

ANA CRISTINA CERQUEIRA CAVALCANTE

**ENDOSSIMBIOSE DE *Tetranychus evansi* BAKER E PRITCHARD (ACARI:
TETRANYCHIDAE) E A RESPOSTA DE DEFESA INDUZIDA 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**

ANA CRISTINA CERQUEIRA CAVALCANTE

ENDOSSIMBIOSE DE *Tetranychus evansi* BAKER E PRITCHARD (ACARI: TETRANYCHIDAE) E A RESPOSTA DE DEFESA INDUZIDA 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: 11 de Fevereiro de 2010.

Dr^a. Liliane Evangelista Visôto
(Co-orientadora)

Prof^a. Terezinha Maria C. Della Lucia

Prof. Derly Jose Henriques da Silva

Dr^a. Madelaine Venzon

Prof. Angelo Pallini Filho
(Orientador)

Dedico,

Aos meus pais, José Antônio Oliveira Cavalcante e Djanira Cerqueira Cavalcante, meus primeiros e preciosos educadores, exemplos de vida, pelo amor e apoio incondicional em todas as minhas decisões.

*“Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho,
Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!”*

(Machado de Assis)

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível”.*

(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela paciência e determinação na minha vida, sempre ao meu lado em todos os momentos e por ter colocado pessoas maravilhosas na minha trajetória.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, Antônio e Djanira, e minha irmã Ana Carolina, pelo amor e pela confiança. A toda minha grande família pela torcida, em especial minhas avós Anisia e Melania.

À Dr^a. Aloyséia Noronha por estar sempre presente, pelos conselhos, incentivo e amizade.

Ao Professor Angelo Pallini pela orientação e ensinamentos, correções e sugestões.

À Dr^a. Liliane Visôto pela co-orientação, ensinamentos e conselhos valiosos.

Ao pesquisador Arne Janssen pela colaboração imprescindível a este trabalho.

Ao Dr. Renato Sarmento pelas correções e sugestões.

À Miriam e a Paula, secretárias da Entomologia por todo auxílio prestado e pela amizade.

À Prof.^a Maria Goreti e ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, ao Anderson Pilon, a Zaíra e ao Daniel pelo auxílio nas análises bioquímicas e aos colegas do BioAgro (Daniela, Camila, Sandra, Sr. José Fausto, Glaucia, Marlene, Cássio e Naldo).

Ao Eduardo do Departamento de Química pela contribuição nas análises no espectrofotômetro de massa.

Aos colegas do Laboratório de Acarologia (Hamilton, Poliane, Elisângela, Daniela, Cleide, Elaine, João, Livia, Felipe, Vinícius, Gabriel, Cleber e Vagner). À Ana Maria, sempre disposta para o trabalho e a Monique Eller pelos ensinamentos de bioquímica, sugestões e amizade.

A grande família Magalhães que me acolheu com carinho, sempre presente em todos os momentos ao longo da minha caminhada aqui em Viçosa.

“Desejo que você

Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.

Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.

Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.

Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.

Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.

Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,

Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.

Seja um debatedor de idéias. Lute pelo que você ama.”

Augusto Cury

Obrigada a todos aqueles que acreditaram na realização deste trabalho, pela amizade e contribuição na minha formação profissional e pessoal.

BIOGRAFIA

ANA CRISTINA CERQUEIRA CAVALCANTE, filha de José Antônio Oliveira Cavalcante e Djanira Cerqueira Cavalcante, nasceu em Salvador, BA, no dia 27 de dezembro de 1983.

Em Setembro de 2008, graduou-se Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Em Março de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa e submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Magister Scientiae” em fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO GERAL	1
Ácaros em tomateiro	2
O ácaro <i>Tetranychus evansi</i>	2
Mecanismos de defesa nas plantas	5
Interações	9
Relações simbióticas em artrópodes.....	10
II. CAPÍTULO 1 - Associação biológica entre <i>Tetranychus evansi</i> Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae) e microrganismos.....	13
Resumo	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	26
III. CAPÍTULO 2 - A microbiota bacteriana do <i>Tetranychus evansi</i> Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae) pode afetar a resposta de defesa induzida do tomateiro?	31
Resumo	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3. RESULTADOS	43

4. DISCUSSÃO	47
IV. CONCLUSÕES.....	51
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figuras	
Figura 1. Em folha de tomateiro, ácaros <i>T. evansi</i> , a olho nu (A), visualizado com o microscópio estereoscópico, <i>T. evansi</i> em diferentes fases de desenvolvimento.....	3
Figura 2. Abundante quantidade de teia produzida pelo ácaro <i>T. evansi</i> , em tomateiro	4
Figura 3. Modelo de sinalização para produção de inibidores de proteinases por fermento em folhas de tomate	8
Figura 4. Colônia do ácaro <i>T. evansi</i> em folha de tomateiro	8
Figura 5. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.	23
Figura 6. Meio de cultura BHI líquido, 36 h após a inoculação.....	24
Figura 7. Plaqueamento em BHI após 36 h após a inoculação	24
Figura 8. Detalhe do tomateiro infestado com ácaro <i>T. evansi</i>	37
Figura 9. Experimento em casa de vegetação. Tomateiros infestados com ácaros para avaliação da resposta de defesa	37
Figura 10. Esquema do método de Bradford.....	38
Figura 11. Quantidade média (\pm E.P.) de tripsina inibida (mg)/proteína(g) presente no extrato foliar de plantas de tomate não infestada (Pn I) e tomateiros infestados por quatro dias com o <i>T. evansi</i> tratado com hidróclorido de tetraciclina 0, 2% (<i>T. evansi</i> + Tet), com o <i>T. evansi</i> e com <i>T. urticae</i> , não tratados.....	43
Figura 12. Quantidade média (\pm E.P.) de aldeídos totais presente no extrato foliar de plantas de tomate não infestada (Pn I) e tomateiros infestados por quatro dias com o <i>T. evansi</i> tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % (<i>T. evansi</i> + Tet), com o <i>T. evansi</i> e com <i>T. urticae</i> , não tratados	44
Tabelas	
Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) do número médio de ovos de <i>T. evansi</i> tratados com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % e <i>T. evansi</i> não tratado em folha de tomateiro	25

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) do número médio de ovos de *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % e *T. evansi* não tratado utilizando quatro tipos de substrato: i) plantas de tomate não infestadas, ii) plantas de tomate infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 %, iii) tomateiros infestados com *T. evansi* e, iv) tomateiros infestados com *T. urticae*..... 44

Tabela 3. Médias da oviposição (\pm EP) no período de quatro dias para o *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina 0,2% e *T. evansi* não tratado utilizando quatro tipos de substrato: i) plantas de tomate não infestadas, ii) plantas de tomate infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2%, iii) tomateiros infestados com *T. evansi* e, iv) tomateiros infestados com *T. urticae*..... 45

RESUMO

CAVALCANTE, Ana Cristina C., M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Endossimbiose de *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae) e a resposta de defesa induzida em tomateiro.** Orientador: Angelo Pallini Filho. Co-Orientadores: Liliane Evangelista Visôto, Arne Janssen e Renato de Almeida Sarmento.

Interações entre artrópodes e microrganismos vêm recebendo maior atenção devido ao impacto que essas associações simbióticas promovem nos seus macro-simbiontes. A reprodução é um dos parâmetros biológicos afetados com a incompatibilidade citoplasmática e a partenogênese telítoca, contudo, os endossimbiontes auxiliam os artrópodes a explorar plantas hospedeiras. No momento da alimentação, o herbívoro provoca injúrias no tecido vegetal e induz uma resposta de defesa da planta com produção e/ou liberação de uma diversidade de compostos químicos. O ácaro *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard consegue interferir no sistema de defesa de suas plantas hospedeiras, tornando-as nutricionalmente mais adequadas para o seu desenvolvimento. Nesse contexto, este trabalho procurou compreender melhor a interação tomateiro-ácaro *T. evansi*, além da possível associação simbiótica promovendo vantagens para esse ácaro superar as defesas do seu hospedeiro. Para isto, os ácaros foram submetidos ao tratamento com o antibiótico hidróclorido de tetraciclina 0,2 %. Assim foram utilizados para os ensaios ácaros tratados com antibiótico e ácaros não tratados. Análises moleculares e microbiológicas foram realizadas para verificar a presença dos microrganismos. A oviposição foi avaliada diariamente durante quatro dias, utilizando folhas de tomate da variedade Santa Clara I-5300 como substrato. Os níveis de inibidores de proteinases e aldeídos totais foram determinados em tomateiros. As plantas aos 45 dias de idade foram infestadas com o ácaro *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 %, *T. evansi* não tratado e *T. urticae* não tratado, e como controle foram utilizadas plantas não infestadas. Plantas sob os mesmos tratamentos foram utilizadas como substrato para a avaliação da oviposição do *T. evansi* tratado com tetraciclina e não tratado. A análise molecular, utilizando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR), confirmou a presença de fragmentos DNA bacteriano nos ácaros não tratados e ausência nos ácaros tratados com tetraciclina. As

análises microbiológicas confirmaram os resultados obtidos por PCR. A taxa de oviposição dos ácaros tratados foi 2,8 vezes inferior a dos ácaros não tratados. A presença dos microrganismos pode estar associada a benefícios nutricionais e desintoxicação. Na determinação dos níveis de inibidores de proteinases, o tratamento composto por plantas infestadas com ácaros tratados apresentou valor significativamente inferior, em relação aos demais tratamentos. O nível de aldeídos totais foi baixo em todos os tratamentos. Para o *T. evansi* tratado não houve diferença significativa na taxa de oviposição para os diferentes substratos utilizados. Já para o *T. evansi* não tratado foi verificada uma maior taxa de oviposição quando utilizado como substrato folhas de plantas pré-infestadas com *T. evansi* e pré-infestadas com *T. evansi* com a microbiota reduzida. Tais resultados podem estar relacionados a qualidade nutricional do substrato oferecido. Os resultados advindos deste trabalho vêm contribuir para o conhecimento científico sobre a interação *T. evansi*-tomateiro, sendo necessária a realização de pesquisas futuras visando à identificação dos microrganismos envolvidos na associação e o estudo de outros parâmetros biológicos.

ABSTRACT

CAVALCANTE, Ana Cristina C., M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, february of 2010. **Endosymbioses of *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae) and tomato induced defence response.** Advisor: Angelo Pallini Filho. Co-advisors: Liliane Evangelista Visôto, Arne Janssen and Renato de Almeida Sarmiento.

Interactions between arthropods and microorganisms have been receiving more attention due to the impact that these symbiotic associations causes on their macrosymbionts. Reproduction is the main biological parameters affected with cytoplasmic incompatibility and thelytokous parthenogenesis; however, endosymbionts can help arthropods to exploit host plants. In the feeding time, the herbivore causes injuries in plant tissue and induces a defense response in the plant that respond with production and posterior release of a variety of chemical compounds. However, in one case, plant defense system is affected and disturbed bay herbivore mite. It was detected in tomato plants when the mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard interfered in the defense system of these plants, making them more nutritionally adequate for development of this mite. Continuing in the research line, the actual study looked for a better understanding of the interaction tomato and the mite *T. evansi*, in the possible symbiotic association presence between mite and microorganism that could promote advantages for this mite overcome the tomato defenses. Initially, molecular and microbiological analyses were performed to verify the presence of microorganisms. Later, mites were treated with the antibiotic tetracycline hydrochloride 0.2% that was the treated population. Control was represented from an untreated population and the possible advantage given by microorganism presence in the interior of the *T. evansi* organism was evaluated by the oviposition performance of the mite populations. Mite egg number was checked daily for four days. As substrate were used tomato leaves from Santa Clara I-5300 variety. In another experiment, chapter two, was evaluated the levels of proteinase inhibitors and total aldehydes that are present tomato damaged by treated and untreated mite population. As result from a first chapter, molecular analysis, using the method of polymerase chain reaction (PCR) confirmed the presence of bacterial DNA fragments in the untreated population and DNA fragments absence in the treated

population. These results were confirmed by the microbiological analysis. Accessing the biological performance of treated and untreated was obtained that oviposition rate from treated population was 2.8 times lower than that of untreated population. In the second chapter was observed that the level of total aldehydes was low in plants damaged for treated and untreated treatments. These plants were put as feed and oviposition substrate for treated and untreated populations. Treated population put a same egg number on plants previously damaged by both populations. Already, untreated population showed highest oviposition rate on plants previously damaged by treated population. Thus, we can resume that the presence of microorganisms may be associated with nutritional benefits and detoxification. In determining the levels of proteinase inhibitors, treatment consists of plants infested with mites treated showed significantly lower value compared to other treatments. And the occurrence of microorganism and mite interaction can be related to potential of *T. evansi* to explore the nutritional quality and to confound the defense system of tomato plants. Future researches need be carried for to identify the microorganisms involved in the association and to study other possible effects of this interaction on other biological parameters of *T. evansi*.

I. INTRODUÇÃO GERAL

Ácaros em tomateiro

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) é uma Solanacea originária da região Andina, na América do Sul. Diferentes ácaros podem atacar essa cultura: dentre os eriofídeos, há o ácaro-cinza-do-tomateiro [*Aceria lycopersici* (Wolffenstein)], o ácaro-do-bronzeamento ou microácaro-do-tomateiro [*Aculops lycopersici* (Masse)]]. Dentre os ácaros da família Tarsonemidae, tem-se o ácaro branco [*Polyphagotarsonemus latus* (Banks)] e nos tetraniquídeos as espécies de destaque são o ácaro vermelho (*Tetranychus evansi* Baker e Pritchard) e o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Kock) (MORAES e FLECHTMANN, 2008). Vários trabalhos vêm sendo realizados com *T. evansi* no intuito de controlar esta praga (ALVARADO, 2007; FIABOE *et al.*, 2007; FURTADO *et al.*, 2007; WEKESA, 2008).

O ácaro *Tetranychus evansi*

São ácaros fitófagos e têm como comportamento característico a produção de teia. As larvas são incolores e translúcidas, de tamanho aproximadamente igual ao do ovo. Com o início da alimentação, o ácaro muda gradativamente de cor e vai escurecendo à medida em que se alimenta. Na fase adulta, *T. evansi* apresenta coloração alaranjada. As fêmeas possuem maior tamanho e opistossoma arredondado, enquanto os machos são menores com opistossoma afilado (MORAES e FLECHTMANN, 2008), (Fig 1).

O seu desenvolvimento é favorecido por altas temperaturas e um ambiente seco (temperatura mínima de 10°C, temperatura ótima 34°C). A temperatura de 36°C ocorreu seu menor tempo de desenvolvimento (6,3 dias) e a 25°C, o ciclo de vida foi completado em 13,5 dias (EPPO, 2004; MORAES e FLECHTMANN, 2008). Conforme estudos realizados por BONATO (1999), o Brasil apresenta condições ideais para o desenvolvimento de *T. evansi*, com uma temperatura ótima para o crescimento populacional.

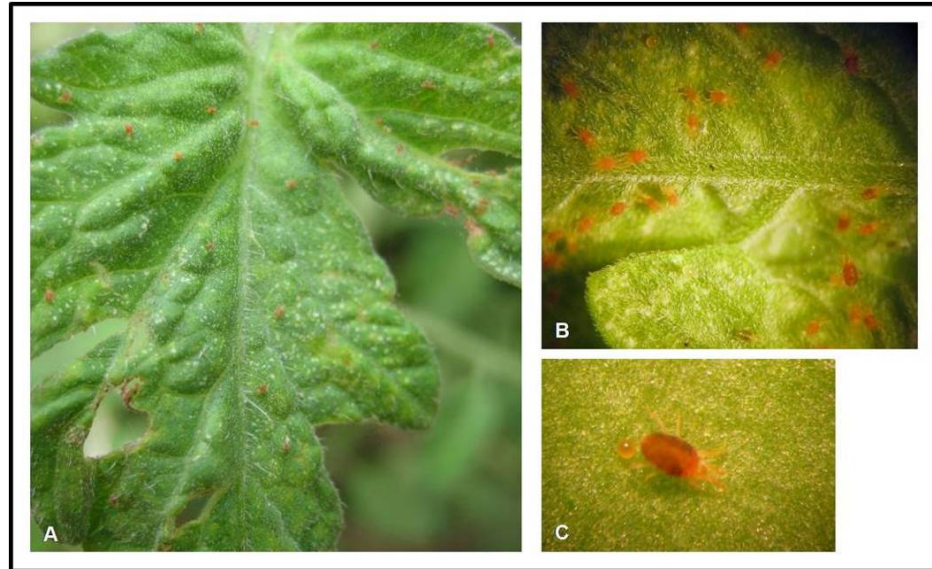


Figura 1. Em folha de tomateiro, ácaros *T. evansi*, a olho nu (A), visualizado com o microscópio estereoscópico, *T. evansi* em diferentes fases de desenvolvimento (B) e uma fêmea próxima a um ovo (C).

Esse fitófago possui distribuição cosmopolita, tendo sido relatado em diferentes localidades. Em 1979, *T. evansi* foi encontrado em plantas de tabaco no Zimbábue, África (BLAIR, 1983). Foi também relatado no Congo (BONATO, 1999), Marrocos (EL JAOUANI, 1988), Tunísia (BOLLAND *et al.*, 1998), Ilhas Virgens (MORAES *et al.*, 1987) e Estados Unidos (SCHUSTER, 1959; MORAES *et al.*, 1987). Relatos de problemas com *T. evansi* em tomateiro, indicam que essa espécie chegou à Zâmbia por volta de 1985 (MINGOCHI e JENSEN, 1986) e em Malawi no início dos anos 90. Outros relatos sugerem a presença de *T. evansi* na Tanzânia, Senegal e Etiópia e em 2001, *T. evansi* foi encontrado no Quênia. O mesmo foi encontrado na Espanha (FERRAGUT e ESCUDERO, 1999) e em Portugal (BOLLAND e VALA, 2000).

Atualmente *T. evansi* ocorre na América do Norte, América Central, América do Sul (Brasil, Argentina, Peru) Europa (Espanha, Portugal e França) e África (República Democrática do Congo, Quênia, Malawi, Mauritius, Marrocos, Moçambique, Namíbia, Réunion, Seychelles, Somália, África do Sul, Tunísia, Zâmbia e Zimbábue) (MORAES *et al.*, 1987; FERRAGUT e ESCUDERO, 1999; EPPO, 2004; FURTADO, 2006; ALVARADO, 2007). No Brasil, este ácaro é encontrado na região Nordeste, especialmente nas regiões do Recife, Ceará, Rio Grande do Norte e Sergipe. No Centro-oeste foi encontrado no Mato Grosso do Sul, no Sudeste em

São Paulo e Minas Gerais e no Sul, no Rio Grande do Sul (MORAES *et al.*, 1987; ROSA *et al.*, 2005; FURTADO, 2006; FIABOE *et al.*, 2007; MORAES e FLECHTMANN, 2008).

Como a América do Sul é o centro de origem desse ácaro torna-se de grande importância a busca de métodos de controle biológico para o controle do *T. evansi*. Essa busca de inimigos naturais de *T. evansi* poderia seguir os mesmos passos dados para o controle de outro ácaro fitófago, *Mononychellus tanajoa* (Bondar), que também provocou enormes prejuízos na África sobre cultivos de mandioca. Estudos realizados no Brasil para busca de métodos de controle resultaram na identificação de inimigos naturais (*Amblydromalus manihoti* (Moraes), *Neoseiulus ideaus* Denmark & Muma e *Typhlodromalus aripo* DeLeon) que foram introduzidos com sucesso para o controle do *M. tanajoa* no Brasil e no continente Africano (FIABOE *et al.*, 2007).

O *T. evansi* promove danos no tecido foliar, levando ao amarelecimento das folhas, em seguida, desidratação e eventual desfolhamento, inviabilizando a produção (EPPO, 2004; FURTADO, 2006; ALVARADO, 2007; MORAES e FLECHTMANN, 2008). No Brasil, em cultivos de tomate, esse ácaro causa danos severos (MORAES e MCMURTY, 1985). Na África, principalmente, esse ácaro constitui uma praga causando elevados prejuízos para a cultura de tomate (MORAES *et al.*, 1987; FIABOE *et al.*, 2007). No sul da África, é considerado como a mais importante praga do tomate. No Zimbábue, até 90% de perdas no rendimento têm sido registradas em ensaios de campo (EPPO, 2004). Trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de encontrar inimigos naturais para *T. evansi* (FIABOE *et al.*, 2007). Ácaros predadores da família Phytoseiidae vêm sendo testados como agente de controle biológico deste ácaro praga (FURTADO *et al.*, 2007), entretanto *T. evansi* produz uma grande quantidade de teia, o que dificulta a ação destes predadores (ROSA *et al.*, 2005), (Fig. 2).

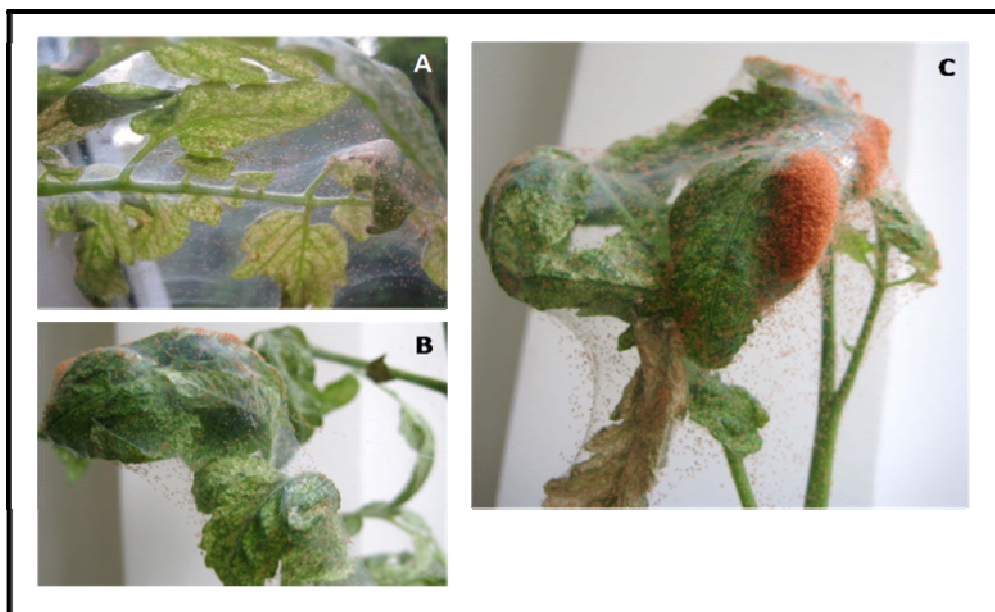


Figura 2. Abundante quantidade de teia produzida pelo ácaro *T. evansi*, em tomateiro.

Outro foco de estudo para o controle desta praga é o fungo entomopatogênico *Neozygites floridana* Weiser & Muma que vem causando a morte de populações de *T. evansi* no Brasil (ALVARADO, 2007; WEKESA, 2008). ALVARADO (2007) relatou que esse fungo causou epizootias no período de maio e junho em Recife, promovendo drástica redução na população da praga.

Pesquisas envolvendo *T. evansi* e defesa de plantas vêm sendo realizadas por SARMENTO (2007). SARMENTO (2007) estudou a resposta de defesa induzida do tomateiro ao ataque do *T. evansi* e *T. urticae*. Este autor sugere que o *T. evansi* possa estar manipulando o sistema de defesa de suas plantas hospedeiras, tornando-as nutricionalmente mais adequadas para o seu desenvolvimento.

Mecanismos de defesa das plantas

As defesas podem ser classificadas em constitutivas e induzidas. As constitutivas são aquelas pré-existentes na planta para evitar a colonização dos seus tecidos e independe da ação do fitófago ou patógeno. As barreiras físicas e os compostos metabólicos presentes no vegetal são exemplos de defesa constitutiva. Já as defesas induzidas ocorrem em resposta à injúria do tecido vegetal, seja esta lesão provocada pela ação de um patógeno ou herbívoro. Quando ocorre a lesão do

tecido, a planta incrementa seu sistema de defesa com o aumento da produção de compostos já pré-existentes, como os inibidores de proteinases. Além do mais, pode ocorrer produção de novas substâncias tais como compostos voláteis, que são utilizados pelos inimigos naturais de herbívoros para localizar plantas com suas presas (JONGSMA e BOLTER, 1997; PIETERSE e VAN LOON, 1999; KESSLER e BALDWIN, 2002; SCHALLER, 2008).

Dentre os compostos bioquímicos que a planta pode produzir, existem as proteínas de defesa, e dentre estes os inibidores de enzimas digestivas. Estes inibidores são sintetizados constitutivamente em várias partes da planta, porém sua síntese pode se elevar em resposta ao ataque de um herbívoro ou patógeno (FARMER e RYAN, 1992; JONGSMA e BOLTER, 1997; MOSOLOV e VALUEVA, 2005).

Os inibidores atuam no trato digestivo do artrópode e comprometem as suas enzimas digestivas (JONGSMA e BOLTER, 1997; CARLINI e GROSSI-DE-AS, 2002; CHOUGULE *et al.*, 2008). Estes inibidores podem afetar as enzimas carboidrases ou proteinases. Os inibidores de carboidrases, principalmente as α -amilases estão relacionados aos grãos e leguminosas, tendo maior importância para os artrópodes que se desenvolvem em grãos e sementes ricas em amido, como o caruncho *Callosobruchus maculatus* (PUEYO *et al.*, 1995; CARLINI e GROSSI-DE-AS, 2002; BONAVIDES *et al.*, 2007).

Inibidores de proteinases são moléculas protéicas importantes na natureza para a regulação específica da atividade de enzimas alvo, inibindo a atividade destas em caso emergenciais, ou na inativação com receptores de sinalização (LASKOSKI e KATO, 1980).

Os inibidores de proteinases comprometem a atividade proteolítica com a redução da disponibilidade dos aminoácidos. Os inibidores de proteinases são classificados em quatro tipos, conforme as quatro classes de proteinases que inibem, assim são classificadas em inibidores de serino, de cisteíno, de aspártico e de metalo-proteinases (RYAN, 1990; CARLINI e GROSSI-DE-AS, 2002; BIRK, 2003; MOSOLOV e VALUEVA, 2005; CHOUGULE *et al.*, 2008). Os inibidores mais estudados são os inibidores de serino-proteinases; dentre estes os inibidores de

tripsina e quimiotripsina (JONGSMA e BOLTER, 1997; CARLINI e GROSSI-DE-AS, 2002; BIRK, 2003; MOSOLOV e VALUEVA, 2005).

Os inibidores de serino proteinases foram encontrados inicialmente em órgãos de reserva de plantas, tais como sementes e tubérculos, mas posteriormente foram detectados em folhas e frutos (XAVIER-FILHO, 1992), acontecendo o mesmo para os inibidores de cisteíno proteinases. Além de protegerem a planta contra o ataque de insetos e ácaros, os inibidores de proteinase também são utilizados como proteínas de reserva em algumas sementes (SILVA e FALCO, 2000).

Os inibidores têm como mecanismo de ação a inibição competitiva, assim competem com o substrato a ser clivado, pela enzima diminuindo significativamente a atividade da enzima. Geralmente os inibidores associam-se fortemente as enzimas que eles inibem com constante de associação da ordem de 10^7 a 10^{14} M⁻¹ (LASKOSKI e KATO, 1980). O inibidor apresenta uma estrutura semelhante ao substrato, desta forma ele consegue se acoplar a enzima não havendo o reconhecimento dos sítios de ativação e assim não ocorre a clivagem do substrato (BODE e HUBER, 1992; BIRK, 2003).

A redução da clivagem dos substratos limita a disponibilidade dos aminoácidos, e como consequência, o desenvolvimento e a sobrevivência do fitófago são afetados negativamente. A presença do inibidor também eleva a produção de proteinases, sendo os aminoácidos alocados para o incremento na produção destas enzimas, levando a limitação da biodisponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese protéica. Como efeito da presença dos inibidores tem-se a redução da fecundidade, do peso, aumento da mortalidade e deformações (BIRK, 2003; MOSOLOV e VALUEVA, 2005; CHOUGULE *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2009).

FAMER e RYAN (1992) propuseram um modelo de sinalização para a produção de inibidores de proteinases (Fig. 3). O metil jasmonato, um volátil derivado de ácidos graxos seria um robusto indutor de inibidores de proteinases em tomate, tabaco e alfafa. Assim, o jasmonato seria um dos componentes sinalizadores para a expressão gênica com a produção de inibidores de proteinases.

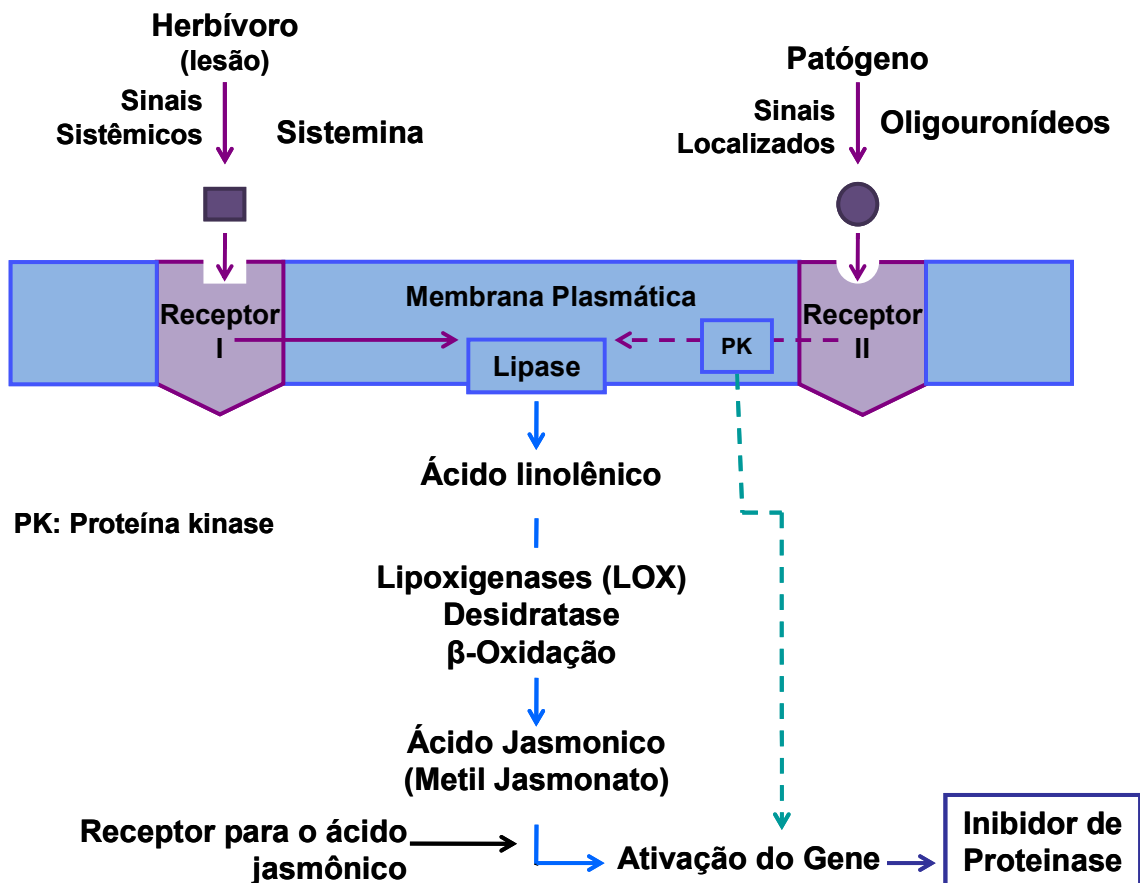


Figura 3. Modelo de sinalização da ativação da produção de inibidores de proteinases por ferimento em folhas de tomate (FARMER e RYAN, 1992).

Na ativação das rotas que desencadeiam a produção de compostos de defesa, é necessário o reconhecimento de sinais através da ligação específica de moléculas protéicas (MITHÖFER e BOLAND, 2000). A planta responde ao ataque do herbívoro, conforme o tipo de injúria mecânica que ele causa no tecido vegetal e ao estímulo químico. Os sinais gerados por herbívoros, que atravessam células vegetais para remover os líquidos como fontes de nutrientes são complexos. Diferentes compostos estão presentes nas secreções orais dos artrópodes. Ao reconhecer uma substância que atua como molécula sinalizadora, a planta ativa uma rota bioquímica para a produção de compostos metabólicos envolvidos na resposta de defesa de maneira específica (WALLING, 2000; MITHÖFER e BOLAND, 2008).

Compostos presentes nas secreções orais de alguns fitófagos atuam como indutores do sistema de defesa indireta da planta. Ácaros galhadores, por exemplo, secretam um composto chamado quitosana no local da alimentação. Esses compostos atuam como sinalizadores, dando início a uma cascata de reações, resultando na produção de compostos envolvidos na resposta de defesa da planta (WALLING, 2000; KESSLER e BALDWIN, 2002; MITHÖFER e BOLAND, 2008).

Interações

Os organismos não vivem isolados; normalmente eles estabelecem associações biológicas e estão sujeitos simultaneamente a diferentes tipos de interações (BEGON *et al.*, 2007). BEGON *et al.* (2007) sugeriram que as interações podem ser classificadas dentro de cinco categorias: competição, predação, parasitismo, mutualismo e detritívora. A competição ocorre quando um organismo consome um recurso que estaria disponível para outro organismo. Predação seria a situação na qual um organismo mata o outro, ou ataca parte de outro organismo, relação entre o predador e a presa. Quando um organismo o parasito, obtém seus recursos de um ou poucos hospedeiros a interação é chamada de parasitismo. Nas interações mutualistas ambos os organismos experimentam algum benefício. A detritívora ocorre quando há o consumo de partes de ou organismos mortos (TOWNSEND *et al.*, 2006; BEGON *et al.*, 2007).

Quando se tem uma interação física fechada entre espécies, esta seria chamada de simbiose. O “simbionte” ocupa um habitat fornecido por um “hospedeiro”. A simbiose, que significa *vivendo junto*, é definida como uma associação íntima entre indivíduos de espécies diferentes, em que um vive dentro do outro ou sobre ele (TOWNSEND *et al.*, 2006).

Muitos organismos são utilizados como abrigo de microrganismos extracelulares e intracelulares, sendo o habitat para mutualistas, parasitos e comensais (TOWNSEND *et al.*, 2006). Assim, consideram-se as interações mutualísticas, comensais, e parasitárias como simbióticas. Na simbiose comensal, ocorre uma associação em que um organismo obtém um benefício e o seu hospedeiro não é prejudicado e nem beneficiado. Em uma associação em que ambos os organismos obtêm benefícios, ocorre uma simbiose mutualística. Já

quando um organismo recebe nutriente à custa de um organismo hospedeiro forma-se uma simbiose parasitária (PARACER e AHMADJIAN, 2000; KLEPZIG *et al.*, 2009).

Estas associações não são estáticas, podendo haver transições frequentes de um tipo para outro. Associações simbióticas podem mudar devido a fatores ambientais ou influências internas causadas pelo desenvolvimento do simbiote. A associação parasitária poderia evoluir para um mutualismo ou comensalismo. E de fato, a maioria das simbioses mutualísticas provavelmente teve início como parasitária, na qual um organismo tenta explorar o outro (PARACER e AHMADJIAN, 2000).

Em uma relação simbiótica, o hospedeiro também pode ser denominado de macro-simbiote, e os organismos benéficos (hóspedes) seriam os micro-simbiontes, o que engloba uma ampla gama de fungos, bactérias, ácaros, nematóides etc. (KLEPZIG *et al.*, 2009).

O estudo da simbiose tornou-se central para alguns temas de biologia. Estes incluem mecanismos de evolução, co-adaptação e especiação, interações planta-herbívoro, interações tritróficas, comunicação animal e organização social, dinâmica das populações, invasões biológicas e manejo de pragas (ZOOK, 1998; KLEPZIG *et al.*, 2009).

Diferentes microrganismos estão associados como simbiotes a ácaros e insetos, como bactérias do gênero *Wolbachia* e *Cardinium* (WEEKS *et al.*, 2001; CHIGIRA, 2005). Esses microrganismos além de afetarem a reprodução dos artrópodes também podem estar associados à adaptação de alguns fitófagos aos seus hospedeiros, contribuindo para que estes macro-simbiontes superem as defesas do hospedeiro (DILLON e DILLON, 2004; KLEPZIG *et al.*, 2009).

Relações simbióticas em artrópodes

As relações simbióticas podem conferir uma grande variedade de benefícios para o macro-simbiote, como a nutrição direta ou indireta, a habilidade para combater as defesas do hospedeiro (uma planta ou um animal), a proteção contra

inimigos naturais, auxílio no desenvolvimento e na reprodução do indivíduo (KLEPZIG *et al.*, 2009).

A associação do besouro da madeira, do gênero *Dendroctonus*, por exemplo, com alguns fungos, resultou em uma estrutura especializada (micetângias) para o transporte deste micro-simbiontes. Nesta simbiose, os fungos ajudam os coleópteros a colonizar árvores vivas e fornecem nutrientes após a colonização, em troca de transporte para um hospedeiro (KOPPER *et al.*, 2004; HOFSTETTER *et al.*, 2005; KLEPZIG *et al.*, 2009).

Uma relação simbiótica interessante é entre a vespa européia, *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera: Siricidae) e o fungo *Amylostereum areolatum* (Fr.) Boidin. Esta vespa se estabeleceu como uma praga florestal devido a sua associação com este micro-simbionte. A sua oviposição é realizada no caule das árvores, e neste momento o inseto também inocula a árvore com o fungo *A. areolatum*. Este microrganismo reduz o teor de umidade da madeira permitindo a eclosão das larvas do inseto, e oferece recursos alimentares para as mesmas. Este fungo é saprófito em troncos caídos e tocos de *Picea* spp. e *Abies* spp. e é o causador de ferimentos no caule e decadência em *Picea abies* (L.) Karst (VASILIAUSKA, 1999; KLEPZIG, 2009).

Alguns padrões de associações simbióticas podem ser destacados, como: i) benefícios nutricionais, como no caso do coleóptero *Dendroctonus*, ii) proteção contra inimigos naturais, como competidores, predadores e parasitos, iii) alterações na fisiologia, com um incremento no desenvolvimento, reprodução e comunicação destes macro-simbiontes (HOFSTETTER *et al.*, 2005; KLEPZIG *et al.*, 2009).

Artrópodes em geral possuem uma dieta nutricionalmente desequilibrada. Em particular, os insetos não conseguem sintetizar esteróides e carotenóides que devem ser obtidos então da dieta ou de microrganismos. Hemípteros que se alimentam da seiva de plantas, por exemplo, são desafiados com baixos níveis de nitrogênio. Em afídeos, bactérias do gênero *Buchnera* sintetizam aminoácidos essenciais e auxiliam na produção de leucina e vitaminas (PARACER e AHMADJIAN, 2000; DOUGLAS, 2006, 2009; KLEPZIG *et al.*, 2009).

Em *Spodoptera exigua*, uma enzima foi obtida a partir do micro-simbionte *Microbacterium arborescens* SE14 isolado do estômago de larvas desse herbívoro

generalista (PING *et al.*, 2007). Os substratos dessa enzima N-acetil-hidrolase são os N-acetil-glutaminas, previamente relatadas como indutores das reações de defesa induzida na planta (ZHAO e QI, 2008). A faixa de pH alcalino contribui para a atividade de N-acetil-hidrolase e esta enzima atua num grande intervalo de temperatura. Tais propriedades combinam com o ambiente do inseto, que está exposto a variações de temperatura no ambiente. Além disso, o pH do trato intestinal destes insetos é elevado, variando de 9 a 11. Estas fornecem glutamina, que seria uma importante fonte de nitrogênio para biossíntese de ácido nucléico nos macro-simbiontes (PING *et al.*, 2007).

Muitos artrópodes possuem associação com bactérias do gênero *Wolbachia*. Este micro-simbionte tem efeitos reprodutivos, promovendo o aumento na produção de fêmeas. Relações simbióticas envolvendo *Wolbachia* vêm sendo bem estudadas em diferentes artrópodes, tais como ácaros Tetranychidae e Tenuipalpidae, parasitóides do gênero *Trichogramma*; em *Drosophila* spp. Os resultados sugerem que nessa associação há o aumento da resistência do macro-simbionte a fungos patogênicos (STOUTHAMER e KAZMER, 1994; RELMAN, 2008; SERBUS *et al.*, 2008; WERREN *et al.*, 2008; KLEPZIG *et al.*, 2009).

O ácaro *T. evansi* apresenta um bom desempenho em plantas de tomate com alta capacidade reprodutiva. Esse potencial do ácaro pode estar associado a relações simbióticas ácaro-microrganismo que favorecem o seu macro-simbionte superar as defesas da planta tornando-a adequada para o seu desenvolvimento. Desse modo, este trabalho tem como objetivo estudar a interação entre o ácaro *T. evansi* e possíveis microrganismos simbiotes e averiguar se esta interação pode estar associada à capacidade de resposta de defesa do tomateiro ao ataque desta praga. O trabalho conta com os seguintes capítulos:

1. Associação biológica entre *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae) e microrganismos;

2. A microbiota bacteriana do *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae) pode afetar a resposta de defesa induzida do tomateiro?

II. CAPÍTULO I

ASSOCIAÇÃO BIOLÓGICA ENTRE *Tetranychus evansi* BAKER E PRITCHARD (ACARI: TETRANYCHIDAE) E MICRORGANISMOS

ASSOCIAÇÃO BIOLÓGICA ENTRE *Tetranychus evansi* BAKER E PRITCHARD (ACARI: TETRANYCHIDAE) E MICRORGANISMOS

RESUMO – Os micro-simbiontes conferem uma gama de benefícios para o seu macro-simbionte, tais como o fornecimento de nutrientes, a resistência a patógenos, habilidade em superar as defesas da planta e desintoxicação. Neste trabalho, foi estudado o ácaro *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard, uma importante praga em cultivos de tomate. Foi verificado se o ácaro *T. evansi* possui associação com microrganismos e se a existência desta relação *T. evansi*-simbionte promove benefícios para esse ácaro. Para os ensaios, foram utilizados ácaros tratados com o antimicrobiano hidroclorito de tetraciclina 0,2 % e ácaros não tratados. A confirmação da presença de microrganismos foi realizada através da análise molecular e microbiológica. Adicionalmente, para verificação do efeito do microrganismo sobre o desempenho do *T. evansi* foi realizada a avaliação da oviposição de ácaros com a microbiota reduzida (tratados) e daqueles com microrganismos (ácaros não tratados) em folhas de tomate por quatro dias. Por intermédio das análises moleculares e microbiológicas foi possível confirmar a presença de microrganismos nos ácaros não tratados, demonstrando assim a eficácia do tratamento com o antimicrobiano. A taxa de oviposição dos ácaros não tratados foi 2,8 vezes superior a dos tratados. Tal resultado pode ser devido a redução de nutrientes fornecidos pelo micro-simbionte, a ausência de mecanismos de desintoxicação associados à presença de microrganismos ou a à ação tóxica do antimicrobiano. Portanto, é possível afirmar que o ácaro *T. evansi* está associado à endossimbiontes.

Palavras-chave: Tetranychidae, endossimbionte, *Lycopersicon esculentum* Mill

1. INTRODUÇÃO

Os artrópodes possuem associação simbiótica com diversos microrganismos. Sabe-se que alguns microrganismos simbiontes são necessários para insetos com dietas sub-ótimas. Em afídeos a presença do endossimbionte *Buchnera aphidicola* é obrigatória, pois este fornece aminoácidos essenciais, como o triptofano. Afídeos tratados com antibiótico tiveram o crescimento e a reprodução afetados negativamente, o que sugere a dependência destes insetos aos nutrientes resultantes da biossíntese do seu endossimbionte (DOUGLAS *et al.*, 2001; WERREN *et al.*, 2008).

Outros microrganismos associados a ácaros e insetos são as bactérias do gênero *Wolbachia* e *Cardinium* (CHIGIRA, 2005; WEEKS *et al.*, 2001). A *Wolbachia* tem atraído considerável interesse devido à sua grande abundância, e aos efeitos sobre os seus macro-simbiontes como a participação em processos celulares e reprodutivos e aplicações para o controle de pragas e insetos vetores de doenças. Bactérias do gênero *Cardinium* também atuam no processo reprodutivo de seus hospedeiros (GOTOH *et al.*, 2007; WERREN *et al.*, 2008).

Trabalhos envolvendo o estudo de microrganismos associados a ácaros vêm sendo realizados. ENIGL e SCHAUSBERGER (2007) identificaram bactérias endossimbióticas associadas aos ácaros *T. urticae*, *Bryobia rubrioculus*, *Eotetranychus uncatius*, *Euseius finlandicus* e *Neoseiulus californicus*. Os efeitos que esses microrganismos causam sobre o ácaro *T. urticae* foram estudados por VALA *et al.* (2004) e GOTOH *et al.* (2006). WEEKS *et al.* (2001) realizaram estudos com o ácaro *Brevipalpus phoenicis* e sua associação com bactéria *Wolbachia*.

As *Wolbachias* estão presentes na maioria das espécies de insetos, bem como em alguns ácaros, crustáceos e nematóides filariais. Esse microrganismo é herdado através do citoplasma materno e não de outras estruturas especializadas. Em muitos casos, este simbiote aparentemente contribui pouco para seu hospedeiro. Entretanto, há relatos de que essa bactéria manipula a reprodução do hospedeiro de várias maneiras, tais como a indução de incompatibilidade citoplasmática, partenogênese telítoca, conversão de machos genéticos em fêmeas funcionais, ou morte dos machos (STOUTHAMER *et al.*, 1999; PERROT-MINNOT *et al.*, 2008; SERBUS *et al.*, 2008; KLEPZIG *et al.*, 2009).

A *Wolbachia* estabelece uma associação tão íntima com seu macro-simbionte que para as diferentes cepas de *Wolbachia* que infectam o artrópode, têm-se diferentes linhagens. Dentro de uma espécie têm-se diferentes linhagens e em cruzamentos entre machos infectados com fêmeas não infectadas ou, então, com fêmeas infectadas por outra linhagem de *Wolbachia*, os embriões são abortados. Esta incompatibilidade citoplasmática ou reprodutiva é o efeito mais comum deste endossimbionte na reprodução de seus macro-simbiontes (SERBUS *et al.*, 2008; PERROT-MINNOT *et al.*, 2008; WERREN *et al.*, 2008).

Fêmeas que mantêm associação com este endossimbionte apresentam vantagens sobre as fêmeas não infectadas por não possuírem restrições quanto ao parceiro e geram uma progênie com fêmeas infectadas. Tal fato pode promover alterações na razão sexual dos macro-simbiontes (WERREN *et al.*, 2008). Infecções por *Wolbachia* podem gerar outros efeitos no seu hospedeiro como respostas a estímulos olfativos. A presença desse endossimbionte promoveu a proteção de *D. melanogaster* contra entomopatógenos (RELMAN, 2008; WERREN *et al.*, 2008).

Este trabalho investigou a existência de microrganismos associados ao ácaro *T. evansi* e averiguou mediante a mensuração da oviposição, o desempenho do ácaro *T. evansi* após a redução populacional da sua microbiota simbiote. Para tal propósito, foram utilizadas duas linhagens de *T. evansi*, sendo: i) tratada com antibiótico e, ii) não tratada com antibiótico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos

Os tomateiros foram cultivados em casa de vegetação e a criação dos ácaros e as avaliações biológicas foram realizadas Laboratório de Acarologia/Entomologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV). As análises molecular e microbiológica foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BioAgro), UFV.

2.2. Obtenção de folhas de tomateiro

Foram utilizadas folhas de tomateiros da variedade Santa Clara I-5300. As sementes foram plantadas em substrato comercial, composto por vermiculita e adubo orgânico, em bandejas de isopor (8 x 16 células). Após 23 dias da semeadura, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos (1,5 L) contendo mistura de solo e esterco bovino curtido (3:1 v/v). Para a criação dos ácaros foram utilizadas folhas completamente desenvolvidas.

As folhas foram coletadas no período da manhã, cortadas com o auxílio de uma tesoura e colocadas em um vaso com água. No laboratório as folhas foram inspecionadas com o auxílio do microscópio estereoscópico antes de serem utilizadas na criação. Para os experimentos foram utilizadas as segundas folhas definitivas de baixo para cima das plantas com 45 dias de idade e com quatro folhas completamente desenvolvidas.

Desde o plantio das sementes até a coleta das folhas, a plantas permaneceram no interior de gaiolas construídas através de encaixes de canos de PVC $\frac{3}{4}$ sendo desmontável nas dimensões 0,70 m x 1,0 m x 3,4 m e revestida com organza, evitando com isso o ataque de fitófagos. Após realização dos ensaios, as plantas foram imediatamente descartadas. As demais plantas utilizadas para a criação foram descartadas com 55 dias de idade.

2.3. Criação de *Tetranychus evansi*

Os ácaros foram mantidos em arenas tendo como substrato folha de tomateiro da variedade Santa Clara I-5300. Foram utilizadas folhas completamente

desenvolvida, coletadas com o auxílio de uma tesoura e colocadas imediatamente em um copo com água. Em seguida, as folhas foram transportadas para o Laboratório de Acarologia. Para a montagem das arenas, as folhas foram mantidas com a face abaxial em contato com uma espuma de náilon recobertas com algodão hidrofílico umedecido com água destilada e mantidas no interior de bandejas plásticas (Fig. 4). Posteriormente, com o auxílio de um microscópio estereoscópico as folhas foram observadas e limpas com um auxílio de um pincel. Os ácaros foram transferidos para as arenas com o auxílio de um pincel de cerdas macias. As colônias permaneceram a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, U.R. $70 \pm 5 \%$ e fotofase de 12 h, em câmara incubadora BOD.

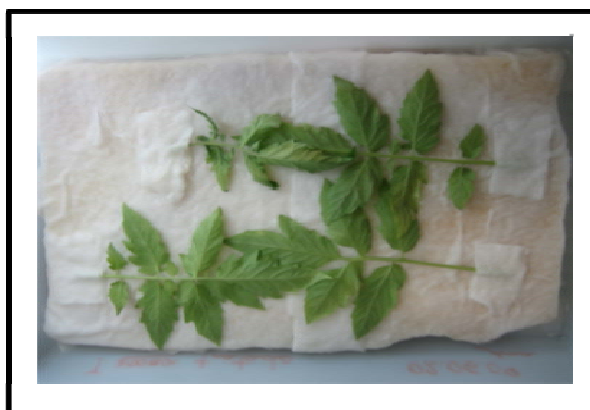


Figura 4. Arena com ácaros *T. evansi* em folha de tomateiro.

2.4. Tratamento dos ácaros

Para a obtenção de ácaros com microbiota reduzida, utilizou-se o antibiótico hidróclorido de tetraciclina 0,2 % como tratamento, conforme WEEKS (2004). A solução foi preparada em câmara de fluxo laminar asséptica utilizando todos os materiais autoclavados, seringa estéril, unidade filtrante Millipore com 0,22 μm de poro. Discos de folhas de tomateiro com 2,5 cm de diâmetro foram mantidos submersos nesta solução por cerca de duas horas. Em seguida estes discos foram re-aloçados em placas de Petri autoclavadas, contendo algodão hidrofílico estéril, sendo o algodão embebido em solução de hidróclorido de tetraciclina 0,2 %. Fêmeas adultas de *T. evansi* foram transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas macias para esses discos e mantidas a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h por 72 h. Após esse período, os ácaros foram coletados e imediatamente utilizados nos ensaios

(metodologia obtida a partir de testes pilotos realizados no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária- BioAgro e no Laboratório de Acarologia- UFV) .

2.5. Análise Molecular

Para confirmar a redução de microrganismos simbiotes foram realizadas análises moleculares para detectar a presença de DNA dos microrganismos nos ácaros tratados e nos ácaros não tratados.

Extração do DNA

Foram utilizadas 30 fêmeas tratadas e 30 não tratadas. Os ácaros foram previamente esterilizados, para retirada de microrganismos da sua superfície. Para a esterilização superficial, inicialmente os ácaros foram colocados em álcool 70 %, em seguida lavados com solução de hipoclorito de sódio a 0,1 %, e por fim o material foi lavado em água estéril para retirada do excesso de hipoclorito de sódio e centrifugado a 5.000 rpm por cinco minutos.

Para a extração de DNA foi utilizada metodologia adaptada a partir de POSPIECH e NEUMANN (1995). Aos indivíduos no interior dos microtubos de 1,5 mL foram adicionados 200 µL de tampão SET (75 mM NaCl; 25 mM EDTA; 20 mM Tris HCl, pH 7,4) autoclavado, seguido por maceração imediata. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 0,5 rpm por três minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes. Os sobrenadantes obtidos foram centrifugados a 5.000 rpm por cinco minutos. O pellet foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCL e 10 mM EDTA, pH 7,5), na presença de 1 µL de proteinases K (20 mg/mL) e 8 µL de lisozima (50 mg/mL). O pellet foi incubado a 37°C por uma hora em banho-maria, sendo homogeneizado em tempos espaçados. Adicionou-se 60 µL de SDS 10 % (dodecil sulfato de sódio) e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 60 µL de CTAB 10 % e a reação incubada a 65°C por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi tratada com a adição de um volume equivalente de fenol-cloroformio-álcool isoamilico (25:24:1) e centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos. Retirou-se a fase superior, adicionou-se igual volume de isopropanol e centrifugou-se a 12.000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi incubada a -20°C por duas horas e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 20 µL álcool

etílico 70 % e centrifugado a 5.000 rpm por dois minutos. O pellet foi ressuspenso em 20 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCL e 10mM EDTA, pH 7,5). O material foi acondicionado a -20°C até o momento da amplificação.

Amplificação DNA do gene 16S rRNA bacteriano

Para identificar eubactérias foram utilizados primers de oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA, sendo 16SF (5'- AGAGTTTGATCMTGG-3') e 16SR (5'- TACCTTGTTACGACTT-3'), citado por WEEKS *et al.* (2001). Cada reação foi feita num volume total de 25 µL, com 1 µL de amostra de DNA e 25 µL da mistura [2,5 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2,5 µL do tampão Tris 1X, 2 µL dos primers (16 SF e 16 SR), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de TAQ Polimerase (5 U/µL) e 16,8 µL de água Milli Q autoclavada]. As amplificações foram realizadas em termociclador, sendo que o programa de amplificação constituiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, em seguida 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e por fim, 72°C por 5 minutos (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com 0,2 µL de brometo de etídeo em tampão TBE 1X, a voltagem constante de 100 v. O gel foi visualizado e fotografado pelo sistema de captura de imagem digital LPIX – Loccus Biotecnologia, gravado eletronicamente e impresso para arquivo (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.6. Análise Microbiológica

Meio de cultura

Para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi utilizado o meio de cultura infusão cérebro coração (BHI) Merck®, pH 7,4. Esse meio é rico em nutrientes, adequado para o cultivo de várias bactérias fastidiosas, fungos e leveduras, sendo recomendado para análise de água e em testes de suscetibilidade a antimicrobianos (Merck Microbiology Manual, 2008).

O meio foi preparado conforme a indicação do fabricante. Foi utilizada a proporção de 37 g de BHI para 1 L de água destilada. Para o preparo do meio sólido foi acrescentado 20 g de ágar. Após o preparo, o meio de cultura foi devidamente autoclavado e vertido em placas de Petri previamente esterilizadas, em câmara de

fluxo laminar. No preparo do meio líquido, 3 mL de BHI foram colocados em tubos de ensaios e fechados com tampão de algodão hidrófilo e gaze e em seguida autoclavados. As placas de Petri e os tubos de ensaio contendo o meio de cultura foram mantidos a 4°C até o momento da sua utilização (VERMELHO *et al.*, 2006).

Detecção de microrganismos

Os ácaros foram coletados com o auxílio de um pincel de cerdas macias e acondicionados em microtubos de 1,5 mL, sendo utilizados cerca de 100 ácaros adultos *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % e 100 ácaros adultos *T. evansi* não tratados para a realização da detecção de microrganismos. Os indivíduos coletados em microtubos foram transportados para câmara de fluxo laminar previamente asséptica; os ácaros foram lavados em solução de álcool 70 % e posteriormente centrifugados a 5.000 rpm por 5 min. Em seguida, os mesmos foram lavados duas vezes com água destilada estéril e centrifugados novamente a 5.000 rpm por 5 min para a retirada de microrganismos da sua superfície. Os ácaros foram transferidos para um novo microtubo contendo 450 µL de solução salina 0,85% estéril onde foram macerados (adaptado de VISÔTTO *et al.*, 2009).

Para todos os tubos de ensaio, contendo o meio de cultura BHI líquido, foram transferidos 100 µL do macerado e em seguida os mesmos foram selados com filme de PVC. Os tubos foram mantidos inclinados em câmara incubadora BOD a 30°C por 24 h para a observação do crescimento bacteriano.

O meio de cultura sólido foi utilizado para a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC). Nas placas de Petri foram adicionados 50 µL do macerado de cada tratamento e com o auxílio da alça de Drigalsky, a solução foi espalhada sobre a superfície do meio. O material foi acondicionado em câmara incubadora BOD a 30°C por 24-72 h para o crescimento das colônias.

2.7. Avaliação Biológica

Fêmeas adultas de mesma idade foram individualizadas em discos de folhas de tomateiros com 3 cm de diâmetro. Como substrato foi utilizado a segunda folha de baixo para cima coletadas de plantas de tomate com 49 dias.

Para obtenção de fêmeas da mesma idade, cerca de 200 fêmeas de *T. evansi* provenientes da criação de manutenção foram depositadas sobre folhas de tomateiro. As folhas foram mantidas com a parte superior (adaxial) em contato com algodão hidrófilo umedecido com água destilada, no interior de placas de Petri (14 cm de diâmetro x 2 cm de profundidade). Após 24 h, as fêmeas foram removidas. Foram realizadas observações a cada 48 h, verificando a mudança de fase. Após emergência dos adultos, as fêmeas foram retiradas para a realização dos ensaios.

Nesse experimento foram utilizados dois tipos de ácaros: (i) *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % e (ii) *T. evansi* não tratado. Para os ácaros tratados com hidróclorido de tetraciclina, o procedimento foi realizado na fase de ninfa. O parâmetro avaliado foi oviposição por um período de 96 h. Os ensaios foram conduzidos a 25 °C, 70 ± 5 % de umidade relativa e 12 h de fotofase em câmara incubadora BOD.

2.8. Análise Estatística

Com o objetivo de comparar as estimativas das variâncias provenientes da avaliação no número de ovos para os dois tipos de ácaros (*T. evansi* tratado e não tratado) foi feito o teste F a 5% de significância, cuja finalidade era testar se há diferença significativa entre os efeitos os tratamentos. Os procedimentos estatísticos foram realizados através do software estatístico SAS® (SAS, 2003).

3. RESULTADOS

3.1. Análise Molecular

Na figura 5, tem-se a amplificação do gene 16S rRNA oriundo dos microrganismos associados ao *T. evansi*. As amostras de DNA nas canaletas 2 e 3, correspondem ao DNA bacteriano presente nos ácaros não tratados e tratados com tetraciclina 0,2 %, respectivamente. Esse resultado confirma a eficiência do tratamento com o antimicrobiano tetraciclina 0,2 %.

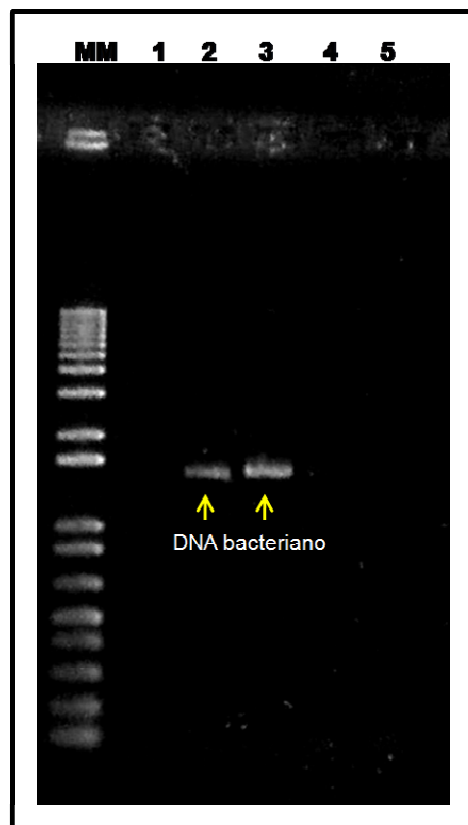


Figura 5. Gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio. (MM) marcador molecular, (1) controle negativo, (2) e (3) correspondem ao gene 16S rRNA de microrganismos associados ao *T. evansi* e as (4) e (5) mostram o gene 16S rRNA de microrganismos do ácaro *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 %.

3.2. Análise microbiológica

Após 36 h verificou-se o crescimento bacteriano nos tubos de ensaio (Fig. 6), sendo observado crescimento bacteriano somente no tratamento com o ácaro *T.*

evansi não tratado. Nas placas de Petri foi realizada a contagem das UFCs. Nas placas contendo o macerado do ácaro tratado com tetraciclina, após 36h foram observadas quatro UFCs. No tratamento com *T. evansi* não tratado, devido ao crescimento bacteriano significativo não foi possível realizar a contagem (Fig. 7).

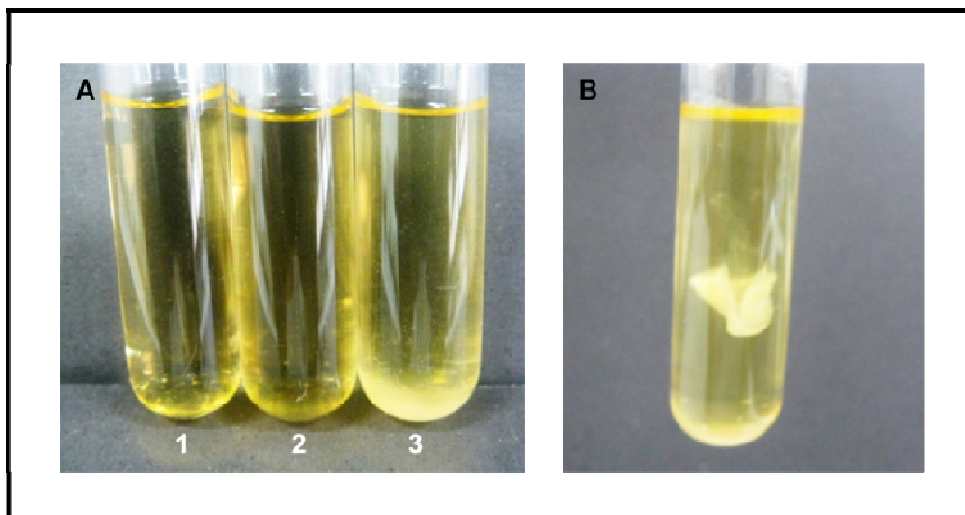


Figura 6. Meio de cultura BHI líquido, 36 h após a inoculação. Em A, o teste controle com o meio de cultura puro (1), ácaro *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina a 0,2% (2), ácaro *T. evansi* não tratado (3). Em B, detalhe do crescimento bacteriano oriundo do ácaro *T. evansi* não tratado.

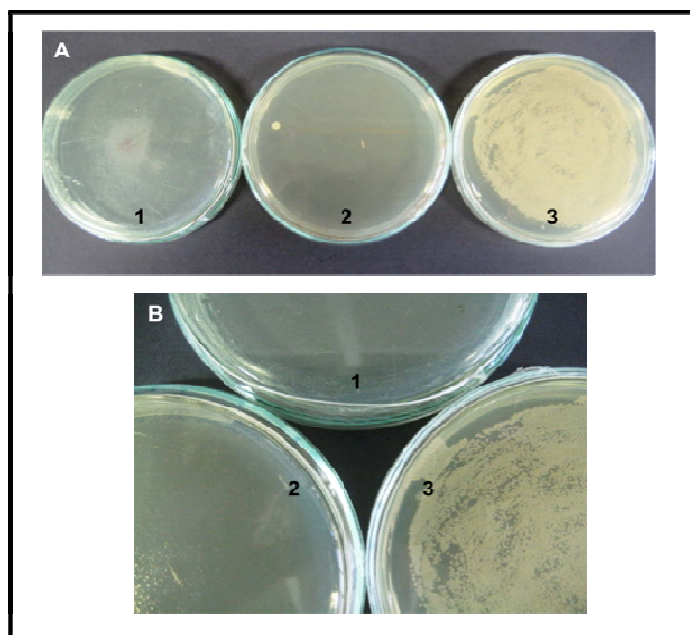


Figura 7. Plaqueamento em BHI após 36 h, (1) o teste controle com o meio de cultura puro, (2) a inoculação do ácaro *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % e (3) a inoculação do ácaro *T. evansi* não tratado. Em A visualização das placas e em B, detalhe plaqueamento.

3.3. Avaliação Biológica

Com a análise de variância foi verificado que há diferenças entre os tratamentos, i) ácaros tratados com antibiótico e, ii) ácaros não tratados, pelo teste F a 5% de significância (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) do número médio de ovos de *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % e *T. evansi* não tratado em folha de tomateiro a 28^oC, 12h de fotofase e umidade relativa de 70 %.

Fatores de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr> Fc
Tratamento	1	184, 94672	184, 946762	60, 144	0, 0000
Resíduo	49	150, 679054	3, 075084		
Total	50	335, 625816			

O ácaro *T. evansi* quando tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % apresentou taxa de oviposição significativamente menor ($2,1666 \pm 1,5492$) quando comparado ao *T. evansi* não tratado ($6,0114 \pm 1,8924$).

4. DISCUSSÃO

O uso de antibióticos para a eliminação de microrganismos de artrópodes é freqüentemente utilizado devido à conveniência e o baixo custo deste método. Além disso, a esterilização via administração oral de antimicrobianos facilita estudos fisiológicos e das possíveis relações entre a microbiota o seu hospedeiro (VISÔTTO *et al.*, 2009). Este estudo mostrou que existem microrganismos associados ao ácaro *T. evansi*. A comprovação foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), onde foram observados fragmentos de DNA bacteriano, amplificados com primers específicos para o gene 16S rRNA, nos ácaros não tratados com antibiótico. O mesmo não ocorreu com os ácaros tratados com tetraciclina. Além disso, a análise microbiológica complementou a análise molecular confirmando a redução dos microrganismos associados aos artrópodes tratados com o hidróclorido de tetraciclina a 0,2 %. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos envolvendo a aplicação de hidróclorito de tetraciclina (BREEUWER, 1997; WEEKS *et al.*, 2001; CHIGIRA e MIURA, 2005; GOTOH *et al.*, 2007). A escolha do hidróclorido tetraciclina deve-se à sua atuação na síntese protéica, o que propicia este antibiótico ter um amplo espectro e ação. Além disso, a tetraciclina é muito utilizada em experimentos nos quais se deseja eliminar microrganismos intracelulares, devido a sua capacidade de penetrar estruturas como bacteriócitos, onde se localizam simbioses intracelulares (HOERAUF *et al.*, 1998; VISÔTTO *et al.*, 2009).

Entretanto, o uso de antimicrobianos para a obtenção de linhagens de artrópodes com a microbiota reduzida pode apresentar inconvenientes (DILLON e DILLON, 2004). O antibiótico pode promover efeitos tóxicos para o macro-simbionte ou o tratamento pode ser ineficaz para a eliminação dos micro-simbiontes devido a populações de microrganismos resistentes. Deste modo, o antibiótico hidróclorido de tetraciclina pode ter tido uma ação tóxica aos ácaros expostos a esse tratamento, o que explica a taxa de oviposição cerca 2,8 vezes inferior aos dos ácaros que não foram expostos a antibióticos. Uma alternativa para neutralizar esse efeito seria a utilização de outros métodos para a 'esterilização' dos artrópodes, como o uso de tratamento térmico com temperaturas acima de 30⁰C citado por VAN OPIJNEN e

BREEUWER (1999) e a manutenção desses indivíduos em ambiente estéril com uma fonte de alimento livre de microrganismos.

Existe uma grande variação de microrganismos colonizando o intestino dos insetos e esta microbiota promove impactos no seu hospedeiro. A associação com alguns microrganismos pode promover relações benéficas como, auxílio na nutrição, contribuição nos processos de desintoxicação e impedimento da entrada de microrganismos potencialmente nocivos (PARACER e AHMADJIAN, 2000; DILLON e DILLON, 2004).

Diferentes microrganismos podem estar associados aos artrópodes, tais como bactérias do gênero *Wolbachia*, *Cardinium*, *Buchnera*; os fungos *Amylostereum areolatum*, *Attamyces* spp, *Septobasidium retiforme*; coleópteros da família Scolytidae estão associados com fungos ascomicetos como *Ambrosiella*, *Cephalosporium*, *Endomycopsis*, *Fusarium*, *Ceratocystis*, *Ophiostoma* e alguns basidiomicetos como *Entomocorticium* spp. (VASILIAUSKA, 1999; PARACER e AHMADJIAN, 2000; DILLON e DILLON, 2004; KLEPZIG, 2009).

Em *T. evansi*, a associação com microrganismos pode estar relacionada com a nutrição do ácaro, com o fornecimento de nutrientes complementares a sua dieta. Resultados obtidos por DOUGLAS (2001) mostraram que afídeos sem o micro-simbionte *Buchnera* apresentaram uma alta taxa de mortalidade, devido a ausência de aminoácidos essenciais que lhes seriam fornecidos por bactérias, como a *Buchnera*. Para a *Buchnera* o papel nutricional está relacionado com contribuições que podem assumir várias formas: melhora da capacidade de sobrevivência em dietas sub-ótimas, melhora da eficiência digestiva, fornecimento de enzimas digestivas e vitaminas (PARACER e AHMADJIAN, 2000; DOUGLAS, 1998). No grilo *Acheta domesticus*, as bactérias presentes no intestino aumentaram a eficácia da utilização dos polissacarídeos solúveis das plantas. Em cupins, bactérias fornecem o carbono, nitrogênio e energia para as necessidades nutricionais através acetogenese e fixação do nitrogênio (DILLON e DILLON, 2004). A menor taxa de oviposição verificada para os ácaros com microbiota reduzida pode ser resultante de um desequilíbrio nutricional. A ausência de nutrientes associados com a biossíntese dos endossimbiontes pode ter afetado negativamente a oviposição do *T. evansi* tratado.

Outra possível explicação para a redução da oviposição do *T. evansi* tratado seria que em tomateiro ocorre a produção de uma gama de compostos de defesa, tais como a α -tomatina, ácidos clorogênicos e rutina e seus tricomas glandulares possuem exsudados tóxicos (KOLLER *et al.*, 2007). Os microrganismos do *T. evansi* poderiam estar envolvidos no processo de desintoxicação de compostos de defesa da planta e na ausência desses microrganismos o substrato oferecido (folhas de tomateiro) tornou-se inadequado para o ácaro com efeitos adversos sobre a sua biologia.

Neste trabalho, avaliou-se o efeito da redução da microbiota de *T. evansi* na sua oviposição. Biologicamente, foi observado que populações de *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina a 0,2 % reduziram significativamente a oviposição quando comparadas a populações não tratadas com o antibiótico.

Nos ácaros tratados, o uso do antibiótico promoveu a redução da microbiota. E dentre os microrganismos que podem ter sido afetados negativamente pelo tratamento com antibiótico, têm-se a *Wolbachia*. Há estimativas que sugerem que mais de 65% dos insetos estejam infectados por *Wolbachia* (HILGENBOECKER *et al.*, 2008). Esta bactéria foi identificada infectando ácaros pertencentes a família Tetranychidae, a qual pertence o *T. evansi* (ENIGL e SCHAUSBERGER, 2007). A supressão do desenvolvimento de microrganismos, como a *Wolbachia* e de outros micro-simbiontes que afetam os processos reprodutivos dos artrópodes podem ter promovido alterações na biologia do *T. evansi* tratado.

VALA *et al.* (2004) realizaram estudos sobre o comportamento de acasalamento e oviposição do ácaro rajado *Tetranychus urticae* infectado por *Wolbachia* ou não. Neste caso, a *Wolbachia* promoveu a incompatibilidade citoplasmática. Os resultados mostraram que as fêmeas apresentaram comportamento favorável a acasalamentos compatíveis. Fêmeas infectadas com *Wolbachia* e não infectadas se comportam diferentemente com relação à escolha do local de oviposição, o que sugere que esses indivíduos podem avaliar o estado de infecção de outros ovos presentes na folha, ou da fêmea que anteriormente realizou oviposição. Além disso, fêmeas infectadas não têm preferência pelo tipo de macho enquanto as fêmeas não infectadas preferem machos não infectados. Esse estudo de VALA *et al.* (2004) comprova que os acasalamentos não são realizados ao

acaso, a presença do endossimbionte atuou como o fator determinante na tomada de decisões do ácaro. A presença da *Wolbachia* em *T. evansi* também poderia estar afetando o comportamento de oviposição deste ácaro, o que pode ter resultado em um maior número de ovos/dia/fêmea não tratada em relação às fêmeas tratadas.

Os efeitos da infecção por *Wolbachia* além da indução de incompatibilidade citoplasmática ou reprodutiva, incluem a partenogênese telítica, a conversão de machos genéticos em fêmeas funcionais e a morte dos machos (STOUTHAMER *et al.*, 1999; WEEKS *et al.*, 2001; PERROT-MINNOT *et al.*, 2008; SERBUS *et al.*, 2008; WERREN *et al.*, 2008; KLEPZIG *et al.*, 2009). Além desses efeitos associados a reprodução, a presença da *Wolbachia* e de outros microrganismos podem estar afetando a taxa de oviposição. Neste trabalho, um fato relevante foi a observação da alta taxa de mortalidade e o reduzido crescimento populacional das colônias tratadas em relação às não tratadas.

Trabalho realizado por WEEKS *et al.* (2001) mostrou que a haploidia entre as fêmeas do ácaro *Brevipalpus phoenicis* está relacionada à presença desta bactéria endossimbiótica. Ocorre a feminilização de indivíduos geneticamente machos, assim há a geração de uma prole composta por fêmeas com dois cromossomos e raramente machos. Na ausência do microrganismo, fêmeas partenogênicas poderiam dar origem a machos haplóides. Essa população possui uma alta taxa de crescimento populacional, devido à prole ser sempre composta por fêmeas. Esse incremento populacional acelerado favorece a rápida evolução da resistência com o surgimento de populações resistentes aos acaricidas indicados para o controle deste ácaro, como hexitiazox (regulador de crescimento de ácaros) e propargite (inibidor da fosforilação oxidativa). No estado de São Paulo, levantamentos em cultivos de citros mostram populações de *B. phoenicis* resistentes a diferentes pesticidas, comprometendo a eficácia dos programas de controle para essa praga que atua com vetor de viroses (CAMPOS e OMOTO, 2002; FRANCO, 2002). Além de mecanismos associados a capacidade do ácaro em superar as defesas do tomateiro, o desempenho reprodutivo do *T. evansi* também poderia estar sendo favorecido pela associação com microrganismos.

Pesquisas adicionais sobre a exploração destas relações simbióticas para o manejo de pragas e artrópodes vetores de doenças são necessárias (DILLON e

DILLON, 2004). Os resultados aqui obtidos mostram que a eliminação dos microrganismos afetou negativamente o ácaro *T. evansi*. Os ácaros tratados com tetraciclina apresentaram oviposição média de cerca de 2,8 vezes inferior a dos ácaros não tratados.

O *T. evansi* possivelmente estabelece associação com bactérias como *Wolbachia* e *Cardinium* e a *Spiroplasma*. ENIGL e SCHAUSBERGER (2007) citam esses microrganismos associados ao *Tetranychus urticae* Koch, que é uma espécie de ácaro que pertence à mesma família do *T. evansi*. Esses microrganismos são potenciais fontes de estudos em virtude das consequências que promovem ao processo reprodutivo de seus hospedeiros.

III. CAPÍTULO II

A MICROBIOTA BACTERIANA DO *Tetranychus evansi* BAKER E PRITCHARD (ACARI: TETRANYCHIDAE) PODE AFETAR O A RESPOSTA DE DEFESA INDUZIDA DO TOMATEIRO?

**A MICROBIOTA BACTERIANA DE *Tetranychus evansi* BAKER E PRITCHARD
(ACARI: TETRANYCHIDAE) PODE AFETAR A RESPOSTA DE DEFESA
INDUZIDA DO TOMATEIRO?**

RESUMO – O ácaro *Tetranychus evansi* interfere no sistema de defesa de suas plantas hospedeiras, de forma que essas plantas se tornam nutricionalmente mais adequadas para o desenvolvimento desse ácaro do que as plantas limpas. Com o objetivo de averiguar se os micro-simbiontes associados ao ácaro *T. evansi* estão envolvidos na resposta de defesa induzida do tomateiro, foram realizadas determinações dos níveis de inibidores de proteinase e aldeídos totais em plantas de tomate infestadas. Isso porque inibidores de proteinase e aldeídos são compostos produzidos pela planta, mediante injúria provocada no tecido vegetal, pela ação de um herbívoro ou patógeno. Os tomateiros aos 45 dias de idade foram infestados com o ácaro *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 %, *T. evansi* não tratado e *T. urticae* não tratado, e como controle foram utilizadas plantas não infestadas. Plantas sob os mesmos tratamentos foram utilizadas como substrato para ácaros *T. evansi* tratados e *T. evansi* não tratados com o objetivo de avaliar o número depositado de ovos/dia/fêmea durante quatro dias. A concentração de inibidores de proteinases foi significativamente inferior nas plantas infestadas com ácaros tratados sendo que os demais tratamentos não diferiram entre si. Já os níveis de aldeídos totais foram baixos em todos os tratamentos. As maiores taxas de oviposição foram observadas para o *T. evansi* não tratado, utilizando como substrato folhas de tomateiros pré-infestados com *T. evansi* tratado e não tratados com antibiótico. Para os ácaros não tratados a maior média foi $6,9162 \pm 1,5138$ ovos/dia/fêmea, obtida em folhas de plantas de tomateiros infestados com *T. evansi* não tratado. A taxa de oviposição pode ter sido afetada pela qualidade do substrato. A presença de inibidores de proteinase deve ter provocado desequilíbrio nutricional no ácaro, reduzindo o número de ovos. A taxa de oviposição não diferiu entre os substratos utilizados para os ácaros tratados.

Palavras-chave: Tetranychidae, endossimbionte, *Lycopersicon esculentum* Mill, defesa de plantas.

1. INTRODUÇÃO

A defesa induzida é uma resposta da planta a um dano provocado em seus tecidos (KESSLER e BALDWIN, 2002). Existem três moléculas sinalizadoras envolvidas no mecanismo de resposta das plantas ao ataque de fitófagos e patógenos, o ácido jasmônico (AJ), o ácido salicílico (AS) e o etileno (ET) (WALLING, 2000; HARMAN *et al.*, 2004; ZHAO e QI, 2008).

O ácido jasmônico é uma importante molécula biossintetizada através da via das lipoxigenases. A sua síntese é aumentada após o ataque de herbívoros, patógenos ou algum tipo de ferimento ao tecido da planta (HOWE e JANDER, 2008). Em tomateiro, as moléculas sinalizadoras são a sistemina e o ácido jasmônico responsáveis pela ativação gênica (AMENT *et al.*, 2004).

A via das lipoxigenases envolve a ação das enzimas hidropéroxido liase e hidropéroxido ciclase. A ação da primeira culmina na produção de aldeídos e a segunda catalisa ácidos graxos cíclicos derivados do ácido 13-hidropéroxido linolênico que são precursores da síntese do ácido jasmônico. O metil éster do ácido jasmônico é um indutor para ativação gênica e conseqüente expressão de inibidores de proteinases (IPs), (FAMER e RYAN, 1990, 1992; CROFT *et al.*, 1993)

Durante a sondagem do local de alimentação os estiletes dos artrópodes provocam danos mecânicos no tecido vegetal. Na penetração, os estiletes danificam as células ao longo do caminho e a punção das células e consumo de líquidos também pode ser percebida. Danos físicos promovem a liberação de compostos elicitores, e em tomate, por exemplo, ocorre a indução da síntese de inibidores de proteinases (RHODES *et al.*, 1999; WALLING, 2000).

Para se alimentarem, os ácaros da família Tetranychidae apresentam no gnatossoma dígitos móveis em forma de estilete. Os estiletes são utilizados para penetrar e injetar o produto das suas glândulas salivares na planta hospedeira; posteriormente há a retração dos estiletes e os fluidos celulares são extravasados e sugados pelo fitófago (MORAES e FLECHTMANN, 2008). Os compostos indutores de uma resposta específica podem ser sintetizados diretamente pelo artrópode, ou podem ser um produto endossimbiótico de bactérias (WALLING, 2000).

Os microrganismos além de afetarem a reprodução dos artrópodes também podem estar associados à adaptação de alguns fitófagos aos seus hospedeiros, contribuindo para que o artrópode supere as defesas do seu hospedeiro. Existem micro-simbiontes que atuam debilitando o sistema de defesa da planta em prol do seu macro-simbionte, e existem aqueles que podem estar envolvidos na produção de compostos indutores de defesa na planta (KLEPZIG *et al.*, 2009).

Estudos envolvendo a resposta de defesa induzida do tomateiro ao ataque dos ácaros *T. urticae* e *T. evansi* vêm sendo realizados (AMENT *et al.*, 2004 e KANT *et al.*, 2004 e SARMENTO, 2007). KANT *et al.* (2004) comprovaram que o *T. urticae* induz a produção de compostos de defesa, já que tomateiros danificados por esse ácaro possuem concentrações de inibidores de proteinase superiores às plantas não danificadas.

Em trabalho realizado por SARMENTO (2007), nos tomateiros danificados por *T. evansi* verificou-se uma menor concentração de inibidores de proteinase do que nas plantas não danificadas. Acredita-se então que o *T. evansi* interfere no sistema de defesa de suas plantas hospedeiras, tornando o tomateiro uma fonte adequada para o desenvolvimento desse ácaro (SARMENTO, 2007). Baseado nessa relevância, o presente trabalho avaliou se endossimbiontes associados ao *T. evansi* estão envolvidos na capacidade que esse ácaro possui em superar as defesas do tomateiro.

Para tal propósito realizou-se o estudo da resposta de defesa da planta comparando os níveis de inibidores de proteinase e os níveis de aldeídos totais em tomateiros atacados com *T. evansi* tratados com tetraciclina, *T. evansi* não tratado, *T. urticae* e tomateiros não infestados. Adicionalmente, parâmetros biológicos do ácaro *T. evansi* tratados com tetraciclina e não tratados foram avaliados quanto a sua capacidade de oviposição utilizando plantas de tomateiro sob diferentes tratamentos (plantas atacadas com *T. evansi* tratados com tetraciclina, *T. evansi* não tratado, *T. urticae* e plantas não infestadas).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção das plantas de tomate

Foram utilizados tomateiros da variedade Santa Clara I-5300. As sementes foram plantadas em substrato comercial, composto por vermiculita e adubo orgânico, em bandejas de isopor (8 x 16 células). Após 23 dias da semeadura, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos (1,5 L), contendo mistura de solo, esterco bovino curtido (3:1 v/v). Nos experimentos, foram utilizadas plantas com 45 dias de idade e com quatro folhas completamente desenvolvidas.

Desde o plantio das sementes até a realização dos ensaios, as plantas permaneceram no interior de gaiolas construídas através de encaixes de canos de PVC $\frac{3}{4}$ revestidas com organza em casa de vegetação, evitando com isso o ataque de fitófagos. Após realização dos ensaios, as plantas foram imediatamente descartadas.

2.2. Criação de *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*

Colônias de manutenção foram montadas para a realização dos ensaios. Os ácaros utilizados foram inicialmente coletados em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa, onde são criados massalmente. Folhas de tomateiro com sintomas do ataque do *T. evansi* e folhas de feijão com sintomas de ataque de *T. urticae* foram coletadas em casa de vegetação do Departamento de Biologia Animal/Entomologia e transportadas ao Laboratório de Acarologia em sacos de papel acondicionados em caixa de isopor. As folhas foram observadas com o auxílio de microscópio estereoscópico para a retirada dos ácaros adultos. Estes ácaros foram re-aloçados em uma arena tendo como substrato folha de tomateiro da variedade Santa Clara I-5300, mantidas a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, U.R. $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h.

2.3. Tratamento com antibiótico

Foi preparada uma solução de hidróclorido de tetraciclina 0,2 % estéril e mantida a -20°C . Posteriormente, folhas de plantas sadias de tomateiro foram coletadas, e discos de 2,5 cm de diâmetro foram cortados com o auxílio de um vazador. Os discos foram mantidos submersos na solução de hidróclorido de

tetraciclina 0,2 % por cerca de duas horas. Em seguida, os discos foram acondicionados em placas de Petri, contendo algodão hidrofílico autoclavado e foi adicionada solução de hidróclorido de tetraciclina 0,2 % para embeber o algodão. Para cada disco de folha foram transferidos cerca de 30 ácaros *T. evansi* adultos. As placas de Petri foram mantidas em câmara incubadora BOD, com fotofase de 12 h e temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Os ácaros permaneceram nestes discos por 72 h até a sua utilização na montagem dos ensaios (metodologia obtida a partir de testes pilotos realizados no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídios do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária- BIOAGRO - UFV e no Laboratório de Acarologia - UFV) .

2.4. Experimentação

Os experimentos para verificar a resposta de defesa da planta foram constituídos dos seguintes tratamentos: i) plantas não infestadas (Pn I), ii) plantas danificadas por *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina (*T. evansi* + Tet); iii) plantas danificadas por *T. evansi* não tratados e iv) plantas danificadas por *T. urticae*. Para os tratamentos nos quais as plantas foram danificadas, os tomateiros foram infestados com 25 ácaros adultos/planta (Fig. 8). As plantas permaneceram dentro de gaiolas de estrutura de canos de PVC revestidas com organza (3,5 x 1,0 x 0,7 m), em casa de vegetação (Fig. 9). Em seguida foram coletadas amostras (segunda folha da planta), de acordo com cada tratamento. As coletas foram realizadas após quatro dias de infestação. As folhas do tomateiro são alternadas, compostas de número ímpar de folíolos, sendo que cada repetição foi composta por folíolos de três plantas para compor o extrato vegetal utilizado para as análises bioquímicas.

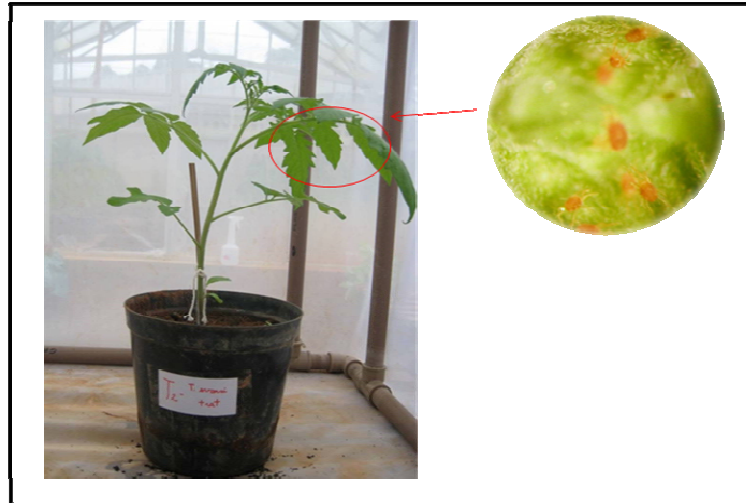


Figura 8. Detalhe do tomateiro infestado com ácaro *T. evansi*.



Figura 9. Experimento em casa de vegetação. Tomateiros infestados com ácaros para avaliação da resposta de defesa.

2.5. Análises Bioquímicas

Obtenção do extrato foliar

Os extratos foliares dos tomateiros foram obtidos a partir da folha coletada (segunda folha desenvolvida). As folhas foram coletadas após quatro dias de infestação, sendo imediatamente acondicionadas em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e transportadas ao laboratório. As amostras foram mantidas numa temperatura de -80°C até o momento do processamento das mesmas para a obtenção do extrato bruto.

No Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos as amostras foram processadas, o preparo do extrato bruto foi realizado a 4°C, de acordo com o método descrito por OHTA *et al.* (1986). O material vegetal foi pesado em balança analítica e imediatamente macerado com o auxílio de pistilo e cadinho, em nitrogênio líquido. Ao pó obtido foi adicionado o tampão 0,1M Tris-HCl, pH 8,2 e 20 mM CaCl₂; 1:3 (p/v), homogeneizado e em seguida transferido para um microtubo e mantido em gelo. Posteriormente, o material foi centrifugado a 17.200 g por 30 minutos a 4°C (adaptado de BATISTA *et al.*, 2002). O sobrenadante foi coletado e mantido a -20 °C para posterior determinação da concentração de proteína total e de inibidores de proteinases.

Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteína do extrato foliar foi obtida pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando como padrão uma solução de soro albumina bovina (BSA), 0,2 mg/mL. Primeiramente o extrato foi diluído (100 µL do extrato em 900 µL de água destilada), depois retirou-se 100 µL deste extrato diluído e acrescentou-se em um microtubo contendo 700 µL de água destilada e 200 µL do reagente de Bradford. Para o branco foram utilizados 800 µL de água destilada, e 200 µL do reagente de Bradford. A mistura foi homogeneizada por agitação e incubada por quinze minutos a temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi realizada em $\lambda = 595$ nm em um espectrofotômetro (Beckman, DU 530 UV/Vis Spectrophotometer, U.S.A) (Fig. 12). As amostras foram analisadas em triplicadas.

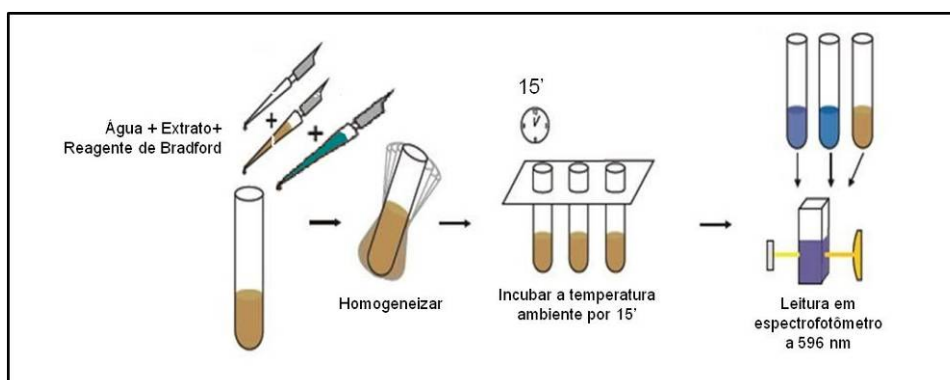


Figura 10. Esquema do método de Bradford.

Determinação dos inibidores de proteinases

A presença de inibidores no extrato foliar foi determinada utilizando tripsina purificada Sigma®. Foi realizada a determinação da atividade da tripsina conforme o seguinte procedimento analítico: para a análise do teste foram adicionados em um microtubo 100 µL do extrato foliar; 500 µL do tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio; e 50 µL da solução de 1,25g de tripsina/ 1mL de água Mili-Q. Para o controle da enzima foram adicionados, em outro microtubo, 600 µL do tampão Tris-HCl 0,1M; pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50 µL da solução de 1,25g de tripsina/ 1mL de água Mili-Q. Para o branco foram utilizados 1000 µL do tampão Tris-HCl 0,1M; pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM.

A mistura contida em ambos os microtubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, 500 µL da mistura de incubação, do teste e do respectivo controle, foram retiradas e adicionadas a um novo eppendorf contendo 500 µL Tris-HCl 0,1M; pH 8,2 e contendo 20 mM de cloreto de cálcio; e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorvância da solução foi determinada a 410 nm a cada 30 segundos até 2,5 minutos de reação. Para a leitura da absorvância foi utilizado o espectrofotômetro, modelo DU 65, Beckman.

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

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 100 \times P}$$

Em que:

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, em g/mL, de proteína dos extratos; e

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)

2.5.2. Determinação de Aldeídos Totais

A via das lipoxigenases pode culminar na produção de inibidores de proteinases ou na produção de aldeídos, então foi realizada a determinação de aldeídos totais. Para a determinação de aldeídos totais, nos extratos foliares de tomateiro, foi utilizado o método colorimétrico desenvolvido por SANTOS *et al.* (1993), com o uso de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) como reagente de cor.

As folhas de tomateiro foram liofilizadas por 36 h, posteriormente 50 mg de material vegetal foram moídos e adicionados em 4 mL de etanol 2 %. Após ser mantida por duas horas à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 31.000 g por 15 minutos, a 15^oC. Para a reação do teste, tomou-se 250 μ L do sobrenadante, ao qual foi adicionado 250 μ L de solução MBTH 0,1 % e 650 μ L de FeCl₃ 0,23%. Após 6 minutos foram acrescentados 1500 μ L de acetona. Para a reação controle, utilizou-se 250 μ L do sobrenadante ao qual foi adicionado 3 mL de acetona, impedindo que a reação ocorresse, em seguida 250 μ L de MBTH 0,1% e 650 μ L de FeCl₃ 0,23%.

As leituras de absorvância foram realizadas no λ = 635 nm sendo os resultados expressos como a diferença da absorvância observada no final da reação e na reação controle. As análises foram realizadas em triplicatas.

2.5.3. Análise Estatística

Os procedimentos estatísticos foram realizados através do software estatístico SAS® (SAS, 2003). Com a finalidade de testar se existe diferença significativa entre

as médias dos tratamentos foi feito o teste F a 5% de significância. O teste de Tukey foi aplicado a 5% de significância para comparação de médias dos tratamentos.

2.6. Avaliação Biológica

Neste ensaio foram utilizados dois tipos de ácaros: *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 %, e *T. evansi* não tratado. Para os ácaros tratados com hidróclorido de tetraciclina, o procedimento foi realizado na fase de ninfa. Foi utilizado como substrato folhas oriundas de tomateiros sob diferentes tratamentos: i) não infestado (Pn I); ii) pré-infestados com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina a 0,2 % (*T. evansi* + Tet); iii) pré-infestados com o *T. evansi* e iv) pré-infestado com *T. urticae*. As folhas de tomateiro foram coletadas para o ensaio após quatro dias de infestação.

Fêmeas adultas de *T. evansi* de uma mesma idade foram individualizadas em discos de folhas de tomateiros com 3 cm de diâmetro. Para a confecção das arenas, foi utilizada como substrato a folha de tomateiro sob os diferentes tratamentos. As folhas foram mantidas sobre algodão hidrófilo, umedecido com água destilada e para o manuseio do ácaro foi utilizado um pincel de cerdas macias e o auxílio do microscópio estereoscópico.

Para obtenção de fêmeas da mesma idade, cerca de 200 fêmeas de *T. evansi* provenientes da criação de manutenção foram depositadas sobre folhas de tomateiro. As folhas foram mantidas com a parte superior (adaxial) em contato com algodão hidrófilo umedecido com água destilada no interior de placas de Petri (14 cm de diâmetro x 2 cm de profundidade). Após 24 h as fêmeas foram removidas. Foram realizadas observações a cada 48 h, verificando a mudança de fase. Após emergência dos adultos, as fêmeas foram retiradas para a realização dos ensaios.

O parâmetro avaliado foi oviposição por um período de 96 h. Os ensaios foram conduzidos a 25 °C, 70± 5 % de umidade relativa e 12 h de fotofase.

2.6.1. Análise Estatística

Foi utilizado um delineamento fatorial, sendo utilizado como substrato, plantas sobre diferentes tratamentos: i) não infestada (Pn I); ii) pré-infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina a 0,2 % (*T. evansi* + Tet); iii) pré-infestadas

com o *T. evansi* e iv) pré-infestada com *T. urticae*, e de dois tipos de ácaros: i) *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 %; ii) *T. evansi* não tratado.

Os procedimentos estatísticos foram realizados através do software estatístico SAS® (SAS, 2003), e realizada a análise de variância para verificar se há efeitos significativos da interação entre os diferentes substratos e os ácaros.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação de Inibidores de Proteinases

As concentrações de inibidores de proteinase (IPs) nos extratos foliares de tomateiro foram quantificadas através da inibição de tripsina (serino-proteinase). Na figura 18 são apresentados os resultados de inibidores de proteinases expressos em miligrama de tripsina inibida por grama de proteína para plantas de tomate não infestadas e infestadas por diferentes ácaros. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre as plantas não infestadas e aquelas infestadas com os ácaros *T. evansi* e *T. urticae*, os valores médios obtidos foram $45,65 \pm 10,19$, $42,75 \pm 10,04$ e $46,82 \pm 5,11$, respectivamente. Nas plantas infestadas com o *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina, a quantidade de tripsina inibida por g de proteína foi significativa, sendo 2,07 vezes inferior em relação às médias dos demais tratamentos.

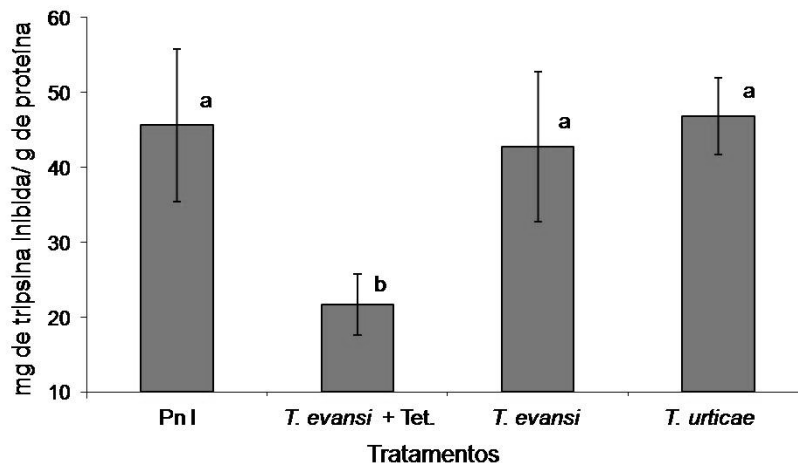


Figura 11. Quantidade média (\pm E.P.) de tripsina inibida (mg)/proteína(g) presente no extrato foliar de plantas de tomate não infestada (Pn I) e tomateiros infestados por quatro dias com o *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0, 2% (*T. evansi* + Tet), com o *T. evansi* e com *T. urticae*, não tratados. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $P \leq 0,05$).

3.2. Determinação de Aldeídos Totais

Na figura 19 são apresentados os resultados da determinação dos níveis de aldeídos totais em extratos foliares de tomateiros não infestados e infestados por diferentes ácaros. As plantas infestadas com os ácaros *T. evansi* e *T. urticae* não apresentaram diferença significativa entre si. Os tratamentos com as plantas não infestadas e infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina apresentaram níveis de aldeídos com as médias $0,443 \pm 0,032$ e $0,394 \pm 0,094$. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

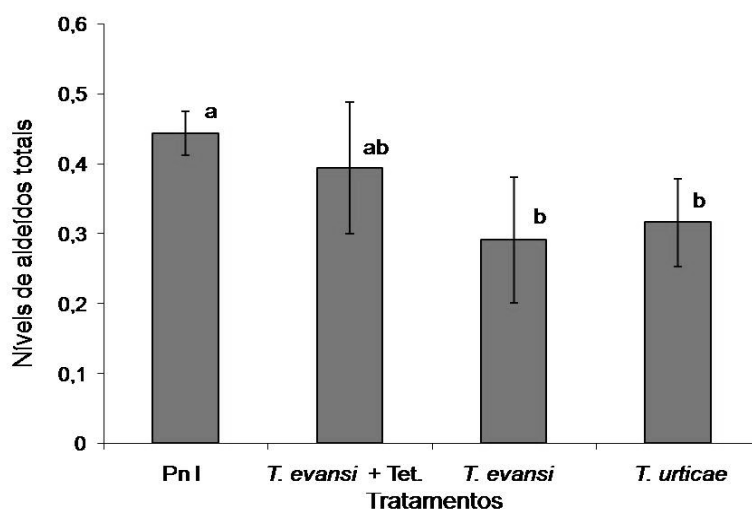


Figura 12. Quantidade média (\pm E.P.) de aldeídos totais presente no extrato foliar de plantas de tomate não infestada (Pn I) e tomateiros infestados por quatro dias com o *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % (*T. evansi* + Tet), com o *T. evansi* e com *T. urticae*, não tratados. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey, $P < 0,05$).

3.3. Avaliação Biológica

Através do quadro de análise de variância para os quatro tipos de substratos e dois tipos de ácaros, representada na tabela 2, podemos observar que houve efeito significativo $P < 0,05$ da interação entre os tratamentos.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) do número médio de ovos de *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % e *T. evansi* não tratado utilizando quatro tipos de substrato: i) plantas de tomate não infestadas, ii) plantas de tomate infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 %, iii) tomateiros infestados com *T. evansi* e, iv) tomateiros infestados com *T. urticae*.

Fatores de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Substrato	3	15, 758500	5, 252833	1, 871	0, 1481
Ácaro	1	169, 989748	169, 989748	60, 534	0,0000
Substrato x Ácaro	3	31, 577986	10, 525995	3, 748	0, 0174
Resíduo	45	126, 368294	2, 808184		
Total	52	343, 694528			

De acordo com os resultados obtidos na tabela 2, foi realizado o desdobramento dos efeitos da interação (Tabela 3). Nesta tabela são apresentados os valores médios de oviposição dos ácaros *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2% e *T. evansi* não tratado, sobre diferentes substratos. Primeiramente realizou-se a análise do desdobramento de substrato dentro de cada nível de ácaro.

Tabela 3. Médias da oviposição (\pm EP) no período de quatro dias para o *T. evansi* tratados com hidróclorido de tetraciclina 0,2% e *T. evansi* não tratado utilizando quatro tipos de substrato: i) plantas de tomate não infestadas, ii) plantas de tomate infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2%, iii) tomateiros infestados com *T. evansi* e, iv) tomateiros infestados com *T. urticae*.

Substrato	Ácaro <i>T. evansi</i> tratado com tetraciclina	Ácaro <i>T. evansi</i> não tratado
Planta não infestada	1,0833 \pm 0,3819 a A	4,1875 \pm 1,7048 a B
Planta pré- infestada com <i>T. evansi</i> tratado com tetraciclina	2,5114 \pm 1,3259 a A	6,3437 \pm 1,3722 ab B
Planta pré- infestada com <i>T. evansi</i>	3,1383 \pm 2,1811 a A	6,9162 \pm 1,5138 b B
Planta pré- infestada com <i>T. urticae</i>	1,3333 \pm 0,5627 a A	5, 7500 \pm 2,4746 a B

Na coluna, estudo dos efeitos dos substratos dentro de cada tipo de ácaro, as médias e desvio padrão seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Nas linhas, estudo dos efeitos de cada tipo de ácaro dentro dos substratos, as médias e desvio padrão seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para o *T. evansi* tratado com tetraciclina não houve diferença significativa entre os substratos, já para *T. evansi* não tratado é possível verificar que houve diferenças significativas.

Para *T. evansi* não tratado, a oviposição foi maior ao utilizar como substrato folhas de tomateiro de plantas pré-infestadas com *T. evansi* não tratado e folhas de tomateiro de plantas pré-infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina 0,2 % com $6,9162 \pm 1,5138$ e $6,3437 \pm 1,3722$, respectivamente, em relação aos demais tratamentos.

4. DISCUSSÃO

Os dados mostraram que a quantidade de tripsina inibida nos extratos foliares das plantas infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina foi inferior à observada nos demais tratamentos diferindo significativamente. O incremento na produção de inibidores de enzimas digestivas, tais como inibidores de α -amilase e proteinase é uma resposta de defesa induzida a injúria provocada ao tecido vegetal. Como inibidores de proteinases (IPs) há, por exemplo, os inibidores de tripsina, quimotripsina (ARIMURA *et al.*, 2005; SCHALLER, 2008, RAMOS *et al.*, 2009). Sabe-se que plantas de tomate infestadas com o *T. urticae* respondem ao ataque do ácaro induzindo a produção de IPs, segundo trabalho realizado por KANT *et al.* (2004). Nesse trabalho foram utilizadas plantas de tomate cv Castlemart infestadas com 15 ácaros *T. urticae* por um e quatro dias, nas quais verificou-se um aumento na produção do inibidor de proteinase cerca de duas vezes nas plantas infestadas em relação ao controle, tanto com um dia como quatro dias de infestação.

Nos resultados obtidos no presente trabalho, as plantas não infestadas apresentaram níveis de inibidores de proteinases próximos aos das plantas infestadas com *T. evansi* e *T. urticae* diferindo dos resultados obtidos por AMENT *et al.* (2004) em plantas de tomate cv Castlemart infestadas com *T. urticae*. A percentagem da atividade de inibidores de quimotripsina em plantas com um dia e quatro dias de infestação foi superior nas plantas infestadas em relação às plantas controle. Assim foram utilizadas plantas infestadas com *T. urticae* como controle positivo, no qual deveria haver uma elevada produção de IPs. Entretanto nossos resultados mostram níveis de IPs semelhantes para as plantas não-infestadas e as plantas infestadas com *T. urticae*. Portanto, organismos contaminantes devem ter atuado como elicitores promovendo a produção de IPs nas plantas não-infestadas.

O ensaio pode ter sido comprometido pela presença de contaminantes como o oídio, que tem como agente etiológico o fungo *Oidium lycopersicum*. O oídio é um organismo elicitor que promove uma cascata de reações e através da via das lipoxigenases tem-se o ácido jasmônico, que é metilado. O metil-jasmonato é a molécula responsável pela ativação gênica resultando na produção de IPs (FAMER e RYAN, 1990, 1992; CROFT *et al.*, 1993; HARMAN *et al.*, 2004).

Isso explicaria o elevado nível de IPs nas plantas não infestadas. Apesar das plantas permanecerem no interior de gaiolas de organza em casa de vegetação, não houve a utilização de qualquer tipo de pesticida ou método químico para proteção desses tomateiros. O experimento foi implantado nos meses de setembro e outubro, quando o ar é frio e úmido, sendo o estabelecimento de *O. lycopersicum* favorecido por temperaturas amenas e a umidade relativa do ar moderada (JACOB *et al.*, 2008). Até o momento da infestação das plantas não foram observados sintomas da presença do oídio, entretanto em condições adequadas, a partir do momento em que os esporos desse fungo atingem a superfície da folha, os sintomas podem aparecer em sete dias (CERKAUSKAS, 2005). Nos experimentos realizados, as folhas foram coletadas após quatro dias de infestação.

As plantas infestadas com *T. evansi* apresentaram um alto nível de IPs semelhante às plantas infestadas com *T. urticae*. Além disso, plantas danificadas por *T. urticae* apresentaram concentrações de inibidores de proteinase semelhantes às observadas em plantas não infestadas (limpas), o que difere dos resultados observados por KANT *et al.* (2004) e SARMENTO (2007). É provável que os níveis de IPs encontrados não sejam resultado somente da presença do ácaro, mas da ação do fungo *O. lycopersicum*. Diferentemente do trabalho realizado por SARMENTO (2007) com *T. evansi* e *T. urticae* em tomateiro infestado por sete dias foram encontrados níveis da atividade de inibidores de tripsina maiores nas plantas infestadas com *T. urticae* e baixos níveis para as plantas infestadas com *T. evansi* quando comparadas com as plantas não infestadas. Os resultados obtidos por SARMENTO (2007) sugerem que o ácaro *T. evansi* interfere no sistema de defesa de suas plantas hospedeiras, de forma que essas plantas se tornam nutricionalmente mais adequadas para o desenvolvimento desse ácaro que as plantas não infestadas.

A indução da resposta de defesa da planta requer a presença de uma substância elicitora no artrópode ou no microrganismo agressor (WALLING, 2000; HARMAN *et al.*, 2004; ARIMURA *et al.*, 2005). Os baixos níveis de IPs encontrados nas plantas infestadas com ácaros tratados com antibiótico podem estar relacionados à ausência ou o não reconhecimento de uma substância elicitora pelo sistema de defesa da planta. Com isso, uma hipótese seria que a substância

elicitora que desencadeia a reposta de defesa do tomateiro ao ataque deste ácaro seja um produto resultante da biossíntese de algum microrganismo associado a esse artrópode. Segundo WALLING (2000) a substância elicitora pode ser sintetizada diretamente pelo artrópode, ou este pode ser um produto endossimbiótico.

Como a concentração de IPs nas plantas infestadas com ácaros tratados com antibiótico foi baixo, uma suposição seria que a planta estaria investindo seus recursos para a produção de aldeídos, já que a via das lipoxigenases pode culminar na produção de inibidores de proteinases ou na produção de aldeídos (GARDNER, 1991 e CROFT *et al.*, 1993). Contudo os níveis de aldeídos totais, em resposta a injúria provocada pelo ácaro foram baixos, o que indica que a via das lipoxigenases, nesse caso não segue a via de produção de aldeídos proposta por GARDNER, 1991; FARMER e RYAN, 1992 e CROFT *et al.*, 1993. Com base nesses resultados, acredita-se que os ácaros tratados com tetraciclina, cuja microbiota está reduzida, podem estar afetando negativamente a resposta de defesa do tomateiro.

A taxa de oviposição do ácaro *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina (*T. evansi* + Tet) não apresentou diferenças significativas entre os diferentes substratos (planta não infestada, planta pré-infestada com *T. evansi* não tratado e planta pré-infestada com *T. urticae*). Apesar da oviposição ser negativamente afetada quando os ácaros são tratados com hidróclorido de tetraciclina, quando em plantas pré-infestadas por *T. evansi*, esses ácaros tiveram uma tendência de aumento da oviposição, semelhante aos resultados obtidos por SARMENTO (2007). Isso pode indicar que as plantas pré-infestadas com *T. evansi* devam ser mais adequadas, provavelmente devido a presença de uma menor concentração de IPs.

Para o *T. evansi* não tratado, o número de ovos foi significativamente superior utilizando como substrato as plantas pré-infestadas com *T. evansi* tratado com hidróclorido de tetraciclina, em comparação aos demais substratos utilizados. As plantas pré-infestadas com *T. evansi* + Tet destacaram-se entre os tratamentos como sendo o substrato mais adequado para esse ácaro, possivelmente devido a baixa concentração de IPs encontrada em plantas infestadas com *T. evansi* + Tet.

Os IPs produzidos pelas plantas atuam na inibição da atividade enzimática e que compromete a atividade proteolítica com a redução da disponibilidade dos aminoácidos promovendo um desequilíbrio nutricional no herbívoro. A limitação da disponibilidade dos aminoácidos atua negativamente sobre herbívoro afetando o seu desenvolvimento e a reprodução (BIRK, 2003; MOSOLOV e VALUEVA, 2005; RAMOS *et al.*, 2009). As menores taxas de oviposição para os substratos compostos de folhas de plantas não infestadas, e plantas pré-infestadas com *T. evansi* não tratado e plantas pré-infestadas com *T. urticae* podem ser devido ao desequilíbrio nutricional do ácaro pela ação dos IPs. SARMENTO (2007) também observou uma maior oviposição do ácaro *T. evansi*, com um maior número de ovos nos tratamentos cujas plantas apresentaram menor concentração de IPs.

Neste trabalho, a melhores taxas de oviposição ocorreram em plantas que apresentam baixas concentrações de IPs, para o *T. evansi* + Tet em plantas pré-infestadas com *T. evansi* e para o ácaro *T. evansi* não tratado, plantas pré-infestadas com *T. evansi* + Tet. A escolha do local de oviposição é importante, pois isso maximiza o desempenho da progênie. A taxa de oviposição das fêmeas pode estar associada ao reconhecimento deste substrato como inadequado para a sua prole. Na seleção da planta hospedeira ocorre o reconhecimento de compostos químicos, odores na superfície da folha, propriedades físicas, distinguindo a qualidade do alimento como adequado ou não para seus descendentes e para a própria progenitora (CHAPMAN, 2003; BERNAYS e CHAPMAN, 2004).

Esses estudos dão indícios que a presença de microrganismos associados ao ácaro *T. evansi* podem afetar o mecanismo de defesa da planta. Adicionalmente, novos estudos devem ser realizados avaliando outros parâmetros biológicos, como a fecundidade, duração das diferentes fases de desenvolvimento do ácaro e mortalidade utilizando como substratos plantas com altas concentrações de IPs e com baixas concentrações de IPs.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos e nos resultados obtidos, conclui-se que o ácaro *Tetranychus evansi* está associado a microrganismos. Essa associação simbiótica promove vantagens para esse artrópode, visto que os ácaros com a microbiota reduzida apresentaram uma menor taxa de oviposição em relação aos ácaros não tratados.

Tomateiros infestados com os ácaros com a microbiota reduzida apresentaram uma baixa concentração de inibidores de proteinase, indicando sobre a provável interação que ocorre entre *T. evansi* e microrganismos.

Os resultados da avaliação da taxa de oviposição do *T. evansi* tratados e dos ácaros não tratados indicam que a qualidade do substrato utilizado interfere no número de ovos. Trabalhos envolvendo plantas com qualidades nutricionais distintas devem ser realizados. Essas plantas devem ser utilizadas como substrato para os ácaros, com a avaliação de outros parâmetros biológicos no intuito de estudar o efeito da planta hospedeira no desenvolvimento desse ácaro com microbiota reduzida (tratados) e não tratados.

O conhecimento sobre os efeitos dessa interação microrganismos - *T. evansi* poderiam ser utilizados para aperfeiçoar o controle biológico desse ácaro. Os simbiontes poderiam ser manipulados, a fim de influenciar negativamente o desempenho dessa praga.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal A A, Lajeunesse M J, Fishbein M (2008) Evolution of latex and its constituent defensive chemistry in milkweeds (*Asclepias*): a phylogenetic test of plant defense escalation. *Entomol Exp Appl* 128: 126–138.
- Alvarado A. D. G. (2007) Busca de *Tetranychus evansi* e seus inimigos naturais no Peru e no norte da Argentina. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 186p.
- Ament K, Kant M R, Sabelis M W, Haring M A, Schuurink R C (2004) Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiol* 135: 2025–2037.
- Arimura G, Kost C, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochem Biophys Acta* 1734: 91-111.
- Batista R B, Oliveira M G A, Pires C V, Piovesan N D, Rezende S T, Moreira M A (2002) Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesqu Agropecu Bras* 37: 1517-1524.
- Begon M, Harper J L, Townsend C R (2007) *Ecology: from individuals to ecosystems*. 4 ed. Blackwell, Oxford.
- Bernays E A, Chapman R F (1994) *Host selection by phythoghagous insects*. New York, Chapman e Hall, 312p.
- Birk Y (2003) *Plant proteases: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering*. Yehudith Birk, Berlin, New York, Springer, 170p.
- Bode W, Huber R (1992) Natural protein proteinase-inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 204: 433-451.
- Bolland H R, Gutierrez J, Flechtmann C H W (1998) *World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae)*. Boston, Köln, Brill, 392p.
- Bolland H R, Vala F (2000) First record of the spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) from Portugal. *Entomol Berichten* 60-180.
- Bonato O (1999) The effect of temperature on life history parameters of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol* 23: 11-19.
- Bonavides K B, Pelegrini P B, Laumann R A, Grossi-de-Sá M F, Bloch Jr C, Melo J A T, Quirino B F, Noronha E F, Franco O L (2007) Molecular identification of four different α -amylase Inhibitors from Baru (*Dipteryx alata*) seeds with activity toward insect enzymes. *J Biochem Mol Biol* 40: 494-500.
- Bordenstein S R, Paraskevopoulos C, Hotopp J C D, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, Tettelin H, Werren J H, Bourtzis K (2009) Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Mol Biol Evol* 26: 231-241.

- Bradford M M (1976) Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Breeuwer J A J (1997) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity* 79: 41-47.
- Campos F J, Omoto C (2002) Resistance to hexythiazox in *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) from Brazilian citrus. *Exp Appl Acarol* 26: 243-251.
- Carlini C R, Grossi-de-as M F (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties: a review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 20: 1515–1539.
- Cerkauskas R F (2005). Tomato diseases: powdery mildew. Asian Vegetable Research and Development Center Report, AVRDC Publication 05-636.
- Chapman R F (2003) Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annu Rev Entomol* 48: 455-484.
- Chigira A, Miura K (2005) Detection of *Candidatus Cardinium* bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari: Tenuipalpidae) and effect on the host. *Exp Appl Acarol* 37: 107–116.
- Chougule N P, Doyle E, Fitchesand E, Gatehouse J (2008) Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *J Insect Physiol* 54: 563-572.
- Croft K P C, Jüttner F, Slusarenko A J (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* 101:13-24.
- Dillon R J, Dillon V M (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 49:71–92.
- Douglas A E (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu Rev Entomol* 43:17–37.
- Douglas A E, Minto L B, Wilkinson T L (2001) Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. *Exp Biol* 204: 349–358.
- Douglas A E (2006) Phloem sap feeding by animals: problems and solutions. *J Exp Bot* 57: 747–754.
- Douglas A E (2009) The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* 23: 38–47.
- Enigl M, Schausberger P (2007) Incidence of the endosymbionts *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* in phytoseiid mites and associated prey. *Exp Appl Acarol* 42:75–85.

- El Jaouani N (1988) Contribution a la connaissance des acariens phytophages au maroc et etude bio-ecologique de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae). Raba, Memoire Diplome d'Ingenieur en Agronomie, Inst Agron et Veterin Hassan II.
- EPPO (2004) Introduction of *Tetranychus evansi* in some mediterranean countries: Addition to the EPPO Alert List. EPPO Reporting Service, 5.
- Farmer E E, Ryan C A (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves .U S A, Proc Natl Acad Sci 87:7713–7716.
- Farmer E E, Ryan C A (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound- inducible proteinase-inhibitors. Plant cell 4: 129-134.
- Ferragut F, Escudero A (1999) *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari, Tetranychidae), una nueva araña roja en los cultivos hortícolas españoles. Bol San Veg Plagas 25:157-164.
- Fiaboe K K M, Gondim Jr M G C, Moraes G J D, Ogot C K P O, Knapp M (2007) Surveys for natural enemies of the tomato red spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in northeastern and southeastern Brazil. Zootaxa 1395: 33-58.
- Furtado I P (2006) Sélection d'ennemis naturels pour la lutte biologique contre *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae). Afrique Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 186p.
- Franco C R (2002) Detecção e caracterização da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida propargite. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 64p.
- Furtado I P, Moraes G J, Kreiter S, Knapp M (2006) Search for effective natural enemies of *Tetranychus evansi* in south and southeast Brazil. Exp App Acarol 40: 157–174.
- Furtado I P, Moraes G J, Kreiter S, Tixier M S, Knapp M (2007) Potential of a brazilian population of the predatory mite *Phytoseiulus longipes* as a biological control agent of *Tetranychus evansi* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). Biol Control 42: 139-147.
- Gardner H W (1991) Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. Biochem Phys Acta 1084: 221-239.
- Gotoh T, Noda H, Ito S (2007) *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. Heredity 98:13–20.
- Harman G E, Howell C R, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) Trichoderma species — Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2: 43-56.

- Harris H L, Braig H R (2003) Sperm chromatin remodeling and *Wolbachia*:induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Biochem Cell Biol* 81: 229–40.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren J H (2008) How many species are infected with *Wolbachia*: a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol* 281: 215–20.
- Hoerauf A, Pähle K N, Schmetz C, Dührsen K H, Blaxter M L, Büttner D W, Gallin M Y, Al-Qaoud K M, Lucius R, Fleischer B (1999) Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Investig* 103: 11-18.
- Hofstetter R W, Mahfouz J B, Klepzig K D, Ayres M P (2005) Effects of tree phytochemistry on the interactions among endophloedic fungi associated with the southern pine beetle. *J Chem Ecol* 31: 539-559.
- Howe G A, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 59: 41–66.
- Jacob D., Rav-David D, Sztjenberg A, Elad Y (2008) Conditions for development of powdery mildew of tomato caused by *Oidium neolycopersici*. *Phytopathol* 98: 270–281.
- Jongsma M A, Bolter C (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J Insect Physiol* 43: 885-895.
- Kakade M L, Rackis J J, Mcghee J E, Puski G (1974) Determination of trypsin-inhibitor activity of soy products - collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem* 51 (3): 376-382.
- Kant M R, Ament K, Sabelis M W, Haring M A, Schuurink R C (2004) Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol* 135: 483-495.
- Kessler A, Baldwin I T (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 299–328.
- Klepzig K D, Adams A S, Handelsman J, Raffa K F (2009). Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environ Entomol* 38: 67–77.
- Koller M, Knapp M, Schausberger P (2007) Direct and indirect adverse effects of tomato on the predatory mite *Neoseiulus californicus* feeding on the spider mite *Tetranychus evansi*. *Entomol Exp Appl* 125: 297–305.
- Kopper B J, Klepzig K D, Raffa K F (2004) Components of antagonism and mutualism in ips pini-fungal interactions: relationship to a life history of colonizing highly stressed and dead trees. *Environ Entomol* 33: 28-4.
- Laskowski M J, Kato I (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 49: 593-626.

- Matos C H C, Pallini A, Chaves F F, Schroeder J H, Janssen A. (2006) Do domatia mediate mutualistic interactions between coffee plants and predatory mites. *Entomol Exp Appl* 118: 185 – 192.
- Merck Microbiology Manual (2008) Darmstadt, Editora Merck KGaA.
- Mingochi D S, Jensen A (1986) Pests and diseases in tomato cultivars in Zambia, their seasonal occurrence and possible control. *Acta Hort* 190: 131-138.
- Mithöfer A, Boland W (2008) Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiol* 146: 825–831.
- Moraes G J de, McMurtry J A (1985) Chemically mediated arrestment of the predaceous mite *Phytoseiulus persimilis* by extracts of *Tetranychus evansi* and *T. urticae*. *Exp Appl Acarol* 1: 127-138.
- Moraes G J de, McMurtry J A (1987) Physiological effect of the host plant on the suitability of *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Entomophaga* 32: 35-38.
- Moraes G J de, Flechtmann C H W (2008) Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto, Holos Editora, 308p.
- Mosolov V V, Valueva T A (2005) Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Appl Bioch and Microbiol* 41: 261–282.
- Ohta H, Ida S, Mikami B, Morita Y (1986) Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol* 27: 911-918.
- Paracer S, Ahmadjian V (2000) Symbiosis: an introduction to biological associations. Oxford, Oxford University Press, United Kingdom.
- Perrot-Minnot M J, Werren J H (1999) *Wolbachia* infection and incompatibility dynamics in experimental selection lines. *J Evol Biol* 12: 272–282
- Pieterse C M J, Van Loon L C (1999) Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci* 4: 52–58.
- Ping L, Büchler R; Mithöfer A, Svatos A, Spiteller D, Dettner K, Gmeiner S, Piel, J Schlott B, Boland W (2007) A novel dps-type protein from insect gut bacteria catalyses hydrolysis and synthesis of n-acyl amino acids. *Environ Microbiol* 9: 1572–1583.
- Price P W, Bouton C E, Gross P, McPheron B A, Thompson J N, Weis A E (1980) Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annu Rev Ecol Syst* 11: 41–65.
- Pospiech A, Neumann B (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram positive bacteria. *Trends Genet* 11:217-218.

- Pueyo J J, Morgan T D, Ameenuddin N, Liang C, Reeck G R, Chrispeels M J , Kramer K J (1995) Effects of bean and wheat α -amylase inhibitors on α -amylase activity and growth of stored product insect pests. *Entomol Exp Appl* 74: 237-244.
- Ramos V da, Freire M G M, Parra J R P, Macedo M L R (2009) Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comp Biochem and Physiol* 152: 255–261
- Relman D A (2008) Til death do us part”: coming to terms with symbiotic relationships. *Nat Rev* 6: 721-724.
- Rhodes J D, Thain J F, Wildon D C (1999) Evidence for physically distinct systemic signalling pathways in the wounded tomato plant. *Ann Bot* 84: 109–116.
- Rosa A A, Gondim Jr M G C, Fiaboe K K M, De Moraes G J, Knapp M (2005) Predatory mites associated with *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae) on native solanaceous plants in coastal Pernambuco state, Brazil. *Neotrop Entomol* 34:689–692.
- Ryan C A (1990) Protease inhibitors in plants - genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28:425-449.
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarmiento R A (2007) *Tomato induced defenses mediating ecological interactions among arthropods*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 110p.
- Santos I C, Reis W J P, Moreira M A, Rezende S T, Rocha V S E, Sedyama C S (1993) Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação de sementes de soja. *Rev Ceres* 40: 438-444.
- SAS institute (2003) *SAS System: SAS/STAT version 9.1 (software)*. Cary.
- Schaller A (2008) *Induced plant resistance to herbivory*. Springer, University of Hohenheim. Germany, 462 p.
- Schuster M F (1959) Chemical control of *Tetranychus marianae* McGregor on tomatoes in the lower Rio Grande valley. *J Econ Entomol* 52: 63-764
- Serbus L R, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W (2008) The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet* 42: 683-707.
- Silva-Filho M C, Falco M C (2000) Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. *Biotechnol Cienc e Desenvol* 12: 38-42.
- Stouthamer R, Kazmer D J (1994) Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity* 73: 317–327

- Stouthame R, Breeuwer J A, Hurst G D (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71–102.
- Theologis A, Zarembinski T I, Oeller P W, Liang X, Abel S (1992) Modification of fruit ripening by suppressing gene expression. *Plant Physiol* 100: 549-551.
- Townsend C R, Begon M, Harper J L (2008) *Essentials of ecology*. 3 ed. Oxford, Blackwell.
- Vala F, Egas M, Breeuwer J A J, Sabelis M W (2004) *Wolbachia* affects oviposition and mating behaviour of its spider mite host. *J Evol Biol* 17: 692–700.
- Van Opijnen T, Breeuwer J A J (1999) High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Exp Appl Acarol* 23: 871–881.
- Vasiliauskas R (1999) Spread of *Amylostereum areolatum* and *A. chailletii* decay in living stems of *Picea abies*. *Forestry* 72: 95-102.
- Vermelho A B, Pereira A F, Coelho R R R, Souto-Pradrón T (2006) *Práticas de microbiologia*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 256p.
- Visôto L E, Oliveira M G A, Guedes R N C, Ribon A O B, Good-God P I V (2009) Contribution of bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *J Insect Physiol* 55: 185-191.
- Walling L L (2000) The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul* 19:195-216.
- Weeks A R, Marec F, Breeuwer J A (2001) A mite species that consists entirely of haploid females. *Science* 292: 2479–2482.
- Wekesa V W (2008) Avaliação do potencial de *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae) para o controle biológico clássico de *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) na África. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 114p.
- Werren J H, Baldo L, Clark M E (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6:741-751.
- Xavier-Filho J (1992) The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. *Rev Bras Fisiol Veg* 4: 1-6.
- Yang S F, Hoffman N E (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35:155-189.
- Zook D (1998) A new symbiosis language. *Symbiosis News* , 1–3.
- Zhao S, Qi X (2008) Signaling in plant disease resistance and symbiosis. *J Integrative Plant Biol* 50:799–807.