

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA

LOHAYNNE BORGES ROSA DE MOURA

**RESISTÊNCIA AO PARASITOIDE *Diaeretiella rapae* (McINTOSH) EM
POPULAÇÕES DE *Lipaphis pseudobrassicae* (DAVIS) COLETADAS EM PATOS
DE MINAS**

UBERLÂNDIA -MG
JULHO -2018

LOHAYNNE BORGES ROSA DE MOURA

**RESISTÊNCIA AO PARASITOIDE *Diaeretiella rapae* (McINTOSH) EM
POPULAÇÕES DE *Lipaphis pseudobrassicae* (DAVIS) COLETADAS EM PATOS
DE MINAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal
de Uberlândia, como parte das
exigências do Curso de Graduação
em Agronomia para obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Sampaio

**UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS- BRASIL
JULHO - 2018**

LOHAYNNE BORGES ROSA DE MOURA

**RESISTÊNCIA AO PARASITOIDE *Diaeretiella rapae* (McINTOSH) EM
POPULAÇÕES DE *Lipaphis pseudobrassicae* (DAVIS) COLETADAS EM PATOS
DE MINAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal
de Uberlândia, como parte das
exigências do Curso de Graduação
em Agronomia para obtenção do
título de Bacharel em Agronomia.

Aprovado pela Banca Examinadora em 19 de julho de 2018.

Prof. Dr. Marcus Vinicius Sampaio (Orientador)

Prof. Dr. Sandro M. Carmelino Hurtano

Prof. Dr. Fernando Juari Celoto

**UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS- BRASIL
JULHO-2018**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a **Deus**, que mesmo diante das dificuldades, me manteve forte para superá-las e seguir em frente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Marcus Vinícius Sampaio**, que me concedeu a oportunidade de trabalhar no LACOB durante toda a graduação. Agradeço pelos ensinamentos e pela confiança durante esses anos na Universidade. Agradeço também ao Prof. Dr. **Adão de Siqueira Ferreira** pelos ensinamentos e por toda paciência.

Agradeço às pessoas incríveis que tive oportunidade de conhecer e conviver no LACOB-UFU, **Amanda, Carol, Diego, Lorryne, Giovana, Ana Letícia, Gabriel, Anakely, Davi e Matheus Gregório**. Por todos conselhos e amizade durante esses anos.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro durante esses anos de pesquisa.

Aos meus amigos (as) por terem a paciência comigo por não ter tempo de vê-los diante a correria de final de semestre. Ao Breno, pela amizade e ajuda nas correções do TCC.

Agradeço a minha família, em especial a minha tia Clideucia e a minha avó, Maria Aparecida, por sempre torcerem por mim e me apoiarem. Ao Roney por ser esse “paizão” e sempre me incentivar nos estudos.

A minha amiga-irmã, Francielle Borges, uma pessoa extremamente forte, que nunca desiste de seus sonhos, meu exemplo de perseverança, torço muito pelo seu sucesso. Agradeço também ao meu cunhado Danilo por todo apoio durante esse ano.

À minha mãe, que lutou muito para eu estar aqui hoje e nunca deixou eu desistir dos meus sonhos, por ter me dado todo apoio, amor e carinho e por ser meu exemplo de humildade, força e fé. Tenha certeza que o meu maior sonho é que estivesse aqui comigo neste momento.

RESUMO

O pulgão *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) vem demonstrando uma alta taxa de resistência ao parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh) em todas as Regiões do Brasil. Em Uberlândia esta taxa é superior a 90%. Porém, a causa da resistência deste afídeo não foi determinada. Este estudo objetivou determinar a resistência de populações de *L. pseudobrassicae* coletadas em Patos de Minas ao parasitoide *D. rapae*; além disso, identificar se a causa da resistência de *Lipaphis pseudobrassicae* ao parasitoide *Diaeretiella rapae* é devido a presença dos endossimbiontes secundários: *Hamiltonella defensa* e *Regiella insecticola*, por meio da detecção dessas bactérias por PCR em amostras de pulgões resistentes de diferentes Regiões do Brasil. Após a coleta *L. pseudobrassicae* em Patos de Minas, estes tiveram sua população aumentada em laboratório até atingir 50 indivíduos adultos. Destes, foi avaliada a resistência de indivíduos de 4º instar de 30 clones da geração F1 e confirmação da resistência na geração F2 de laboratório. Para verificar se a causa da resistência é devido a presença de *H. defensa* e *R. insecticola* o DNA de indivíduos de *L. pseudobrassicae* resistentes e suscetíveis de diferentes regiões do Brasil (Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul) foi testado, assim como foi verificada a presença de *H. defensa* e *R. insecticola* em outras cinco espécies de pulgões, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856), *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy, 1907), *Rhodobium porosum* (Sanderson, 1900) e *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852), para a confirmação da metodologia utilizada para a detecção dessas bactérias. O DNA dos pulgões foi extraído para compor o banco de dados. Em seguida foi realizada a Reação em cadeia de polimerase (PCR) e a eletroforese, para confirmação da subunidade 16S. Os clones de *L. pseudobrassicae* apresentaram taxa de resistência de 83,3% a *D. rapae*. Além disso, foi possível confirmar a subunidade 16S, comprovando a presença de bactérias endossimbiontes nas espécies avaliadas. As bactérias *H. defensa* e *R. insecticola* não foram encontradas em nenhuma das 12 amostras, o que indica inefetividade do método utilizado para a detecção das bactérias. Desta forma, não foi possível confirmar que a resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* está relacionada à presença de bactérias simbiotes.

Palavras chaves: afídeos, subunidade 16S, brassicaceae, controle biológico.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	7
2- OBJETIVOS	9
3- MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 - Produção de mudas de couve (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> L.).....	10
3.2 - Obtenção dos pulgões <i>L. pseudobrassicae</i>	10
3.3 - Obtenção de parasitoides.....	11
3.4- Avaliação da resistência de <i>L. pseudobrassicae</i>	11
3.5 - Extração de DNA dos indivíduos resistentes e suscetíveis.....	13
3.6 - PCR das amostras.....	13
3.7 - Gel de agarose.....	14
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	

1- INTRODUÇÃO

O agronegócio de hortaliças é um ramo da economia agrícola que proporciona uma grande oportunidade de trabalho, principalmente no setor primário, devido à grande exigência de mão-de-obra desde os métodos de semeadura até a etapa de comercialização (FILGUEIRA, 2008). Estima-se que sejam cultivados aproximadamente 770 mil hectares e produzidos cerca de 17,5 milhões de toneladas de hortaliças em todo o país (EMBRAPA, 2006). Entre o período dos anos de 2000 e 2011, a produção brasileira de hortaliças cresceu 31% (EMBRAPA, 2012). Dentre essas hortaliças tem-se a couve de folhas (*Brassica oleracea* var. *cephala* L.), pertencente à família Brassicaceae, que é uma planta perene de porte ereto e de caule sublenhoso, que emite folhas continuamente (VIEIRA, 2006).

Segundo Filgueira (2008) a couve é um alimento importante na nutrição humana, sendo rica em minerais e vitaminas, destacando-se entre as plantas hortícolas. Estas hortaliças são frequentemente atacadas por pragas, sendo os pulgões ou afídeos considerados os mais prejudiciais.

As espécies mais importantes nesta cultura são: *Myzus persicae* (Sulzer), *Brevicoryne brassicae* L. e *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Hemiptera: Aphididae), causam bastante danos às brassicáceas, como couve, brócolis, couve-flor, nabo, mostarda e repolho (SOUSA-SILVA; ILHARCO, 1995; BLACKMAN; EASTOP, 2000). Essas espécies trazem um impacto negativo para a produção dessas hortaliças.

Os parasitoides prejudicam o hospedeiro por depositarem seus ovos no interior ou exterior do seu corpo. Em estágios mais avançados, as larvas do parasitoide eclodem, se alimentam dos tecidos e matam seu hospedeiro (GODFRAY, 1994). O pulgão *L. pseudobrassicae* é a espécie mais frequente em couve (SAMPAIO et al., 2017) e apresenta como principal parasitoide a vespa *Diaeretiella rapae* (McIntosh) (RESENDE et al., 2006; DESH; CHAND, 1998; AKHTAR et al., 2010; SAMPAIO et al., 2017).

Os hospedeiros podem apresentar mecanismos de defesa para contra-atacar seu inimigo natural. Essa defesa pode ser comportamental ou fisiológica. Na comportamental, o hospedeiro impede a deposição do ovo por meio de comportamentos agressivos ou utilizam outros indivíduos como guarda costas (HENTER; VIA, 1995). Já na resistência fisiológica o hospedeiro previne que os ovos do parasitoide venham a se desenvolver (GRIFFITHS, 1961; CARVER; SULLIVAN, 1988). Dentre essas respostas que podem ocorrer, estão a morte por asfixia do parasitoide ou a liberação de

substâncias que ocasionam sua necrose. Essa capacidade do hospedeiro pode ser alterada em função da população do hospedeiro, visto que está ligada às características de cada genótipo (KRAAIJEVELD et al. 1998). A resistência é um importante parâmetro da adaptação do hospedeiro, afetando diretamente o efeito e o estabelecimento dos parasitoides no campo (VORBURGER et al. 2009).

Estudos indicam que o parasitismo de *L. pseudobrassicae* por *D. rapae* pode ser superior a 60% (AKHTAR et al., 2010). Entretanto, na região de Uberlândia, em Minas Gerais, foi encontrada uma taxa de parasitismo de *L. pseudobrassicae* inferior a 10%, indicando que este pulgão é resistente ao parasitoide (SAMPAIO et al., 2017).

Alta porcentagem de indivíduos resistentes a *D. rapae* foi encontrada em populações de *L. pseudobrassicae* das Regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil, indicando que a resistência deste afídeo ao parasitoide é distribuída em todo o país (SILVA, 2017).

Ferreira (2013) comprovou em seus trabalhos que a resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae* não foi devido à defesa celular, já que não haviam estruturas encapsuladas do parasitoide no interior dos pulgões. Oliveira et al. (2013), buscou explicar o baixo parasitismo realizando testes em laboratório relacionando a preferência do parasitoide ao pulgão e observou que *D. rapae* ovipositou igualmente em *L. pseudobrassicae* e em *M. persicae*. Ferreira (2013) e Oliveira et al. (2013) observaram que a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae* está ligada com o desaparecimento e inviabilização dos ovos do parasitoide. Henter e Via (1995) já haviam notado que em pulgões resistentes os ovos do parasitoide não se desenvolviam. Posteriormente, segundo Oliver et al. (2003), o mecanismo de resistência foi associado aos pulgões resistentes devido à associação às bactérias endossimbiontes secundárias.

Esse mecanismo de resistência relacionado aos simbiossiontes foi confirmado em populações de pulgões das espécies *Acyrtosiphon 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). Dentre eles o pulgão *A. pisum*, conhecido popularmente como pulgão da ervilha, é a espécie mais utilizada como modelo para o estudo de bactérias endossimbiontes facultativas. Nessa espécie de pulgão já foram encontradas três espécies de endossimbiontes secundários: *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).

Levando em consideração a falta de estudos sobre a causa da resistência por endossimbiontes secundários no pulgão *L. pseudobrassicae*. Esse trabalho tem como intuito verificar a resistência ao parasitoide *D. rapae* em *L. pseudobrassicae* coletado em Patos de Minas, com a finalidade de aumentar a representatividade do estado de Minas Gerais e também verificar a causa dessa resistência do pulgão é devido a presença de duas bactérias: *H. defensa* e *R. insecticola*.

2- OBJETIVOS

- Determinar a resistência de populações de *L. pseudobrassicae* coletadas em Patos de Minas ao parasitoide *D. rapae*;

- **Hipótese nula (H₀):** não há indivíduos resistentes ao parasitoide *D. rapae* nas populações de *L. pseudobrassicae* coletadas em Patos de Minas.

- **Hipótese nula (H₁):** há indivíduos resistentes ao parasitoide *D. rapae* nas populações de *L. pseudobrassicae* coletadas em Patos de Minas.

- **Hipótese nula (H_{1.1}):** a porcentagem de indivíduos resistentes ao parasitoide *D. rapae* nas populações de *L. pseudobrassicae* coletadas em Patos de Minas é semelhante a que ocorre em Uberlândia.

- **Hipótese alternativa (H_{1.2}):** a porcentagem de indivíduos resistentes ao parasitoide *D. rapae* nas populações de *L. pseudobrassicae* coletadas em Patos de Minas é diferente da que ocorre em Uberlândia.

- Identificar se a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *Diaeretiella rapae* é devido a presença dos endossimbiontes secundários: *H. defensa* e *R. insecticola*.

- **Hipótese nula (H₀):** a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *Diaeretiella rapae* não é devido a presença dos endossimbiontes secundários: *H. defensa* e *R. insecticola*.

- **Hipótese alternativa (H₁):** a resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* é devido a presença de pelo menos um dos endossimbiontes secundários: *H. defensa* e *R. insecticola*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Produção de mudas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.)

Na casa de vegetação do campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), foram produzidas mudas de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) da variedade Manteiga da Geórgia. As sementes foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células preenchidas com substrato comercial, sendo que em cada célula foi inserida duas sementes de couve. Após 7 dias de sua emergência, foi realizado o desbaste deixando apenas a plântula mais vigorosa. Quando apresentavam um par de folhas definitivas, realizou-se o transplântio para vasos plásticos (15 cm de altura e 13 cm de diâmetro) contendo substrato orgânico (**Figura 1**).



Figura 1. Produção de mudas de couve: (A) semeadura; (B) transplântio; (C) plantas adultas

As plantas foram irrigadas diariamente e monitoradas para evitar a ocorrência de outras pragas. As folhas das plantas foram cortadas, conduzidas ao laboratório e utilizadas para a confecção de discos foliares de couve.

3.2 - Obtenção dos pulgões *L. pseudobrassicae*

A coleta dos pulgões *L. pseudobrassicae* foi realizada em 18/10/2016, na cidade de Patos de Minas (-18.5794 Sul, -46.5184 Oeste), no estado de Minas Gerais. Os pulgões foram coletados juntamente com as folhas de couve, num total de 5 folhas, sendo uma folha por planta. Cada folha continha no mínimo 10 pulgões. Os pulgões foram levados para o Laboratório de Controle Biológico (LACOB) na cidade de Uberlândia – Minas Gerais. Posteriormente, dez indivíduos adultos de cada folha foram colocados em placa Petri (100 mm de diâmetro) contendo uma camada de 10 mm ágar

1% e sobre o ágar um disco foliar de couve, totalizando 50 pulgões. As placas foram mantidas em câmara climática (22 °C, 50-55% UR e 12 horas de fotofase) até que a população aumentasse.

3.3 - Obtenção de parasitoides

Os parasitoides foram coletados de múmias de *M. persicae* e *B.brassicae* na casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Em seguida, foram colocadas e mantidas até sua emergência em um microtubo (2,0 mL). Após a emergência do parasitoide, foi disponibilizado mel e água na proporção de 1:1. Em seguida os parasitoides (macho e fêmea) foram colocados em um microtubo e após a observação do acasalamento a fêmea foi transferida para uma placa de Petri contendo 30 ninfas de 2º instar de *M. persicae* e mantida por duas horas para oviposição. Após este tempo, a fêmea foi retirada e as ninfas foram mantidas na placa em câmara climática (22°C e 12 h de fotofase), até a formação das múmias (10 a 15 dias depois). Os parasitoides foram utilizados nos testes de laboratório.

3.4 - Avaliação da resistência de *L. pseudobrassicae*

A taxa de indivíduos resistentes foi determinada a partir de 30 pulgões adultos retirados da população de Patos de Minas. Foi colocado um pulgão adulto por placa de Petri (50mm x 15mm) até totalizar 30 placas. A placa continha uma camada de ágar 1% de 10mm de altura e sobre o ágar um disco foliar de couve, esses pulgões foram mantidos por 24 horas. Após esse tempo, os adultos foram retirados e permaneceram somente as quatro ninfas por placa. Após 72 horas, as ninfas se encontravam no quarto instar, em seguida foram colocadas a oviposição por *D. rapae*

A oviposição foi observada no microscópio estereoscópico, sendo que cada ninfa de pulgão recebeu uma oviposição no abdome. As ninfas que receberam a oviposição na cabeça, nas pernas ou sifúnculo foram descartadas. Cada pulgão recebeu uma oviposição e cada fêmea de parasitoide *D. rapae* parasitou dez ninfas de *L. pseudobrassicae*. Em seguida, os pulgões parasitados foram levados para a câmara climática por um período de 14 dias (**Figura 2**).



Figura 2. Fluxograma para seleção de indivíduos resistentes e suscetíveis

Diariamente foram realizadas observações e avaliados o número de pulgões que atingiram a fase adulta e que reproduziram (resistente) e o número que se transformaram em múmia (suscetível) (**Figura 3**). As ninfas utilizadas foram de quarto instar porque mesmo os pulgões suscetíveis se reproduzem antes de mumificar ao serem parasitados neste instar.

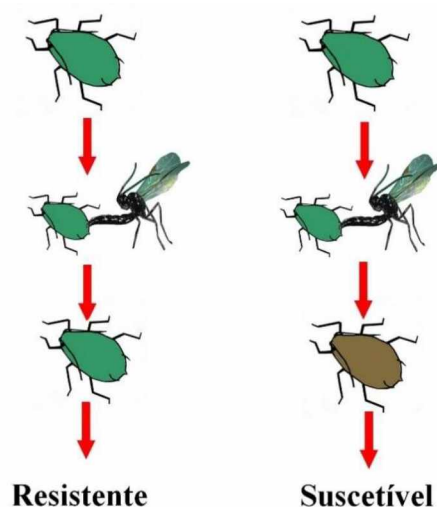


Figura 3. Identificação de indivíduos resistentes e suscetíveis

Realizou-se novamente o teste para a geração F2 de Patos de Minas, a fim de confirmar a resistência. Assim, quatro ninfas de quarto instar de pelo menos um clone (resistente e suscetível) foram parasitadas, seguindo a metodologia descrita anteriormente. A prole dos indivíduos com resistência e a suscetibilidade confirmada, foram mantidas em laboratório para a obtenção e armazenamento do DNA.

3.2 - Pulgões utilizados para análises moleculares

Para verificar a presença dos endossimbiontes secundários, *H. defensa* e *R. insecticola*, foram utilizados indivíduos de *L. pseudobrassicae* coletados em Patos de Minas e de pulgões resistentes e suscetíveis a *D. rapae* coletados em diferentes regiões do Brasil (**Tabela 1**). Para verificar a eficiência da metodologia de detecção das bactérias, indivíduos de diferentes espécies de pulgões foram coletados no campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia: *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856), *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy, 1907), *Rhodobium porosum* (Sanderson, 1900) e *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852).

Tabela 1. Dados de coleta de *Lipaphis pseudobrassicae* em diferentes localidades do Brasil.

Clones	Coordenadas Geográficas	Data da coleta	Nome do coletor	Clones*
Morrinhos	17°43'16" Sul	19/11/2016	Lohaynne O.	R
	49°6'29" Oeste		Borges	S
Porto Alegre	30°5'18" Sul	21/11/2016	Viviane F. Pretz	R
	51°1'26" Oeste			S
Recife	8°3'15" Sul	08/08/2016	Jorge B. Torres	R
	34°52'53" Oeste			S
Piracicaba	22°43'30" Sul	16/01/2017	Reinaldo S. de Oliveira	R
	47°38'51" Oeste			
Uberlândia	18°54'41" Sul	21/11/2016	Carolinne A.	S
	48°15'44" Oeste		Silva	

* R - Resistente; S - Suscetível ao parasitoides *D. rapae* de acordo com Silva (2017).

3.5 - Extração de DNA

O DNA foi extraído com o uso do Kit DNeasy® BloodandTissue de acordo com as instruções do fabricante. Em cada microtubo de 2ml foram colocados dez pulgões resistentes e dez suscetíveis. Posteriormente, com o auxílio de um bastão metálico, foi realizado a maceração dos indivíduos. Este procedimento foi feito em um recipiente de isopor contendo nitrogênio líquido. Em cada microtubo foi adicionado 200 µL de Buffer AL e homogeneizadas com auxílio de um agitador. Em seguida incubadas em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Após a retirada do banho-maria, foi adicionado 200 µL de etanol (96-100%) e os microtubos foram novamente homogeneizadas.

Em seguida, a mistura foi colocada em um tubo com filtro, que foi inserida em um tubo de coleta de 2 ml. Em seguida, foi adicionado 500 µL do Buffer AW1 e centrifugado novamente à 6.000g, e o fluido foi novamente descartado. Posteriormente, foi colocado novamente em novo tubo de coleta, adicionado o Buffer AW2 e centrifugado por 3 min a 20.000g. O DNA extraído foi diluído em 200 µL de Buffer AE no centro da membrana do tubo com filtro. O mesmo foi incubado a temperatura ambiente (15-25°C) por um minuto e centrifugado por 1 min a 6.000g. Essa etapa foi realizada duas vezes para aumentar o rendimento do DNA. O DNA foi armazenado no ultrafreezer (- 80°C). Estas amostras foram utilizadas nos testes de identificação da causa da resistência.

3.6 – PCR das amostras

Dentro de um microtubo foi colocado 6µ de água e 4 µl de DNA extraído das amostras, o mesmo foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta graduada. Essa solução foi adicionada ao mix, constituído por 2,5 µL de solução tampão, 1,5 µL de Mg, 5 µL de dNTP, 0,5 µL de Taq polimerase e 0,5 µL de primer 515F. Em seguida, foi adicionado o primer da subunidade ribossomal 16S. Em cada microtubo foi adicionado um primer específico, ou seja, na amostra 1 foi adicionado o primer A1, na amostra 2 foi adicionado o primer A2 e assim até chegar na amostra 13. As amostras foram amplificadas em um termociclador de acordo com o programa utilizado por: 94 °C, por 2 minutos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72 °C. Ao final do programa as amostras permaneceram no aparelho a 4°C até serem retiradas.

Depois foi realizada uma PCR com os primers específicos de *Hamiltonella defensa* e *Regiella insecticola* (**Tabela 2**).

Tabela 2. Primers usados para amplificação das bactérias *Hamiltonella defensa* e *Regiella insecticola*

Bacteria	Primer (5'-3')	Programa de amplificação
<i>Hamiltonella defensa</i>	Forward: 10F Reverse: T419R: AAA TGG TAT TCG CAT TTA TCG	95°C 4 min; 40 ciclos (95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s); 72°C 6 min
<i>Regiella insecticola</i>	Forward: 10F Reverse: U443R: GGT AAC GTC AAT CGA TAA GCA	94°C 2 min, 10 ciclos (94°C 1 min; 65°C 1 min; 72°C 2 min); 25 ciclos (94°C 1 min; 55°C q min; 72°C por 2 min) 72°C 6 min

3.7- Gel de agarose

Para cada amostra de DNA foi adicionado o mix que contém 2 µL do tampão + 1 µL de Syber na proporção 1:1, o mesmo foi homogeneizado com auxílio da pipeta. Em seguida, foi colocado 4µL da PCR em microtubo e acrescentado 3 µL do mix. Essa solução foi colocada nos poços do gel de agarose para corrida. O gel foi realizado da seguinte forma: para cada 40 µL de TAE 1X foi adicionado 0,8 g de agarose, obtendo um gel de 2% de agarose. Essa solução foi transferida para um béquer e levada ao micro-ondas por aproximadamente 15 segundos. Quando esta solução atingiu a temperatura de 60°C, foi utilizado para obtenção do gel à 2 % de agarose. Foi colocado o pente para formar vários poços, a mesma foi retirada quando ocorria a solidificação do gel. Para a montagem do aparato de corrida, o gel foi colocado na cuba no sentido negativo – positivo. Para a corrida das amostras foi utilizado uma voltagem de 90 volts durante uma hora. Após a corrida, o gel foi direcionado ao transiluminador para a verificação das bandas fluorescentes.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior parte das populações de afídeos apresentam uma grande variação genética, muitas vezes prevalecendo os clones suscetíveis aos parasitoides. O teste de resistência realizado nos pulgões *L. pseudobrassicae* que foram individualizados da população coletada em Patos de Minas (MG) demonstrou que dos trinta clones, cinco tornaram-se suscetíveis e mumificaram, resultando em uma taxa de 16,7% de suscetibilidade ao *D. rapae* (Tabela 2, Tabela 3).

Tabela 2 – Número de *Lipaphis pseudobrassicae* parasitados em quarto instar por *Diaeretiella rapae* que mumificaram ou não e taxa de suscetibilidade ao parasitoide

Localidade	Nº de clones parasitados	Não mumificaram	Mumificação	Taxa de susceptibilidade
Pato de Minas	30	25	5	16,7%

Não há dúvida quanto a suscetibilidade do pulgão *L. pseudobrassicae* quando o mesmo se transforma em múmia. Como foi parasitado quatro pulgões no 4º instar de cada clone, um clone já é suficiente para demonstrar a suscetibilidade ao parasitoide. A não mumificação do pulgão pode ser devido a quatro causas: a resistência ao parasitoide, erro fêmea do parasitoide ao ovipositar, erro do observador em visualizar corretamente a oviposição e a mortalidade natural da larva ou do ovo antes da mumificação (SILVA, 2017).

Tabela 3. Número de pulgões parasitados em quarto instar por *Diaeretiella rapae*, pulgões que mumificaram (suscetíveis) e pulgões que não mumificaram (resistentes) nos clones de *Lipaphis pseudobrassicae* da localidade de Patos de Minas (MG).

Clones	Pulgões parasitados	Pulgões mumificados	Pulgões que não mumificaram
PM1	4	0	4
PM2	4	0	4
PM3	4	0	4
PM4	4	0	4
PM5	4	3	1
PM6	4	2	2
PM7	4	0	4
PM8	4	0	4
PM9	4	0	4
PM10	4	0	4
PM11	4	0	4
PM12	4	0	4
PM13	4	0	4
PM14	4	3	1
PM15	4	0	4
PM16	4	0	4
PM17	4	0	4
PM18	4	0	4
PM19	4	0	4
PM20	4	0	4
PM21	4	4	0
PM22	4	0	4
PM23	4	0	4
PM24	4	0	4
PM25	4	3	1
PM26	4	0	4
PM27	4	0	4
PM28	4	0	4
PM29	4	0	4
PM30	4	0	4

O estudo realizado por Sampaio et al. (2017) com as três espécies de pulgões da couve, demonstrou que duas das três espécies, *M. persicae* e *B. brassicae*, apresentou 80% de parasitismo no campo, indicando alta proporção de indivíduos suscetíveis ao parasitoide na população. Enquanto na espécie *L. pseudobrassicae* a quantidade de indivíduos parasitados foi inferior a 10%, indicando alta proporção de resistentes. No entanto, esses dados não descartam a possibilidade da existência das populações de *L. pseudobrassicae* suscetíveis ao parasitoide em outras regiões do Brasil.

O trabalho de Silva et al. (2011) mostrou uma alta taxa de parasitismo por *D. rapae* em *L. pseudobrassicae*. Nesse trabalho também foram coletados pulgões de couves, na cidade de Jaboticabal – SP, e foi observado uma suscetibilidade em *L. pseudobrassicae* de 42,5%, que foi semelhante a de *B. brassicae* (48,2%), diferindo de *M. persicae* (66,5%), o qual demonstrou uma suscetibilidade maior que os demais. No entanto, Silva (2017) realizou um teste semelhante e encontrou indivíduos com alta taxa de resistência em várias localidades: Morrinhos (GO), Porto Alegre (RS), Recife (PE) e Piracicaba (SP). Compreendendo cinco estados do Brasil, constituindo as regiões Centro-Oeste, Sul, Sudeste e Nordeste brasileiro.

No estado de São Paulo foram encontradas duas situações distintas, indivíduos com maior taxa de resistência no município de Piracicaba (SILVA, 2017) e com maior índice de indivíduos suscetíveis em Jaboticabal (SILVA et al., 2011). Evidenciando que em um mesmo estado pode ocorrer variação dessa resistência. Entretanto, no estado de Minas Gerais as diferenças na suscetibilidade ao *D. rapae* foram pequenas, apresentando alta resistência nos municípios de Patos de Minas e Uberlândia (SILVA, 2017). Os dados desse trabalho contribuem para um aumento da representatividade sobre a resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* no estado de Minas Gerais.

Os indivíduos de Patos de Minas da geração F2 mantiveram suas características de resistência e suscetibilidade a *D. rapae* semelhantes as da geração F1 (Tabela 4), indicando que foi realizado o parasitismo correto na geração F1, aumentando credibilidade dos resultados.

Tabela 4. Clones resistentes e suscetíveis de *Lipaphis pseudobrassicae* parasitados em quarto instar por *Diaeretiella rapae* na geração F2 de Patos de Minas.

Clones	Pulgões parasitados	Resistentes	Suscetíveis
PMS	4	0	4
PMR	4	4	0

A causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* ainda não foi comprovada. O estudo realizado por Oliveira et al. (2013), buscou explicar o baixo parasitismo em *L. pseudobrassicae*, realizando testes no laboratório em relação a preferência do parasitoide ao pulgão e observou que *D. rapae* ovipositou igualmente em *L. pseudobrassicae* e em *M. persicae*. Demonstrando que não se trata de preferência por parte do parasitoide, e sim, de uma possível resistência do pulgão. Ferreira et al. (2018) mostraram em seu trabalho que essa resistência não é genética, verificando que indivíduos resistentes geram proles suscetíveis.

A resistência fisiológica contra os parasitoides, em geral, é encontrada em insetos e está associada ao genótipo do hospedeiro. Dentre esses mecanismos de resistência, o encapsulamento (formação da cápsula) é a resposta na qual algumas células identificam o parasitoide como um corpo estranho e se aderem ao ovo ou a larva causando seu rompimento (GRIFFITHS, 1961; CARVER; SULLIVAN, 1988). Esse tipo de estrutura também não foi encontrado no interior dos pulgões, demonstrando que a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* a *D. rapae* não foi pela defesa celular (OLIVEIRA, et al., 2013; FERREIRA, 2013). Dessa forma, podemos inferir que a provável causa dessa resistência é a presença de endossimbiontes secundários que, no caso dos procariotos, podem ser identificados através da PCR da subunidade ribossomal 16S (CLARCK et al. 2012). Essa confirmação é o primeiro passo para identificar bactérias específicas que podem estar causando esse tipo de resistência.

Foi observado que a água utilizada no mix não estava contaminada, pois o branco não foi amplificado (**Figura 4**). Ainda, a subunidade 16S foi amplificada em todas amostras que continham pulgões, independente da espécie ou se era resistente ou não (**Figura 4**).

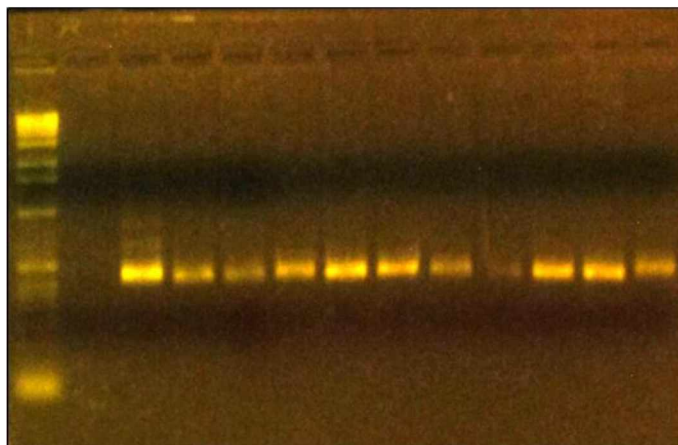


Figura 4: 1) 1KB, 2) Branco, 3) *Rhopalosiphum maidis*, 4) *Aphis (Toxoptera) citricidus*, 5) *Rhodobium porosum*, 6) *Schizaphis graminum* 7) *L. pseudobrassicae* Pernambuco Resistente, 8) *L.pseudobrassicae* Porto Alegre Resistente, 9) *L. pseudobrassicae* Patos de Minas resistente 10) *L. pseudobrassicae* Patos de Minas Suscetível, 11) *L. pseudobrassicae* Piracicaba Resistente, 12) *L. pseudobrassicae* Piracicaba Suscetível, 13) *L. pseudobrassicae* Uberlândia Resistente.

Não houve a confirmação das bactérias *Hamiltonella defensa* ou *Regiella insecticola* em nenhuma das 12 amostras testadas, nem em *L. pseudobrassicae* resistentes, nem em suscetíveis e nem sequer nas amostras de outras espécies de pulgões. Essas bactérias são encontradas em diversas espécies de pulgões. Guidolin e Cônsoli (2018) encontraram em 4,2% das amostras de *A. citricidus*, o que evidencia que a probabilidade de não ocorrência em todas as amostras do presente trabalho é pequena. Desta forma, o mais provável é que a metodologia de identificação das bactérias precisa ser aperfeiçoada. O protocolo utilizado foi testado e aprovado (Ferrari), no entanto, erros como a temperatura adequada para a ativação da enzima polimase, o tempo necessário para cada etapa ou o primer que foi utilizado podem afetar os resultados da PCR. Ferreira (2013) utilizou o mesmo protocolo em 60 amostras e não obteve sucesso na identificação dos simbiontes. Com isso, não foi possível identificar a causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae*.

5. CONCLUSÃO

Os pulgões *L. pseudobrassicae* coletados em Patos de Minas apresentaram 83% dos indivíduos resistentes ao parasitoide, demonstrando um alto nível de resistência.

A causa da resistência de *L. pseudobrassicae* ao parasitoide *D. rapae* não pôde ser determinada, uma vez que os resultados não foram conclusivos quanto a presença das bactérias *Hamiltonella defensa* e *Regiella insecticola*.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M.S. et al. 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. Aphids on the world's crops: an identification and information guide. **John Wiley & Sons**, New York, 475p., 2000.
- CARVER, M.; SULLIVAN, D. J. Encapsulative defence reactions of aphids (Hemiptera: Aphididae) to insect parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae and Aphelinidae). **Ecology and Effectiveness of Aphidophaga**, p. 299-303, 1988.
- CLARK, E. L.; DANIELL, T. J.; WISHART, J.; HUBBARD, S. F.; KARLEY, A. J. How conserved are the bacterial communities associated with aphids? A detailed assessment of the *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae) using 16S rDNA. **Environmental Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1386-1397, 2012.
- 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.
- 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.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013, 17 de outubro. **Hortaliças em números:** produção, 1980-2006. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalias_em_numeros/hortalias_em_numeros.htm
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2017, 18 de novembro. **Hortaliças em números:** Situação da Produção de Hortaliças no Brasil - 2000 - 2012. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalias_em_numeros/hortalias_em_numeros.htm
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013, 18 de outubro. **Hortaliças em números: Situação da Produção de Hortaliças no Brasil - 2000 - 2011.** Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalias_em_numero/hortalias_em_numeros.htm
- EMDEN, H. F. VAN; WRATTEN, S. D. Tri-trophic interactions involving plants in the biological control of aphids. In D.C. Peters, J.A. Webster & C.S. Chlouber (eds.), *Aphid-plant interactions: Population to molecules*. **Stillwater**, Oklahoma State Univ./USDA, p.29-43, 1990.
- 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

FERREIRA, S. E. **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. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

FERREIRA, S. E.; SAMPAIO, M. V.; OLIVEIRA, R. S.; VASCONCELOS, H. L. Parasitism rate of *Myzus persicae* (Sulzer) by *Diaeretiella rapae* (McIntosh) in the presence of an alternative, resistant host. **Sociedade Brasileira de Entomologia**, 2018.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV. 2 ed, 421 p, 2008.

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

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.

GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Diversity of the Most Commonly Reported Facultative Symbionts in Two Closely-Related Aphids with Different Host Ranges. **Neotrop Entomol**, 2018.

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 de Mestrado – UFU, 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.

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.

MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. Aphids: their biology, natural enemies and control, Elsevier, New York v.2B, 384 p., 1988.

OLIVER, K. M. et al. 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.

RESENDE, A. L. S. et al. Primeiro registro de *Lipaphis pseudobrassicae*. Davis (Hemiptera: Aphididae) e sua associação com insetos predadores, parasitoides e

formigas em couve (Cruciferae) no Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 551-555, 2006.

SAMPAIO et al. Brassica aphid (Hemiptera: Aphididae) populations are conditioned by climatic variables and parasitism level: a study case of Triângulo Mineiro, **Brazil. Bulletin of Entomological Research**, Reino Unido, 2017.

SILVA, R. S.; MORAIS, E. G. F.; PICANÇO, M. C.; SANTANA JUNIOR, P. A.; SOUZA JUNIOR, R. C.; SILVA, D. J. H. **Influência dos fatores bióticos e abióticos na população de *Lipaphis erysimi*. Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, supl., p. 763- 771, 2011

SILVA, C. A.; **Resistência ao parasitoide *Diaeretiella rapae* (MCINTOSH, 1855) (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae) de *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis, 1914) (Hemiptera: Aphididae) de diferentes localidades do brasil**. 2017. Dissertação de mestrado em agronomia -Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SOUSA-SILVA, C.R.; ILHARCO, F. A. **Afídeos do Brasil e suas plantas hospedeiras** (lista preliminar). São Carlos, EDUFSCar, 85p., 1995.

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.

VAZ, A. L.; TAVARES, M. T.; LOMÔNACO, C. Diversidade e tamanho de himenópteros parasitóides de *Brevicorynebrassicae* L. e *Aphisnerii* Boyer de Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v.33, p. 225-230, 2004.

VIEIRA, R. S. I. R. **Sistema de informação rural**. Associação de agricultores da madeira portugal, 2006. Disponível em: [http:// w.sirmadeira.org/ epages/sir.sf/pt_pt/](http://w.sirmadeira.org/epages/sir.sf/pt_pt/)?

VON BURG, S. et al. 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. et al 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.