain. **Ecological Entomology**. 31:207-215.
- Marco, D. E., S. A. Paez, S.A Cannas. 2002. Species invasiveness in biological invasions: a modeling approach. **Biological Invasion**. 4:193-205.
- Michaud, J. P. 1999. Sources of mortality in colonies of brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. **BioControl**. 44:347-367.
- Michaud, J. P. 2000. Development and Reproduction of Ladybeetles (Coleoptera: Coccinellidae) on the Citrus Aphids *Aphis spiraecola* Patch and *Toxoptera*

- citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Biological Control**. 18(3):287-297.
- Michaud, J. P. 2001. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera, Coccinellidae) to infestations of asian citrus psyllid, (Hemiptera, Psyllidae) in Florida. **Florida Entomologist**. 84:608-612.
- Michaud, J. P. 2002a. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera, Psyllidae) in Florida: a preliminary report. **Entomological News**. 113(3): 216-222.
- Michaud, J. P. 2002b. Invasion of the Florida citrus ecosystem by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and asymmetric competition with a native species, *Cycloneda sanguinea*. **Environmental Entomology**. 31:827-835.
- Michaud, J. P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in Central Florida. **Biological Control**. 29:260-269.
- Michaud, J. P., C. W. McCoy & S. H. Futch. 2002. **Ladybeetles as Biological Control Agents in Citrus**. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponível em: (<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/HS/HS13800.pdf>). Acessado em: 12 de dezembro de 2007.
- Mills, N. J. 1981. Essential and alternative foods for some British Coccinellidae (Coleoptera). **Entomologists Gazette**. 32:197-202.
- Mondor, E. B. & B. D. Roitberg. 2000. Has the attraction of predatory coccinellids to cornicle droplets constrained aphid alarm signaling behavior? **Journal of Insect Behavior**. 13(3):321-329.
- Musser, F. R. & A. M. Shelton. 2003. Bt sweet corn and selective insecticides: impacts on pests and predators. **Journal of Economic Entomology**. 96:71-80.
- Nault, B. A. & G. G. Kennedy. 2003. Establishment of multicolored Asian lady beetle in Eastern North Carolina: Seasonal abundance and crop exploitation within an agricultural landscape. **BioControl**. 48:363-378.
- Neupane F. P., M. D. Sharma & K. R. Neupane. 2006. Incidence of Insect Pests on Chayote, *Sechium edule* (Swartz.) in Nepal. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**. 27:161-164.
- Ongagna, P., L. Giuge, G. Iperti & A. Ferran. 1993. Cycle de développement d'*harmonia axyridis* (Col. Coccinellidae) dans son aire d'introduction le sud-est de la France. **Entomophaga**. 38(1):125-128.

- Osawa, N. 1993. Population field studies of the aphidophagous ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): life tables and key factor analysis. **Researches on Population Ecology**. 35:335-348.
- Osawa, N. 2000. Population field studies on the aphidophagous ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae): resource tracking and population characteristics. **Population Ecology**. 42:115-127.
- Peronti, A. L. B. G. & C. R. Souza-Silva. 2002. Aphids (Hemiptera: Aphidoidea) of ornamental plants from São Carlos, São Paulo state, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**. 50:137-144.
- Pimentel, D., L. Lach, R. Zuniga & D. Morrison. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. **Bioscience**. 50:53-65.
- Poutsma, J., A. J. M. Loomans, B. Aukema & T. Heijerman. 2008. Predicting the potential geographical distribution of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, using the Climex model. **BioControl**. 53(1). doi:10.1007/s10526-007-9140-y. Online.
- Rosenheim, J. A, H. K. Kaya, L. E. Ehler, J. J. Marois & B.A. Jaffee. 1995. Intraguild predation among biological-control agents: theory and evidence. **Biological Control**. 5:303–335.
- Saini, E. D. 2004. Presencia de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) en la provincia de Buenos Aires. Aspectos Biológicos y Morfológicos. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**. 33(1):151-160.
- Sato, S. & A. F. G. Dixon. 2004. Effect of intraguild predation on the survival and development of three species of aphidophagous ladybirds: consequences for invasive species. **Agricultural and Forest Entomology**. 6:21-24.
- Silva, R. A., L. M. Almeida & A. C. Busoli. 2005. Morfologia dos imaturos e do adulto de *Coccidophilus citricola* Brèthes (Coleoptera, Coccinellidae, Sticholotidinae), predador de cochonilhas-de-carapaça (Hemiptera, Diaspididae) de citros. **Revista Brasileira de Entomologia**. 49(1):29-35.
- Snyder, W. E. & G. M. Clevenger. 2004. Negative dietary effects of Colorado potato beetle eggs for the larvae of native and introduced ladybird beetles. **Biological Control**. 31: 353-361.
- Snyder, W.E., S. N. Ballard, S. Yang, G. M. Clevenger, T. D. Miller, J. J. Ahn, T. D. Hatten & A.A. Berryman. 2004. Complementary biocontrol of aphids by the

- ladybird beetle *Harmonia axyridis* and the parasitoid *Aphelinus asychis* on greenhouse roses. **Biological Control**. 30:229-235.
- Soares, A. O., D. Coderre & H. Schanderl. 2004. Dietary self-selection behaviour by the adult of the aphidophagous ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae). **Journal of Animal Ecology**. 73:478-486.
- Soares, A. O. & A. Serpa. 2007. Interference competition between ladybirds beetle adults (Coleoptera, Coccinellidae): effects on growth and reproductive capacity. **Population Ecology**. 49:37-43.
- Soares, A. O., I. Borges, P. A. V. Borges, G. Labrie & E. Lucas. 2008. *Harmonia axyridis*: What will stop the invader? **BioControl**. 53(1). doi: 10.1007/s10526-007-9141-x. Online.
- Steenis, M. J. van & K. A. M. H. El-Khawass. 1995. Life history of *Aphis gossypii* on cucumber: influence of temperature, host plant and parasitism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 76:121-131.
- Stuart, R. J., J. P. Michaud, L. Olsen & C. W. McCoy. 2002. Lady beetles as potential predators of the root weevil *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera, Curculionidae) in Florida citrus. **Florida Entomologist**. 85(3):409-416.
- Sun, X. Q., W. L. Chen, Z. B. Chen, J. L. He & W. J. Ye. 1996. A preliminary study on the artificial diet of an aphidophagous coccinellid, *Harmonia axyridis* (Pallas), and its use to control strawberry aphids under plastic covering. **Journal of Shanghai Agricultural College**. 14:133-137.
- Takisawa, T., H. Yasuda & B. K. Agarwala. 2000. Effects of parasitized aphids (Homoptera, Aphididae) as food on larval performance of three predatory ladybirds (Coleoptera, Coccinellidae). **Applied Entomology and Zoology**. 35(4):467-472.
- Tan, C. C. 1946. Mosaic dominance in the inheritance of color patterns in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. **Genetics**. 31:195-210.
- Tedders, W. L. & P. W. Schaefer. 1994. Release and establishment of *Harmonia axyridis* in the southeastern United States. **Entomological News**. 105: 228-243.
- Tsaganou F. C., C. J Hodgson, C. G. Athanassiou, N. G Kavallieratos & Z. Tomanovic. 2004. Effect of *Aphis gossypii* Glover, *Brevicoryne brassicae* (L.), and *Megoura viciae* Buckton (Hemiptera: Aphidoidea) on the development of the predator *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). **Biological Control**. 31:138-144.

- Van Lenteren, J. C., D. Babendreier, F. Bigler, G. Burgio, H. M. T. Hokkanen, S. Kuske, A. J. M. Loomans, Menzler-Hokkanen, P. C. J. Van Rijn, M. B. Thomas, M.G. Tommasini & Q-Q. Zeng. 2003. Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. **BioControl**. 48:3-38.
- Van Lenteren, J. C., A. J. M. Loomans, D. Babendreier & F. Bigler. 2008. *Harmonia axyridis*: an environmental risk assessment for Northwest Europe. **BioControl**. 53(1) doi:10.1007/s10526-007-9120-2. Online.
- Wang, J. & J. H. Tsai. 2000. Effect of temperature on the biology of *Aphis spiraecola* (Homoptera: Aphididae). **Annals of the Entomological Society of America**. 93(4):874-883.
- Yarbrough, J. A., J. L. Armstrong, M. Z. Blumberg, A. E. Philips, E. Mcgahee & W. K. Dolen. 1999. Allergic rhinoconjunctivitis caused by *Harmonia axyridis* (Asian lady beetle, Japanese lady beetle or lady bug). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 104:704-705.
- Yasuda, H. & H. Ishikawa. 1999. Effects of prey density and spatial distribution on prey consumption of the adult predatory ladybird beetle. **Journal of Applied Entomology**. 123:585-589.
- Yasuda, H., T. Kikuchi, P. Kindlmann & S. Sato. 2001. Relationship Between Attack and Escape Rates, Cannibalism, and Intraguild Predation in Larvae of Two Predatory Ladybirds. **Journal of Insect Behavior**. 14(3):373-384.
- Zhang, Z. Q. 1992. The natural enemies of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera, Aphididae) in China. **Journal of Applied Entomology**. 114:251-262.
- Zhang, Z. Y, X-J Liu, X.-Y Yu, C-Z Zhang & X-Y Hong. 2007. Pesticide residues in the spring cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) grown in open field. **Food Control**. 18:723-730.

## ***CAPÍTULO II***

**Evidências moleculares sobre a origem de *Harmonia axyridis* (Pallas)  
(Coleoptera, Coccinellidae) no Brasil.**



## RESUMO

*Harmonia axyridis*, espécie asiática muito utilizada em programas de controle biológico de afídeos, destaca-se por competir por alimento e desalojar espécies nativas, além de predá-las (predação intraguilda). Foi introduzida pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1916 e hoje pode ser encontrada em quase todo país, bem como no México e Canadá. Na França foi mantida em quarentena até 1990 antes da introdução e hoje está distribuída em diversos outros países da Europa. A Argentina importou uma população da França no final dos anos noventa e em 2001 foi detectada pela primeira vez em Buenos Aires. No Brasil, foi introduzida provavelmente de maneira acidental em 2002. Os objetivos deste trabalho foram estimar a variabilidade genética de amostras de populações do Brasil, Estados Unidos, Europa e Paraguai, analisando filogeograficamente suas populações através do seqüenciamento de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI). Três protocolos de extração foram utilizados e as seqüências de Denver (EUA) foram obtidas no GenBank. A partir das 47 seqüências obtidas foram detectados 18 haplótipos mitocondriais com aproximadamente 640 pares de bases. Os haplótipos divergiram de zero a seis nucleotídeos entre si, sendo o 2 e o 7 compartilhados pelo Brasil e Europa. Os resultados das análises de Neighbour Joining (NJ), Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) foram similares, pois mostraram um grupo formado por espécimes norte americanos. As análises de NJ e IB mostram um grupo unindo os espécimes do Brasil, Paraguai e Europa. Assim, pode-se concluir que as populações de *H. axyridis* destes locais pertencem a uma mesma linhagem mitocondrial e hipotetiza-se que sua introdução no Brasil tenha ocorrido com populações oriundas diretamente da Europa ou da Argentina. Não há evidências de que espécimes dos Estados Unidos tenham entrado no Brasil. Existem possíveis pontos de heteroplasmia nas posições 181, 196 e 616 dos fragmentos de COI, em indivíduos da Bélgica, França, Inglaterra, Paraguai e Brasil.

## ABSTRACT

*Harmonia axyridis*, the multicolored Asian ladybeetle, is well-known as a classical biological control agent of aphids. It is an important intraguild predator, competing for food with other native coccinellid and sometimes managing to displace them. In 1916, it was released for the first time in the United States. Nowadays, it can be found in almost the entire country, and also in Mexico and Canada. In France, before the official release, it was kept in a quarantine program, until 1990, and it is distributed in many countries in Europe at the moment. In Argentina, a French population was imported by the end of the nineties and its presence in Buenos Aires was detected for the first time at the end of 2001. In Brazil, it was introduced probably accidentally, in 2002. For that reason the objectives of this work are to investigate the genetic variability of samples of populations of Brazil, United States, Europe and Paraguay through the sequencing of a fragment of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I (COI), analyzing them phylogeographically. Three protocols of extraction were used and the sequences of Denver (U.S.A.) were taken from the GenBank. Forty seven sequences with approximately 640 pb were analyzed, and 18 mitochondrial haplotypes were detected. The haplotypes diverged from zero to six nucleotides between them, being the haplotypes 2 and 7 shared between Brazil and Europe. The results of the Neighbour Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses were similar, revealing a group formed by EUA specimens. The NJ and IB analyses result in trees of which a group of specimens formed by Brazil, Paraguay and Europe can be seen. Therefore, it's been concluded that these *H. axyridis* populations belong to same mitochondrial lineage and hypothesized that the introduction of this coccinellid in Brazil has occurred with populations deriving directly of Europe and/or Argentina. There is no evidence that the EUA specimens entered in Brazil. Possible points of heteroplasmy in 181, 196 and 616 positions of the COI fragments exist in individuals of Belgium, France, England, Paraguay and Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

A aplicação de métodos filogenéticos para entender a variação genética, no tempo e espaço, entre populações ou táxons relacionados tem emergido como uma importante ferramenta em estudos de evolução e biologia da conservação (Moya *et al.* 2006). A Filogeografia é um método que combina análises filogenéticas e distribuições geográficas para mapear as histórias espacial e temporal, de linhagens intraespecíficas do DNA mitocondrial (DNAMit) (Avice 2000). Dentre outros estudos, este método foi utilizado com sucesso para entender a história de dispersão de cupins (Isoptera) exóticos, incluindo seus locais de origem (Jenkins *et al.* 2007).

O DNAMit em função do seu tamanho pequeno, da taxa evolucionária relativamente rápida e da sua usual herança materna, pode ser utilizado para examinar histórias populacionais e a evolução entre taxa proximoamente aparentados (Caterino *et al.* 2000). Pode ser utilizado também em estudos evolutivos, incluindo análises de estrutura populacional e fluxo gênico, hibridização, biogeografia e relacionamentos filogenéticos (Avice 1987).

Como acontece com o DNA nuclear, as seqüências de DNAMit contêm mais informações do que os fragmentos de restrição e por isso devem ser mais úteis para inferir as histórias dos haplótipos e das populações (Roderick 1996).

O genoma mitocondrial animal é pequeno em comprimento (16 a 20 kb), circular, sem íntrons e com os genes compactados. Com algumas exceções, o DNAMit animal de uma maneira geral contém 37 genes. Estes genes codificam as subunidades dos RNA's ribossômicos, 13 proteínas e 22 tRNA's. Todos os DNAMit de animais possuem no mínimo uma região não codificadora, com elementos regulatórios para a replicação e transcrição do DNA, e as seqüências intergênicas estão ausentes ou são pequenas (Boore 1999). Existem milhares de mitocôndrias em cada célula, portanto o DNAMit é abundante e relativamente fácil de se obter, até de amostras degradadas (Otranto & Stevens 2002).

O DNAMit deve ser mais sensível do que o DNA nuclear aos efeitos fundadores em populações menores, pois em uma população a freqüência de um haplótipo mitocondrial deve flutuar mais rapidamente do que as freqüências dos alelos nucleares (Avice 1991). O rápido ritmo de substituições de nucleotídeos, juntamente com a característica de herança materna tornam o DNAMit vantajoso para estudos de análise filogenética no nível microevolucionário, o qual não será conseguido facilmente pelos

genes de linhagem nuclear. Estas características do DNAmít forçam a adição de uma perspectiva filogenética à estudos de evolução intraespecífica (Avise 1987).

A utilização do fragmento mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) é muito comum em trabalhos de filogenia molecular para fins bastante diversificados, nos diversos grupos de seres vivos, como por exemplo, peixes, helmintos e em Insecta. Por exemplo, Thaenkham *et al.* (2007), na Tailândia, utilizaram o seqüenciamento do fragmento COI e posterior técnica de PCR-RFLP, para diferenciar infecções de duas espécies de platelmintos trematódeos, encontrados em peixes. Ames *et al.* (2006) através do seqüenciamento de parte desse gene e posterior digestão do produto seqüenciado com a enzima de restrição (SfcI) conseguiu diferenciar, de uma maneira simples e relativamente rápida, as duas mais importantes espécies de Calliphoridae (Diptera) de interesse forense no Reino Unido, *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 e *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758). O autor comenta ainda sobre a variação potencial existente neste gene entre outras espécies de Diptera de interesse forense.

Através dos genes COI e citocromo c oxidase subunidade II (COII) e posterior corte com enzima de restrição, foi formulada a hipótese de que houve apenas um evento fundador com sucesso para a espécie *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1924 (besouro de batata do Colorado) na Europa, depois de ter sido encontrado apenas um haplótipo mitocondrial fixado dentro das populações (Grapputo *et al.* 2005).

Palenko *et al.* (2004) utilizou seqüências de COI para determinar as distâncias genéticas entre as espécies: *Coccinella transversoguttata* Fald., 1835, *Coccinella distincta* Fald., 1837, *Coccinella trifasciata* L., 1758, *C. septempunctata* L., 1758, *Coccinella quinquepunctata* L., 1758, *Adalia bipunctata* L., 1758 e *Adalia decempunctata* L., 1758 (Coccinellidae). Nesse trabalho foram estudados os processos microevolutivos, como por exemplo, eventos relativamente recentes de divergência entre populações. *A. bipunctata* possui duas formas, (f. *bipunctata*) e (f. *fasciopunctata*). *A. bipunctata* (f. *fasciopunctata*) proveniente da Ásia Central possui um polimorfismo no padrão de coloração de pronoto e élitro que serve para distingui-la. Analisando amostras da Itália, Bulgária e Rússia contendo as duas formas foram encontradas diferenças em até 12 nucleotídeos, enquanto que entre duas outras espécies do gênero, *A. bipunctata* e *A. decempunctata* foram encontrados 24 nucleotídeos diferentes. Assim, o autor concluiu que a análise da variação do gene mitocondrial COI torna possível a revelação dos mecanismos de formação de espécies nesse grupo.

*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) é utilizada no controle biológico principalmente de afídeos e já foi introduzida em diversos países para este fim (Koch 2003). Nos Estados Unidos, desde 1916, várias liberações foram realizadas com espécimes de origem asiática (Japão e antiga USSR) em diversos locais (Califórnia, Washington, Geórgia, Nova Escócia, Ohio, Pensilvânia) (Gordon 1985), porém estas populações não se estabeleceram até 1988 (Chapin & Brou 1991).

Essa espécie foi introduzida na França pelo INRA (Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas) com espécimes provenientes da China (Iperti & Bertand 2001) e ficou em quarentena até 1990 (Kabiri 2006 *apud* Poutsma *et al.* 2008). Na Europa, desde 1982, *H. axyridis* vem sendo comercializada como agente de controle biológico por diferentes empresas particulares (Adriaens *et al.* 2003). Esta espécie já foi encontrada em diversos países: Áustria, Bielo-Rússia, Bélgica, República Tcheca, Dinamarca, França, Alemanha, Grécia Holanda, Itália, Liechtenstein, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Espanha, Suécia e Suíça (Soares *et al.* 2008). Em 1993, uma população de *H. axyridis* de origem francesa foi introduzida na Grécia (Katsoyannos *et al.* 1997) e na Bélgica, foi liberada em 1997 (Adriaens *et al.* 2003).

Na Argentina, espécimes liberados na província de Mendoza, no final da década de noventa, utilizados no controle biológico, foram obtidos da França (Estação de Zoologia e Luta Biológica de Antibes) (Garcia *et al.* 1999). Em Curitiba, Paraná, em 2002, *H. axyridis* foi encontrada pela primeira vez, em *Pinus* spp., alimentando-se de *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) e *Cinara pinivora* (Wilson, 1919) (Hemiptera, Aphididae), espécies de afídeos também exóticas (Almeida & Silva 2002).

A determinação das origens geográficas de organismos exóticos tem se tornado altamente importante, ecológica e economicamente, pois os impactos que estas espécies causam continuam a crescer (Scheffer & Grissell 2003).

## **2. OBJETIVOS**

Tendo em vista a recente introdução de *H. axyridis* no Brasil e o escasso conhecimento sobre a origem da sua introdução, este trabalho tem por objetivo geral:

- Inferir sobre a procedência das populações de *H. axyridis* no Brasil.

## 2.1. Objetivos específicos

- Estimar a variabilidade genética de *H. axyridis* de amostras de populações procedentes do Brasil, Estados Unidos, Europa e Paraguai.
- Analisar filogeograficamente as populações de *H. axyridis* através do fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Coleta e armazenamento dos exemplares coletados

Para a avaliação da variabilidade genética de diferentes populações de *H. axyridis*, foram coletados exemplares de Curitiba e de outras localidades do Brasil e exterior (Tabela I). Adultos e pupas foram capturados diretamente no campo e mantidos no laboratório até o esvaziamento do conteúdo intestinal e/ou a emergência dos adultos, evitando-se assim, a interferência de outros materiais, como conteúdo intestinal e parasitóides, nas análises moleculares. Os adultos recém emergidos foram fixados em tubos Eppendorf contendo etanol absoluto e armazenados no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração. O material proveniente de outras localidades do Brasil e do exterior foi recebido já fixado em etanol absoluto.

Tabela I. Amostras das populações de *Harmonia axyridis* para as análises de seqüenciamento do fragmento do gene mitocondrial COI.

Localidade / n° espécimes analisados	Código	Latitude (N-S)	Longitude (W-E)
Viçosa (MG) / 4	MG	21°6'0"	45°17'0"
Andradina (SP) / 4	SP	22°43'31"	47°38'57"
Curitiba (PR) / 6	Ca	25° 25' 40"	49°16'23"
Ponta Grossa (PR) / 5	PG	25° 50'58"	50°09'30"
Guaratuba (PR) / 4	GUA	25°54'0"	48°34'0"
Itaiópolis (SC) / 1	SC	26°20'0"	49°56'0"
Xanxerê (SC) / 2	SC	26°53'0"	52°23'0"
Camboriu (SC) / 2	SC	26°59'0"	48°38'0"
Passo Fundo (RS) / 4	RS	28°15'46"	52°24'24"
Paraguai (PAR) – Santa Rita / 2	PAR	25°47'0"	55°04'0"
França (FR) - Roquefort-les-Pins / 1	FR	43°40'44.4"	07°02'26.46"
Bélgica (BE) - Grand-Leez / 1	BEL	50°35'44.06"	04°46'36.95"
Inglaterra (IN) – London / 1	IN	51° 28'43.99"	00°09'02.02"

### 3.2. Extração e quantificação do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foram utilizados três protocolos em função da dificuldade de extração: Cheung *et al.* (1993), com as modificações de Carvalho & Vieira (2000, 2001) e Carvalho (2004) (protocolo 1), Cheung *et al.* (1993) com as modificações de França (2005) (protocolo 2) e o kit de extração EZDNA (Biosystems, Brasil) (protocolo 3).

As extrações pelos protocolos 1 e 2 foram realizadas no Laboratório do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, e o protocolo 3 no Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE) do Departamento de Zoologia e do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais.

Protocolo 1: Adultos de *H. axyridis* foram triturados individualmente, com pistilo de propileno autoclavado, em tubo de microcentrífuga de 1,5ml, contendo 200µl de tampão de extração [200mM Tris-HCl (ph 8,0), 2M NaCl e 70mM EDTA]. Em seguida, foram adicionados 50µl de sarcosyl a 5%, novamente homogeneizado e incubado a 65°C, por 60 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos e a fase aquosa (sobrenadante), foi transferida para novos tubos de microcentrífuga de 1,5µl. A precipitação do DNA foi efetuada pela adição de 110µl de 10mM de acetato de amônia e 250µl de isopropanol gelados e mantidos a 4°C “overnight” para favorecer a precipitação do DNA. O precipitado foi recuperado através de centrifugação a 10.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de DNA lavado duas vezes com 300µl de etanol gelado a 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100µl de tampão TE [10mM Tris e 1mM EDTA (pH 8,0)], contendo 10µg/µl de RNase e armazenado a - 20°C.

Protocolo 2: tendo como base o protocolo de Cheung *et al.* (1993), depois do material ter sido incubado por uma hora a 65°C, foi resfriado em temperatura ambiente. Depois de frio adicionou-se às amostras de 50 a 100µl de clorofórmio (álcool isoamílico 24:1), dependendo do volume da amostra. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15 minutos a 10.000rpm, o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5µl, aonde foram adicionados 80µl de acetato de amônio (7,5M) e 300µl de etanol 96%. As amostras foram homogeneizadas por inversão, levadas ao congelador por 2 horas, a - 20°C. Em seguida o material foi centrifugado por 15 minutos a 13.000rpm. O

sobrenadante foi descartado e lavado duas vezes com etanol 70%. As amostras foram secas em estufa, ressuspensas em 20µl de água MiliQ e posteriormente armazenadas a -20°C.

Protocolo 3: Inicialmente as amostras foram homogeneizadas em 98µl de tampão de digestão (Tris 50 mM – pH 8.0, EDTA 100 mM, SDS 0.5%), trituradas com pistilo de polipropileno e depois adicionados 2µl de proteinase K. As amostras foram incubadas a 50°C por 3 horas. A extração do DNA foi então efetuada utilizando o protocolo do Kit EZ-DNA (Biosystems).

A quantificação do DNA de cada amostra foi efetuada por espectrofotometria, com absorvância de 260-280nm no aparelho GeneQuant pro (Amersham Biosciences).

### **3.3. Primers e amplificação do DNA**

Foram testados para a amplificação e seqüenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), os primers universais não purificados HCO (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA) e LCO (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) (Invitrogen®). As reações de amplificação do DNA foram conduzidas em um volume final de 25µl contendo: 2,5µl 10X/µl Buffer; 1,5µl de 50mM MgCl<sub>2</sub>; 1,0 de 10mM dNTP; 1µl de 20pM de cada primer; de 50 a 100ng de DNA molde; 0,5 de 1U de Taq polimerase e completando o volume de 25µl com H<sub>2</sub>O MiliQ autoclavada. As amplificações foram realizadas através do seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 4 minutos e manutenção em refrigeração a 4°C.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando o tampão de corrida 1X TBE (Tris-borato-EDTA). Um marcador de peso molecular, de 100pb, foi utilizado em cada corrida como padrão de peso molecular co-migrante. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio a 0,5µg/ml, fotografados e analisados quanto à presença do fragmento amplificado do COI.

Os fragmentos amplificados foram purificados com Polietileno Glicol (PEG 20%) e quantificados. A reação de seqüenciamento continha 50ng de DNA purificado; 0,5µl de BigDye; 0,5µg de Buffer; 0,5µl dos primers HCO ou LCO a 1,6pmol e água MiliQ autoclavada completando 10µl. Para cada amostra foram amplificados



separadamente os primers HCO e LCO. A precipitação da reação de seqüenciamento com Isopropanol 75% foi realizada adicionando 40µL do álcool e posteriormente realizada a lavagem do precipitado com etanol 70% retirando-o logo em seguida. Depois de secas, as amostras eram armazenadas na geladeira. Para o seqüenciamento as amostras eram ressuspensas em formamida. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador ABI 3130 do LEMPE.

### 3.4. Análise das Seqüências de DNA

As seqüências obtidas foram editadas no programa BioEdit versão 7.0.0, e conferidas manualmente. Após a construção da seqüência consenso construída a partir dos dois primers, o alinhamento foi realizado através com ClustalW (Thompson *et al.* 1994) no programa BioEdit 7.0.5.2 (Hall 1999). As amostras de seqüências provenientes de Denver, Colorado, Estados Unidos (AM403712, AM403713, AM403518, AM403519, AM407721, AM407722, AM407723, AM407724, AM398943 e AM398944) foram obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e comparadas com as demais. No entanto, não foi possível analisar proporções de cada haplótipo, pois não há informações sobre a amostragem.

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando os métodos de “Neighbour Joining” (NJ), Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). A análise de NJ foi realizada pelo programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007). As análises de parcimônia e de máxima verossimilhança foram realizadas pelo programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2001) e a análise bayesiana com o programa Mr.Bayes 3.1.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). O modelo de evolução molecular foi obtido com o programa ModelTest 3.7 (Posada & Crandall 1998).

As árvores de parcimônia foram obtidas por busca heurística e o suporte por análise de “bootstrap” com 500 repetições. Os critérios da busca heurística foram: [CNI (close-neighbor-interchange): (level=1); árvore inicial com adição ao acaso com 10 reps.; Gaps/missing data: Complete deletion)].

Já para a análise de Máxima Verossimilhança os parâmetros iniciais foram: [lset base= (0.3107 0.1551 0.1518) nst=2, tratio=3.4104, rates=gamma, shape=0.6750, pinvar=0.9256].

A análise de inferência bayesiana foi realizada com o modelo de evolução molecular (HKY+I+G), indicado pelo programa ModelTest a partir do teste hLRTs

(Hierarchical Likelihood Ratio Tests). A árvore resultante desta análise foi obtida com estimativa para 2.500.000 gerações. Os parâmetros utilizados para esta análise foram: [lset nst=6 rates=invgamma; mcmc ngen=2500000 printfreq=100 filename=resultados; mcmc; sumt filename=resultados burnin=100 contype=allcompat].

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectados 18 haplótipos mitocondriais a partir de 47 seqüências de diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos, com aproximadamente 640 pares de base cada e não foram observadas deleções ou adições. Os haplótipos obtidos divergiram de zero a seis nucleotídeos entre si. De todas as amostras analisadas, o haplótipo mais freqüente foi o 5, encontrado em 38,3% das seqüências obtidas (Tabela II). O segundo haplótipo mais freqüente foi o 2 (12,76%), seguido pelo 3 (10,64%). Haplótipos únicos foram observados na população de Denver (haplótipos 10 a 18), de Curitiba (haplótipos 4 e 6) e de Guaratuba (haplótipo 8 e 9).

Tabela II. Lista dos haplótipos encontrados nos espécimes analisados de *Harmonia axyridis* provenientes de diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos. A nomenclatura das amostras está indicada na Tabela I.

Haplótipos	%	Amostras
4	2,13	Ca1
6	2,13	Ca6
8	2,13	GUA 1
9	2,13	GUA 5
10	2,13	AM403712
11	2,13	AM403713
12	2,13	AM403518
13	2,13	AM403519
14	2,13	AM407721
15	2,13	AM407722
16	2,13	AM407723
17	2,13	AM407724
7	4,25	GUA4; IN1;
1	4,25	BEL1; PAR1
18	4,25	AM398943; AM398944
3	10,64	SC2; PAR3; CaE1; Ca2; Ca5
2	12,76	FR1; MG3; SC1; SP3; PG2; SP5
5	38,30	MG1; MG2; MG5; PG1; PG3; PG4; PG5; SC3; SC4; SC5; SP1; SP2; RS1; RS2; RS3; RS4; Ca4; GUA2

Nos Estados Unidos foram detectados nove haplótipos mitocondriais únicos (Fig. 1). As porções apresentadas no gráfico indicam apenas os haplótipos e não representam suas proporções.



Fig. 1. Mapa dos Estados Unidos indicando os haplótipos de *Harmonia axyridis* provenientes de Denver, Colorado, obtidas através do GenBank.

Na Europa foram obtidos três haplótipos, o 1 encontrado na Bélgica, o 2 na França e o 7 na Inglaterra. O haplótipo 2 e 7 também foram obtidos de espécimes do Brasil. Foram encontrados no Brasil os haplótipos de 2 a 9, sendo o 5, o mais representativo com 56,25%, seguido do 2 (15,63%) e do 3 (12,5%). No Paraguai foram detectados os haplótipos 1 e 3 (Fig. 2).

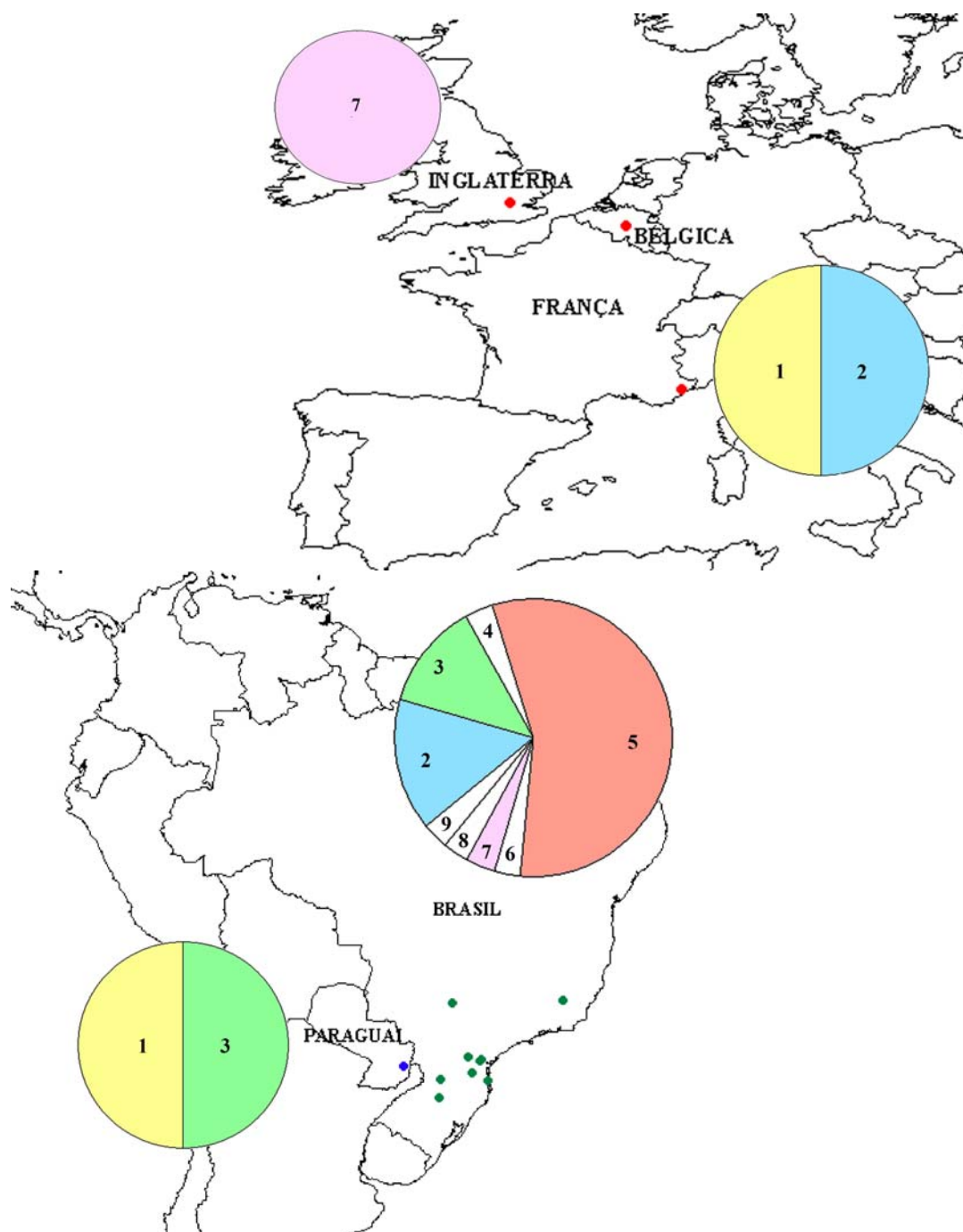


Fig. 2. Pontos de *Harmonia axyridis* amostrados e proporção dos haplótipos encontrados na Europa Continental, Inglaterra, Brasil e Paraguai. Nos gráficos os números e cores indicam os mesmos haplótipos.

#### 4.1. Análises filogeográficas

A árvore obtida a partir da análise de NJ (Fig. 3) representa graficamente a tabela de similaridade dos espécimes analisados. Um dos grupos de espécimes dos Estados Unidos foi formado com um forte suporte de bootstrap (77).

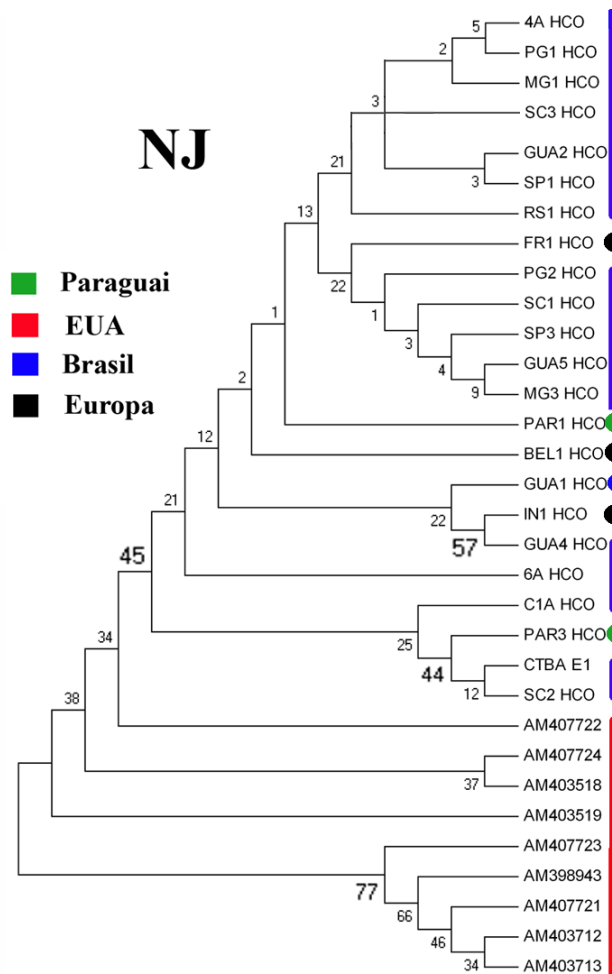


Fig. 3. Cladograma de Neighbour Joining não enraizado de espécimes de *Harmonia axyridis* provenientes de diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos.

A árvore de NJ revela que os espécimes dos Estados Unidos formam grupos próximos entre si cujos haplótipos divergem entre si em até cinco nucleotídeos. Estes espécimes não estão completamente separados dos espécimes do Brasil, Paraguai e Europa. Este não seria o resultado esperado. Nos Estados Unidos ocorreram várias

introduções independentes de espécimes provenientes da Ásia (região de origem de *H. axyridis*), que datam desde 1916. Porém, isto pode ter ocorrido em função das seqüências dos espécimes norte-americanos terem sido obtidas no GenBank (não sabemos a quantidade de espécimes analisados) e dos coccinelídeos terem sido coletados em apenas um estado (Denver).

Analisando ainda a árvore de NJ, pode-se observar outro grupo, com suporte de bootstrap de 45, que une os espécimes do Brasil, Europa e Paraguai. As diferenças nucleotídicas entre estes espécimes variam de zero a dois, o que explicaria o agrupamento desses espécimes. Existem nesta árvore, portanto, dois grupos de haplótipos definidos, o grupo formado por haplótipos norte-americanos e o de haplótipos brasileiros, paraguaios e europeus. As relações entre os haplótipos do segundo grupo, no entanto, não são bem definidas e possuem suportes fracos, exceto o ramo que une um espécime de Guaratuba (GUA4) e um da Inglaterra (IN1) (57).

A análise de MP resultou em 550 árvores igualmente parcimoniosas (índice de consistência= 1,0; índice de retenção=1,0) e a análise de MV resultou em 476 árvores com o score de 931.60953 (Parâmetros: Number of substitution types = 2 (HKY85 variant) Transition/transversion ratio = 3.4104 (kappa = 7.9625086); Freqüência dos nucleotídeos (set by user): A=0.31070 C=0.15510 G=0.15180 T=0.38240; Among-site rate variation: Assumed proportion of invariable sites = 0.9256; Distribution of rates at variable sites = gamma (discrete approximation); Shape parameter (alpha) = 0.675; Number of rate categories = 4; Representation of average rate for each category = mean; These settings correspond to the HKY85+G+I model; Number of distinct data patterns under this model = 15; Molecular clock not enforced; Starting branch lengths obtained using Rogers-Swofford approximation method).

Uma das árvores de MP (Fig. 4) revela os mesmo agrupamentos já mencionados na análise de NJ, ou seja, o grupo formado por espécimes do Brasil, Paraguai e Europa e o grupo formado por espécimes dos Estados Unidos. A união do primeiro grupo possui suporte alto (69), apesar das relações entre espécimes dentro dele se apresentarem incertas. Uma das árvores de MV (Fig. 4) também resultou em dois grupos, um deles formado de espécimes do Brasil, Paraguai e Europa e o outro formado por espécimes dos Estados Unidos, Brasil e Paraguai.

Em ambas as árvores de consenso resultantes das análises de MV e MP (Fig. 4) podemos notar um grupo de espécimes dos Estados Unidos que, em MP é formado pelos espécimes de código final 18, 19, 22 e 24, com suporte de 45, e em MV pelos

espécimes de código final 12, 13, 21, 23 e 43. O restante da árvore é uma grande politomia constituída de espécimes do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos.

Na árvore gerada a partir da análise de IB (Fig. 5) pode-se observar também o mesmo grupo de espécimes norte-americanos relatado nas árvores consenso de MP e MV, desta vez com um suporte de 99. Verifica-se, ainda, um grupo formado por dois espécimes brasileiros (CaE1 e SC2), um paraguaio (PAR3) e um norte-americano (espécime de código com final 22). No entanto, este grupo tem o suporte de apenas 30% e não foi observado nas outras árvores, portanto não foi considerado relevante.

Também se pode constatar na árvore de IB o mesmo ramo obtido entre um espécime de Guaratuba (GUA4) e outro da Inglaterra (IN1) na árvore de NJ, com um suporte um pouco menor (42).

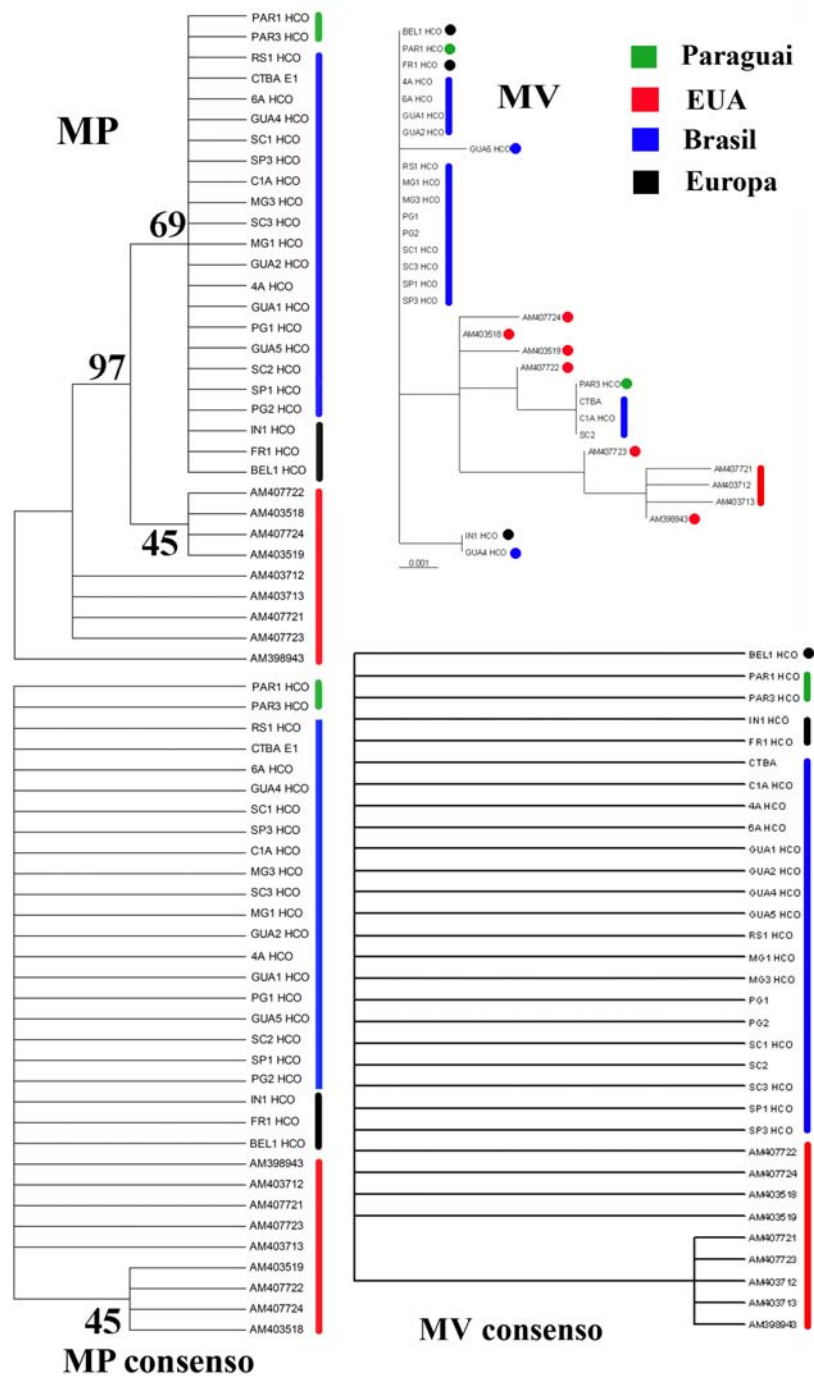


Fig. 4. Cladogramas de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, não enraizados, de espécimes de *Harmonia axyridis* provenientes de diferentes localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos. Esquerda: uma das 550 árvores de MP e consenso estrito. Direita: uma das 476 árvores de MV e consenso estrito.



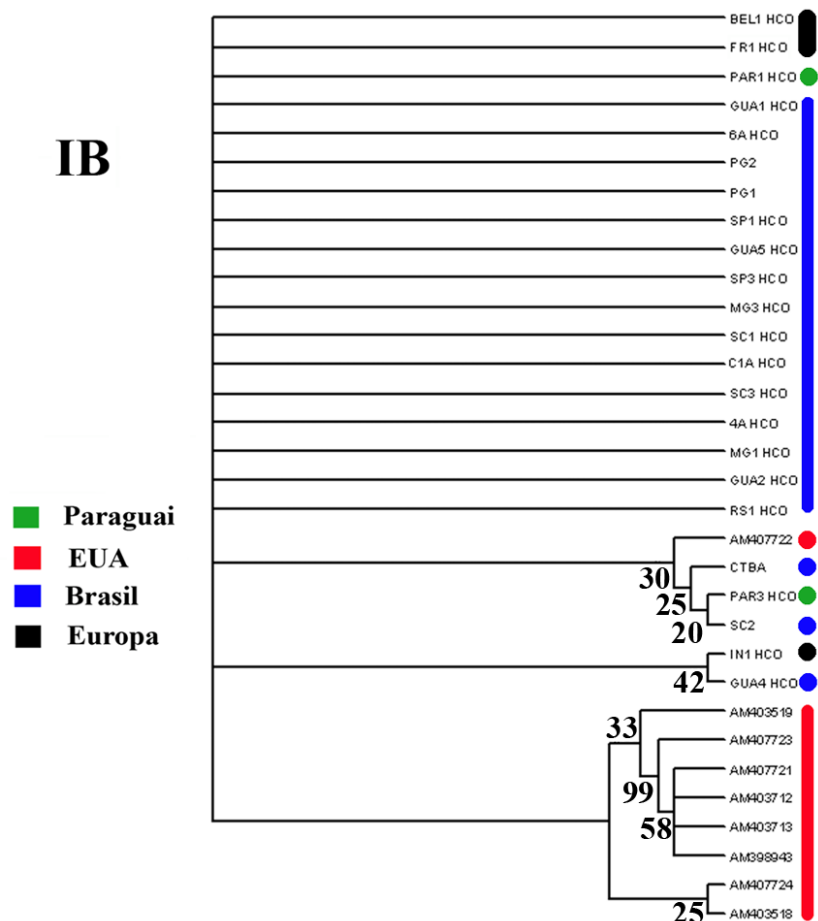


Fig. 5. Inferência Bayesiana de espécimes das populações de *Harmonia axyridis* provenientes de localidades do Brasil, Paraguai, Europa e Estados Unidos.

Os resultados das análises foram muito similares. Em todas elas foi possível observar dois grupos formados por espécimes dos Estados Unidos e outro grupo maior entre espécimes do Brasil, Paraguai e Europa, cujo relacionamento foi mal resolvido.

#### 4.2. Análise haplotípica

Nos espécimes provenientes de Denver, nos Estados Unidos, foram encontrados nove haplótipos únicos. No Brasil, foram observados os haplótipos de 2 a 9. Estes haplótipos também estão presentes nos espécimes da Europa (2, 3 e 7) e do Paraguai (3). Assim, podem ser observados dois grupos distintos de haplótipos, o que compreende os do Brasil, Paraguai e Europa (Fig. 2) e o dos Estados Unidos (haplótipos

10 a 18). Não existe suporte para a hipótese de que espécimes dos Estados Unidos tenham sido introduzidos no Brasil.

Devido à similaridade entre os haplótipos encontrados nas populações do Brasil, podemos supor que houve um único ou poucos eventos fundadores de sucesso com variabilidade haplotípica baixa. Já que alguns haplótipos do Brasil são encontrados em espécimes da Europa e Paraguai, podemos inferir que eles possuem uma história em comum. Poderia ser formulada a hipótese de que espécimes europeus foram introduzidos acidentalmente no Brasil através do comércio internacional. Nas análises de NJ e de IB puderam ser observados unidos, um espécime de Guaratuba (GUA4) e outro da Inglaterra (IN1), com o haplótipo 7 e suporte de bootstrap que variou entre 57 e 42. Existe próximo à cidade de Guaratuba o porto de Paranaguá, um possível ponto de entrada. Introduções acidentais através dos portos de navegação podem ter sido importantes na colonização de *H. axyridis* na América do Norte (Day *et al.* 1994).

A população de *H. axyridis* introduzida para controle biológico na Argentina é sabidamente originária da França (Garcia *et al.* 1999), assim uma outra hipótese seria a de que espécimes provenientes da Argentina se dispersaram e chegaram ao Brasil. Esta hipótese não pode ser suportada neste trabalho, pois espécimes argentinos não puderam ser avaliados.

Em um estudo sobre a variabilidade genética dos besouros de batata do Colorado (*L. decemlineata*) (Chrysomelidae) e sua diversidade entre os continentes, Norte Americano e Europeu, Grapputo *et al.* (2005) sugeriram em função da presença de apenas um haplótipo mitocondrial fixado dentro das populações da Europa, que teria ocorrido um único evento fundador, ou apenas um evento que obteve sucesso. Outra hipótese seria a introdução de diferentes espécimes do mesmo haplótipo vindos de uma mesma população de origem.

O haplótipo 3 de *H. axyridis* foi encontrado em espécimes de Curitiba, PR e Camboriu, SC, no Brasil e também em um espécime de Santa Rita, no Paraguai. Podemos formular duas hipóteses, que espécimes da Argentina também se dispersaram para o Paraguai, e/ou que espécimes brasileiros se dispersaram após seu estabelecimento para o Paraguai. O haplótipo 1 encontrado neste país também o foi na Bélgica, porém parece pouco provável que *H. axyridis* tenha vindo diretamente da Europa. Devido à baixa variabilidade dentro das populações brasileiras e paraguaias, em função do curto tempo de introdução, e por não termos analisado espécimes da Argentina, não foi possível propor possíveis rotas de dispersão.

Devido à falta de variação genética dentro do continente Europeu, o DNA mitocondrial não foi informativo para explicar a dispersão de *Leptinotarsa decemlineata* na Europa (Villablanca *et al.* 1998 *apud* Grapputo *et al.* 2005).

Utilizando informações de COI foi possível descobrir as possíveis rotas de invasão de *Hemymysis anomala* (Crustacea, Mysidae), espécie nativa dos estuários de Ponto-Caspian, que vem se dispersando pela Europa, desde os anos sessenta, em função da ação humana e principalmente da aberturas de canais, como o do rio Danúbio. Foi avaliado o conteúdo genético de 24 espécimes procedentes de 21 localidades da região de origem e o restante dos locais invadidos, totalizando 130 seqüências. Foram descobertos nove haplótipos mitocondriais e determinadas duas rotas de dispersão, cada uma a partir de linhagens mitocondriais diferentes (Audzijonyte *et al.* 2007).

A região de origem de *Megastigmus transvaalensis* (Hussey, 1956) (Hymenoptera, Torymidae) também pode ser desvendada através de análise do gene COI. Esta vespa alimenta-se de plantas do gênero *Rhus* sp. (africana) e *Schinus* sp. (sul americana) em diferentes países do mundo. A partir das análises filogeográficas de espécimes coletados na África e na América do Sul, os autores concluíram que *M. transvaalensis* é originalmente africana e alimentava-se de espécies do gênero *Rhus* spp. passando posteriormente a atacar *Schinus*. Neste estudo 49 espécimes foram analisados e 25 haplótipos únicos foram descobertos na África. A divergência entre eles não foi maior do que 4% (Scheffer & Grissell 2003).

A distinção entre diferentes rotas de invasão através de marcadores moleculares depende criticamente da estruturação da variabilidade genética das populações de origem (Audzijonyte *et al.* 2007).

Em estudos realizados na República Popular da China, utilizando o gene COI, foi possível determinar, a origem de introdução de *Dendroctonus valens* LeConte, 1860 (Coleoptera, Scolytidae). Esta espécie vem causando danos em florestas de *Pinus* e tem sido controlada através de programas de controle biológico. Foram utilizados de 1 a 10 exemplares por população para as análises de um total de 32 populações de diversas localidades nos Estados Unidos, México e América Central. Foram encontrados 131 haplótipos diferentes e os locais do noroeste dos Estados Unidos foram os que apresentaram maiores similaridades com as populações chinesas. Estas populações possuíam a maior quantidade de haplótipos em comum e os haplótipos únicos que ocorriam na China eram muito similares aos dessa região dos Estados Unidos. As

diferenças entre os haplótipos norte americanos e os da China não foram maiores do que 0,2 – 2% entre si (Cognato *et al.* 2005).

No presente estudo apenas um espécime de *H. axyridis* de cada país Europeu foi analisado, os quais se mostraram muito próximos. Os espécimes da França e da Bélgica possuem o mesmo haplótipo (haplótipo 1), e apenas um nucleotídeo diferente foi encontrado entre os haplótipos da Inglaterra e da Bélgica, e os da Inglaterra e da França. A probabilidade de haver uma variedade haplotípica alta nestes países e termos analisado espécimes com haplótipos quase idênticos é muito baixa. Portanto, *H. axyridis* não deve possuir uma variabilidade haplotípica alta na Europa.

Davies *et al.* (1999) comentam que não são esperadas mutações em populações recentemente estabelecidas, porque não houve tempo para que elas ocorressem, e o relacionamento entre os haplótipos refletiria eventos evolucionários da linhagem ancestral da espécie e não a história das novas áreas ocupadas.

*H. axyridis* vem se espalhando pelo Brasil e América Latina num curto período de tempo. Na Europa, seu poder de dispersão também gera preocupações, como na Inglaterra (Majerus *et al.* 2006). É provável que a baixa variabilidade possa ajudar no futuro controle deste coccinelídeo invasor no Brasil.

Grapputo *et al.* (2005) comentam que a falta de variabilidade genética e a consistência da estrutura populacional de *L. decemlineata* na Europa podem auxiliar no seu controle. Indicam também que a falta de variabilidade não impede sua dispersão, pois estes se espalharam no continente em um curto período de tempo e ainda continuam se dispersando.

Koch *et al.* (2006) discute que *H. axyridis* tem a capacidade de se disseminar pelo vôo e por meios associados ao homem. As populações de *H. axyridis* no Brasil continuam se dispersando após a detecção da espécie em 2002 em Curitiba e tem se sobressaído em relação às demais espécies de Coccinellidae (comunicação pessoal, L.M. Almeida).

As informações do estágio inicial de dispersão e estabelecimento são de grande interesse para entender a dinâmica das invasões biológicas e o desenvolvimento de projetos de manejo (Azzurro *et al.* 2007).

### 4.3. Heteroplasmia

Na posição 181, 196 e 616 das seqüências obtidas houve sobreposições de picos de nucleotídeos em alguns espécimes. Nas duas primeiras posições foi possível visualizar no eletroferograma dois picos sobrepostos de adenina (A) e guanina (G), representadas posteriormente como R (A ou G), e na terceira posição, picos de citosina (C) e timina (T), representadas por Y (C ou T) (Fig. 6). Para as análises, as seqüências que possuem estas sobreposições foram analisadas com as denominações de R ou Y.

É provável que estas sobreposições de picos de leitura dos nucleotídeos estejam revelando um fenômeno conhecido por heteroplasmia, quando mais de um genótipo coexiste num espécime (Awise 1987). É importante ressaltar que mais testes serão necessários para confirmar a heteroplasmia nestes pontos.

A heteroplasmia de ponto é um fenômeno incomum de haplótipos mitocondriais que diferem entre si em alguns nucleotídeos e coexistem dentro de um espécime (Shigenobu *et al.* 2005). As mutações mitocondriais representam uma importante causa das doenças humanas. Pacientes que possuem doenças em função de uma mutação do DNA mitocondrial possuem uma mistura de DNA's mutantes e saudáveis (Chinnery 2002), ou seja, são heteroplásmicos. No entanto, não só a mutação leva à heteroplasmia, mas também a herança mitocondrial paterna já relatada para algumas espécies de diferentes grupos de invertebrados, como por exemplo, em *Apis mellifera* L., 1758 (Apidae, Hymenoptera) (Meusel & Moritz 1993), *Antheraea proylei* Jolly (Saturniidae, Lepidoptera) (Arunkumar *et al.* 2006) e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Mytilidae, Bivalvia) (Venetis *et al.* 2006). A herança mitocondrial paterna parece ser um fenômeno distribuído por todo o filo animal, estando presente nos moluscos, insetos e vertebrados (mamíferos e aves) (Kvist *et al.* 2003).

Shigenobu *et al.* (2005) relataram a presença de heteroplasmia pontual não sinônima, a partir de mutação, em duas espécies de peixes *Oncorhynchus keta* (Walbaum in Artedi, 1792) e *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel, 1846). Foram detectados picos sobrepostos de A ou citosina C na terceira posição do códon 58 do gene mitocondrial ND5 de espécimes de *O. keta* que codificavam para os aminoácidos Isoleucina ou Metionina. Em *P. olivaceus* os picos sobrepostos de C ou T foram detectados em um espécime na segunda posição do códon 450 de uma região do gene mitocondrial ND4, codificando com Leucina ou Prolina. A detecção da posição

correta dos pontos de heteroplasmia foi possível através da comparação com seqüências destes genes já determinados de outras espécies congênicas.

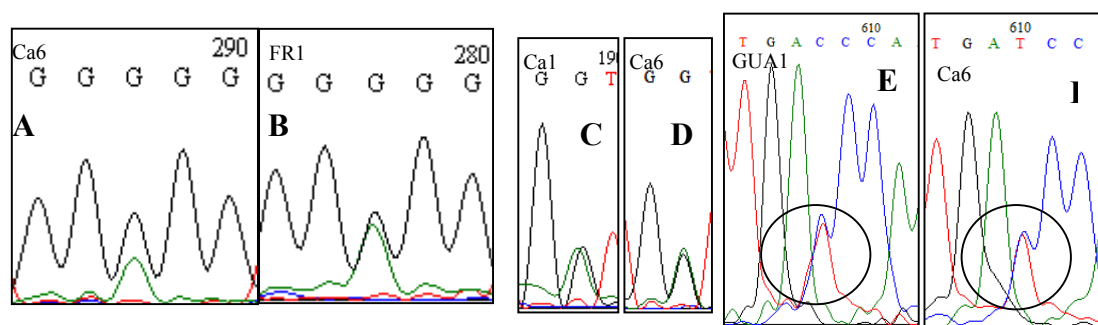


Fig. 6. Eletroferogramas de amostras de seqüências de *Harmonia axyridis* com picos sobrepostos: A e B posição 181 (G ou A nos espécimes Ca6: A – FR1: B); C e D posição 196 (G ou A nos espécimes Ca1: C – Ca6: D); E e F posição 616 (C ou T nos espécimes GUA1: E - Ca6: F).

Os espécimes analisados de *H. axyridis* originários da França, Bélgica, Inglaterra, Paraguai e Brasil apresentam evidências de heteroplasmia nos mesmos pontos do fragmento de COI analisado. Esta é possivelmente mais uma evidência de que eles possuem uma história em comum, pois a probabilidade de existirem em populações distintas o mesmo ponto heteroplásmico parece ser muito baixa.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As amostras dos Estados Unidos possuem uma variação maior de nucleotídeos entre si (de um a cinco nucleotídeos diferentes) e entre as outras amostras (de um a seis), do que as amostras do Brasil, da Europa e do Paraguai (de zero a dois nucleotídeos diferentes).

- Os resultados das análises filogeográficas (“Neighbour Joining”, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana) foram muito similares. Em todas foi possível observar um grupo de espécimes dos Estados Unidos e outro de espécimes do Brasil, Paraguai e Europa.

- As populações de *H. axyridis* do Brasil, Paraguai e Europa mostram ser de uma mesma linhagem mitocondrial.

- *Harmonia axyridis* foi introduzida provavelmente de maneira acidental com espécimes vindos diretamente da Europa ou da Argentina.

- Existem possíveis pontos de heteroplasma nas posições 181, 196 e 616 das seqüências de COI de *H. axyridis*, em espécimes da Bélgica, França, Inglaterra, Paraguai e Brasil.

## 6. REFERÊNCIAS

- Adriens, T., E. Branquart & D. Maes. 2003. The Multicoloured Asian Ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium? **Belgium Journal of Zoology**. 133(2):195-196.
- Almeida, L. M & V. B. Silva. 2002. Primeiro registro de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): um coccinelídeo originário da região Paleártica. **Revista Brasileira de Zoologia**. 19(3):941-944.
- Ames, C., B. Turner & B. Daniel. 2006. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. **Forensic Science International**. 164:179–182.
- Arunkumar, K. P., M. Metta & J. Nagaraju. 2006. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 40 (2):419-427.
- Audzijonyte, A., K. J. Wittmann & R. Väinölä. 2007. Tracing recent invasions of the Ponto-Caspian mysid shrimp *Hemimysis anomala* across Europe and to North America with mitochondrial DNA. **Diversity and Distributions**. Disponível em:  
[http://www.meduniwien.ac.at/user/karl.wittmann/docs/2007/Audzijonyte\\_et\\_al\\_2007.pdf](http://www.meduniwien.ac.at/user/karl.wittmann/docs/2007/Audzijonyte_et_al_2007.pdf). Acessado em: 21 de janeiro de 2008.
- Avise, J. C. 1987. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 18:489-522.
- Avise, J. C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics**. 25:45-69.

- Avise, J. C. 2000. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, MA. 446p.
- Azzurro, E., O. Carnevali, M. Bariche & F. Andaloro. 2007. Reproductive features of the non-native *Siganus luridus* (Teleostei, Siganidae) during early colonization at Linosa Island (Sicily Strait, Mediterranean Sea) **Journal of Applied Ichthyology**. 23(6):640–645.
- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genome. **Nucleic Acids Research**. 27(8):1767-1780.
- Carvalho, R. C. Z. 2004. Bioecologia de *Tinocallis kahawualuakalani* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) em *Lagerstroemia indica* L. (Lythraceae), em Curitiba, Paraná, e Variabilidade Genética Determinada por PCR-RAPD. 132 p. (Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná).
- Carvalho, O. R. A. & L. G. E, Vieira. 2000. Comparison of preservation methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD analysis. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 29:489-496.
- Carvalho, O. R. A. & L. G. E, Vieira. 2001. Determinação das condições ótimas para análises de RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**. 10:593-600.
- Caterino, M. S., S. Cho & F. A. H. Sperling. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Annual Review of Entomology**. 45:1-54.
- Chapin, J. B. & V. A. Brou. 1991. *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**. 93(3):630-635.
- Cheung, W. Y., N. Hubert & B. S. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction for plant, insect suitable for RAPD and other analysis. **PCR Methods and Applications**. 3:69-70.
- Chinnery, P. F. 2002. Modulating heteroplasmy. **Trends in Genetics**. 18(4):173-176.
- Cognato, A. I., J. Sun, M. A. Anducho-Reyes & D. R. Owen. 2005. Genetic variation and origin of red turpentine beetle (*Dendroctonus valens* LeConte) introduced to the People's Republic of China. **Agricultural and Forest Entomology**. 7:87–94
- Davies, N., F. X. Villablanca & G. K. Roderick. 1999. Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**. 14:17-21



- Day, W.H., D. R. Prokrim, D. R. Ellis & R. J. Chianese. 1994. The known distribution of the predator *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera, Coccinellidae) in the United States, and thoughts on the origin of this species and five other exotic lady beetles in eastern north America. **Entomological News**. 105(4): 244-256.
- França, G. S. 2005. Seqüenciamento e análise da região ITS2 de *Anopheles* (*Kortesia*) *cruzii* (Diptera, Culicidae) provenientes da população da Floresta Estadual do Palmito – Paranaguá – PR. 36p. (Monografia do curso de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná).
- Garcia, M. F., V. C. Becerra & C. E. Reising. 1999. *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae). Estudio biológico. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrárias**, Mendoza. Tomo XXXI. 1:85-91.
- Grapputo, A., S. Boman, L. Lindström, A. Lyytinen & J. Mappes. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. **Molecular Ecology**. 14:4207–4219.
- Gordon, R. D. 1985. The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. **Journal of New York Entomology Society**. 93:1-912.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acid Synthetic Biology Research**. 41:95-98.
- Iperti, G. & E. Bertand. 2001. Hibernation of *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) in South-Eastern France. **Acta Societas Zoologicae Bohemicae**. 65: 207-210.
- Jenkins, T. M., S. C. Jones, C. Lee, B. T. Forschler, Z. Chen, G. Lopez-Martinez, N. T. Gallagher, G. Brown, M. Neal, B. Thistleton & S. Kleinschmidt. 2007. Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 42:612–621.
- Katsoyannos P., D. C. Kontodimas, G. J. Stathas & C. T. Tsartsalis. 1997. Establishment of *Harmonia axyridis* on citrus and some data on its phenology in Greece. **Phytoparasitica**. 25: 183-191.
- Koch, R. L. 2003. The multicolored Asian beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. **Journal of Insects Science**. 32(3):1-16.

- Koch, R. L., R. C. Venette & W. D. Hutchinson. 2006. Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Western Hemisphere: Implications for South America. **Neotropical Entomology**. 35(4): 421-434.
- Kvist, L., J. Martens, A. A. Nazarenko & M. Orell. 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). **Molecular Biology and Evolution**. 20:243-247.
- Majerus, M., V. Strawson & H. Roy. 2006. The potential impacts of the arrival of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae), in Britain. **Ecological Entomology**. 31:207-215.
- Meusel, M. S. & R. F. Moritz. 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. **Current Genetics**. 24:539-543.
- Moya, O., H. G. Contreras-Díaz, P. Oromí & C. Juan. 2006. Using statistical phylogeography to infer population history: Case studies on *Pimelia* darkling beetles from the Canary Islands. **Journal of Arid Environments**. 66:477-497.
- Otranto, D. & J. R. Stevens. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal for Parasitology**. 32:1345-1360.
- Palenko, M. V., D. V. Mukha & I. A. Zakherov. 2004. Intraspecific and interspecific variation of the mitochondrial gene of cytochrome oxidase I in ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). **Russian Journal of Genetics**. 40:148-151.
- Poutsma, J., A. J. M. Loomans, B. Aukema & T. Heijerman. 2008. Predicting the potential geographical distribution of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, using the Climex model. **BioControl**. 53(1) doi:10.1007/s10526-007-9140-y. Online.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**. 14:817-818.
- Roderick, G. K. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene Flow, Phylogeography, and Their Uses. **Annual Review of Entomology**. 41:325-52
- Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. 19: 1572-1574.
- Scheffer, S. J. & E. E. Grissell. 2003. Tracing the geographical origin of *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Torymidae): an African wasp feeding on a South American plant in North America. **Molecular Ecology**. 12:415-421.

- Shigenobu, Y. K. Saitoh, K. Hayashizaki & H. Ida. 2005. Nonsynonymous site heteroplasmy in fish mitochondrial DNA. **Genes and Genetic Systematics**. 80:297-301.
- Soares, A. O., I. Borges, P. A. V. Borges, G. Labrie & E. Lucas. 2008. *Harmonia axyridis*: What will stop the invader? **BioControl**. 53(1). doi: 10.1007/s10526-007-9141-x. Online.
- Swofford, D. L. 2001. **PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and others methods)**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K, J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092
- Thaenkham, U., K. Visetsuk, D. T. Dung & J. Waikagul. 2007. Discrimination of *Opisthorchis viverrini* from *Haplorchis taichui* using COI sequence marker. **Acta Tropica**. online
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." **Nucleic Acids Research**. 22:4673-4680.
- Venetis, C., I. Theologidis, E. Zouros & G. C. Rodakis. 2006. No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**. 273(1600):2483-2489.