

MANUEL ANTONIO SOLÍS VARGAS

**IMPACTO DE *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* e *Tuta absoluta*
SOBRE A VIA DAS LIPOXIGENASES DO TOMATEIRO E AS PROTEASES
DIGESTIVAS DESTES HERBÍVOROS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

S687v
2014

Solis Vargas, Manuel Antonio, 1979-
Impacto de *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* e *Tuta absoluta* na via das lipoxigenases em tomateiro e nas proteases digestivas destes herbívoros / Manuel Antonio Solis Vargas. –
Viçosa, MG, 2014.
x, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.47-59.

1. Relação inseto-planta. 2. *Tetranychus*. 3. *Tuta absoluta*.
4. Lipoxigenases. 5. Inibidores de proteases. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de
Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22 ed. 591.5

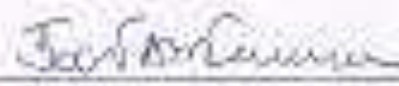
MANUEL ANTONIO SOLIS VARGAS

**IMPACTO DE *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* e *Tuta absoluta*
SOBRE A VIA DAS LIPOXIGENASES DO TOMATEIRO E AS PROTEASES
DIGESTIVAS DESTES HERBÍVOROS**


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

APROVADA: 27 de Fevereiro de 2014


Dra. Camila Rocha da Silva


Dr. João Alfredo Marinho Ferreira


Prof. Marcelo Coutinho Picango
(Coorientador)


Prof. Eliseu José Guedes Pereira


Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

DEDICATORIA

A minha Mãe e minha Filha

A meu Pai

A meus Irmãos, Irmãs, Sobrinha, Sobrinhos

A família que sempre tem me apoiado

A meus Amigos e Colegas

A meus Professores e Mestres

AGRADECIMENTOS

A vida, Deus e as forças da natureza que tem me levado pelo caminho certo.

A Organização dos Estados Americanos e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras por ter-me aceitado na edital OEA-GCUB 2011 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) favorecer-me com a bolsa de mestrado.

A Universidade Federal de Viçosa e o Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade, a experiência e o conhecimento adquirido.

Aos Professores e Colegas do PPG-Entomologia pela amizade, apoio, e experiências compartilhadas.

Ao Laboratório de Semioquímicos e o Professor Eraldo Lima pela ajuda com materiais e conselhos para realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Manejo Integrado de Pragas e o Professor Marcelo Picanço pelo apoio com as lagartas de *Tuta absoluta* conselhos e orientações para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Laboratório de Acarologia e os Professores Angelo Pallini e Arne Janssen pelas orientações, apoio, conselhos e solidariedade no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Laboratório de Enzimas, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos e a Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira pela orientação e apoio no desenvolvimento desta pesquisa. Pela amizade e irmandade de todas e todos em estes dois anos.

A todos meus amigos em Brasil e Costa Rica que tem apoiado sempre em especial a minha namorada María Paulina por toda a ajuda, compressão e tolerância nos momentos mais difíceis e as alegrias compartilhadas.

A minha família pelo sacrifício feito para eu conseguir esta importantíssima meta na minha vida. Pelo apoio, por crer firmemente em mim e meus sonhos. A meus Pais e irmãos, agradeço enormemente.

A minha filha, quem tem sido sacrificada a presença de seu pai nos primeiros anos da sua vida e quem em tão pouco tempo que estivemos juntos me mostrou o amor verdadeiro. Obrigado Lara por existir.

BIOGRAFIA

Manuel Antonio Solís Vargas, filho de Victor Manuel Ramón Solís Arce e María Gabriela de Jesús Vargas Villalobos, nasceu no dia 27 de setembro de 1979 em San José, Costa Rica.

Em 1998 iniciou o curso de Manejo e Proteção dos Recursos Naturais pela Universidade Estadual a Distancia de Costa Rica (UNED) graduou-se como Licenciando no ano 2008.

Trabalho no Instituto Nacional de Biodiversidade de Costa Rica (INBio) desde 2000 até 2011 como técnico de laboratório e logo como curador de coleções de insetos, especialista nos ordenes Hymenoptera e Diptera. Instrutor sobre historia natural de insetos para guias naturistas.

De 2009 a 2011 foi Professor da Universidade Estadual a Distancia de Costa Rica (UNED) em disciplinas de Biologia da Conservação, Monitoramento Ambiental e Turismo Sustentável.

Em fevereiro de 2012 iniciou o curso de Mestrado em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação da Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2014.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	- 1 -
1.1. Objetivo Geral	- 3 -
1.2. Objetivos Específicos	- 3 -
2. REVISÃO DE LITERATURA	- 4 -
2.1. Tomate	- 4 -
2.2. Ácaros	- 6 -
2.3. A traça do tomateiro <i>Tuta absoluta</i>	- 7 -
2.4. Defesa das plantas.....	- 10 -
2.5. Enzimas digestivas de artrópodes.....	- 14 -
3. MATERIAL E MÉTODOS	- 19 -
3.1. Local de realização dos experimentos	- 19 -
3.2. Produção das plantas de tomate.....	- 19 -
3.3. Criação dos ácaros	- 19 -
3.4. Criação das lagartas de <i>Tuta absoluta</i>	- 20 -
3.5. Experimentação	- 20 -
3.6. Análise da atividade enzimática nas plantas	- 21 -
3.6.1. Obtenção do extrato foliar	- 21 -
3.6.2. Determinação dos inibidores de proteases.	- 21 -
3.6.3. Determinação da atividade de lipoxigenases.	- 22 -
3.7. Análise da atividade enzimática nos herbívoros.....	- 23 -
3.7.1. Obtenção do extrato enzimático.....	- 23 -
3.7.2. Determinação da concentração de proteína.....	- 24 -

3.7.3. Determinação de atividade de proteases totais.....	- 24 -
3.7.4. Determinação de atividade de serino-proteases.	- 24 -
3.7.4.1. Tripsinas- <i>like</i>	- 24 -
3.7.4.2. Quimotripsinas- <i>like</i>	- 26 -
3.7.5. Determinação de atividade de cisteíno-proteases.....	- 26 -
3.7.6. Análises estatísticas	- 27 -
3.8. Avaliação biológica.....	- 28 -
4.8.1 Análise estatística	- 28 -
4. RESULTADOS E DISCUSSAO.....	- 31 -
4.1. Reposta de defesa do tomate	- 31 -
4.2. Efeito da resposta de defesa do tomate na taxa de oviposição de <i>T. evansi</i>	- 35 -
4.3 Atividade de enzimas digestivas dos herbívoros em relação a reposta de defesa do tomate.	- 38 -
5. CONCLUSOES	- 45 -
6. REFERÊNCIAS.....	- 47 -

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Herbívoros pragas do tomateiro, alvo do presente estudo; . *Tetranychus evansi*, o ácaro vermelho (superior). *Tetranychus urticae* (medio); *Tuta absoluta* (inferior). - 9 -
- Figura 2** Mecanismo esquemático da ativação da produção de inibidores de proteases por fermento em folhas de tomate. PK=Proteína Cinase (FARMER & RYAN, 1992). - 12 -
- Figura 3.** Metodologia de experimentação: Detalhe das gaiolas de PVC com organza, onde foram cultivadas as plantas e aplicado o experimento em 6 tratamentos (a-c). Coleta dos ácaros e lagartas assim como infestação das plantas (d-f). Coleta das amostras de folíolos para análises de PI e LOX (g-k). Detalhe dos danos causados por ácaros e as lagartas assim como coleta das amostras de herbívoros para análises de proteases digestivas (l-n). Seleção de fêmeas e disposição dos discos foliares para experimento de oviposição (o-q). - 30 -
- Figura 4.** Atividade específica de LOX ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)/($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) de plantas de tomate antes de serem infestadas (0 dias) e após 7 dias de infestação de acordo aos tratamentos. Médias dos tratamentos (+SEM; n= 4) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. - 32 -
- Figura 5.** Concentração de IP (g de tripsina inibida/g de proteína) de plantas de tomate antes de serem infestadas (tempo 0) e após 7 dias de infestação de acordo aos tratamentos. Médias dos tratamentos (+SEM; n= 4) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. - 33 -
- Figura 6.** Ovos colocados por fêmea em cada dia de avaliação sobre discos foliares de plantas infestadas por sete dias de acordo aos tratamentos. - 36 -
- Figura 7.** Media de ovos colocados (fêmea/dia) sobre discos foliares de plantas infestadas por sete dias de acordo aos tratamentos. Médias dos tratamentos (+SEM; n= 25, 27 e 30) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. - 37 -

- Figura 8.** Atividade de proteases totais (Absorvância 440 nm/mg de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 4) entre as espécies seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância.- 39 -
- Figura 9.** Correlação das atividades amidásicas e esterásicas de serino proteases Tripsina-like com atividade de proteases totais pelo índice de Correlação de Pearson. - 40 -
- Figura 10.** Atividade amidásica de Tripsinas-like ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 4) entre as espécies seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância. ... - 40 -
- Figura 11.** Atividade esterásica de Tripsinas-like ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 4) entre as espécies seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância. ... - 41 -
- Figura 12.** Atividade amidásica de Quimotripsinas-like ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias (+ SEM; n= 4) dos tratamentos entre as espécies seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância. ... - 41 -
- Figura 13.** Atividade de Cisteíno proteases ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM, n= 4) entre as espécies seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância. ... - 42 -

RESUMO

SOLÍS VARGAS, Manuel Antonio. M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Impacto de *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* e *Tuta absoluta* sobre a Via das Lipoxigenases do Tomateiro e as Proteases Digestivas destes Herbívoros.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Marcelo Coutinho Picanço e Joel Oliveira e Angelo Pallini.

O ácaro *Tetranychus evansi* interfere na resposta de defesa pela via das lipoxigenases do tomateiro, na qual ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases os quais afetam a capacidade dos herbívoros para digerir proteínas. Ao não induzir inibidores de proteases, *T. evansi* favorece o seu desenvolvimento e reprodução, mas também de outros herbívoros como *T. urticae*. Até agora não tem sido demonstrado quais enzimas digestivas e como as suas atividades em este e outros herbívoros podem ser afetados por essa interferência na resposta de defesa do tomateiro, o que consistiu em nosso objetivo de trabalho. Plantas de tomate foram infestadas com ácaros das espécies *T. evansi*, *T. urticae* e com a lagarta *Tuta absoluta*, outras foram infestadas com uma combinação de *T. evansi* com as outras duas espécies. Quando *T. evansi* esteve na mesma planta com *T. urticae* a resposta de defesa pela via das lipoxigenases foi induzida e a concentração de inibidores de proteases igual que a indução gerada por *T. urticae*, o mesmo quando *T. evansi* esteve junto com *T. absoluta* na planta. A oviposição de *T. evansi* foi afetada em plantas que foram infestadas unicamente com *T. urticae*, mas em plantas atacadas pela combinação de herbívoros ou unicamente por *T. absoluta* a oviposição não diferiu com aquela em plantas limpas, apesar das altas concentrações de IP. Isto sugere que a oviposição de *T. evansi* não é afetada só pelos IP, mas possivelmente pelos danos e rastros deixados por *T. urticae* nas folhas. O perfil das enzimas digestivas indica uma maior atividade de serino proteases que de cisteíno proteases, sendo as Tripsinas-like as de maior atividade. Nos ácaros as tripsinas incrementam com a concentração de IP, possivelmente pela necessidade de superar o efeito deletério destes e no caso de *T. evansi* de digerir mais aminoácidos quando compete com *T. urticae*. As quimotripsinas-like parecem ser mais sensíveis aos IP e diminuir com o incremento da atividade das tripsinas.

ABSTRACT

SOLÍS VARGAS, Manuel Antonio. M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. . **Impact of *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* and *Tuta absoluta* over the Lipoxygenases Pathway of Tomato and Digestive Proteinases of these Herbivores.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Marcelo Coutinho Picanço and Joel Oliveira and Angelo Pallini.

The spider mite *Tetranychus evansi* interferes in the lipoxygenases pathway of plant defenses respond where are produced jasmonic acid that activates expressing genes of proteinase inhibitors which affect the capability of digest proteins in herbivores. The not PI induction ability of *T. evansi* promotes his performance and reproduction but other species too like the spider mite *T. urticae*. Until now, there has not been study how digestive enzyme activity of these and other herbivores could be affected by *T. evansi*' interference in tomato defense respond neither which digestive enzymes are present in this particular plant-herbivore relation what became in our research objective. Tomato plants were infested with *T. evansi*, *T. urticae* or moth larvae *Tuta absoluta*, while some plants were infested with a combination of *T. evansi* with each one of the other species simultaneously. When *T. evansi* was in the same plant with *T. urticae* the defense respond by lipoxygenases pathway were induced and the proteinase inhibitors were equal that plants attacked by only *T. urticae*, and plants attacked by *T. evansi* and *T. absoluta* simultaneously. *T. evansi* oviposition rate were only affected in plants previously attacked by *T. urticae*. In plants previously attacked by the combination of herbivores or just *T. absoluta* the oviposition rate doesn't differs of rates in clean plants, despite of high PI concentration. This suggests that *T. evansi* performance is affected by PI but for *T. urticae* plant injuries and traces and *T. evansi* has to overcome more factors involved in food competition. Digestive enzymes profile suggest a higher serine than cysteine proteinase activity been mainly tripsyn-like proteinases. In spider mites, tripsyn-like proteinases increase when PI were higher, possible to overcome PI toxic effects plus a higher aminoacids demand in *T. evansi* when competes with *T. urticae* for food resources. The quimotripsyn-like proteinases seems to be sensible to PI and decrease with high tripsyn-like activity.

1. INTRODUÇÃO

As pragas do tomateiro reduzem a produtividade da cultura, devido aos danos diretos ou indiretos e comprometem o potencial produtivo da planta (VILLAS BÔAS *et al.*, 1997). Em certos casos, a alta intensidade do ataque de pragas na cultura pode comprometer até 100% da produtividade (ESPINOSA, 1991). Uma das principais pragas que atacam a cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) na América do Sul e em vários países da Europa, África, América Central e América do Norte destaca-se o ácaro vermelho *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard e o ácaro rajado *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (BLAIR, 1983; DEMORAES; MCMURTY, 1985a; DEMORAES *et al.*, 1987; FERRAGUT; ESCUDERO, 1999; LEITE *et al.*, 2003; EPPO, 2004). Também a traça do tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), tem sido considerada a praga mais importante desta cultura na América do Sul (PICANÇO *et al.*, 2007).

As defesas das plantas podem ser diretas quando exercem impacto negativo imediato sobre os herbívoros, ou defesas indiretas, como por exemplo, atração de predadores e parasitóides (PRICE *et al.*, 1980). No instante em que o herbívoro danifica as estruturas das plantas se desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos que precedem alterações na expressão de genes de defesas de plantas (MAFFEI *et al.*, 2007). Uma das principais formas de defesas direta é mediada pela via das lipoxigenases. Na qual ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992; SCOTT *et al.*, 2010; SHIVAJI *et al.*, 2010). Nos herbívoros a capacidade para digerir as proteínas pode ser afetada pelos inibidores de proteases e outro químicos como taninos e fenóis (BROADWAY *et al.* 1986). Essa interferência na digestão diminui a disponibilidade de aminoácidos prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do herbívoro (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010).

Plantas de tomate atacadas por *T. evansi* apresentam um baixo nível de inibidores de proteases, devido a supressão da via de sinalização do ácido salicílico e ácido jasmônico fazendo que as plantas apresentem menores quantidades de inibidores de proteases, favorecendo o desenvolvimento e reprodução do ácaro. Também *T. evansi* suprime a liberação de voláteis associados com a defesa de plantas e demonstraram preferência por plantas previamente infestadas por coespecíficos nas quais apresentaram melhor desenvolvimento (SARMENTO *et al.*, 2011a).

O ácaro rajado, *T. urticae*, apresenta melhor desenvolvimento e oviposição quando se alimentam de plantas de tomate previamente atacadas por *T. evansi*, mas o dano causado por *T. urticae* ativa a produção de inibidores de proteases, inclusive na presença de *T. evansi* ou em plantas previamente atacadas por *T. evansi*, afetando a reprodução e desenvolvimento de *T. evansi* (SARMENTO *et al.*, 2011a; b; OLIVEIRA, 2012). Outros estudos demonstraram que o ataque simultâneo de patógenos e herbívoros com distintos mecanismos de alimentação podem gerar diferentes expressões de defesa da planta pela via do ácido salicílico e jasmônico afetando de igual forma o desenvolvimento dos herbívoros (THALER *et al.*, 2002; KAWAZU *et al.*, 2012). Mas, poucos estudos tem demonstrado o que acontece quando as plantas são atacadas por mais de uma espécie simultaneamente e as consequências para os herbívoros (RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2005).

Até o momento não tem sido demonstrado se a presença de outros tipos de herbívoros como lagartas (Lepidoptera; Insecta) junto com *T. evansi* podem alterar a indução da resposta de defesa da planta ou como estas interações influenciam as concentrações de inibidores de protease e o desenvolvimento do ácaro *T. evansi*. Também não tem sido estudado como estas interações e a supressão de inibidores de proteases modificam a atividade das enzimas digestivas nestes herbívoros. O qual é a novidade e objetivos deste trabalho.

1.1. Objetivo Geral

Caracterizar a atividade enzimática nos ácaros *Tetranychus evansi*, *T. urticae* e na lagarta *Tuta absoluta* em relação à resposta de defesa do tomate pela via das Lipoxigenases e avaliar como os Inibidores de Proteases afetam o desempenho reprodutivo de *T. evansi*.

1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade das lipoxigenases e a produção de inibidores de proteases em tomate sob ataque de *Tetranychus evansi* simultaneamente com *Tetranychus urticae* e *Tuta absoluta*.
- Avaliar a oviposição de *Tetranychus evansi* em plantas de tomate submetidas ao ataque de *T. urticae*, *Tuta absoluta*, e em plantas simultaneamente atacadas por *T. evansi* mais *T. urticae* e *T. evansi* mais *T. absoluta*.
- Avaliar a atividade das proteases no sistema digestivo de *Tetranychus evansi* quando se alimenta junto com *T. urticae* ou *Tuta absoluta*, em plantas de tomate.
- Avaliar a atividade das proteases no sistema digestivo de *Tetranychus urticae* quando se alimenta junto com *T. evansi* em plantas de tomate.
- Avaliar a atividade de proteases no sistema digestivo de *Tuta absoluta* quando se alimenta junto com *T. evansi* em plantas de tomate.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tomate

A cultura do tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill, esta amplamente difundida em todo o mundo. Tem a sua origem na América do Sul, mas foi domesticada no México e introduzido na Europa em 1544 e disseminado para Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio (NAIKA *et al.*, 2006, SILVA *et al.*, 2007). O tomateiro é produzido em todos os estados do Brasil sendo comercializado anualmente 4,43 milhões de toneladas, das quais 85% estão concentradas nos estados de Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e região Sul, sendo Goiás o estado de maior produção com 32,5% do total (AGRIANUAL, 2013). O tomate se destaca como a mais importante hortaliça em área cultivada, volume produzido, consumo e valor econômico no Brasil (SILVA *et al.*, 2007, MEDEIROS *et al.*, 2009). É uma hortaliça de elevada importância socioeconômica, reconhecida como poderosa fonte geradora de emprego e renda em todos os segmentos de sua cadeia produtiva (SILVA; GIORDANO 2000). Além da importância econômica, essa hortaliça possui propriedades alimentícias substancialmente benéficas para a saúde humana. O fruto é fonte de ácido fólico, vitamina C, potássio e carotenóides, sendo o licopeno (antioxidante) o mais destacado (NAIKA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

A infestação de pragas na cultura do tomateiro pode levar à redução da produtividade da cultura devido aos danos diretos que comprometem o potencial produtivo da planta em função de serem, em alguns casos, transmissores de viroses (VILLAS BÔAS *et al.*, 1997). O tomateiro é atacado por um grande número de patógenos e artrópodes-pragas, desde a germinação até a colheita. Os estresses bióticos são tão intensos que o tomateiro tem o status de hortaliça líder no emprego de agrotóxicos (VILLAS BÔAS *et al.*, 2007). Aragão *et al.* (2000) observaram que inúmeras aplicações de produtos de amplo espectro não só elevam o custo da produção da lavoura, como também colabora para o ressurgimento de determinadas pragas e o aparecimento de novas até então desconhecidas. Devido à complexidade de implantação da cultura do tomate, os

produtores utilizam uma grande quantidade de pesticidas para manter a produção. Aproximadamente 120 pesticidas e 90 fungicidas são utilizados no Brasil para controlar pestes e doenças do tomate e as culturas podem receber até três aplicações por semana. Esta intensa aplicação de agroquímicos é necessária para obtenção de características dos frutos, como forma, peso, ausência de manchas, os quais vão aumentar o valor comercial do produto (ARAGÃO *et al.*, 2000; NAIKA, 2006; VILLAS BÔAS *et al.*, 2007).

Apesar de o tomateiro ser cultivado durante todo o ano, as menores produtividades e os maiores preços são obtidos em cultivos realizados em épocas quentes. A variação da produtividade e do preço está diretamente relacionada à ocorrência de artrópodes-praga que causam grandes perdas e oneram o custo de produção (PICANÇO *et al.*, 2004). Entre os artrópodes-pragas que atacam a cultura do tomate, os ácaros, principalmente em condições de seca e elevadas temperaturas, são considerados um sério problema (ARAGÃO *et al.*, 2002). Os ácaros fitófagos incluem espécies que se alimentam da parte aérea e subterrânea de plantas (MENEZEZ *et al.*, 2010).

Entre 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 & Pritchard) e o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Kock) (MORAES; FLECHTMANN, 2008, citado por CAVALCANTE, 2010). No Brasil, a traça do tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) tem sido considerada a praga mais importante desta cultura (PICANÇO *et al.*, 2007).entre outras lagartas como *Helicoverpa zea*, (Bod.), *Spodoptera exigua* (Hubner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Neoleucinoides elegantalis* (Guen.) (Lepidoptera: Crambidae) (PICANÇO *et al.*, 2000;LEITE, 2004).

2.2. Ácaros

Ácaros do gênero *Tetranychus* exibem como comportamento característico a produção de teia, fato que dificulta a ação de inimigos naturais, diminui a eficiência de agrotóxicos e oferece proteção em caso de condições climáticas adversas (GERSON 1985). Seus ovos esbranquiçados são ovipositados na parte inferior das folhas e eclodem de quatro a sete dias depois. As larvas são incolores e translúcidas com tamanhos semelhantes aos de um ovo da própria espécie. Com o início da alimentação, o ácaro apresenta um gradativo escurecimento. Na fase adulta, *Tetranychus* apresentam forma oval e coloração vermelha.

Os machos apresentam menores tamanhos com opistossoma afilado e as fêmeas são maiores com o opistossoma arredondado (MORAES; FLECHTMANN, 2008). *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) apresenta melhor desenvolvimento em temperaturas elevadas e em ambiente seco (temperatura mínima de 10 °C, temperatura ótima 34 °C). Quando submetidos a uma temperatura de 36 °C o tempo necessário para seu desenvolvimento é menor (6,3 dias), já com 25 °C, o ciclo de vida é completado em 13,5 dias (EPPO, 2004; MORAES; FLECHTMANN, 2008).

O ácaro vermelho (Figura 1) *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) foi originalmente descrito de espécimes coletados em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) nas ilhas Maurício (BAKER; PRITCHARD, 1960) e desde então tem sido relatado em várias partes do mundo. Atualmente este ácaro é considerado uma praga-chave de solanáceas em diversos países do continente africano (KNAPP *et al.*, 2003; SAUNYAMA; KNAPP, 2003) com relatos de perdas de até 90% da produtividade no Zimbabué (SARR *et al.*, 2002). Na maioria dos países onde foi constatada a presença de *T. evansi* foi demonstrada sua pronunciada preferência por solanáceas (MORAES; MCMURTRY, 1987). Entretanto, na Europa estes ácaros atacam também plantas de diferentes famílias (FERRAGUT; ESCUDERO, 1999).

Outro ácaro de grande importância agrícola é o ácaro rajado (Figura 1) *Tetranychus urticae* (KOCH, 1836). Devido sua ampla gama de hospedeiros e prejuízos causados, *T. urticae* é apontado como principal espécie praga do gênero

Tetranychus. Flechtmann (1985) relacionou as culturas do algodão, amendoim, feijão, ervilha, fava, soja, mamona, pessegueiro, flores, folhagens, morangueiro, roseira, tomate, berinjela e pimentão como as principais culturas atacadas por este ácaro no Brasil. Em tomate, as plantas atacadas por *T. urticae* apresentam injúria mecânica como consequência de sua alimentação. As folhas perfuradas são prejudicadas pela perda de água e clorofila resultando em redução na intensidade de fotossíntese.

2.3. A traça do tomateiro *Tuta absoluta*

A traça do tomateiro (Figura 1) *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), tem sido considerada a praga mais importante desta cultura na América do Sul (PICANÇO *et al.*, 2007). As larvas desse inseto afetam a produtividade por reduzir a área fotossintética ao se alimentarem do mesófilo foliar (SOUZA; REIS, 1992; BOGORNI *et al.*, 2003, PICANÇO *et al.*, 2007); por afetar o crescimento vertical ao broquear o ponteiro e por broquear os botões florais, as flores e principalmente os frutos (SOUZA; REIS, 1992; MIRANDA, 1997; PAULA, 1997; PICANÇO *et al.*, 1997; 2007; LEITE *et al.*, 2001). Seus hospedeiros secundários são outras espécies de Solanaceae (BACCI, *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2011). *T. absoluta* é nativa da América do Sul, e foi introduzida na Europa via Espanha e já se dispersa por praticamente todo este continente. Recentemente ela também foi introduzida na África e Ásia onde tem causado grandes prejuízos (DESNEUX *et al.*, 2010).

Os ovos são alongados e de cor branca e aparecem agrupados nas folhas e ramos. Cada fêmea coloca em média 50 ovos. As lagartas medem no máximo 9 mm e são verdes com uma mancha parda no dorso. As lagartas possuem coloração pardacenta e cabeça marrom-clara. Nos restos dos vegetais a pupa fica protegida por um casulo de seda. As pupas são de coloração marrom, das quais surgirão os adultos. As mariposas são pequenas, de coloração cinza-prateada com pontuações escuras nas asas e com cerca de 10 mm de envergadura.

O ciclo de vida da *T. absoluta*, desde a postura dos ovos até a emergência dos adultos, varia de 76,3 a 23,8 dias a temperatura média de 14 a 27°C, respectivamente (BARRIENTOS, 1998), ocorrendo numerosas gerações

anualmente em regiões de clima tropical (SOUZA; REIS, 1992). As lagartas penetram nas folhas em 20 a 45 minutos após a eclosão (COELHO; FRANÇA, 1987). Na fase larval a traça do tomateiro passa por quatro instares e preferem o estrato mediano do dossel (LEITE *et al.*, 1999a; TORRES *et al.*, 2001). No quarto instar podem abandonar os tecidos internos das folhas e migrar, através de um fio de seda, para outros órgãos da planta (COELHO; FRANÇA, 1987; IMENES *et al.*, 1990).

O período larval varia de 10,95; 13,0 e 19,17 dias em temperaturas médias de 27,0; 22,8 e 18,55°C, respectivamente (COELHO; FRANÇA, 1987; IMENES *et al.*, 1990). A alta capacidade de injúria dessa praga aliada à exigência estética do produto pelo mercado consumidor determina o elevado número de aplicações de inseticidas no agroecossistema tomateiro, aumentando assim o custo de produção e prejuízos ao meio ambiente e ao consumidor (PICANÇO; MARQUINI, 1999).



Figura 1 – Herbívoros pragas do tomateiro, alvo do presente estudo; *Tetranychus evansi*, o ácaro vermelho (superior). *Tetranychus urticae* (medio); *Tuta absoluta* (inferior).

2.4. Defesa das plantas

Muitos são os tipos de estresses que os vegetais estão sujeitos, como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pestes ou patógenos, dentre outros. Ao longo de uma coexistência de pelo menos 100 milhões de anos, plantas e insetos desenvolveram uma série de interações que podem ser benéficas ou maléficas (STOTZ *et al.*, 1999), em uma relação constante, complexa e que é observada nos mais diversos ecossistemas. Esta interação pode ser mutuamente benéfica, quando os insetos propiciam às plantas atividades como polinização e defesa e quando as plantas propiciam aos insetos abrigo, local para reprodução e alimentação. Por outro lado, alguns insetos atacam as plantas e prejudicam seu desenvolvimento. No entanto, a capacidade das plantas responderem seus agressores parece ser bem desenvolvida, apresentando estratégias de defesa contra organismos como vírus, bactérias, fungos, nematoides, ácaros, insetos e até mesmo mamíferos (DICKE *et al.*, 2003).

Suas habilidades em resistir ao ataque de insetos são baseadas em defesas constitutivas e induzidas, que visam reduzir o desempenho dos herbívoros (ARIMURA *et al.*, 2005). Essas defesas precisam ser sincronizadas tanto no tempo e no espaço, através de complexas redes regulatórias que são influenciadas por interações com outras vias de sinalização. O resultado dessa integração de vias é um padrão característico de expressão gênica resultando, entre muitas outras atividades, na produção de fitoquímicos que vão agir contra herbívoros ou patógenos. Na defesa constitutiva, a planta expressa resistência de forma contínua e este mecanismo de defesa não está ligado à presença ou ação de herbívoros. O aparato que compreende este tipo de defesa é formado por compostos químicos e estruturas morfológicas que dificultam o acesso dos insetos a planta, podendo prejudicar alguns parâmetros do ciclo biológico, como reprodução e desenvolvimento do herbívoro (KARBAN; BALDWIN, 1997). Esses componentes podem ser encontrados em todas as partes das plantas, geralmente suas concentrações e quantidades variam com a idade da mesma (GOULD, 1998).

Defesas induzidas estão relacionadas às mudanças morfológicas e aumento do nível de metabólitos secundários ou proteínas relacionadas à defesa. Como tais

eventos reduzem a qualidade do hospedeiro para os herbívoros, são consideradas como defesas diretas (KANT *et al.*, 2004). A investigação de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas (GATEHOUSE, 2002; FERR *et al.*, 2004). Um importante elemento envolvido na transdução de sinal após o ferimento no tecido vegetal por herbívoros é representado por uma rede de fitormônios. Através de interações sinérgicas e antagônicas, herbívoros e plantas envolvidas fornecem uma resposta que regula a expressão gênica e assim controla a indução de proteínas de defesa (MAFFEI *et al.*, 2007).

Uma das principais formas de defesas direta das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela via das lipoxigenases. Nessa via ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER; RYAN, 1992; SCOTT *et al.*, 2010; SHIVAJI *et al.*, 2010). Farner e Ryan (1992) propuseram que em folhas de tomateiro, os jasmonatos são responsáveis por regular a expressão dos genes que codificam inibidores de proteases. No esquema proposto na Figura 2, uma importante etapa ocorre na interação dos sinais extracelulares com os receptores da membrana plasmática, levando a ativação de lipases com posterior liberação do ácido linolênico dentro do citoplasma. O ácido linolênico é convertido pela Via das Lipoxigenases a ácido jasmônico, o qual reage com um receptor que ativa a expressão de genes de inibidores de proteases.

A ingestão de inibidores de proteases pelos insetos interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio. Os inibidores são considerados agentes antimetabólicos, pois levam os insetos a uma deficiência proteica. Essa interferência na digestão diminui a disponibilidade de aminoácidos prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (SILVA-FILHO E FALCO, 2000; XAVIER *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010). Outra possibilidade de interferência no desenvolvimento dos insetos é a atuação de forma indireta dos inibidores, via um mecanismo de retroalimentação, que levaria a

um aumento na produção de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis.

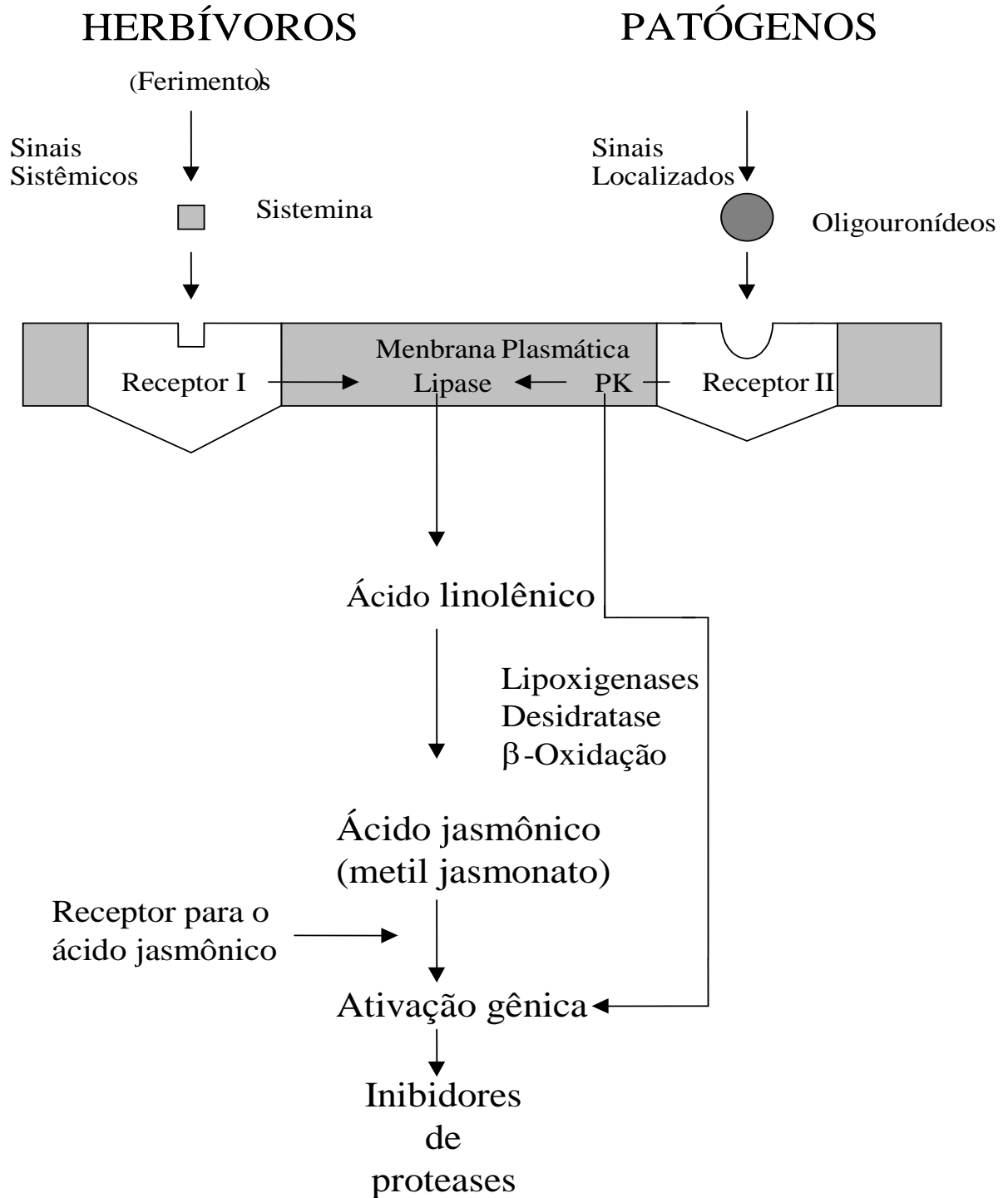


Figura 2 - Mecanismo da ativação da produção de inibidores de proteases por ferimento em folhas de tomate. PK=Proteína Cinase (FARMER & RYAN, 1992).

Os aminoácidos seriam deslocados para síntese de mais serino-proteases ou de outras proteases em detrimento de outras proteínas essenciais a seu crescimento, desenvolvimento e manutenção (OLIVEIRA *et al.*, 2005) Em contrapartida, como resultado da coevolução das interações planta-inseto, estes também desenvolveram mecanismos para se defenderem dos efeitos deletérios provocados pelos inibidores de proteases produzidos pelas plantas, através do aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de enzimas insensíveis aos inibidores, tentando burlar esse efeito inibitório (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SRINIVASAN *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010)

A ativação destas respostas específicas requer o reconhecimento e respostas apropriadas ao ataque inimigo e a maioria destes eventos leva por fim à ativação de genes por vias de sinalização celular em poucos minutos (MAFFEI *et al.*, 2007). Os danos causados pelos herbívoros podem gerar modificações químicas e morfológicas na fisiologia da planta as quais são específicas ao tipo de artrópode (RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2005). Expressão genica pela ativação do ácido salicílico e jasmônico podem-se manifestar de formas distintas quando as plantas são atacadas por diferentes patógenos e herbívoros.

Thaler *et al.*, (2002) avaliaram a relação (cross-talk) entre as vias de sinalização do ácido salicílico e jasmônico em tomate selvagem e o efeito da relação nos herbívoros em tomate cultivado. No tomate selvagem encontraram que a expressão gênica compostos de defesa não apresentou efeito sob o desenvolvimento da lagarta *Spodoptera exigua*, enquanto no tomate cultivado a indução da proteína de defesa polyphenol oxidase incrementa o desenvolvimento da lagarta *Trichoplusia ni*, mas não de outras pragas como tripes (*Frankliniella occidentalis*), a lagarta *Manduca sexta*, o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) e a bactéria *Pseudomonas syringae*. Kawazu *et al.*, 2012 compararam a expressão de genes induzidos dos ácidos salicílico e jasmônico em tomate quando as plantas são atacadas pelos mesmos herbívoros do caso anterior incluindo a mosca minadora *Liriomyza sativae* e acharam variação na indução dos genes avaliados: *Spodoptera* e *Frankliniella* ativaram principalmente genes do ácido jasmônico; o ácaro rajado ativo apenas um dos genes do ácido jasmônico e dois genes do ácido

salicílico; e quando as lagartas da mosca minadora começaram alimentar os genes do ácido jasmônico e a defesa da planta por esta via aparentemente foram suprimidos pela ativação dos genes do ácido salicílico.

Fêmeas adultas de ácaros no gênero *Tetranychus* produzem de 50-70% de seu peso corporal em ovos por dia. Por enquanto a conversão de alimento é maior em fêmeas adultas e a taxa de oviposição esta fortemente relacionada ao crescimento populacional (SARMENTO *et al.*, 2011a). Por conseguinte uma baixa qualidade de alimento pode resultar numa baixa taxa de oviposição. Sarmento *et al.*, (2011a) demonstraram que o ácaro vermelho do tomateiro, *Tetranychus evansi* tem a capacidade de interferir no mecanismo de defesa do tomate suprimindo a indução da via de sinalização do ácido salicílico e jasmônico fazendo que as plantas apresentem menores quantidades de inibidores de proteases favorecendo o desenvolvimento e reprodução do ácaro. Também *T. evansi* suprime a liberação de voláteis associados com a defesa das plantas Os ácaros demonstraram preferencia por plantas previamente infestadas por coespecíficos nas quais obtém melhor desenvolvimento

Trabalhos recentes mostram que *T. evansi* possui uma diversidade bacteriana endossimbionte superior ao *T. urticae*. Indivíduos de *T. evansi* tratados com tetraciclina e livres de bactérias endossimbiontes estimularam respostas de defesa em plantas de tomate (aumento da atividade de lipoxigenases e aumento da concentração de inibidores de proteases) similares a *T. urticae* e significativamente superiores a indivíduos de *T. evansi* com bactérias endossimbiontes. Estes resultados sugerem que as bactérias poderiam auxiliar os ácaros *T. evansi* na manipulação da defesa das plantas, deixando-as mais susceptíveis ao ataque e à alimentação (CAVALCANTE, 2010; RIBEIRO, 2011). Mais ate agora os possíveis efeitos dessa alta diversidade simbiótica não tem sido esclarecido.

2.5. Enzimas digestivas de artrópodes

As enzimas digestivas dos artrópodes são hidrolases e classificadas de acordo com o substrato que degradam. Os principais grupos de enzimas digestivas

dos insetos são constituídos pelas lipases, carboidrases e proteases, sendo este último grupo melhor caracterizado. Estas são subdivididas em endopeptidases, proteases, que clivam ligações peptídicas internas na cadeia polipeptídicas e exopeptidases, que removem aminoácidos da região C-terminal ou N-terminal do polipeptídeo (JONGSMA; BOLTER, 1997; FAN; WU, 2005).

As proteases são amplamente distribuídas em quase todas as plantas, animais e microorganismos (VALUEVA; MOSOLOV, 2004; HAQ *et al.*, 2004; MOSOLOV; VALUEVA, 2005; CHRISTELLER, 2005; JOANITTI *et al.*, 2006). Portanto uma determinada espécie de inseto muitas vezes possui múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanístico serino, cisteino, aspartil o metalo, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2008; AHN; ZHU-SALZMAN, 2009).

Estas proteases digestivas são encontradas na região do intestino médio dos insetos e catalisam a clivagem de ligações peptídicas das proteínas ingeridas através do processo de hidrólise, liberando peptídeos e aminoácidos. Estão envolvidas em vários processos fisiológicos e bioquímicos incluindo ativação de proteínas, ativação de proenzimas, produção de peptídeos bioativos, além da digestão de alimentos, coagulação sangüínea e fibrinólise, controle do tamanho de proteínas, resposta imune e apoptose (TERRA; FERREIRA, 2000; LEUNG-TOUNG *et al.*, 2002; KANOST; CLARKE, 2005; CHOU; CAI, 2006).

Quase um terço de todas as proteases é classificado como serino proteases, assim nomeadas por apresentarem o resíduo nucleofílico de serina no sítio ativo. Essa classe de proteases foi originalmente distinguida pela presença do sistema “relé de cargas” ou “tríade catalítica” Asp-His-Ser. Mais recentemente, serino-proteases com outras tríades e díades catalíticas foram descobertas, incluindo Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His (HENDSTROM, 2002). As serino-proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos, e em vírus. Seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimotripsina (PAGE; DI CERA, 2008).

Em artrópodes herbívoros, as serino-proteases participam de processos fisiológicos que incluem a digestão e a resposta à defesa de plantas, bem como a resposta imune dos insetos; a sinalização e amplificação de sinal; a ativação de cascatas; a indução de peptídeos antimicrobianos; a atividade antimicrobiana e a ativação de mecanismos específicos de melanização e coagulação (LEVY *et al.*, 2004; HERRERO *et al.*, 2005; PAGE; DI CERA, 2008).

O intestino médio das larvas de lepidópteros hospeda um complexo ambiente proteolítico com atividades do tipo quimotripsina, tripsina, elastase, catepsina-B, aminopeptidases e carboxipeptidases, dentre outras, todas responsáveis pela digestão proteica. Serino-proteases são conhecidas por dominar o ambiente intestinal das larvas e contribuem com cerca de 95% da atividade proteolítica total (SRINIVASAN *et al.*, 2006).

As serino-proteases tripsina-like são sintetizadas nas células do intestino médio na sua forma ativa, e estão associadas com as membranas de vesículas. Estas vesículas, então, migram para o ápice celular e os precursores de tripsina são processados a uma forma solúvel antes de serem secretadas. Parece que os insetos controlam a atividade de suas proteases digestivas através da ligação das proteases a membranas, onde permanecem até serem liberadas no lúmen do intestino médio e não usando formas inativas ou zimógenos (TERRA; FERREIRA, 1994). Enzimas tripsina-like do intestino médio de insetos têm sido caracterizadas em várias espécies de lepidóptera: *Anticarsia gemmatalis* (OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005; Reis, 2009), *Alabama argillacea* (VIDAL *et al.*, 2005), *Anagasta kuehniella* (RAMOS *et al.*, 2009), *Plodia interpunctella* (AMORIN *et al.*, 2008), *Spodoptera litura* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2007), *Mamestra brassicae* (CHOUGULE *et al.*, 2008). Tripsinas com massas moleculares maiores foram encontradas por Wagner *et al.*, (2002) em estudos com *Melolontha melolontha* (Coleoptera) apresentando massas moleculares de 56 e 63 kDa e por Ahmad *et al.*, (1980) com massa de 53 kDa em *Spodoptera litura* (Lepidoptera).

As quimotripsinas são serino proteases, que clivam proteínas nos grupos carboxilas presentes nos aminoácidos aromáticos. A atividade destas enzimas é

baixa no intestino médio de lagartas da ordem Lepidoptera e tem sido caracterizada com detalhes somente em *Pieris brassicae* (LECADET; DEDONDER, 1966). A sequência da quimotripsina-like de *Vespa orientalis* foi determinada e mostrou semelhança com a de quimotripsina de vertebrados (JANY *et al*, 1983)

As cisteíno prteases ocorrem tanto em procariotos como em eucariotos (RAO *et al*, 1998). O mecanismo de ação das cisteíno proteases é muito semelhante ao das serino proteases. A presença de um resíduo de asparagina conservado na proximidade com a histidina catalítica cria a tríade Cys-His-Asn que é considerada análoga a tríade Ser-His-Asp arranjo encontrado em serino proteases (RAO *et al*, 1998). Estas enzimas desenvolvem um papel importante na degradação de proteínas de estoque durante a germinação. Na germinação de sementes, o requerimento de aminoácidos para a síntese de proteínas é fornecido pela proteólise de proteínas de reserva (POMPE-NOKOVAK *et al*, 2002). Também tem um importante papel no sistema de defesa de plantas contra insetos herbívoros e estão envolvidas na morte celular programada de soja, induzida por estresse oxidativo. Em mamíferos, cisteíno proteases desenvolvem um importante papel na degradação lisossomal de proteínas e têm sido relatadas com a invasão de células cancerígenas e com a apresentação de antígenos, as células do sistema imune (ALAVAREZ-FERNANDEZ *et al*, 1999). Cisteíno proteases de parasitas da malária e da esquistosome são consideradas potentes alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra as infecções parasitárias (McKERROW *et al*, 1999)

Nos ácaros, grande parte das informações detalhadas sobre a digestão tem sido obtida dos membros da ordem Ixodida (garrapatos) e da alergenicidade provocada por ácaros da ordem Astigmata (EVANS, 1992; NISBET; BILLINGSLEY, 2000). As enzimas digestivas em ácaros incluem cisteíno proteases, serino proteases e amilases, as estruturas e natureza celular dos sistemas digestivos parecem ser semelhantes aos dos carrapatos. Os principais locais de digestão são o ventrículo e “caecae”, e a hidrólise enzimática ocorre dentro das células digestivas após a fagocitose e pinocitose do conteúdo do intestino (EVANS, 1992; MOTHE; SEITZ, 1981).

Embora poucos trabalhos detalhasse o tipo de enzimas digestivas em ácaros fitófagos, Carrillo *et al* (2011); descreve a atividade enzimática dos ácaros *Tetranychus urticae* e *Brevipalpus chilensis* atacando variedades transgênicas de milho. Estes ácaros apresentaram atividade de catepsina-B, elastase, aminopeptidases, e carboxipeptidases, mas não apresentaram atividade de tripsinas nem quimotripsinas. Estes resultados concordam com o estudo prévio de Nisbete e Billingsley (2000) no qual *T. urticae* foi alimentado com pimenta doce (*Capsicum annuum*). e também determinaram ausência de atividade de serino proteases, mas sim de cisteíno proteases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

Os tomateiros da variedade Santa Clara I-5300 foram cultivados em ambiente protegido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (Figura 3; a-c) conforme Silva e Xavier (2007). Os ácaros *Tetranychus evansi* foram criados no Laboratório de Acarologia e as lagartas *Tuta absoluta* no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, do Departamento de Entomologia da UFV. Os ácaros *Tetranychus urticae* foram criados no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), UFV e as avaliações biológicas foram realizadas no Laboratório de Acarologia/Entomologia, UFV. O experimento foi executado na mesma casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia na qual foram cultivadas as plantas.

3.2. Produção das plantas de tomate

Para a obtenção de plantas de tomate foram utilizadas sementes da variedade Santa Clara I-5300, plantadas em substrato comercial, composto por vermiculita e adubo orgânico (Plantmax, Eucatex Agro), em bandejas de isopor (8 x 16 células) e mantidas em casa de vegetação dentro de gaiolas de cano de PVC revestidas com organza (Figura 3; a-c). Aos 23 dias após a semeadura, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos (1,5 L) contendo o mesmo tipo de substrato, sendo irrigadas diariamente e adubadas a cada 7 dias após transplante com fertilizante (20:5:20 N-P-K) até o momento dos experimentos. Para os experimentos foram utilizadas plantas com 45 dias de idade e com quatro folhas completamente desenvolvidas.

3.3. Criação dos ácaros

Os ácaros foram criados em folhas de tomate da variedade Santa Clara I-5300 e mantidos a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, U.R. $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h. As folhas de tomate coletadas nas quais os ácaros desenvolveram, foram colocadas em potes

plásticos contendo água e dentro de badejas de plástico contendo água com detergente para evitar o escape dos ácaros e contaminaram outras criações.

3.4. Criação das lagartas de *Tuta absoluta*

Os insetos utilizados no estabelecimento da criação foram coletados em lavouras comerciais de tomate em Viçosa, MG. Esta criação foi mantida no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas conforme Leite *et al.*, (1998) e Galdino *et al.*, (2011). As lagartas foram alimentadas com folhas de tomate do cultivar Santa Clara I-5300, cultivada em casa de vegetação sem uso de pesticidas.

3.5. Experimentação

Os experimentos foram constituídos dos seguintes tratamentos: 1- Plantas de tomate limpas (sem herbívoros); 2- Plantas sob ataque de *T. evansi*; 3- Plantas sob ataque de *T. evansi* e *T. urticae* simultaneamente; 4- Plantas sob ataque de *T. urticae*; 5- Plantas sob ataque de *T. evansi* e *Tuta absoluta* simultaneamente; 6- Plantas sob ataque de *T. absoluta*.

Cada planta constituiu uma unidade experimental e o delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições. Para as análises de atividade de lipoxigenases e produção de inibidores de proteases foram coletadas amostras em dois tempos; o tempo 0 (antes da infestação) e o tempo 1 (após sete dias de infestação). As plantas foram infestadas (figura 3; d;f) na segunda folha de baixo para cima com 100 ácaros adultos (100 por espécie nos tratamentos 2, 4 e 5 e 50 ácaros por espécie no tratamento 3) e 3 lagartas de segundo instar de *T. absoluta* (tratamentos 5 e 6). As plantas foram expostas ao ataque dos herbívoros por sete dias, e logo, foram retirados três folíolos atacados, os ácaros de cada espécie e as lagartas de cada planta (Figura 3; g-l).

As amostras foram armazenadas a -80°C o material vegetal e -20 °C os ácaros e insetos para análises posteriores. O restante dos folíolos foi levado para o Laboratório de Acarologia e recortados em discos de 1,5 cm de diâmetro para iniciar os ensaios de avaliação biológica do ácaro *T. evansi* (Figura 3; o-q).

3.6. Análise da Atividade Enzimática nas Plantas

3.6.1. Obtenção do extrato foliar

Os extratos foliares dos tomateiros foram obtidos a partir da folha coletada (segunda folha desenvolvida). As folhas foram limpas com o auxílio de um pincel para retirada das lagartas, dos ácaros, teia e fezes. Os folíolos foram cortados com uma tesoura e acondicionados em caixas de isopor em envelopes de alumínio, cobertas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para serem processadas posteriormente (Figura 3; g-i).

O preparo do extrato foliar foi realizado a 4°C , de acordo com o método descrito por Ohta *et al* (1986). O material vegetal foi pesado em balança analítica macerado com o auxílio de pistilo e almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó ao qual foi adicionado uma solução tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 e 20mM CaCl_2 (inibidor de proteases e concentração de proteína) o de tampão Fosfato de sódio 0,05M pH 6,5 (lipoxigenases); 1:3 (p/v). O extrato foi homogeneizado e colocado em eppendorf de 2 mL e em seguida centrifugado a 17.200 g por 60 minutos a 4°C (BATISTA *et al.*, 2002). O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade de lipoxigenases, da concentração de proteína total e da concentração de inibidores de proteases.

3.6.2. Determinação dos inibidores de proteases.

A presença de inibidores no extrato foliar foi determinada utilizando tripsina purificada. A determinação foi baseada no seguinte procedimento analítico: 50 μL do extrato foliar; 500 μL de Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl_2 e 50 μL da solução de tripsina $4,7 \times 10^{-5}$ M, adicionados em um tubo de ensaio. Para o controle da enzima foram adicionados, a outro tubo de ensaio, 550 μL de Tris-HCl 0,1M; pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl_2 ; e 50 μL da solução de tripsina $4,7 \times 10^{-5}$ M.

A mistura contida em cada tubo (teste e controle da enzima) foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente para a tripsina atuar com o tampão. Após o tempo de incubação, 500 μL dessa mistura e do respectivo controle serão retirados e adicionados a outro tubo contendo 500 μL Tris-HCl 0,1M pH 8,2 contendo 20 mM

de CaCl₂ e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorbância da solução foi determinada a 410 nm a cada 30 segundos durante 2,5 minutos de reação.

A determinação da concentração de proteína do extrato foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando como padrão uma solução de 0,2 mg/mL de soro albumina bovina (BSA). Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{AxB}{Cx1000xP}$$

Em que:

A = absorbância em 410 nm do controle – absorbância em 410 nm do teste;

B = diluição da amostra;

P = concentração, em g/mL, de proteína dos extratos; e

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

3.6.3. Determinação da atividade de lipoxigenases.

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por Axelrod *et al.*, (1981). Nesse método é determinado o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado.

Foi preparada uma solução estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% de pureza (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, adiciona-se 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de tween 20 (SIGMA). Em seguida, a solução foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta automática, tomando o cuidado para não formar bolhas. Para o clareamento da solução foram adicionadas gotas de solução de NaOH 0,5M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL

envolvido por papel alumínio e o volume aferido. A solução estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos plásticos de 1,5 mL com tampa envolvidos em papel alumínio e armazenados a -20 °C.

Para as análises das atividades de lipoxigenases, foram misturados 1,0 µL do extrato bruto foliar e 4,0 µL da solução estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,5. A absorvância da mistura de reação foi determinada a cada 30 segundos a 234 nm por um período de 2,5 minutos. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. A partir dos valores de absorvância obtidos a 234 nm foram calculadas as velocidades de formação dos produtos utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Velocidade de formação de produto} = \frac{A_{234}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A₂₃₄ = absorvância a 234 nm

ε = 25000 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico a 234 nm).

t = 120 segundos (tempo de incubação).

l = 1,0 cm (caminho ótico).

3.7. Análise da Atividade Enzimática nos Herbívoros

3.7.1. Obtenção do extrato enzimático.

De acordo com Cerna *et al.*, (2010), a quantidade de fêmeas adultas para a obtenção das melhores leituras de concentração de proteínas são entre 30 a 100 indivíduos. Neste trabalho, cinquenta fêmeas adultas de *Tetranychus evansi* e *T. urticae* e três lagartas entre segundo e terceiro instar foram coletadas em tubos plásticos de 1,5 mL contendo 1 mL de solução HCl 10⁻³ M a 4 °C (Figura 3; l-n). No laboratório, os ácaros foram maceradas com bastão de vidro estéril, e as lagartas em almofariz com auxílio de um pistilo, sobre banho de gelo adicionando 1 mL de solução HCl 10⁻³ M a 4 °C e centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005). O sobrenadante contendo o

material solúvel, chamado de extrato bruto, foi utilizado para análises posteriores.

3.7.2. Determinação da concentração de proteína.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se BSA na faixa de concentração de 0-0,2mg/mL como padrão.

3.7.3. Determinação de atividade de proteases totais.

A atividade proteásica foi determinada segundo o método descrito por Tomarelli *et al.*, (1949) utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 37°C. A mistura reacional consistiu em 50 µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático, sendo incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a parada de reação as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso no gelo por 15 minutos. Em seguida, os tubos plásticos de 2 mL com tampas contendo as amostras foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 25°C para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 µL do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 280 µL de NaOH 1M. As absorbâncias foram determinada a 440 nm e os valores divididos entre a concentração de proteínas totais expressadas em mg/mL para a obtenção da atividade específica. O experimento foi realizado em uma série de quatro repetições por tratamento e em triplicatas.

3.7.4. Determinação de atividade de serino-proteases.

3.7.4.1. Tripsinas-like

A atividade amidásica foi determinada segundo o método descrito por Erlanger *et al.*, (1961), utilizando-se o substrato cromogênico para tripsina-like L-BApNA (N- α -Benzoil-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 500 µL de substrato e 10 µL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi

obtida a 410 nm em função do tempo (2,5 min) a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto p-nitroanilida, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹cm⁻¹. A partir dos valores de absorvância obtidos a 410 nm foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

$$A = \frac{A_{410}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A₄₁₀ = absorvância a 410 nm

ε = 8800 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar).

t = 150 s (tempo de incubação).

l = 1,0 cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL) e convertidas a μmol/s/mg de proteína

A atividade esterásica foi determinada utilizando-se o substrato L-TAME (N-α-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride) na concentração final de 0,1 mM a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM CaCl₂. A mistura reacional consistiu de 500 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 500 μL de substrato e 10 μL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorvância da amostra foi obtida a 247 nm por 2,5 minutos utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540 M⁻¹cm⁻¹. A partir dos valores de absorvância obtidos a 247 nm foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

$$A = \frac{A_{247}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A₂₄₇ = absorvância a 247 nm

ε = 540 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar).

t = 150 s (tempo de incubação).

l = 1,0 cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL) e convertidas a μmol/s/mg de proteína

3.7.4.2. Quimotripsinas-like

A determinação da atividade de quimotripsina foi realizada pelo método de Erlanger *et al.*, (1961), utilizando-se o substrato cromogênico para quimotripsina-like L-BTpNA (N-Benzoil-L-tyrosine p-nitroanilide) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 500 µL de substrato e 10 µL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 410 nm em função do tempo (2,5 min) a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto p-nitroanilida, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹cm⁻¹. A partir dos valores de absorvância obtidos a 410 nm foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

$$A = \frac{A_{410}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A₄₁₀ = absorvância a 410 nm

ε = 8800 M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar).

t = 150 s (tempo de incubação).

l = 1,0 cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL) e convertidas a µmol/s/mg de proteína

3.7.5. Determinação de atividade de cisteíno-proteases.

A atividade amidásica de cisteíno-proteases foi realizada pelo método descrito por Erlanger *et al.*, (1961) com modificações conforme Mendonça *et al.*, (2011 e 2012), utilizando-se 500 µL do substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil p-nitroanilina (L-BapNA) na concentração final de 0,5 mM, a 25°C e 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20mM de CaCl₂ e 5mM de Ditioneitol (DTT) para garantir que o resíduo de cisteína esteja reduzido. Ao extrato foi adicionado 100 µL do inibidor de serino-protease benzamidina na concentração final de 1mM, a qual corresponde ao K_i de inibição de tripsinas-like por benzamidina. A reação foi realizada durante 2,5 minutos com leitura de absorbância a 410 nm a cada 30 segundos. Para a determinação da atividade foi

utilizado o coeficiente de extinção molar do produto formado, p-nitroanilina, $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A partir dos valores de absorvância obtidos a 410 nm foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

$$A = \frac{A_{410}}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

onde :

A_{410} = absorvância a 410 nm

ϵ = $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar).

t = 150 s (tempo de incubação).

l = 1,0 cm (caminho ótico).

A atividade específica foi obtida dividindo os valores das atividades (M/s) pela concentração de proteína (mg/mL) e convertidas a $\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína

3.7.6. Análises estatísticas

Os valores obtidos foram transformados para raiz quadrada de “x” com a finalidade de reduzir o coeficiente de variação. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov–Smirnov para concentração de inibidor de proteases ($D = 0,1254$; $p = 0.8006$), atividade de lipoxigenases ($D = 0,1436$; $p = 0.6537$) atividade proteases totais ($D = 0,1282$; $p = 0.7472$), atividade amidásica de tripsinas-like ($D = 0,1455$; $p = 0.5941$), atividade esterásica de tripsinas-like ($D = 0,0844$; $p = 0.9885$), atividade amidásica de quimotripsinas-like ($D = 0,1691$; $p = 0.3588$) e cisteino proteases ($D = 0,1714$; $p = 0.3829$).

Em todos os análises, foram verificadas as pressuposições para análise de variância (ANOVA) de um fator de interesse pelo teste F a 5% de significância e comprovar diferenças entre tratamentos. Comprovadas as diferenças, as medias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey HSD ($p < 0,05$) para os valores de inibidores de proteases e lipoxigenases entre os tratamentos. No caso dos valores de atividades de proteases, foram avaliados os dados obtidos para cada espécie de herbívoro entre todos eles por médio de uma ANOVA (de um fator), mas como as variâncias dos tratamentos dentro e entre as espécies foram muito discrepantes procedeu-se a comparar as variâncias dos tratamentos de cada espécie de herbívoro pelo teste F a 5% de significância.

Assim comprovado se as variâncias dos tratamentos comparados foram homogêneas ou heterogêneas as medias dos tratamentos foram comparadas com o teste t-Student a 5% de significância. Os perfis de atividade das serino e cisteino proteases foram submetidas a uma análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$) para determinar quais foram mais semelhantes com o perfil de atividade de proteases totais. Os procedimentos estatísticos foram realizados através do software Excel de Micorsoft e o software estatístico R version 3.0.2 (R Core Team, 2013).

3.8. Avaliação Biológica

Os ensaios foram conduzidos a 25 °C, 70 ± 5% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas. Como substrato, foram avaliadas folhas de tomateiros, pré-infestadas por sete dias, tal como nos tratamentos. Para avaliar a oviposição, foram feitos discos das folhas expostas aos tratamentos, 4 repetições por tratamentos, cada repetição constituída de 8 discos (192 discos no total) nos quais foi colocada uma fêmea adulta por disco obtidas da criação massal sendo essas fêmeas de 2 dias de idade e acasaladas (Figura 3; o-q).

As fêmeas ovipositaram por quatro dias que é o tempo em que *T. evansi* atinge a maior taxa de oviposição e os ovos contabilizados a cada dia. Os discos foram mantidos 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).

4.8.1 Análise estatística

Os valores de oviposição de cada dia foram analisados e determinou-se que os valores dos dias 2 e 4 foram corretos de acordo ao esperado. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov–Smirnov para os dados do dia 2 ($D = 0.112$, $p = 0.03105$), dia 4 ($D = 0.0972$, $p = 0.08665$) e a oviposição foi analisada obtendo a media de ovos por dia por fêmea em cada tratamento ($D = 0.0757$, $p = 0.2971$), assim contando 28 repetições para o tratamento I, III e IV; 30 para tratamento II; 27 para tratamentos V; e 25 para tratamento IV.

Com a finalidade de testar a diferença entre as médias dos tratamentos para a oviposição, os valores das medias foram transformados para raiz de "x" e logo verificadas as pressuposições foi feito o teste F a 5% de significância através de análise de variância ANOVA de um fator e o teste Tukey HSD foi aplicado a 5% de significância para comparação de médias dos tratamentos.



Figura 3. Metodologia de experimentação: Detalhe das gaiolas de PVC com organza, onde foram cultivadas as plantas e aplicado o experimento em 6 tratamentos (a-c). Coleta dos ácaros e lagartas assim como infestação das plantas (d-f). Coleta das amostras de folíolos para análises de PI e LOX (g-k). Detalhe dos danos causados por ácaros e as lagartas assim como coleta das amostras de herbívoros para análises de proteases digestivas (l-n). Seleção de fêmeas e disposição dos discos folhares para experimento de oviposição (o-q).

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1. Reposta de defesa do tomate

Observaram-se diferenças significativas na atividade de lipoxigenases ($F_{5,17}=14,27$; $p<0,001$) e concentração de inibidores de proteases ($F_{5,17}=17,31$; $P<0,001$). Os valores de atividade específica de lipoxigenases das plantas antes de serem submetidas aos tratamentos (tempo 0) foram muito baixos e com pouca variabilidade, confirmando que as plantas posteriormente infestadas apresentavam todas os níveis semelhantes de compostos a serem avaliados e estavam livres de danos que ativam as repostas de defesa. Após sete dias de infestação dos herbívoros nas plantas, os danos causados ativaram a reposta de defesa pela via das lipoxigenases, atingindo diferentes graus de atividade correspondente ao tipo de herbívoro ou a combinação deles nas plantas (Figura 4).

Plantas que foram atacadas apenas pelo o ácaro vermelho *T. evansi* não diferem das plantas controle nem das plantas coletadas no início do experimento (tempo 0), ou seja se comprova que o ácaro vermelho não induz a reposta de defesa pela via de sinalização do ácido jasmônico (SARMENTO *et al.*, 2011a). Da mesma forma se comprova que o ácaro rajado *Tetranychus urticae* ativa esta via de reposta de defesa no tomateiro (THALER *et al.*, 2002; KANT *et al.*, 2004; SARMENTO *et al.*, 2011; KAWAZU *et al.*, 2012) em um nível até 3,5 vezes mais atividade de LOX que a lagarta minadora, *Tuta absoluta* e 7 vezes que o nível normal da planta sem ataques por herbívoros.

Aparentemente a particularidade de supressão da reposta de defesa por *T. evansi* consegue reduzir significativamente a atividade de LOX quando atacam plantas de tomate simultaneamente com *T. urticae*, comparando com plantas atacadas apenas por *T. urticae* embora as repostas fossem induzidas e a atividade de LOX até 4 vezes mais que em plantas limpas. Entretanto no caso de ataques simultâneos de *T. evansi* com *Tuta absoluta* a atividade de LOX aumentou significativamente em comparação a atividade induzida pela lagarta. Mas estes valores (*T. evansi*+*T. absoluta*; Figura 4) não diferem da atividade de LOX nas plantas atacadas por *T. evansi* e *T. urticae* simultaneamente.

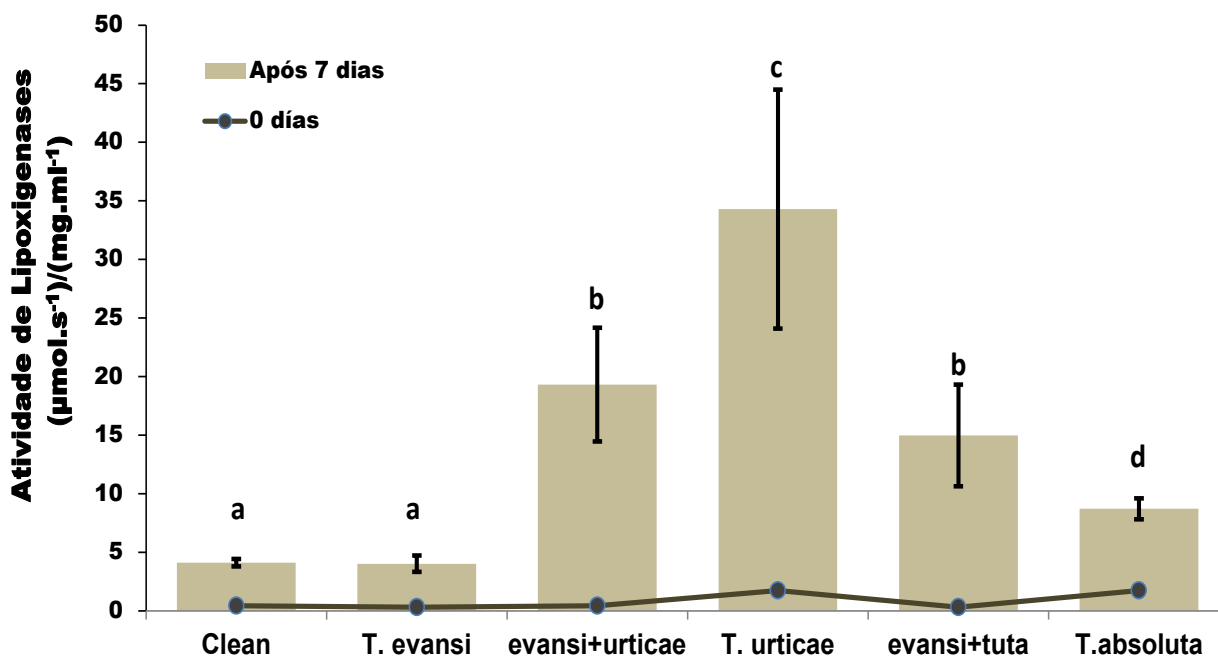


Figura 4. Atividade específica de LOX ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)/($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) de plantas de tomate antes de serem infestadas (0 dias) e após 7 dias de infestação de acordo com tratamentos. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 4) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Para os valores de concentração de inibidores de proteases nas plantas coletadas antes da infestação (tempo 0) apresentaram concentrações muito baixas e com pouca variação entre os tratamentos, confirmando que as plantas infestadas apresentaram inicialmente todos níveis semelhantes dos compostos a serem avaliados e estiveram livres de danos que ativam as repostas de defesa antes de serem submetidas aos tratamentos. Após sete dias de ataque pelos herbívoros a resposta de defesa pela via das LOX foi induzida e a atividade trípica (IP) apresentou diferentes níveis de acordo com os tratamentos. Da mesma forma que na atividade de LOX, as plantas atacadas unicamente pelo ácaro vermelho *T. evansi*, expressaram a mesma concentração de IP que as plantas limpas após sete dias de infestação. Não obstante Sarmiento *et al.*, (2011a) descreveram que plantas atacadas por *T. evansi* apresentaram concentrações de IP inferiores (-2 vezes) aos de plantas limpas, os resultados do presente trabalho mostram que igualmente *T. evansi* não induziu a produção de IP (Figura 5).

A pesar dos valores de IP plotados apresentarem um comportamento similar que das LOX, a concentração de IP não tiveram diferença significativa entre as

plantas atacadas por *T.urticae* e *T. absoluta*, nem plantas atacadas por estes herbívoros simultaneamente com *T. evansi*. Isto devido ao alto coeficiente de variação nos dados. A presença de *T. evansi* em plantas atacadas por *T. urticae*, aparentemente reduz os níveis de IP conferindo com os resultados de Oliveira (2012), quem demonstrara que plantas atacadas simultaneamente por estas duas espécies de ácaros induziram níveis de IP inferiores aos níveis induzidos por *T. urticae*, pelo que o efeito de não indução de IP *T. evansi* consegue nivelar essa reposta.

Os níveis de IP em plantas atacadas por *T. absoluta* não diferem de plantas atacadas por esse herbívoro mais *T. evansi*. Embora o padrão do perfil de IP da interação de *T. evansi* com os outros herbívoros seja semelhante ao perfil da LOX, os dados mostram que o ataque simultâneo de *T. evansi* junto a herbívoros com diferentes mecanismos de alimentação, não apresentam variações na concentração de IP.

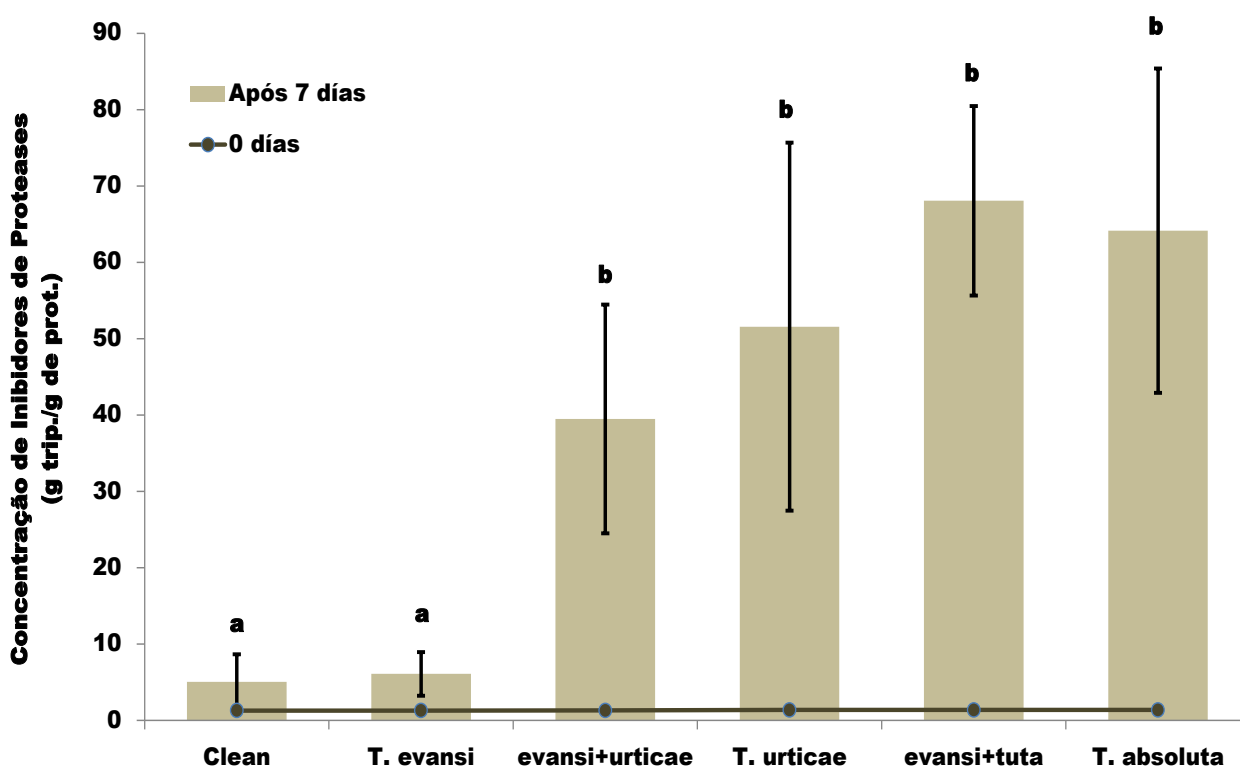


Figura 5. Concentração de IP (g de tripsina inibida/g de proteína) de plantas de tomate antes de serem infestadas (tempo 0) e após 7 dias de infestação de acordo com tratamentos. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 4) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Tem sido atribuído às lipoxigenases de plantas, além das funções de defesa (BLÉE, 2002), o envolvimento em processos de crescimento e desenvolvimento (HILDEBRAND, 1989; SIEDOW, 1991; BLEE, 2002), senescência (ROUET-MAYER *et al.*, 1992; BLÉE, 2002) e reserva vegetativa (TRANBARGER *et al.*, 1991; BUNKER *et al.* 1995). Isso justifica a atividade destas enzimas nas plantas, que não receberam ataque de herbívoros. O aumento da atividade nestas plantas provavelmente está relacionado a funções fisiológicas da planta.

No tomateiro a indução da reposta de defesa é regulada pela expressão de genes e o nível de reposta depende tanto do dano causado como do tipo de herbívoro (STOUT *et al.*, 1998). O ácaro *T. urticae* e *Tuta absoluta* apresentaram atividade de LOX significativamente maior que das plantas limpas. Estes herbívoros induziram a via da resposta ao estresse pelo que ocorre degradação sequencial de lipídeos pela lipoxigenases, estes formam hidroperóxidos de ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos (SILVA *et al.* 2001). Entre eles estão a traumatomina, envolvida na resposta a ferimentos e na indução da divisão celular e formação de calos (SIEDOW, 1991); e o ácido jasmônico, associado à ativação de genes que codificam para a síntese de proteínas de reserva e inibidores de proteases (MELAN *et al.* 1993).

O nível de indução do gene WIPI-II, que é dependente de ácido jasmônico e ativado após ataque de herbívoros foi avaliado por Sarmento, *et al.*(2011a) em plantas atacadas pelos ácaros *T.evansi*, *T. urticae* independentemente e em plantas limpas. *T. urticae* induziu expressivamente os níveis deste gen. Porém em plantas atacadas por *T. evansi* e plantas limpas não houve indução deste gene. Os resultados dos níveis de LOX e IP do presente trabalho, relativos a plantas atacadas por *T. evansi* e *T. urticae* concordam com os resultados de Sarmento e colaboradores. Precisa-se realizar a avaliação destes e outros genes para entender melhor a relação da expressão génica com atividade das LOX e concentração de IP na interação de *T.evansi* e *T. absoluta*. Assim para determinar quanto da atividade das LOX esta expressando a ativação de genes relacionados à produção de IP e genes relacionados a outras funções como divisão celular e formação de calos.

Kawazu *et al.*, (2012) compararam os perfis de genes induzidos dos ácidos salicílico (AS genes PRb-1b e GluB) e jasmônico (AJ genes Pin2 e LapA1) em tomate quando as plantas são atacadas por diferentes herbívoros entre eles a mosca minadora *Liriomyza sativae* e acharam variação na indução dos genes avaliados. Assim, lagartas *Spodoptera litura*, *S. exigua* e tripes *Frankiniella occidentalis* ativaram principalmente genes do ácido jasmônico em níveis similares a danos mecânicos; o ácaro rajado *T. urticae* ativo só um dos genes do ácido jasmônico (LapA1) e dois genes do ácido salicílico; e quando as moscas minadoras ovipositaram nas folhas ativaram os genes induzíveis do AJ. Mas quando as lagartas começaram alimentar estes genes e a defesa da planta por esta via aparentemente foram suprimidos pela ativação dos genes do AS. Ao ser *T. absoluta* uma lagarta minadora de folhas de tomate poderia estar acontecendo uma situação similar com a mosca minadora, o que poderia explicar a variação da expressão das LOX com respeito à expressão de IP.

Por extenso, *T. evansi* manipula a resposta de defesa do tomateiro, fazendo com que a planta não expresse genes que codificam a produção de IP e assim o ácaro consegue obter maiores taxas de oviposição e sobrevivência de adultos (SARMENTO *et al.*, 2011 a; b). Esta manipulação pode significar um custo fisiológico e ecológico para *T. evansi*, por exemplo, a baixa da defesa da planta pode beneficiar outros herbívoros como *T. urticae* (SARMENTO *et al.*, 2011b; OLIVEIRA, 2012) que poderia competir com *T. evansi* incrementando ou melhorando o desenvolvimento o que poderia afeitar a estrutura da comunidade de herbívoros em plantas atacadas por *T. evansi*. Mas, para o caso de *Tuta absoluta* parece não ser assim, devido a o incremento da atividade de LOX e IP quando estas estão junto a *T. evansi* na planta.

4.2. Efeito da resposta de defesa do tomate na taxa de oviposição de *T. evansi*

A quantidade de ovos colocados por fêmea em cada disco foliar foi contabilizada por quatro dias obtendo-se a média de oito fêmeas por repetição em quatro repetições por tratamento (Figura 6). Observaram-se diferenças significativas na média de ovos colocados no segundo dia ($F_{5;159}=4,84$; $p<0,001$),

no quarto dia ($F_{5;159}=4,04$; $p<0,001$) e para a media geral de ovos colocados por fêmea por dia ($F_{5;159}=5,82$; $p<0,001$).

A maior taxa de oviposição apresentou-se nos discos das folhas que foram previamente atacados por coespecíficos e significativamente diferentes dos outros tratamentos exceto do controle (plantas limpas). A menor taxa de oviposição foi em discos de plantas previamente atacadas por *T. urticae*, significativamente menores que em plantas limpas e plantas atacadas unicamente por *T. evansi*. Ainda para este tratamento a taxa de oviposição foi menor que para tratamentos em que as plantas foram atacadas por dois herbívoros simultaneamente (evansi+urticae; evansi+tuta) e *T.absoluta*, mas estes não apresentaram diferenças significativas com o controle (Figura 7).

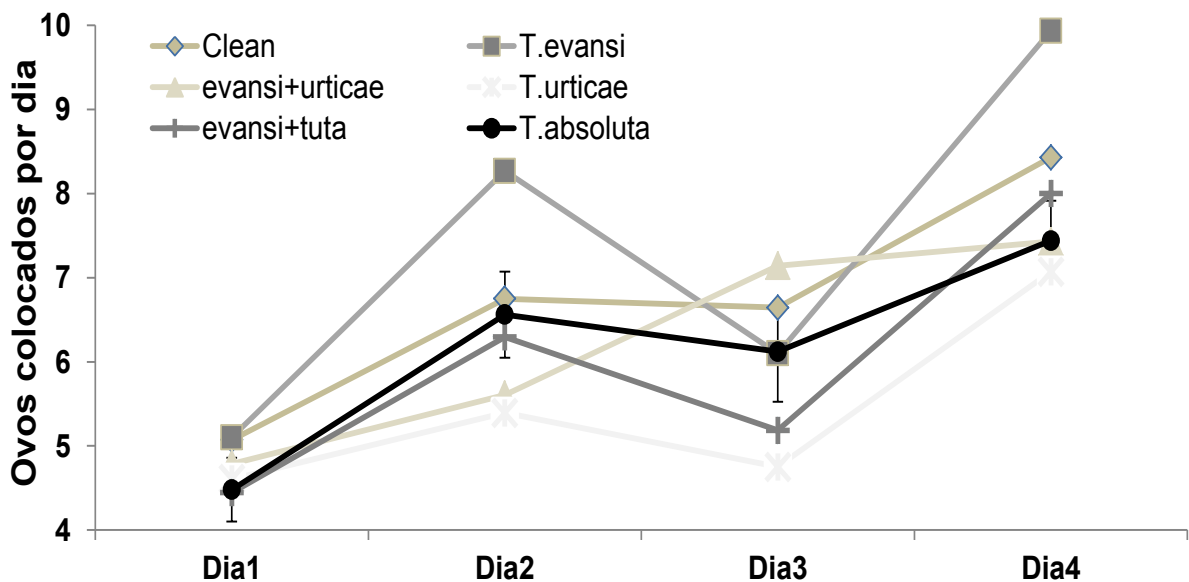


Figura 6. Media de ovos colocados por fêmea em cada dia de avaliação sobre discos foliares de plantas infestadas por sete dias de acordo aos tratamentos.

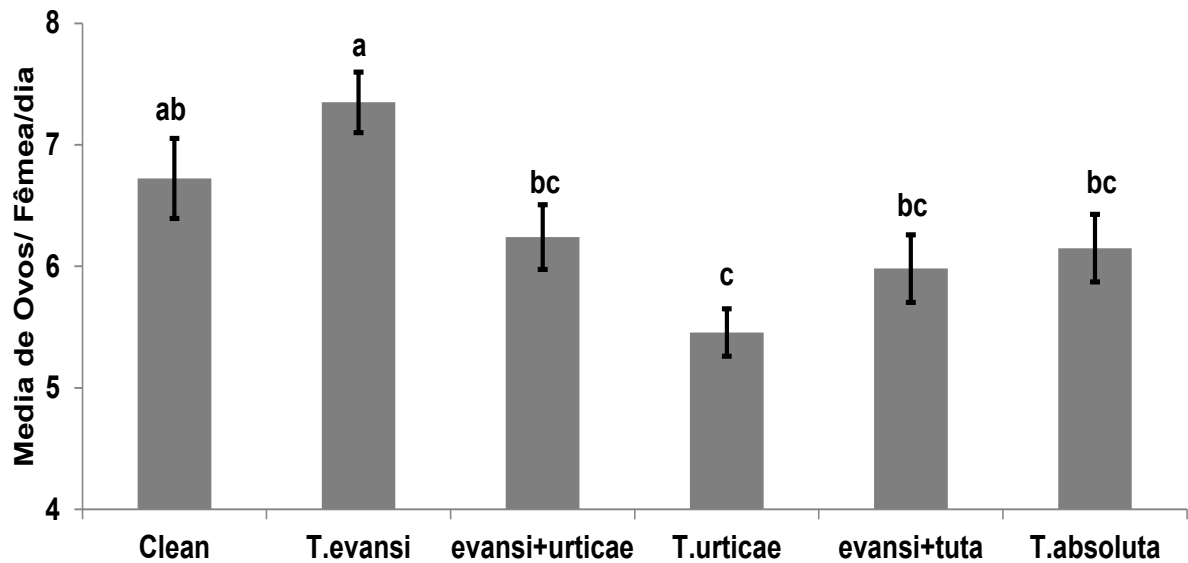


Figura 7. Média de ovos colocados (fêmeas/dia) por *T. evansi* sobre discos foliares de plantas infestadas por sete dias de acordo aos tratamentos. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 25, 27 e 30) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

As plantas podem ser atacadas por mais de uma espécie de herbívoro, e as interações das plantas com estes herbívoros podem afetar as preferências e desenvolvimento dos herbívoros e inimigos naturais, dependendo da identidade e quantidade das espécies de artrópodes que se alimentam na planta (RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2005). Sarmiento *et al.*, (2011a) relatam que *T. evansi* apresentou maiores taxas de oviposição em plantas previamente atacadas por coespecíficos que em plantas limpas e maiores que em plantas atacadas previamente por *T. urticae*. O que sugere que *T. evansi* é sensível às defensas induzidas por *T. urticae*. Também determinaram que o efeito negativo no desenvolvimento de *T. urticae* nestas plantas foi de acordo aos altos níveis de inibidores de proteases, concluindo que os altos níveis de IP afetaram o desenvolvimento de *T. evansi*. O mesmo pode-se inferir dos resultados obtidos no presente trabalho, pelo menos para os tratamentos controle (plantas limpas com baixo nível de IP), plantas atacadas por *T. evansi* (baixo nível de IP) e plantas atacadas por *T. urticae* (alto nível de IP) (Figura 5).

No entanto em plantas atacadas por *T. absoluta* na ausência e presença de *T. evansi* assim como em plantas atacadas por *T. evansi* e *T. urticae* simultaneamente apresentaram altos níveis de IP, mas também taxas de

oviposição igual a plantas limpas (Figura 5). A diferença de resultados anteriores em que a oviposição de *T. evansi* no quarto dia foi significativamente menor em plantas atacadas por *T. evansi* e *T. urticae* simultaneamente que em plantas limpas (OLIVEIRA, 2012). Nossos resultados podem sugerir que os IP não tem total efeito no desenvolvimento de *T. evansi*, mas por outras defesas da planta tais como as vias de sinalização do ácido salicílico possivelmente induzidas por *T. urticae* (SARMENTO, *et al.*, 2011a), e o efeito dos rastros deixados por este. Pero não parecem ter efeito quando estas duas espécies interagem ao mesmo tempo na planta, possivelmente por causa da teia produzida por *T. evansi* a qual reduz a capacidade de *T. urticae* de se alimentar e desenvolver (SARMENTO 2011b). Essa competitividade não parece acontecer o induzir outras vias de defesa na relação com a lagarta *T. absoluta*.

Nossos resultados sugerem que o ataque simultâneo de mais de um herbívoro em plantas de tomate induz alterações fenotípicas mais complexas que o ataque de uma única espécie de herbívoro o que poderia afetar o desenvolvimento de *T. evansi* (van ZANDT; AGRAWAL, 2004; DICKE *et al.*, 2009).

4.3 Atividade de enzimas digestivas dos herbívoros em relação a reposta de defesa do tomate.

As proteases totais, serino e cisteíno proteases foram avaliadas para cada uma das espécies de herbívoros e os valores das atividades para cada espécie de acordo as interações. Ainda que alguns estudos avaliassem atividade de enzimas digestivas em ácaros, e para o caso de herbívoros como *T. urticae* não foram detectadas serino proteases do tipo tripsina-*like* e quimotripsina-*like* (NISBETE; BILLINGSLEY, 2000; CARRILLO *et al.*, 2011), essas enzimas foram detectadas no presente trabalho.

Para as proteases totais obteve-se que *T. evansi* apresentou menor atividade quando foi a única espécie alimentando-se na planta quando comparado com a presença de *T. urticae* ou *T. absoluta*. ($t=-3.1576$, $g.l=4.751$, $p=0.027$). Também apresentou menor atividade que *T. urticae* sem a presença de *T. evansi* ($t=-8.338$, $g.l=4.989$, $p=0.00041$) e menor atividade que *T. absoluta* quando estava na presença de *T. evansi* ($t=4.4871$, $g.l=5.278$, $p=0.0056$). No caso de *T. urticae* e

T. absoluta as interações com *T. evansi* não foram significativas para estas espécies (Figura 8).

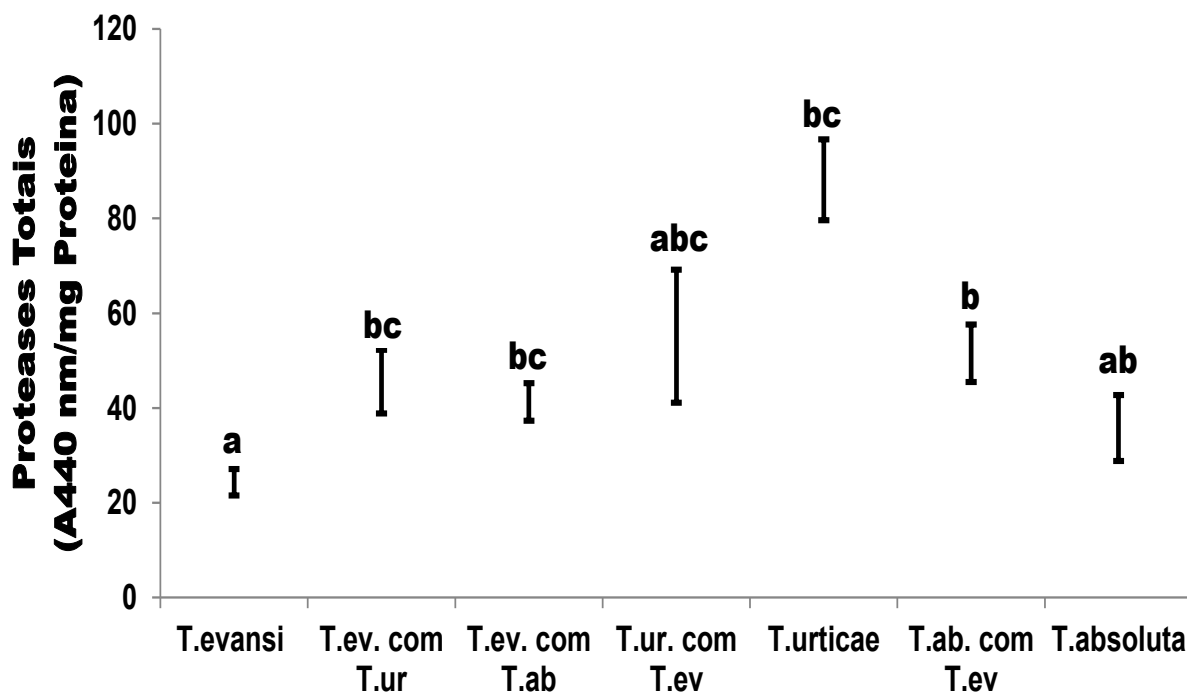


Figura 8. Atividade de proteases totais (Absorvância 440 nm/mg de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 4) entre as espécies seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância.

A atividade das serino e cisteíno proteases foi correlacionada com a atividade das proteases totais, sendo as serino proteases Trisina-*like* tanto na atividade amidásica ($r=0,83$) como esterásica ($r=0,88$) as que apresentaram maior porcentagem de correlação (Figura 9). Ainda foram estas as proteases que mais se ajustaram ao perfil das proteases totais, só a atividade amidásica do ácaro *T. urticae* foi maior que *T. evansi* ($t = -2,93$, g.l.=5.989, $p=0,026$) e que *T. absoluta* ($t = -4,8838$, g.l.=6, $p=0,0027$) (Figuras 10 e 11).

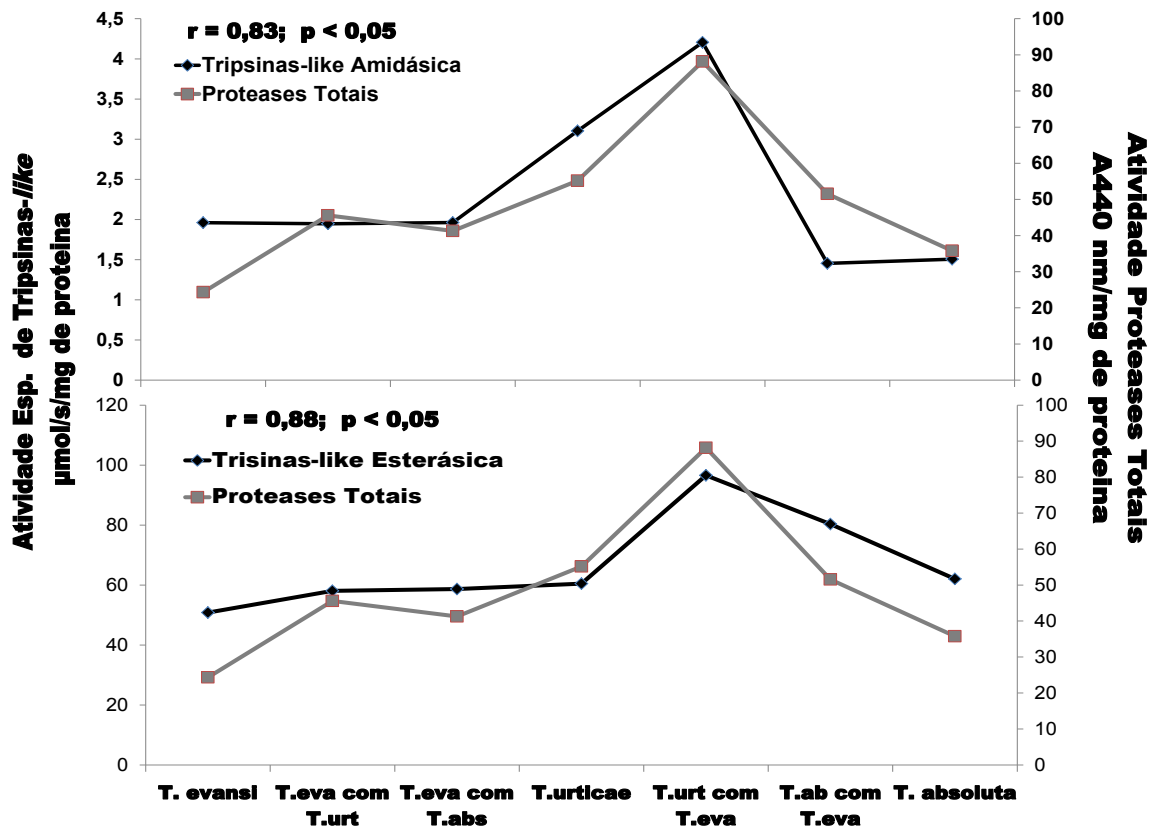


Figura 9. Correlação das atividades amidásicas e esterásicas de serino proteases Tripsina-like com atividade de proteases totais pelo índice de Correlação de Pearson.

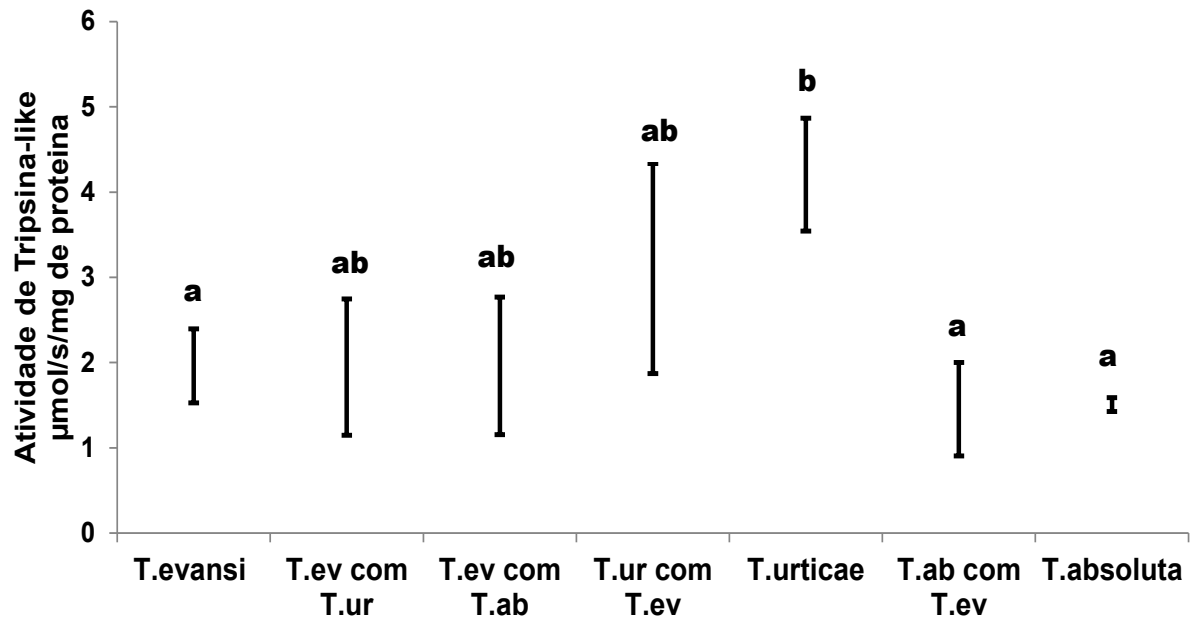


Figura 10. Atividade amidásica de Tripsinas-like (µmol/s/mg de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM; n= 4) entre as espécies seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância.

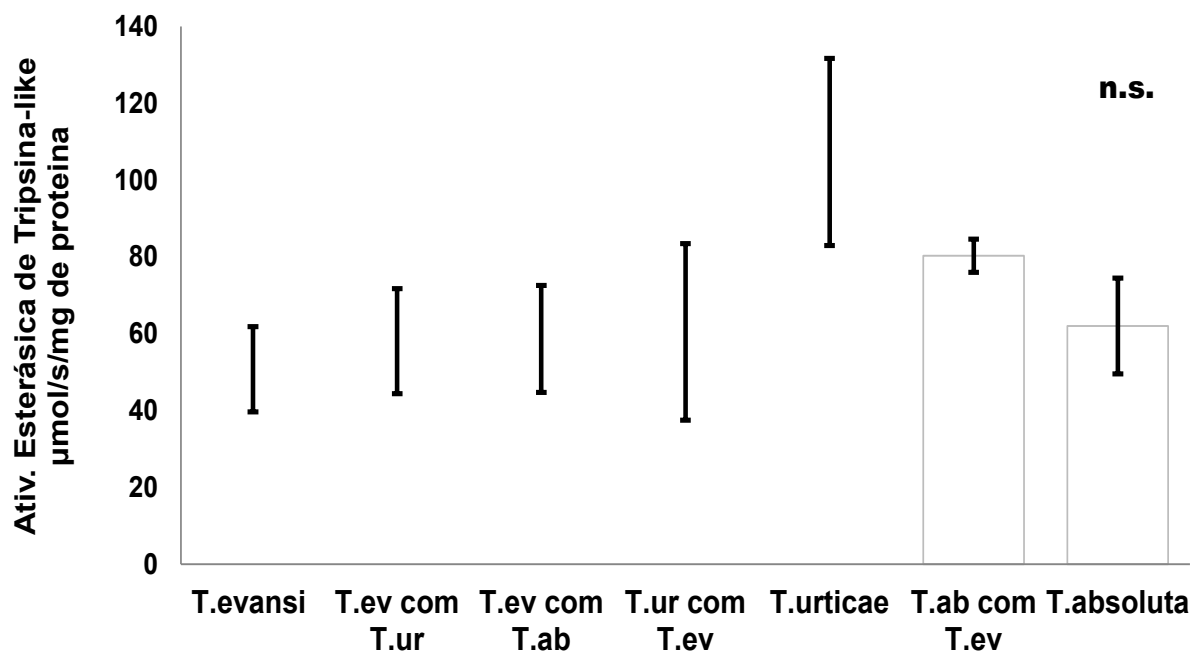


Figura 11.Atividade esterásica de Tripsinas-*like* ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM; $n= 4$) não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância.

Para a atividade amidásica de Quimotripsinas-*like* o ácaro *T. evansi* não apresenta diferença na atividade quando estava alimentando-se em interação com outro herbívoro ou sozinho na planta. Mas apresenta maior atividade que *T. urticae* ($t=-2.9244$, $gl=5.663$, $p=0.0283$) e maior atividade que *T. absoluta* ($t=3.0154$, $gl=4.658$, $p=0.032$). A atividade em *T. absoluta* quando infestava a planta junto com *T. evansi* foi mais alta que quando esta lagarta estava sozinha alimentando-se na planta ($t=5.3285$, $gl=5.51$, $p=0.0023$) (Figura 12).

Para as cisteíno proteases, os valores que apresentaram diferença significativa foi entre uma maior atividade de *T. absoluta* em interação com *T. evansi* com a atividade da mesma espécie sendo o único herbívoro na planta (Figura 13). Esta tendência é correspondente ao observado nas atividades de quimotripsinas-*like*, tripsinas-*like* e proteases totais.

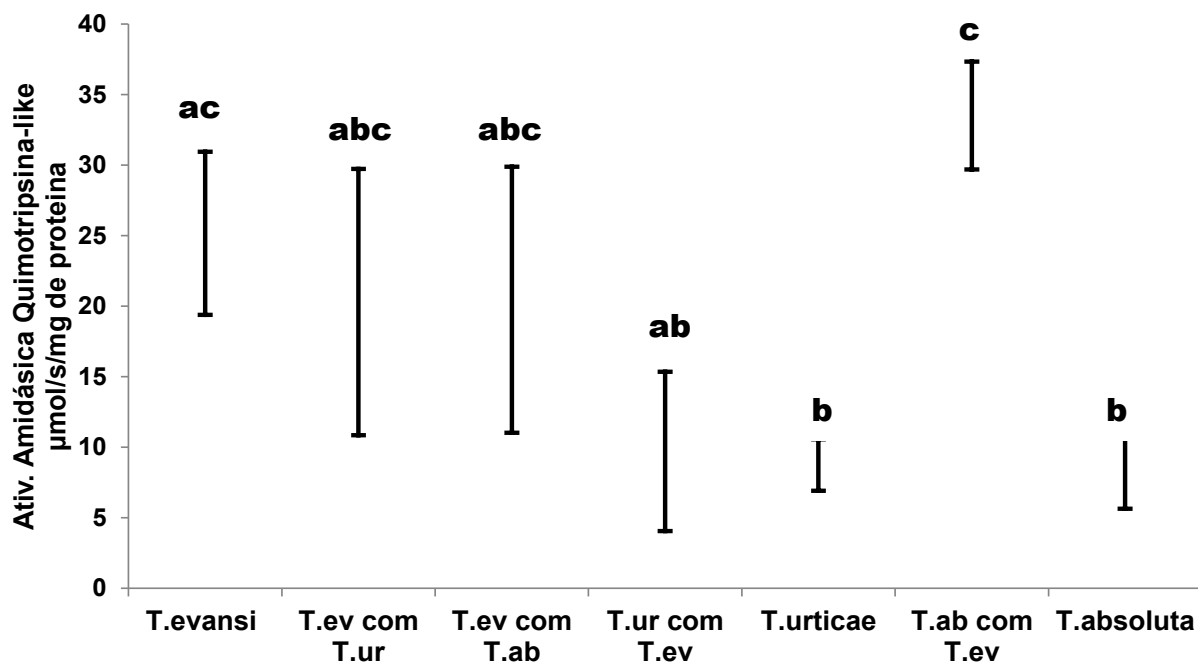


Figura 12. Atividade amidásica de Quimotripsinas-like ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias (+ SEM; $n=4$) dos tratamentos entre as espécies seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância.

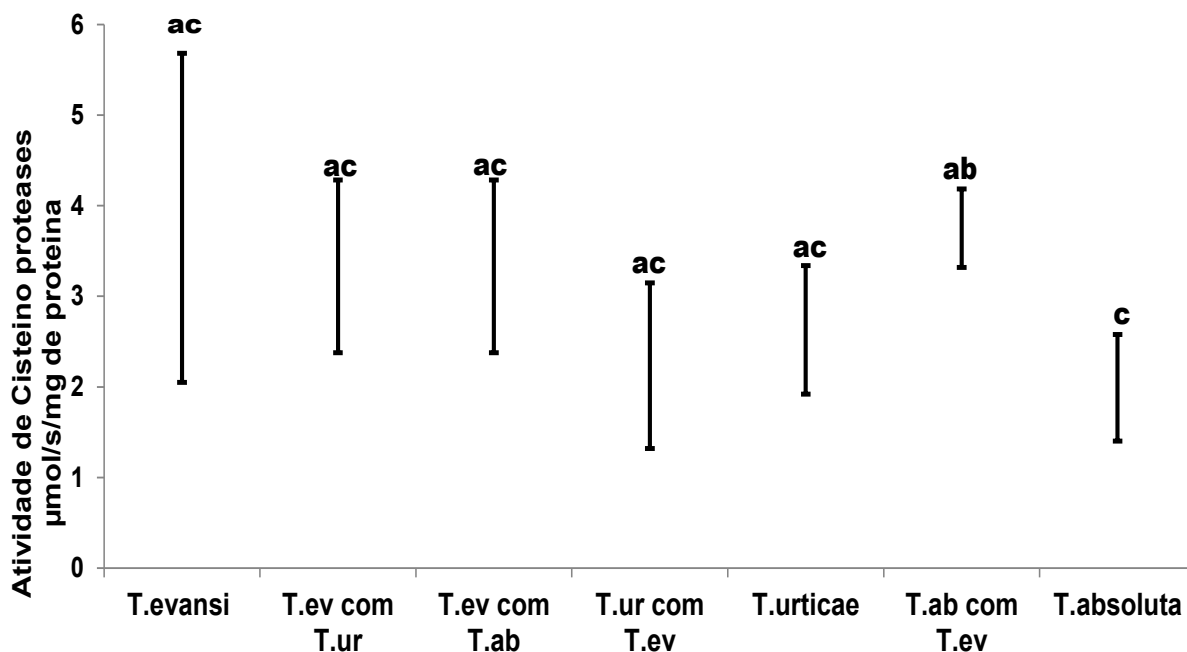


Figura 13. Atividade de Cisteino proteases ($\mu\text{mol/s/mg}$ de proteína) para as espécies de herbívoros de acordo as interações. Médias dos tratamentos (+ SEM; $n=4$) entre as espécies seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste t-Student a 5% de significância.

O perfil enzimático de *T. absoluta* pode sugerir que reflete a adaptabilidade da lagarta contra a defesa da planta, pois no tratamento 5, (plantas infestadas com *T. evansi* e *T. absoluta* simultaneamente), apresentara uma alta concentração de IP, estes causando interferência na digestão e diminuindo a disponibilidade de aminoácidos prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do herbívoro (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010).

A atividade enzimática de *T. absoluta* sendo o único herbívoro na planta foi sempre significativamente menor que na presença de *T. evansi*, contrariamente ao esperado nesta interação. Além que a lagarta tem que superar os efeitos tóxicos dos IP (BROADWAY *et al* 1986) parece que *T. evansi* utiliza outras estratégias para afeitar a capacidade de digestão de proteínas em *T. absoluta*. Sendo este refletido num aumento de atividade de serino e cisteino proteases pela a atuação de forma indireta dos inibidores, via um mecanismo de retroalimentação, que levaria a um aumento na produção de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis (OLIVEIRA *et al*, 2005). Os aminoácidos seriam deslocados para síntese de mais serino-proteases ou de outras proteases em detrimento de outras proteínas essenciais a seu crescimento, desenvolvimento e manutenção (OLIVEIRA *et al*, 2005). Mas para poder assegurar isto, devem-se avaliar parâmetros biológicos da lagarta, que correspondem a possíveis efeitos no desenvolvimento como tamanho e peso antes e depois dos tratamentos.

Para *T. urticae* a atividade enzimática, especialmente de tripsinas-like e ligeiramente de cisteíno proteases, sempre foi maior quando esta espécie foi o único herbívoro na planta, sugerindo adaptabilidade do ácaro aos efeitos antimetabólicos dos IP (OLIVEIRA *et al.*, 2005; PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010). Mas quando este ácaro infestou a planta com *T. evansi* obteve uma ligeira vantagem pela capacidade do ácaro vermelho de suprimir a reposta de defesa da planta na qual a concentração de IP foi menor (Figura 5) o qual gera uma vantagem para o desenvolvimento de *T. urticae* (SARMENTO *et al.*, 2011b).

O perfil de atividade das quimotripsinas-*like* e cisteíno proteases, indica que *T. evansi* apresenta maior atividade destas proteases, contrariamente ao *T.urticae* o qual poderia sugerir que nestes ácaros, estas enzimas sejam mais ativas na digestão de proteínas, devido a pouca interferência pela menor concentração de IP nas plantas que se alimentou *T. evansi* e uma alta interferência dos IP nestas enzimas em *T. urticae*. Ou seja, que nos ácaros, as quimotripsinas-*like* podem ser enzimas sensíveis aos IP e a ação antimetabólica destas gera um detrimento destas enzimas, pelo aumento de outras como as tripsina-*like* (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O perfil de proteases totais de *T. evansi* e a correlação com a atividade estarásica de tripsinas-*like* sugerem que quando este ácaro interage com seu competidor interespecífico *T. urticae* as atividades destas proteases incrementam como indicativo a adaptabilidade das condições de estresse como poderia ser a competência. Sarmiento *et al.*, (2011b) demonstraram que quando *T. evansi* compete com *T. urticae* na mesma planta, o primeiro aumenta a produção de teia a qual impossibilita a oviposição e alimentação do segundo, posteriormente a população de *T. urticae* é extinta da planta.

O gasto energético deste mecanismo de defesa de *T. evansi* poderia ter um alto custo energético devido a que a seda produzida pelos ácaros para construção da teia consiste de proteínas (HAZAN *et al.*, 1975). A produção da seda pode assim significar um gasto de aminoácidos que poderia ser utilizado para crescimento e reprodução (SARMENTO *et al.*, 2011b), e a necessidade de sintetizar mais aminoácidos para compensar esse gasto, pode-se refletir num aumento da atividade das proteases tripsinas-*like* e detrimento de das quimotripsinas-*like* e cisteíno proteases, como demonstrado no presente trabalho (Figura 8 a12). Experimentos dirigidos em responder claramente esta possível relação do custo de defesa por atividade enzimática nestes ácaros devem ser feitos.

5. CONCLUSOES

- *Tetranychus evansi* não induz a resposta de defesa do tomateiro pela via das lipoxigenases, ao contrario são induzidas pelo competidor heteroespecífico com mesmo mecanismo de alimentação. Quando as duas espécies se alimentam na mesma planta, a reposta induzida ativa a via de sinalização do ácido jasmônico, mas à atividade das lipoxigenases é reduzida. O ataque simultâneo de *T. evansi* e *Tuta absoluta* faz que a atividade de LOX incrementa em comparação a atividade induzida só por *T. absoluta*.
- A não indução das lipoxigenases mediada por *T. evansi* reflete na concentração de inibidores de proteases proporcionalmente. Igualmente que a indução de IP mediada por *T. urticae* e a interação destas duas espécies de ácaros na mesma planta. A concentração de IP induzida por *T. absoluta* e em interação com *T. evansi* é maior em proporção a atividade das LOX.
- A oviposição e êxito reprodutivo de *T. evansi* incrementam pela não indução da reposta de defesa direta do tomateiro e afetada tanto por uma alta concentração de inibidores de proteases como por outros rastros da presença do competidor heteroespecífico *T. urticae*.
- A concentração de IP não é um fator maléfico no desenvolvimento de *T. evansi* em plantas atacadas por este ácaro com outras espécies de herbívoros e por *Tuta absoluta*, pois a oviposição não é inferior que em plantas limpas. Outras estratégias contra competidores deve assegurar o sucesso reprodutivo de *T. evansi*.
- O perfil da atividade de proteases se correlaciona principalmente com o perfil das tripsinas-like tanto da atividade amidásica como esterásica. As serino proteases apresentaram maior atividade que as cisteíno proteases.
- Tanto serino como cisteíno proteases são afetadas pela concentração de inibidores de proteases nas lagartas e reflete a adaptabilidade do inseto a

baixa qualidade do alimento. Quando *T. evansi* ataca a planta junto com este herbívoro a atividade destas proteases aumenta

- Nos ácaros as quimotripsinas-*like* e cisteíno proteases são mais ativas na digestão de proteínas pelo que são afetadas pelos inibidores de proteases e em detrimento pelo incremento das tripsinas-*like* para compensar a falta de aminoácidos utilizados na produção de seda quando *T. evansi* compete com *T. urticae*.

6. REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL 2013: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2013.
- AHMAD, Z., SALEEMUDDIN, M., SIDDI, M. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of armyworm *Spodoptera litura*. *Insect Biochemistry*. 10, 667–673. 1980.
- AHN, J-E.; K. ZHU-SALZMAN. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal Insect Physiology*. 55:678-685. 2009.
- ALAVAREZ-FERNANDEZ, M.; BARRET, A.J.; GERHARTZ, B.; DANDO, P.M.; NI, J.; ABRAHAMSON, M. Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel secondreactivesite. *Journal of Biological Chemistry*. v.274. p.19195-19203, 1999.
- AMORIM, T.M.L., MACEDO, L.L.P., UCHOA, A.F., OLIVEIRA, A.S., PITANGA, J.C.M., MACEDO, F.P., SANTOS, E.A., SALES, M.P. Proteolytic Digestive Enzymes and Peritrophic Membranes during the Development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:7738– 7745. 2008.
- ARAGÃO, C. A.; MALUF, W. R.; DANTAS, B. F.; GAVILANES, M. L.; CARDOSO, M. D. Tricomas foliares associados a resistencia ao acaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch) em linhagens de tomateiro com alto teor de 2-tridecanona nos folíolos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.24, p.81-93, 2000.
- ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; BENITES, F.R.G. Efeito de aleloquímicos em tricomas foliares de tomateiro na repelência a ácaro (*Tetranychus urticae* koch.) em genótipos com teores contrastantes de 2-tridecanona. *Acta bot. bras.*, v.16, n.1, p.83-88, 2002.
- ARIMURA, A., KOST, C., BOLANDT, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1734, p.91-111, 2005.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymology*. 71:441-451. 1981.
- BACCI, L. Fatores determinandes do ataque de *Tuta absoluta* ao tomateiro. (Tese de Doutorado). Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 133 p. 2006.
- BARRIENTOS, Z.R.; APABLAZA, H.J.; NORERO, S.A.; ESTAY, P.P. Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ciencia e Investigación Agraria*, v.25, n.3, p.133- 137, 1998.

- BATISTA R B, OLIVEIRA M G A, PIRES C V, PIOVESAN N D, REZENDE S T, MOREIRA M. A. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesqu Agropecu Bras.*, v.37, p.1517-1524, 2002.
- BAKER, E.W., PRITCHARD, A.E., The Tetranychoid mites of Africa. *Hilgardia*. v.29, n.11, p.455-574, 1960.
- BHATTACHARYYA A., LEIGHTON S. M., BABU C. R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145:669–677. 2007.
- BLAIR, B.W. *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae): A New Pest of Tobacco in Zimbabwe. CORESTA Phytopathology and Agronomy Study Groups, Bergerac, France, p. 1-6, 1983.
- BLÉE, E. Impact of phyto-oxylinins in plant defense. *Trends Plant Sci*; v.7, p315–22, 2002.
- BORGONI, C.P.; SILVA, R.A.; CARVALHO, G.S. Consumo de mesofilo foliar por *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) por três cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. *Ciência Rural*, v.33, n.1, p.7-11, 2003.
- BOLLAND H R, GUTIERREZ J, FLECHTMANN C H W. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Boston, Köln, Brill, 1998, 392p.
- BOLLAND, H. R.; VALA, F. First record of the spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) from Portugal. *Entomol Berichten* 60, 2000, p.180.
- BONATO, O. The effect of temperature on life history parameters of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol*, v.23, p.11-19, 1999.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.41, p. 33-38, 1986.
- BUNKER, T.W., KOETJE, D.S.; STEPHENSON, L.C.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E.; GRIMES, H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell*, v.7, p.1319-1331, 1995.
- CARRILLO, L.; MARTINEZ, M.; RAMESSAR, K.; CAMBRA, I.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F.; DÍAZ, I. Expression of a barley cystatin gene in maize enhances

- resistance against phytophagous mites by altering their cysteine-proteases. *Plant Cell Rep.* v.30. p.101–112, 2011.
- CAVALCANTE, A.C.C. Endossimbiose de *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae) e a resposta de defesa induzida em tomateiro. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, fevereiro de 2010.
- CERNA, E.; OCHOA, Y.; MENDOZA, R.; BADI, M.H.; GALLEGOS, G.; LANDEROS, J. Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas. *ΦYTON, Revista Internacional De Botánica Experimental.* v.79. p.147-152, 2010.
- CHOU K.C., CAI, Y.D.. Prediction of protease types in a hybridization space. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 339(3):1015-1020. 2006.
- CHOUGULE, N.P., DOYLE, E., FITCHES, E., GATEHOUSE, J.A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (Cabbage moth: Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology.* 54:563-572. 2008.
- CHRISTELLER, J.T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal.* 272:5710–5722. 2005.
- COELHO, M.C.F.; FRANÇA, F.H. Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça do tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.22, n.2, p.129-135, 1987.
- DEMORAES, G. J. & MCMURTRY, J. A. Chemically mediated arrestment of the predaceous mite *Phytoseiulus persimilis* by extracts of *Tetranychus evansi* and *T. urticae*. *Exp. Appl. Acarol.* **1**, 127-138. 1985a.
- DEMORAES, G. J. & MCMURTRY, J. A. Comparison of *Tetranychus evansi* and *T. urticae* (Acari: Tetranychidae) as prey for eight species of phytoseiid mites. *Entomophaga* **30**, 393-397. 1985b.
- DEMORAES, G. J. & MCMURTRY, J. A. Suitability of the spider mite *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis*. *Entomol. Exp. Appl.* **40**, 109-115. 1986.
- DEMORAES, G. J. & MCMURTRY, J. A. Physiological effect of the host plant on the suitability of *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Entomophaga*, v.32, p.35-38, 1987.
- DESNEUX, N.; WAJNBERG, E.; WYCKHUYS, K.; BURGIO, G.; ARPAIA, S.; NARVÁEZ- VASQUEZ, C.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; CATALÁN RUESCAS, D.; TABONE, E.; FRANDON, J.; PIZZOL, J.; PONCET, C.; CABELLO, T.; URBANEJA, A. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, v.83, n.3, p.197-215. 2010.

- DICKE, M.; VAN POECKE, R.M.P.; BOER, J.G. Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic Appl. Ecol.* v.4, p.27-42, 2003.
- DICKE, M.; VAN LOON, J.J.A.; SOLER, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology*, v.5, p.317-324, 2009.
- DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* , v.49, p.71–92, 2004.
- EL-JAOUANI, N. Contribution à la connaissance des acariens phytophages au Maroc et étude bio-écologique det *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acarina: Tetranychidae). Thesis, Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II, Rabat, Morocco, 1988. 230p.
- EPPO. Introduction of *Tetranychus evansi* in some mediterranean countries: Addition to the EPPO Alert List. EPPO Reporting Service, 5. 2004.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278, 1961.
- ESCUDERO, L. A. & FERRAGUT, F. Life-history of predatory mites *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) on four spider mite species as prey, with special reference to *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Biol. Control* **32**, 378-384. 2005.
- ESPINOSA, W. *Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco*. Brasília, DF: Codevasf, 1991.
- EVANS GO. Principles of Acarology. Wallingford: CAB International, 1992.
- FAN, S.G., WU, G.J. 2005. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 46:273-292.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound- inducible proteinase-inhibitors. *Plant cell*, v.4, p.129-134, 1992.
- FERRAGUT F, ESCUDERO. A *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari, Tetranychidae), una nueva araña roja en los cultivos hortícolas españoles. *Bol San Veg Plagas*, v.25, p.157-164, 1999.
- FLECHTMANN, C.H.W. *Ácaros de importância agrícola*. 6ª ed. São Paulo, Nobel, 1985. 189p.
- FELTON, G.W.; TUMLINSON, J.H. Plant–insect dialogs: complex interactions at the plant–insect interface. *Current Opinion in Plant Biology*, v.11, p.457-463, 2008.
- FORTUNATO, E.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; BRUMANO, M.H.N.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; PILON, A.M.; ALMEIDA, F.T.; SEDIYAMA, C.S.; MOREIRA, S.A.

- efeito da injuria causada por *Anticarsia gemmatalis* na atividade de lipoxigenase foliares de soja. *Biosci. J.*, v.20, n.2, p.37-46, 2004.
- GALDINO, T. V. S.; PICANÇO, M. C.; MORAIS, E. G. F.; SILVA, N. R.; SILVA, G. A. R.; LOPES, M. C. Bioassay method for toxicity studies of insecticide formulations to *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917). *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, p.869-877. 2011.
- GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*. v.156, p.145-169, 2002.
- GERSON, U. Webbing. In: HELLE W, SABELIS MW (eds) Spider mites: their biology, natural enemies and control. Elsevier, Amsterdam, p.223-232, 1985.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* v.43, p.701-726, 1998.
- HAQ, S.K., ATIF, S.M., KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431(1): 145-159. 2004.
- HAZAN, A.; GERTLER, A.; TAHORI, A.S.; GERSON, U. Spider mite webbing - III. Solubilization and amino acid composition of the silk protein. *Comp Biochem and Physiol B.* v.51, p.457-462, 1975.
- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews.* 102(12):4501-4523. 2002.
- HERRERO, S., COMBES, E., VAN OERS, M.M., VLAK, J.M., MAAGD, R.A., BEEKWILDER, J. Identificacion and rcombinat expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 35:1073-1082. 2005.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxigenases. *Physiol. Plantarum.* v.76, p.249-253, 1989.
- IMENES, S.D.L.; FERNANDES, M.A.U.; CAMPOS, T.B.; TAKEMATSU, A.P. Aspectos biológicos e comportamentais da traça do tomateiro *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick, 1917), (Lepidoptera – Gelechiidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.57, n.1/2, p.63-68, 1990.
- JANY, K.; BEKELAER, K.; PFLEIDERER, G.; ISHAY, J. Amino acid sequence of an insect chymotrypsin form the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v.110. p.1-7, 1983.
- JOANITTI, G.A., FREITAS, S.M., SILVA, L.P. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. *Current Enzyme Inhibition.* 2(3):199-217. 2006.
- JONGSMA, M. A., BOLTER, C. The Adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors. *Journal Insect Physiol.* 43 (10): 885-895. 1997.

- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*. n. 51, p. 376-382, 1974.
- KANT, M.R.; AMENT, K.; SABELIS, M.W.; HARING, M.A.; SCHUURINK, R.C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology*, v.135, p.483-495, 2004.
- KANOST, M.R., CLARKE, T.E. Proteases. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 4. Pergamon, New York, 247–265. 2005.
- KARBAN, R.; I.T. BALDWIN. *Induced responses to herbivory*. Chicago, Univ. of Chicago Press, 1997. 275p.
- KAWAZU, K.; MOCHIZUKI, A.; SATO, Y.; SUGENO, W.; MURATA, M.; SEO, S.; MITSUHARA, I. Different expression profiles of jasmonic acid and salicylic acid inducible genes in the tomato plant against herbivores with various feeding modes. *Arthropod-Plant Interactions*. V.6. p.221–230, 2012.
- KNAPP M, WAGENER B, NAVAJAS M. Molecular discrimination between the spider mites *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Afr Entomol*, v.11, p.300-304, 2003.
- LECADE, M.;DEDONDER, R. Les protéases de *Pieris brassicae*. I. Purification et propriétés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, v.48. p.631-660, 1966.
- LEITE, G.L.D.; PICANÇO, M.C.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MOREIRA, M.D. Role of canopy height in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). *Journal of Applied Entomology*, v.123, n.8, p.459-463, 1999.
- LEITE, G.L.D.; PICANÇO, M.; GUEDES, R.N.C.; ZANUNCIO, J.C. Role of plant age in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Scientia Horticulturae*, v.89, p.103-113, 2001.
- LEITE, G.L.D.; ALMEIDA, C.I.M.; ROCHA, S.L.; COSTA, C.A.; VELOSO, R.V.S. Insetos, ácaros e aranhas associados à soja hortaliça, em quatro espaçamentos entre plantas, em Montes Claros–MG. *Unimontes Científica*, **5**, 1-5. 2003.
- LEITE, G.L.D. Resistência de tomates a pragas. *Unimontes Científica*, v.6, n.2 p. 129-140, 2004.
- LEUNG-TOUNG; LI, W., TAM, T. F., KARIMIAN, K. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a Review. *Current Medicinal Chemistry*. 9(9):979-1002. 2002.

- MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, v.68, p.2946-2959, 2007.
- McKERROW, J.H.; ENGEL, J.C.; CAFFREY, C.R. Cystein protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. v.7. p.639-644, 1999.
- MEDEIROS, M.A.; VILLAS BÔAS, G.L.; VILELA, N.J.; CARRIJO, A.O. Estudo preliminar do controle biológico da traça-do-tomateiro com o parasitóide *Trichogramma pretiosum* em ambientes protegidos. *Hortic. Bras.* 27: 80-85. 2009.
- MEDEIROS, M.A.; SUJII, E. R.; MORAIS, H. C. D. Fatores de mortalidade na fase de ovo de *Tuta absoluta* em sistemas de produção orgânica e convencional de tomate. *Bragantia*, v.70, n.1, p.72-80. 2011.
- MELAN, M.A.; DONG, X.; ENDARA, M.E.; DAVIS, K.R.; AUSUBEL, F.M.; PETTERMAN, T.K. An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant physiol.*, v.101, p.441-450, 1993.
- MENEZEZ, E.L.A.; AQUINO, A.M.; CORREIA; MENEZEZ, E.B. Ácaros: Taxonomia, Biotecnologia e sua Importância Agrícola. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicações/download/doc240.pdf>. Acessado em 01 de agosto de 2013.
- MEYER, M.K.P.S. African Tetranychidae (Acari: Prostigmata)-with reference to the World genera. *Entomology Mem.* v.69, 1987. 175p.
- MINGOCHI, D.S.; JENSEN, A. Pests and diseases in tomato cultivars in Zambia, their seasonal occurrence and possible control. *Acta Hort*, v.190, p.131-138, 1986.
- MIRANDA, M.M.M. Impacto do manejo integrado na predação e no parasitismo das pragas do tomateiro. Viçosa, 1997, 105p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MORAES, G.J., FLECHTMANN, C.H.W. Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto, Holos Editora, 2008. 308p.
- MORAES, G.J.; MCMURTRY, J. A Physiological effect of the host plant on the suitability of Tetranychus evansi as prey for Phytoseiulus persimilis (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Entomophaga*, v.32, p.35-38, 1987.
- MOSOLOV, V.V.; VALUEVA, T.A. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 41(3): 261-82. 2005.
- MOTHES, U.; SEITZ, K.A. Funtional microscopic anatomy of the digestive system of Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). *Acarología*. v.22, p257-270, 1981.

- NAIKA, S.; JEUDE, J.V.L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B.V.. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 104p. 2006.
- NISBET, A.J.; BILLINGSLEY, P.F. A comparative survey of the hydrolytic enzymes of ectoparasitic and free-living mites. *International Journal for Parasitology*. v.30, p.19-27, 2000.
- OHTA H, IDA S, MIKAMI B, MORITA Y Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol*, v.27, p.911-918, 1986.
- OLIVEIRA, M.F. Induction and Reduction of tomato plant defenses by spider mites: Effects of sequential and simultaneous plants. Teses de Maestria em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, 63p. 2012.
- OLIVEIRA, M.G.A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.140B, p.369-380, 2005.
- PAGE, M.J., DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65:1220-1236. 2008.
- PAULA, S.V. Incidência de pragas e reflexos na produção do tomateiro em função da adoção de nível de controle e de faixas circundantes. Viçosa, 1997. 90p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PICANÇO, M.C.; MARQUINI, F. Manejo integrado de pragas de hortaliças em ambiente protegido. *Informe Agropecuário*, v.20, p.26-133, 1999.
- PICANÇO, M.C.; GUSMÃO, M.R.; GALVAN, T.L. Manejo integrado de pragas de hortaliças. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Manejo integrado de doenças, pragas e ervas daninhas*. Viçosa: UFV. 2000. p.275-324.
- PICANÇO, M.C.; PAULA, S.V.; JUNIOR, A.R.M.; OLIVEIRA, I.R.; SEMEÃO, A.A.; ROSADO, J.F. Impactos financeiros da adoção de manejo integrado de pragas na cultura do tomateiro. *Acta Scientiarum*, v.26, n.2, p.245-252, 2004.
- PICANÇO, M. C.; BACCI, L.; CRESPO, A. L. B.; MIRANDA, M. M. M.; MARTINS, J. C. Effect of integrated pest management practices on tomato production and conservation of natural enemies. *Agricultural and Forest Entomology*, v.9, n.4, p.327-335. 2007.
- PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A. ; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 23-29, 2006.

- PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; PILON, F.M.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, J.A.; FAZOLLO, A. Adaptação da lagarta de soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 56, n.6, p.744-748, nov/dez, 2009.
- POMPE-NOVAK, M.; POLSAK-PRIJATELJ, M.; POPOVIC, T.; STRUKELJ, B.; RAVNIKAR, M. The impact of potato cysteine proteinases in plant growth and development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v.60. p.71-78, 2002.
- RELMAN, D. A. Ôtil death do us partô: coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology*. v.6, p.721-724, 2008.
- PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; MCPHERON, B.A.; THOMPSON, J.N.; WEIS, A.E. Interactions among 3 trophic levels — influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* v.11, p.41– 65, 1980.
- RAO, M.M; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.62. p.596-635, 1998.
- REIS, D.T.C. Purificação e caracterização de proteases digestivas tripsina-like do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. Teses de Doutorado em Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 123p. 2009.
- RIBEIRO, F.R. Identificação de bactérias endossimbiontes associadas aos ácaros *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e seus efeitos na manipulação do mecanismo de defesa do tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill. Teses de Maestria em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, 56p. 2011.
- RODRIGUEZ-SAONA, C; CHALMERS, J.A.; RAJ, S.; THALER, J.S. Induced plant responses to multiple damagers: differential effects on an herbivore and its parasitoid. *Oecologia*, v.143, p.566-577, 2005.
- RODRIGUEZ-SAONA, C; MUSSER, R.O.; VOGEL, H.; HUM-MUSSER, S.M.; THALER, J.S. Molecular, biochemical, and organismal analyses of tomato plants simultaneously attacked by herbivores from tow feeding guilds. *Journal of Chemical Ecology*, v.36, p.1043-1057, 2010.
- ROS, V.I.D.; BREEUWER, J.A.J. The effects of, and interactions between, *Cardinium* and *Wolbachia* in the doubly infected spider mite *Bryobia sarothamni*. *Heredity*, v.102, p.413–422, 2009.
- ROSA, A. A., GONDIM JR, M. G. C., FIABOE, K. K. M., DE MORAES, G. J. & KNAPP, M. Predatory mites associated with *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae) on native solanaceous plants in coastal Pernambuco state, Brazil. *Neotrop. Entomol.* v.34, p.689–692, 2005.

- ROUET-MAYER, M.; BUREAU, J.; LAURIERI, C. Identification and characterization of lipoxygenase soforms in senescing carnation petals. *Plant Physiol.*, v.98, p.971-978, 1992.
- R CORE TEAM (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- SANTOS I C, REIS W J P, MOREIRA M A, REZENDE S T, ROCHA V S E, SEDIYAMA C S. Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação de sementes de soja. *Rev Ceres* , v.40, p. 438-444, 1993.
- SARR, I., KNAPP, M., OGOL, C.K.P.O., BAUMGÄRTNER, J. Impact of Predators on *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard Populations and Damage on Tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Kenya. *International Congress of Acarology*. p.271, 2002.
- SARMENTO, R.A.; LEMOS, F.; BLEEKER, P.M.; SCHUURINK,R.C.; PALLINI,A.; OLIVEIRA,M.G.A; LIMA, E.R.; KANT, M.; SABELIS,M.W.; JANSSEN, A. A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters*, v.14, p. 229–236, 2011 (a).
- SARMENTO, R.A.; LEMOS, F.; DIAS C.R; KIKUCHI, W.T; RODRIGUES, J.C.P; PALLINI, A; SABELIS, M.W; JANSSEN, A. A Herbivorous Mite Down-Regulates Plant Defence and Produces Web to Exclude Competitors. *PLoS ONE* v. 6 n.8, p. 1;7, 2011(b).
- SAUNYAMA, I.G.M.; KNAPP, M. The effects of pruning and trellising of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on red spider mite (*Tetranychus evansi* Baker & Pritchard) incidence and crop yield in Zimbabwe. *Afri. Crop Sci. J.* v.11, p.269-277, 2003.
- SCARBOROUGH, C.L., FERRARI, J., AND GODFRAY, H.C. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, v.310, p.1781. 2005.
- SCHUSTER, M. F. Chemical control of *Tetranychus marianae* McGregor on tomatoes in the lower Rio Grande valley. *J Econ Entomol*, v.52, p.63-764, 1959.
- SCOTT, I.M.; THALER, J.S.; SCOTT, J.G. Response of a Generalist Herbivore *Trichoplusia ni* to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato. *J Chem Ecol*, v.36, p.490–499, 2010.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*v.42, p.145-188, 1991.
- SHIVAJI, R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, J.R.; LUTHE, D.S. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. *J Chem Ecol*, v.36, p.179–191, 2010.

- SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. *Biotecnol Cienc e Desenvol*, v.12, p.38-42, 2000.
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. Tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 168p. 2000.
- SILVA, M.D.; OLIVEIRA, M.G.A.; LANNA, A.C.; PIRES, C.V.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C.; BATISTA, R.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.. Caracterização da via das lipoigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorthe phaseoloruf.sp. meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v.13, n.3, p.316-328, 2001.
- SOUZA, J.C.; REIS, P.R. Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Belo Horizonte: EPAMIG, 1992, (Boletim Técnico, 38), 20p.
- SOUZA, J.C.; REIS, P.R. Principais pragas do tomate para mesa: bioecologia, dano e controle. Informe Agropecuário, v.24, n.219, p.79-92, 2003.
- SRINIVASAN, A., GIRI, A.P., GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 11:132-154. 2006.
- STEINHAUS, E. A. The importance of environmental factors in the insect microbe ecosystem. *Archives of Bacteriological Reviews*.,24: 365-373, 1960.
- STOTZ, H.U.; KROYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T. Plant–insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. v.2, p.268–272. 1999.
- STOUT, M.J.; WORKMAN, K.V.; BOSTOCK, R.M.; DUFFEY, S.S. Simulation and attenuation of induced resistance by elicitors and inhibitors of chemical induction in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v86, p.267-279.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 109(1): 1-62. 1994.
- TERRA, W., FERREIRA, C., BAKER, J.E. Digestive enzymes. In: Lehane, M. J. and Billingsley, P. F. (Eds.) *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, Cambridge. 206-235. 1996.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. *As pragas também morrem pela boca*. Pesquisa Fapesp. 54:20-27. 2000.

- THALER, J. S.; KARBAN R.; ULLMAN, D.E.; BOEGE, K.; BOSTOCK, R.M. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia*. V.131, p.227–235, 2002.
- TOMARELLI, R.M., CHARNEY, J., HARDING, M.L. *Journal Laboratory Clinical Medical* 34: 428, 1949.
- TORRES, J.B.; FARIA, C.A.; EVANGELISTA, W.S.; PRATISSOLI, D. Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. *International Journal of Pest Management*, v.47, n.3, p.173-178, 2001.
- TRANBARGER, T.J.; FRANCESCHI, V.R.; HILDEBRAND, D.F.; GRIMES, H.D. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxigenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell*, v.3, p.973-978.
- VALUEVA T.A., MOSOLOV V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*. 69(11): 1305-1309. 2004.
- VAND ZANDT, P.A.; AGRAWAL, A.A. Community-wide impacts of herbivore-induced plant responses in milkweed (*Asclepias syriaca*). *Ecology*, v.85, p.2616-2629, 2004.
- VIDAL, M.S., SALES, M.P., AMORIM, T.M.L., SOUSA, D.M.M. Atividade Proteolítica do Tipo Tripsínica Durante o Desenvolvimento Larval de Curuquerê-do-Algodoeiro (*Alabama argillacea* Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Circular Técnica* 86. 2005.
- VILLAS BOAS, G.L.; FRANÇA, F.H.; ÁVILA, A.C. de; BEZERRA, I.C.. Manejo integrado da mosca branca *Bemisia argentifolli*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 11p. (Circular Técnica, n.9).
- VILLAS BOAS, G.L.; MELO, P.E.; BRANCO, M.C.; GIODANO, L.B.; MELO, W.F. Desenvolvimento de um modelo de produção integrada de tomate indústria- PITI. In : ZAMBOLIM,L; LOPES,C,A; PICANÇO,M,C; COSTA,H,E. *Manejo Integrado De Doenças e Pragas Hortalíça*. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2007. p.349-362.
- VISOTTO, L.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; RIBON, A.O.B.; GOOD-GOD, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Insect Physiology*, v.55, p.185–191, 2009.
- WAGNER, W., MÖHRLÉN, F., SCHNETTER, W. Characterization of the proteoliticenzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera:Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(7):803-814. 2002.

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). European Journal of Biochemistry, 102: 147-153, 2005.

ZHU-SALZMAN, K., LUTHE, D.S., FELTON, G.W. Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores. Plant Physiology. 146:852–858.2008

