

**POLIANE SÁ ARGOLO**

**RESISTÊNCIA INDUZIDA AO ÁCARO RAJADO *Tetranychus urticae* KOCH  
(ACARI: TETRANYCHIDAE) EM MORANGUEIRO**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

**POLIANE SÁ ARGOLO**

**RESISTÊNCIA INDUZIDA AO ÁCARO RAJADO *Tetranychus urticae* KOCH  
(ACARI: TETRANYCHIDAE) EM MORANGUEIRO**

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

**APROVADA: 07 de julho de 2008**

---

**Dra. Aloyséia Cristina da Silva Noronha**  
(Co-orientador)

---

**Dra. Madelaine Venzon**  
(Co-orientador)

---

**Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira**

---

**Prof. Derly José Henriques da Silva**

---

**Prof. Angelo Pallini Filho**  
(Orientador)

*Dedico,  
Aos meus pais, Eliel e Graça,  
Aos meus irmãos, Héric, Murilo, Eliane e Clara.*

**Foram tantas lutas pra chegar até aqui, tudo suportamos com firmeza e alegria.**

**Que nunca nos falte à coragem de lutar.**

**Poliane**

**“A maior vitória na competição é derivada da satisfação interna de saber que  
você fez o seu melhor e que você obteve o máximo daquilo que você deu.”**

**(Howard Cosell)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, por minhas conquistas e pela força pra seguir em frente e não desfalecer.

Agradeço especialmente aos meus pais, Eliel e Graça e aos meus irmãos Héric, Murilo, Eliane e Clara pelo apoio, incentivo, amor, pela torcida e confiança.

A toda minha família Sá e Argolo tios, tias, primos, primas e meus avós Laura e Tertualino.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Animal pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A Aloyséia Noronha, que nunca deixará de ser minha Orientadora, pela amizade, apoio, incentivo, torcida, correções e sugestões.

Ao Prof. Angelo Pallini, pela orientação, compreensão, amizade, apoio e incentivo para concretização deste trabalho.

Ao meu Co-Orientador Marcos Fadini, pelo auxílio na execução dos trabalhos, críticas e sugestões, pela confiança e palavras de apoio.

A Dra. Madelaine Venzon, pela disposição, amizade e sugestões ao trabalho.

Ao meu amigo Milton Oliveira, pelo apoio na execução dos trabalhos, correções, sugestões, pela grande amizade, atenção, dedicação, pelas oportunidades e por estar sempre presente quando eu mais precisava.

Ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, especialmente a Prof. Goreti e a colega Jeanne Scardini, pelas sugestões e auxílio na execução das análises bioquímicas.

A “minha gente”, os amigos do Laboratório de Acarologia, Elisa, Clévim e Rafael, pela ajuda na execução dos experimentos; e aos demais amigos Marla, Alberto, Claudinei, João, Elisângela, Denise, Samir, Felipe, Cleide, Elaine, Daniela, Fernanda, Cris e a Ana Cristina, minha conterrânea. A todos agradeço a amizade e convivência.

A minha Professora de Inglês Beth Braathen pela grande amizade e colaboração.

Aos colegas do curso pela amizade e companheirismo.

Agradeço as secretárias da Entomologia, Miriam e D. Paula, pela constante disposição a nos ajudar e por sempre resolver as nossas pendências.

Enfim, agradeço a todos pela colaboração e amizade.

## **BIOGRAFIA**

POLIANE SÁ ARGOLO, filha de Eliel dos Santos Argolo e Maria das Graças Sá Argolo, nasceu em Salvador, BA, no dia 20 de outubro de 1980.

Em Agosto de 2006, graduou-se Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal da Bahia.

Em Outubro de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa e submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Magister Scientiae” em julho de 2008.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumo</b>	viii
<b>Abstract</b>	x
<b>1. Introdução Geral</b>	1
<b>2. Revisão de Literatura</b>	4
2.1. Defesa induzida de plantas	4
2.1.1. Especificidade da defesa induzida	5
2.1.2. Sistemicidade da defesa induzida	6
2.1.3. Inibidores de proteases	8
2.2. Ocorrência de <i>T. urticae</i> e <i>T. mexicanus</i> em morangueiro	11
<b>3. Material e Métodos</b>	12
3.1. Criação estoque	13
3.2. Obtenção das mudas e instalação do experimento	13
3.2.1. Ensaio 1 e 2	13
3.2.2. Ensaio 3	13
3.3. Avaliação das populações de <i>T. urticae</i> e <i>T. mexicanus</i>	15
3.4. Obtenção do extrato foliar	16
3.5. Determinação dos inibidores de proteases	17
3.6. Determinação da concentração de proteína do extrato	17
3.7. Análises estatísticas	18
<b>4. Resultados e Discussão</b>	18
4.1. Ensaio 1	18
4.2. Ensaio 2	23
4.3. Ensaio 3	29
<b>5. Conclusões Gerais</b>	36
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	37

## RESUMO

ARGOLO, Poliane Sá, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008.  
**Resistência induzida ao ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em morangueiro.** Orientador: Angelo Pallini Filho. Co-Orientadores: Aloyséia Cristina da Silva Noronha, Madelaine Venzon e Marcos Antonio Matiello Fadini.

Plantas previamente atacadas por herbívoros podem ter o seu sistema de defesa ativado. As formas de defesa podem ocorrer por diferentes rotas. Algumas das rotas desencadeadas ocorrem logo após a herbivoria, quando a planta passa a responder de forma indireta através da produção de substâncias voláteis atrativas aos inimigos naturais dos fitófagos infestantes. Uma outra rota seria a resposta direta da planta através da síntese de inibidores de proteases produzidos após a injúria, o que pode afetar o desenvolvimento e crescimento de fitófagos infestantes. As plantas, por sua vez, podem apresentar especificidade nas respostas induzidas, ou seja, as defesas podem intimidar a herbivoria posterior, porém em alguns casos as espécies re-infestantes não tem o desempenho afetado. Estudos recentes têm demonstrado mecanismos de resistência em plantas de interesse comercial contra o ataque de pragas. Plantas de morangueiro que são cultivadas em larga escala no Brasil têm sofrido sérios danos pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae*, que é praga primária para a cultura. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo estudar a resistência induzida direta em plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) sobre populações de *T. urticae*. Nos estudos experimentais foram utilizadas plantas de morangueiro limpas (controle), plantas injuriadas mecanicamente e plantas pré-infestadas por *T. urticae*. Para determinação dos inibidores de proteases foram utilizadas amostras de folhas limpas de cada tratamento. Baseado nestes métodos, testou-se no ensaio 1 a hipótese de que a pré-infestação de *T. urticae* induziria a

produção de inibidores de proteases reduzindo o crescimento populacional de seus coespecíficos. No ensaio 2, estudou-se a especificidade dos compostos defensivos, testando a hipótese de que a pré-infestação de *T. urticae* induziria a produção de inibidores de proteases que afetariam o desenvolvimento do ácaro-vermelho *Tetranychus mexicanus*, uma espécie de ácaro que também ocorre em morangueiro. No ensaio 3, foi testada a hipótese de que a infestação por *T. urticae* nas plantas matrizes de morangueiro induziria a produção de inibidores de proteases e estes seriam translocados através dos estolões até as plantas-filhas prejudicando o desenvolvimento de *T. urticae* nestes propágulos. De acordo com os resultados, menor número de indivíduos de *T. urticae* foram encontrados em plantas previamente infestadas com o coespecífico. O ácaro *T. mexicanus* não teve seu desenvolvimento afetado pela resposta induzida decorrente da pré-infestação de *T. urticae*. A resposta da planta teve efeito contrastante a *T. mexicanus*, aparentemente as defesas induzidas em morangueiro não atuam em re-infestações de heteroespecíficos, pelo menos para *T. mexicanus*. O crescimento populacional de *T. urticae* também foi menor nos propágulos de morangueiro. A defesa induzida por *T. urticae* em plantas matrizes de morangueiro apresentou sistemicidade, através do estolão, afetando o desempenho dos fitófagos nos propágulos. Nos resultados das concentrações de inibidores de proteases, verificou-se em geral, que as mesmas variaram entre os tratamentos nos experimentos, mas não foram correlacionados ao desempenho dos fitófagos. Possivelmente, outros compostos fitoquímicos produzidos pelas plantas estejam envolvidos nas respostas induzidas por *T. urticae*. Estes resultados suportam a hipótese de que as plantas que apresentam defesa direta podem reduzir o desempenho de fitófagos coespecíficos na geração seguinte.

## ABSTRACT

ARGOLO, Poliane Sá, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2008.  
**Induced resistance to the two-spotted mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari, Tetranychidae) in strawberry plants.** Advisor: Angelo Pallini Filho.  
Co-advisors: Aloyséia Cristina da Silva Noronha, Madelaine Venzon and Marcos Antonio Matiello Fadini.

Plants previously attacked by herbivores may have their defense system activated. The defense forms may occur by different routes. Some of the unleashed routes take place right after the herbivory, when the plant starts responding in an indirect way through the production of volatile substances attractive to natural enemies of the infesting phytophagous. Another route would be the direct response from the plant through the synthesis of proteinase inhibitors produced post-injury, which can affect the development and growth of the infesting phytophagous. The plants can present specificity in the induced responses, that is, the defenses may intimidate a subsequent herbivory; however, in some cases the re-infesting species do not have their performance affected. Recent studies have shown resistance mechanisms in plants of commercial interest against the attack of pests. Strawberry plants which are cultivated in large scale in Brazil have suffered serious damage by the two spotted mite *Tetranychus urticae*, which is a primary pest for the culture. Therefore, the present study had as an aim to study induced direct resistance in strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) upon the population dynamics of the two-spotted mite *T. urticae*. In the experimental studies clean strawberry plants (control), plants that were mechanically injured as well as plants pre-infected with the two-spotted mite *T. urticae* were used. In order to determine the proteinase inhibitors, samples of each treatment were used. Based on these methods, in test 1 the hypothesis that the pre-infestation of *T. urticae* would induce the production of proteinase inhibitors reducing the population growth of their co-specifics was tested. In test 2, the

specificity of the defensive compounds was studied, testing then the hypothesis that the pre-infestation of *T. urticae* would induce the production of proteinase inhibitors which would affect the development of red mite *Tetranychus mexicanus*, a species of spider mite that also occur in strawberry plants. In test 3, the hypothesis that the infestation by *T. urticae* in the mother strawberry plants would induce the production of proteinase inhibitors and these would be translocated through stolons until the strawberry runners injuring the development of *T. urticae* in these daughter plants was tested. According to the results a smaller number of individuals of *T. urticae* were found in plants previously infected with the co-specific. The spider mite *T. mexicanus* did not have its development affected by the induced response due to the pre-infestation of *T. urticae*. The plant response had contrasting effect to *T. mexicanus*, apparently the induced defenses in strawberry plants do not act in re-infestations of hetero-specifics, at least for *T. mexicanus*. The population growth of *T. urticae* was also smaller in the strawberry runners of strawberry plants. The induced defense by *T. urticae* in mother strawberry plants presented systemic defense signals through the stolon, affecting the performance of the phytophagous of the strawberry runners. In the results of the concentrations of proteinase inhibitors, one could verify that they varied among the treatments in the experiments, but were not correlated to phytophagous' performance. Possibly, other phytochemicals compounds produced by the plants might be involved in the induced responses by *T. urticae*. These results support the hypothesis that the plants that present direct defense can reduce the performance of co-specific phytophagous in the following generation.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas apresentam dois tipos de defesas a fitófagos: a) resistência constitutiva expressa independente de um ataque ou injúria; b) defesa induzida em que a planta expressa defesa quando é injuriada por fitófagos transmitindo sinais que ativam mecanismos de defesa de forma direta ou indireta (Karban & Baldwin, 1997). A defesa induzida indireta é caracterizada pelo controle de populações de fitófagos estimulando a atração e permanência de inimigos naturais (Vet & Dicke, 1992; Dicke *et al.*, 1993). As plantas quando atacadas liberam substâncias voláteis atrativas, que servem como guia aos inimigos naturais (predadores e parasitóides), sinalizando a presença dos fitófagos. E ainda estimulam a presença dos inimigos naturais através das domácias que são pequenos orifícios geralmente localizados nas folhas (Maffei *et al.*, 2007; Halitschke *et al.*, 2008).

A defesa induzida direta inclui as características da planta que afetam seus hospedeiros após o dano causado por eles (Karban & Baldwin, 1997). Essas características atuam contra os fitófagos reduzindo a qualidade nutricional da planta em relação a plantas não atacadas, a preferência pelo alimento e a performance dos fitófagos, através de barreiras físicas, como espinhos e tricomas, e químicas, como os inibidores de proteases (Arimura *et al.*, 2005; Chen, 2008). As defesas induzidas de plantas pelo ataque de fitófagos podem ser sistêmica, quando a injúria local produz sinais que são transmitidos para tecidos não injuriados, ou não sistêmica, quando a indução se apresenta somente no órgão injuriado (Mattiacci *et al.*, 2001).

A defesa induzida de plantas apresenta dois tipos de especificidade: a) especificidade na elicitación da resposta, quando os compostos elicitados diferem para cada tipo de dano provocado na planta; b) especificidade do efeito, a resposta da

planta originada do dano após herbivoria pode afetar diferentes espécies de fitófagos (Messina *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 2005).

No sistema agrícola atual, as alterações nos ecossistemas têm provocado a redução na diversidade de espécies, o surgimento de outras espécies insetos e ácaros de importância secundária e a ocorrência de surtos populacionais de fitófagos. Isso tem ocorrido principalmente devido a mudanças nas interações entre inimigos naturais e fitófagos, provocando danos econômicos às culturas. A resistência de plantas torna-se uma boa alternativa para estes problemas (English-Loeb *et al.*, 1993; Karban *et al.*, 1999; Letourneau & Goldstein, 2001). A indução de resistência de plantas é uma estratégia em potencial que vem sendo empregada no controle de pragas e regulação populacional dos artrópodes (Agrawal, 2000). A função dos mecanismos de defesa constitutivo e induzido na estruturação de comunidades de artrópodes, a evolução dos mecanismos de defesa induzida e os custos energéticos associados à indução de defesa em plantas são estudos que devem ser explorados para aumentar o conhecimento nesta área (Agrawal, 2005).

Karban & Myers (1989) e Karban & Baldwin (1997) verificaram resistência induzida em sistemas planta-herbívoro, abrangendo plantas anuais e perenes, ervas e plantas lenhosas com fitófagos sedentários e móveis. Em morangueiro (*Fragaria x ananassa*), estudo de defesa induzida conduzido por Shanks & Doss (1989) revelou que populações do ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) declinaram tanto em campo como em casa de vegetação.

O morangueiro (*Fragaria x ananassa*) (Rosaceae) é uma cultura típica de climas mais amenos, não sendo muito tolerante a temperaturas elevadas. No Brasil o morango tem se adaptado melhor do sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. O

ciclo de produção dos frutos dura entre 60 e 80 dias, sendo que do aparecimento da flor até o ponto da colheita são de 25 a 35 dias (Ronque, 1998).

Os ácaros fitófagos são relatados como as principais pragas do morangueiro, dentre os que causam grandes danos está o ácaro rajado *T. urticae* (Chiavegato & Mischán, 1981; Watanabe *et al.*, 1994; Fraulo & Liburd, 2007). O ácaro vermelho *Tetranychus mexicanus* (McGregor, 1950) aparece como praga secundária no morangueiro. Este fitófago já foi observado em diversas plantas frutíferas como algodoeiro, maracujazeiro, citros (Dominguezgil & McPherson, 1992; Quiros-Gonzalez, 2000; Azevedo & Vieira, 2002). O controle de ácaros fitófagos tem sido feito principalmente pela aplicação de acaricidas organos-sintéticos, que nem sempre reduzem suas populações em níveis economicamente aceitáveis, podendo ser responsáveis por problemas relacionados com a contaminação ambiental, resistência de fitófagos a pesticidas e eliminação de inimigos naturais (Tamai *et al.*, 1999). A resistência induzida, então, seria uma forma alternativa de controle, economicamente viável, pois através dos mecanismos de defesa de plantas, é possível aprimorar o controle de pragas reduzindo o uso de agrotóxicos (Walling, 2001).

Entender os mecanismos de defesa das plantas facilitaria o desenvolvimento de cultivares mais resistentes as pragas e doenças, bem como a determinação de relações evolutivas e bioquímicas entre diferentes espécies de plantas e seus respectivos predadores (Walling, 2001; Bale *et al.*, 2008; Chen, 2008).

O objetivo principal desta dissertação foi estudar a resistência induzida direta em plantas de morangueiro sobre populações de *T. urticae*. Espera-se que tais informações sirvam de base para estudos de controle de ácaros fitófagos na cultura do morangueiro. Nesta dissertação, estudou-se no ensaio 1 o efeito das defesas induzidas de plantas de morangueiro previamente atacadas por *T. urticae* sobre o

crescimento populacional do seu coespecífico. A hipótese testada neste capítulo foi de que a infestação prévia induziria a produção de inibidores de proteases e *T. urticae* teria seu desempenho afetado. No ensaio 2, estudou-se especificidade da resposta induzida de plantas previamente infestadas por *T. urticae* sobre populações do ácaro vermelho *T. mexicanus*. Hipotetizou-se que a defesa induzida atuaria sobre outra espécie de ácaro fitófago no morangueiro. No ensaio 3, estudou-se a sistemicidade da defesa induzida em propágulos de plantas de morangueiro, ou seja, se os compostos químicos resultantes da indução são de fato translocados da planta matriz para os propágulos. A hipótese testada foi de que o desempenho populacional de *T. urticae* seria reduzido nos propágulos de plantas matrizes previamente infestadas com o coespecífico.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Defesa induzida de plantas**

As interações tróficas entre plantas e insetos são complexas e importantes na determinação, distribuição e ocorrência dos organismos nos agroecossistemas. As plantas não são passíveis aos herbívoros e quando injuriadas ativam seu sistema de defesa bioquímico como forma de proteção (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal, 2000). As respostas de defesas das plantas podem expressar-se de forma constitutiva ou induzida (Karban & Baldwin, 1997; Pickett, 1999).

A forma constitutiva da defesa está presente na planta independente da ocorrência de danos provocados por herbívoros (Karban & Baldwin, 1997). A defesa constitutiva se expressa fisicamente na forma de domácias, tricomas, cutículas espessas; ou bioquimicamente por meio de compostos ou substâncias produzidas

pelas plantas como terpenóides, compostos fenólicos e nitrogenados (Lara, 1991; Agrawal, 1998; Thaler *et al.*, 2001; Schoonhoven *et al.*, 2005).

A resposta induzida se expressa na forma de mudanças físicas ou bioquímicas na planta devido ao ataque de fitófagos ou infecção por patógenos, podendo ocorrer de forma indireta ou direta (Karban & Baldwin, 1997; Pickett, 1999). Constitui-se a forma indireta da defesa induzida de plantas a produção de compostos carbonílicos servindo como indicadores da presença dos fitófagos aos inimigos naturais (Steinberg *et al.*, 1993; Agrawal *et al.*, 2002). A defesa induzida direta expressa pelas plantas ao ataque de herbívoros, está baseada em vários mecanismos de defesa que incluem inibidores de proteases e  $\alpha$ -amilase, enzimas oxidativas (mironases, peroxidases, lipoxigenases etc.), proteínas tóxicas como lectinas e arcelinas, dentre outros (Koiwa *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005).

### **2.1.1. Especificidade da defesa induzida**

Dentro da defesa induzida existem dois tipos de especificidade de defesa. Um tipo de especificidade é em relação à eliciação da resposta, relacionada aos compostos produzidos pela planta, ou seja, a habilidade da planta de gerar repostas bioquímicas a diferentes tipos de danos (Stout *et al.*, 1998). Um segundo tipo é a especificidade do efeito, que ocorre quando a mesma resposta da planta tem efeitos contrastantes em herbívoros diferentes, ou em diferentes estágios de vida do mesmo herbívoro (Van Dam *et al.*, 2001a; Messina *et al.*, 2002; Rasmann & Turlings, 2008).

A especificidade da defesa de plantas também pode determinar interações ecológicas entre comunidades de artrópodes que vivem em plantas (Karban & Baldwin, 1997; Kessler & Halitschke, 2007). Herbívoros especialistas podem ser prejudicados pelos efeitos da reposta induzida específica, diferentemente dos herbívoros generalistas que podem habitar outras plantas susceptíveis (Agrawal &

Karban, 2000; Poelman *et al.*, 2008; Viswanathan *et al.*, 2008). Isso significa que a resposta induzida pode afetar uma espécie competidora e não promover efeito em outras espécies (Karban & Baldwin, 1997).

Já existem relatos sobre a especificidade da defesa induzida em cereais, tomate, pepino, feijão, algodão, uva, brássicas, morangueiro etc.; e as respostas dessas plantas mediadas por indutores (afídeos, coleópteros, lepidópteros, ácaros, fitopatógenos) promoveram interações negativas e o controle de herbívoros de diferentes espécies (Karban, 1988; Stout *et al.*, 1998; Bounfour & Tanigoshi, 2001; Messina *et al.*, 2002; Van Zandt & Agrawal, 2004; Matsushima *et al.*, 2006; Bird & Akhurst, 2007; Inbar & Gerling, 2008; Lin *et al.*, 2008).

Populações de *Tetranychus pacificus* McGregor, são reduzidas pela infestação prévia de *Eotetranychus willamettei* McGregor em videiras (Flaherty & Hoy, 1971; English-Loeb *et al.*, 1993). O fitness do ácaro rajado *T. urticae* é reduzido pela infestação prévia do coespecífico em morangueiro (Kielkiewicz, 1988; Shanks & Doss, 1989; Bounfour & Tanigoshi, 2001). *Tetranychus turkestanii* Ugarov & Nikolski, o ácaro do morangueiro, afeta a densidade populacional de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Inbar & Gerling, 2008). Messina *et al.* (2002) estudaram a especificidade da defesa induzida em plantas de trigo, previamente infestadas por *Rhopalosiphum padi* e *Diuraphis noxia* (Aphididae) e vice-versa. Foi constatado, que somente a infestação prévia de *R. padi* promoveu efeito negativo sobre os coespecíficos deste afídeo.

### **2.1.2. Sistemicidade da defesa induzida**

Plantas estoloníferas consistem de indivíduos múltiplos, geneticamente idênticos e interconectados por ramos denominados estolões. Os estolões representam um tecido de transporte altamente especializado. Plantas com tal

característica vegetativa tornam possível o transporte de água, nutrientes e fotoassimilados para os novos clones, beneficiando plantas localizadas em ambientes com escassez de recursos, permitindo sua sobrevivência (Bullock *et al.*, 1994; Alpert, 1996; Roiloa *et al.*, 2007).

O transporte de substâncias dentro da rede de plantas clones tem sido extensivamente descrito na literatura (Marshall & Anderson-Taylor, 1992; Alpert, 1996; Hutchings & Wijesinghe, 1997). No entanto, a importância das conexões de estolões para o transporte de agentes de defesa é um aspecto que vem sendo estudado recentemente e que se deve levar em consideração no contexto da defesa de plantas (Stuefer *et al.*, 2004; Gomez & Stuefer, 2006).

Sabe-se que a herbivoria desencadeia sinais de defesa através das rotas vasculares, emitindo o alerta desde o local do dano até outras partes da planta que não foram danificadas, conseqüentemente as partes não danificadas também ativam suas defesas (Stuefer *et al.*, 2004). No contexto da defesa das plantas deve-se mencionar o fenômeno da resistência induzida sistêmica, a injúria localizada ou o local de expressão da resposta induzida mesmo distante dos demais órgãos, dirige-se sistematicamente por toda a planta. É notável a importância dos estolões para a defesa sistêmica de plantas, no entanto, ainda não está elucidado sobre a possível função dos estolões e conexões de rizoma para a distribuição interna de substâncias, como hormônios, sinais de defesa, toxinas, patógenos etc. (Karban & Baldwin, 1997; Van der Putten *et al.*, 2001; Alpert *et al.*, 2003; Bruce & Pickett, 2007). Qualquer que seja a rota dessas substâncias, sabe-se que a conectividade de folha para folha se dá através dos respectivos tecidos condutores, logo se espera o mesmo para os sinais do sistema induzido de defesa (Alpert *et al.*, 2003; Roiloa *et al.*, 2007).

Mudanças fitófago-induzidas que ocorrem nos fenótipos das plantas relacionam-se a alterações das características que reduzem a digestibilidade do tecido consumido, devido à produção de metabólitos tóxicos, como os inibidores de proteases, substâncias voláteis e uma variedade de combinações defensivas (Dudley & Schmitt, 1996; Schmitt *et al.*, 1999; Bruce & Pickett, 2007).

Gomez & Stuefer (2006) verificaram que ramos da erva estolonífera *Trifolium repens* L. (Fabaceae) emitem defesa induzida de forma sistêmica para outros ramos após o dano local produzida pela espécie *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Esse estudo corrobora a existência da defesa induzida em plantas ligadas fisiologicamente através dos estolões. Por um lado essa forma de integração fisiológica pode conferir benefícios à rede de plantas clones, ou pode resultar em custos para outros clones que não sofreram herbivoria (Stuefer *et al.*, 2004; Gomez & Stuefer, 2006; Gomez *et al.*, 2007).

### **2.1.3. Inibidores de proteases**

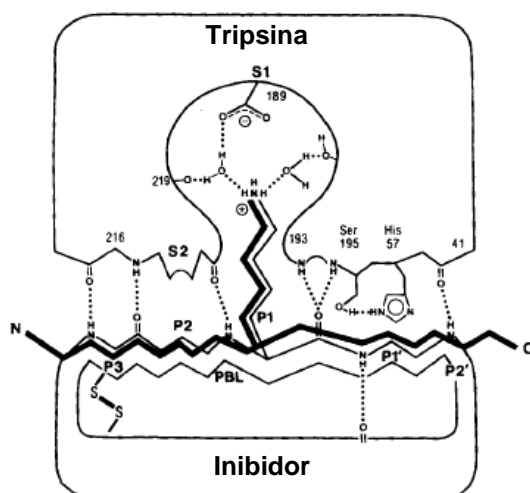
As proteases são enzimas presentes no intestino dos fitófagos que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas do alimento ingerido pelos mesmos (Ryan, 1990) Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com os aminoácidos ativos e o centro de reação (Koiwa *et al.*, 1997): serino, cisteíno, aspartil e metallo-proteases. Elas agem no intestino dos fitófagos biodisponibilizando aminoácidos provenientes da proteína ingerida, para satisfazer as exigências nutricionais requeridas no crescimento e desenvolvimento dos fitófagos (Amirhusin *et al.*, 2007).

Os inibidores de proteases (IPs) exercem função de defesa das plantas (Ryan, 1990), dificultando a digestão das proteínas e a assimilação de nutrientes no intestino

dos fitófagos, afetando o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos mesmos (Vila *et al.*, 2005; Marsaro *et al.*, 2006).

Tipos de inibidores de proteases como: serino-proteases, cisteino-proteases, dentre outros, vêm sendo aplicados no controle de pragas, principalmente aquelas pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera, Hemiptera, Coleoptera e a sub-ordem Acarina. A aplicação desses inibidores tem sido feita diretamente na dieta dos fitófagos, aplicando peptídeos ou combinações sintéticas que são inibidores de proteases que atuam no intestino dos insetos (Pilon *et al.*, 2006). Bem como a utilização de genes que codificam inibidores em plantas, como forma de conferir resistência a ácaros e insetos (Laskowski & Kato, 1980; Shanks & Doss, 1989; Marinho, 2006; Ralph *et al.*, 2006; Kusnierczyk *et al.*, 2007; Lawrence *et al.*, 2007; Sarmiento, 2007; Zheng *et al.*, 2007; Zong & Wang, 2007).

O mecanismo de ação dos inibidores de proteases baseia-se na inibição competitiva de uma proteinase, via bloqueio de sua atividade proteolítica (Fig. 1). A ingestão de inibidores pelos fitófagos interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio. Assim sendo, os inibidores são considerados agentes anti-metabólicos, pois levam a uma deficiência protéica dos insetos. A atividade antibiótica dos inibidores de proteases é atribuída à sua interferência na digestão protéica que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução. Outra hipótese é que os inibidores afetem o desenvolvimento de forma indireta, via um mecanismo de feedback, que levaria a um aumento da produção de proteinases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis (Broadway *et al.*, 1986; Bode & Huber, 1992; Amirhusin *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Esquema representativo da ligação de uma serino-proteinase (tripsina) ao inibidor correspondente (Adaptado de Bode & Huber, 1992).

Os aminoácidos são deslocados para a síntese de proteinases em detrimento de outras proteínas essenciais (Zavala *et al.*, 2004). Entretanto, investigações mais recentes mostraram que a deficiência de aminoácidos essenciais resultantes da hiperprodução de proteinases em lagartas de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea* deveu-se à redução da atividade proteolítica intestinal (Broadway, 1995).

A magnitude da indução de IPs nas plantas pode variar de acordo com a intensidade do dano (Pearce *et al.*, 1993), do tipo de herbívoro que está se alimentando (Stout *et al.*, 1998) ou o agente indutor que está sendo aplicado (Botella *et al.*, 1996) A resposta induzida pode ser local, sistêmica ou restrita para folhas ou órgãos (Pearce *et al.*, 1993; Jongsma *et al.*, 1994; Orians *et al.*, 2000). Além disso, a habilidade da planta para produzir ou induzir a produção de IPs pode ser dependente da idade da planta ou órgão específico (Pearce *et al.*, 1993; Ausloos *et al.*, 1995). Isso sugere que em algumas espécies de plantas a expressão dos IPs está condicionada ao seu desenvolvimento (Jongsma, 1995). Supõe-se que a grande variação entre tipos, distribuição e indução dos IPs entre plantas, está firmemente ligada ao papel ecológico dos IPs para cada espécie vegetal (Jongsma, 1995).

## 2.2. Ocorrência de *T. urticae* e *T. mexicanus* em morangueiro

No Brasil, a produção de morangos se expande a cada ano (Resende *et al.*, 1999). Os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul são os maiores produtores, onde se destaca o cultivo das cultivares Campinas, Dover e Princesa Isabel (Botelho, 1999; Cruz, 1999; Santos, 1999). A cultivar Campinas, desenvolvida no Instituto Agrônomo de Campinas - IAC na década de sessenta, a partir do cruzamento entre as cultivares norte-americanas Donner e Tahoe, causou um salto na produtividade e qualidade dos morangos produzidos no país.

O morangueiro é propagado vegetativamente através de mudas de estolões emitidas pela planta matriz, verificada logo após o transplante das mudas, realizado de fevereiro a junho, de acordo com a região (Santos, 1993; Tessarioli Neto *et al.*, 2003). Já na floração (etapa reprodutiva) ocorre a diferenciação do meristema vegetativo para o floral, originando os componentes da flor (pétalas, estames e pistilo), ao invés dos órgãos vegetativos (folhas, caule e estolhos) (Duarte, 1999).

A relação de pragas associadas à cultura do morangueiro é composta por ácaros fitófagos. O ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) é uma espécie polífaga considerada praga-chave nesta cultura. Esse ácaro em altas infestações pode reduzir a produção de frutos em até 80% (Chiavegato & Mischán, 1981). O ácaro-vermelho *Tetranychus mexicanus* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), apesar de não ser relatado como praga primária, também é observado em plantios de morangueiro em cultivo protegido provocando injúrias às folhas (obs. pessoal).

Para o controle de ácaros no morangueiro, normalmente emprega-se o controle químico, por meio do uso de acaricidas (Moraes & Flechtmann, 2008); o controle biológico, através da liberação de ácaros predadores, principalmente aqueles

pertencentes à família Phytoseiidae, por exemplo *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot e *Neoseiulus californicus* McGregor (De Boer & Dicke, 2005; Fraulo & Liburd, 2007); e a utilização de variedades resistentes (Lourenção *et al.*, 2000; Wold & Hutchison, 2003).

No morangueiro, a resistência de plantas vem se tornando uma estratégia para o manejo de populações de fitófagos. Resultados positivos foram obtidos sobre resistência induzida em populações do ácaro rajado *T. urticae* em plantas em morangueiro (Steinite & Ievinsh, 2002). Walker-Simmons & Ryan (1977) observaram a presença de inibidores de proteases em 23 espécies de plantas, dentre elas *Fragaria virginiana* Duchesne.

Trabalhos realizados em tomateiro com ácaros do mesmo gênero *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, mostraram que os inibidores de protease tripsina-like se apresentaram como bons indicadores de resposta induzida (Sarmiento, 2007). *T. urticae* possivelmente pode ter seu desenvolvimento e performance alterados em plantas previamente infestadas por ácaros coespecíficos. Esses argumentos nos conduzem a hipotetizar que a defesa induzida direta, através dos inibidores de protease, pode afetar o crescimento populacional do ácaro rajado *T. urticae*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Para avaliar a possibilidade da indução de defesa direta em plantas de morangueiro foram realizados três ensaios. No primeiro ensaio, estudou-se a flutuação populacional de *T. urticae* e a atividade dos inibidores de proteases em plantas de morangueiro. No segundo ensaio, foi avaliada a especificidade da defesa direta, estudando-se a flutuação populacional de *T. mexicanus* em plantas previamente infestadas por *T. urticae*, como também a atividade dos inibidores de

proteases nas mesmas. No terceiro ensaio, diante da possibilidade de sistemicidade da resposta induzida, estudou-se a população de *T. urticae* e a atividade dos inibidores de proteases nos propágulos conectados às plantas matrizes de morango.

### **3.1. Criação estoque**

Para a criação de manutenção, plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* DC.) cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa - UFV, foram infestadas, respectivamente, com espécimes de *T. urticae* e de *T. mexicanus*. Quando necessário para realização dos experimentos, fêmeas adultas de *T. urticae* e *T. mexicanus* eram transferidas, utilizando-se pincel de cerdas finas, das folhas de feijoeiro infestadas para as plantas de morango.

### **3.2. Obtenção das mudas e instalação do experimento**

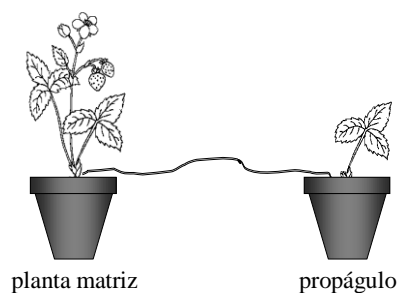
#### **3.2.1 - Ensaio 1 e 2:**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG/CTZM, em Viçosa. Foram utilizadas 60 plantas de morangueiro da cultivar IAC Campinas por ensaio, com três meses de idade e com três folhas formadas. Cada muda de morangueiro foi cultivada em vasos de 2,0 L.

#### **3.2.2 - Ensaio 3:**

Foram utilizadas 60 plantas de morangueiro cultivar IAC Campinas com aproximadamente 5 meses de idade, tempo necessário para obtenção dos clones. Cada muda de morangueiro foi cultivada em vasos de 2,0 L. Durante a formação destolões, as plantas matrizes permaneceram na casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa.

Os clones formados foram plantados em pequenos vasos, mantendo-se conectados à planta-mãe (Fig. 2), posteriormente todas as unidades (plantas matrizes + propágulos) foram transferidas para a casa de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.



**Figura 2** – Sistema planta matriz e propágulo de morangueiro utilizado para avaliar a capacidade sistêmica da resistência induzida em morangueiro.

As plantas utilizadas nos três ensaios foram mantidas sobre estrados de madeira, sob uma estrutura montada com ferro galvanizado e recoberta com tecido organza, para evitar o acesso de ácaros e insetos. Em cada estrutura era mantido apenas um tratamento (Fig. 3).



**Figura 3-** Estrutura montada em casa de vegetação para alocação das plantas e isolamento dos tratamentos.

### **3.3. Avaliação das populações de *T. urticae* e *T. mexicanus***

Nos ensaios 1 e 2 a avaliação da população de *T. urticae* e de *T. mexicanus* foi feita em plantas controle, plantas pré-infestadas e em plantas injuriadas mecanicamente. No ensaio 3, a fim de verificar a sistemicidade da defesa induzida a avaliação populacional de *T. urticae* foi feita nos propágulos conectados às respectivas plantas matrizes controle, plantas pré-infestadas e plantas injuriadas mecanicamente. Cada planta e cada propágulo representavam uma repetição num total de 20 por tratamento.

Primeiramente, todas as plantas e os propágulos de cada tratamento tiveram uma folha envolvida por tecido organza até a altura do pecíolo e envolto com cola stick à base de poliisobutileno para servir de barreira adesiva, para evitar o acesso de ácaros. Essas folhas foram utilizadas para a determinação dos inibidores de proteases.

O tratamento plantas pré-infestadas foi composto por plantas de morangueiro submetidas a uma primeira infestação de 20 fêmeas de *T. urticae* por um período de dez dias. No tratamento de plantas injuriadas mecanicamente, as folhas foram perfuradas por um conjunto de vinte alfinetes entomológicos montados em um disco plástico. Com esse artefato, as folhas sofriam danos, ao se ter somente as pontas dos alfinetes em contato com as mesmas. O controle experimental, plantas limpas, foi representado por plantas de morangueiro que não sofreram ataque de *T. urticae* e nem injúria mecânica. No ensaio 3, somente nas plantas matrizes foram aplicados os tratamentos.

Decorridos dez dias da aplicação dos tratamentos, as folhas isoladas de cada planta foram retiradas e utilizadas para a determinação dos níveis de inibidores de proteases.

Após a coleta das folhas, a população de *T. urticae* remanescente sobre as plantas pré-infestadas foi exterminada, aplicando-se o produto Organic Neem® (3262 ppm de Azadirachtina A/L), comumente utilizado para o controle de ácaros e insetos, na concentração de 2%. Esse procedimento foi realizado para as plantas controle e as injuriadas mecanicamente, para manter constantes as condições experimentais. Após a aplicação do produto esperou-se o período de cinco dias. Em seguida foi realizada a segunda infestação na nova folha formada em cada planta, em todos os tratamentos. Tal procedimento teve por objetivo manter constante a qualidade nutricional do alimento oferecido para as espécies de ácaros utilizadas, *T. urticae* e *T. mexicanus*, na infestação subsequente.

A nova folha foi infestada por cinco fêmeas adultas de *T. urticae* no ensaio 1 e cinco fêmeas adultas de *T. mexicanus* no ensaio 2. No ensaio 3, as fêmeas de *T. urticae* foram colocadas sobre os propágulos. Em cada ensaio as fêmeas permaneceram sobre as plantas de morangueiro por 15 dias. Com o auxílio de lupa manual (10x), somente na folha infestada, foi avaliada diariamente a população de ácaros com a contagem do número de formas móveis de *T. urticae* e *T. mexicanus*, de acordo com os ensaios.

### **3.4. Obtenção do extrato foliar**

O extrato foliar das plantas de morangueiro foi obtido a partir da amostra de um folíolo não danificado, das folhas que foram isoladas (descrito anteriormente), de cada uma das 20 plantas de cada tratamento: plantas controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas.

No Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da UFV, o preparo do extrato bruto foi realizado a 4°C, de acordo com o método descrito por Ohta *et al.* (1986). As folhas foram retiradas das plantas e imediatamente

congeladas em nitrogênio líquido. No laboratório, as mesmas foram pesadas e trituradas com auxílio do almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão 0,1M Tris-HCl, pH 8,2 e 20mM CaCl<sub>2</sub>; 1:3 (p/v), e em seguida centrifugado a 17.200 g por 60 minutos a 4° C (Batista *et al.*, 2002). O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi coletado e utilizado para a determinação da concentração de proteína total e da concentração de inibidores de proteases.

### **3.5. Determinação dos inibidores de proteases**

A presença de inibidores no extrato foliar foi determinada utilizando-se tripsina purificada. A determinação da atividade trípica baseou-se no seguinte procedimento analítico: 50 µL do extrato; 500 µL de Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio; e 50 µL da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M foram 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 cloreto de cálcio; 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. Após o tempo de incubação, 500 µL dessa mistura e do respectivo controle foram retirados e adicionados a outro tubo contendo 500 µL Tris-HCl 0,1M; pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio; e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorbância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas em triplicatas.

### **3.6. Determinação da concentração de proteína do extrato**

A concentração de proteína foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão uma solução de 0,2 mg/mL de soroalbumina bovina (BSA).

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

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1000 \times P}$$

Em que:

A = absorvância em 410 nm do padrão – absorvância em 410 nm da amostra;

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 1 µL de tripsina ativa sobre o substrato L-BAPNA dará a leitura de absorvância em 410 nm de 0,019 (Kakade *et al.*, 1974).

### **3.7. Análises estatísticas**

Foi utilizado nos experimentos o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados relativos ao número médio de ácaros, *T. urticae* e *T. mexicanus*, avaliados diariamente, nos diferentes tratamentos foram transformados em  $\text{Log}_{10}x$  para reduzir o efeito da pseudo-repetição no tempo e estabilizar a variância, respectivamente (Crawley, 2007). Utilizou-se o programa R (R Development Core Team, 2006) para a Análise de Covariância (ANCOVA), tendo o tempo como covariável, seguido pelo teste Tukey a 5% de significância. Os dados referentes à quantidade de tripsina inibida foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Tukey a 5% de significância.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

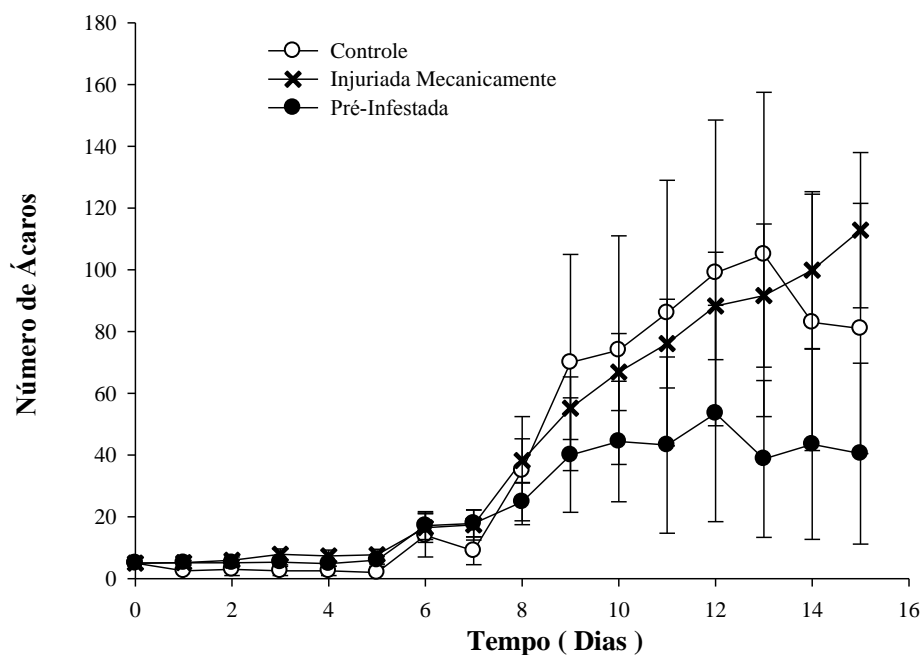
### **4.1. Ensaio 1**

Na análise de covariância realizada, o fator tratamento foi significativo ( $F=3,754$ ; g.l.= 2;  $P=0,032$ ). Como também, o que já era esperado, a variável tempo teve efeito significativo ( $F= 205,657$ ; g.l.=1;  $p<0,0001$ ) (Tabela 1).

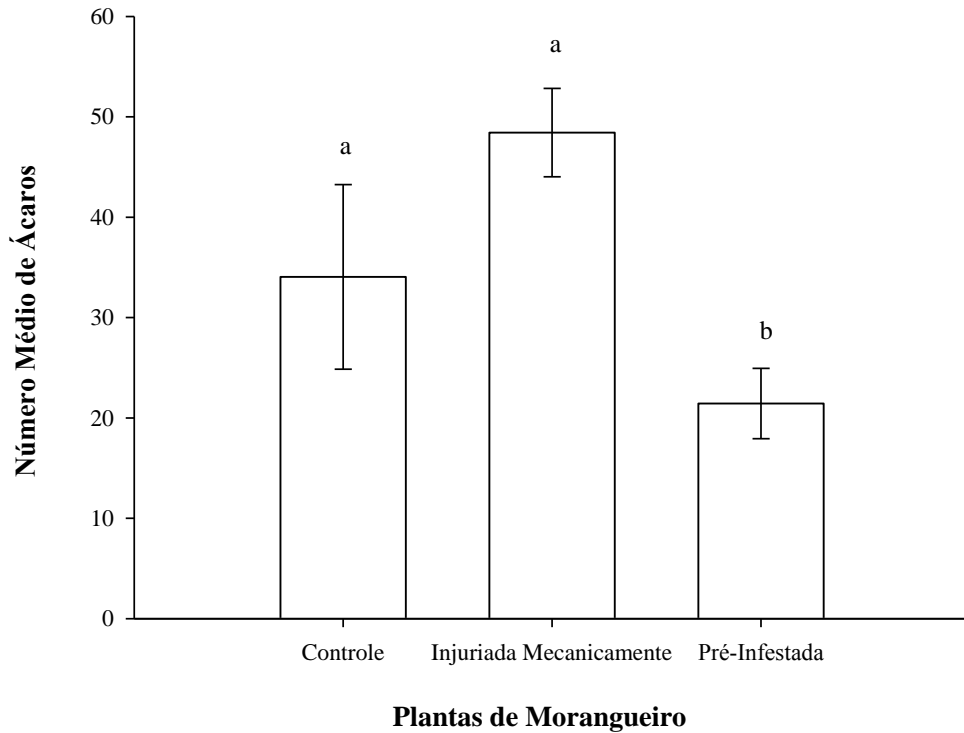
O número médio de *T. urticae* para o tratamento plantas pré-infestadas foi significativamente menor ( $21,43 \pm 3,5$ ) que os demais tratamentos (Figura 4). Não houve diferença significativa para plantas injuriadas mecanicamente ( $48,43 \pm 4,4$ ), quando comparadas às plantas controle ( $34,05 \pm 9,2$ ) pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 5).

**Tabela 1.** Análise de covariância (ANCOVA) do número médio de indivíduos de *Tetranychus urticae* sobre plantas de morangueiro.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P
Tratamento	0,409	2	0,204	3,754	0,032
Tempo (cov.)	11,199	1	11,199	205,657	<0,0001
Erro	2,233	41	0,055		
Total	13,841	44			



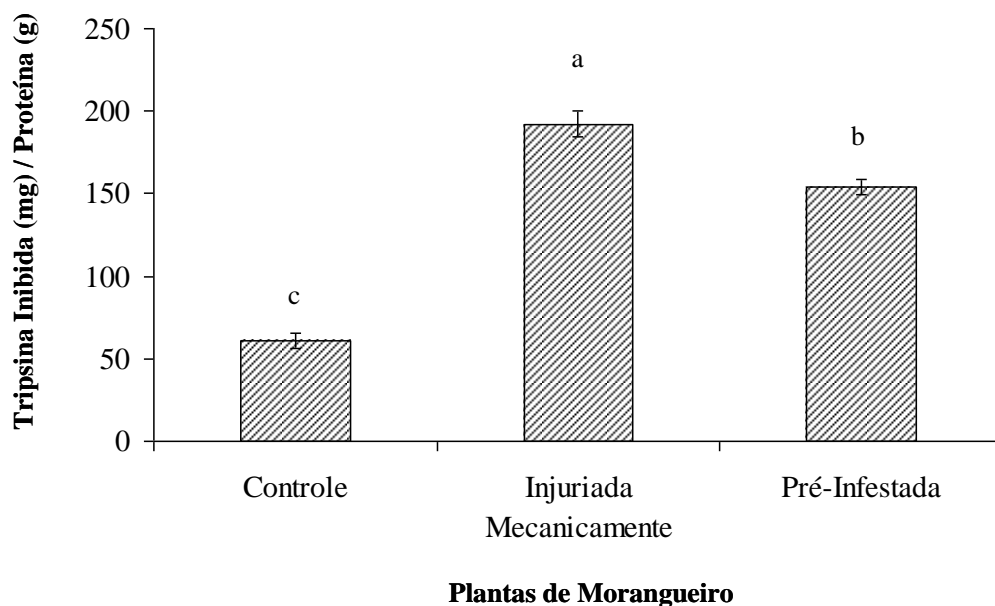
**Figura 4** – Número de indivíduos do ácaro rajado *Tetranychus urticae* por plantas de morangueiro controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas com o coespecífico.



**Figura 5** - Número médio ( $\pm$  E.P.) do ácaro rajado *Tetranychus urticae* relativo ao período de avaliação sobre plantas de morangueiro controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas com o coespecífico. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey,  $P \leq 0,005$ ).

Diferenças significativas nas concentrações de inibidores de proteases foram observadas entre os tratamentos ( $F = 126,23$ ; g.l. = 2;  $p < 0,05$ , ANOVA) (Fig. 4).

Maiores concentrações de inibidores de proteases foram encontradas nas plantas injuriadas mecanicamente [ $192,20 \pm 13,98$  tripsina inibida (mg)/proteína(g)], seguidas das plantas pré-infestadas [ $154,08 \pm 8,09$  tripsina inibida (mg)/proteína(g)], e das plantas controle [ $61,11 \pm 7,96$  tripsina inibida (mg)/proteína(g)] pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 6).



**Figura 6** – Quantidade média ( $\pm$  E.P.) de tripsina inibida (mg)/proteína(g) presente no extrato foliar de plantas de morango controle, injuriadas mecanicamente e plantas pré-infestadas com o ácaro rajado *Tetranychus urticae*. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey,  $P \leq 0,005$ ).

O número médio de *T. urticae* em plantas pré-infestadas foi menor do que em plantas controle e injuriadas mecanicamente. Isso indica uma redução no crescimento populacional de *T. urticae* em plantas de morango previamente infestadas por coespecíficos e a capacidade da planta de responder à herbivoria, o que demonstra o efeito da defesa induzida sobre populações de *T. urticae*, possivelmente através da ação dos inibidores de proteases.

Proteases são enzimas presentes no intestino médio dos artrópodes que realizam a degradação da proteína do alimento ingerido. Uma vez que a enzima é inibida, a assimilação de nutrientes pelos fitófagos é reduzida e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos fitófagos é afetado. Pompermayer *et al* (2003) verificaram a

interferência negativa da ingestão de inibidores de proteases sobre o desenvolvimento de lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). Oliveira *et al.* (2005) obtiveram resultados positivos utilizando o inibidor de protease SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor) contra a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Outros estudos também têm demonstrado o efeito anti-nutricional desses inibidores contra espécies da ordem Coleoptera (*Callosbruchus maculatus* Fabricius) (Murdock *et al.*, 1988).

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por Shanks & Doss (1989) em plantas de morangueiro previamente infestadas por *T. urticae*; ocorreu decréscimo no número de indivíduos da população seguinte, explicado por possíveis mudanças ocorridas nas plantas tornando-as menos adequadas aos ácaros. Esse fato também foi observado por Karban & Carey, (1984), que verificaram que plantas de algodão previamente infestadas por *Tetranychus turkestanii* Ugarov & Nikolski se mostraram inadequadas a esse fitófago na população futura.

As plantas injuriadas mecanicamente e plantas controle não diferiram em relação ao número médio de *T. urticae* na infestação posterior. No entanto, maior conteúdo de inibidores de proteases foi encontrado nas plantas injuriadas mecanicamente. Sabe-se que na ocorrência de stress ou dano físico às células vegetais, uma degradação seqüencial de lipídeos pode ser iniciada pelas lipoxigenases (Farmer & Ryan, 1992; Vieira *et al.*, 2001). As lipoxigenases vegetais são isoenzimas que estão envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, tais como o ácido traumático, o ácido jasmônico e aldeídos voláteis (Anderson *et al.*, 1989; Bunker *et al.*, 1995). O ácido jasmônico está associado à ativação de genes que codificam para a síntese de inibidores de proteases (Anderson *et al.*, 1989; Fortunato *et al.*, 2007). Sugere-se, portanto que em virtude da injúria causada pelos alfinetes,

maior nível de inibidores foi verificado nessas plantas. Vieira *et al.* (2001) obtiveram aumento dos níveis de inibidores de proteases em plantas de soja submetidas à injúria mecânica nas folhas.

Os resultados deste trabalho demonstram que a população seguinte de *T. urticae* decresceu em função da produção de inibidores de proteases, resultado da injúria provocada previamente pelo coespecífico. Dessa forma, podemos perceber que a resistência induzida de plantas torna-se um componente importante dos programas de manejo de pragas, particularmente nos casos onde os métodos atuais tornam-se pouco efetivos.

Estudos adicionais precisam ser realizados para verificar a especificidade da ação dos inibidores em resposta à herbivoria de *T. urticae*. É necessário também, investigar se a maior produção de inibidores de proteases se converteria em um mecanismo de defesa que se translocaria entre as plantas de morangueiro conectadas através dos estolões.

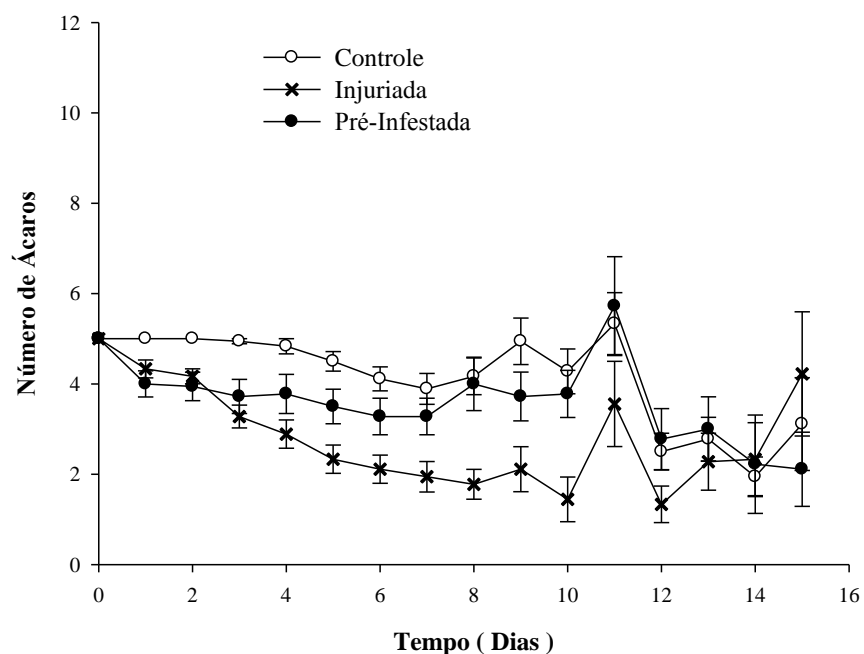
#### **4.2. Ensaio 2**

Foi detectada diferença significativa na dinâmica populacional de *T. mexicanus* sobre plantas de morangueiro em função dos tratamentos testados ( $F=12,642$ ; g.l.= 2;  $p<0,0001$ ). Como esperado, a covariável “tempo” contribuiu significativamente na dinâmica populacional de *T. mexicanus* ( $F=20,428$ ; g.l.=1;  $p<0,0001$ ) (Tabela 2).

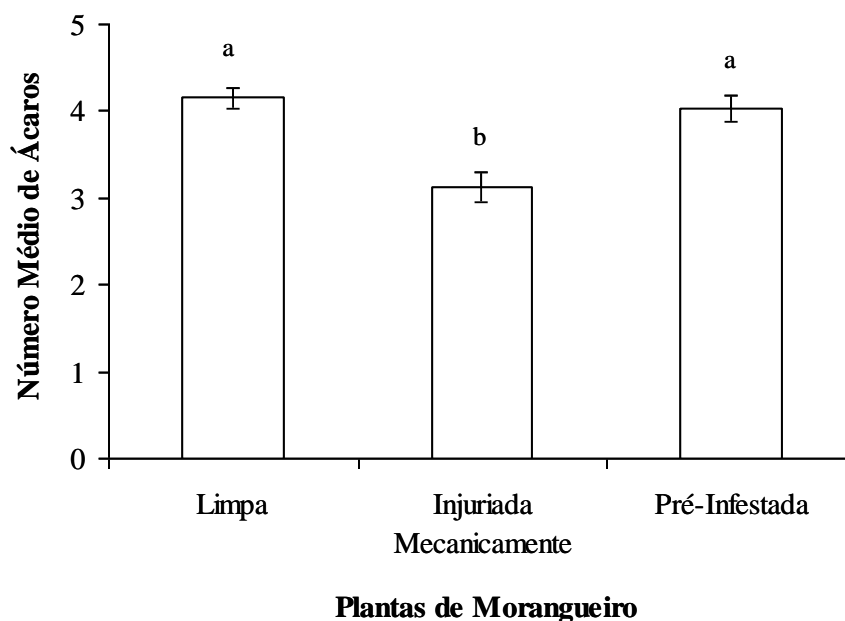
A média populacional de *T. mexicanus* durante o experimento em plantas injuriadas mecanicamente foi menor ( $3,12 \pm 0,17$  indivíduos) em relação aos demais tratamentos (Figura 7). Plantas controle ( $4,15 \pm 0,12$  indivíduos) e pré-infestadas com *T. urticae* ( $4,03 \pm 0,16$  indivíduos) não diferiram entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 8).

**Tabela 2.** Análise de covariância (ANCOVA) do número médio de indivíduos de *Tetranychus mexicanus* sobre plantas de morangueiro.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P
Tratamento	0,347	2	0,174	12,642	<0,0001
Tempo (cov.)	0,280	1	0,280	20,428	<0,0001
Erro	0,604	44	0,014		
Total	1,231	47			



**Figura 7** - Número de indivíduos do ácaro vermelho *Tetranychus mexicanus* por plantas de morangueiro controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas com o *Tetranychus urticae*.

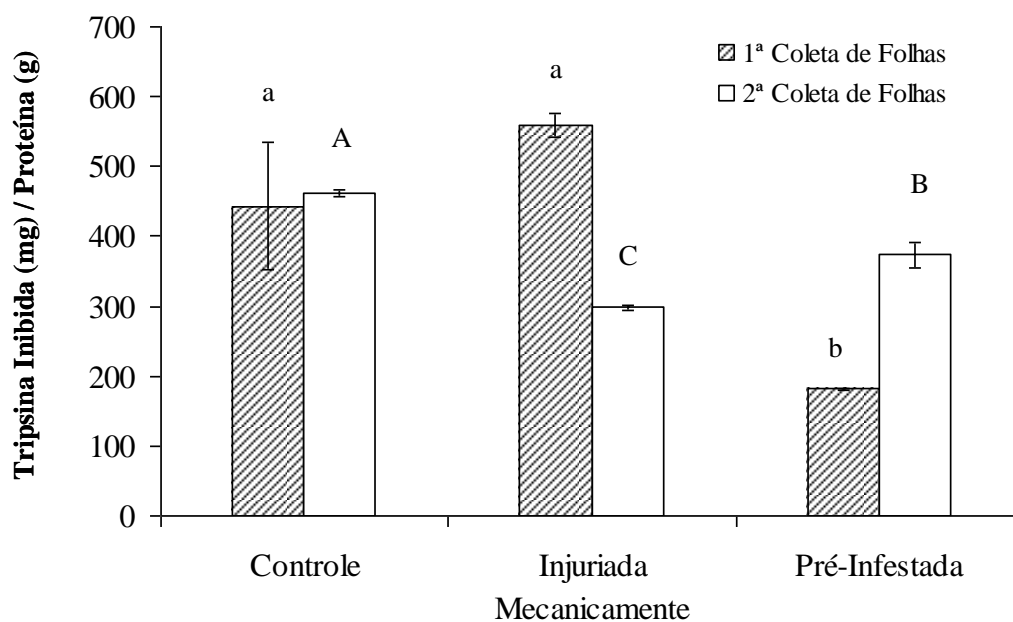


**Figura 8** – Número médio ( $\pm$  E.P.) do ácaro vermelho *Tetranychus mexicanus* relativo ao período de avaliação sobre plantas de morangueiro controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas com *T. urticae*. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey,  $P \leq 0,005$ ).

As concentrações de inibidores de proteases detectadas na primeira coleta de folhas de morangueiro não diferiram estatisticamente entre os tratamentos de plantas controle [(443,17  $\pm$  91,83 tripsina inibida (mg)/proteína(g)] e injuriadas mecanicamente [(558,90  $\pm$  17,65 tripsina inibida(mg)/proteína(g)], diferindo do tratamento de plantas pré-infestadas com *T. urticae* [(181,293  $\pm$  0,28 tripsina inibida(mg)/ proteína(g)] pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 9).

As concentrações de inibidores de proteases detectadas na segunda coleta de folhas de morangueiro diferiram estatisticamente entre tratamentos de plantas controle [(461,92  $\pm$  5,22 tripsina inibida(mg)/proteína(g)], injuriadas mecanicamente [(298,26  $\pm$  3,19 tripsina inibida(mg)/proteína(g)] e plantas pré-infestadas com *T.*

*urticae* [(373,58 ± 17,74 tripsina inibida(mg)/ proteína(g)] pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 9).



#### Plantas de Morangueiro

**Figura 9** - Quantidade média ( $\pm$  E.P.) de tripsina inibida (mg)/proteína(g) presente no extrato foliar de plantas de morangueiro controle, injuriadas mecanicamente e plantas pré-infestadas com o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Barras rachuradas) e infestação posterior com *Tetranychus mexicanus* (Barras brancas). Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey,  $P \leq 0,005$ ).

A pré-infestação com *T. urticae* nos morangueiros não alterou os números médios do ácaro heteroespecífico *T. mexicanus*, na infestação subsequente. Tal resultado demonstra a especificidade das defesas induzidas por *T. urticae* em morangueiro, uma vez que, em trabalhos anteriores (Ensaio 1), foi possível detectar a redução do número médio na infestação posterior, naquele caso *T. urticae*. Apesar das concentrações de inibidores de proteases diferirem entre os tratamentos de plantas controle e pré-infestadas em ambas as coletas de folhas, tal diferença não

alterou o número médio de *T. mexicanus* nas plantas. Somente houve diferença significativa nas plantas injuriadas mecanicamente, onde o número médio de *T. mexicanus* foi menor.

Em vista disso, as defesas induzidas em morangueiro por *T. urticae* aparentemente atuam somente na infestação subsequente do coespecífico e não em infestações de heteroespecíficos, pelo menos para a espécie *T. mexicanus*. Estes resultados não podem ser generalizados, uma vez que, em algodoeiro previamente infestado com *T. urticae* foi observada redução do crescimento populacional do heteroespecífico *Tetranychus turkestanii*. Nesse caso foi observado que as respostas induzidas por *T. urticae* atuam sobre o heteroespecífico *T. turkestanii*, apesar dos fatores que reduziram o crescimento populacional do heteroespecífico também não terem sido identificados (Karban & Carey, 1984). Como descrito anteriormente, outros trabalhos mostraram a especificidade da defesa induzida. Plantas de trigo previamente infestadas com o afídeo *R. padis* tiveram a população do coespecífico reduzida, o mesmo verificado para *T. urticae* no (Ensaio 1), entretanto o mesmo não ocorreu para o heteroespecífico *D. noxia* (Messina *et al.*, 2002).

Em plantas injuriadas mecanicamente foi observada redução do número médio de *T. mexicanus* que foram posteriormente infestados nos morangueiros em relação ao controle e plantas pré-infestadas com *T. urticae*. As concentrações de inibidores de proteases não foram correspondentes à redução do número médio de *T. mexicanus* no tratamento de plantas injuriadas mecanicamente. Possivelmente outros compostos ou rotas bioquímicas estejam envolvidos nas respostas induzidas por *T. urticae* em morangueiro e seja mais eficiente para explicar a dinâmica populacional de ácaros fitófagos em re-infestação no morangueiro, o que não foi aqui estudado.

O estudo da especificidade da defesa induzida direta por ácaros em plantas apresenta possibilidades de aplicação no manejo de ácaros de importância agrícola (Baldwin & Schmelz, 1996). Entretanto, para o manejo de ácaros em morangueiro, pelo menos para a espécie *T. mexicanus*, tal estratégia teria baixa probabilidade de sucesso pela especificidade das respostas induzidas, como verificado neste trabalho.

Com os estudos na área de defesa induzida de plantas, Karban & Baldwin (1997) observaram que as defesas são sistêmicas, ou seja, translocam pela planta uma vez ativada. Existe então a possibilidade de defesas induzidas por uma espécie de fitófago serem deletérias à outra espécie sobre a mesma planta (e.g. Moran & Whitham (1990)). A não identificação de efeitos deletérios entre espécies de fitófagos, como observado neste trabalho, sugere a possibilidade da coexistência de heteroespecíficos sobre mesma planta. Fadini *et al.* (2007) observaram a não interação entre os ácaros *T. urticae* e *Oligonychus ilicis* Mc Gregor por sítios de alimentação em morangueiro. Por utilizarem sítios de alimentação diferentes em plantas de morangueiro, *T. urticae* e *O. ilicis* são capazes de permanecerem juntos sobre a mesma planta. O mesmo poderia ser concluído para *T. urticae* e *T. mexicanus* com base nos resultados obtidos neste trabalho. Baseados nos estudos anteriores (Ensaio 1), as respostas induzidas por *T. urticae* em morangueiro não atuam sobre *T. mexicanus*, haveria, então, a possibilidade dessas espécies explorem a mesma planta como fonte de recuso alimentar. Uma vez que, foram verificadas em casa de vegetação, altas populações de *T. mexicanus* sobre plantas de morangueiro (*observação pessoal*).

A possibilidade de fitófagos competirem indiretamente por recursos alimentares via defesa de plantas é levantada por Agrawal (2005). Nesse caso, esperar-se-ia a indução de defesa direta de planta provocada por uma espécie de ácaro fitófago que atuaria na redução populacional de um ácaro heteroespecífico. Este fato não foi observado para *T. urticae* e *T. mexicanus* sobre morangueiro. O passo seguinte para o estudo da indução de defesas diretas no morangueiro por ácaros fitófagos seria a identificação dos compostos produzidos pelas plantas após o ataque, fato que não efetuado no presente trabalho.

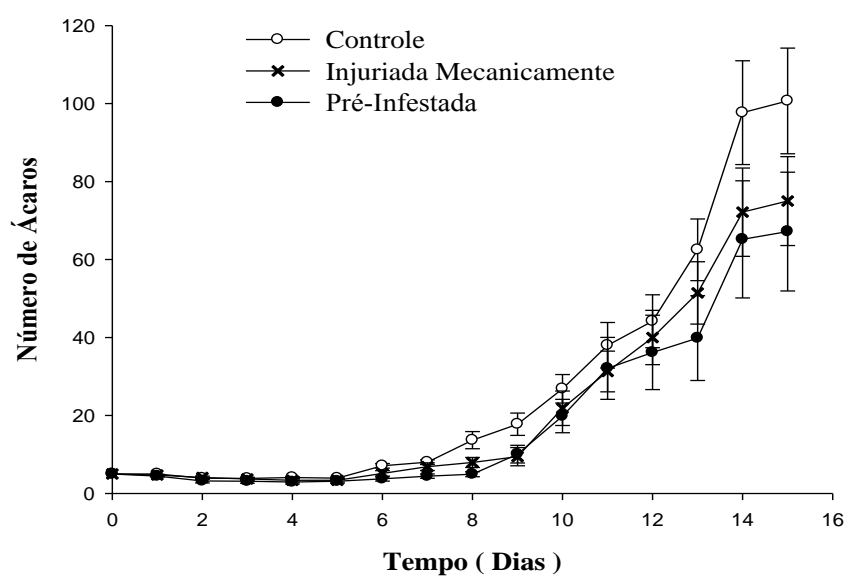
O que se pode generalizar é que a especificidade da defesa induzida por ácaros fitófagos em plantas pode, aparentemente, variar com as espécies do ácaro infestante e da planta. Tal conclusão é possível quando se compara os resultados obtidos neste trabalho com os resultados da literatura. O estudo dos mecanismos de interações intra e interespecíficas entre ácaros fitófagos no morangueiro contribui tanto para o entendimento das teias alimentares formadas e quanto para a definição de possíveis estratégias de manejo de ácaros de importância agrícola.

### **4.3. Ensaio 3**

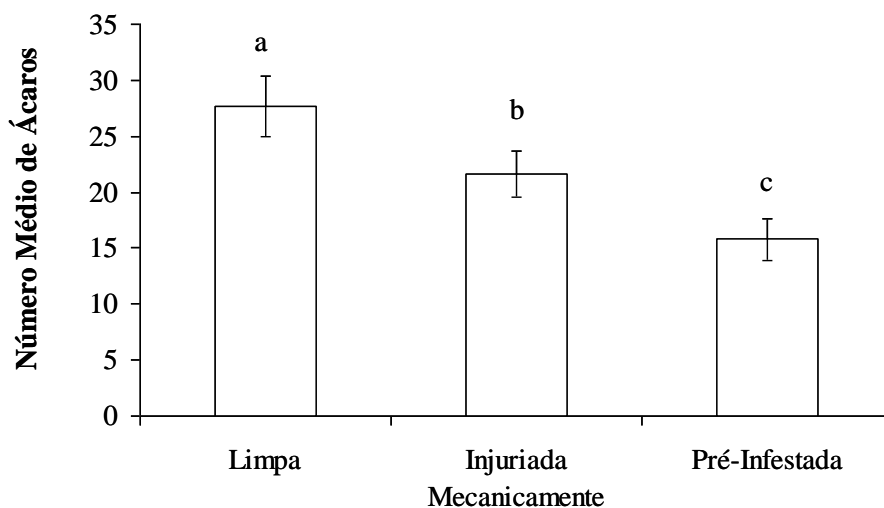
O fator tratamento ( $F= 2,512$ ; g.l.= 2;  $P=0,0426$ ) e a covariável tempo ( $F= 254,713$ ; g.l.=1;  $P<0,0001$ ) tiveram efeitos significativos sobre a dinâmica populacional de *T. urticae* nos propágulos de morangueiro conectado à planta matriz (Tabela 3, Figura 10). As médias dos números de indivíduos de *T. urticae* diferiram estatisticamente para os três níveis do fator tratamento pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), plantas controle ( $27,63 \pm 2,7$ ), plantas injuriadas mecanicamente ( $21,58 \pm 2,1$ ) e plantas pré-infestadas com *T. urticae* ( $15,77 \pm 1,9$ ) (Figura 11).

**Tabela 3.** Análise de covariância (ANCOVA) do número médio de indivíduos de *Tetranychus urticae* sobre plantas de morangueiro.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P
Tratamento	0,201	2	0,100	2,512	0,0426
Tempo (cov.)	10,195	1	10,195	254,713	<0,0001
Erro	1,761	44	0,0400		
Total	12,157	47			



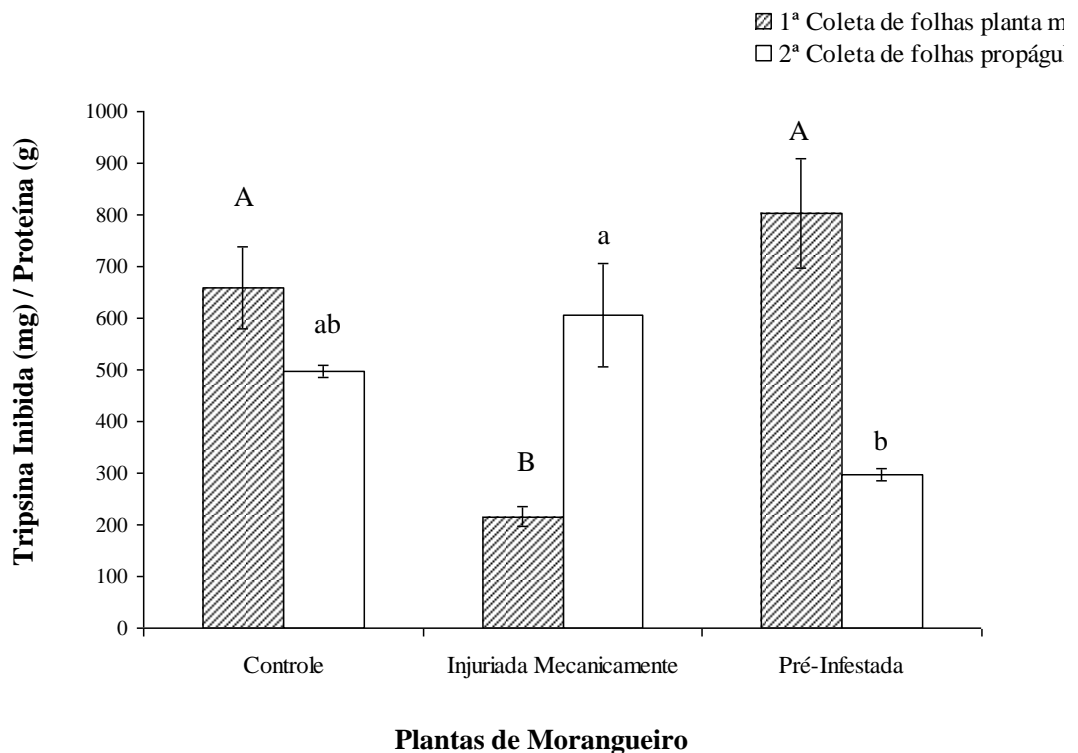
**Figura 10** - Número de indivíduos do ácaro rajado *Tetranychus urticae* em propágulos de morangueiro conectados à planta matriz controle, injuriada mecanicamente e pré-infestada com o coespecífico.



### Plantas de Morangueiro

**Figura 11** – Número médio ( $\pm$  E.P.) do ácaro rajado *Tetranychus urticae* relativo ao período de avaliação em propágulos de morangueiro conectados à planta matriz controle, injuriada mecanicamente e pré-infestada com o coespecífico. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey,  $P \leq 0,005$ ).

As concentrações de inibidores de proteases detectadas na primeira coleta de folhas de morangueiro não diferiram estatisticamente entre plantas controle [(658,48  $\pm$  78,47 tripsina inibida (mg)/proteína(g)] e pré-infestada com *T. urticae* [(803,36  $\pm$  105,44 tripsina inibida(mg)/proteína(g)]. No entanto estes tratamentos diferiram do tratamento das plantas injuriadas mecanicamente [(215,71  $\pm$  19,41 tripsina inibida(mg)/ proteína(g)] ( $F=15,93$ ; g.l.=2;  $P < 0,004$ , ANOVA) (Figura 12).



**Figura 12** – Quantidade média ( $\pm$  E.P.) de tripsina inibida (mg)/proteína(g) presente no extrato foliar de plantas matrizes de morango (Barras rachuradas) e nos respectivos propágulos (Barras brancas) dos tratamentos: plantas controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas com *Tetranychus urticae*. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey,  $P \leq 0,005$ ).

As concentrações de inibidores de proteases detectadas na segunda coleta de folhas dos propágulos conectados à planta matriz diferiram estatisticamente entre tratamentos de planta injuriada mecanicamente [(606,60  $\pm$  100,37 tripsina inibida(mg)/proteína(g)] e planta pré-infestada com *T. urticae* [(297,705  $\pm$  11,70 tripsina inibida(mg)/proteína(g)], enquanto que o controle não diferiu dos demais [(495,80  $\pm$  11,96 tripsina inibida(mg)/proteína(g)] ( $F=7,10$ ; g.l.=2;  $P < 0,026$ , ANOVA) (Figura 12).

O número médio de indivíduos de *T. urticae* em propágulos conectados à planta matriz pré-infestada com o coespecífico do ácaro foi menor do que em propágulos conectados a plantas controle e injuriadas mecanicamente. Isso indica que a pré-infestação com *T. urticae* nas plantas matrizes reduz o número médio do coespecífico em uma infestação posterior dos propágulos. Tal resultado aponta para uma capacidade sistêmica das defesas induzidas por *T. urticae* em morangueiro entre plantas matrizes e propágulos, uma vez que, em trabalhos anteriores (Ensaio 1), foi possível detectar a redução do número médio na re-infestação do coespecífico, naquele caso *T. urticae*.

As concentrações de inibidores de proteases não diferiram entre os tratamentos de plantas controle e pré-infestadas em ambas as coletas de folhas da planta matriz e propágulo, o número médio de *T. urticae* foi menor em propágulo conectado a planta matriz pré-infestada com o coespecífico. As plantas injuriadas mecanicamente apresentaram menor nível de inibidores de proteases em relação à primeira coleta e na segunda coleta foi igual ao controle. Estes resultados diferem dos resultados encontrados por Vieira *et al.* (2001) onde o nível de inibidor foi maior em plantas de soja submetidas à injúria mecânica. Esperava-se nesse caso resultado semelhante ao encontrado por Vieira *et al.* (2001) e no Ensaio 1, onde o nível de inibidor foi maior nas plantas injuriadas mecanicamente.

Os dados indicam que os níveis de inibidores de proteases determinados nos propágulos não correspondem ao número de indivíduos encontrados. Uma possível explicação, novamente seria que outros compostos produzidos pelas plantas, aqui não identificados, podem ter atuado reduzindo o nível populacional de *T. urticae* nos propágulos. Ou ainda, a injúria provocada por *T. urticae* nas plantas matrizes não foi suficiente para induzir a produção de inibidores de proteases nessas plantas. Visto

que, existe a possibilidade de redução do fitness da planta, ou seja, pode haver custo energético para induzir a produção de inibidores de proteases e a translocação entre as plantas matrizes e os propágulos (Gomez *et al.*, 2007). Em estudos realizados por Gomez *et al.*(2007) foi verificado que em curto prazo, a ativação de respostas em plantas estoloníferas, neste caso *Trifolium repens*, apresentam custos e benefícios. Na ausência de herbívoros há o custo de alocação de defesa; já, na presença de herbívoros a planta é beneficiada, pois o dano provocado pelos mesmos é reduzido, devido à ação do sistema de defesa das mesmas. É provável então que a longo prazo ocorra o equilíbrio de custos e benefícios da defesa induzida entre a rede de plantas clones.

As plantas de morangueiro utilizadas neste ensaio já tinham aproximadamente 5 meses de idade, tempo necessário para as plantas emitirem os estolões. Analisando então os níveis de inibidores de proteases representados na Figura 12, observa-se a não significância entre o controle experimental e os demais tratamentos. Hipotetiza-se que a idade da planta pode ter sido fator determinante para tal resultado, uma vez que o nível de produção de inibidores de proteases muda de acordo com a idade da planta e durante seu desenvolvimento (Van Dam *et al.*, 2001b). Zeier (2005) verificou em folhas do gênero *Arabidopsis* que os caminhos sistêmicos de defesa estão essencialmente ausentes dentro de folhas mais velhas. Outros estudos têm demonstrado que as defesas induzidas são dependentes do sistema vascular da planta (Anderson & Agrell, 2005). É possível que a idade e a arquitetura vascular das plantas de morangueiro podem ter sido fator condicionante na produção de inibidores de proteases induzidos pelo ácaro rajado *T. urticae* (Anderson & Agrell, 2005; Zeier, 2005).

A capacidade sistêmica das defesas induzidas entre plantas matrizes e propágulos em morangueiro apresenta possibilidades de aplicação no manejo de ácaros de importância econômica para o morangueiro. Uma vez que, propágulos provenientes de plantas matrizes pré-infestadas com *T. urticae* possam apresentar menores números do coespecífico em uma infestação posterior, pode-se esperar que o dano provocado pelo ácaro a plantas oriundas desses propágulos seja reduzido. Tal conjectura, entretanto, para ser corroborada necessita de informações adicionais com relação à capacidade dos propágulos se manterem resistentes ao *T. urticae* após o desprendimento das plantas matrizes.

Estudos da defesa induzida em plantas clonais conectadas (Gomez & Stuefer, 2006) têm mostrado que essas plantas são capazes de usar as conexões para a translocação de compostos. Entretanto, ainda não está elucidado como isso ocorre em termos fisiológicos, ou seja, relacionado ao sistema vascular das plantas.

O morangueiro apresenta, então, a capacidade de translocar defesas induzidas por *T. urticae* entre a planta matriz e os propágulos através do estolão. Os resultados demonstram que estolões de morangueiros, além de permitirem o transporte de recursos como água, nutrientes e minerais, também é possível que sinais de defesas induzidas sejam sistemicamente transportados entre plantas conectadas. Essa é uma característica vantajosa do ponto de vista das plantas, uma vez que, as plantas podem ser antecipadamente alertadas para a presença de fitófagos ou ainda, a infestação em plantas matrizes provavelmente produziria mudas de morangueiros resistentes a pragas. Informação adicional seria a avaliação da persistência da resistência a *T. urticae* após o desprendimento do propágulo da planta matriz.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A infestação prévia em morangueiro por *T. urticae* reduz o número médio de indivíduos da população subsequente do coespecífico. Uma possível causa dessa redução seria a produção de inibidores de proteases nos morangueiros após a herbivoria.

A especificidade da defesa induzida pode variar com as espécies, tanto para os fitófagos quanto para as plantas. A defesa induzida por *T. urticae*, não atua sobre o ácaro *T. mexicanus*. Provavelmente outros compostos bioquímicos ou estratégia de defesa de *T. mexicanus* podem ter influenciado para tal resultado.

A infestação na planta matriz de morangueiro com *T. urticae* foi desfavorável ao desenvolvimento do coespecífico nos propágulos. A indução da defesa apresenta sistemacidade entre essas plantas, mas não foram elucidados os compostos determinantes sobre essas populações, pois os resultados obtidos para o conteúdo de inibidor de proteases não foram correspondente a essa ocorrência.

A indução de defesa em morangueiro por *T. urticae* pode vir a ser um componente no manejo de ácaros-praga e minimizar as perdas provocadas por este fitófago. Propõe-se que estudos mais aprofundados sobre a atuação das defesas de plantas em populações de ácaros fitófagos, identificando os compostos de defesas que de fato atuam sobre esses organismos ou utilizando outros inibidores, para que seja alcançado sucesso na inibição.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, A. 1998. Induced responses to herbivory and increased plant performance. **Science**, 279, 1201-1202.
- Agrawal, A. A. 2005. Future directions in the study of induced plant responses to herbivory. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 115:1, 97-105.
- Agrawal, A. A. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, 3:4, 329-335.
- Agrawal, A. A., Janssen, A., Bruin, J., Posthumus, M. A. & Sabelis, M. W. 2002. An ecological cost of plant defence: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. **Ecology Letters**, 5:3, 377-385.
- Agrawal, A. A. & Karban, R. 2000. Specificity of constitutive and induced resistance: pigment glands influence mites and caterpillars on cotton plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 96:1, 39-49.
- Alpert, P. 1996. Nutrient Sharing in Natural Clonal Fragments of *Fragaria Chiloensis*. **The Journal of Ecology**, 84:3, 395-406.
- Alpert, P., Holzappel, C. & Slominski, C. 2003. Differences in performance between genotypes of *Fragaria chiloensis* with different degrees of resource sharing. **Journal of Ecology**, 91:1, 27-35.
- Amirhusin, B., Shade, R. E., Koiwa, H., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Murdock, L. L. & Zhu-Salzman, K. 2007. Protease inhibitors from several classes work

- synergistically against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Physiology**, 53:7, 734-740.
- Anderson, J. M., Spilatro, S. R., Klauer, S. F. & Franceschi, V. R. 1989. Jasmonic acid-dependent increase in the level of vegetative storage proteins in soybean. **Plant Science**, 62:1, 45-52.
- Anderson, P. & Agrell, J. 2005. Within-plant variation in induced defence in developing leaves of cotton plants. **Oecologia**, 144:3, 427-434.
- Arimura, G., Kost, C. & Boland, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1734:2, 91-111.
- Ausloos, G. R. J., Proost, P., Vandamme, J. & Vendrig, J. C. 1995. Proteinase-Inhibitor-II is developmentally-regulated in nicotina flowers **Physiologia Plantarum**, 94:4, 701-707.
- Azevedo, F. R. & Vieira, F. V. 2002. Levantamento populacional de pragas do algodoeiro em condições de sequeiro. **Ciência Agrônoma**, 33:1, 15-19.
- Baldwin, I. T. & Schmelz, E. A. 1996. Immunological "memory" in the induced accumulation of nicotine in wild tobacco. **Ecology**, 77:1, 236-246.
- Bale, J. S., van Lenteren, J. C. & Bigler, F. 2008. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, 363:1492, 761-776.
- Batista, R. B., Oliveira, M. G. d. A., Pires, C. V., Piovesan, N. D., Rezende, S. T. d. & Moreira, M. A. 2002. Caracterização bioquímica e cinética de

lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37, 1517-1524.

Bird, L. J. & Akhurst, R. J. 2007. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera : Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, 94:2, 84-94.

Bode, W. & Huber, R. 1992. Natural protein proteinase-inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, 204:2, 433-451.

Botelho, J. S. 1999. A situação da cultura do morangueiro no estado de Minas Gerais. **Morango: tecnologia de produção e processamento**, 125-127.

Botella, M. A., Xu, Y., Prabha, T. N., Zhao, Y., Narasimhan, M. L., Wilson, K. A., Nielsen, S. S., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, 112:3, 1201-1210.

Bounfour, M. & Tanigoshi, L. K. 2001. Host plant-mediated interactions between *Tetranychus urticae* and *Eotetranychus carpini borealis* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, 25, 13-24.

Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:1-2, 248-254.

- Broadway, R. M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **Journal of Insect Physiology**, 41:2, 107-116.
- Broadway, R. M., Duffey, S. S., Pearce, G. & Ryan, C. A. 1986. Plant proteinase-inhibitors - a defense against herbivorous insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 41:1, 33-38.
- Bruce, T. J. A. & Pickett, J. A. 2007. Plant defence signalling induced by biotic attacks. **Current Opinion in Plant Biology**, 10:4, 387-392.
- Bullock, J. M., Mortimer, A. M. & Begon, M. 1994. Physiological integration among tillers of *Holcus lanatus*: age-dependence and responses to clipping and competition. **New Phytologist**, 128:4, 737-747.
- Bunker, T. W., Koetje, D. S., Stephenson, L. C., Creelman, R. A., Mullet, J. E. & Grimes, H. D. 1995. Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase messenger-RNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low **Plant Cell**, 7:8, 1319-1331.
- Chen, M. S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. **Insect Science**, 15:2, 101-114.
- Chiavegato, L. G. & Mischán, M. M. 1981. Efeito do *Tetranychus (T.) urticae* (Koch, 1836) Boudreaux & Dosse, 1963 (Acari, Tetranychidae) na produção do morangueiro (*Fragaria* sp.) cv. 'Campinas'. **Científica**, 9, 257-266.
- Crawley, M. J. 2007. **The R book**. John Wiley & Sons, West Sussex. 942 pp.
- Cruz, P. C. 1999. A situação da cultura do morangueiro no estado de São Paulo. **Morango: tecnologia de produção e processamento**, 129-130.

- De Boer, J. G. & Dicke, M. 2005. Information use by the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari : Phytoseiidae), a specialised natural enemy of herbivorous spider mites. **Applied Entomology and Zoology**, 40:1, 1-12.
- Dicke, M., Vanbaaren, P., Wessels, R. & Dijkman, H. 1993. Herbivory induces systemic production of plant volatiles that attract predators of the herbivore - extraction of endogenous elicitor. **Journal of Chemical Ecology**, 19:3, 581-599.
- Dominguezgil, O. E. & McPheron, B. A. 1992. Arthropods associated with passion-fruit in western Venezuela. **Florida Entomologist**, 75:4, 607-612.
- Duarte, F. 1999. Aspectos do florescimento e técnicas empregadas objetivando a produção precoce em morangueiros. **Informe Agropecuário**, 20:189, 30-35
- Dudley, S. A. & Schmitt, J. 1996. Testing the adaptive plasticity hypothesis: Density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. **American Naturalist**, 147:3, 445-465.
- English-Loeb, G. M., Karban, R. & Hougren-Eitzman, D. 1993. Direct and indirect competition between spider mites feeding on grapes. **Ecological Applications**, 3:4, 699-707.
- Fadini, M. A. M., Oliveira, H. G., Venzon, M., Pallini, A. & Vilela, E. F. 2007. Distribuição espacial de ácaros fitófagos (Acari : Tetranychidae) em plantas de morangueiro. **Neotropical Entomology**, 36:5, 783-789.

- Farmer, E. E. & Ryan, C. A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound- inducible proteinase-inhibitors **Plant Cell**, 4:2, 129-134.
- Flaherty, D. & Hoy, M. 1971. Biological control of Pacific mites and Willamette mites in San Joaquin Valley vineyards: part III. Role of tydeid mites. **Researches on Population Ecology**, 13:1, 80-96.
- Fortunato, F. S., Oliveira, M. G. A., Brumano, M. H. N., Silva, C. H. O., Guedes, R. N. C. & Moreira, M. A. 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **Journal of Pest Science**, 80:4, 241-247.
- Fraulo, A. B. & Liburd, O. E. 2007. Biological control of twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*, with predatory mite, *Neoseiulus californicus*, in strawberries. **Experimental and Applied Acarology**, 43:2, 109-119.
- Gomez, S., Latzel, V., Verhulst, Y. M. & Stuefer, J. F. 2007. Costs and benefits of induced resistance in a clonal plant network. **Oecologia**, 153:4, 921-930.
- Gomez, S. & Stuefer, J. F. 2006. Members only: induced systemic resistance to herbivory in a clonal plant network. **Oecologia**, 147:3, 461-468.
- Halitschke, R., Stenberg, J. A., Kessler, D., Kessler, A. & Baldwin, I. T. 2008. Shared signals - 'alarm calls' from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. **Ecology Letters**, 11:1, 24-34.

- Hutchings, M. J. & Wijesinghe, D. K. 1997. Patchy habitats, division of labour and growth dividends in clonal plants. **Trends in Ecology & Evolution**, 12:10, 390-394.
- Inbar, M. & Gerling, D. 2008. Plant-Mediated Interactions Between Whiteflies, Herbivores, and Natural Enemies. **Annual Review of Entomology**, 53:1, 431-448.
- Jongsma, M. A. The resistance of insects to plant proteinase inhibitors. Wageningen, The Netherlands, 1995. PhD Thesis
- Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Visser, B. & Stiekema, W. J. 1994. Trypsin-inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus-infection. **Planta**, 195:1, 29-35.
- Kakade, M. L., Rackis, J. J., Mcghee, J. E. & Puski, G. 1974. Determination of Trypsin-Inhibitor Activity of Soy Products - Collaborative Analysis of an Improved Procedure. **Cereal Chemistry**, 51:3, 376-382.
- Karban, R. 1988. Resistance to beet armyworms (*Spodoptera exigua*) induced by exposure to spider mites (*Tetranychus turkestanii*) in cotton. **American Midland Naturalist**, 119:1, 77-82.
- Karban, R., Agrawal, R. K., Thaler, J. S. & Adler, L. S. 1999. Induced plant responses and information content about risk of herbivory. 14:11, 443-447.
- Karban, R. & Baldwin, I. T. 1997. **Induced Response to Herbivory**. The University of Chicago Press, Chicago. 317 pp.

- Karban, R. & Carey, J. R. 1984. Induced Resistance of Cotton Seedlings to Mites. **SCIENCE**, 225:4657, 53-54.
- Karban, R. & Myers, J. H. 1989. Induced Plant Responses to Herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 20, 331-348.
- Kessler, A. & Halitschke, R. 2007. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. **Current Opinion in Plant Biology**, 10:4, 409-414.
- Kielkiewicz, M. 1988. Susceptibility of previously damaged strawberry plants to mite attack. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 47:2, 201-203.
- Koiwa, H., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, 2, 379-384.
- Kusnierczyk, A., Winge, P., Midelfart, H., Armbruster, W. S., Rossiter, J. T. & Bones, A. M. 2007. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. **Journal of Experimental Botany**, 58:10, 2537-2552.
- Lara, F. M. 1991. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. 2 ed, Ícone. São Paulo, pp. 336.
- Laskowski, M. & Kato, I. 1980. Protein Inhibitors of Proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, 49:1, 593-626.

- Lawrence, S. D., Novak, N. G. & Blackburn, M. B. 2007. Inhibition of proteinase inhibitor transcripts by *Leptinotarsa decemlineata* regurgitant in *Solanum lycopersicum*. **Journal of Chemical Ecology**, 33:5, 1041-1048.
- Letourneau, D. K. & Goldstein, B. 2001. Pest damage and arthropod community structure in organic vs. conventional tomato production in California. **Journal of Applied Ecology**, 38:3, 557-570.
- Lin, L., Shen, T. C., Chen, Y. H. & Hwang, S. Y. 2008. Responses of *Helicoverpa armigera* to tomato plants previously infected by ToMV or damaged by *H. armigera*. **Journal of Chemical Ecology**, 34:3, 353-361.
- Lourenção, A. L., Moraes, G. J., Passos, F. A., Ambrosano, G. M. B. & Silva, L. V. F. 2000. Resistência de morangueiros a *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 29, 339-346.
- Maffei, M. E., Mithöfer, A. & Boland, W. 2007. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. **Phytochemistry**, 68:22-24, 2946-2959.
- Marinho, J. S. Resposta bioquímica de lagartas de *Thyrintina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae), submetidas ao inibidor de serino-proteases benzamidina. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. 63p. Dissertação de Mestrado
- Marsaro, A. L., Mourão, M., Paiva, W. R. S. C. d. & Barreto, H. C. d. S. 2006. Inibidores de enzimas digestivas de insetos-praga. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, 4:1, 57-61.

- Marshall, C. & Anderson-Taylor, G. 1992. Mineral nutritional inter-relations amongst stolons and tiller ramets in *Agrostis stolonifera* L. **New Phytologist**, 122:2, 339-347.
- Matsushima, R., Ozawa, R., Uefune, M., Gotoh, T. & Takabayashi, J. 2006. Intraspecific variation in the Kanzawa spider mite differentially affects induced defensive response in lima bean plants. **Journal of Chemical Ecology**, 32:11, 2501-2512.
- Mattiacci, L., Rocca, B. A., Scascighini, N., D'Alessandro, M., Hern, A. & Dorn, S. 2001. Systemically induced plant volatiles emitted at the time of "danger". **Journal of Chemical Ecology**, 27:11, 2233-2252.
- Messina, F. J., Taylor, R. & Karren, M. E. 2002. Divergent responses of two cereal aphids to previous infestation of their host plant. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 103:1, 43-50.
- Moraes, G. J. & Flechtmann, C. H. W. 2008. **Manual de Acarologia: Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil**. Holos, Ribeirão Preto. 308 pp.
- Moran, N. A. & Whitham, T. G. 1990. Interspecific competition between root-feeding and leaf-galling aphids mediated by host-plant resistance. **Ecology**, 71:3, 1050-1058.
- Murdock, L. L., Shade, R. E. & Pomeroy, M. A. 1988. Effects of E-64, a cysteine proteinase-inhibitor, on cowpea weevil growth, development and fecundity. **Environmental Entomology**, 17:3, 467-469.

- Ohta, H., Ida, S., Mikami, B. & Morita, Y. 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. **Plant Cell Physiol.**, 27:5, 911-918.
- Oliveira, M. G. A., De Simone, S. G., Xavier, L. P. & Guedes, R. N. C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 140:3, 369-380.
- Orians, C. M., Pomerleau, J. & Ricco, R. 2000. Vascular architecture generates fine scale variation in systemic induction of proteinase inhibitors in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, 26:2, 471-485.
- Pearce, G., Johnson, S. & Ryan, C. A. 1993. Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase iso-inhibitors of the potato inhibitor II family. **Plant Physiol.**, 102:2, 639-644.
- Pickett, J. A. 1999. **Insect-Plant Interactions and Induced Plant Defence**. Novartis Foundation. 290 pp.
- Pilon, A. M., Oliveira, M. G. A. & Guedes, R. N. C. 2006. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 86:1, 23-29.
- Poelman, E. H., Galiart, R. J. F. H., Raaijmakers, C. E., van Loon, J. J. A. & van Dam, N. M. 2008. Performance of specialist and generalist herbivores

feeding on cabbage cultivars is not explained by glucosinolate profiles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 127:3, 218-228.

Pompermayer, P., Falco, M. C., Parra, J. R. P. & Silva-Filho, M. C. 2003. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 109:3, 217-224.

Quiros-Gonzalez, M. 2000. Phytophagous mite populations on tahiti lime, *Citrus latifolia*, under induced drought conditions. **Experimental and Applied Acarology**, 24:12, 897-904.

Ralph, S. G., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J. A., Nelson, C. C., Butterfield, Y. S. N., Kirkpatrick, R., Liu, J., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Douglas, C. J., Ritland, K. & Bohlmann, J. 2006. Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. **Plant Cell and Environment**, 29:8, 1545-1570.

Rasmann, S. & Turlings, T. C. J. 2008. First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. **Oikos**, 117:3, 362-369.

Resende, L. M. A., Mascarenhas, M. H. T. & Paiva, B. M. 1999. **Panorama da produção e comercialização do morango**, Vol. 20, Informe Agropecuário. Belo Horizonte, pp. 5-19.

- Roiloa, S. R., Alpert, P., Tharayil, N., Hancock, G. & Bhowmik, P. C. 2007. Greater capacity for division of labour in clones of *Fragaria chiloensis* from patchier habitats. **Journal of Ecology**, 95:3, 397-405.
- Ronque, E. R. V. 1998. **Cultura do morangueiro revisão e prática**, EMATER. PANARÁ, pp. 206.
- Ryan, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants - genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 28, 425-449.
- Santos, A. M. 1993. **A cultura do morango**, ed. EMBRAPA, Coleção Plantar, 7, pp. 35.
- Santos, A. M. 1999. A situação da cultura do morangueiro no estado do Rio Grande do Sul. **Morango: tecnologia de produção e processamento**, 115-117.
- Sarmiento, R. d. A. Tomato induced defenses mediating ecological interactions among arthropods. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. 118p.
- Schmitt, J., Dudley, S. A. & Pigliucci, M. 1999. Manipulative approaches to testing adaptive plasticity: Phytochrome-mediated shade-avoidance responses in plants. **American Naturalist**, 154, S43-S54.
- Schoonhoven, L. M., Loon, J. J. A. v. & Dicke, M. 2005. **Insect-Plant Biology**. 2nd ed. Oxford, New York. 440 pp.
- Shanks, C. H. & Doss, R. P. 1989. Population Fluctuations of Twospotted Spider-Mite (Acari, Tetranychidae) on Strawberry. **Environmental Entomology**, 18:4, 641-645.

- Steinberg, S., Dicke, M. & Vet, L. E. M. 1993. Relative importance of infochemicals from 1st and 2nd trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. **Journal of Chemical Ecology**, 19:1, 47-59.
- Steinite, I. & Ievinsh, G. 2002. Wound-induced responses in leaves of strawberry cultivars differing in susceptibility to spider mite. **Journal of Plant Physiology**, 159:5, 491-497.
- Stout, M. J., Workman, K. V., Bostock, R. M. & Duffey, S. S. 1998. Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Oecologia**, 113:1, 74-81.
- Stuefer, J. F., Gomez, S. & Van Molken, T. 2004. Clonal integration beyond resource sharing: implications for defence signalling and disease transmission in clonal plant networks. **Evolutionary Ecology**, 18:5-6, 647-667.
- Tamai, M. A., Alves, S. B. & Neves, P. J. 1999. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. ao ácaro *Tetranychus urticae* Koch. **Scientia Agricola**, 56, 285-288.
- Tessarioli Neto, J., Ortigoza, L. E. R. & Verdial, M. F. 2003. Produção de mudas de cultivares de morangueiro em duas épocas de coleta. **Horticultura Brasileira**, 21, 231-233.
- Thaler, J. S., Stout, M. J., Karban, R. & Duffey, S. S. 2001. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. **Ecological Entomology**, 26:3, 312-324.

- Van Dam, N. M., Hermenau, U. & Baldwin, I. T. 2001a. Instar-specific sensitivity of specialist *Manduca sexta* larvae to induced defences in their host plant *Nicotiana attenuata*. **Ecological Entomology**, 26:6, 578-586.
- Van Dam, N. M., Horn, M., Mares, M. & Baldwin, I. T. 2001b. Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. **Journal of Chemical Ecology**, 27:3, 547-568.
- Van der Putten, W. H., Vet, L. E. M., Harvey, J. A. & Wackers, F. L. 2001. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. **Trends in Ecology & Evolution**, 16:10, 547-554.
- Van Zandt, P. A. & Agrawal, A. A. 2004. Specificity of induced plant responses to specialist herbivores of the common milkweed *Asclepias syriaca*. **Oikos**, 104, 401-409.
- Vet, L. E. M. & Dicke, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review Entomology**, 37, 141-172.
- Vieira, A. A., Oliveira, M. G. A., José, I. C., Piovesan, N. D., Rezende, S. T. D. E., Moreira, M. A. & Barros, E. G. D. E. 2001. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13, 05-12.
- Vila, L., Quilis, J., Meynard, D., Breitler, J. C., Marf, Victoria, Murillo, I., Vassal, J. M., Messeguer, J., Guiderdoni, E. & San Segundo, B. 2005. Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance

- against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. **Plant Biotechnology Journal**, 3, 187-202.
- Viswanathan, D. V., McNickle, G. & Thaler, J. S. 2008. Heterogeneity of plant phenotypes caused by herbivore-specific induced responses influences the spatial distribution of herbivores. **Ecological Entomology**, 33, 86-94.
- Viswanathan, D. V., Narwani, A. J. T. & Thaler, J. S. 2005. Specificity in induced plant responses shapes patterns of herbivore occurrence on *Solanum dulcamara*. **Ecology**, 86:4, 886-896.
- Walker-Simmons, M. & Ryan, C. A. 1977. Wound-induced accumulation of trypsin inhibitor activities in plant leaves: survey of several plant genera. **Plant Physiol.**, 59:3, 437-439.
- Walling, L. L. 2001. Induced resistance: from the basic to the applied. **Trends in Plant Science**, 6:10, 445-447.
- Watanabe, M. A., Moraes, G. J. d., Gastaldo Jr, I. & Nicolella, G. 1994. Controle biológico do Ácaro rajado com Ácaros predadores fitoseídeos (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) em culturas de pepino e morango. 51:1, 75-81.
- Wold, S. J. & Hutchison, W. D. 2003. Varietal resistance to *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae) in Minnesota strawberries and control with bifenthrin. **Journal of Entomological Science**, 38:4, 692-695.
- Zavala, J. A., Patankar, A. G., Gase, K., Hui, D. & Baldwin, I. T. 2004. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata*

demonstrates their function as antiherbivore defenses. **Plant Physiol.**, 134:3, 1181-1190.

Zeier, J. 2005. Age-dependent variations of local and systemic defence responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 66:1-2, 30-39.

Zheng, S. J., van Dijk, J. P., Bruinsma, M. & Dicke, M. 2007. Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (*Brassica oleracea* L.): Dynamics of BoLOX expression patterns during insect and pathogen attack. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 20:11, 1332-1345.

Zong, N. & Wang, C. Z. 2007. Larval feeding induced defensive responses in tobacco: comparison of two sibling species of *Helicoverpa* with different diet breadths. **Planta**, 226:1, 215-224.