

CARLA CRISTINA MARQUES ARCE

INTERAÇÃO TRÓFICA ENTRE *Meloidogyne javanica* E *Tuta absoluta* EM TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A668i
2010

Arce, Carla Cristina Marques, 1985-
Interação trófica entre *Meloidogyne javanica* e
Tuta absoluta em tomateiro / Carla Cristina Marques Arce.
– Viçosa, MG, 2010.
xi, 42f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-42.

1. Tomate - Resistência a *Tuta absoluta*. 2. *Tuta absoluta*
- Comportamento. 3. Relação inseto-planta. 4. Enzimas
proteolíticas. 5. *Meloidogyne javanica*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

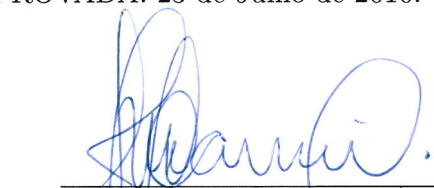
CDD 22. ed. 635.642978

CARLA CRISTINA MARQUES ARCE

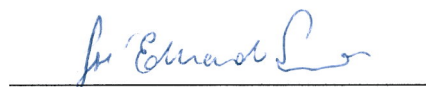
INTERAÇÃO TRÓFICA ENTRE *Meloidogyne javanica* E *Tuta absoluta* EM TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

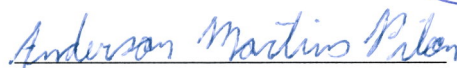
APROVADA: 23 de Julho de 2010.



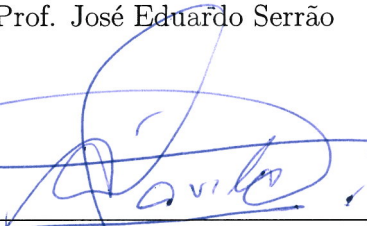
Prof. Flavia Maria da Silva Carmo
(Bos. todos)



Prof. José Eduardo Serrão



Dr. Anderson Martins Pilon



Dr. Crébio José Ávila



Prof. Eraldo Rodrigues de Lima
Orientador

Dedico à minha irmã Claudia pelo estímulo e força.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força e sabedoria.

À Universidade Federal de Viçosa e à coordenação do programa de pós-graduação em Entomologia, pela oportunidade e estrutura oferecida.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro para realização do projeto.

Ao Prof. Eraldo pela oportunidade, dedicação e orientação ao longo desses anos.

Aos meus co-orientadores: Flávia e Leandro pela ajuda, disponibilidade e atenção ao longo desse trabalho.

Ao “Seu Manuel” pela incansável ajuda em todos os momentos da realização deste trabalho.

Aos colegas e ex-cologas do laboratório de Semioquímicos: Amanda, Andreza, Daniel, Juliana, Lívia, Mateus, Silvana, Sandra e Zulma. Pelo convívio, discussões e ensinamentos. Muito Obrigada!

Aos estagiários Ana Marina, Fernando e Gabriel pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos alunos do Laboratório de Nematologia, em especial ao Ronaldo, pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos integrantes do Laboratório de Enzimologia, em especial ao Gilson, pela contribuição na avaliação de inibidores de protease.

À Carol Muller e Daniel pela ajuda na coleta de dados.

À minha família, pela dedicação, força e principalmente por me mostrar que viver é melhor do que sonhar.

Ao meu grande irmão Paulo, que sempre esteve presente em momentos importantes me apoiando e também criticando. Muito Obrigada por tudo e principalmente pela amizade.

Às grandes e velhas amigas: Aretha, Carol, Marília e Vanessa que mesmo longe contribuíram através da torcida.

Ao Danilo pelo companheirismo, carinho e por sempre acreditar em mim me dando força.

Aos novos amigos de Viçosa: Ana Paula, Cassiano, Roberta, Damares, Joanna, Flávia, Silvia e Fabiana, entre outros pelos momentos de descontração que possibilitaram bons momentos nestes anos.

À Mirian e Paula, por toda ajuda durante o mestrado.

Enfim, agradeço a todos que torceram e apoiaram durante esta etapa. Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL & MÉTODOS	7
2.1 Cultivo das Plantas	7
2.2 Delineamento Amostral	7
2.3 Criação de <i>Tuta absoluta</i>	8
2.4 Teste de Oviposição	8
2.5 Nitrogênio	9
2.6 Fotossíntese	9
2.6.1 Caracterização dos parâmetros de trocas gasosas	9
2.7 Inibidor de Protease	10
2.7.1 Análise enzimática	10
2.7.2 Determinação de proteínas totais	10
2.7.3 Determinação dos inibidores de protease	11
2.8 Análise de Dados	12
3 RESULTADOS	14
3.1 Oviposição	15

	vi
3.1.1 10 Dias	15
3.1.2 20 e 30 Dias	16
3.1.3 Nitrogênio	20
3.1.4 Fotossíntese	20
3.1.5 Inibidor de Protease	23
3.1.6 Observações Fenológicas	25
4 DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÕES	30
ANEXOS	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Galhas de <i>Meloidogyne javanica</i> presentes em raiz de <i>Solanum lycopersicon</i> . Viçosa-MG.	8
2	Teste de oviposição de <i>Tuta absoluta</i> com chance de escolha. Viçosa-MG	9
3	Efeito dos níveis de infestação por <i>Meloidogyne javanica</i> no número de galhas por planta (<i>Solanum lycopersicon</i>). ($F_{1,22} = 327,93$; $p < 0.001$). Viçosa, MG.	15
4	Proporção dos ovos depositados por fêmeas acasaladas de <i>Tuta absoluta</i> em <i>Solanum lycopersicon</i> com 10 dias de infestação por ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> nos níveis 0, 1000, 3000 e 5000 ovos. ($\chi_{1,58} = 337,44$; $p < 0.001$). Viçosa, MG.	17
5	Proporção dos ovos depositados por fêmeas acasaladas de <i>Tuta absoluta</i> em <i>Solanum lycopersicon</i> com 20 dias de infestação por ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> nos níveis 0, 1000, 3000 e 5000 ovos. ($\chi_{1,58} = 435,93$; $p = 0.0176$). Viçosa, MG.	18
6	Proporção dos ovos depositados por fêmeas acasaladas de <i>Tuta absoluta</i> em <i>Solanum lycopersicon</i> com 30 dias de infestação por ovos de <i>Meloidogyne javanica</i> nos níveis 0, 1000, 3000 e 5000 ovos. ($\chi_{1,58} = 328,86$; $p = 0.0321$). Viçosa, MG.	19
7	Efeito do Número de galhas por planta ($F_{1,34} = 23,99$; $p < 0.001$;) e dias de infestação ($F_{2,32} = 6,81$; $p < 0.001$;) por <i>Meloidogyne javanica</i> na quantidade de Nitrogênio total em folhas de <i>Solanum lycopersicon</i> . Viçosa, MG.	21
8	Efeito do Número de galhas ($F_{1,38} = 158,05$; $p < 0.001$;) por planta e dias de infestação ($F_{1,37} = 91,36$; $p < 0.001$;) por <i>Meloidogyne javanica</i> na Taxa Fotossintética Líquida ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$) de <i>Solanum lycopersicon</i> . Viçosa, MG.	22

9	Efeito do Número de galhas por planta ($F_{1,34} = 1085.32$; $p < 0.05$) e dias de infestação ($F_{2,32} = 640.08$; $p < 0.001$) por <i>Meloidogyne javanica</i> na quantidade de mg de Tripsina inibida por g de Proteína em <i>Solanum lycopersicon</i> . Viçosa, MG.	24
10	Plantas de tomate <i>Solanum lycopersicon</i> de mesma idade infestadas na parte radicial por <i>Meloidogyne javanica</i> em diferentes estádios reprodutivos. Plantas sem ataque do nematóide (a) e planta atacada pelo nematóide (b).	25

RESUMO

ARCE, Carla Cristina Marques, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Interação trófica entre *Meloidogyne javanica* e *Tuta absoluta* em tomateiro.** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-orientadores: Flávia Maria da Silva Carmo e Leandro Grassi de Freitas.

Para compreender como o ataque de herbívoros na raiz pode influenciar herbívoros na parte aérea é essencial entender os efeitos que esta herbivoria pode causar no hospedeiro. Plantas quando atacadas por herbívoros respondem na tentativa de combatê-los. Dentre as variadas respostas, a indução de defesa é um mecanismo bastante utilizado por plantas nestas condições. Sendo assim, o objetivo geral desta dissertação foi verificar se um dano causado no sistema radicular de uma planta por um nematóide desencadeia respostas defensivas e como esta indução de defesa varia quanto a intensidade da injúria sofrida e ao longo do tempo. Dessa forma, como espera-se que a resposta defensiva seja sistêmica, qual o impacto que um herbívoro especialista de parte aérea sofrerá. Para tal, verificamos: (i) se plantas de tomate *Solanum lycopersicon* infestadas no sistema radicular por nematóide *Meloidogyne javanica* respondem ao ataque pela indução de defesa e (ii) se plantas de tomate infestadas no sistema radicular por nematóide afetam o comportamento de oviposição do herbívoro de parte aérea *Tuta absoluta*. Para obter a variação da resposta na indução de defesa quanto a intensidade do dano e tempo, avaliou-se plantas sob diferentes níveis e dias de infestação no sistema radicular. Como indicativo de indução de defesa quantificou-se inibidor de protease, nitrogênio e fotossíntese. Para verificar o comportamento de oviposição avaliou-se a porcentagem de ovos em teste de oviposição com chance de escolha. Plantas de tomate infestadas no sistema radicular responderam ao ataque pela indução sistêmica de defesa, através do aumento nas quantidades de inibidor de protease, de nitrogênio e com a diminuição da taxa fotossintética. Diante destas respostas constatou-se que o comportamento

de oviposição do herbívoro especialista na parte aérea foi afetado. Os resultados obtidos aumentam as evidências de que interações entre herbívoros separados espacialmente podem ser mediadas pela resposta de indução de defesa da planta. Assim, fortalecendo com subsídios a teoria ótima de defesa de plantas.

ABSTRACT

ARCE, Carla Cristina Marques, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010.
Trophic interaction between *Meloidogyne javanica* and *Tuta absoluta* in tomato. Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-Advisers: Flávia Maria da Silva Carmo and Leandro Grassi de Freitas.

To understand how the attack on the root herbivores can influence shoot is essential to understand the effects that herbivory can cause the host. Plants respond when attacked by herbivores respond in an attempt to combat them. Among the varied responses, induction of defense is a mechanism frequently used by plants in these conditions. Therefore, the objective of this thesis was to determine whether an injury to the roots of a plant by a nematode triggers defensive responses and induction of defense as it varies in intensity and the injury suffered over time. Thus, as it is expected that the defensive response is systemic, what impact a specialist herbivore shoot suffer. For this, we checking: (i) if tomato plants *Solanum lycopersicon* infested by the root nematode *Meloidogyne javanica* respond to attack by the induction of defense and (ii) if tomato plants infested by nematodes in the root system affect the behavior of the herbivore oviposition shoot *Tuta absoluta*. For the response variation in the induction of defense and the intensity of damage and time was evaluated under different plants and days feeding on the roots. As an indication of induced defense was quantified protease inhibitor, nitrogen and photosynthesis. To check the oviposition behavior evaluated the percentage of eggs in oviposition test with multiple choice tests. Tomato plants infested root system responded to the attack by inducing systemic defense by increasing the amounts of protease inhibitors, nitrogen and the decrease of photosynthetic rate. Given these responses it was found that oviposition behavior of the specialist herbivore in the shoot was affected. The results increase the evidence that interactions between spatially separated herbivores may be mediated by the induction response of plant defense. Thus, strengthening the theory with subsidies optimal plant defense.

1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos apontam a interdependência das dinâmicas populacionais de organismos que vivem no solo ou sobre ele e de inimigos naturais, mediadas por respostas de defesa em órgãos da planta acima e abaixo do solo. Todavia, a maioria dos estudos focam interações que ocorrem acima do solo, geralmente negligenciando o fato de que organismos separados espacialmente interagem entre si de formas muito complexas (van der Putten *et al.*, 2001).

As atividades de organismos no solo podem afetar o fenótipo da parte aérea da planta, e como resposta ocorre a indução de defesa contra herbívoros e patógenos (Blouin *et al.*, 2005). Nesse contexto, alguns compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, que protegem as folhas contra herbívoros, são sintetizados nos tecidos das raízes, promovendo assim uma interação entre raiz e proteção foliar (Karban, 1997; van der Putten *et al.*, 2001).

O elaborado sistema de defesa das plantas pode atuar de várias formas, existindo um balanço entre o metabolismo primário e secundário que promove respostas da planta ao estresse (Karban & Myers, 1989). Embora plantas possuam defesas constitutivas (defesas permanentes da planta), é estratégico desencadear as defesas somente em resposta ao ataque de herbívoros. Assim, a defesa induzida só ocorre mediante o ataque, promovendo a indução de compostos defensivos que podem atuar de forma direta e/ou indireta ao agressor (Karban, 1997). A ação direta da defesa induzida causa um efeito deletério para o herbívoro, como por exemplo toxinas que podem afetar o desenvolvimento do inseto (Howe & Schaller, 2008; Dicke

& Vet, 1999), enquanto que a defesa induzida indireta promove a atração de inimigos naturais (van Poecke & Dicke, 2004; Wäckers, 2001).

Uma vantagem que a defesa induzida pode proporcionar é o redirecionamento de custos biossintéticos na produção de metabólitos ao evitar que outros organismos possam explorar as defesas em benefício próprio (Karban, 1997; Cipollini *et al.*, 2003; Zangerl, 2003). As defesas devem ser preferencialmente alocadas em partes valiosas das plantas, resultando em uma alocação espaço-temporal (Rhoads, 1979) e garantindo, assim, uma alocação ótima dos produtos de defesa dentro dela (Iwasa *et al.*, 1996; van Dam *et al.*, 1996; Bezemer *et al.*, 2003). Na ausência do herbívoro, a planta pode realocar seus recursos para outras funções (Berenbaum & Zangerl, 1999).

Diante de um ataque a planta desencadeia uma cascata de sinalização que pode resultar na indução de defesa, podendo ser do tipo morfofisiológicas (tricomias) e/ou químicas (toxinas). O mecanismo de indução de defesa acionado pela planta, irá depender do tipo e da intensidade da injúria na qual é submetida, sendo ativado por uma variedade de sinais emitidos pelo órgão lesionado. A ativação desses mecanismos geralmente envolve a produção de ácido jasmônico, que regula vários processos envolvidos na indução de defesa (Wang *et al.*, 2000), ocorrendo acúmulo em plantas atacadas (Baldwin *et al.*, 1997).

A ativação de genes relacionados a defesa na sua maioria são induzidos pelo ácido jasmônico, que produz uma variedade de compostos defensivos de plantas, como os inibidores de protease (Farmer & Ryan, 1992). Estes redutores de digestibilidade estão intimamente relacionados aos mecanismos de defesa contra herbivoria e seus níveis podem ser rapidamente elevados quando a planta é danificada pelo inseto ou mediante a liberação de elicitores (Rakwal *et al.*, 2001). Além da resposta local verifica-se que sinais específicos originários dos tecidos danificados são

transportados via floema, acarretando aumento nos níveis de inibidores de proteases por toda a planta, caracterizando uma resposta sistêmica (Jongsma & Bolter, 1997). Estes inibidores atuam significativamente nas atividades proteolíticas das proteases presentes no intestino dos insetos (Hilder *et al.*, 1987; Ryan, 1990). A ingestão de altas quantidades de inibidores de proteases resulta na hiperprodução de proteases alimentares, levando à limitação de aminoácidos essenciais para a síntese protéica e, conseqüentemente, redução do crescimento e desenvolvimento de alguns insetos (Brodway & Duffey, 1986).

A resposta de indução de defesa iniciada pela planta quando atacada por um herbívoro, pode ser considerada a principal resposta para combater a herbivoria. Com isso, alguns processos decorrentes da injúria sofrida pela planta podem impactar a herbivoria, pois como consequência do dano a planta pode ter alterações fisiológicas, um exemplo de processo é a fotossíntese, que pode ser alterada (Schmidt *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009). O redirecionamento de recursos metabólicos para defesa pode ser um mecanismo que contribui para uma supressão indireta na fotossíntese. Havendo alteração na fotossíntese, o metabolismo primário e o processo de crescimento da planta são alterados (Schmidt *et al.*, 2009).

Entre outras mudanças a qualidade nutricional de uma planta sob ação de herbivoria também pode ser afetada (Gange & Brown, 1989; Masters & Brown, 1992). Crescimento e defesa em plantas requerem recursos similares, como aminoácidos e nutrientes (Herms & Mattson, 1992). Por exemplo, com a ação de herbivoria em *Nicotiana attenuata*, 6% do nitrogênio total é alocado para compostos defensivos, o que reduz a disponibilidade de nitrogênio para o desenvolvimento da planta (Baldwin, 1998). Dentre os nutrientes disponíveis em uma planta, o nitrogênio destaca-se por exercer um importante papel no desenvolvimento de herbívoros (Awmack & Leather, 2002). Dessa forma, considerando que a condição nutricional da planta é

avaliada pelo herbívoro durante a seleção do mesmo, uma deficiência nutritiva na planta pode torná-la não hospedeira.

Uma planta sob estresse, seja este causado por fatores bióticos (herbivoria) e/ou abióticos (temperatura e luz) (Schoonhoven *et al.*, 2005), podem alterar o metabolismo de carbono e nitrogênio (Hamilton & Berenbaum, 2001) e conseqüentemente a produção de aleloquímicos, tornando-se mais ou menos atrativas para insetos. Estas respostas de uma planta mediante o ataque de herbívoros podem afetar o comportamento de insetos, tornando-se importantes para seleção de um hospedeiro. Diante disso, a seleção de uma planta hospedeira pelo herbívoro envolve a escolha de um hospedeiro adequado para alimentação, desenvolvimento e sobrevivência (Bernays & Chapman, 1994).

O tomateiro *Solanum lycopersicon* L. (Solanaceae) é uma das mais importantes hortaliças cultivadas no mundo, podendo ser utilizada como hospedeira por cerca de 200 espécies de artrópodes. Plantas de tomate tem sido utilizadas como modelo para estudos que envolvem expressão gênica (Fung *et al.*, 2006; Kok *et al.*, 2007), defesas induzidas contra bactérias (Cavalcanti *et al.*, 2006), nematóides (Molinari & Loffredo, 2006) e voláteis emitidos após injúria (Farag & Paré, 2002).

Dentre os insetos associados a essa cultura, merece destaque a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* M. (Lepidoptera: Gelechiidae) que ataca folhas, flores e frutos, podendo ocasionar até a morte da planta, motivos pelos quais passou a ser considerada uma praga chave desta cultura no Brasil. A primeira ocorrência de *T. absoluta* no Brasil foi verificada em meados de 1979, no litoral do Paraná (Muszynski *et al.*, 1982), e já no final da década de 80 esta praga era relatada em todos os campos de produção de tomate deste país (França, 1993). Em condições de laboratório, o ciclo completo da *T. absoluta* varia de 26 a 38 dias, suas larvas minadoras alimentam-se, inicialmente, do mesófilo foliar, construindo galerias transparentes.

Outros organismos que atacam o tomateiro são os nematóides, que exploram uma grande variedade de nichos ecológicos. De acordo com Semblat *et al.* (2000), os nematóides causadores de galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (Treud), são endoparasitas sedentários que causam danos extensivos a um vasto número de culturas economicamente importantes, incluindo o tomate. As espécies *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* (Chitwood) estão entre as espécies mais nocivas à agricultura brasileira (Peixoto *et al.*, 1999).

Segundo Taylor & Sasser (1983) o ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. começa com o ovo, passando a juvenil (vários estádios), sendo estes juvenis formados ainda dentro do ovo. Quando o juvenil de segundo estágio (J2) é formado ele começa a perfurar o ovo com o seu estilete rompendo a casca por onde sai para o solo e migra em busca de uma raiz. Seguindo um gradiente de concentração de exsudatos radiculares, o J2 orienta seu movimento em direção à raiz. Após a penetração, o J2 migra para o tecido vascular e começa a se alimentar, introduzindo substâncias nas células da planta que vão alterá-las morfo e fisiologicamente. Estas células aumentam de tamanho, seus núcleos se dividem sem divisão da célula e o metabolismo é acelerado. As células do córtex se multiplicam desordenadamente e a raiz se engrossa formando um tumor que recebe o nome de galha. A sintomatologia na parte aérea da planta causados pelos nematóides das galhas são similares aos causados por outros patógenos que reduzem a quantidade de água e nutrientes disponíveis para a planta. As plantas infectadas mostram crescimento reduzido, com folhas pequenas e amareladas, que murcham prematuramente.

Sendo assim, o objetivo geral desta dissertação foi verificar se um herbívoro na parte aérea de uma planta é impactado pela resposta na indução de defesa gerada pelo ataque no sistema radicular e qual o padrão espaço-temporal desta resposta. Para tanto, verificamos: (i) se plantas de tomate *Solanum lycopersicon* infes-

tadas no sistema radicular por nematóide *Meloidogyne javanica* respondem ao ataque pela indução sistêmica de defesa e (ii) se estas plantas afetam o comportamento de oviposição do herbívoro de parte aérea *Tuta absoluta*. Para obter o padrão espaço temporal da resposta na indução de defesa, avaliou-se plantas sob diferentes níveis e dias de infestação no sistema radicular. Como indicativo de indução de defesa quantificamos nitrogênio, fotossíntese e inibidor de protease. Após verificar se a planta responde ao ataque na raiz, foi avaliado o comportamento de oviposição de *Tuta absoluta*, um inseto especialista da parte aérea.

2 MATERIAL & MÉTODOS

2.1 Cultivo das Plantas

Sementes de tomate (*Solanum lycopersicon* Mill cultivar Santa Clara 5600 VF), foram semeadas em bandejas de isopor com 100 células contendo substrato comercial Plantmax[®]. Após 25 dias da semeadura, as plantas foram transferidas para vasos de 3 L. contendo solo esterelizado com brometo de metila, na proporção de 1:1 de solo e areia.

As plantas de tomate foram submetidas a inoculação por ovos de *Meloidogyne javanica*, 5 dias após o trasplante. A coleta dos ovos foi realizada pela técnica de Hussey & Barker adaptado por Boneti & Ferraz (1981). O inóculo foi cedido pelo Laboratório de Nematologia/Bioagro/UFV.

2.2 Delineamento Amostral

Para verificar se a resposta da planta ocorre de maneira diferenciada quanto ao tempo de exposição e a quantidade da injúria, cada planta foi submetida a diferentes níveis de infestação por ovos de *M. javanica*: 0, 1000, 3000 e 5000 e avaliadas em diferentes dias após de infestação 10, 20 e 30. Para todos os experimentos realizou-se a contagem do número de galhas (Fig 1) em cada tratamento (1000, 3000 e 5000) nos diferentes dias: 10, 20 e 30, este procedimento foi realizado afim de confirmar que os níveis de infestação estavam ocorrendo.



Figura 1: Galhas de *Meloidogyne javanica* presentes em raiz de *Solanum lycopersicon*. Viçosa-MG.

2.3 Criação de *Tuta absoluta*

A criação de *T. absoluta* foi estabelecida conforme Miranda *et al.* (1998), mantida a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. 65% e fotofase de 12 horas, no laboratório de Semioquímicos/UFV. Segundo protocolo de criação em anexo.

2.4 Teste de Oviposição

Para avaliar a preferência de oviposição de *T. absoluta*, foi realizado teste em confinamento, onde fêmeas recém emergidas foram confinadas com machos para ocorrência do acasalamento. Após acasaladas essas fêmeas foram individualizadas dentro de potes plásticos (250 ml), com solução açucarada à 10% para alimentação e mantidas nessas condições por 24 horas. Após esse período foram oferecidos folíolos do terço superior das plantas de tomate nos tratamentos estudados (Fig 2). A avaliação do teste foi realizada através da contagem de ovos depositados nos folíolos, após 24 horas do confinamento.



Figura 2: Teste de oviposição de *Tuta absoluta* com chance de escolha. Viçosa-MG

2.5 Nitrogênio

A quantificação de nitrogênio total foi verificada nas folhas (folíolos coletados do terço superior) e raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos (níveis e dias). Após coletados, o material foi colocado em estufa a 60 °C para secagem e encaminhados ao Laboratório de Análise de Solo e Folha Viçosa Ltda. O método de quantificação utilizado foi Kjeldahl.

2.6 Fotossíntese

2.6.1 Caracterização dos parâmetros de trocas gasosas

A caracterização dos parâmetros de trocas gasosas foram feitas em folhas (folíolos coletados do terço superior), completamente expandidas de plantas de tomate, submetidas aos tratamentos (níveis e dias). As medições foram realizadas entre 08:00 e 10:00 h, utilizando-se um sistema de determinações da concentração de

gases no infravermelho (IRGA, Li-Cor Inc. LI-6400, Lincoln, EUA). Determinou-se a taxa fotossintética líquida ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$).

2.7 Inibidor de Protease

2.7.1 Análise enzimática

A quantificação de inibidores de protease foi realizada em plantas submetidas aos tratamentos (níveis e dias). Os extratos foram obtidos a partir das folíolos coletados do terço superior das plantas. Após coletados, os folíolos foram imediatamente acondicionadas em isopor contendo nitrogênio líquido, mantidos em freezer à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do processamento dos mesmos para a obtenção do extrato bruto.

No laboratório de Enzimologia/Bioquímica de Proteínas e Peptídeos/Bioagro, as amostras foram processadas e o preparo do extrato bruto foi realizado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, de acordo com o método descrito por Ohta *et al.* (1986). O material foi pesado em balança analítica e imediatamente macerado em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo e cadinho. Ao pó obtido foi adicionado o tampão 0,1M Tris-HCl, pH 8,2 e 20mM CaCl₂; 1:3(p/v), homogeneizado e em seguida transferido para um ependorf e mantido em gelo.

Posteriormente o material foi centrifugado a 17.200g por 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (adaptado de Batista *et al.* (2002)). O sobrenadante do extrato bruto foi coletado e mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação da concentração de proteína total e inibidores de protease.

2.7.2 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteína no extrato foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão uma solução de 0,2 mg/mL de soro de

albumina bovina (BSA). Primeiramente o extrato foi diluído, sendo 100 μL do extrato em 900 μL de água destilada. A etapa seguinte foi retirar 100 μL deste extrato diluído e acrescentar em um novo ependorf contendo 700 μL de água destilada e 200 μL do reagente Bradford. Para o teste em branco foram adicionados a outro ependorf 800 μL de água destilada e 200 μL do reagente de Bradford. Os componentes foram homogeneizados por agitação do ependorf e incubados por quinze minutos. A leitura da absorbância das amostras foi realizada no comprimento de onda de 595 nm em um espectrofotômetro (Beckman, DU 530 UV/Vis Spectrophotometer, U.S.A). As amostras foram analisadas em duplicadas.

2.7.3 Determinação dos inibidores de protease

A presença de inibidores no extrato foi determinada utilizando tripsina purificada. Foi realizada a determinação da atividade da tripsina conforme o seguinte procedimento analítico: 100 μL do extrato; 500 μL do tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20mM de cloreto de cálcio; e 50 μL da solução de tripsina $4,7 \times 10^{-5}$ M foram adicionados em um ependorf. Para o controle da enzima foram adicionados a outro ependorf, 600 μL do tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20mM de cloreto de cálcio; e 50 μL da solução de 1,25g de tripsina/1mL de água Mili-Q.

A mistura contida em cada ependorf foi incubada por cinco minutos. Após o tempo de incubação, 500 μL dessa mistura foi retirada e adicionada a um novo ependorf contendo 500 μL Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20mM de cloreto de cálcio; e 500 μL da solução estoque de L-BApNA 1,2 mM. Para o preparo da solução estoque, foi utilizada 0,026g de BapNA/1mL DMSO (Dimethyl Sulfoxide), posteriormente 200 μL desta solução inicial foi retirada e diluída em 10 mL Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20mM de cloreto de cálcio. A absorbância da solução foi

determinada a 410 nm a cada 30 segundos até 2,5 minutos da reação. Para a leitura da absorbância foi utilizado o espectrofotômetro (modelo dU65, Beckman).

Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$mg \text{ de tripsina inibida/g de proteina} = A * B / P * C * 100 \quad (1)$$

Onde:

A= (absorbância em 410 nm do padrão) - (absorbância em 410 nm da amostra);

B= Diluição da amostra (volume final da solução incubada - volume da amostra utilizada);

P= Concentração de proteína dos extratos em g/mL;

C= Fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 μ l de tripsina ativa sobre o substrato L-BApNA dará a leitura de absorbância em 410 nm de 0,019 (Kakade *et al.*, 1974).

2.8 Análise de Dados

As análises foram realizadas através do programa R (R Development Core Team, 2009), usando Modelagem Linear Generalizada (GLM), seguido por análise de resíduo para verificar a aceitabilidade do modelo utilizado e ocorrência de sobredispersão. A simplificação dos modelos procederam através da retirada das variáveis não significativas, sendo extraídas primeiro aquelas de menor deviência.

Para avaliar a preferência de oviposição realizada pelo teste com chance de escolha, realizou-se uma Análise de Variância (ANOVA), com distribuição de erros

Binomial corrigida a sobredispersão, seguida por Análise de Contraste. Esta análise agrega os tratamentos da variável explicativa (x) que não são significativamente diferentes uma das outras. A variável (y) foi porcentagem de ovos e a variável (x) foi nível de infestação (0, 1000, 3000 e 5000).

Para checar se a quantidade de nitrogênio total (folha e raiz) foi afetada pelos níveis e dias de infestação, realizou-se Análise de Regressão, com distribuição de erros Normal. A variável y resposta foi nitrogênio (dag/Kg(%)) e as variáveis explanatórias foram Número de galhas / Planta (x_1), dias de infestação (x_2) e a interação entre essas variáveis.

Afim de avaliar se a taxa fotossintética líquida foi afetada pelos níveis e dias de infestação, realizou-se Análise de Regressão com distribuição de erros Normal. A variável (y) resposta foi taxa fotossintética líquida e as variáveis explanatórias foram Número de galhas / Planta (x_1), dias de infestação (x_2) e a interação entre essas variáveis.

Para verificar se a quantidade de inibidor de protease foi afetada pelos níveis e dias de infestação, realizou-se Análise de Regressão com distribuição de erros Normal. A variável resposta (y) foi mg de tripsina inibida / g de proteína e as variáveis explanatórias foram Número de galhas / Planta (x_1), dias de infestação (x_2) e a interação entre essas variáveis.

3 RESULTADOS

Nos experimentos de oviposição a contagem do número de galhas não foi realizada pela indisponibilidade de material para tal. Por meio da relação existente entre os níveis de infestação estudados, foi possível estimar o número de galhas de cada tratamento, sendo esta uma relação positiva ($F_{1,22} = 327,93$; $p < 0.001$; Fig 3).

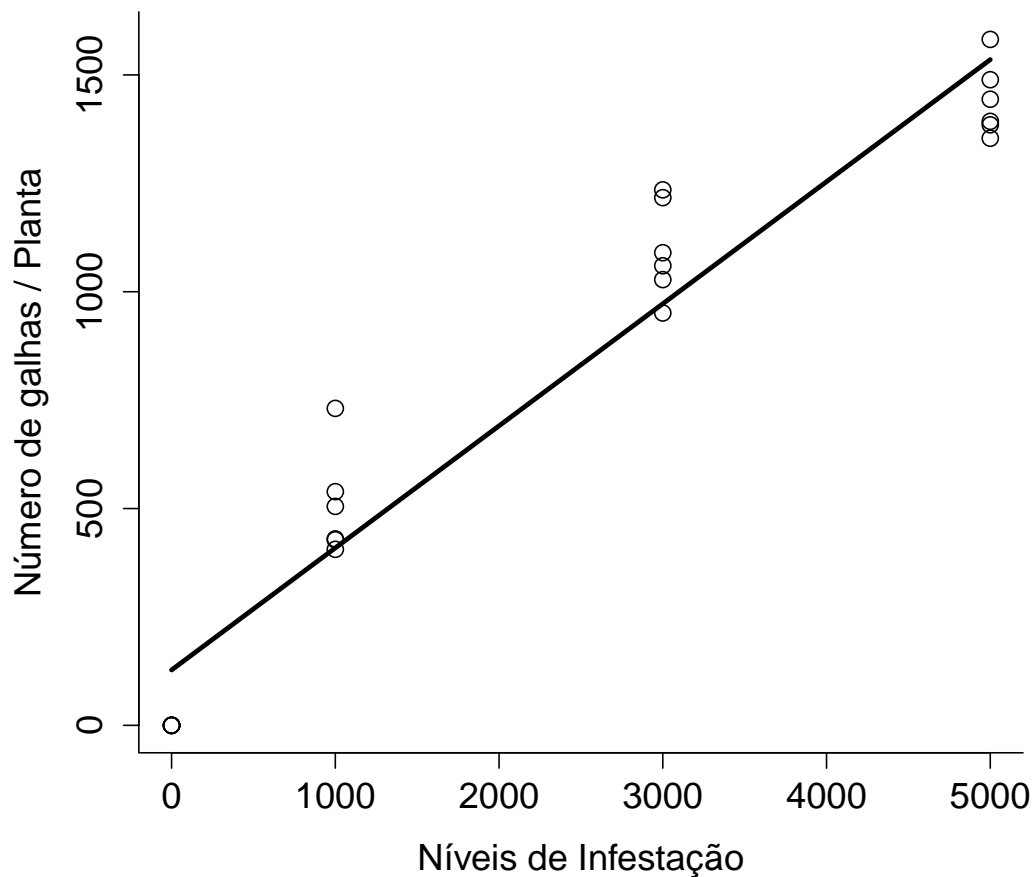


Figura 3: Efeito dos níveis de infestação por *Meloidogyne javanica* no número de galhas por planta (*Solanum lycopersicon*). ($F_{1,22} = 327,93$; $p < 0.001$). Viçosa, MG.

3.1 Oviposição

3.1.1 10 Dias

A preferência das fêmeas de *T. absoluta* por locais de oviposição foi afetada pelos níveis de infestação de nematóides. A proporção de ovos depositados em folíolos de plantas no nível zero foi maior quando comparada com os níveis de 1000, 3000 e 5000, não havendo diferença entre eles ($\chi_{1,58} = 337.44$; $p < 0.001$; Fig 4).

3.1.2 20 e 30 Dias

Fêmeas de *T. absoluta* tem sua preferência por locais de oviposição em plantas infestadas pelos nematóides. Os níveis de infestação 1000, 3000 e 5000 tiveram uma porcentagem maior de ovos depositados por fêmeas de *T. absoluta* e nenhuma diferença entre estes níveis foi observada. Assim a menor porcentagem de deposição de ovos ocorreu em plantas sem infestação (nível zero). Este padrão de oviposição observado foi encontrado nos experimentos avaliando plantas com 20 ($\chi_{1,58}=435.93$; $p=0.0176$; Fig 5) e 30 dias após infestação ($\chi_{1,58}=328.86$; $p=0.0321$; Fig 6).

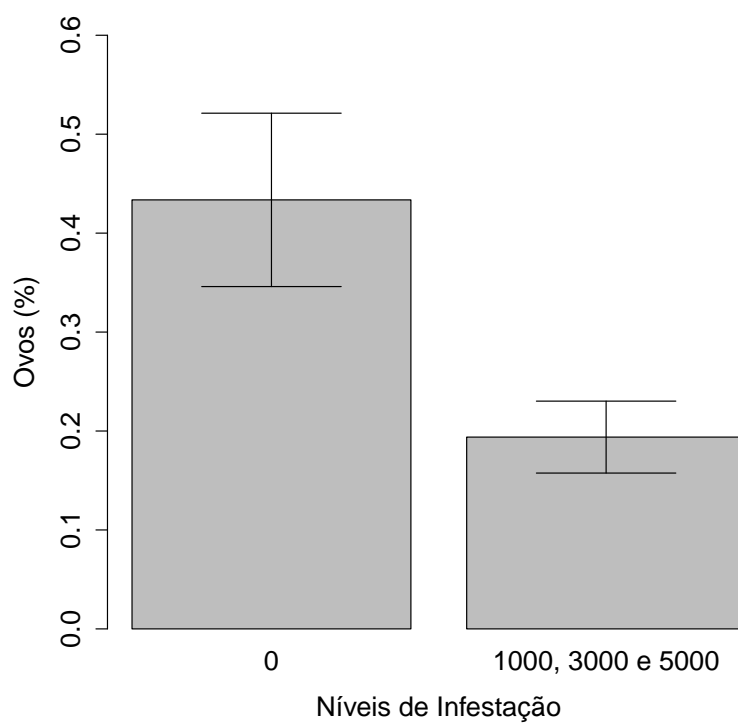


Figura 4: Proporção dos ovos depositados por fêmeas acasaladas de *Tuta absoluta* em *Solanum lycopersicon* com 10 dias de infestação por ovos de *Meloidogyne javanica* nos níveis 0, 1000, 3000 e 5000 ovos. ($\chi_{1,58} = 337.44$; $p < 0.001$). Viçosa, MG.

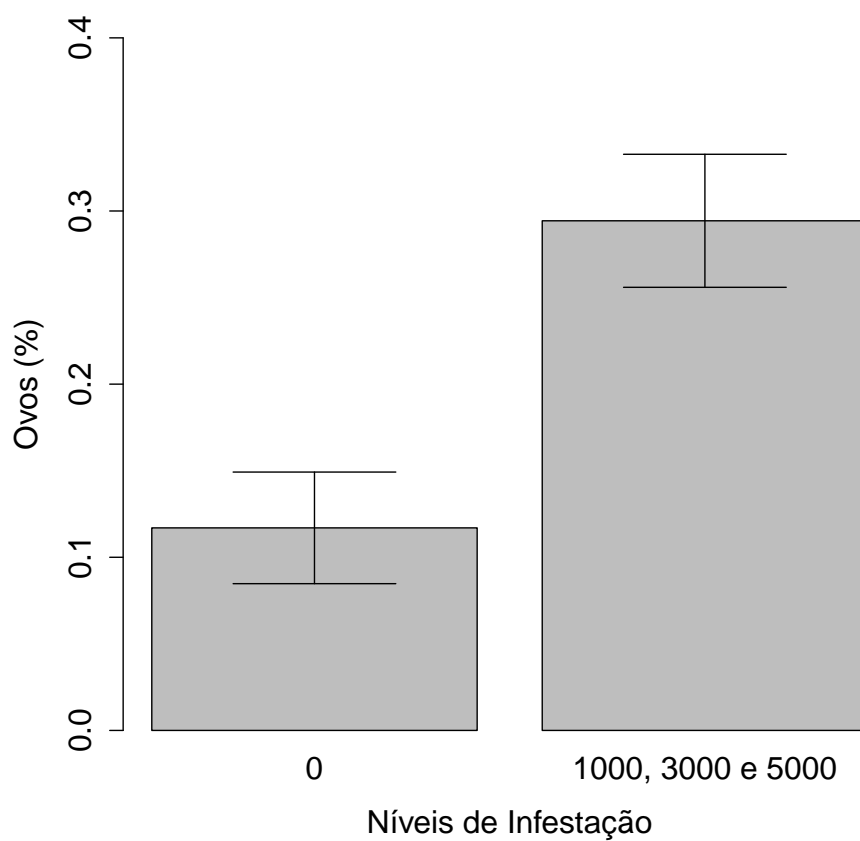


Figura 5: Proporção dos ovos depositados por fêmeas acasaladas de *Tuta absoluta* em *Solanum lycopersicon* com 20 dias de infestação por ovos de *Meloidogyne javanica* nos níveis 0, 1000, 3000 e 5000 ovos. ($\chi_{1,58} = 435,93$; $p=0.0176$). Viçosa, MG.

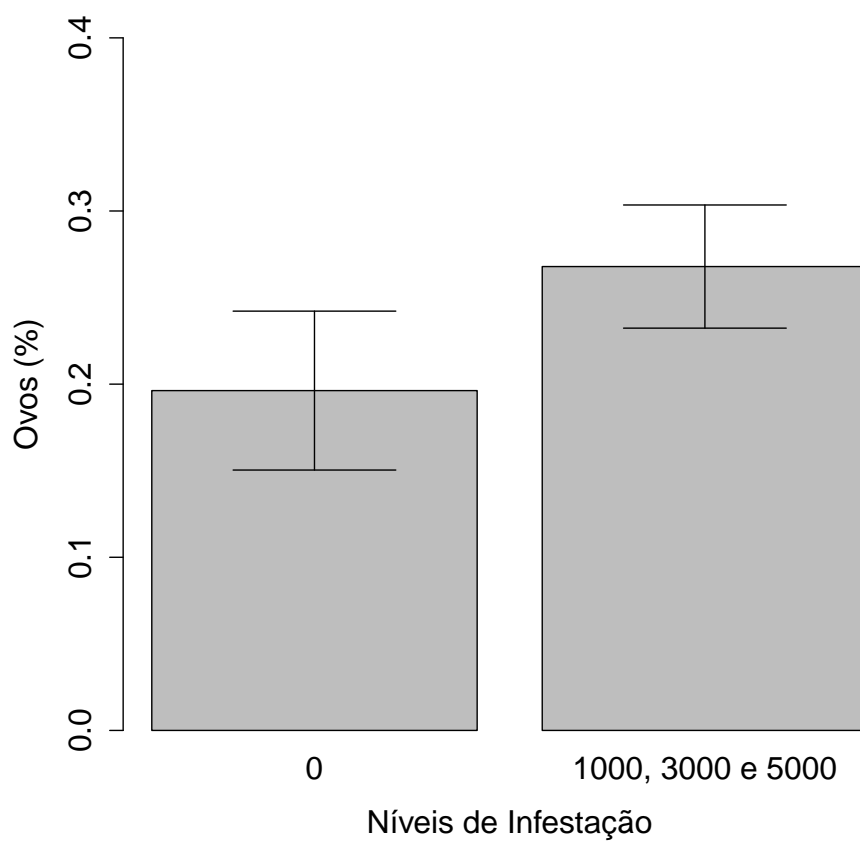


Figura 6: Proporção dos ovos depositados por fêmeas acasaladas de *Tuta absoluta* em *Solanum lycopersicon* com 30 dias de infestação por ovos de *Meloidogyne javanica* nos níveis 0, 1000, 3000 e 5000 ovos. ($\chi_{1,58} = 328,86$; $p=0.0321$). Viçosa, MG.

3.1.3 Nitrogênio

Folha

A quantidade de Nitrogênio total presente nas folhas de tomate, foi afetada significativamente pelo número de galhas ($F_{1,34} = 23,99$; $p < 0.001$; Fig 7) e os dias de infestação ($F_{2,32} = 6,81$; $p < 0.001$; Fig 7). As folhas de tomateiro tiveram um aumento na quantidade de nitrogênio total nas folhas em plantas com maior número de galhas, entretanto houve diminuição no nitrogênio ao longo do tempo.

Raiz

No sistema radicular das plantas de tomate a quantidade de Nitrogênio total não foi afetada pelo número de galhas ($F_{1,34} = 0,023$; $p = 0.878$) nem pelos dias de infestação ($F_{2,33} = 2.058$; $p = 0.143$).

3.1.4 Fotossíntese

A Taxa Fotossintética Líquida das plantas foi afetada significativamente pelo número de galhas ($F_{1,38} = 158.05$; $p < 0.001$; Fig 8) e os dias de infestação ($F_{1,37} = 91.36$; $p < 0.001$; Fig 8). Houve uma diminuição da Taxa Fotossintética Líquida ocasionada pelo aumento do número de galhas e com o aumento dos dias de infestação. O vigésimo e o trigésimo dias de infestação não apresentaram diferenças entre si.

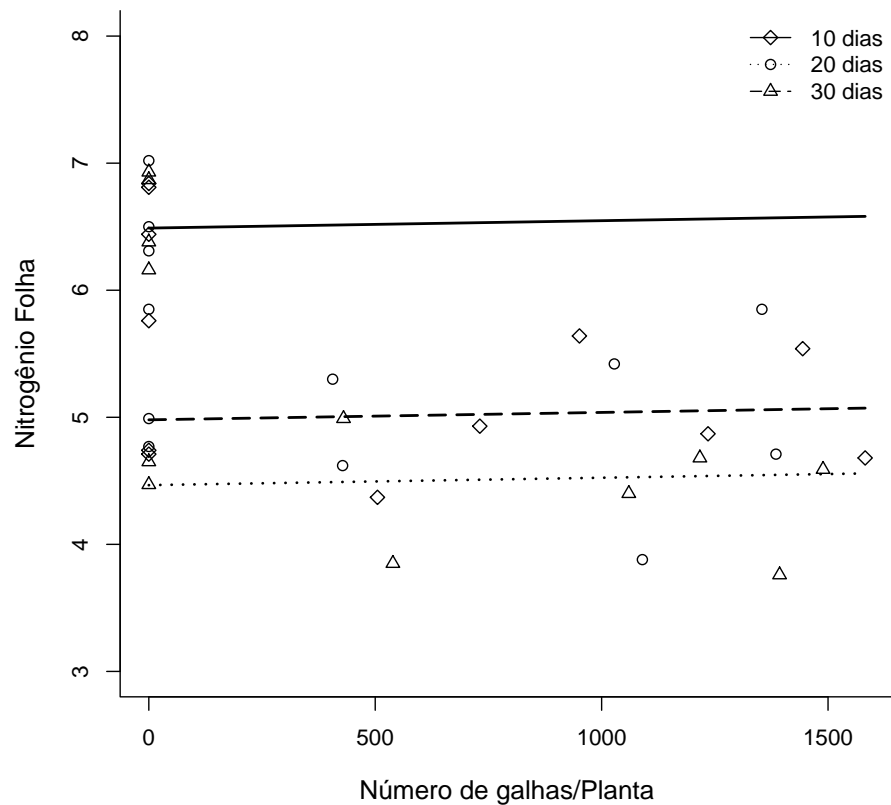


Figura 7: Efeito do Número de galhas por planta ($F_{1,34} = 23,99$; $p < 0.001$;) e dias de infestação ($F_{2,32} = 6,81$; $p < 0.001$;) por *Meloidogyne javanica* na quantidade de Nitrogênio total em folhas de *Solanum lycopersicon*. Viçosa, MG.

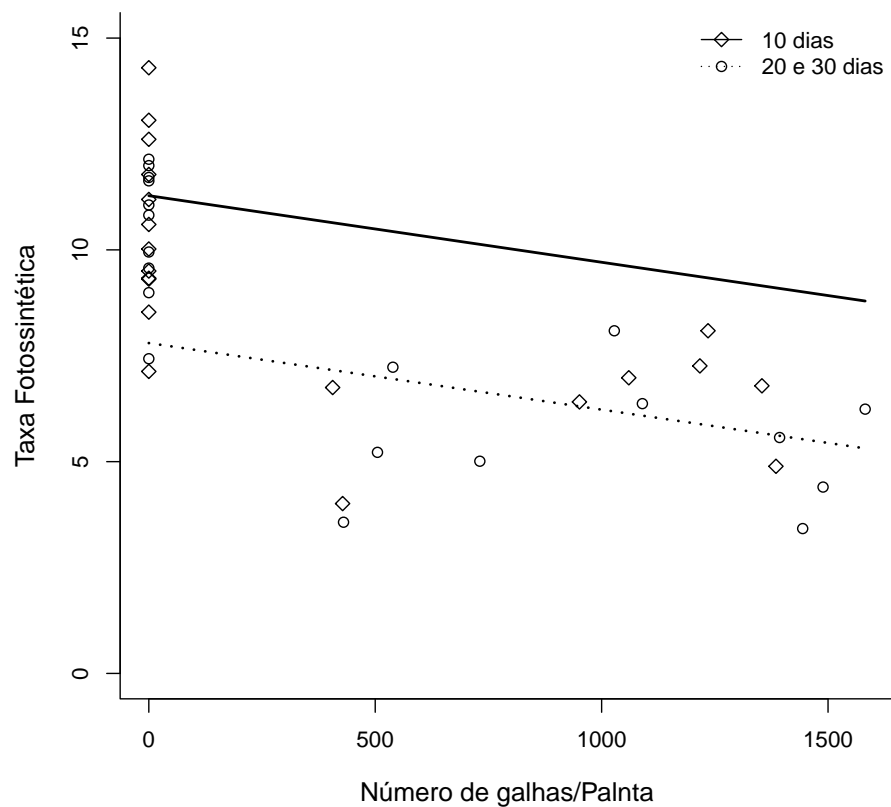


Figura 8: Efeito do Número de galhas ($F_{1,38} = 158.05$; $p < 0.001$;) por planta e dias de infestação ($F_{1,37} = 91.36$; $p < 0.001$;) por *Meloidogyne javanica* na Taxa Fotossintética Líquida ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$) de *Solanum lycopersicon*. Viçosa, MG.

3.1.5 Inibidor de Protease

A quantidade de mg de Tripsina inibida por g de Proteína foi afetada significativamente pelo número de galhas ($F_{1,34} = 1085.32$; $p < 0.05$; Fig 9) presentes nas plantas e pelos dias de infestação ($F_{2,32} = 640.08$; $p < 0.001$; Fig 9). O número de galhas presente nas plantas afetou positivamente a quantidade mg de Tripsina inibida por g de Proteína. A fase inicial de infestação (10 dias), apresentou uma quantidade de mg de Tripsina inibida por g de Proteína intermediária quando comparada com as fases finais de infestação (20 e 30 dias). No vigésimo dia de infestação esta quantidade diminuiu, porém no tempo máximo de infestação estudado (30 dias) as plantas apresentaram uma aumento considerável na quantidade de mg de Tripsina inibida por g de Proteína.

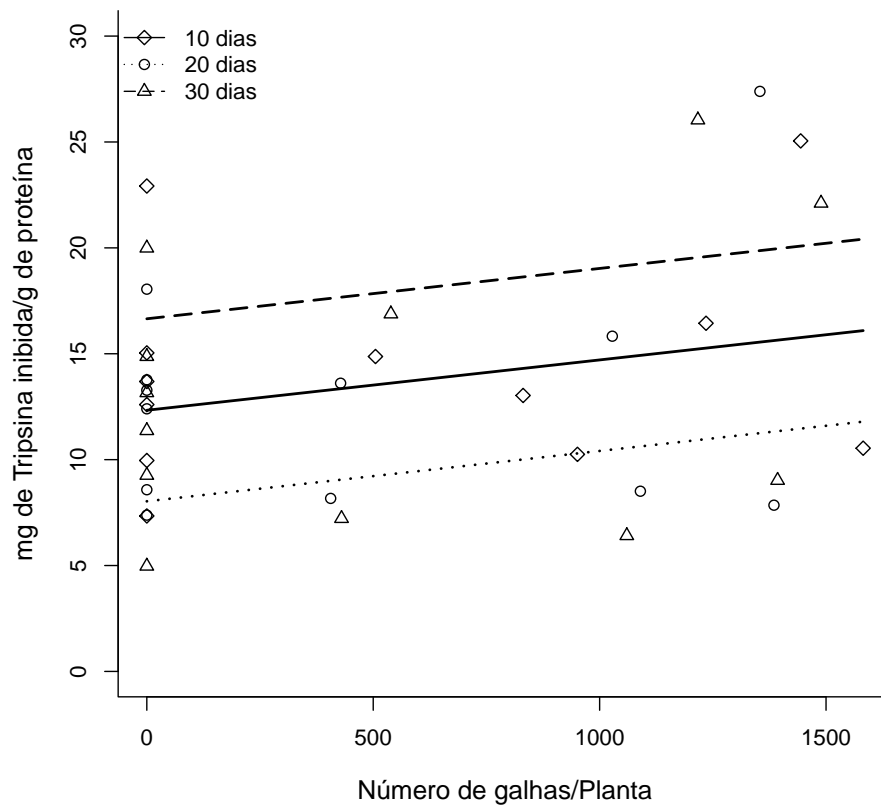


Figura 9: Efeito do Número de galhas por planta ($F_{1,34} = 1085.32$; $p < 0.05$) e dias de infestação ($F_{2,32} = 640.08$; $p < 0.001$) por *Meloidogyne javanica* na quantidade de mg de Tripsina inibida por g de Proteína em *Solanum lycopersicon*. Viçosa, MG.

3.1.6 Observações Fenológicas

No vigésimo dia de infestação foi observada diferenças nos estádios fenológicos das plantas de tomate. Plantas infestadas com 5000 ovos do nematóide apresentavam-se com frutos (Fig. 10b) e plantas sem infestação estavam sem frutos (Fig. 10a).

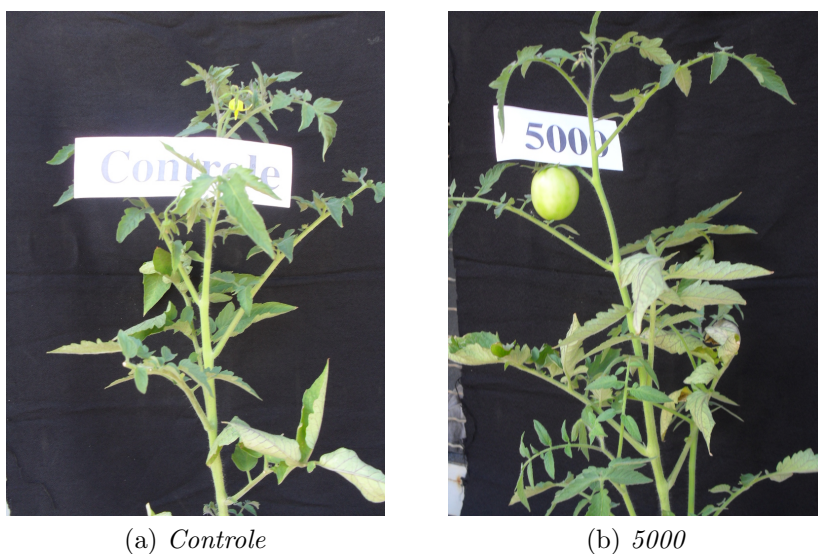


Figura 10: Plantas de tomate *Solanum lycopersicon* de mesma idade infestadas na parte radicial por *Meloidogyne javanica* em diferentes estádios reprodutivos. Plantas sem ataque do nematóide (a) e planta atacada pelo nematóide (b).

4 DISCUSSÃO

O padrão de oviposição de *T. absoluta* encontrado neste trabalho pode ter ocorrido devido a mudança no perfil de compostos voláteis, em decorrência da herbivoria sofrida na raiz pelo ataque do nematóide. Uma vez que plantas possuem uma mistura específica de compostos químicos voláteis e ao sofrer uma injúria este perfil de voláteis pode ser alterado (De Moraes *et al.*, 2001). Estes compostos ao serem alterados podem passar a exercer a ação de repelência ou atração para insetos na busca de locais para oviposição (Baur *et al.*, 1991; Dicke *et al.*, 2003). Além do perfil químico, outras características, como a qualidade nutricional são avaliadas por fêmeas de muitos insetos na escolha de indivíduos específicos dentro de uma população de hospedeiros (Thompson & Pellmyr, 1991; Honda, 1995). Assim, a disponibilidade de nutrientes pode mudar a atratividade de fêmeas em busca de locais de oviposição, como observado para *Pieris rapae* por Wolfson (1980) e Myers (1985). Caso contrário, ao encontrar um hospedeiro de baixa qualidade, uma fêmea pode modificar seu comportamento de oviposição através da redução na postura dos ovos por planta (Thompson & Pellmyr, 1991).

Uma planta além de responder a herbivoria no sistema radicular pela indução de compostos defensivos pode ser prejudicada na capacidade de absorção de água e nutrientes, no entanto a medida que se aumentou a injúria na raiz observamos o aumento na quantidade de nitrogênio foliar (Fig. 7). Segundo Masters *et al.* (1993) este prejuízo na capacidade da planta de absorver água e nutrientes do solo pode resultar na redução relativa do conteúdo de água foliar e conseqüentemente

um aumento na quantidade de nitrogênio disponível na folha, mecanismo este que pode ter gerado o resultado encontrado. Este aumento no nitrogênio foliar não é necessariamente uma resposta na qual a planta induziu mediante ao ataque, mas sim uma consequência da injúria causada pelo nematóide.

Para muitos insetos herbívoros o nitrogênio é limitante, podendo afetar positiva ou negativamente seu desenvolvimento. Assim, o aumento de nitrogênio encontrado neste estudo poderia afetar positivamente o desenvolvimento de *T. absoluta*. Essa correlação positiva entre nitrogênio e desenvolvimento tem sido observada por diversos autores (ver Masters, 1992; Gange & Brown, 1989; Masters & Brown, 1992). Mudanças na qualidade nutricional da planta são mais prováveis de afetar a população do herbívoro do que os parâmetros de crescimento do indivíduo (Johnson *et al.*, 2008).

Assim como o nitrogênio, o gradiente de CO₂ pode ser detectado por órgãos sensoriais de mariposas, sendo que a concentração desse gás pode afetar a oviposição, como demonstrado em *Cactoblastis cactorum* (ver Stange, 1997). Langan *et al.* (2001) estudando a preferência de oviposição de *Pieris rapae* relacionada a fotossíntese e transpiração na escolha do hospedeiro, encontraram que a preferência foi maior por plantas com taxa fotossintéticas elevadas, tendo uma relação com a escolha de folhas jovens para ovipositar. Dessa forma, nitrogênio e fotossíntese devem estar relacionadas na escolha do hospedeiro por herbívoros, pois geralmente mariposas preferem ovipositar em folhas mais jovens que possuem maior quantidade de nutrientes, reforçando o resultado obtido neste estudo.

O balanço entre defesa e fotossíntese parece existir, pois ambas necessitam de recursos energéticos em comum (Tang *et al.*, 2009). Neste trabalho encontramos que as plantas de tomate infestadas por nematóides tiveram sua taxa fotossintética reduzida (Fig.8). Uma planta injuriada na raiz pode sofrer alterações

fisiológicas que comprometam a abertura estomática, o que resultaria na diminuição da taxa fotossintética (Bondada *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 2009). Esta diminuição pode ter ocorrido por um redirecionamento de recursos metabólicos para defesa que suprimiu de forma indireta a fotossíntese (Tang *et al.*, 2009). Outra resposta pode ser o aumento na expressão de genes relacionados a defesa em detrimento de genes relacionados à fotossíntese, processo regulado pelo ácido jasmônico (Görschen *et al.*, 1997; Schenk *et al.*, 2000).

Dentre as respostas de uma planta mediante ataque de herbívoros, a indução de compostos defensivos como redutores de digestibilidade possuem um papel importante. Nossos resultados mostraram que a quantidade de inibidor de protease nas folhas de tomate aumentaram de acordo com o nível de infestação pelo nematóide, e uma variação ao longo do tempo foi observada (Fig. 9), indicando que houve resposta ao ataque pela indução sistêmica de defesa para partes não atacadas da planta. Inibidores de protease quando presentes em quantidades elevadas na dieta de herbívoros podem impactar seu desenvolvimento negativamente, como observado por outros autores (ver Orr *et al.*, 1994; Michaud *et al.*, 1995; Azzouz *et al.*, 2005). Dessa forma, a maior quantidade de inibidor encontrada neste trabalho em plantas infestadas pelo nematóide poderiam potencialmente afetar os parâmetros biológicos de *T. absoluta*.

Durante um estresse alguns processos defensivos são desencadeados em plantas, que por fim podem levar a ativação de genes relacionados a produção de compostos de defesa como inibidores de protease (Melan *et al.*, 1993). O início deste processo pode ter sido desencadeado pelas secreções salivares produzidas pelos nematóides, as quais contém enzimas que são injetadas dentro das células (Hussey, 1989). Geralmente estas secreções induzem a produção de auxinas e lipoxigenases (LOX) (Giebel, 1982; Waetzig *et al.*, 1999; Leone *et al.*, 2001). As lipoxigenases

vegetais estão envolvidas na biossíntese de compostos que regulam o metabolismo, ao final da atividade da LOX vários produtos são formados. Dentre esses produtos está o ácido jasmônico, o qual é associado à ativação de genes relacionados a defesa (Melan *et al.*, 1993; Baldwin *et al.*, 1997). Portanto, o aumento nas quantidades de inibidores de protease encontrado neste trabalho pode ser resultado do aumento de ácido jasmônico.

Parte aérea e sistema radicular de plantas respondem à herbivoria através da indução de defesa que podem constituir uma significativa pressão de seleção na evolução de estratégias ótimas de defesa da planta (van Dam & Bezemer, 2006). Uma diferença foi observada no estágio fenológico entre plantas com e sem nematóides no vigésimo dia de infestação (Fig. 10). Esta diferença pode estar relacionada com o investimento em defesa, como por exemplo, na quantidade de inibidores de protease encontradas ao longo dos dias de infestação (Fig. 9). As estratégias de defesa redirecionam os recursos da planta para tal, mas uma realocação dos recursos para outras funções podem ocorrer (van Dam & Bezemer, 2006; Herms & Mattson, 1992). Assim, uma realocação dos recursos para reprodução pode ter ocorrido entre o décimo e o vigésimo dia de infestação, já que plantas infestadas aos vinte dias possuíam frutos e plantas sadias estavam somente com flores.

Por fim, podemos concluir que plantas de tomate atacadas na raiz induziram defesa sistêmica em resposta ao ataque do nematóide, afetando os padrões de inibidores de protease, nitrogênio e fotossíntese. Frente a estas respostas o comportamento de oviposição *T. absoluta* foi afetado. Portanto interações entre herbívoros separados espacialmente podem ser mediadas através de respostas induzidas pelo hospedeiro, tal resposta parece estar principalmente envolvida pela ação do ácido jasmônico.

5 CONCLUSÕES

De modo geral, plantas de tomate infestadas por nematóide no sistema radicular tiveram como resposta a indução de defesa sistêmica através do aumento na quantidade de inibidor de protease, de nitrogênio e diminuição da taxa fotossintética. Devido as alterações ocasionadas pelo ataque do nematóide, fêmeas do herbívoro especialista na parte aérea da planta tiveram seu comportamento de oviposição afetado. Se faz necessário estudos do perfil de voláteis em plantas nestas condições, para verificar se este comportamento foi afetado pelos voláteis. Este tipo de informação é importante para o desenvolvimento de estratégias para o manejo integrado de pragas. Diante dos resultados obtidos aumentam-se as evidências de que interações entre herbívoros podem ser mediadas pela resposta de indução de defesa espaço-temporal da planta. Assim, fortalecendo com subsídios a teoria ótima de defesa de plantas.

Anexos

Protocolo de Criação de *Tuta absoluta*

Os ovos para o início da criação foram transferidos juntamente com as folhas de tomate da variedade Santa Clara para gaiolas de madeira com armação de tela, medindo 30x20x30 e acondicionadas em um sala com temperatura de $(25\pm 2^\circ\text{C})$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Após a eclosão, as lagartas foram alimentadas com folhas novas desta mesma variedade, substituídas periodicamente sempre que necessário. Na criação de *T. absoluta*, as lagartas foram mantidas em folhas de tomateiro com os pecíolos imersos em frascos de vidro contendo água com solução nutritiva "ouro verde" (na proporção recomendada pelo fabricante - 7g/L), para manter o turgor das folhas. Ao envelhecerem e se tornarem inadequadas para a alimentação, as folhas foram dispostas no fundo da gaiola de madeira, permitindo a migração das lagartas para o material renovado. Cerca de 7 a 11 dias após a eclosão das lagartas, finda a fase larval e considerando que as lagartas têm o hábito de abandonar as folhas verdes e buscar as folhas secas para empupar, as folhas secas foram cuidadosamente retiradas da gaiola. Após a triagem das folhas, as pupas foram cuidadosamente retiradas de dentro das folhas e sexadas segundo método preconizado por Coelho & França (1987). Estas foram enviadas para uma outra sala de criação, sem presença de qualquer tipo de odor proveniente de plantas e as pupas macho e

fêmea foram colocadas em gaiolas separadas. Dentro de cada gaiola foi fornecida solução açucarada (10%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Awmack, C. & Leather, S. (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review Of Entomology*, 47, 817–844.
- Azzouz, H.; Cherquia, A.; andCampana, E.; Rahbeb, Y.; Duportb, G.; Jouaninc, L.; Kaiserd, L. & Giordanengoa, P. (2005). Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin i and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera,Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *Journal of Insect Physiology*, 51, 75–86.
- Baldwin, I. (1998). Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 95, 8113–8118.
- Baldwin, I.; Zhang, Z.; Diab, N.; Ohnmeiss, T. E.; McCloud, E.; Lynds, G. & Schmelz, E. (1997). Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta*, 201, 397–404.
- Batista, R.; Oliveira, M.; Pires, C.; Piovesan, N.; Rezende, S. & Moreira, M. (2002). Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 1517–1524.

- Baur, R.; Binder, S. & Benz, G. (1991). Nonglandular Leaf Trichomes As Short-Term Inducible Defense Of The Gray Alder, *Alnus incana* (L), Against The Chrysomelid Beetle, *Agelastica alni* (L). *Oecologia*, 87, 219–226.
- Berenbaum, M. & Zangerl, A. (1999). *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*, Princeton University Press, chap. Coping with Life as a Menu Option: Inducible Defenses of the Wild Parsnip. pp. 10–32.
- Bernays, E. & Chapman, R. (1994). *Host-plant selection by phytophagous insects*.
- Bezemer, T. M.; Wagenaar, R.; Van Dam, N. M. & Wackers, F. L. (2003). Interactions between above- and belowground insect herbivores as mediated by the plant defense system. *Oikos*, 101, 555–562.
- Blouin, M.; Zuily-Fodil, Y.; Pham-Thi, A.; Laffray, D.; Reversat, G.; Pando, A.; Tondoh, J. & Lavelle, P. (2005). Belowground organism activities affect plant aboveground phenotype, inducing plant tolerance to parasites. *Ecology Letters*, 8, 202–208.
- Bondada, B.; Oosterhuis, D.; Tugwell, N. & Kim, K. (1995). Physiological and cytological studies of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* K (Acari, Tetranychidae) injury in cotton. *Southwestern Entomologist*, 20, 171–180.
- Boneti, J. & Ferraz, S. (1981). Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

- Brodway, R. & Duffey, S. (1986). Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 32(10), 827–833.
- Cavalcanti, F. R.; Resende, M. L. V.; Carvalho, C. P. S.; Silveira, J. A. G. & Oliveira, J. T. A. (2006). Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis perniciososa*. *Biological Control*, 39, 408–417.
- Cipollini, D.; Purrington, C. B. & Bergelson, J. (2003). Costs of induced responses in plants. *Basic And Applied Ecology*, 4, 79–89.
- Coelho, M. D. F. & França, F. H. (1987). Biology, larva chaetotaxy and description of the pupa and adult of a tomato pinworm. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 22, 129–135.
- De Moraes, C. M.; Mescher, M. C. & Tumlinson, J. H. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, 410, 577–580.
- Dicke, M.; van Poecke, R. & de Boer, J. (2003). Inducible indirect defence of plants: From mechanisms to ecological functions. *Basic And Applied Ecology*, 4, 27–42.
- Dicke, M. & Vet, L. (1999). *Herbivores: between plants and predators*, Oxford: Blackwell, chap. Plant-carnivore interactions: evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore.
- Farag, M. A. & Paré, P. W. (2002). C-6-green leaf volatiles trigger local and systemic voc emissions in tomato. *Phytochemistry*, 61, 545–554.
- Farmer, E. & Ryan, C. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cellular And Molecular Life Sciences*, 4, 129–134.

- França, F. (1993). Por quanto tempo conseguiremos conviver com a traça-do-tomateiro? *Horticultura Brasileira*, 11, 176–178.
- França, F. & Castelo Branco, M. (1992). Ocorrência da traça-do-tomateiro (*Scrobipalpus absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil central. *Horticultura Brasileira*, 10, 6–10.
- Fung, R. W. M.; Wang, C. Y.; Smith, D. L.; Gross, K. C.; Tao, Y. & Tian, M. S. (2006). Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *Journal Of Plant Physiology*, 163, 1049–1060.
- Gange, A. & Brown, V. (1989). Effects of root herbivory by an insect on a foliar-feeding species, mediated through changes in the host plant. *Oecologia*, 81, 38–42.
- Giebel, J. (1982). Mechanism of resistance to plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 257–279.
- Görschen, E.; Dunaeva, M.; B., H.; Reeh, I.; Wasternack, C. & Parthier, B. (1997). Expression of the ribosome-inactivating protein JIP60 from barley in transgenic tobacco leads to an abnormal phenotype and alterations on the level of translation. *Planta*, 202, 470–478.
- Hamilton, J. & Berenbaum, M. (2001). Carbon nutrient balance hypothesis (cnb). *Ecology Letters*, 4, 86–95.
- Hermes, D. & Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67, 283–335.
- Hilder, V.; Gatehouse, A.; Sheerman, S.; Barker, R. & Boulter, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330, 160–163.

- Honda, K. (1995). Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 30, 1–23.
- Howe, G. A. & Schaller, A. (2008). *Induced plant resistance to herbivory*, Springer, chap. Direct Defenses in Plants and Their Induction by Wounding and Insect Herbivores. pp. 7–30.
- Hussey, R. (1989). Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annual Review Of Phytopathology*, 27, 123–141.
- Iwasa, Y.; Kubo, T.; van Dam, N. & De Jong, T. J. (1996). Optimal level of chemical defense decreasing with leaf age. *Theoretical Population Biology*, 50, 124–148.
- Johnson, S.; Bezemer, T. & Jones, T. (2008). CABI, chap. Linking Aboveground and Belowground Herbivory. pp. 153–170.
- Jongsma, M. & Bolter, C. J. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43(10), 885–895.
- Kakade, M.; Rackis, J. & McGhee, J. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51, 376–382.
- Karban, R. (1997). Evolution of prolonged development: A life table analysis for periodical cicadas. *American Naturalist*, 150, 446–461.
- Karban, R. & Myers, J. H. (1989). Induced plant-responses to herbivory. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, 20, 331–348.
- Kok, E. J.; Franssen-van Hal, N. L. W.; Winnubst, L. N. W.; Kramer, E. H. M.; Dijkema, W. T. P.; Kuiper, H. A. & Keijer, J. (2007). Assessment of representational difference analysis (RDA) to construct informative cDNA microarrays for

- gene expression analysis of species with limited transcriptome information, using red and green tomatoes as a model. *Journal Of Plant Physiology*, 164, 337–349.
- Langan, A.; Wheeler, C. & Dunleavy, P. (2001). Does the small white butterfly (*Pieris rapae* L.) aggregate eggs on plants with greater gas exchange activity? *Journal of Insect Behavior*, 14, 459–468.
- Leone, A.; Melillo, M. & Bleve-Zacheo, T. (2001). Lipoxigenase in pea roots subjected to biotic stress. *Plant Science*, 161, 703–717.
- Masters, G. (1992). *Interactions between foliar- and root-feeding insects*. Ph.D. thesis, Imperial College, University of London, London.
- Masters, G. & Brown, V. (1992). Plant mediated interactions between two spatially separated insects. *Functional Ecology*, 6, 175–179.
- Masters, G.; Brown, V. & Gange, A. (1993). Plant mediated interactions between aboveground and belowground insect herbivores. *Oikos*, 66, 148–151.
- Melan, M.; Dong, X.; Endara, M.; Davis, K.; Ausubel, F. & Petterman, T. (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 101, 441–450.
- Michaud, D.; Bernier-Vadnais, N.; Overney, S. & Yelle, S. (1995). Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle. *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology.*, 25, 1041–1048.
- Miranda, M.; Picanço, M.; Zanuncio, J. & Guedes, R. (1998). Ecological life table of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biocontrol Science and Technology*, 8, 597–606.

- Molinari, S. & Loffredo, E. (2006). The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. *Physiological And Molecular Plant Pathology*, 68, 69–78.
- Muszinski, T.; Lavendowski, I. & Maschio, L. (1982). Constatação de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) (= *Gnorimoschema absoluta*) (Lepidoptera: Gelechiidae), como praga do tomateiro (*Lycopersicon sculentum* Mill.), no litoral do Paraná. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 11, 291–292.
- Myers, J. (1985). Effect of physiological condition of the host plant on the ovipositional choice of the cabbage white butterfly *Pieris rapae*. *Journal of Animal Ecology*, 54, 193–204.
- Ohta, H.; Ida, S.; Mikami, B. & Mourita, Y. (1986). Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. *Plant Cell Physiology*, 22, 911–918.
- Orr, G.; Strickland, J. & Walsh, T. (1994). Inhibition of *Diabrotica* larval growth by a multicystatin from potato tubers. *Journal of Insect Physiology*, 40, 893–900.
- Peixoto, J. R.; Maluf, W. R. & Campos, V. P. (1999). Evaluation of resistance of lines, hybrids F-1 and cultivars of sweet pepper to *Meloidogyne* spp. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 34, 2259–2265.
- R Development Core Team (2009). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
URL <http://www.R-project.org>
- Rakwal, R.; Agrawal, G. & N.S., J. (2001). Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in re-

- sponse to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2 A inhibitors. *Gene*, 263, 189–198.
- Rhoads, D. F. (1979). *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites.*, Academic Press. New York, chap. Evolution of plant chemical defense against herbivores. pp. 3–54.
- Ryan, C. (1990). Genes for improving defences against insects and pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 28, 245–449.
- Schenk, P.; Kazan, K.; Wilson, I.; Anderson, J.; Richmond, T.; Somerville, S. & Manners, J. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 97, 11655–11660.
- Schmidt, L.; Schurr, U. & Röse, U. (2009). Local and systemic effects of two herbivores with different feeding mechanisms on primary metabolism of cotton leaves. *Plant, Cell & Environment*, 32, 893–903.
- Schoonhoven, L.; van Loon, J. & Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*. Oxford.
- Semblat, J. P.; Bongiovanni, M.; Wajnberg, E.; Dalmaso, A.; Abad, P. & Castagnone-Sereno, P. (2000). Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity*, 84, 81–89.
- Souza, J. & Reis, P. (1992). Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Boletim técnico, Epamig.
- Stange, G. (1997). Effects of changes in atmospheric carbon dioxide on the location of hosts by the moth, *Apium graveolens*. *Oecologia*, 110, 539–545.

- Tang, J.; Zielinski, R.; Aldea, M. & DeLuca, E. (2009). Spatial association of photosynthesis and chemical defense in *Arabidopsis thaliana* following herbivory by *Trichoplusia ni*. *Physiologia Plantarum*, 137, 115–124.
- Taylor, A. & Sasser, Y. (1983). *Biología, Identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (Especies de Meloidogyne.*, Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina de Norte y Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional, chap. El género *Meloidogyne* (nematodo del nódulo de la raíz). pp. 1–12.
- Thompson, J. N. & Pellmyr, O. (1991). Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. *Annual Review Of Entomology*, 36, 65–89.
- van Dam, N. M. & Bezemer, T. (2006). *Chemical Ecology from gene of ecosystem*, Springer, chap. Chemical communication between roots and shoots: Towards an integration of aboveground and belowground induced responses in plants. pp. 127–143.
- van Dam, N. M.; De Jong, T. & IWASA, Y. (1996). Optimal distribution of defences: are plants smart investors? *Functional Ecology.*, 10(1), 128–136.
- van der Putten, W. H.; Vet, L. E. M.; Harvey, J. A. & Wackers, F. L. (2001). Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends In Ecology & Evolution*, 16, 547–554.
- van Poecke, R. & Dicke, M. (2004). Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biology*, 6(4), 387–401.
- Waetzig, G.; Sobczak, M. & Grundler, F. (1999). Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology*, 1, 681–686.

- Wang, C.; Zien, C.; Afithile, M.; Welti, R.; Hildebrand, D. & Wang, X. (2000). Involvement of phospholipase d in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12, 2237–2246.
- Wolfson, J. (1980). Oviposition response of *Pieris rapae* to environmentally induced variation in *Brassica nigra*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 27, 223–232.
- Wäckers, F. L. . (2001). A comparison of nectar and honeydew sugars with respect to their utilization by the hymenopteran parasitoid *Cotesia glomerata*. *Journal of Insect Physiology*, 47, 1077–1084.
- Zangerl, A. R. (2003). Evolution of induced plant responses to herbivores. *Basic And Applied Ecology*, 4, 91–103.