

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SAMIRA EVANGELISTA FERREIRA

**CAUSA DA RESISTÊNCIA DE *Lipaphis pseudobrassicae* (DAVIS, 1914) AO
PARASITOIDE *Diaeretiella rapae* (McINTOSH, 1855) E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O
PARASITISMO DE *Myzus persicae* (SULZER, 1776)**

UBERLÂNDIA/MG
2013

SAMIRA EVANGELISTA FERREIRA

**CAUSA DA RESISTÊNCIA DE *Lipaphis pseudobrassicae* (DAVIS, 1914) AO
PARASITOIDE *Diaeretiella rapae* (McINTOSH, 1855) E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O
PARASITISMO DE *Myzus persicae* (SULZER, 1776)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Fitotecnia

Orientador:
Prof. Dr. Marcus Vinicius Sampaio

UBERLÂNDIA/MG
2013

SAMIRA EVANGELISTA FERREIRA

**CAUSA DA RESISTÊNCIA DE *Lipaphis pseudobrassicae* (DAVIS, 1914) AO
PARASITOIDE *Diaeretiella rapae* (McINTOSH, 1855) E SUA INFLUÊNCIA SOBRE O
PARASITISMO DE *Myzus persicae* (SULZER, 1776)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de março de 2013

Dra. Ana Paula Korndörfer

UFU

Dr. Alexander Machado Auad

EMBRAPA
CNPGL

Prof. Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

UFU

Prof. Dr. Marcus Vinicius Sampaio
ICIAG/UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA/MG
2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar por esse caminho e me dar coragem para lutar por meus objetivos.

Aos meus pais, Wellington e Silvia, por terem sempre me apoiado, terem lutado para que meus sonhos se tornassem possíveis e por serem, para mim, o maior exemplo de honestidade e caráter.

Ao meu noivo, Wellington, por ter me dado força quando achei que não daria conseguiria, por sempre estar disposto a me ajudar, quando eu preciso, e por ser tão especial para mim.

À minha irmã, Camila, que sempre torceu pelo meu sucesso, como se fosse o seu.

Aos colegas do LACOB-UFU pelo auxílio no decorrer dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Sampaio pela orientação e conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca examinadora, Professores Doutores Alexander Machado Auad, Ana Paula Korndörfer e Vanessa Andaló Mendes de Carvalho, pela disponibilidade e pelos ensinamentos.

E aos órgãos de fomento de pesquisa CAPES, pela bolsa; FAPEMIG pelo apoio financeiro ao PROJETO N° APQ-01744-12 e a CAPES; e CNPq, pelo apoio financeiro ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1	3
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	3
2 OBJETIVOS	5
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4 REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 2	27
1 RESUMO	27
2 ABSTRACT.....	28
3 INTRODUÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS.....	38
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	45
8 REFERÊNCIAS.....	46
CAPÍTULO 3	50
1 RESUMO	50
2 ABSTRACT.....	51
3 INTRODUÇÃO	52
4 MATERIAL E METODOS	54
5 RESULTADOS.....	59
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	64
8 REFERÊNCIAS.....	65

RESUMO

FERREIRA, Samira Evangelista. **Causa da resistência de *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis, 1914) ao parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh, 1855) e sua influência sobre o parasitismo de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776)**. 2013. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

O pulgão *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis, 1914) (Hemiptera: Aphididae) é uma importante praga das brássicas. Na região de Uberlândia, Minas Gerais, neste afídeo ocorrem baixas porcentagens de parasitismo por ser resistente ao parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh, 1855), entretanto, não se sabe a causa da resistência. Variações na susceptibilidade ou na resistência de insetos a inimigos naturais podem impactar a interação de populações de afídeos. Os objetivos deste trabalho foram determinar qual a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae* e se o controle biológico de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) pelo parasitoide *D. rapae* é prejudicado pela presença de *L. pseudobrassicae* resistente. Em laboratório, foram identificados clones resistentes e suscetíveis ao parasitoide, avaliadas a influência do superparasitismo na resistência, a perda de resistência na progénie, a presença de estruturas de encapsulamento do parasitoide em pulgões parasitados e testes moleculares para comparar a composição de simbiontes em clones resistentes e suscetíveis. O experimento de interação entre as espécies foi conduzido em plantas de couve, cobertas com gaiolas de tela antiafídica e em casa-de-vegetação (temperatura média de 28°C). Cada planta foi infestada com 30 *M. persicae* e 30 *L. pseudobrassicae*, resistentes ou suscetíveis ao parasitoide, e duas fêmeas de *D. rapae* foram liberadas por gaiola. Ainda em laboratório, foi verificado que nos clones suscetíveis o parasitismo variou de 47 a 67% e no clone resistente o parasitismo foi zero. O superparasitismo não alterou a resistência, e 6,7% dos indivíduos da prole do clone resistente perderam a resistência. Não foram encontradas estruturas que indicassem o encapsulamento de ovos ou larvas dos parasitoides nos pulgões resistentes. Os testes moleculares não indicaram diferença na composição das bactérias simbiontes em pulgões resistentes e suscetíveis do mesmo clone. Em casa-de-vegetação, o número de pulgões mumificados foi menor na população de *L. pseudobrassicae* resistente do que na suscetível ao parasitoide. Foi observado que o número de *L. pseudobrassicae* vivos da população resistente ao parasitoide foi maior do que o número de *M. persicae*. Observou-se também menor porcentagem de parasitismo para *L. pseudobrassicae* resistente ao parasitoide, porém, não houve alteração na população ou no parasitismo de *M. persicae*. Os resultados indicam que a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* é a presença de endossimbiontes secundários e que *D. rapae* pode ser utilizado no controle de *M. persicae*, mesmo que esteja em associação com populações de *L. pseudobrassicae* resistentes ao parasitoide.

Palavras-chave: afídeo, Brassicaceae, competição mediada, controle biológico, defesa hospedeira.

ABSTRACT

FERREIRA, Samira Evangelista. **The cause of resistance of *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis, 1914) to the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntosh, 1855) and its influence on parasitism of *Myzus persicae* (Sulzer, 1776)**. 2013. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

The aphid *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis, 1914) (Hemiptera: Aphididae) is an important pest of Brassicaceae plants. In Uberlândia, Minas Gerais, this aphid has low percentages of parasitism because of its resistance to the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntosh) and the cause of resistance is unknown. Variations in susceptibility or resistance to natural enemies can impact in different ways on the interaction of herbivore populations. The aims of this study was to determine if the resistance of *L. pseudobrassicae* is caused by individual biotype or by association with secondary endosymbionts organisms and verify if the parasitism of *M. persicae* is changed in the presence of resistant *L. pseudobrassicae*. In laboratory we identified clones resistant and susceptible to parasitoid, verified the influence of superparasitism in the resistance, the loss of resistance in the aphid's progeny, the presence of encapsulation structures of the parasitoid in parasitized aphids and molecular tests to compare the composition of symbionts in resistant and susceptible clones were made. The interaction experiment was conducted on green collard plants, covered with fine net cages (anti aphid net) in green house (average temperature of 28°C). Each plant was infested with 30 *M. persicae* and 30 *L. pseudobrassicae* resistant or susceptible to the parasitoid *D. rapae* and two female parasitoids were released. In laboratory the parasitism in susceptible clones ranged from 47 to 67% and in resistant clone was zero. Superparasitism did not alter the resistance, however, aphids resistant that received three ovipositions had a higher proportion of individuals with changes caused by parasitism than those who received one oviposition of *D. rapae*. It was verified the loss of the resistance in 6.7% of the progeny of the resistant clone. There were no structures that indicate the encapsulation of parasitoid eggs or larvae of parasitoid in resistant aphids. Molecular tests indicated no difference in the composition of symbiotic bacteria between resistant and susceptible aphids of the same clone. In the green house experiment the number of mummified aphids was lower in the population of *L. pseudobrassicae* resistant than susceptible to the parasitoid. It was observed that the number of resistant *L. pseudobrassicae* alive was higher than the number of *M. persicae*. We also observed a lower percentage of parasitism in the *L. pseudobrassicae* resistant to the parasitoid, but there was no influence of the *L. pseudobrassicae* resistant in *M. persicae* population or parasitism. The results indicate that the cause of *L. pseudobrassicae*'s resistance to the parasitoid *D. rapae* is due to the presence of secondary endosymbionts and shows that *D. rapae* can be used to control *M. persicae* even when it is associated with a population of *L. pseudobrassicae* resistant to the parasitoid.

Keywords: aphid, Brassicaceae, mediated competition, biological control, host defense.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os afídeos são importantes pragas de hortaliças e, devido ao seu hábito alimentar, são capazes de depauperar as plantas pela sucção de seiva, causando modificações nas partes vegetais, além da depreciação de frutos e flores pela ação de fungos que desenvolvem em seus excrementos. São, ainda, importantes vetores de viroses em plantas e apresentam grande potencial reprodutivo, já que se reproduzem por partenogênese telítoca (BLACKMAN; EASTOP, 2000), o que faz com que exijam aplicações sucessivas de inseticidas.

O controle biológico se insere no Manejo Integrado de Pragas, atuando concomitantemente com outras formas de controle, a fim de reduzir a população da praga ao nível de equilíbrio a partir do uso de populações de inimigos naturais (PARRA et al., 2002). Além disso, esse controle tem potencial de ser de baixo custo e livre de substâncias químicas (BELLOWS, 2001).

Numerosos programas demonstram sucesso no controle de pragas, por meios biológicos (BELLOWS, 2001). Entretanto, o programa de controle biológico de afídeos na couve tem apresentado problemas para sua implementação. Hubaide (2011), estudando as três espécies de pulgões encontradas em couve, *Brevicoryne brassicae* (L.), *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) e *Myzus persicae* (Suzer), em avaliações no campo, verificou baixo parasitismo do parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh) em *L. pseudobrassicae* (10% de parasitismo). Já para nas outras duas espécies de afídeos o parasitismo foi elevado, atingindo máximo de 82% para *B. brassicae* e 72% para *M. persicae*. Esses resultados foram diferentes dos comumente encontrados em outras partes do mundo, nos quais o parasitismo em *L. pseudobrassicae* por *D. rapae* pode atingir 60% (AKHTAR et al., 2010; BLANDE et al., 2007). O baixo parasitismo de *L. pseudobrassicae* encontrado por Hubaide (2011) não pôde ser explicado pelos levantamentos de campo.

Oliveira et al. (2013), buscando explicar o baixo parasitismo em *L. pseudobrassicae* verificou, por meio de testes de laboratório, que *D. rapae* ovipositou igualmente em *L. pseudobrassicae* e em *M. persicae*, não se tratando de preferência por parte do parasitoide, mas, sim, de resistência. Esses autores não isolaram indivíduos suscetíveis, o que certificaria a

existência da resistência, e nem investigaram a causa da resistência. Dentre as causas da resistência de pulgões aos parasitoides estão aquelas relacionadas ao biótipo do indivíduo, causada pela defesa celular que provoca o encapsulamento dos parasitoides (CARVER; SULLIVAN, 1988), e a associação com endossimbiontes secundários (OLIVER et al., 2003).

A resistência por defesa celular pode ser reduzida com o superparasitismo, já que o hospedeiro não teria células suficientes para encapsular vários parasitoides (MACKAUER; CHAU, 2001; VAN ALPHEN; VISSER, 1990). Já a resistência por associação com microrganismos simbiontes secundários pode ser perdida em parte da prole, mesmo em indivíduos partenogenéticos como os pulgões, já que a transmissão ovariana de mãe para os filhos não é perfeita (CHEN; PURCELL, 1997; FUKATSU et al. 2000). Os parasitoides podem, ainda, exercer um papel importante na mediação de competição entre seus hospedeiros (PRICE et al., 1986). No caso da couve, a resistência de *L. pseudobrassicae* pode favorecer indiretamente *M. persicae*, já que *D. rapae* oviposita em *L. pseudobrassicae* resistente (OLIVEIRA et al., 2013), o que pode proporcionar um menor número de parasitoides para as próximas gerações, reduzindo o impacto de *D. rapae* em *M. persicae*. Com isso, o controle biológico de *M. persicae* pode ser prejudicado pela associação com colônias de *L. pseudobrassicae* resistente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar qual a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae*; e se constatar de o controle biológico de *M. persicae* pelo parasitoide *D. rapae* é prejudicado pela presença de *L. pseudobrassicae* resistente.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se a resistência de *L. pseudobrassicae* é causada pelo biótipo do indivíduo ou pela associação com organismos endossimbiontes secundários.

Hipóteses:

H_0 ₁: O superparasitismo não interfere na resistência de *L. pseudobrassicae*, caracterizando que a resistência é causada pela associação com organismos endossimbiontes secundários.

H_1 ₁: O superparasitismo reduz a resistência de *L. pseudobrassicae*, caracterizando que a resistência é causada pelo biótipo do indivíduo.

H_0 ₂: Não há perda da resistência entre os indivíduos da prole por partenogenia, caracterizando que a resistência é causada pelo biótipo do indivíduo.

H_1 ₂: Há perda da resistência entre os indivíduos da prole por partenogenia, caracterizando que a resistência é causada pela associação com organismos endossimbiontes secundários.

H_0 ₃: Não há diferença na composição dos microrganismos simbiontes secundários entre indivíduos de *L. pseudobrassicae*, resistentes e suscetíveis ao parasitoide, indicando que a resistência não é causada por interação com microrganismo.

H_1 ₃: Há diferença na composição dos microrganismos simbiontes secundários entre indivíduos de *L. pseudobrassicae* resistentes e suscetíveis ao parasitoide, indicando que a resistência é causada por interação com microrganismo.

- Verificar se o parasitismo de *M. persicae* é alterado na presença de *L. pseudobrassicae* resistente.

Hipóteses:

H0: O parasitismo de *M. persicae* não é alterado pela presença de *L. pseudobrassicae* resistente.

H1: O parasitismo de *M. persicae* é alterado pela presença de *L. pseudobrassicae* resistente.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pulgões em brássicas

Os pulgões são insetos fitófagos sugadores de seiva, que é um alimento rico em carboidrato, mas deficiente em compostos nitrogenados. Penetram os tecidos foliares através de seus estiletes (DIXON, 1973; MINKS; HARREWIJN, 1988). Sua reprodução por partenogênese cíclica os diferenciam dos demais indivíduos da ordem Hemiptera. A partenogênese cíclica é aquela em que a progênie é constituída por fêmeas vindas de reprodução assexuada na maior parte do ano e por ambos os sexos no fim do outono e inverno. Os afídeos podem ser reconhecidos por inúmeras características morfológicas, como: o sifúnculo, que é um órgão secretor; cinco ou seis segmentos antennais, compostos por dois segmentos basais e um segmento denominado flagelo com um processo terminal; tarsos com dois segmentos, no qual o primeiro segmento é bem menor que o segundo; e a cauda, que é utilizada para eliminar gotas de suas fezes açucaradas (honeydew). Algumas dessas características foram modificadas ou perdidas em algumas espécies, mas são evidentes na maioria dos afídeos que são pragas em plantas cultivadas (BLACKMAN; EASTOP, 2007).

As espécies de pulgões que se tornaram pragas foram aquelas com maior habilidade de se adaptar e de explorar ambientes modificados pelo homem. Os pulgões são considerados pragas de grande importância, tanto em culturas no campo, quanto em cultivos protegidos, devido a seu hábito alimentar (STARÝ, 1993). Esses insetos causam danos em plantas cultivadas devido à sucção da seiva e depreciação do produto final, em função do desenvolvimento de fungos em seus excrementos, e são considerados importantes vetores de fitovírus em ambientes agrícolas (BLACKMAN; EASTOP, 2000; CARVER, 1988; PEÑA-MARTÍNEZ, 1992). Objetivando-se controlar as viroses e as deformações vegetais ocasionadas por afídeos, o controle químico é largamente utilizado, o que pode ocasionar resistência a inseticidas (SCHELT et al., 1990; STARÝ, 1993; FURIATTI et al., 1996). Dessa forma, métodos alternativos de controle têm sido desenvolvidos, dentre eles o biológico, em que se faz importante o papel desempenhado pelos parasitoides (STARÝ, 1993).

A origem de *L. pseudobrassicae* ainda não é certa. Inicialmente foi confundido com *B. brassicae*, até que Davis (1914) reconheceu as diferenças e o nomeou de *Aphis pseudobrassicae*.

Devido ao seu sifúnculo levemente clavado, foi denominado, por Takahashi, em 1923, como *Ropalosiphum pseudobrassicae*, até que Borner e Schilder (1932) entenderam que *R. pseudobrassicae* deveria pertencer ao gênero *Lipaphis*, de origem paleártica e que se alimenta de crucíferas. No entanto, foi denominado *Lipaphis erysimi*, descrito por Kaltenbach em 1834, e considerado sinonímia sênior de *R. pseudobrassicae*. Apenas a partir de estudos morfológicos detalhados e do número de cromossomos das espécies do gênero *Lipaphis* é que *L. pseudobrassicae* foi considerado espécie diferente de *L. erysimi*. Foram observadas diferenças morfológicas, já que *L. erysimi* apresenta dez cromossomos, diferentemente de *L. pseudobrassicae*, o qual apresenta oito ou nove cromossomos e tem origem provável no leste asiático. Além disso, *L. erysimi* tem ocorrência restrita a brássicas selvagens na Europa e não coloniza brássicas cultivadas, assim sendo, todos os relatos de *L. erysimi* em plantas cultivadas ao redor do mundo são, provavelmente, referentes à *L. pseudobrassicae* (BLACKMAN; EASTOP, 2000; BLACKMAN; EASTOP, 2007).

O pulgão *L. pseudobrassicae* é uma praga cosmopolita de brássicas. As formas ápteras são de tamanho pequeno a médio, podem apresentar coloração amarela, cinza ou verde oliva com camada de cera branca. Os alados apresentam coloração verde oliva com franjas transversais nos últimos segmentos do abdome, as franjas transversais são verificadas somente após os sifúnculos em *L. pseudobrassicae*. As formas ápteras apresentam de 1,85 a 2,05 mm de comprimento, fronte sinuosa, sifúnculos ligeiramente escurecidos e é de 2,08 a 2,36 vezes mais compridos que a cauda, a qual apresenta uma ligeira constrição no ápice (BLACKMAN; EASTOP, 2007).

Como resultado de sua alimentação, as folhas se encarquilham e amarelecem. Esse pulgão é considerado vetor de dez vírus não persistentes, como o Vírus do Mosaico do Nabo (potivirus) e o Vírus do Mosaico da Couve-flor (caulimovirus). Trata-se de uma praga de ocorrência mundial, embora se estabeleça melhor em climas mais quentes, reproduzindo-se durante todo o ano por continuas partenogênese (BLACKMAN; EASTOP, 2007).

De acordo com Peña-Martinez (1992), esses pulgões colonizam a parte inferior das folhas, partes terminais de talos e inflorescências. Contudo, a preferência de *L. pseudobrassicae* por folhas completamente desenvolvidas da planta foi observada por Cividanes e Souza (2004) e Hubaide (2011).

A distribuição de *M. persicae* se dá em praticamente todas as regiões do mundo, este afídeo é altamente polífago e utiliza como hospedeiras mais de 500 espécies de plantas,

distribuídas em 50 famílias. Causa, portanto, danos diretos, em função da sucção de seiva, e indiretos, principalmente pela notável capacidade de transmitir fitopatógenos, configurando-se como uma espécie considerável, em termos de se estabelecer enquanto vetor de viroses, tendo a capacidade comprovada de transmitir mais 100 viroses de plantas, em espécies de 30 famílias de plantas, incluindo culturas de importância econômica no mundo inteiro (BLACKMAN; EASTOP, 2000; FURIATTI et al., 1996; PEÑA-MARTÍNEZ, 1992).

Na cultura da couve, *M. persicae* apresenta-se distribuído em maior número nas folhas medianas da couve (CIVIDANES; SOUZA, 2004; HUBAIDE, 2011).

Cada espécie de pulgão apresenta características peculiares que permitem o diagnóstico correto das espécies que afetam as brássicas. A espécie *M. persicae*, por exemplo, pode ser reconhecida facilmente, por apresentar a fronte em forma de “W”, o sifúnculo claro e de maior comprimento dentre os afídeos em brássicas. Já, para separar as espécies *B. brassicae* e *L. pseudobrassicae*, o sifúnculo mais curto de *B. brassicae*, em comparação ao de *L. pseudobrassicae*, é a melhor forma de diagnosticar as espécies. Quanto aos alados, além dos sifúnculos, a presença de franjas transversais esclerotizadas, tanto em *L. pseudobrassicae*, quanto em *B. brassicae*, também auxilia na diferenciação das espécies: *L. pseudobrassicae* apresenta franjas somente após os sifúnculos no abdome, e a espécie *B. brassicae* apresenta franjas antes dos sifúnculos. A placa negra no abdome de *M. persicae* o diferencia das outras duas espécies encontradas em brássicas (BLACKMAN; EASTOP, 1984).

3.2 Hospedeiros e biologia de *Diaeretiella rapae*

Os parasitoides são os inimigos naturais utilizados com maior eficiência no controle biológico de pulgões (CARVER, 1988). Destacam-se os endoparasitoides solitários das famílias Aphelinidae (Hymenoptera), com espécies do gênero *Aphelinus* Dalman e Braconidae (Hymenoptera), na qual a subfamília Aphidiinae é a mais importante e numerosa. Os principais gêneros encontrados no Brasil, que compõem a subfamília Aphidiinae, são *Aphidius* Nees, *Binodoxys* Haliday, *Diaeretiella* Starý, *Ephedrus* Haliday, *Lysiphlebus* Foster, *Praon* Haliday e *Xenostigmus* Ashmead (STARÝ et al., 2007).

Na fase de larva, o parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh) apresenta três ínstares, com os dois estágios iniciais alimentando-se da hemolinfa do hospedeiro e, no último, dos

tecidos do mesmo (STARÝ, 1988; BUENO; SAMPAIO, 2009). No fim do seu desenvolvimento, quando resta apenas a epiderme do afídeo, a larva do parasitoide ataca a face ventral do hospedeiro, colando-o na superfície da folha em meio a secreções produzidas em glândulas especializadas, e é formada a pupa do parasitoide, a epiderme restante do pulgão endurece e forma a múmia (STARÝ, 1988; BUENO; SAMPAIO, 2009).

O parasitoide *D. rapae* se destaca no controle biológico dos pulgões das brássicas é cosmopolita e apresenta diversas espécies de afídeos como hospedeiro em plantas de trigo, alfafa, batata, aveia, sorgo, entre outras (STARÝ, 1988; PIKE et al., 1999; STARÝ et al., 2007). Entretanto, possui associação constante aos pulgões que atacam as brássicas, sendo o parasitoide de maior ocorrência ou o único a parasitar os afídeos que utilizam a couve como planta hospedeira (SOUZA; BUENO, 1992; BUENO; SOUZA, 1993; CIVIDANES, 2002; MUSSURY; FERNANDES, 2002; VAZ et al., 2004; STARÝ et al., 2007; HUBAIDE, 2011).

O período de desenvolvimento de *D. rapae* é de, aproximadamente, 14 dias a 24° C (ELLIOTT et al., 1995). O período de desenvolvimento das fêmeas de *D. rapae* em *L. pseudobrassicae*, *B. brassicae* e *M. persicae* é de 12 dias a 23° C. Para os machos do parasitoide, o período de desenvolvimento foi menor em *L. pseudobrassicae* (11 dias) que em *B. brassicae* (12 dias) a 23° C (OLIVEIRA et al., 2013). Sua longevidade varia de 9 a 12 dias, a 21° C, e as fêmeas emergem com cerca de 50 ovos em seus ovários nesta temperatura (BERNAL; GONZÁLEZ, 1997).

3.3 Fatores envolvidos no parasitismo

A seleção do hospedeiro envolve a localização do *habitat*, localização do hospedeiro, aceitação do hospedeiro, adequação do hospedeiro (DOUT, 1959) e regulação do hospedeiro (VINSON; IWANTSCH, 1980). Após a emergência, a fêmea do parasitoide precisa encontrar novos hospedeiros para depositar seus ovos e formar nova geração. Essa tarefa demanda um processo de procura do hospedeiro no ambiente altamente variável no tempo e no espaço (VET et al, 2002).

Os habitats dos hospedeiros são, geralmente, encontrados pela detecção de sinais perceptíveis à distância e não por procura aleatória. A visão, então, tem uma importante função no sentido mais amplo, já para localização de microhabitats é frequentemente uma resposta a

estímulos químicos (CADE, 1975; REHMAN; POWELL, 2010).

A procura por novos hospedeiros não é fácil, já que os hospedeiros são organismos pequenos em um ambiente muito complexo e estão sobre ação forte de seleção para se manterem imperceptíveis para seus inimigos. Em alguns casos, os parasitoides solucionam esses problemas ao perceberem o sistema de comunicação de seus hospedeiros. Alguns parasitoides utilizam o odor de uma planta infestada por possíveis hospedeiros, voláteis liberados pela planta, feromônios sexuais do hospedeiro, ou feromônios de agregação para encontrar locais em potencial, em que as fêmeas do hospedeiro estão depositando ovos. No entanto, a maioria dos parasitoides não consegue identificar essas pistas e são forçados a usar pistas indiretas para encontrá-los (VAN DRIESCHE, 2008).

Essas pistas indiretas, como o cheiro do alimento do hospedeiro, causam incertezas no reconhecimento. Uma planta com potencial para estabelecer-se enquanto alimento para o hospedeiro pode ser fácil de ser encontrada, mas sua localização não garante a presença de um hospedeiro adequado (VAN DRIESCHE, 2008; VET et al, 2002). Como as diversas espécies de parasitoides respondem às diferentes substâncias químicas, há um aumento na segregação destes inimigos naturais no *habitat*. As respostas do parasitoide às substâncias químicas são inatas, mas podem ser modificadas pelo processo de aprendizagem, associando pistas químicas ou físicas relacionadas às espécies de hospedeiros adequados durante a oviposição. Além disso, o parasitoide pode aprender a responder a certos compostos voláteis das folhas verdes das plantas através da aprendizagem associativa (EIRAS; GERK, 2001).

Os hospedeiros são detectados por químicos não voláteis, como escamas e fezes do hospedeiro na superfície da planta. Esses materiais são perceptíveis pelo toque do parasitoide com as antenas ou com os tarsos. O sucesso na localização do hospedeiro determina o valor adaptativo da fêmea parasitoide, sendo que sua escolha resulta no sucesso ou no fracasso da sua próxima geração (VAN DRIESCHE, 2008).

Depois de encontrar o hospedeiro, a fêmea do parasitoide deve decidir se vai usá-lo para alimentação, para oviposição ou se vai rejeitá-lo. Se o hospedeiro é aceito para oviposição, a fêmea deve decidir quantos ovos vai depositar e qual a razão sexual de sua prole. Com esse modelo de adequação, é possível perceber a estreita relação entre o comportamento da fêmea e o seu valor adaptativo (GODFRAY, 1994).

A aceitação do hospedeiro é a oviposição propriamente dita. Ela é muito afetada pelo

número de ovos que a fêmea possui para depositar e do número de hospedeiros que a fêmea ainda vai encontrar durante sua vida. Quando estão expostos a condições que apontam baixa probabilidade de sobrevivência, os hospedeiros serão aceitos com mais facilidade (GODFRAY, 1994).

O sucesso do desenvolvimento do parasitoide depende da escolha de um hospedeiro adequado, e isso está diretamente relacionado com a nutrição desse, com competição intraespecífica entre as larvas, com a resposta imune do hospedeiro e com o balanço hormonal do hospedeiro (VINSON; IWANTSCH, 1980). A regulação do hospedeiro, por sua vez, trata-se de quando o desenvolvimento do parasitoide afeta o desenvolvimento, comportamento, fisiologia e bioquímica dele (HAGVAR; HOFSVANG, 1991).

3.3.1 Resistência do hospedeiro ao parasitoide

A resistência pode ser dividida em resistência comportamental e fisiológica, dependendo se a resistência ocorre antes ou depois da aceitação do hospedeiro, respectivamente (HENTER; VIA, 1995). A resistência por pré oviposição, também chamada de resistência comportamental, ocorre a partir da defesa do hospedeiro para evitar o ataque do parasitoide. Essas táticas podem estar relacionadas a estruturas de defesa daquele, por este apresentar comportamento evasivo ou agressivo ou por utilizar de outros indivíduos como guarda-costas (HENTER; VIA, 1995). Ninfas de pulgões em estádios mais avançados, por exemplo, podem evitar o parasitismo, chutando o parasitoide, pulando da planta (ROITBERG; MYERS, 1979) ou utilizando formigas para se protegerem (GROSS, 1993).

A resistência por pós-oviposição, ou resistência fisiológica, ocorre após os hospedeiros serem parasitados. Os endoparasitoides depositam seus ovos no interior do hospedeiro, desta forma, ele pode desenvolver uma resposta imune que resulta na sua sobrevivência e na morte do parasitoide. Para grande parte dos parasitoides, a resposta imune se baseia no encapsulamento de seus ovos pelo hospedeiro. Alguns insetos são capazes de destruir parasitoides imaturos pelo encapsulamento, processo no qual células de hemolinfa do hospedeiro unem-se ao embrião do parasitoide para formar uma cápsula. Moléculas reativas são, então, lançadas dentro da capsula e matam o parasitoide (CARVER; SULLIVAN, 1988). Existem evidências, ainda, das variações dessas taxas de resistência fisiológica entre biótipos do hospedeiro. As larvas de algumas

espécies de *Drosophila* Fallén de regiões diferentes da Europa, por exemplo, apresentam diferentes porcentagens de encapsulamento dos ovos do parasitoide, após a oviposição (KRAAIJEVELD et al., 1998).

Embora o encapsulamento seja a forma mais comum de defesa dos insetos, ela é pouco frequente em afídeos, possivelmente pelo seu número reduzido de hemócitos (FLANDERS, 1934; CARVER, 1985; CARVER; SULLIVAN, 1988; GWYNN et. al., 2005). Em afídeos, o encapsulamento foi demonstrado por Griffiths (1961), no qual o ovo do parasitoide *Monoctonus crepidis* (Haliday) foi encapsulado pelo afídeo *Aulacorthum circumflexum* (Buckton). Também, Carver e Sullivan (1988) observaram os afídeos *Myzus ascalonicus* Doncaster e *Acyrthosiphon kondoi* Shinji encapsulando ovos de *Aphelinus asychis* Walker, e o pulgão *Aulacorthum circumflexum* (Buckton) encapsulando larvas desse mesmo parasitoide. Os autores ainda observaram os afídeos *M. ascalonicus* e *A. circumflexum* encapsulando formas jovens de *D. rapae* e o pulgão *Sitobion avenae* (Fabricius) encapsulando larva de *Aphidius rhopalosiphii* (DeStefani-Perez).

Um processo de resistência fisiológica que é observado em pulgões ocorre sem o encapsulamento, porém, o ovo não se desenvolve (HENTER; VIA, 1995; GWYNN et. al., 2005). Henter e Via (1995) observaram que em afídeos suscetíveis aos ovos dos parasitoides apresentaram aumento da divisão celular e mudanças no desenvolvimento até a eclosão. Em hospedeiros resistentes, entretanto, os ovos dos parasitoides não apresentaram divisão celular e, por fim, houve o desaparecimento do ovo sem nenhum sinal de encapsulamento.

Estudos recentes apontam que simbiontes associados a insetos podem ter um papel importante como mutualistas de defesa (OLIVER; MORAN, 2009; HANSEN et al., 2012). O primeiro registro de um simbionte oferecendo defesa contra parasitoides foi dado em uma seção em um capítulo de livro (HSAIO, 1996), mas não recebeu muita atenção. Hsaio (1996) percebeu que a bactéria *Wolbachia* sp. aumentou a resistência de um gorgulho, em relação ao seu parasitoide *Microtonus aethiopoides* Loan. Dois biótipos de gorgulho, tratados com antibióticos, tornaram-se altamente suscetíveis a *M. aethiopoides*. Em função da grande importância dos simbiontes na proteção de afídeos contra parasitoides, este tema será tratado com mais detalhes nos item 3.5 desta revisão.

3.3.2 Contra defesa dos parasitoides

Em resposta à resistência fisiológica dos hospedeiros, os parasitoides apresentam meios de contra atacar. Essas táticas incluem a escolha do hospedeiro, saturação, polidnavirus, veneno, teratócitos e dispositivos de anti-reconhecimento, como revestimentos especiais nos ovos. Alguns parasitoides ovipositam em hospedeiros jovens, os quais apresentam menor acurácia no encapsulamento (DEBOLT, 1991). Em outros casos, os parasitoides promovem uma saturação, ovipositando um número elevado de ovos nos hospedeiros para esgotar o fornecimento de células de encapsulamento, permitindo que alguns ovos sobrevivam (BLUMBERG; LUCK, 1990).

Outro exemplo se baseia em duas famílias de parasitoides, Braconidae e Ichneumonidae (ASGARI; SCHMIDT, 1994), que usam genes de vírus (Polydnaviridae) e venenos para desativar o encapsulamento por parte do hospedeiro (BLUMBERG, 1997). Os vírus e os venenos são injetados nos hospedeiros durante a oviposição e também auxiliam na regulação fisiológica do hospedeiro a favor do parasitoide (WEAVER et al., 2001; MOREAU, 2003).

3.4 Os endossimbiontes dos pulgões

Quando uma simbiose é obrigatória, o simbionte é chamado primário, no caso de simbiose facultativa, este simbionte é considerado secundário. Os afídeos têm sido o principal modelo para o estudo de simbiontes em função de sua relação obrigatória com a bactéria *Buchnera aphidicola* (BAUMANN et al., 1995). Além do simbionte primário, sabe-se que *A. pisum*, por exemplo, pode ser infectado por pelo menos cinco simbiontes secundários relacionados a várias interações ecológicas, dentre elas a proteção contra parasitoides. Os pulgões são ideais para o estudo dos efeitos dos simbiontes secundários por ter reprodução por partenogênese, dando origem a clones que podem ser mantidos em laboratório e permitindo que simbiontes secundários possam ser manipulados por transferência, utilizando microinjeção e ou eliminando por manipulação com antibióticos (CHEN; PURCELL, 1997; OLIVER et al., 2003).

3.4.1 O endossimbionte primário *Buchnera*

As relações entre pulgão e *Buchnera* sp. foram revisadas por Baumann et al. (1995) e, por isso, este item se baseia em sua revisão. Estudos apontam que há 200-250 milhões de anos um antecessor de afídeo foi infectado por uma bactéria de vida livre. Essa relação se estabeleceu nas células dos afídeos e assim, o hospedeiro e o endossimbionte do gênero *Buchnera* se tornaram interdependentes e incapazes de sobreviverem um sem o outro. A presença de peptideoglicanos entre as duas membranas é indicada como uma evidencia química da adição de penicilina à dieta do pulgão.

A especiação das linhagens dos afídeos ocorreu paralelamente à divergência das linhagens do endossimbionte, resultando em uma evolução paralela de *Buchnera* sp. e dos afídeos. As bactérias *Buchnera* sp., hoje, mantém várias das propriedades do seu antecessor de vida livre, contendo genes para proteínas envolvidas na replicação, transcrição e translação do DNA, assim como, chaperoninas e proteínas envolvidas na secreção, metabolismo de produção de energia e biossíntese de aminoácidos.

Buchnera é um gênero de probactéria com fina parede celular gram-negativa e se divide por constrição. Os membros do gênero *Buchnera* são esféricos ou células ovaladas, apresentam tamanho entre 2,5 e 5 micrometros de diâmetro, com parede celular comum a bactérias gram-negativas. Esse gênero tem sido identificado em todos os membros de Aphidoidea estudados, com exceção das famílias Phylloxeridae e Adelgidae e algumas espécies da família Hormaphididae. Nas formas paternogenéticas dos Aphididae, são encontrados aproximadamente 10^7 bactérias por mg de peso de afídeo o que equivale a 10% da biomassa do pulgão.

Esse microrganismo localiza-se no interior da célula e é restrito ao citoplasma de um único tipo de célula chamado micetócito. Essas células que transportam a bactéria podem ser chamadas, por alguns autores, de bacteriócitos. Os microrganismos são herdados maternalmente e a associação com o pulgão é requerida por ambos os organismos.

As células de *Buchnera* sp. são transmitidas maternalmente de uma geração de afídeo para outra pelos ovários, um processo denominado transmissão transovariana. Em afídeos ovíparos, as bactérias são endocitadas por cada ovo e podem ser facilmente observadas como uma bola no polo posterior do ovo maduro. Em indivíduos vivíparos a bactéria passa dentro da

blastocel (cavidade do blastocisto) em embriões recém formados e são sequencialmente endocitados pelos micetócitos do embrião e se diferenciam.

A necessidade do simbionte por parte dos afídeos tem sido demonstrada por estudos com afídeos desprovidos de bactérias, chamados de afídeos apossimbióticos. Esses afídeos podem ser gerados pelo uso de antibióticos orais ou injetados na hemolinfa. Afídeos apossimbióticos se desenvolvem de maneira bem lenta e tem poucos ou nenhum descendente. Esses estudos evidenciam a importância nutricional que o simbionte tem para o pulgão. Esse gênero de bactéria não foi encontrado em nenhum *habitat* que não seja os micetócitos dos pulgões. Estudos sugerem que a *Buchnera* sp. é capaz de sintetizar metionina, cisteína e triptofano e suprir esses aminoácidos ao seu hospedeiro.

3.4.2 Endossimbiontes secundários

Alguns membros de várias famílias de afídeos, incluindo Aphididae, Lachnidae, Drepanosiphidae e Pemphigidae apresentam simbiontes secundários (BAUMANN et al., 1995). Esses simbiontes são facultativos e, diferentemente dos endossimbiontes primários, eles não estão restritos a um tipo de célula e não são essenciais para a sobrevivência do afídeo. Essas bactérias foram relatadas em uma variedade de tipos de células, tais como, células de órgãos reprodutivos, células do intestino e na hemolinfa (GRIFFITHS; BECK, 1973; McLEAN; HOUK 1973; FUKATSU et al., 2000). Também podem ser encontradas em micetócitos secundários, tipo de célula semelhante aos micetócitos primários que abrigam *Buchnera* sp. (HINDE, 1971; FUKATSU et al., 2000).

O pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae) é uma espécie utilizada como modelo para o estudo de bactérias endossimbiontes facultativas, embora estudos tenham sido realizados com espécies do gênero de endobactéria *Arrenophonus* em psilídeos e em outros artrópodes (DALE et al., 2006; HANSEN et al., 2007). No pulgão da ervilha, pelo menos cinco diferentes táxons de endossimbiontes secundários foram registrados em populações naturais em todo o mundo (CHEN; PURCELL, 1997; FUKATSU et al., 2000; SANDSTROM et al., 2001; TSUCHIDA et al., 2002; RUSSELL et al., 2003; DARBY et al., 2006) e estão envolvidos em uma ampla clade (filogenia) de bactéria. Três espécies de endossimbiontes secundários de pulgões, *Serratia symbiotica* (também conhecido como tipo R,

S-sym, PASS - pea aphid secondary symbiont), *Hamiltonella defensa* (também conhecido como tipo T, PABS – pea aphid *Bemisia*-like symbiont) e *Regiella insecticola* (também conhecida por tipo U, PAUS), pertencem à subdivisão gama-3 da proteobactéria, enquanto PAR é uma *Rickettsia* sp. (RUSSELL; MORAN, 2005) e a quinta bactéria relacionada a pulgões é um Spiroplasma que se encontra em baixas densidades (FUKATSU et al., 2000).

A transmissão vertical de bactérias endossimbiontes secundária, via ovários da mãe para seus filhos, já foi descrita e a transmissão horizontal, por meio de parasitoides, dietas artificiais e com uso de microseringas, também é possível (CHEN, PURCELL, 1997; DARBY; DOUGLAS, 2003; VORBURGER, 2008;). Alguns estudos apontam benefícios conferidos por esses microrganismos, envolvendo resistência a inimigos naturais, tolerância ao calor e utilização da planta hospedeira. Estudos com PABS, na espécie de pulgão *A. pisum*, revelaram que entre 37 e 90% dos indivíduos apresentam esta bactéria e não foi detectado diferença entre a *fitness* de afídeos que hospedam a bactéria e os que não possuem a bactéria em condições de campo (DARBY; DOUGLAS, 2003; DARBY et al., 2006). Chen et al. (2000) evidenciaram que, com infecção artificial em pulgões da ervilha com PASS (R) ou PAR, obtiveram-se efeitos neutros ou negativos nos componentes do *fitness* do hospedeiro. Um único clone de uma espécie relacionada, *Acyrtosiphon kondoi* Shinji, apresentou uma severa redução do *fitness* após a injeção dessas bactérias. Entretanto, afídeos que foram infectados artificialmente com PASS (R) foram, na maioria dos casos, mais hábeis na recuperação por estresse por calor do que os mesmos clones, sem o endossimbionte secundário. Já Tsuchida et al. (2006) afirmaram, em seus estudos, que a presença do endossimbionte *R. insecticola* permitiu que *A. pisum* utilizasse o trevo branco como planta hospedeira, o que não foi possível pelos afídeos que não apresentavam este simbionte.

Oliver et al. (2003) estudaram o impacto de PASS (R), PABS (T), e PAUS (U), em resposta a um único clone de *A. pisum* ao ataque do parasitoide, e observou que afídeos com PABS (T) tiveram duas vezes mais chances de sobreviver ao parasitismo de *Aphidius ervi* Haliday do que o controle. Os afídeos com PASS (R) demonstraram menor aumento na sobrevivência de afídeos ao parasitismo, enquanto PAUS (U) não mostrou nenhum efeito. Desta forma, os resultados de Oliver et al. (2003) demonstraram que *S. symbiotica* é capaz de promover resistência dos pulgões aos seus parasitoides. Posteriormente, foi observado o mesmo efeito nas bactérias *H. defensa* (OLIVER et al., 2003) e *R. insecticola* (VORBURGER et al., 2010).

3.5 Competição mediada por inimigo natural

Insetos fitófagos e seus inimigos naturais constituem um dos maiores e mais diversificados grupos de organismos da Terra. Processos ecológicos, em particular os efeitos indiretos negativos mediados por inimigos naturais em comum, podem ser importantes na estruturação de comunidades de insetos fitófagos (VAN VEEN et al., 2006). Essas interações surgem quando o efeito de uma espécie em outra é mediada pela ação de uma terceira espécie (WOOTTON, 1994; ABRAMS, 1995). Se a população de uma das espécies aumenta abundantemente em densidade, em consequência, a segunda espécie vai sofrer aumento na mortalidade (MULLER; GODFRAY, 1997).

Alguns autores (JEFFRIES; LAWTON, 1984; GODFRAY, 1994) sugerem que comunidades de herbívoros se estruturam com base no compartilhamento de predadores e parasitoides (Figura 1). A competição pode ser envolvida, por exemplo, na substituição de hospedeiros suscetíveis por outros mais resistentes que podem sustentar uma carga parasitária mais elevada. No entanto, os resultados podem ser inconclusivos em grande parte porque os efeitos transmitidos, através de parasitoides compartilhados, são muitas vezes confundidos pela competição por recursos (MARVIER, 1998).

Grande parte dos organismos está associada a patógenos que podem apresentar efeito significativo na abundância da população e na persistência no ambiente de seus hospedeiros. A associação de patógenos a uma espécie pode influenciar outras populações da comunidade, sendo por compartilharem o patógeno ou pela interação, direta ou indireta, com a espécie atacada e, portanto, sofrendo alterações na sua abundância populacional (POPE et al., 2002).

Interações entre guildas de inimigos naturais diferentes são potencialmente importantes para a dinâmica da comunidade de hospedeiros, e várias relações intraguilda foram descritas entre parasitoides de pulgões e microrganismos, quando este último se comporta como patógeno (HOCHBERG; LAWTON, 1990; ROY; PELL, 2000; POPE et al., 2002) ou endossimbionte da planta hospedeira (HOLT 1977, BEGON et al., 1992, BROWN; HASTINGS, 2003, POWER; MITCHELL, 2004). Entretanto, para relações microrganismo-hospedeiro em que o microrganismo é um endossimbionte do afídeo, ainda não existem relatos.

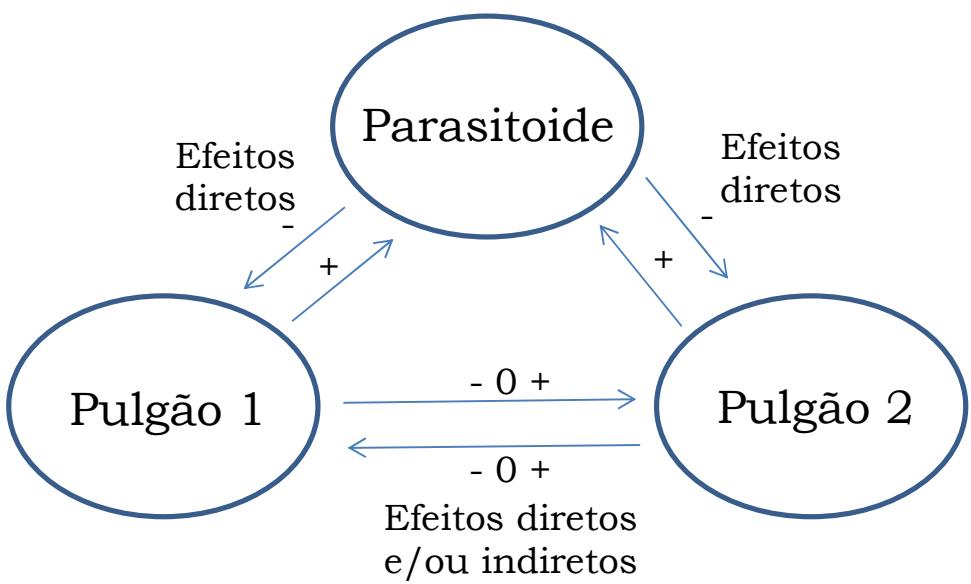


Figura 1. Interação parasitoide e duas espécies de pulgões hospedeiras. Efeitos diretos e/ ou indiretos, sendo estes negativos (-), positivos (+) ou neutros (0) entre os indivíduos. Fonte: elaborado pelo autor.

4 REFERÊNCIAS

- ABRAMS, P. A. Implications of dynamically variable traits for identifying, classifying, and measuring direct and indirect effects in ecological communities. **The American Naturalist**, Chicago, v. 146, n. 1, p. 112-134, 1995.
- ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Passive protection of eggs from the parasitoid *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*. **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 789-795, 1994.
- BAUMANN, P.; BAUMANN, L., LAI, C. Y.; ROUHBAKSH, D.; MORAN, N. A.; CLARK, M. A. Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto , v. 49, n. 1, p. 55-94, 1995.
- BEGON, M.; BOWERS, R. G.; KADIANAKIS, N.; HODGKINSON, D. E. Disease and community structure: the importance of host self-regulation in a host-host-pathogen model. **The American Naturalist**, Chicago, p. 1131-1150, 1992.
- BELLOWS, T. S. Restoring population balance through natural enemy introductions. **Biological Control**, Orlando, v. 21, n. 3, p. 199-205, 2001.
- BERNAL, J.; GONZÁLEZ, D. Reproduction of *Diaeretiella rapae* on Russian wheat aphid hosts at different temperatures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 82, p. 159-166, 1997.
- BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. P. **Aphids on the world's crops:** an identification and information guide, 2^a. ed. Chichester: J. Wiley & Sons, 2000. 466 p.
- BLACKMAN R.L; EASTOP V.F. Taxonomic Issues. In: van EMDEN HF, HARRINGTON R, (eds). **Aphids as Crop Pests**. Cambridge: CAB International. p. 1-30. 2007
- BLUMBERG, D.; LUCK, R. F. Differences in the rates of superparasitism between two strains of *Comperiella bifasciata* (Howard) (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitizing California red scale (Homoptera: Diaspididae): an adaptation to circumvent encapsulation. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 83, n. 3, p. 591-597, 1990.
- BLUMBERG, D. Parasitoid encapsulation as a defense mechanism in the Coccoidea (Homoptera) and its importance in biological control. **Biological control**, Orlando, v. 8, n. 3, p. 225-236, 1997.
- BORNER, C.; SCHILDER, F. A. Aphidoidea Blattlause. **Sorauer Handbook Pfl. Krankh. Ed**, Berlin, v. 4, p. 551-715, 1932.
- BROWN, D. H.; HASTINGS, A. Resistance may be futile: dispersal scales and selection for disease resistance in competing plants. **Journal of theoretical biology**, London, v. 222, n. 3, p. 373-388, 2003.

BUENO, V. H. P.; SAMPAIO, M. V. Desenvolvimento e multiplicação de parasitoides de pulgões. **Controle biológico de pragas:** produção massal e controle de qualidade. Lavras: Editora UFLA, v. 429, p. 117-167, 2009.

BUENO, V. H. P.; SOUZA, B. M. Ocorrência e diversidade de predadores e parasitoides em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) em Lavras, MG, Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia, Anais ...**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.5-18, 1993.

CADE, W. Acoustically orienting parasitoids: fly phonotaxis to cricket song. **Science**, Washington, v. 190, n. 21, p. 1312-1313, 1975.

CARVER, M. Biological control of aphids. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **Aphids:** their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier, p. 141-165, 1988.

CARVER, M.; SULLIVAN, D. J. Encapsulative defence reactions of aphids (Hemiptera: Aphididae) to insect parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae and Aphelinidae). **Ecology and Effectiveness of Aphidophaga**, Teresin, v. 48, n. 3, p. 299-303, 1988.

CHEN, D. Q.; MONTLLOR, C. B.; PURCELL, A. H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. **Entomologia experimentalis et applicata**, Amsterdam, v. 95, n. 3, p. 315-323, 2000.

CHEN, D.Q.; PURCELL, A. H. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. **Current microbiology**, New York, v. 34, n. 4, p. 220-225, 1997.

CVIDANES, F. J. Impacto de Inimigos Naturais e de Fatores Meteorológicos Sobre Uma População de *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) em Couve. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 249-255, 2002.

CVIDANES, F. J.; SOUZA, V. P. Distribuição vertical de pulgões (Hemiptera: Aphididae) em couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 254-256, 2004.

DALE, C., BEETON; M.; HARBISON, C., JONES, T.; PONTES, M. Isolation, pure culture, and characterization of “*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*,” an intracellular secondary endosymbiont from the Hippoboscid Louse fly *Pseudolynchia canariensis*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2997-3004, 2006.

DARBY, A. C., BIRKLE, L. M., TURNER, S. L.; DOUGLAS, A. E. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 43-50, 2006.

DARBY, A. C.; DOUGLAS, A. E. Elucidation of the transmission patterns of an insect-borne bacterium. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4403-4407, 2003.

DEBOLT, JACK W. Behavioral Avoidance of Encapsulation by *Leiophron uniformis* (Hymenoptera: Braconidae), a Parasitoid of *Lygus spp.* (Hemiptera: Miridae): Relationship between Host Age, Encapsulating Ability, and Host Acceptance. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 84, n. 4, p. 444-446, 1991.

DIXON, A. F. G. **Biology of aphids**. London: Edward Arnold, 55 pp. 1973.

DOUT, R. L. The biology of parasitic Hymenoptera. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 4, n. 1, p. 161-182, 1959.

EIRAS, A. E.; GERK, A. O. Cairomônios e aprendizagem em parasitoides. **Feromônios de insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 206 p, p. 127-134, 2001.

ELLIOTT, N.C.; BURD, J. D.; KINDLER, S. D.; LEE, J. H. Temperature effects on development of three cereal aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae). **The Great Lakes Entomologist**, East Lansing, v. 28, n. 3, p. 137-142, 1995.

FUKATSU, T., NIKOH, N., KAWAI; R.; KOGA, R. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 2748-2758, 2000.

FURIATTI, R.S.; LÁZZARI, S.M.N.; ALMEIDA, A.M.R. Técnica para a detecção de carboxilase em *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae). In: **Congresso Brasileiro de Entomologia, Anais ...**, Curitiba, v.25, n.1, p.151-152, 1996.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L; BATISTA, G.C.; FILHO; E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C., LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. 2002. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p.

GRIFFITHS, D. C. The development of *Monoctonus palidum* Marshall (Hymenoptera, Braconidae) in *Nasonia ribis-nigri* on lettuce and immunity reactions in other lettuce aphids. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 52, n. 1, p. 147-163, 1961.

GRIFFITHS, G. W.; BECK, S. D. Intracellular symbionts in the pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 19, p. 75–84, 1973.

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

GROSS, P. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 38, n. 1, p. 251-273, 1993.

GWYNN, D. M., CALLAGHAN, A., GORHAM, J., WALTERS, K. F. A., FELLOWES, M. D. E. Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea

aphid. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Edinburgh v. 272, n. 1574, p. 1803-1808, 2005.

HÅGVAR, E. B.; HOFSVANG, T. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae): biology, host selection and use in biological control. **Biocontrol News and Information**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 13-42, 1991.

HANSEN, A. K.; JEONG, G.; PAINE, T. D.; STOUTHAMER, R. Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 73, n. 23, p. 7531-7535, 2007.

HANSEN, A. K.; VORBURGER, C.; MORAN, N. A. Genomic basis of endosymbiont conferred protection against an insect parasitoid. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, NY, v. 22, n. 1, p.106-114. 2012.

HENTER, H. J.; VIA, S. The potential for coevolution in a host parasitoid system. I. genetic variation within an aphid population in susceptibility to a parasitic wasp. **Evolution**, Chicago, v. 49, p. 427-438, 1995.

HOCHBERG, M. E.; LAWTON, J. H. Competition between kingdoms. **Trends in Ecology & Evolution**, Chicago, v. 5, n. 11, p. 367-371, 1990.

HOLT, R. D. Predation, apparent competition, and the structure of prey communities. **Theoretical population biology**, New York, v. 12, n. 2, p. 197-229, 1977.

HOUK, E. J.; GRIFFITHS, G. W. Intracellular symbionts of the Homoptera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 25, n. 1, p. 161-187, 1980.

HSAIO, T. H. Studies of interactions between alfalfa weevil strains, *Wolbachia endosymbionts* and parasitoids. **Systematics association special volume**, Oxford, v. 53, p. 51-72, 1996.

HUBAIDE, J. E. A. **Distribuição na planta, fatores climáticos e parasitismo na dinâmica populacional de pulgões (Hemiptera: Aphididae) em couve**. 2011, 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

JEFFRIES, M. J.; LAWTON, J. H. Enemy free space and the structure of ecological communities. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 23, n. 4, p. 269-286, 1984.

KRAAIJVELD, A. R.; VAN ALPHEN, J. J. M.; GODFRAY, H. C. J. The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. **Parasitology**, Cambridge, v. 116, n. S1, p. S29-S45, 1998.

MARVIER, M. A. Parasite impacts on host communities: plant parasitism a California coastal prairie. **Ecology**, Tempe, v. 79, n. 8, p. 2616-2623, 1998.

MCLEAN, D. L.; HOUK, E. J. Phase contrast and electron microscopy of the mycetocytes and symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 625-633, 1973.

MINKS A. K., HARREWIJN P., eds. **Aphids: their biology, natural enemies and control**, Amsterdam: Elsevier, 1988

MORAN, N. A., RUSSELL, J. A., KOGA, R.; FUKATSU, T. Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 6, p. 3302-3310, 2005.

MOREAU, S. J. M. Relationships between parasitoid Hymenoptera and the immune system of their hosts: The “active” and “passive” mechanisms redefined. In: **Annales de la Societe Entomologique de France**. Societe Entomologique, v. 39, n. 4, p. 305-314. 2003

MULLER, C. B.; GODFRAY, H. C. J. Apparent competition between two aphid species. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, p. 57-64, 1997.

MUSSURY, R. M.; FERNANDES, W. D. Occurrence of *Diaeretiella rapae* (Mc'Intosh, 1855) (Hymenoptera: Aphidiidae) parasitising *Lipaphis pseudobrassicae* (Kaltenbach, 1843) and *Brevicoryne brassicae* (L. 1758) (Homoptera: Aphididae) in *Brassica napus* in Mato Grosso do Sul. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 1, p. 41-46, 2002.

OLIVER, K. M.; MORAN, N. A. Defensive symbionts in aphids and other insects. In: WHITE, J. F.; TORRES, M. S. **Defensive mutualism in microbial symbiosis**. CRC, v. 27, p. 129-148, 2009.

OLIVER, K. M.; RUSSELL, J. A.; MORAN, N. A.; HUNTER, M. S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 4, p. 1803-1807, 2003.

OLIVEIRA, R. S., SAMPAIO, M. V., FERREIRA, S. E.; RIBEIRO, L. C. M.; TANNÚS-NETO, J. Low parasitism by *Diaeretiella rapae* (Hym.: Braconidae) of *Lipaphis pseudobrassicae* (Hemip.: Aphididae): pre-or post-ovipositional host resistance? **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 79-91, 2013.

PARRA, J.R.P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. Barueri: Manole, 2002. 609 p.

PEÑA-MARTÍNEZ, R. **Afidos como vectores de virus en Mexico**. Montecillo, Centro de Fitopatología, 1992, 135 p.

PIKE, K. S.; STARÝ, P.; MILLER, T.; ALLISON, D.; GRAF, G.; BOYDSTON, L.; MILLER, R.; GILLESPIE, R. Host range and habitats of the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae) in Washington state. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 28, n. 1, p. 61-71, 1999.

POPE, T.; CROXSON, E.; PELL, J. K.; GODFRAY, H. C. J.; MÜLLER, C. B. Apparent competition between two species of aphid via the fungal pathogen *Erynia neoaphidis* and its interaction with the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. **Ecological Entomology**, London, v. 27, n. 2, p. 196-203, 2002.

POWER, A. G.; MITCHELL, C. E. Pathogen spillover in disease epidemics. **The American Naturalist**, Chicago, v. 164, n. S5, p. S79-S89, 2004.

PRICE, P. W.; WESTOBY, M.; RICE, B.; ATSATT, P. R.; FRITZ, R. S.; THOMPSON, J. N.; MOBLEY, K. Parasite mediation in ecological interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 17, n. 1, p. 487-505, 1986.

REHMAN, A.; POWELL, W. Host selection behavior of aphid parasitoids (Aphidiidae: Hymenoptera). **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, Victoria Island, Lagos, v. 2, n. 10, p. 299-311, 2010.

ROITBERG, B. D.; MYERS, J. H. Behavioral and physiological adaptations of pea aphids (Homoptera: Aphididae) to high ground temperatures and predator disturbance. **The Canadian Entomologist**, Québec, v. 111, n. 04, p. 515-519, 1979.

ROY, H. E.; PELL, J. K. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 737-752, 2000.

RUSSELL, J. A.; LATORRE, A.; SABATER-MUÑOZ, B.; MOYA, A.; MORAN, N. A. Side stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 1061-1075, 2003.

RUSSELL, J. A.; MORAN, N. A. Horizontal transfer of bacterial symbionts: heritability and fitness effects in a novel aphid host. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 7987-7994, 2005.

SANDSTRÖM, J. P.; RUSSELL, J. A.; WHITE, J. P.; MORAN, N. A. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 217-228, 2001.

SCHELT, J. van; DOUMA, J.B.; RABENSBERG, W.J. Recent development in the control of aphids in sweet peppers and cucumbers. In: LENTEREN, J.C. van (ed). Integrated control in glasshouse, Borgonha, **IOBC/WPRS**, v.13, p. 190-193, 1990.

SOUZA, B. M. de; BUENO, V. H. P. Parasitóides e hiperparasitóides de múnias de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera – Homoptera – Aphididae). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 67, p. 55-62, 1992.

STARÝ, P. Aphidiidae. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Ed.) **Aphids: their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, p. 171-184, 1988.

STARÝ, P.; SAMPAIO, M. V.; BUENO, V. H. P. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo. v. 51, n. 1, p. 107-118, 2007.

STARÝ, P. Alternative host and parasitoid in first method in aphid pest management in glasshouses. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 116, p. 187-191, 1993.

STOLTZ, D. B.; VINSON, S. B.. Viruses and parasitism in insects. **Advances in virus research**, San Diego, v. 24, p. 125-171, 1979.

TSUCHIDA, T.; KOGA, R.; SHIBAO, H.; MATSUMOTO, T.; FUKATSU, T. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 2123-2135, 2002.

VAN DRIESCHE, R.; HODDLE, M.; CENTER, T. **Control of pests and weeds by natural enemies:** an introduction to biological control. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

VAN VEEN, F. J.; MORRIS, R. J.; GODFRAY, H. C. J. Apparent competition, quantitative food webs, and the structure of phytophagous insect communities. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 51, p. 187-208, 2006.

VAZ, L. A. L.; TAVARES, M. T.; LOMÔNACO, C. Diversidade e tamanho de himenópteros parasitoides de *Brevicoryne brassicae* L. e *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 225-230, 2004.

VET, L. E.; HEMERIK, L.; VISSER, M. E.; WÄCKERS, F. L.; LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J. F.; SUKHDEO, M. V. K. **Flexibility in host-search and patch-use strategies of insect parasitoids**. CABI Publishing, 2002.

VINSON, S. B.; IWANTSCH, G. F. Host suitability for insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 25, n. 1, p. 397-419, 1980.

VORBURGER, C.; GEHRER, L.; RODRIGUEZ, P. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. **Biology letters**, London, v. 6, n. 1, p. 109-111, 2010.

WEAVER, R. J.; MARRIS, G. C.; BELL, J.; EDWARDS, J. P. Identity and mode of action of host endocrine disrupters from the venom of parasitoid wasps. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 126, p. S101, 2001.

WOOTTON, J. Timothy. The nature and consequences of indirect effects in ecological communities. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, p. 443-466, 1994.

CAPÍTULO 2

Resistência de *Lipaphis pseudobrassicae* ao parasitoide *Diaeretiella rapae*: biótipo ou simbiose?

1 RESUMO

O pulgão *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Hemiptera: Aphididae) é uma importante praga das brássicas e na região de Uberlândia, Minas Gerais, este afídeo apresenta baixas porcentagens de parasitismo, por ser resistente ao parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh). Não se sabe se a resistência é causada por fatores genéticos do indivíduo ou por associações benéficas com microrganismos. O objetivo deste trabalho foi verificar se a resistência de *L. pseudobrassicae* é causada pelo biótipo do indivíduo ou pela associação com organismos endossimbiontes secundários. Para a criação, os afídeos foram mantidos em discos foliares posicionados sobre a solução de ágar/água a 1% em placas de Petri (10 cm de diâmetro). Os parasitoides foram multiplicados em ninfas de segundo instar de *Myzus persicae* (Sulzer). Foram identificados, ainda, clones resistentes e suscetíveis ao parasitoide; avaliada a influência do superparasitismo na resistência; a perda de resistência na progênie; a presença de estruturas de encapsulamento do parasitoide em pulgões parasitados e realizados testes moleculares para comparar a composição de simbiontes em clones resistentes e suscetíveis. Foi verificado que, nos clones suscetíveis, o parasitismo variou de 47 a 67% e no clone resistente o parasitismo foi zero. O superparasitismo não alterou a resistência, porém pulgões resistentes, que receberam três oviposições, apresentaram maior proporção de indivíduos com alterações provocadas pelo parasitismo do que aqueles que receberam uma oviposição de *D. rapae*. Foi possível verificar que 6,7% dos indivíduos da prole do clone resistente perderam a resistência. Além disso, não foram encontradas estruturas que indicassem o encapsulamento de ovos ou larvas dos parasitoides nos pulgões resistentes. Os testes moleculares não indicaram diferença na composição das bactérias simbiontes em pulgões resistentes e suscetíveis do mesmo clone. Por fim, os resultados indicam que a resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* existe devido à presença de endossimbiontes secundários.

Palavras-chave: afídeo, brássica, controle biológico, defesa do hospedeiro.

2 ABSTRACT

Resistance of *Lipaphis pseudobrassicae* to the parasitoid *Diaeretiella rapae*: biotype or symbiosis?

The aphid *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Hemiptera: Aphididae) is an important pest of Brassicaceae plants, and in Uberlândia, Minas Gerais, this aphid has low percentages of parasitism because of its resistance to the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntosh). It is unknown if the resistance is caused by genetic factors or by beneficial associations with microorganisms. The aim of this study was to determine whether the resistance of *L. pseudobrassicae* is caused by individual biotype or by association with secondary endosymbionts organisms. For the rearing, the aphid *L. pseudobrassicae* was retained in leaf discs positioned on 1% agar/water solution in Petri dishes (10 cm diameter). The parasitoids were multiplied in second instar nymphs of *Myzus persicae* (Sulzer). We identified clones resistant and susceptible to parasitoid, analyzed the influence of superparasitism in the resistance, the loss of resistance in the aphid's progeny, the presence of encapsulation structures of the parasitoid in parasitized aphids, and conducted molecular tests to compare the composition of symbionts in resistant and susceptible clones. It was found that in susceptible clones parasitism ranged from 47 to 67% and the parasitism in resistant clone was zero. Superparasitism did not alter the resistance; however, aphids resistant that received three ovipositions had a higher proportion of individuals with changes caused by parasitism than those who received one oviposition of *D. rapae*. It was verified the loss of the resistance in 6.7% of the progeny of resistant clone. There were no structures that indicate the encapsulation of eggs or larvae of parasitoid in resistant aphids. Molecular tests indicated no difference in the composition of symbiotic bacteria between resistant and susceptible aphids of the same clone. The results indicate that the cause of *L. pseudobrassicae*'s resistance to the parasitoid *D. rapae* is due to the presence of secondary endosymbionts.

Keywords: aphid, Brassicaceae, biological control, host defense

3 INTRODUÇÃO

Parasitoides são importantes inimigos naturais que depositam seus ovos no interior ou exterior de seu hospedeiro e, já que o adulto é de vida livre, matam-no, final da fase imatura. Quando a oviposição é feita no interior do hospedeiro, este pode apresentar mecanismos para se defender do ataque do parasitoide (GODFRAY, 1994). Esses artifícios estão relacionados à resistência fisiológica, ou seja, à habilidade do hospedeiro em prevenir o desenvolvimento do parasitoide após a oviposição. A resistência do hospedeiro é um importante parâmetro da adequação do hospedeiro, afetando diretamente a eficácia e o estabelecimento dos parasitoides no campo (VORBURGER et al., 2009).

A resistência fisiológica contra parasitoides, mais comumente encontrada em insetos, está relacionada às características genéticas do hospedeiro. Algumas células reconhecem o parasitoide como um corpo estranho e se aderem ao ovo ou à larva, promovendo sua ruptura. Esta é uma resposta celular denominada encapsulamento, na qual o parasitoide é morto por asfixia ou pela liberação de substâncias que promovem sua necrose (GRIFFITHS, 1961; CARVER; SULLIVAN, 1988). A capacidade de encapsular os ovos dos parasitoides pode variar em função da população do hospedeiro, uma vez que está relacionada às características de cada genótipo (KRAAIJEVELD et al., 1998). Embora poucos casos tenham sido relatados, o encapsulamento é um mecanismo de defesa encontrado em algumas espécies de afídeos (GRIFFITHS, 1961; CARVER, 1985; CARVER; SULLIVAN, 1988). No entanto, não é o único meio de resistência, já que a presença de simbiontes secundários pode promover a resistência em afídeos contra seus parasitoides preferindo o encapsulamento (OLIVER et al., 2003; FERRARI et al., 2004; OLIVER et al., 2005).

Insetos e outros artrópodes são geralmente infectados com endossimbiontes. Os afídeos, especificamente, apresentam grande variedade de microrganismos associados (OLIVER et al., 2003). O simbionte obrigatório *Buchnera aphidicola* é essencial para a sobrevivência do pulgão por produzir aminoácidos, auxiliando, assim, na nutrição do hospedeiro (DOUGLAS, 1999), mas esse é apenas um dos benefícios da simbiose para o inseto. Além do endossimbionte obrigatório, podem estar associados aos afídeos endossimbiontes secundários que podem trazer muitos benefícios, dentre eles destaca-se a resistência contra parasitoides (OLIVER et al., 2003).

A resistência relacionada à presença de simbiontes é também designada como um tipo de resistência fisiológica. As bactérias endossimbiontes secundárias identificadas em afídeos, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola* e *Serratia symbiotica*, têm demonstrado capacidade expressiva em elevar a resistência dos afídeos aos parasitoides (OLIVER et al., 2003; FERRARI et al., 2004; OLIVER et al., 2005; OLIVER et al., 2006; DOUGLAS, 2009; VON BURG et al., 2008; VORBURGER et al., 2009; OLIVER et al., 2010; VORBURGER et al., 2010). Esses estudos demonstraram que a variação na resistência ao parasitoide está relacionada aos simbiontes herdados e não ao genoma do afídeo. A associação com endossimbiontes secundários que conferem resistência aos parasitoides foi descrita apenas para populações de pulgões das espécies *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (HENTER; VIA, 1995; HUFBAUER; VIA, 1999; FERRARI et al., 2001), *Myzus persicae* (Sulzer) (VORBURGER et al., 2008; VON BURG et al., 2008) e *Aphis fabae* Scopoli (VORBURGER et al., 2009).

Estudos realizados em várias partes do mundo revelam que *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) é considerado o principal hospedeiro de *Diaeretiella rapae* (McIntosh) (DESH; CHAND, 1998; AKHTAR et al., 2010). Entretanto, Hubaide (2011) encontrou taxa de parasitismo em *L. pseudobrassicae* no campo inferior a 10% a qual foi elucidada por Oliveira et al. (2013) como resistência fisiológica de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae*. No entanto, esses autores não determinaram a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide.

Tanto a resistência pela presença de endossimbiontes, quanto aquela relacionada aos biótipos, são conhecidas em poucas espécies de pulgões e nenhuma das duas foi identificada em *L. pseudobrassicae*. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo verificar, por meio de ensaios biológicos e moleculares, se a causa da resistência neste afídeo está relacionada à presença de endossimbiontes ou a características ligadas aos genótipos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de condução dos experimentos

Os experimentos relacionados a testes biológicos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia - Controle Biológico, e as análises moleculares foram realizadas no Laboratório Multusuário do programa de Pós-Graduação em Agronomia, ambos localizados na Universidade Federal de Uberlândia.

4.2 Produção de mudas para obtenção dos discos foliares

As mudas de couve, variedade Manteiga da Geórgia, foram cultivadas em casa de vegetação. Foram utilizadas bandejas de isopor com 128 células preenchidas com substrato orgânico. Em cada célula foram semeadas duas sementes de couve, e esperou-se a emergência das plântulas. Quando se apresentavam com um par de folhas definitivas, realizou-se o transplantio para vasos plásticos (15 cm de altura e 13 cm de diâmetro), contendo substrato orgânico. As plantas foram submetidas à irrigação diária, e as mudas foram monitoradas para evitar a ocorrência de outras pragas que foram controladas manualmente.

4.3 Obtenção e multiplicação dos pulgões e dos parasitoides

A fim de obter diferentes clones de *L. pseudobrassicae* resistentes e suscetíveis ao parasitoide *D. rapae*, foram realizadas coletas de pulgões na casa de vegetação do *Campus Umuarama* da Universidade Federal de Uberlândia e em duas lavouras comerciais de couve-manteiga em Uberlândia (coordenadas de 18° 54' 0.566" S 48° 17' 10.349" W e 18° 54' 0.148" N 48° 17' 10.543" W). A partir dos pulgões coletados, foram individualizadas 27 fêmeas ápteras adultas de *L. pseudobrassicae*, a qual cada uma deu origem a um clone, garantindo, assim, que sua prole fosse formada por indivíduos geneticamente idênticos. Para isso, cada afídeo foi individualizado em uma placa de Petri (100 mm de diâmetro) e mantido para criação em câmara climática até que uma colônia fosse formada. Colônias de cada clone foram mantidas isoladas em laboratório, por até cinco meses, em discos foliares de couve posicionados sobre uma camada

de 10 mm de altura de ágar 1% cobrindo todo o fundo de uma placa de Petri. Tanto para a criação de manutenção dos diferentes clones de pulgões, quanto para a criação de parasitoides foram utilizados discos foliares de 90 mm e placas de Petri de 100 mm de diâmetro. Já para os experimentos, foram utilizados discos foliares de 40 mm e placas de Petri de 50 mm de diâmetro. Tanto as criações, quanto os experimentos foram realizados em câmaras climáticas a 23°C, 50-55% UR e 12 h de fotofase.

Os parasitoides foram obtidos de múmias de *M. persicae* coletadas na casa de vegetação e multiplicados em ninfas de 2º instar desta mesma espécie de hospedeiro. Para a obtenção dessas ninfas de 2º instar, pulgões adultos foram colocados em placas de Petri, contendo um disco foliar de couve e retirados após 24 horas, mantendo-se apenas as ninfas de 1º instar. Mais 24 horas depois, as ninfas se encontravam no 2º instar e foram utilizadas na multiplicação de *D. rapae*. De 30 a 50 ninfas de 2º instar de *M. persicae* foram colocadas em disco foliar de couve em placa de Petri de 100 mm. Uma fêmea acasalada de *D. rapae* foi liberada na placa e mantida por duas horas. Após este período, a fêmea foi retirada e as ninfas mantidas em câmara climática (23°C e 12 h de fotofase) até a formação das múmias. Foi realizada a individualização das múmias em tubos eppendorf (1,5 mL) e, após a emergência dos parasitoides, adicionado mel 50% e água. Para reduzir os efeitos da variabilidade genética dos parasitoides utilizados nos experimentos (HENTER, 1995), esses foram originados de um único casal, formando assim, uma isolinhagem de *D. rapae* segundo metodologia de Ferrari et al. (2001). Foram utilizadas duas isolinhagens do parasitoide: uma para o teste de seleção de clones resistentes e outra para os testes de influência do superparasitismo na resistência e da perda da resistência na progênie.

4.4 Seleção inicial de clones resistentes e suscetíveis

Para seleção inicial, pulgões adultos de cada clone foram mantidos em placa de Petri contendo disco foliar de couve para a padronização e obtenção de ninfas de segundo instar, de acordo com a metodologia descrita anteriormente para a padronização das ninfas de segundo instar de *M. persicae* para a multiplicação dos parasitoides. A utilização de ninfas de segundo instar de *L. pseudobrassicae* visou facilitar a identificação dos clones suscetíveis, já que a resistência fisiológica é menor em pulgões de primeiro e segundo instares (WALKER; HOY

2003; XU et al., 2008), e os resultados obtidos até o momento sugerem que a população em estudo seja formada por maioria de indivíduos resistentes (OLIVEIRA et al., 2013).

Uma fêmea, previamente acasalada de *D. rapae*, foi liberada na placa contendo 10 ninfas de 2º instar de um mesmo clone e observada sob microscópio estereoscópico. Após todos os pulgões receberem uma oviposição, foram mantidos em câmara climática para a observação da formação de múmias durante um período de até dez dias. Como todos os indivíduos receberam uma oviposição do parasitoide, os clones potencialmente suscetíveis foram aqueles que se transformaram em múmia, e os potencialmente resistentes permaneceram vivos. Esta seleção inicial foi realizada para identificar possíveis clones resistentes e suscetíveis para posterior confirmação, com maior número de observações, no teste de seleção de clones resistentes e suscetíveis. Dos 27 clones avaliados na seleção inicial, em apenas dois houve formação de múmias.

4.5 Seleção de clones resistentes e suscetíveis

Como os pulgões se multiplicam por partenogênese telítoca (BLACKMAN; EASTOP, 2007), todos os filhos de um único indivíduo são clones idênticos, o que facilita a verificação da causa da resistência, por meio de testes biológicos.

Foram selecionados, então, quatro clones obtidos na seleção inicial (B2, B3, B6 e B7) baseado na resistência ou susceptibilidade que cada clone apresentou. Para cada um dos clones, foram individualizadas 60 ninfas de segundo instar em placas de Petri e submetidas a uma única oviposição por *D. rapae*. Cada fêmea do parasitoide parasitou seis ninfas as quais formaram uma repetição. Após todos os pulgões receberem uma oviposição, os mesmos foram mantidos individualizados em câmara climática para a observação da formação de múmias.

Foram realizadas observações diárias, durante 15 dias, este período foi suficiente para a emergência dos parasitoides. Foi avaliada a proporção de pulgões que atingiram a fase adulta, que reproduziram, que se transformaram em múmia (parasitismo); a proporção de pulgões que apresentaram sintoma de parasitismo e a mortalidade dos insetos antes do final das observações. O número de pulgões com sintoma de parasitismo foi a soma daqueles que mumificaram com aqueles que não mumificaram, porém, não atingiram a fase adulta e apresentavam o corpo

volumoso e globoso, sintomas típicos da ação do veneno dos parasitoides (SAMPAIO et al., 2007).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (clones de *L. pseudobrassicae*) e 10 repetições (cada uma delas formada pelas seis ninfas parasitadas por uma fêmea do parasitoide). A normalidade e homogeneidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, com o programa SPSS. As médias foram comparadas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.6 Efeito do superparasitismo na resistência

Os clones resistentes foram expostos a dois testes biológicos, o superparasitismo e a perda da resistência na prole. O superparasitismo pode reduzir a ação do encapsulamento, pois um maior número de ovos do parasitoide dificulta a ação das células de defesa do hospedeiro, fazendo com que alguns indivíduos não sejam encapsulados e consigam sobreviver (MACKAUFER; CHAU, 2001; VAN ALPHEN; VISSER, 1990). No entanto, evidências têm demonstrado que o superparasitismo não altera a resistência causada por endossimbionte (VORBURGER et al., 2010).

Este teste foi realizado para verificar se a resistência pode ser quebrada pelo superparasitismo, caracterizando a resistência celular relacionada ao genótipo do hospedeiro (VAN ALPHEN; VISSER, 1990). Uma fêmea acasalada de *D. rapae* foi liberada em uma placa contendo seis ninfas de 2º instar de *L. pseudobrassicae* resistente (clone B3, segundo os resultados do experimento anterior), as quais formaram uma repetição, e observada em microscópio estereoscópico. Após ovipositar uma única vez em cada ninfa, o parasitoide foi transferido para nova placa que continha outras seis ninfas de *L. pseudobrassicae*, até parasitar 12 pulgões. Os pulgões parasitados foram individualizados em placas com disco foliar de couve. Após a obtenção de 120 pulgões parasitados, metade foi mantida com uma única oviposição e a outra metade foi oferecida novamente aos parasitoides, no dia seguinte, para a obtenção de ninfas com três oviposições. Todos os pulgões, após receberem as oviposições, foram mantidos em câmara climática (23°C e 12 h de fotofase) para a observação da formação de múmias. Este procedimento foi repetido para a verificação da presença de estruturas de encapsulamento no interior dos pulgões resistentes, apesar de Oliveira et al (2013) não terem encontrado nenhuma

estrutura que indicasse o encapsulamento dos ovos ou larvas de *D. rapae* em *L. pseudobrassicae*. Desta forma, foram obtidos 11 e nove indivíduos do clone B3, e cinco e sete indivíduos do clone B6, com uma e três oviposições, respectivamente. Esses pulgões foram dissecados, cinco dias após a primeira oviposição, e foram verificadas a presença de larvas e ovos do parasitoide, além de observarmos se os mesmos estavam vivos, mortos ou encapsulados no interior do hospedeiro.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos (indivíduos submetidos a uma oviposição e indivíduos submetidos a três oviposições) e 10 repetições (cada uma formada por seis ninfas de *L. pseudobrassicae*). A normalidade e homogeneidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, com o programa SPSS. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.7 Perda de resistência na progênie

A prole de indivíduos resistentes foi testada para verificar se parte dela perdeu a resistência. A resistência associada à presença de simbiontes secundários pode ser perdida em alguns indivíduos, mesmo que sejam clones descendentes de uma única fêmea resistente. Isso se dá porque as bactérias acessórias associadas aos afídeos são transmitidas via ovários da mãe para seus filhos, entretanto essa transmissão não é perfeita. A variabilidade dessa associação sugere uma relação bastante instável entre os afídeos e os simbiontes secundários (CHEN; PURCELL, 1997; FUKATSU et al. 2000). Já para a resistência por defesa celular, esperava-se que clones de pulgões descendentes de uma única fêmea resistente sejam todos resistentes, já que essa resistência é genética (KRAAIJEVELD et al., 1998) e os clones são geneticamente idênticos.

Neste teste, foram utilizados pulgões do clone B3, obtidos da criação do clone por cinco meses em câmara climática. Segundo Chen e Purcell (1997), clones mantidos em criação por um longo período apresentam maiores chances de perda de resistência.

Foram individualizadas 60 ninfas de *L. pseudobrassicae*, de terceiro e quarto instar em placas com disco foliar, e uma fêmea acasalada de *D. rapae* foi liberada por placa. Cada fêmea ovipositiou em seis ninfas de *L. pseudobrassicae*. Todos os pulgões, após receberem a oviposição, foram mantidos em câmara climática para a observação da formação de mûmias.

Os instares mais avançados foram escolhidos para este experimento para que fosse possível obter a prole dos indivíduos suscetíveis (que perderam a resistência) após serem

parasitados. Caso o teste fosse feito em ninfas de 2º instar, as suscetíveis formariam múmias antes de reproduzir. Após o teste, a prole dos indivíduos parasitados de B3 foi dividida em “B3 que perderam a resistência” e “B3 que continuaram resistentes”, estes mantidos para criação em discos foliares em placas de Petri de 100 mm para serem utilizados em testes moleculares.

Um segundo teste para verificar a perda de resistência foi feito a partir 30 pulgões de segundo instar do clone resistente (B3) e 30 pulgões de segundo instar do clone suscetível (B6) individualizados em placas de Petri. Uma fêmea acasalada de *D. rapae* foi liberada na placa e observada em microscópio estereoscópico até que a ninfa recebesse apenas uma oviposição. Cada fêmea de *D. rapae* parasitou seis ninfas. Os afídeos foram deixados em câmara climática por três dias e depois dissecados para verificar a presença de larvas do parasitoide em seu interior e a presença de estruturas de encapsulamento. Os resultados foram apresentados na forma de porcentagem, e o clone B6 (suscetível) foi utilizado como tratamento controle.

4.8 Testes moleculares

Análises moleculares foram realizadas, visando comparar a composição de microrganismos endossimbiontes em clones resistentes e suscetíveis. Foram selecionados quatro clones obtidos na seleção inicial (B2, B3, B6 e B7).

A subunidade ribossomal 16S é um gene conservador utilizado comumente para caracterização filogenética de bactérias simbiontes de insetos (FUKATSU et al 2000; DARBY et al. 2001). O sequenciamento parcial ou PCR (reação em cadeia de polimerase) com primers específicos são utilizados para marcação de táxons específicos (Screening the bacterial symbiotic community).

Foram realizadas duas extrações de DNA. A primeira extração foi realizada com Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek), utilizando seis, doze e sessenta e seis pulgões dos quatro clones (B3, B7, B2 e B6). Na segunda extração de DNA, foram utilizados os afídeos do clone B3 resistentes e do clone B3 que perdeu a resistência após criação em laboratório por cinco meses (segundo resultados do experimento anterior). Foi utilizado DNeasy® Blood and Tissue Kit, de um e de doze indivíduos, seguindo metodologia de Ferrari et al. (2012).

Foi realizado um PCR para caracterização da região de 16S, para comprovar a presença de bactérias nas amostras de DNA extraídos. A mistura para os PCRs da primeira extração foram

5 µL de tampão, 3 µL de Mg, 10 µL de dNTP, 2,5 µL de cada primer, 0,4 µL de Taq e 2,0 µL de DNA. Para os PCRs feitos a partir da segunda extração foi utilizado BioMix Red 12,5 µL, 1 µL de DNA e 11,1 µL de água.

Foi testada a presença do endosimbionte obrigatório *Buchnera*, segundo metodologia de Tsuchida et al. (2002), visando comprovar a presença de endobactérias simbiontes nas amostras de DNA extraídos. Também foi verificada a presença das três espécies de bactérias endossimbiontes secundárias promotoras de resistência em pulgões, *H. defensa*, *R. insecticola* e *S. symbiotica*, e de grupos de bactérias comumente encontrados em afídeos, X-type, *Rickettsia* e *Spiroplasma*, segundo metodologia de Ferrari et al. (2012) (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de primers utilizados para PCR

Bactéria	Sequência de Primer
<i>Buchnera</i>	Forward: Buch16S1F GAGCTTGCTCTTTGTCGGCAA Reverse: Buch16S1R CTTCTGCGGGTAACGTCACGAA
γ -Proteobacteria (excluding <i>Buchnera</i>)	Forward: 10F 5'-AGT TTG ATC ATG GCT CAG ATT G-3' Reverse: 35R 5'-CCT TCA TCG CCT CTG ACT GC-3'
<i>Hamiltonella defensa</i>	Forward: 10F Reverse: T419R: 5'-AAA TGG TAT TCG CAT TTA TCG-3'
<i>Regiella insecticola</i>	Forward: 10F Reverse U443R: 5'-GGT AAC GTC AAT CGA TAA GCA-3'
<i>Serratia symbiotica</i>	Forward: 10F Reverse R443R: 5'-CTT CTG CGA GTA ACG TCA ATG-3'
X-type	Forward: 10F Reverse: 5'-GCA ACA CTC TTT GCA TTG CT-3'
<i>Rickettsia</i>	Forward: 16SA1 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' Reverse: 5'-TTT GAA AGC AAT TCC GAG GT-3'
<i>Spiroplasma</i>	Forward: 16SA1 Reverse: 5'-ATC ATC AAC CCT GCC TTT GG-3'

5 RESULTADOS

5.1 Seleção de clones resistente e suscetíveis

No teste para a seleção de clones resistentes e suscetíveis, o clone B3, considerado resistente na seleção inicial, apresentou a maior proporção de indivíduos que viraram adultos ($F = 42,60$; $p = 0,0000$; DMS = 0,21) que reproduziram ($F = 66,52$; $p = 0,0000$; DMS = 0,18), a menor proporção de parasitismo ($F = 43,38$; $p = 0,0000$; DMS = 0,18) e de indivíduos que apresentaram sintomas de parasitismo ($F = 80,61$; $p = 0,0000$; DMS = 0,15), confirmando a condição de resistente. Já os clones B6 e B7 não apresentaram diferença entre si para os aspectos avaliados e foram diferentes do clone B3 em todos os quesitos, sendo considerados suscetíveis. O clone B2 apresentou posição intermediária, quando comparados aos clones suscetíveis B6 e B7 e ao resistente B3. A mortalidade das ninfas antes do teste ser concluído foi semelhante dentre os quatro clones (Tabela 1).

Tabela 1: Proporção (média ± erro padrão) de quatro clones de *Lipaphis pseudobrassicae* ($n = 10$ repetições, cada repetição foi formada por seis pulgões) parasitados por *Diaeretiella rapae* no segundo instar, que atingiram a fase adulta, reproduziram-se, transformaram-se em múmias (parasitismo), que apresentaram sintoma de parasitismo (pulgões mumificados + pulgões que não atingiram a fase adulta) e que morreram antes da conclusão do experimento.

Clones	Adultos	Reproduziram	Parasitismo	Sintomas de parasitismo	Mortalidade
B6	$0,05 \pm 0,020$ c	$0,00 \pm 0,000$ c	$0,67 \pm 0,053$ a	$0,68 \pm 0,041$ a	$0,20 \pm 0,055$ a
B7	$0,08 \pm 0,037$ c	$0,02 \pm 0,017$ bc	$0,60 \pm 0,061$ ab	$0,70 \pm 0,042$ a	$0,20 \pm 0,062$ a
B2	$0,33 \pm 0,070$ b	$0,18 \pm 0,055$ b	$0,47 \pm 0,042$ b	$0,47 \pm 0,042$ b	$0,22 \pm 0,042$ a
B3	$0,80 \pm 0,067$ a	$0,77 \pm 0,067$ a	$0,00 \pm 0,000$ c	$0,00 \pm 0,000$ c	$0,27 \pm 0,068$ a

* Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância).

5.2 Efeito do superparasitismo na resistência

Não houve diferença na proporção de indivíduos do clone B3 de *L. pseudobrassicae* que chegaram à fase adulta ($F = 0,79$; $p = 0,3860$), que reproduziram ($F = 1,05$; $p = 0,3196$) e que mumificaram ($F = 1,00$; $p = 0,3306$) após serem parasitados por *D. rapae* uma ou três vezes. No entanto, houve a formação de uma múmia de *L. pseudobrassicae*, entre os 60 indivíduos que receberam uma oviposição de *D. rapae*. Esta mumificação é um indicativo da perda da resistência na progénie. Desta forma, não foi observada quebra de resistência pelo aumento no número de oviposições. Entretanto, o número de pulgões que apresentaram sintoma de parasitismo foi maior, quando *L. pseudobrassicae* recebeu três oviposições ($F = 10,29$; $p = 0,0049$; DMS = 0,13). O aumento do número de oviposições não elevou o número de indivíduos mortos antes da conclusão do experimento (Tabela 2).

Tabela 2: Proporção (média ± erro padrão) de indivíduos do clone resistente B3 de *Lipaphis pseudobrassicae* ($n = 10$ repetições, cada repetição foi formada por seis pulgões) que atingiram a fase adulta, reproduziram-se, transformaram-se em múmias (parasitismo), que apresentaram sintoma de parasitismo (pulgões mumificados + pulgões que não atingiram a fase adulta) e que morreram antes da conclusão do experimento, após serem parasitados uma ou três vezes por *Diaeretiella rapae*.

Nº de Oviposições	Adultos	Reproduziram	Parasitismo	Sintoma de parasitismo	Mortalidade
Uma	$0,67 \pm 0,061$ a	$0,58 \pm 0,075$ a	$0,02 \pm 0,017$ a	$0,08 \pm 0,028$ b	$0,32 \pm 0,052$ a
Três	$0,75 \pm 0,071$ a	$0,47 \pm 0,085$ a	$0,00 \pm 0,000$ a	$0,28 \pm 0,055$ a	$0,27 \pm 0,071$ a

* Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância).

Após as dissecções, foram encontradas larvas vivas do parasitoide nos 12 indivíduos do clone suscetível B6. Para os 20 indivíduos dissecados do clone resistente B3 foram encontrados larvas mortas em quatro pulgões e uma larva viva de *D. rapae* em um indivíduo. Nenhuma estrutura de encapsulamento foi encontrada no interior dos pulgões dissecados.

5.3 Perda da resistência na progênie

Dos 60 pulgões parasitados por *D. rapae*, sete morreram antes do término das avaliações e quatro mumificaram, configurando uma porcentagem de parasitismo de 6,7%, o que demonstrou a perda de resistência em indivíduos da progênie.

Na dissecação dos pulgões parasitados, três dias após a oviposição de *D. rapae*, foi observado que dois indivíduos do clone B3 apresentavam larva do parasitoide em seu interior (6,7% de parasitismo), confirmando a perda da resistência na prole. Já no biótipo suscetível B6 foram encontrados 26 pulgões com larva (86,7% de parasitismo). Nenhuma estrutura de encapsulamento foi encontrada no interior dos pulgões dissecados.

5.4 Testes moleculares

O teste molecular inicial comprovou a presença de DNA bacteriano, por meio da presença do gene 16S, nos clones B2, B3, B6 e B7, utilizando a extração de DNA pelo Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek). A presença de *Buchnera*, endossimbionte obrigatório também foi confirmada nos clones B3 e B6. Entretanto, nenhum dos endossimbiontes secundários foi detectado. Além disso, não foi verificada diferença na composição dos endossimbiontes do clone “B3 resistente” e do clone “B3 que perdeu a resistência”, a qual poderia justificar a resistência.

6 DISCUSSÃO

Uma população de pulgões é formada majoritariamente de clones suscetíveis e uma variedade de clones com diferentes graus de resistência aos parasitoides (HENTER; VIA 1995; FERRARI et al. 2001; VON BURG et al. 2008). Os resultados em campo (HUBAIDE, 2011) e em laboratório (OLIVEIRA et al. 2013) sugerem que a população de *L. pseudobrassicae* em Uberlândia seja formada por maioria de clones resistentes. Apesar de ter sido um teste preliminar, mais de 90% dos clones analisados na seleção inicial foram resistentes a *D. rapae*. Esses resultados indicam um alto grau de indivíduos resistentes e sugere que o controle biológico de *L. pseudobrassicae* com *D. rapae* seja prejudicado pela prevalência de clones resistentes ao parasitoide.

Oliveira et al. (2013) verificaram a existência de resistência fisiológica em *D. rapae*, porém, os autores utilizaram como controle as espécies de pulgões *M. persicae* e *Brevicoryne brassicae* L., as quais são suscetíveis ao parasitoide. Dessa forma, havia a dúvida se realmente se tratava de resistência ou se havia alguma incompatibilidade fisiológica entre os hospedeiros e o parasitoide (STARÝ 1989; LE RALEC et al. 2011). Neste estudo, pela primeira vez, foram separados clones resistentes e suscetíveis de *L. pseudobrassicae*, e foi possível confirmar a existência de resistência fisiológica nesta espécie de pulgão.

A ausência de estruturas do parasitoide encapsuladas no interior dos pulgões indica que a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae* não foi pela defesa celular. O encapsulamento de parasitoides resulta na formação de uma estrutura melanizada, escura e dura no interior do hospedeiro (CARVER; SULLIVAN, 1988), o que não foi observado em *L. pseudobrassicae* resistentes. Esses resultados confirmam as observações de Oliveira et al. (2013), que relatam que a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* está relacionada à inviabilização e desaparecimento dos ovos do parasitoide. Henter e Via (1995) foram os primeiros a observar que em pulgões resistentes os ovos não se desenvolvem, posteriormente, esse mecanismo foi associado, por OLIVER et al. (2003), aos pulgões resistentes pela associação a bactérias endossimbiontes secundárias.

Em parasitoides solitários, como *D. rapae*, o superparasitismo se refere ao comportamento de oviposição da fêmea do parasitoide que deposita seus ovos em hospedeiros já parasitados, por ele mesmo ou por um parasitoide de mesma espécie. Quando o número de

afídeos é inferior à capacidade de oviposição da fêmea do parasitoide, é vantajoso que ela deposite mais do que um ovo por hospedeiro, aumentando a chance de sobrevivência de pelo menos um ovo (GODFRAY, 1994). O parasitoide *D. rapae* superparasita seus hospedeiros, quando tem repetidos encontros com o mesmo indivíduo e quando o número de hospedeiros é limitado, e um hospedeiro superparasitado pode carregar de duas a cinco larvas do parasitoide *D. rapae* (KANT et al., 2011).

Maior proporção de ninfas de *L. pseudobrassicae* que apresentaram sintomas de parasitismo foi observada dentre as que receberam três oviposições, indicando maior deposição do veneno do parasitoide nesses indivíduos do que para aqueles com uma oviposição de *D. rapae*. O veneno injetado pelos parasitoides de pulgões, junto com os ovos, é capaz de reduzir drasticamente a fecundidade dos pulgões que sobrevivem ao parasitismo (DIGILIO et al., 1998; DIGILIO et al., 2000). A maior parte dos pulgões parasitados no segundo instar e que sobrevivem não se reproduz, muitos nem sequer atingem a fase adulta e se mantêm com aspecto globoso e com volume maior que os pulgões não parasitados (STEEENIS; EL-KHAWASS, 1995; SAMPAIO et al., 2007). No entanto, grande parte dos pulgões resistentes não apresentam esses sintomas e, embora tenha redução de 40% de sua fecundidade, a maior parte (83%) consegue se reproduzir mesmo após ser parasitado (OLIVEIRA et al., 2013). Dessa forma, o superparasitismo contribuiu para aumentar a proporção de *L. pseudobrassicae* resistente que apresentaram alterações decorrentes do parasitismo.

O superparasitismo acontece no campo em condições de recursos limitados (MACKAUER, 1990). Tendo dois ou mais ovos no hospedeiro, eleva-se a probabilidade da progênie crescer e de suprimir o sistema de defesa do hospedeiro (MACKAUER; CHAU, 2001). Assim sendo, o superparasitismo é importante em casos em que o hospedeiro consegue encapsular os ovos do parasitoide, pois a chance de sucesso no desenvolvimento do parasitoide aumenta (VAN ALPHEN; VISSER, 1990; HEGAZI; KHAFAGI, 2005). Caso a resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae* fosse celular, seria esperado um aumento na viabilidade dos parasitoides em superparasitismo, o que não ocorreu em *L. pseudobrassicae*. Por outro lado, em pulgões resistentes, por associação com bactérias simbiontes, o superparasitismo não aumenta a viabilidade dos parasitoides (VORBURGER et al. 2010).

Além disso, a defesa celular é uma característica genética do hospedeiro (KRAAIJEVELD et al., 1998). A perda da resistência em indivíduos do mesmo clone,

praticamente definiu que *L. pseudobrassicae* apresenta resistência fisiológica a *D. rapae* causada por uma característica não genética. Os afídeos por se reproduzirem por partenogênese telítoca são clones, dessa forma, se a causa da resistência fosse genética todos os indivíduos originados de um mesmo afídeo deveriam se comportar da mesma maneira e a resistência se manteria em todos os indivíduos de um mesmo clone.

O teste de perda de resistência verificou que a causa da resistência não foi transferida a todos os indivíduos da prole. Isso ocorre quando existe associação com endobactérias simbiontes facultativas. Já foi demonstrado que as bactérias acessórias associadas aos afídeos podem ser adquiridas pela transmissão horizontal, por meio de parasitoides, pela ingestão de seiva da planta (SANDSTRÖM et al., 2001) ou até mesmo por meio da transmissão artificial (CHEN; PURCELL, 1997). Uma vez adquiridos, esses simbiontes facultativos são transmitidos, via ovários, da mãe para seus filhos (transmissão vertical), entretanto, essa transmissão não é perfeita. Por exemplo, os mais altos percentuais de perda dos simbiontes na prole foram encontrados por Chen e Purcell (1997), os quais relataram níveis de perda na transmissão maternal de aproximadamente 20% para os seus descendentes. Embora Darby e Douglas (2003) e Moran e Dunbar (2006) tenham observado elevada constância na transmissão vertical de endossimbiontes facultativos, observaram perda de transmissão (menor que 2% e zero, respectivamente), de acordo com Oliver et al. (2009), a dinâmica dessa comunidade microbiana, através das gerações dos afídeos, vai depender dos efeitos que a bactéria causa na sobrevivência e na reprodução dos hospedeiros, dos padrões de transmissão maternal e horizontal e da competição entre os tipos de endossimbiontes. A variabilidade dessa associação sugere uma relação bastante instável entre *A. pisum* e os simbiontes secundários (CHEN; PURCELL, 1997; FUKATSU et al. 2000), o que é bem contrastante com a relação estável entre os afídeos e o simbionte obrigatório *Buchnera* (MORAN et al., 1993; CLARK et al. 2000).

A confirmação da presença de simbiontes nos indivíduos resistentes e que não estão presentes em indivíduos suscetíveis de um mesmo clone traria a confirmação que faltava para a causa da resistência ser em função de simbiontes. Contudo, nos testes moleculares não foi possível observar diferença na composição de microrganismos entre os indivíduos resistentes e suscetíveis de um mesmo clone de *L. pseudobrassicae*. Embora não tenha sido possível identificar um microrganismo responsável por promover a resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae*, os testes biológicos, principalmente pela perda de resistência na prole de pulgões

resistentes, evidencia que a resistência em *L. pseudobrassicae* é causada por associação com endossimbiontes secundários.

7 CONCLUSÕES

Devido à ausência de estruturas de encapsulamento dos parasitoides no interior dos pulgões resistentes, por não ter havido diminuição da resistência em condições de superparasitismo e, principalmente, pela perda da resistência na prole de indivíduos partenogenéticos, foi possível concluir que a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* é devido à presença de endossimbiontes secundários.

8 REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M.S., DEY, D., USMANI, M.K., AND CHOUDHURY, R.A. Seasonal abundance of *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Braconidae: Aphidiinae) parasitising *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) (Hemiptera: Aphididae) in Brassica juncea variety Pusa Bold, **Munis Entomology and Zoology**, Ankara, v. 5, n. 1, p. 692-696, 2010.
- BLACKMAN, R.L; EASTOP, V.F. Taxonomic issues. In: EMDEN, H.F., HARRINGTON, R., editors. **Aphids as Crop Pests**. Cambridge, MA, USA: CAB International. p. 1-30. 2007.
- CHEN, D.Q.; PURCELL, A. H. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. **Current microbiology**, New York, v. 34, n. 4, p. 220-225, 1997.
- CARVER, M.; SULLIVAN, D. J. Encapsulative defence reactions of aphids (Hemiptera: Aphididae) to insect parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae and Aphelinidae). **Ecology and Effectiveness of Aphidophaga**, v.48, n. 3, Teresin, p. 299-303, 1988.
- CLARK, M. A.; MORAN, N. A.; BAUMANN, P.; WERNEGREN, J. J. Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. **Evolution**, Chicago, v. 54, n. 2, p. 517-525, 2000.
- DESH, R.; CHAND, L G. Efficiency of endoparasitoid *Diaeretiella rapae* (M'intosh) on aphid complex infesting rapeseed in mid hill zone of Himachal Pradesh (India). **Journal of Entomological Research**, New Delhi, v. 22, n. 3, p. 245-251, 1998.
- DIGILIO, M. C.; ISIDORO, N.; TREMBLAY, E.; PENNACCHIO, F. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. **Journal of insect Physiology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 1041-1050, 2000.
- DIGILIO, M. C.; PENNACCHIO, F.; TREMBLAY, E. Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 44, n. 9, p. 779-784, 1998.
- DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 43, n. 1, p. 17-37, 1999.
- FERRARI, J.; DARBY, A. C.; DANIELL, T. J.; GODFRAY, H. C. J.; DOUGLAS, A. E. Linking the bacterial community in pea aphids with host plant use and natural enemy resistance. **Ecological Entomology**, London, v. 29, n. 1, p. 60-65, 2004.
- FERRARI, J.; MÜLLER, C. B.; KRAAIJEVELD, A. R.; GODFRAY, H. C. J. Clonal variation and covariation in aphid resistance to parasitoids and a pathogen. **Evolution**, Chicago, v. 55, n. 9, p. 1805-1814, 2001.

FERRARI, J.; WEST, J. A.; VIA, S.; GODFRAY, H. C. J. Population genetic structure and secondary symbionts in host associated populations of the pea aphid complex. **Evolution**, Chicago, v. 66, n. 2, p. 375-390, 2012.

FUKATSU, T., NIKOH, N., KAWAI; R.; KOGA, R. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 2748-2758, 2000.

GRIFFITHS, D. C. The development of *Monoctonus palidum* Marshall (Hymenoptera, Braconidae) in *Nasonia ribis-nigri* on lettuce and immunity reactions in other lettuce aphids. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 52, n. 1, p. 147-163, 1961.

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

HEGAZI, E.; KHAFAGI, W. Developmental interaction between suboptimal instars of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoid *Microplitis rufiventris* (Hymenoptera: Braconidae). **Archives of insect biochemistry and physiology**, New York, v. 60, n. 4, p. 172-184, 2005.

HENTER, H. J. The potential for coevolution in a host-parasitoid system. II. Genetic variation within a population of wasps in the ability to parasitize an aphid host. **Evolution**, Chicago, v. 49, p. 439-445, 1995.

HENTER, H. J.; VIA, S. The potential for coevolution in a host parasitoid system. I. genetic variation within an aphid population in susceptibility to a parasitic wasp. **Evolution**, Chicago, p. 427-438, 1995

HUBAIDE, J. E. A. **Distribuição na planta, fatores climáticos e parasitismo na dinâmica populacional de pulgões (Hemiptera: Aphididae) em couve**. 2011, 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

HUFBAUER, R. A.; VIA, S. Evolution of an aphid-parasitoid interaction: variation in resistance to parasitism among aphid populations specialized on different plants. **Evolution**, Chicago, p. 1435-1445, 1999.

KANT, R.; MINOR, M. A.; TREWICK, S. A.; SANDANAYAKA, W. R. M. Host selection for self-superparasitism by *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Hymenoptera: Aphidiidae). **New Zealand Plant Protection**, Christchurch, v. 64, p. 37-43, 2011.

KRAAIJEVELD, A. R.; VAN ALPHEN, J. J. M.; GODFRAY, H. C. J. The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. **Parasitology**, Cambridge, v. 116, n. S1, p. S29-S45, 1998.

LE RALEC, A.; ANSELME, C.; OUTREMAN, Y.; POIRIÉ, M.; VAN BAAREN, J.; LE LANN, C.; VAN ALPHEN, J. J. M. Evolutionary ecology of the interactions between aphids and their parasitoids. **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 6, p. 554-565, 2010.

MACKAUER, M. Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids. In: MACKAUER, M.; EHLER, L. E.; ROLAND, J. **Critical issues in biological control**. Intercept Limited, p. 41-62, 1990.

MACKAUER, M.; CHAU, A. Adaptive self superparasitism in a solitary parasitoid wasp: the influence of clutch size on offspring size. **Functional Ecology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 335-343, 2001.

MORAN, Nancy A.; DUNBAR, Helen E. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 34, p. 12803-12806, 2006.

MORAN, N. A.; MUNSON, M. A.; BAUMANN, P.; ISHIKAWA, H. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, v. 253, n. 1337, p. 167-171, 1993.

OLIVER, K. M.; MORAN, N. A.; HUNTER, M. S. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 36, p. 12795-12800, 2005.

OLIVER, K. M.; MORAN, N. A.; HUNTER, M. S. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Edinburgh, v. 273, n. 1591, p. 1273-1280, 2006.

OLIVER, K. M.; RUSSELL, J. A.; MORAN, N. A.; HUNTER, M. S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 4, p. 1803-1807, 2003

OLIVER, K. M.; DEGNAN, P. H.; HUNTER, M. S.; MORAN, N. A. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. **Science**, Washington, v. 325, n. 5943, p. 992-994, 2010.

OLIVEIRA, R. S., SAMPAIO, M. V., FERREIRA, S. E.; RIBEIRO, L. C. M.; TANNÚS-NETO, J. Low parasitism by *Diaeretiella rapae* (Hym.: Braconidae) of *Lipaphis pseudobrassicae* (Hemip.: Aphididae): pre-or post-ovipositional host resistance? **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 79-91, 2013.

SAMPAIO, M. V.; BUENO, V. H.; RODRIGUES, S. M.; SOGLIA, M. C.; DE CONTI, B. F. Desenvolvimento de *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae) e alterações causadas pelo parasitismo no hospedeiro *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) em diferentes temperaturas. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 3, p. 436-444, 2007.

SANDSTRÖM, J. P.; RUSSELL, J. A.; WHITE, J. P.; MORAN, N. A. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 217-228, 2001.

STEENIS, MJ van; EL-KHAWASS, K. A. M. H. Life history of *Aphis gossypii* on cucumber: influence of temperature, host plant and parasitism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 121-131, 1995.

TSUCHIDA, T.; KOGA, R.; SHIBAO, H.; MATSUMOTO, T.; FUKATSU, T. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 2123-2135, 2002.

VAN ALPHEN, J. J.; VISSER, M. E. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 35, n. 1, p. 59-79, 1990.

VON BURG, S.; FERRARI, J.; MÜLLER, C. B.; VORBURGER, C. Genetic variation and covariation of susceptibility to parasitoids in the aphid *Myzus persicae*: no evidence for trade-offs. **Proceedings of the Royal Society B: biological sciences**, Edinburgh, v. 275, n. 1638, p. 1089-1094, 2008.

VORBURGER, C., EUGSTER, B., VILLIGER, J.; WIMMER, C. Host genotype affects the relative success of competing lines of aphid parasitoids under superparasitism. **Ecological Entomology**, London, v. 35, n. 1, p. 77-83, 2010.

VORBURGER, C.; GEGENSCHATZ, S. E.; RANIERI, G.; RODRIGUEZ, P. Limited scope for maternal effects in aphid defence against parasitoids. **Ecological Entomology**, London, v. 33, n. 2, p. 189-196, 2008.

VORBURGER, C.; SANDROCK, C., GOUSKOV, A.; CASTAÑEDA, L. E.; FERRARI, J. Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all parthenogenetic host-parasitoid interaction. **Evolution**, Chicago, v. 63, n. 6, p. 1439-1450, 2009.

WALKER, A.M.; HOY, M.A. Responses of *Lipolexis oregmae* (Hymenoptera: Aphidiidae) to different instars of *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 1, p. 1685-1692, 2003.

XU, Q.; MENG, L.; LI, B.; MILLS, N. Influence of host size variation on the development of a koinobiont aphid parasitoid, *Lysiphlebus ambiguus* Haliday (Braconidae, Hymenoptera). **Bulletin of entomological research**, Farnham Royal, v. 98, n. 04, p. 389-395, 2008.

CAPÍTULO 3

A presença de *Lipaphis pseudobrassicae* resistente ao parasitoide *Diaeretiella rapae* pode afetar o parasitismo de *Myzus persicae* por resistência indireta?

1 RESUMO

Os pulgões *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) e *Myzus persicae* (Sulzer) são pragas importantes das brássicas que causam vários danos às culturas. O baixo parasitismo de *L. pseudobrassicae*, em condições de campo, está relacionado à resistência contra o parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh) e variações na susceptibilidade ou na resistência de hospedeiros a inimigos naturais podem impactar de diferentes formas a interação de populações de afídeos. Este trabalho teve como objetivo verificar se o parasitismo de *M. persicae* é alterado na presença de *L. pseudobrassicae* resistente. O experimento foi conduzido em plantas de couve, cobertas com gaiolas de tela antiafídica e em casa-de-vegetação (temperatura média de 28°C). Cada planta foi infestada com 30 *M. persicae* e 30 *L. pseudobrassicae* resistentes ou suscetíveis ao parasitoide *D. rapae*. Duas fêmeas de *D. rapae* foram liberadas por gaiola. Vinte e um dias após a infestação das plantas, foi avaliado o número de pulgões vivos e parasitados de cada espécie em três folhas de 11 e nove plantas de couve para os tratamentos com *L. pseudobrassicae* resistente e suscetível, respectivamente. O número de pulgões mumificados foi menor na população de *L. pseudobrassicae* resistente do que na suscetível ao parasitoide. Foi observado que o número de *L. pseudobrassicae* vivos da população resistente ao parasitoide foi maior do que o número de *M. persicae*. Verificou-se que a presença de *L. pseudobrassicae* resistente, no sistema, não alterou o parasitismo de *D. rapae* em *M. persicae*. Esses resultados são importantes para o controle biológico de pulgões das brássicas, pois demonstram que *D. rapae* pode ser utilizado no controle de *M. persicae* independente da população de *L. pseudobrassicae* ser resistente ou suscetível ao parasitoide.

Palavras-chave: Competição mediada, controle biológico, defesa do hospedeiro.

2 ABSTRACT

Can the presence of *Lipaphis pseudobrassicae* resistant to the parasitoid *Diaeretiella rapae* affect the parasitism of *Myzus persicae* by indirect resistance?

Aphids *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) and *Myzus persicae* (Sulzer) are important pests of Brassicaceae causing severe damage to crops. The low parasitism of *L. pseudobrassicae* under field conditions is related to resistance against the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntosh) and variations in susceptibility or resistance to natural enemies can impact the interaction of herbivore populations in different ways. This study aimed to verify if the parasitism of *M. persicae* is changed in the presence of resistant *L. pseudobrassicae*. The experiment was conducted on green collard plants, covered with fine net cages (anti aphid net) in green house (average temperature of 28°C). Each plant was infested with 30 *M. persicae* and 30 *L. pseudobrassicae* resistant or susceptible to the parasitoid *D. rapae*. Twenty-one days after plant infestation, the number of parasitized and living aphids of each species was evaluated. Three leaves of eleven and nine green collard plants for the treatments with *L. pseudobrassicae* resistant and susceptible, respectively, were evaluated. The number of mummified aphids was lower in the population of *L. pseudobrassicae* resistant than susceptible to the parasitoid. It was observed that the number of resistant *L. pseudobrassicae* alive was higher than the number of *M. persicae*. We also observed a lower percentage of parasitism in the *L. pseudobrassicae* resistant to the parasitoid. It was observed that the presence of *L. pseudobrassicae* resistant did not change the parasitism of *D. rapae* in *M. persicae*. These results are important for the biological control of aphids in Brassicaceae because they show that *D. rapae* can be used to control *M. persicae* even when the *L. pseudobrassicae* population is resistant to the parasitoid.

Keywords: Mediate competition, biological control, host defense.

3 INTRODUÇÃO

Interações que envolvem um recurso compartilhado e limitado podem abranger indivíduos de mesma espécie, denominadas competição intraespecífica, ou indivíduos de espécies diferentes, designadas competição interespecífica (PRICE, 1997). Dentre as formas de competição, a por exploração é aquela em que os indivíduos utilizam os recursos disponíveis e, assim, privam os competidores de receber os benefícios desses recursos. Por outro lado, a competição por interferência é uma forma mais direta de intervenção, na qual os indivíduos causam danos uns aos outros por meio de contato direto e privam o acesso dos competidores ao recurso (NICHOLSON, 1954; SCHOENER, 1983; PRICE, 1997).

O resultado da competição entre duas espécies pode ser alterado por um predador, parasita ou patógeno, sendo denominada de competição mediada por parasitas ou inimigos naturais. Este tipo de competição foi definido como a redução da densidade populacional de uma espécie, quando a população da espécie competitiva aumenta a partir da interação com uma terceira espécie de um nível trófico mais elevado (HOLT, 1977). A competição mediada por parasitas e inimigos naturais é bastante comum na natureza e pode ser considerada como um dos principais tipos de interação em sistemas ecológicos (PRICE et al., 1986; KAPLAN; DENNO, 2007). Existem vários casos em que as espécies têm parasitoides em comum, mas o impacto deste inimigo natural em uma das espécies é maior do que na outra, assim a abundância ou a distribuição das espécies são afetadas pela presença do parasitoide (BARBEHENN, 1969; HOLMES, 1982; RICE; WESTOBY, 1982; PRICE, 1997). Uma das espécies pode ser menos afetada pelo parasitoide por possuir maior potencial de crescimento populacional, por exemplo, suportando uma maior população do inimigo natural e tornando-o mais abundante. Este aumento na população do parasitoide pode gerar um impacto maior em uma segunda espécie de hospedeiro, do que o esperado na ausência da espécie competitiva de maior potencial de crescimento populacional (PRICE et al., 1986; BLUMBERG, 1997; ASGARI et al. 1998).

A teoria do forrageamento ótimo preconiza que os parasitoides ovipositem mais em indivíduos de maior qualidade para o desenvolvimento de sua prole (EMLEN, 1966; MACARTHUR; PIANKA, 1966; MACARTHUR; WILSON, 1967). No caso dos parasitoides afidiíneos (Braconidae: Aphidiinae), os quais parasitam pulgões, isso nem sempre ocorre, havendo, às vezes, maior número de oviposições em hospedeiros de menor qualidade

(SAMPAIO et al., 2008). Esses parasitoides chegam a ovipositar até em hospedeiros em que não há desenvolvimento de sua prole (STARÝ, 1989; SAMPAIO et al., 2008). Em função disso, clones resistentes são parasitados com mesma frequência que clones suscetíveis, pois os parasitoides não reconhecem esses hospedeiros não adequados ao desenvolvimento de suas formas jovens (OLIVEIRA et al., 2013, OLIVER et al., 2003; FERRARI et al. 2001). Como resultado, a população do parasitoide pode ser reduzida pela presença de uma espécie que apresenta algum mecanismo de resistência ao parasitoide. Dessa forma, na presença de competidores resistentes, espécies de pulgões suscetíveis podem ser beneficiadas por uma resistência indireta, já que a resistência de seu competidor pode reduzir a população do parasitoide (POPE et al., 2002). Esse pressuposto pode trazer consequências sérias para o controle biológico de pragas que utilizam uma mesma planta cultivada e compartilham o mesmo parasitoide.

Os pulgões *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) e *Myzus persicae* (Sulzer) são pragas importantes das brássicas, de ocorrência mundial e que causam danos significativos às culturas (BLACKMAN; EASTOP, 2007). Estudos revelam que a população de *L. pseudobrassicae* de Uberlândia apresenta indivíduos resistentes ao principal parasitoide presente em brássicas na região, *Diaeretiella rapae* (McIntosh). Esses estudos indicam que os indivíduos resistentes são maioria na população local desse afídeo, o que torna a ação de *D. rapae* ineficiente no controle de *L. pseudobrassicae* (HUBAIDE 2011; OLIVEIRA et al., 2013; Capítulo 2). Por outro lado, o parasitoide *D. rapae* vem sendo apontado como um dos principais inimigos naturais de *M. persicae*, com altas taxas de parasitismo em laboratório (SILVA et al., 2011) e controlando este afídeo em condições de campo e casa-de-vegetação (HUBAIDE, 2011).

Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo verificar se a presença de *L. pseudobrassicae* – resistente ao parasitoide *D. rapae* – pode afetar negativamente o parasitismo de *M. persicae*, visando trazer subsídios para o controle biológico dessas espécies de pulgões.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Produção de mudas e local de condução do experimento

As mudas de couve variedade Manteiga da Geórgia foram cultivadas em casa de vegetação do *Campus* Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Foram utilizadas bandejas de isopor com 128 células, preenchidas com substrato orgânico. Em cada célula foram semeadas duas sementes de couve e, quando as plantas apresentavam um par de folhas definitivas, realizou-se o transplantio para vasos de plásticos contendo substrato orgânico. As plantas destinadas à criação de pulgões e parasitoides foram mantidas em vasos plásticos de 3,0 litros e as plantas destinadas ao experimento foram transplantadas para vasos plásticos de 14,5 litros. As plantas foram submetidas à irrigação diária e as mudas foram monitoradas para evitar a ocorrência de possíveis pragas. Para a criação dos afídeos, folhas foram destacadas das plantas produzidas para criação e levadas ao laboratório para a obtenção de discos foliares para a confecção de placas de Petri com solução de ágar (ver item 4.2). Já para as plantas utilizadas no experimento, trinta dias após o transplantio, foi acoplado ao vaso uma gaiola feita de tela antiafídica (Figura 1). As plantas foram utilizadas no experimento 35 dias após o transplante e apresentavam seis folhas definitivas. O experimento foi conduzido na casa de vegetação entre os dias 10 de novembro e primeiro de dezembro de 2012, com temperatura média de 28°C, média das mínimas de 19°C e média das máximas de 37°C.

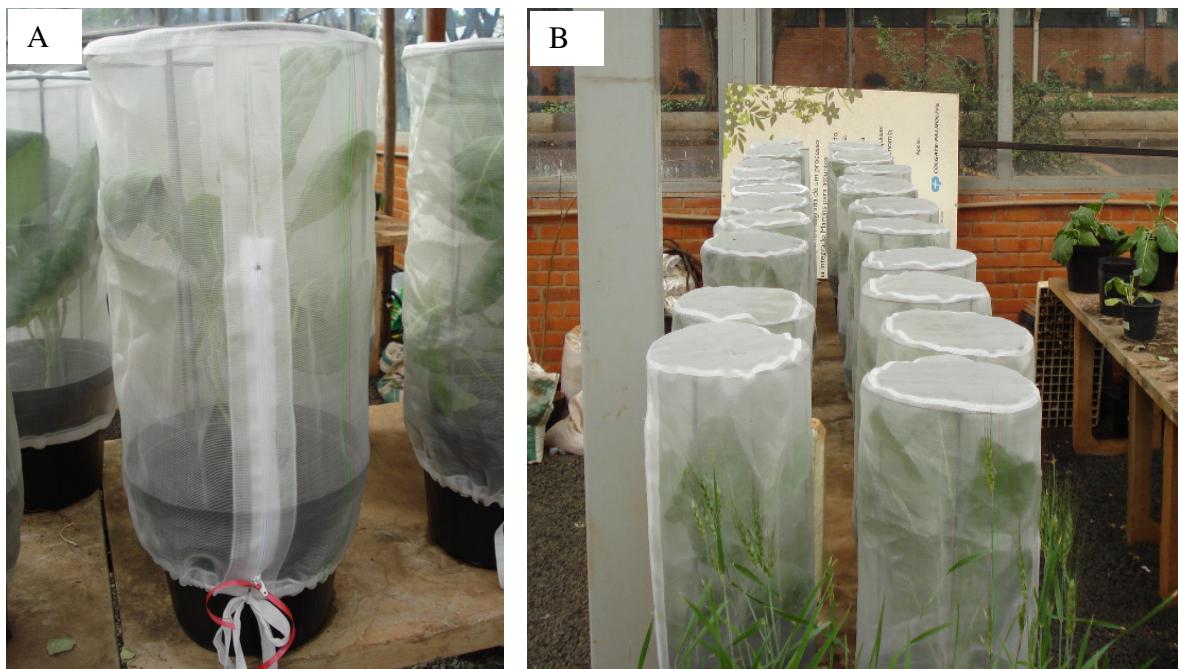


Figura 1: Plantas de couve utilizadas em experimento da influência de *Lipaphis pseudobrassicae* resistente a *Diaeretiella rapae* no parasitismo de *Myzus persicae*. A - Detalhe da gaiola utilizada para condução do experimento. B - Visão geral do experimento. Uberlândia, 10 de novembro a primeiro de dezembro de 2012.

4.2 Obtenção e criação dos afídeos

Os afídeos foram obtidos de criações do Laboratório de Entomologia - Controle biológico. Foram utilizados pulgões resistentes aos parasitoides *D. rapae* e pulgões suscetíveis, pois perderam a resistência durante o seu desenvolvimento embrionário, ambos do clone B3 (Capítulo 2). Os pulgões da espécie *M. persicae* foram coletados na casa de vegetação do Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Os afídeos foram mantidos em discos foliares de couve posicionados sobre uma solução de ágar/água a 1% em placas de Petri (10 cm de diâmetro). As placas com os pulgões foram acondicionadas em câmara climática (23°C, 12 h de fotofase, 50 ± 55% de umidade). Os discos foliares foram trocados de quatro em quatro dias e foram mantidas 30 placas de *M. persicae*, 15 de *L. pseudobrassicae* resistente e 15 de *L. pseudobrassicae* suscetível ao parasitoide, em colônias de aproximadamente 50 indivíduos de vários instares. Os pulgões *M. persicae* de duas dessas placas de Petri foram utilizadas para a criação de *D. rapae* e os demais insetos foram utilizados no experimento.

4.3 Obtenção e criação dos parasitoides

Os parasitoides foram obtidos de múmias de *Brevicoryne brassicae* L. coletadas em plantio comercial de couve na Fazenda Experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia. As múmias foram levadas ao laboratório, individualizadas em tubos eppendorfs e mantidas em temperatura controlada de 23°C e fotofase de 12 horas. Assim que emergiam, os parasitoides foram alimentados com mel 50% e água e colocados para acasalar. Em duas placas contendo colônias de aproximadamente 50 indivíduos de *M. persicae* foram liberadas duas fêmeas acasaladas por placa e mantidas por 24 horas. Após esse período, as fêmeas foram retiradas e os pulgões parasitados mantidos em câmara climática a 23°C 50-55 UR% e fotofase de 12 horas. Após oito dias os afídeos já mumificados foram individualizados em eppendorfs e, após a emergência, os parasitoides foram alimentados. Vinte e quatro horas após a emergência, os insetos foram acasalados. Um mesmo macho foi utilizado para acasalar três fêmeas. Sabe-se que o macho que acasala por múltiplas vezes tende a reduzir a transferência de esperma e isso diminui o número de ovos fertilizados, reduzindo o número de fêmeas na progênie. Entretanto, para *D. rapae* a perda de esperma nos macho não ocorre antes da terceira cópula (KANT et al, 2012). Após a observação do acasalamento, os machos foram retirados dos tubos e as fêmeas utilizadas no experimento.

4.4 Montagem e condução do experimento

No primeiro dia da montagem do experimento, as colônias de afídeos das placas de Petri foram reduzidas para que permanecessem com 30 indivíduos de vários instares. O disco foliar, contendo os afídeos, foi retirado da placa e colocado em uma planta que estava coberta pela gaiola de tela antiafídica. Cada planta recebeu um disco foliar contendo 30 *L. pseudobrassicae* resistente ou 30 suscetíveis e um disco foliar com 30 *M. persicae*, totalizando 60 pulgões por planta. Ambas as espécies de pulgões são encontradas em folhas totalmente desenvolvidas, na região mediana ou inferior da planta (CIVIDANES; SOUZA, 2004; HUBAIDE, 2011) e, por isso, os discos foliares contendo os pulgões foram posicionados em folhas totalmente desenvolvidas dessas regiões das plantas. Os discos foram deixados por 24 h para que os pulgões se transferissem para a planta e, após esse período, os discos foram retirados e os pulgões foram mantidos nas plantas por mais 24 h para, então, ser realizada a liberação dos parasitoides.

A liberação dos parasitoides ocorreu da seguinte forma: duas fêmeas foram liberadas por gaiola, uma no terceiro e a outra no quarto dia da montagem do experimento, ambas foram liberadas no final do dia (horário com temperatura mais amena) para facilitar a aclimatação do parasitóide. As fêmeas foram deixadas nas gaiolas até a sua morte natural.

Foram realizadas observações diárias, visando acompanhar o desenvolvimento dos parasitoides nas plantas no interior das gaiolas e, assim, determinar o tempo de duração do experimento. As primeiras múmias foram formadas aos sete dias, e os primeiros adultos da geração F1 emergiram aos dez dias, após a liberação da primeira fêmea de *D. rapae*. Dessa forma, as múmias da geração F2 de *D. rapae* começaram a ser formadas 17 dias após a liberação da primeira fêmea do parasitóide. No vigésimo primeiro dia da montagem do experimento (19 dias após a liberação da primeira fêmea de *D. rapae*), as plantas foram levadas para o laboratório para as avaliações, tempo suficiente para a formação completa das múmias da geração F2, porém, menor do que o necessário para a formação das múmias da geração F3 dos parasitoides. Foi avaliado, sob microscópio estereoscópico, o número de pulgões vivos e parasitados de três folhas completamente desenvolvidas da região mediana de cada planta de couve.

4.5 Análise dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições para os tratamentos com *L. pseudobrassicae* resistentes; e onze repetições para os tratamentos com *L. pseudobrassicae* suscetíveis. Inicialmente, foram formadas dez e doze repetições para os tratamentos com *L. pseudobrassicae* resistentes e suscetíveis, respectivamente. Porém, as plantas de duas gaiolas, uma de cada tratamento, foram perdidas devido a grande população de afídeos e não foram utilizadas nas análises. Para a comparação da população de pulgões vivos e do número de pulgões mumificados dentro de cada espécie de afídeo, foram adotados dois tratamentos (*M. persicae* na presença de *L. pseudobrassicae* resistentes e *M. persicae* na presença de *L. pseudobrassicae* suscetíveis). Para a comparação entre as populações de pulgões vivos e as porcentagens de parasitismo entre as espécies, foram adotados quatro tratamentos (*M. persicae* na presença de *L. pseudobrassicae* resistentes; *M. persicae* na presença de *L. pseudobrassicae* suscetíveis; *L. pseudobrassicae* resistentes na presença de *M. persicae* e *L. pseudobrassicae* suscetíveis na presença de *M. persicae*). Nas análises, foram utilizados os números médios de pulgões por folha.

Para avaliar a normalidade dos resíduos, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,01$), e para a homogeneidade das variâncias, o teste de Levene ($p = 0,05$). Como os dados não apresentaram normalidade dos resíduos foram transformados, segundo Pimentel-Gomes (2000), para nova avaliação pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Nas comparações dentro de cada espécie, os números de pulgões vivos e mumificados foram transformados para a sua raiz. Foi realizada análise de variância e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. Para a comparação entre as espécies o número de pulgões vivos foi transformado para sua raiz e a porcentagem de parasitismo foi transformada para arcoseno da sua raiz. Foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

Após 21 dias da liberação dos afídeos, as plantas estavam totalmente infestadas pelos pulgões das duas espécies. Quando foram feitas comparações dentro das espécies de pulgões, não houve diferença no número de *L. pseudobrassicae* vivos entre as populações deste afídeo resistente e suscetível ao parasitoide *D. rapae* ($F = 0,03$; $p > 0,05$), o mesmo foi observado para o número de *M. persicae* vivos nas populações deste afídeo que se desenvolveram em associação com as populações de *L. pseudobrassicae* resistente e suscetível ($F = 0,20$; $p > 0,05$). No entanto, o número de pulgões mumificados foi menor na população de *L. pseudobrassicae* resistente do que na suscetível ao parasitoide ($F = 9,56$; $p \leq 0,05$) (Tabela 1). Já o número de *M. persicae* mumificados não foi diferente ($F = 0,08$; $p > 0,05$) quando este afídeo se desenvolveu em associação com *L. pseudobrassicae* resistente ou suscetível a *D. rapae* (Tabela 1).

Tabela 1: Número (média ± erro padrão por folha de couve) de pulgões vivos e mumificados em colônias de *Myzus persicae* em associação com *Lipaphis pseudobrassicae* resistentes ou suscetíveis ao parasitoide *Diaeretiella rapae*. Uberlândia, 10 de novembro a primeiro de dezembro de 2012, temperatura média de 28 °C.

Variáveis	<i>L. pseudobrassicae</i> resistente + <i>M. persicae</i>	<i>L. pseudobrassicae</i> suscetível + <i>M. persicae</i>
<i>L. pseudobrassicae</i> vivo	$376,6 \pm 74,93$ a	$279,9 \pm 53,99$ a
<i>M. persicae</i> vivo	$163,3 \pm 43,36$ a	$200,2 \pm 66,95$ a
<i>L. pseudobrassicae</i> mumificado	$38,4 \pm 22,13$ b	$71,2 \pm 12,95$ a
<i>M. persicae</i> mumificado	$49,7 \pm 12,66$ a	$60,8 \pm 9,97$ a

* Médias seguidas de mesma letra nas linhas, não diferem entre si pelo teste F (5% de significância).

Quando foi realizada comparação entre as espécies, foi observado que o número de *L. pseudobrassicae* vivos da população resistente ao parasitoide foi maior do que o número de *M. persicae* ($F = 2,20$; $p \leq 0,05$). Já a população de *L. pseudobrassicae* suscetível a *D. rapae* não diferiu das populações de *M. persicae*. Não foi observada diferença no número de pulgões vivos para as populações de *L. pseudobrassicae* resistentes e suscetíveis entre si e para as populações de *M. persicae* que se desenvolveram com as populações de *L. pseudobrassicae* resistente ou suscetível (Tabela 2), seguindo o mesmo padrão para a análise comparativa dentro das espécies (Tabela 1).

A menor porcentagem de parasitismo foi observada para *L. pseudobrassicae* resistente ao parasitoide ($F = 6,95$; $p = 0,0008$), já as populações de *L. pseudobrassicae* suscetível e as

populações de *M. persicae* não apresentaram diferença entre si para a porcentagem de parasitismo (Tabela 2).

TABELA 2: Número (média ± erro padrão por folha de couve) de pulgões vivos e porcentagem de parasitismo (média ± erro padrão por folha de couve) de *Diaeretiella rapae* em colônias de *Myzus persicae* em associação com *Lipaphis pseudobrassicae* resistentes ou suscetíveis ao parasitoide *D. rapae*. Uberlândia, 10 de novembro a 1º de dezembro de 2012, temperatura média de 28 °C.

Espécie de pulgão	Pulgões vivos	Parasitismo (%)
<i>L. pseudobrassicae</i> resistente com <i>M. persicae</i>	376,6 ± 74,93 A	6,6 ± 0,02 B
<i>L. pseudobrassicae</i> suscetível com <i>M. persicae</i>	279,9 ± 53,99 AB	23,3 ± 0,03 A
<i>M. persicae</i> com <i>L. pseudobrassicae</i> resistente	163,3 ± 43,35 B	24,9 ± 0,05 A
<i>M. persicae</i> com <i>L. pseudobrassicae</i> suscetível	200,2 ± 66,95 B	29,8 ± 0,05 A

* Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Duncan (5% de significância).

6 DISCUSSÃO

As populações de *L. pseudobrassicae* e *M. persicae* foram expostas à competição por exploração e por interferência, já que ambas têm preferência por se alimentar em folhas de couve nas regiões medianas e inferiores da planta (CIVIDANES; SOUZA, 2004; HUBAIDE, 2011). Como os pulgões não têm mecanismos de retirar o competidor dos pontos preferidos de alimentação, a espécie com maior potencial de crescimento populacional e que ocupar primeiro esses locais terá, provavelmente, vantagem competitiva (CRAWLEY, 1983; SCHÖENER, 1983, DENNO et al., 1995; PETERSEN; HUNTER; 2001). O potencial de crescimento populacional de *L. pseudobrassicae* é maior do que *M. persicae* em plantas de couve (GODOY; CIVIDANES, 2002; CIVIDANES; SOUZA, 2003). Resultados encontrados para populações de pulgões da mesma região e em mesma temperatura média em que o presente trabalho foi desenvolvido, temperatura constante de 28°C, também encontraram maior potencial de crescimento populacional para *L. pseudobrassicae*. A taxa líquida de reprodução (R_o) de *M. persicae* ($R_o = 19,2 \pm 3,11$) foi a metade da encontrada para *L. pseudobrassicae* ($R_o = 40,5 \pm 4,12$). Também, a taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) de *M. persicae* ($r_m = 0,23 \pm 0,013$) foi significativamente inferior a de *L. pseudobrassicae* ($r_m = 0,27 \pm 0,010$) (SAMPAIO, SOUZA, ALMEIDA, FERREIRA dados não publicados). Desta forma, *L. pseudobrassicae* tem características de melhor competidor do que com *M. persicae* em plantas de couve.

Ainda na competição mediada por parasitoides, os insetos que apresentam maior r_m tendem a suportar uma maior população do parasitoide e obter vantagem competitiva sobre a espécie com menor potencial de crescimento populacional (HOLT; LAWTON, 1994). O esperado é que o aumento maior na população de *L. pseudobrassicae* suscetível cause aumento na população de *D. rapae*. Como a população de *M. persicae* cresce de forma mais lenta, este aumento na população do parasitoide causa um impacto maior em sua população do que na de *L. pseudobrassicae*. Com isso, na competição de *M. persicae* com *L. pseudobrassicae* suscetível ao parasitoide, o esperado seria uma maior população de *L. pseudobrassicae*. Essa hipótese, entretanto, não foi confirmada.

D. rapae oviposita em *L. pseudobrassicae* e *M. persicae* em proporções iguais quando ambas as espécies são oferecidas simultaneamente ao parasitoide, mesmo que *L. pseudobrassicae* seja resistente (OLIVEIRA et al., 2013). Então, na competição de *M. persicae* e

L. pseudobrassicae resistente a *D. rapae*, o esperado é que o maior potencial de crescimento populacional de *L. pseudobrassicae* sirva como um fator de redução na população do parasitoide, favorecendo a espécie competitora *M. persicae* por resistência indireta. A presença de uma espécie não suscetível pode diminuir a capacidade de busca do parasitoide, por exemplo, o parasitoide *Aphidius ervi* Haliday não oviposita em *Therioaphis maculata* (Buckton), contudo, a presença deste pulgão reduziu a capacidade de forrageamento deste parasitoide pelo hospedeiro adequado *Acyrthosiphon pisum* (Harris), reduzindo a população do parasitoide (MEISNER et al., 2007). Um maior efeito na redução da população do parasitoide é esperado no caso do *L. pseudobrassicae* resistente, pois, além de esperar uma diminuição na capacidade de forrageamento de *D. rapae* (MEISNER et al., 2007), os pulgões resistentes ainda impedem o desenvolvimento dos ovos do parasitoide neles depositados (OLIVEIRA et al., 2013), reduzindo a população de *D. rapae* por essas duas maneiras. Embora em *L. pseudobrassicae* resistente tenha sido encontrado um número menor de pulgões mumificados e uma menor porcentagem de parasitismo, não houve alteração no parasitismo de *M. persicae*.

Em condições de campo, a população de *L. pseudobrassicae* é formada, provavelmente, por maioria de indivíduos resistentes (HUBAIDE, 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Assim, a população desta espécie é mais abundante e com menor parasitismo do que *M. persicae* (HUBAIDE, 2011). Os resultados do presente trabalho corroboram com essas observações de campo, já que a população de *L. pseudobrassicae* resistente foi maior e o parasitismo menor do que a de *L. pseudobrassicae* suscetível e a de *M. persicae*. A causa mais provável de resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae* é por interação com um microrganismo em simbiose facultativa, já que 6,6% da prole de clones resistentes perde a resistência, mesmo em partenogênese telítoca (CAPÍTULO 2). Dessa forma, o parasitismo encontrado em *L. pseudobrassicae* resistente pode ser explicado pela perda da resistência em parte da prole.

Este é o primeiro trabalho que avalia a influência da população de um pulgão resistente no parasitismo de seu competidor suscetível. Em alguns casos a presença de outra espécie de hospedeiro tende a aumentar a eficiência do parasitoide no controle de ambas às espécies (LANGER; HANCE, 2004), mas, no caso dos pulgões resistentes, o efeito pode ser contrário. Independente da presença de *L. pseudobrassicae* resistente, o parasitismo de *M. persicae* por *D. rapae* não foi alterado. Esses resultados são promissores para o controle biológico em brássicas,

indicando que, mesmo que *D. rapae* tenha pequeno impacto na redução de *L. pseudobrassicae*, este parasitoide pode controlar *M. persicae*.

7 CONCLUSÃO

O parasitismo de *D. rapae* em *M. persicae* não é alterado pela presença de *L. pseudobrassicae* resistentes ao parasitoide.

8 REFERÊNCIAS

ASGARI, S.; THEOPOLD, U.; WELLBY, C.; SCHMIDT, O. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 7, p. 3690-3695, 1998.

BARBEHENN, K. R. Host-parasite relationships and species diversity in mammals: an hypothesis. **Biotropica**, Washington, p. 29-35, 1969.

BERGESON, E.; MESSINA, F. J. Resource-versus enemy-mediated interactions between cereal aphids (Homoptera: Aphididae) on a common host plant. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 90, n. 4, p. 425-432, 1997.

BLACKMAN R.L; EASTOP V.F. Taxonomic Issues. In: van Emden HF, Harrington R, editors. **Aphids as Crop Pests**. Cambridge, MA, USA: CAB International. p. 1-30. 2007

BLUMBERG, D. Parasitoid encapsulation as a defense mechanism in the Coccoidea (Homoptera) and its importance in biological control. **Biological control**, Orlando, v. 8, n. 3, p. 225-236, 1997.

BUENO, V. H. P.; SAMPAIO, M. V. Desenvolvimento e multiplicação de parasitoides de pulgões. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Editora UFLA, Lavras, v. 429, p. 117-167, 2009.

CIVIDANES, F. J.; SOUZA, V. P. Exigências térmicas e tabelas de vida de fertilidade de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 413-419, 2003.

CIVIDANES, F. J.; SOUZA, V. P. Distribuição vertical de pulgões (Hemiptera: Aphididae) em couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 254-256, 2004.

CRAWLEY, M. J. **Herbivory. The dynamics of animal-plant interactions**. Blackwell Scientific Publications, 437 p., 1983.

DENNO, R. F.; MCCLURE, M. S.; OTT, J. R. Interspecific interactions in phytophagous insects: competition reexamined and resurrected. **Annual review of entomology**, Stanford, v. 40, n. 1, p. 297-331, 1995.

DESH, R.; CHAND, L G. Efficiency of endoparasitoid *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) on aphid complex infesting rapeseed in mid hill zone of Himachal Pradesh (India). **Journal of Entomological Research**, New Delhi, v. 22, n. 3, p. 245-251, 1998.

EMLEN, J. M. The role of time and energy in food preference. **The American Naturalist**, Chicago, p. 611-617, 1966.

FERRARI, J.; MÜLLER, C. B.; KRAAIJEVELD, A. R.; GODFRAY, H. C. J. Clonal variation and covariation in aphid resistance to parasitoids and a pathogen. **Evolution**, Chicago, v. 55, n. 9, p. 1805-1814, 2001.

GODOY, K. B.; CIVIDANES, F. J. Tabelas de esperança de vida e fertilidade para *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório e campo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 41-48, 2002.

HOLMES, J. C. Impact of infectious disease agents on the population growth and geographical distribution of animals. **Population biology of infectious diseases**, Springer-Verlag, Berlin, v. 37, p. 51, 1982.

HOLT, R. D. Predation, apparent competition, and the structure of prey communities. **Theoretical population biology**, New York, v. 12, n. 2, p. 197-229, 1977.

HOLT, R. D.; LAWTON, J. H. The ecological consequences of shared natural enemies. **Annual review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 25, p. 495-520, 1994.

HUBAIDE, J. E. A. **Distribuição na planta, fatores climáticos e parasitismo na dinâmica populacional de pulgões (Hemiptera: Aphididae) em couve**. 2011, 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

JEON, H. Y. KIM H.; LEE Y.; CHANG Y.; YIEM M. Biological control of the turnip aphid (*Lipaphis erysimi* K.) using the braconid wasp (*Diaeretiella rapae* M.). **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**. Seul, v.23, n.3, p.337-341, 2005.

KANT, R.; MINOR, M. A.; TREWICK, S. A. Fitness gain in a koinobiont parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae) by parasitising hosts of different ages. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Tokyo, v. 15, n. 1, p. 83-87, 2012.

KAPLAN, I.; DENNO, R. F. Interspecific interactions in phytophagous insects revisited: a quantitative assessment of competition theory. **Ecology Letters**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 977-994, 2007.

LANGER, A.; HANCE, T. Enhancing parasitism of wheat aphids through apparent competition: a tool for biological control. **Agriculture, ecosystems & environment**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 205-212, 2004.

MACARTHUR, R. H.; PIANKA, E. R. On optimal use of a patchy environment. **The American Naturalist**, Chicago, v. 100, n. 916, p. 603-609, 1966.

MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. The theory of island biogeography. **Princeton University Press**, New Jersey, v. 1, 201 pp. 1967.

MEISNER, M.; HARMON, J. P.; IVES, A. R. Presence of an unsuitable host diminishes the competitive superiority of an insect parasitoid: a distraction effect. **Population Ecology**, Tokyo, v. 49, n. 4, p. 347-355, 2007.

NICHOLSON, A. J. An outline of the dynamics of animal populations. **Australian Journal of Zoology**, Victoria, v. 2, n. 1, p. 9-65, 1954.

OLIVEIRA, R. S., SAMPAIO, M. V., FERREIRA, S. E.; RIBEIRO, L. C. M.; TANNÚS-NETO, J. Low parasitism by *Diaeretiella rapae* (Hym.: Braconidae) of *Lipaphis pseudobrassicae* (Hemip.: Aphididae): pre-or post-ovipositional host resistance? **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 79-91, 2013.

PETERSEN, M. K.; HUNTER, M. S. Variation in the outcome of competition between two aphid species on pecan: plants matter more than predators. **Oikos**, Lund, v. 92, n. 1, p. 107-118, 2001.

POPE, T.; CROXSON, E.; PELL, J. K.; GODFRAY, H. C. J.; MÜLLER, C. B. Apparent competition between two species of aphid via the fungal pathogen *Erynia neoaphidis* and its interaction with the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. **Ecological Entomology**, London, v. 27, n. 2, p. 196-203, 2002.

PRICE, P. W. **Insect ecology**. New York: John Wiley & Sons, 1997.

PRICE, P. W.; WESTOBY, M.; RICE, B.; ATSATT, P. R.; FRITZ, R. S.; THOMPSON, J. N.; MOBLEY, K. Parasite mediation in ecological interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, p. 487-505, 1986.

RICE, B.; WESTOBY, M. Heteroecious rusts as agents of interference competition. **Evolutionary Theory**, Chicago, v. 6, p. 43-52, 1982.

SAMPAIO, M. V.; BUENO, V. H. P.; DE CONTI, B. F. The effect of the quality and size of host aphid species on the biological characteristics of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). **European Journal of Entomology**, Bratislava, v. 105, n. 3, p. 489-494, 2008.

SCHOENER, T. W. Field experiments on interspecific competition. **The American naturalist**, Chicago, v. 121, n. 2, p. 240-285, 1983.

SILVA, R. J.; CIVIDANES, F. J.; PEDROSO, E. C.; SALA, S. R. D. Host quality of different aphid species for rearing *Diaeretiella rapae* (McIntosh) (Hymenoptera: Braconidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 4, p. 477-482, 2011.

STARÝ, P. Incomplete parasitization in aphids and its role in pest management (Hymenoptera: Aphidiidae). **Acta Entomologica Bohemoslov**, Bratislava, v. 86, n. 01, p. 356-367, 1989.