

FABRICIO RAINHA RIBEIRO

**MICROBIOTA ASSOCIADA À *Tetranychus* spp. (ACARI:
TETRANYCHIDAE) EM TOMATEIRO E A RESPOSTA BIOQUÍMICA
DEFENSIVA DESSA PLANTA À HERBIVORIA DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R484m
2015

Ribeiro, Fabricio Rainha, 1982-
Microbiota associada à *Tetranychus* spp. (Acari: Tetranychidae)
em tomateiro e a resposta bioquímica defensiva desta planta à
herbivoria de pragas agrícolas / Fabricio Rainha Ribeiro. - Viçosa, MG,
2015.
ix, 78f.: il.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular, 2015.
Inclui bibliografia.

I. Ácaro de planta. 2. *Tetranychus*. 6. Microbiota. 7. Enzimas
proteolíticas. 8. Relação planta-patógeno. 9. Tomate. I. Oliveira, Maria
Goreti de Almeida, 1956-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-
graduação em Bioquímica Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 595.42

Bibliotecário(a) responsável: Fabio Jaderson Miguel Reis CRB-6/3030

FABRICIO RAINHA RIBEIRO

**MICROBIOTA ASSOCIADA À *Tetranychus* spp. (ACARI:
TETRANYCHIDAE) EM TOMATEIRO E A RESPOSTA BIOQUÍMICA
DEFENSIVA DESSA PLANTA À HERBIVORIA DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

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

Gláucia Cordeiro

Derly José Henriques da Silva

Eduardo Vinícius Vieira Varejão

Patrícia Aparecida Fontes Vieira

Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e providência, por iluminar meu caminho e permitir alcançar meus objetivos.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade do curso.

A minha linda esposa Fernanda, pelo apoio, amor e carinho dedicados no dia a dia. Por estar sempre à disposição e pela compreensão nos momentos de dificuldade.

À minha querida mãe, pelas orações, carinho, amor e preocupação. Não imagino a vida sem a senhora. A meu irmão Flávio, por sempre estar ao meu lado nos bons e principalmente, nos momentos mais difíceis. A meu pai Manoel Vicente Ribeiro (*In memoriam*) pela proteção e carinho.

A meu irmão Fabio e a minha irmã Ediane, pelo apoio e compreensão. A meus sobrinhos Gustavo e Gabriel por proporcionar imensurável alegria em minha vida.

A meus demais familiares pelo apoio e torcida ao longo desses anos. Em particular a minha avó pelas orações e carinho, a meu tio Glicério Rainha (*In memoriam*), sua presença me fortalece sempre.

A professora Maria Goreti de Almeida Oliveira pela oportunidade do doutorado, orientação e todo apoio desde a graduação.

A doutora Marliane Silva, pela disponibilidade, paciência e esforço dedicado na parte molecular do trabalho.

A doutora Gláucia Cordeiro pela inestimável ajuda na escrita do trabalho.

A todos os amigos do laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, em especial ao Manuel Antonio Solis Vargas, pela ajuda na instalação e condução dos experimentos.

A todos os amigos do laboratório de acarologia, pela convivência e pela ajuda na manutenção das colônias de ácaros.

BIOGRAFIA

Fabricio Rainha Ribeiro, filho de Manoel Vicente Ribeiro e Aderli Rainha Ribeiro, nasceu no dia 30 de junho de 1982, em Conceição do Castelo - Espírito Santo.

Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) - Viçosa (MG), em julho de 2009. Em agosto do mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Entomologia, pela mesma instituição.

Em agosto de 2011 iniciou o Curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa - UFV.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	i
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
CAPÍTULO 1 - ASSOCIAÇÃO DE ÁCAROS COM MICROORGANISMOS.....	6
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. Criação dos ácaros <i>Tetranychus evansi</i> e <i>Tetranychus urticae</i>	11
2.2. Extração do DNA.....	11
2.3. Amplificação do DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)	12
2.4. <i>Primers</i> para identificação das bactérias.....	12
2.5. <i>Primers</i> para identificação dos fungos.....	13
2.6. Amplificação para bactérias específicas.....	15
2.7. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	15
2.8. Sequenciamento e Comparações das sequências.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4. CONCLUSÃO.....	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO 2 - RESPOSTA DEFENSIVA DO TOMATEIRO A <i>Tetranychus evansi</i> (ACARI: TETRANYCHIDAE) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ENDOSSIBIONTES E QUANDO INJURIADO POR ESTE ÁCARO E OUTROS HERBÍVOROS.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1. Local.....	41
2.2. Cultivo das plantas de tomate.....	41
2.3. Criações dos ácaros <i>Tetranychus evansi</i> e <i>tetranychus urticae</i>	41
2.4. Obtenção do ácaro <i>T. evansi</i> sem endossimbiontes bacterianos	42
2.5. Obtenção do ácaro <i>T. evansi</i> e <i>T. urticae</i> com endossimbiontes bacterianos.....	42
2.6. Experimentação.....	42
2.7. Análises Moleculares.....	43
2.7.1. Amplificação DNA por PCR (polymerase chain reaction).....	44
2.8. Análise da atividade enzimática foliar.....	45
2.8.1. Obtenção do extrato foliar.....	45
2.8.2. Determinação da concentração da proteína total.....	45
2.8.3. Determinação da atividade da lipase.....	46
2.8.4. Determinação da atividade da lipoxigenase.....	46
2.8.5. Determinação dos inibidores de tripsina.....	47
2.8.6. Determinação da atividade da polifenoloxidase.....	48
2.9. Análise da atividade enzimática nos herbívoros.....	48

2.9.1.	Obtenção do extrato enzimático dos ácaros.....	48
2.9.2.	Obtenção do extrato enzimático das lagartas.....	49
2.9.3.	Determinação da atividade das proteases totais.....	49
2.9.4.	Determinação da atividade da serino-proteases.....	49
2.9.4.1.	Tripsina- <i>like</i> (amidásica).....	49
2.9.4.2.	Tripsina- <i>like</i> (esterásica).....	50
2.9.4.3.	Quimiotripsina- <i>like</i>	51
2.9.5.	Determinação da atividade de cisteíno-proteases.....	52
2.10.	Comportamento reprodutivo de <i>T. evansi</i>	52
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1.	Análise molecular.....	53
3.2.	Atividade enzimática foliar.....	54
3.3.	Enzimas digestivas dos herbívoros.....	63
3.4.	Comportamento reprodutivo.....	69
4.	CONCLUSÕES.....	71
5.	REFERÊNCIAS IBLIOGRAFICAS.....	72

RESUMO

RIBEIRO, Fabricio Rainha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2015. **Microbiota associada à *Tetranychus* spp. (Acari: Tetranychidae) em tomateiro e a resposta bioquímica defensiva dessa planta à herbivoria de pragas agrícolas.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

O Brasil é um dos maiores produtores de tomateiro do mundo, apresentando assim importante papel na economia do país. Como toda monocultura, o tomateiro não está livre de herbívoros-praga, entre as quais se destacam os ácaros *Tetranychus urticae* (KOCH, 1836) e *T. evansi* (ácaro-vermelho) e a largata *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917). Visando defenderem-se das injúrias causadas por herbívoros, as plantas possuem diversas estratégias de defesa. Uma delas são as alterações na expressão de seus genes que elevam os níveis de compostos de defesa. Em contrapartida aos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas, os insetos tendem a se adaptar e/ou burlar os compostos desta defesa. Isso pode ocorrer através do aumento da síntese de enzimas proteolíticas do intestino dos insetos ou por meio de associação com endossimbiontes. Assim, este trabalho visou identificar a diversidade microbiana em *T. evansi* e *T. urticae*, as possíveis interferências da associação microbiana de *T. evansi* sobre a defesa do tomateiro, além de estudar a resposta de defesa induzida da planta quando submetida, simultaneamente, a diferentes herbívoros e às atividades enzimáticas dos herbívoros quando alimentados com folhas destas plantas. Por fim, foi avaliado o efeito da defesa do tomateiro na reprodução de *T. evansi*. Primeiramente foi determinada mediante técnica de eletroforese e gel com gradiente desnaturante (DGGE), a diversidade de microorganismos, fungos e bactérias, associados a *T. evansi* e *T. urticae*. Além disso, avaliou-se *primers* específicos para identificação de *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Cardinium*. Os ácaros não apresentaram associação endossimbiótica com fungos. *T. evansi* possui maior diversidade bacteriana que *T. urticae*, sendo predominantemente diferentes as espécies de bactérias entre estes ácaros. As maiorias das bactérias encontradas nos ácaros são do filo Proteobactéria e algumas ainda não foram identificadas. Não foi possível a identificação específica das bactérias com os *primeres* utilizados. Este é o primeiro trabalho sobre a diversidade

de micro-organismos nessas duas importantes espécies de ácaros. Em outra etapa da pesquisa foi instalado um experimento com os seguintes tratamentos: plantas sem herbívoros; plantas infestadas com *T. evansi*; plantas infestadas por *T. evansi* tratados com tetraciclina; plantas infestadas por *T. urticae*; plantas infestadas por *T. evansi* + *T. urticae*; plantas infestadas por *T. evansi* + *T. absoluta*; plantas infestadas por *T. urticae* + *T. absoluta*; e plantas infestadas por *T. absoluta*. Para análise da defesa do tomateiro foram avaliadas as atividades de lipase, lipoxigenase (LOX), inibidores de proteases (IP) e polifenoloxidase (PPO). Foram avaliados os efeitos desses compostos de defesa sobre a oviposição de *T. evansi*. Nos herbívoros, foram feitas análises de atividade de proteases totais, atividade amidásica de tripsina-like, atividade esterásica de tripsina-like, atividade de quimiotripsina-like e cisteíno protease. Essas análises foram feitas em *T. evansi*, *T. urticae*, *T. absoluta*, *T. evansi* quando a planta foi injuriada por *T. evansi* e *T. urticae* juntos e em *T. evansi* quando atacou a planta com *T. absoluta*. *T. evansi* não tratado com tetraciclina não induziu a via de defesa do tomateiro que resulta na produção de IP, embora sua injúria tenha induzido uma maior atividade de PPO, isso não afetou sua oviposição. *T. evansi* tratado com tetraciclina induziu parcialmente a defesa do tomateiro. Quando esse ácaro injuriou o tomateiro com outros herbívoros, os níveis de IP do tomateiro foram aumentados. Todos os herbívoros possuem atividades para as enzimas digestivas testadas, sendo que para *T. evansi* tratado com tetraciclina ocorreu uma diferença na atividade de quimiotripsina-like e na atividade de tripsina-like. Estes resultados demonstram que possivelmente bactérias endossimbiontes podem auxiliar o ácaro *T. evansi* a contornar as defesas do tomateiro. O tomate consegue responder ao *T. evansi* quando esse ataca o tomateiro simultaneamente com outros herbívoros e que as bactérias endossimbiontes de *T. evansi* alteram as atividades de suas enzimas digestivas.

ABSTRACT

RIBEIRO, Fabricio Rainha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november, 2015. **Microbiota associated the *Tetranychus* spp. (Acari: Tetranychidae) in tomato and the defensive biochemical response this plant to herbivory agricultural pests.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Brazil is one of the major tomato producers worldwide. As any monoculture, tomato is not unimpeded of pest herbivores within stand out the mites *Tetranychus urticae* (KOCH, 1836) and *T. evansi* and insect larvae as *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917). In order to defence from injures caused by herbivores the plants develop several defence strategies. One of them is alterations in gene expressions which increase levels of defence compounds. On the other hand, against defence mechanisms developed by plants insects tend to adapt and/or outwit this defence compounds. This can occur through increasing proteolytic enzyme synthesis in insect gut or via endosymbiont associations. Thus, this work aimed to identify the microbe diversity in *T. evansi* and *T. urticae* and the possible interferences of microbe association of *T. evansi* over tomato defences. As well of studying the induced plant defence response when subject of different herbivores feeding simultaneously and the enzymatic activity of these herbivores feeding on leaf plants. Finally, effects of plant defences in *T. evansi* performance were evaluated. First, it was determinate through denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), the microorganisms diversity of fungi and bacteria associated to *T. evansi* e *T. urticae*. Besides, specific primers were evaluated for identification of *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Cardinium*. The mites did not show endosymbiotic associations with fungi. *T. evansi* host higher bacteria diversity than *T. urticae*, being predominately different between mites. Most of bacteria belongs to Proteobacteria phylum and some are not identified yet. It was not possible the specific identification of bacteria with the primers utilized. This is the first work on the microorganism's diversity on these two important mite species. In another research stage it was installed an experiment with treatments as follows: plants without herbivores, plants infested with *T. evansi*; plants infested with *T. evansi* treated with tetracycline; plants infested with *T. urticae*; plants infested with *T. evansi* + *T. urticae*; plants infested with *T. evansi* + *T. absoluta*; plants infested with *T. urticae* + *T. absoluta*; and plants infested with *T. absoluta*. For tomato

defence analysis were determined activities of lipases, lipoxygenases (LOX), proteinase inhibitors (PI) and polyphenol oxidases (PPO). It was evaluated the effects of these defence compounds on *T. evansi* performance. In the herbivores were done analysis of total proteinases activities, amidase trypsin-like activity, esterase trypsin-like activity, quimotrypsin-like activity and cysteine proteinase activity. The none tetracycline treated *T. evansi* did not induce PI production although it's injure induced a higher PPO activity but this did not affect their performance. *T. evansi* treated with tetracycline partially induce the tomato defence and when this specie injures the plant simultaneously with other herbivores PI levels are increased. All herbivores showed activities for all the measured digestive enzymes being that for tetracycline treated *T. evansi* a difference in quimotrypsin-like and trypsin-like activities occurs. These results reveal that endosymbiont bacteria can help *T. evansi* to outwit plant defences. The tomato plants respond to *T. evansi* injuries when feed simultaneously with other herbivores and their endosymbiont bacteria alters the digestive enzyme activities.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Lycopersion esculentum* Mill. Solanaceae) tem como possível centro de diversidade o litoral do pacífico entre o Equador e o norte do Chile, até a altitude de, aproximadamente, 2000 m nos Andes (SILVA *et al.*, 2007). Atualmente é cultivado em mais de 150 países, com produção, no ano de 2013, em torno de 163,9 milhões de toneladas (FAO, 2015a). No mesmo ano, o Brasil produziu 4,18 milhões de toneladas de tomate, ficando entre os 10 maiores produtores, com destaque para as regiões Sudeste e Centro-Oeste, as quais foram responsáveis por 75,2 % da produção nacional (IBGE, 2015). Portanto, essa cultura apresenta importância econômica para o país (FAO, 2015b).

O Estado de Goiás é o maior produtor de tomate do país, tendo atingido a produção de 1,3 milhão de toneladas no ano de 2013, correspondendo a 31,5 % da produção brasileira (IBGE, 2015), seguido dos estados de São Paulo e Minas Gerais com, respectivamente, 885,9 mil toneladas e 563,3 mil toneladas.

Além de várias doenças que podem limitar sua produção, a cultura também está sujeita a infestações de insetos-praga como brocas, mosca-minadora, mosca-branca, tripses, pulgões, ácaros e traça-do-tomateiro (SILVA *et al.*, 2007). Esse fato leva a aplicação de grandes quantidades de agrotóxicos nas lavouras de tomate (CARVALHO *et al.*, 2015)

Entre estas pragas, os ácaros e a traça-do-tomateiro são consideradas as mais importantes devido à capacidade de causarem prejuízos na produção do tomate. Os ácaros *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado) (KOCH, 1836) e *T. evansi* (ácaro-vermelho) sugam a face inferior dos folíolos, o que causa manchas cloróticas na parte superior dos mesmos. Quando estas injúrias são intensas, elas desencadeiam o secamento das plantas. Esses ácaros produzem fios de teia na face das folhas (FILGUEIRA, 2013), apresentam 0,46 mm de comprimento, com manchas dorsais escuras (*T. urticae*) ou de cor vermelho-intenso (*T. evansi*).

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), causa danos na sua fase jovem. Suas larvas perfuram as folhas formando galerias onde se alimentam do mesófilo foliar, deixando apenas as epidermes intactas, sendo possível, assim, observar regiões transparentes nas folhas nos últimos instares

larvais, o que facilita o reconhecimento dessa praga (BAHAMONDES & MALLEA, 1969).

Visando se defenderem das injúrias causadas por herbívoros, as plantas, durante a sua evolução, têm desenvolvido diversas estratégias (AGRAWAL & FISHBEIN, 2006). Ao serem injuriadas, ocorre o desencadeamento de uma cascata de eventos bioquímicos que precedem alterações na expressão de seus genes de defesas que elevam os níveis de compostos, por exemplo, de inibidores de proteases (MAFFEI *et al.*, 2007).

É postulado que inibidores de proteases têm função de proteger as plantas contra as injúrias causadas por vários tipos de herbívoros, inibindo significativamente as atividades proteolíticas de proteases presentes no intestino destes indivíduos (HILDER *et al.*, 1987; RYAN, 1990). Quando ocorrem ferimentos em folhas, verifica-se grande aumento na síntese de inibidores de proteases no local da lesão (resposta local) e também por toda a planta (resposta sistêmica), sendo essa síntese dependente da atividade de lipase e lipoxigenase (LOX) (FARMER & RYAN, 1992). Diversos compostos identificados em plantas que podem regular a expressão dos genes que codificam inibidores de proteases são induzidos por ferimentos; dentre eles estão os oligouronídeos, ácido abscísico, metil jasmonato, ácido jasmônico e a sistemina. Entretanto essa resposta de defesa que leva a indução destes compostos pode ser vulnerável a patógenos (NOMURA *et al.*, 2006).

Em contrapartida aos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas, os insetos tendem a se adaptar e/ou burlar os compostos de defesa de seus hospedeiros. Um exemplo disso é o relatado por Pilon *et al.* (2009), que registraram o aumento da síntese de enzimas proteolíticas no intestino médio da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), aumentando o aproveitamento da proteína vegetal ingerida. A maior atividade de enzimas é uma resposta aos inibidores de proteases produzidos pela planta. Outra possibilidade dos artrópodes levarem vantagens em relação ao sistema de defesa dos seus hospedeiros é manter associação com endossimbiontes, pois estes organismos podem aumentar as enzimas digestivas dos artrópodes, inativar compostos de defesa da planta e fornecer vitaminas e aminoácidos para seus hospedeiros (REESON *et al.*, 2003; VISÔTTO, *et al.*, 2009; BARR *et al.*, 2010; CHUNG *et al.*, 2013; DOUGLAS, 2013).

O tomateiro, assim como os demais vegetais, também possui a via octadecanoide (lipase, lipoxigenase e inibidores de proteases) como responsável pela indução de defesa contra suas pragas (FARMER & RYAN, 1992). Mas recentemente foi mostrado que o ácaro *T. evansi* consegue alterar o processo de defesa da planta do tomateiro, diminuindo seus compostos de defesa, dessa forma favorecendo seu desenvolvimento e reprodução (SARMENTO *et al.*, 2011). Nas últimas duas décadas, esse ácaro tem expandido sua distribuição geográfica e emergido como uma séria praga agrícola. Como já mencionado, esta cultura apresenta várias pragas que podem ocorrer simultaneamente. Além disso, sabe-se que ácaros possuem associação com microorganismos (WEEK & BREEUWER, 2001) e que este tipo de associação pode ser benéfica (CHUNG *et al.*, 2013; BARR *et al.*, 2010; DOUGLAS, 2013; REESON *et al.*, 2003; VISÔTTO, *et al.*, 2009). Porém, não se conhece a microbiota relacionada com *T. evansi* e *T. urticae*, nem o comportamento defensivo do tomateiro quando injuriado por diferentes pragas e suas possíveis combinações.

Assim, este trabalho visou identificar a diversidade microbiana em *T. evansi* e *T. urticae* (Capítulo 1), as possíveis interferências da associação microbiana de *T. urticae* sobre a defesa do tomateiro, além de estudar a resposta de defesa induzida da planta quando submetida, simultaneamente, a diferentes herbívoros e as atividades enzimáticas dos herbívoros quando alimentados com folhas destas plantas. Por fim, foi avaliado o efeito da defesa do tomateiro na reprodução de *T. evansi* (Capítulo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A. A.; FISHBEIN, M. PLANT DEFENSE SYNDROMES. Ecology, Supplement, pp. S132–S149, 2006
- BAHAMONDES, L. A.; MALLEA, A. R. Biología en Mendoza de *Scrobipalpa absoluta* (Merrick) Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), espécie nueva para la Republica Argentina. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Mendoza, v.15, n.q, p. 96-104, 1969.
- BARR, K. L.; HEARNE, L.B.; BRIESACHER, S.; CLARK, T.L.; DAVIS, G.E. Microbial Symbionts in Insects Influence Down-Regulation of Defense Genes in Maize. PLoS ONE 5(6): e11339. doi:10.1371/journal.pone.0011339
- CARVALHO, R.; YIHUA, Y.; FIELD, L. M.; GORMAN, K.; MOORES, G.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C. Chlorpyrifos resistance is associated with mutation and amplification of the acetylcholinesterase-1 gene in the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*. Pesticide Biochemistry and Physiology 104 143–149 2015.
- CHUNG, S. H.; ROSA, C.; SCULLY, .E. D.; PEIFFER, M.; TOOKER, J. F.; HOOVER, K.; LUTHE, D. S.; FELTON, G. W.; Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. 15728–15733 | PNAS | September 24, | vol. 110 | no. 39 2013.
- DOUGLAS AE: Microbial brokers of insect–plant interactions revisited. J ChemEcol, 39:952-961 2013.
- FAOSTAT, **Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 08 julho de 2015a.
- FAOSTAT, **Ranque de produção agrícola**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 09 julho de 2015b.
- FARMER,E.E.; RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound- inducible proteinase-inhibitors.Plant cell, v.4, p.129-134, 1992.
- FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2013. 421 p.
- HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R.F., BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature, v.300, p.160-160, 1987.
- IBGE, **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp>>. Acesso em: 08 de julho de 2015.

- MAFFEI, M.E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, v.68, p.2946-2959, 2007
- NOMURA, K.; DEBROY, S.; HOON LEE, Y.; PUMPLIN, N.; JONES, J.; YANG HE, S. A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science*, v.313, p. 220-223, 2006
- PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; PILON, F.M.; GUEDES,R.N.C.; OLIVEIRA,J.A.; FAZOLLO, A. Adaptação da lagarta de soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 56, n.6, p.744-748, nov/dez, 2009
- REESON, A.F; JANKOVIC,T; KASPER, M.L; ROGERS,S. AUSTIN,A.D. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespolagemânica*. *Insect Molecular Biology* 12(1), 85–91 2003.
- RYAN C A. Protease inhibitors in plants - genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, v.28, p.425-449, 1990.
- SARMENTO, R.A.; LEMOS,F.; BLEEKER, P.M.; SCHUURINK,R.C.; PALLINI,A.; OLIVEIRA,M.G.A; LIMA, E.R.; KANT, M.; SABELIS,M.W.; JANSSEN, A. A herbivore that manipulate esplant defence. *Ecology Letters*, v.14, p. 229–236, 2011.
- SILVA, D.J.H.; FONTES, P.C.R.; MIZUBUTI, E.S.G.; PICANÇO, M.C. **Tomate (*Lycopersion esculentum* Mill.)**. In: 101 Culturas Manual de tecnologias agrícolas. pag.735-750. 2007
- VISÔTTO, L.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; RIBON, A.O.B.; GOOD-GOD, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Journal of Insect Physiology*, v.55, p.185–191, 2009.
- WEEKS, A.R.; BREEUWER, J.A.J. Wolbachia-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v.268, p.2245-2251, 2001.

CAPÍTULO I

ASSOCIAÇÃO DE ÁCAROS COM MICRO-ORGANISMOS

RESUMO

Associações simbióticas entre artrópodes e micro-organismos são bem conhecidas na natureza. Para os artrópodes, essas associações proporcionam vantagens tais como produção de enzimas e vitaminas, proteção contra inimigos naturais e desintoxicação de compostos de defesa produzidos pelas plantas. Para os micro-organismos, a principal vantagem é o local para desenvolvimento e dispersão. *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), e *T. urticae* (KOCH, 1836) são importantes pragas de diversas culturas, principalmente do tomate. Considerando a inexistência de investigações sobre micro-organismos associados a ácaros de importância agrícola, o objetivo do presente trabalho foi determinar, mediante a técnica de eletroforese e gel com gradiente desnaturante (DGGE), a diversidade de micro-organismos (fungos e bactérias) associados a *T. evansi* e *T. urticae*, bem como avaliar primers específicos para identificação de *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Cardinium*. Mediante análises dos resultados, observou-se, que essas duas espécies de ácaros não possuem fungos como micro-organismos endossimbiontes. Detectou-se em *T. evansi* uma diversidade bacteriana maior, quando comparada a *T. urticae*, sendo predominantemente diferentes as espécies de bactérias entre esses dois ácaros. A maioria das espécies de bactérias nos ácaros foi do filo Proteobactéria e as duas espécies de ácaros possuem bactérias que ainda não foram identificadas. Nenhum dos *primers* específicos usados foram adequados para identificação de bactérias específicas. Pesquisas relacionadas a endossimbiontes normalmente avaliam a influência de um micro-organismo específico sobre a biologia do hospedeiro. Aqui, pela primeira vez, foi detectada a diversidade de micro-organismos nessas duas importantes espécies de ácaros. Essas informações podem ajudar a compreender o sucesso dessas espécies como pragas agrícolas.

CAPÍTULO I

ASSOCIATION OF MITES WITH MICROORGANISMS

ABSTRACT

Symbiotic associations among arthropods and microorganisms are well known in nature. For arthropods those associations provide some advantages as enzymes and vitamins production, protection against natural enemies and detoxification of plant defence compounds. For microorganisms the main advantages are development sites and dispersion. *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), and *T. urticae* (KOCH, 1836) are important pests of diverse crops mainly tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller). Whereas non-existence of researches about microorganisms associated to mites of agricultural importance the objective of this work was to determine the microorganism's diversity, fungus and bacteria associated to *T. evansi* e *T. urticae* using denaturing gradient gel electrophoresis technic (DGGE) and to evaluate specific primers for identification of *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* and *Cardinium*. Results reveal that none mite species own fungus as endosymbiont organisms. *T. evansi* hosts a larger bacteria diversity compared to *T. urticae* being these bacteria species predominantly different between the two mites. Most of bacteria species inside the mites belongs to Proteobacteria phylum and both mite species host none identified bacteria. None of specific primers used were adequate for species bacteria identification. Related researches to endosymbionts normally evaluate the influence of a specific microorganism on host biology. Here, by the first time we show the microorganism diversity inside this two important mite species. This information could help to understand the success of this two mite species as agriculture pests.

1. INTRODUÇÃO

Os fatores bióticos e abióticos, tais como interações ecológicas, temperatura, intensidade luminosa e nutriente determinam os limites inferiores e superiores onde os organismos conseguem sobreviver (HENRY-SILVA & CAMARGO, 2005). Eles não vivem isolados, normalmente estabelecem associações biológicas e estão sujeitos, simultaneamente, a diferentes tipos de interações que podem ser classificadas dentro de categorias como competição, predação, parasitismo, mutualismo, detritívora (BEGON *et al.*, 2007) e associação endossimbiótica, quando um organismo utiliza outro como hospedeiro (MORAN, 1992).

A ocorrência de interações simbióticas entre micro-organismos e artrópodes é bem conhecida. Em artrópodes, existe uma enorme e diversa gama de bactérias endossimbiontes que, na maioria das vezes, são transmitidas verticalmente através do citoplasma do ovo (MORAN *et al.*, 2008). Cass *et al.* (2014) afirmaram que endossimbiontes são componentes importantes da biologia e ecologia de artrópodes terrestres. Desta forma, para maior entendimento dos mecanismos que regem a interação entre plantas e artrópodes, é necessário que eles sejam estudados dentro de um contexto ecológico juntamente com os micro-organismos, sendo esses importantes componentes do sistema (STEINHAUS, 1960). Esses micro-organismos podem ser encontrados no intestino e em outras regiões do corpo do inseto. A microbiota intestinal representa todo aspecto da relação microbiana, tanto de patógenos como de mutualismo obrigatório. Os primeiros estudos realizados sobre simbiose inseto-bactéria consideraram apenas a relação entre inseto e micro-organismo patogênico e a consequente produção de inseticidas microbianos. Posteriormente, pesquisas no campo da endossimbiose têm enfatizado a relação de como os micro-organismos interagem com os insetos (DILLON & DILLON, 2004).

As relações endossimbióticas são responsáveis pelos insetos serem considerados os organismos mais bem adaptados em nosso planeta, sendo capazes de habitar locais que apresentam severas limitações nutricionais (HEIKE & ROY, 2009). Os insetos xilófagos, cujo alimento é a celulose da madeira, são desafiados com alimento pobre em nitrogênio, com compostos de difícil digestão e altos teores de compostos de defesa (DOUGLAS, 2013). Para esses organismos, a associação endossimbiótica permite a quebra da celulose e a degradação de substâncias tóxicas produzidas pelo vegetal. Reeson *et al.* (2003) destacam ainda que a flora bacteriana

de insetos desempenham importante papel na produção de feromônios, degradação de pesticidas, síntese de vitaminas e prevenção a patógenos.

Em artrópodes, associações com micro-organismos endossimbiontes são comuns nas ordens Homoptera (afídeos, mosca branca, cochonilhas, psilídeos e cigarras), Blattaria (baratas), Coleoptera (besouros) (Buchner, 1965) e Lepidoptera (mariposas) (VISOTTÔ, 2009). Essas associações também estão presentes na subclasse Acari da classe Arachnida (KOPECKY *et al.* 2013; GLOWSKA *et al.* 2015).

Uma grande dificuldade de estudar associações endossimbióticas é devido ao grande número de espécies de bactérias que são impossíveis de serem cultivadas em meios de cultura. Entretanto, o uso de ferramentas de biologia molecular, tem tornado cada vez mais evidente que os micro-organismos desempenham funções que influenciam na biologia, ecologia e evolução dos insetos hospedeiros (OLIVER & MARTINEZ, 2014). Muyzer *et al.* (1993) propuseram a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), que consiste em uma técnica baseada na mobilidade eletroforética de moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em geis de poliacrilamida, o que diminui sua migração pelo gel quando comparadas com a forma de dupla hélice da molécula. Essa técnica separa fragmentos de DNA baseadas em pequenas diferenças em suas sequências (REESON *et al.*, 2003). Para o completo estudo da comunidade bacteriana é comumente usada a amplificação de sequências de DNA correspondentes a porção 16S rRNA, a partir de *primers* universais para bactérias (HEUER *et al.*, 1997), pelo fato de serem sequências conservadas, presentes em todas as bactérias (SMIT & READ, 1997).

Estudos recentes têm indicado que endossimbiontes podem auxiliar o hospedeiro a contornar as defesas produzidas pelas plantas. Como exemplo, o besouro, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins; (Coleoptera: Curculionidae) uma importante praga do pinus (Pinaceae), abriga bactérias que possuem vias de detoxificação de terpenos produzido pelo vegetal (OLIVER, 2014). Barr *et al.* (2010) mostraram que endossimbiontes de insetos influenciam na resposta de defesa do milho de forma a favorecer a alimentação do hospedeiro. Esses trabalhos sugerem que endossimbiontes podem auxiliar seus hospedeiros na reprodução e dispersão da espécie.

Um herbívoro de notável capacidade de dispersão é o ácaro *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), conhecido popularmente como ácaro-vermelho, e descrito pela primeira vez mediante espécimes coletados em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller - Solanaceae) nas ilhas Maurícias (BAKER & PRITCHARD, 1960). *T. evansi* é nativo da América do Sul, mas ampliou sua distribuição para a América do Norte, África, Europa, Ásia e muitas ilhas ao redor do mundo (GUTIERREZ & ETIENE, 1986; MIGEON & DORKELD, 2011; MIGEON *et al.*, 2009; BOUBOU *et al.*, 2010 e 2012). Outro ácaro de grande importância agrícola é o ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) (KOCH, 1836). Devido à ampla gama de hospedeiros e prejuízos causados, *T. urticae* é apontado como principal espécie praga do gênero *Tetranychus* (PAPA *et al.*, 2003).

Considerando a inexistência de investigações sobre micro-organismos associados a ácaros de importância agrícola, o objetivo do presente trabalho foi determinar, através da técnica de eletroforese e gel com gradiente desnaturante (DGGE), a diversidade de micro-organismos, fungos e bactérias, associados a *T. evansi* e *T. urticae*, bem como avaliar *primers* específicos para identificação de *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Cardinium*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Criação dos ácaros *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*

Os ácaros foram criados massalmente no Laboratório de Acarologia/Entomologia-UFV, alimentados com folhas de tomate da variedade Santa Clara I-5300. As plantas de tomate foram cultivadas em casa de vegetação. Quando suas folhas estavam completamente desenvolvidas, estas foram coletadas com o auxílio de uma tesoura esterilizada e o pecíolo das mesmas foram imediatamente colocados em um copo com 100 mL de água e as folhas foram transportadas para o Laboratório de Acarologia. Os ácaros das espécies *T. evansi* e *T. urticae* foram transferidos para as folhas com o auxílio de um pincel de cerdas macias. As colônias foram mantidas em sala climatizada, cada espécie em uma sala, sob condições controladas (temperatura: $25 \pm 5^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar: $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas).

2.2. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando 70 fêmeas de cada espécie de ácaros (*T. evansi* e *T. urticae*). Os ácaros foram previamente desinfestados através da imersão em álcool 70 % (v/v) por dois minutos, seguida de lavagem com solução de hipoclorito de sódio 0,1 % (v/v), posteriormente lavados em água estéril para retirada do excesso desse produto. Por fim, foram centrifugados a 5.000 rpm durante cinco minutos para a retirada de micro-organismos da sua superfície.

O DNA total dos indivíduos foi extraído a partir de uma adaptação da metodologia proposta por Pospiech & Neumann (1995). Os indivíduos, de acordo com cada espécie, foram colocados em microtubos de 1,5 mL onde foi adicionado 200 µL de tampão SET (75 mM de NaCl; 25 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) autoclavado a 120 °C/15 min, seguido por maceração imediata. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 500 rpm por três minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes. O sobrenadante oriundo do passo anterior foi centrifugados a 5.000 rpm por cinco minutos e descartado, e o precipitado formado (*pellet*) foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCl e 10mM EDTA, pH 7,5) na presença de 1 µL de proteinase K (20mg/mL) e 8 µL de lisozima (50 mg/mL). O *pellet* foi incubado a 37°C por uma hora em banho-maria, sendo homogeneizados a cada 10 minutos ao longo da incubação. Em seguida, foram adicionados 60µL de SDS 10 % M/V (dodecil sulfato de sódio) e novamente incubado a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 60 µL de CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio Sigma ultra) 10% M/V e a reação incubada a 65°C por 10 minutos. Posteriormente adicionou-se um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) V/V e centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos. A fase superior foi transferida para outro microtubo, onde adicionou-se igual volume de álcool isopropílico e a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 minutos. Depois, a amostra foi incubada a -20°C por duas horas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 20 µL de álcool etílico 70% V/V, centrifugado a 5.000 rpm por dois minutos e ressuspenso em 20 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA, pH 7,5). O material foi acondicionado a -20°C até o momento da amplificação.

2.3. Amplificação do DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para identificar a diversidade bacteriana e fúngica em ácaros *T. evansi* e *T. urticae*, mantidos em folhas de tomateiro, ampliações por PCR foram realizadas com o DNA extraído usando *primers* universais para bactérias e fungos. Foi amplificado o 16S rRNA para as bactérias. Para a detecção de fungos, foi amplificado o gene 18S rRNA e usado *primers* para amplificar a região ITS (Internal Transcribed Spacer), que separa os genes 18S e 28S do rDNA e que pode ser amplificada com *primers* específicos ancorados nessas duas regiões. Essa região é altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção em nível específico (SWOFFORD & OLSEN, 1990). Uma cauda GC (sequência de guanina - citosina) foi adicionada à extremidade 5' de cada iniciador, para permitir a análise por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) posteriormente. Além disso, *primers* específicos foram utilizados para amplificar sequências de bactérias do gênero *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Wolbachia*.

2.4. *Primers* para identificação das bactérias

A quase completa sequência do gene 16S rRNA foi amplificada com o par de *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') / 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE et al., 1991), abrangendo respectivamente as posições 8-27 e 1492-1507 de *Escherichia coli*. Para a região V3, que é variável dentro de espécie bacterianas, foi amplificada com uma segunda PCR usando os *primers* 338GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')/518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (KIM et al., 2010). Os ciclos para a primeira amplificação foram: 5 minutos a 95 °C, seguindo de 40 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 72 °C, concluindo com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. A primeira PCR foi realizada para um volume final de 25µL sendo: 2µL de amostra de DNA e 23 µL da mistura reacional [2,5 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2,5 µL do tampão Tris 1X, 1 µL de cada primer (27F e 1492r), 1µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de TAQ Polimerase (5 U/µL) e 14,8 µL de água deionizada autoclavada].

Os produtos de PCRs foram armazenados a -20 °C. Para a segunda amplificação, foram utilizados os seguintes ciclos: 5 minutos a 95 °C, seguindo de 40 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 65 °C e 30 segundos a 72 °C, concluindo com uma extensão final de 1 minuto a 72 °C. A segunda PCR foi realizada para um volume final de 50 µL sendo: 3µL de amostra de PCR da primeira reação e 23 µL da mistura reacional [4 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 10 µL do tampão Tris 1X, 2 µL de cada primer (338GC e 518R), 2µL de dNTP (10 mM), 0,25 µL de TAQ Polimerase (5 U/µL) e 29,75 µL de água deionizada autoclavada].

2.5. *Primers para identificação dos fungos*

Para amplificar a região fúngica do gene 18S rRNA foi usado o par de *primers* NS1F (5'-TAGTCATATGCTTGTCTC-3') (White *et al.*, 1990)/FR1 (5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3') (VAINIO & HANTULA, 2000). Com o produto da PCR obtido foi realizado uma segunda PCR usando os seguintes *primers*: NS3- GC (5'-GGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') (WHITE et al., 1990)/YM951r (5'-TTGGCAAATGCTTTTCGC-3') (HARUTA et al., 2006). Esses *primers* amplificam uma região do gene 18 rRNA correspondente as posições 553-573 e 935 a 951 de *Sacharomyces cerevisiae*. As condições para o primeiro PCR foram: 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 48°C e 2 minutos a 72°C, concluindo com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. As condições de amplificação para o segundo PCR foram: 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 62°C e 40 segundos a 72°C, concluindo com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram armazenados a -20°C.

Para amplificação do gene 18 rRNA foi usado os seguintes *primers* FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (VAINIO & HANTULA, 2000)/FR1 (5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3') (WHITE *et al.*, 1990). Os fragmentos amplificados foram usados para uma segunda PCR com os seguintes *primers* FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') /FR1-GC (5'-CCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGCCGATCCATTCA

ATCGGTAIT-3') (VAINIO & HANTULA, 2000). As condições para o primeiro e segundo PCR foram: 5 minutos a 95°C, seguido por quarenta ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 48°C E 2 minutos a 72°C, concluído com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram armazenados a -20°C.

Para amplificar as sequências dos genes ITS E 5.8 rRNA foram usados os *primers* ITSF1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (GARDESA & BRUNS 1993)/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990). Os fragmentos amplificados foram novamente amplificados com os seguintes pares de *primers*:

ITSF1-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (EVANS *et al.*, 2014)/ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (WHITE *et al.* 1990) e ITS3-GC (5'-CCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGCCGGCATCGATGAAGAACGCAGC-3') (EVANS *et al.*, 2014)/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990). A primeira amplificação foi realizada da seguinte maneira: 5 minutos a 95 °C, seguido de quarenta ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 45 °C e 2 minutos a 72 °C, concluindo com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. A segunda constituiu das etapas: 5 minutos a 95 °C seguindo de quarenta ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 63,3 °C e 40 segundos a 72 °C, concluído com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram armazenados a -20 °C.

2.6. Amplificação para bactérias específicas

O gene gyrase B (*gyrB*) de *Cardinium* foi amplificado usando os *primers* *gyrBF* (5'-GTTACCGTATACCGAAATGG-3')/*gyrBR* (5'-TGCTTTCCGRGCMGCTTG-3'), desenhado para bactéria *Cardinium* infectando *Brevipalpus* spp. (GEIJSKES, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) (Grootand & Breeuwer 2006). Para identificação de *Rickettsia* foi usado os *primers* RICS741F (5'-CATCCGGAGCTAATGGTTTTGC-3')/RCIT1197R (5'-CATTTCTTTCCATTGTGCCATC-3'), desenhados do gene da citratossintase (*glTA*) de *Rickettsia prowazekii* (Davis *et al.* 1998). Para amplificação de Spiroplasma, foi usado o par de *primers* Spits-J04 (5'-GCCAGAAGTCAGTGTCTAACCG-

3')/Spits-N55 (5'-ATTCCAAGGCATCCACCATACG-3'), desenhado do (IGS) de *Spiroplasma ixodetis* (VON DER SCHULENBURG *et al.*, 2002). Para amplificação de sequências de *Wolbachia* foram usados os *primers* 76F (5'-TTGTAGCCTGC TATGGTATAACT-3')/1012R (5'-GAATAGGTATGATTTTCATGT-3'), desenhados para amplificar as regiões V1 a V6 do gene 16S rRNA de *Wolbachia pipientis*, que correspondem as posições 79-99 e 994-1012 de *E. coli* (O'Neill *et al.* 1992). A amplificação iniciou-se 95 °C durante cinco minutos, seguindo de quarenta ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 40 °C e 1 minuto a 72 °C, concluindo com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram armazenados a -20 °C.

Os produtos das reações da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% M/V, corado com 1µL de brometo de etídeo em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, sob voltagem constante de 100 V. O gel foi visualizado e fotografado pelo sistema de captura de imagem digital LPIX – Loccus Biotecnologia, gravado eletronicamente e impresso para arquivo (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.7. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A eletroforese foi realizada com a utilização do equipamento “DCodea Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad – Califórnia USA), de acordo com metodologia proposta por Heuer *et al.* (1997), com algumas modificações. Os produtos da PCR, 25µL, foram aplicados no gel de poliacrilamida 8 % (m/v) (acrilamida: metilbisacrilamida - 60:1), que foi preparado com gradiente desnaturante de 50 a 60 %. Esse gradiente foi obtido pela mistura de uma solução de poliacrilamida com 100 % de agentes desnaturantes (formamida 40% e uréia 7 molL⁻¹) e uma sem a presença desses agentes. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 0,5X, à temperatura de 60 °C e voltagem constante de 60V por 17 horas. O gel foi corado com solução de SYBR GOLD[®] 1X (Sigma-Aldrich), conforme as recomendações do fabricante, por 40 minutos. A imagem do gel foi capturada sob luz UV e digitalizada pelo equipamento EagleEye (II, StillVideo System-Stratagene, Califórnia, USA).

As bandas de DNA foram excisadas do gel DGGE utilizando-se um estilete e então colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo 30 µL de água deionizada

autoclavada, sendo imediatamente armazenados a -20°C. Posteriormente, os microtubos tipo eppendorfs foram descongelados e incubados “*overnigh*” a 4 °C para eluir o DNA. Sete microlitros do sobrenadante foram utilizados para reamplificação do DNA utilizando os *primers* usados na primeira reação, ou seja, *primers* sem o grampo GC, 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE *et al.*, 1991). As condições para amplificação das eluições do DGGE foram: 5 minutos a 95 °C, seguido de quarenta ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 50 °C e 2 minutos a 72 °C, concluindo com uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. O produto da PCR obtido foi encaminhado para sequenciamento.

2.8. Sequenciamento e Comparações das sequências

O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa MYLEUS ANALISES GENETICAS S.A. Todas as sequências de nucleotídeos correspondentes às bandas excisadas do gel de DGGE, para os ácaros *T. evansi* e *T. urticae*, foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na amplificação utilizando os *primers* universais para fungos não foi observada formação de bandas (Figura 1). O que evidencia, a princípio, a ausência de fungos endossimbiontes nas espécies de ácaros *T. evansi* e *T. urticae*.

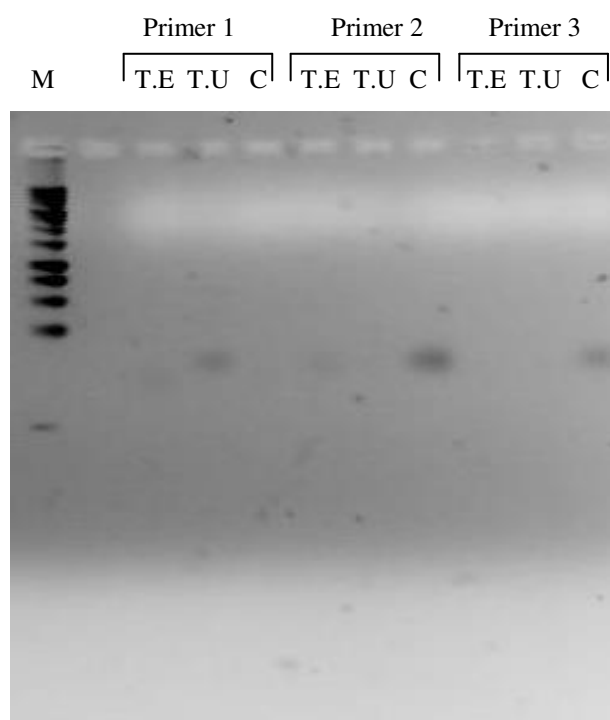


Figura 1. Gel de agarose 1 % dos produtos da amplificação com *primers* universais para sequências 18S rRNA de fungos nos ácaros *Tetranychus evansi* (T.E), *Tetranychus urticae* (T.U) e controle (sem DNA) (C). Primer 1: ITS1/ITS4, Primer 2: NF1/FR1, Primer 3: FF390/FR1. M= Marcador 1Kb promega.

Embora não tenha sido possível visualizar bandas, isso não exclui totalmente a possibilidade da presença de fragmentos de DNA amplificado, uma vez que poderiam estar em concentrações muito baixas, impossibilitando a visualização de bandas. Assim, a partir do produto da primeira amplificação foi realizada a segunda amplificação usando três *primers* (NS3GC/YM951R, ITS1GC/ITS2, FF390/FR1GC) (Figura 2). Como observado nos resultados do primeiro PCR na segunda amplificação de cada *primer*, não houve a detecção de fungos, o que significa que espécies de *T. evansi* e *T. urticae* são isentas desses micro-organismos. A ausência de fungos em ácaros já foi relatada por Hoy & Jeyaprakash (2005), ao investigarem a diversidade microbiana em *Metaseilus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) e *T. urticae*, sem relatar a planta hospedeira. Esse é o primeiro trabalho que comprova a ausência desses microorganismos em *T. evansi*, em tomateiro.

Embora as espécies envolvidas no presente estudo não apresentem associações com fungos, é comum este tipo de associação com os insetos (NODA & KAWAHARA, 1995; WILKINSON & ISHIKAWA, 2001; GANTER, 2006). Nesses trabalhos, os endossimbiontes suprem seus hospedeiros com aminoácidos, encontrados em baixos níveis em suas dietas. Outras interações bem conhecidas são aquelas que envolvem a dispersão desses micro-organismos pelos insetos (WILDING *et al.*, 1989) e insetos com entomopatógenos (LOPEZ & SWORD, 2015) para o uso desses fungos no controle biológico (VINCENT *et al.*, 2007).

A ausência de fungos pode ser devido à grande associação dos ácaros com bactérias endossimbiontes. O aumento da competição provocado pelo desenvolvimento bacteriano pode ter impossibilitado o desenvolvimento dos fungos.

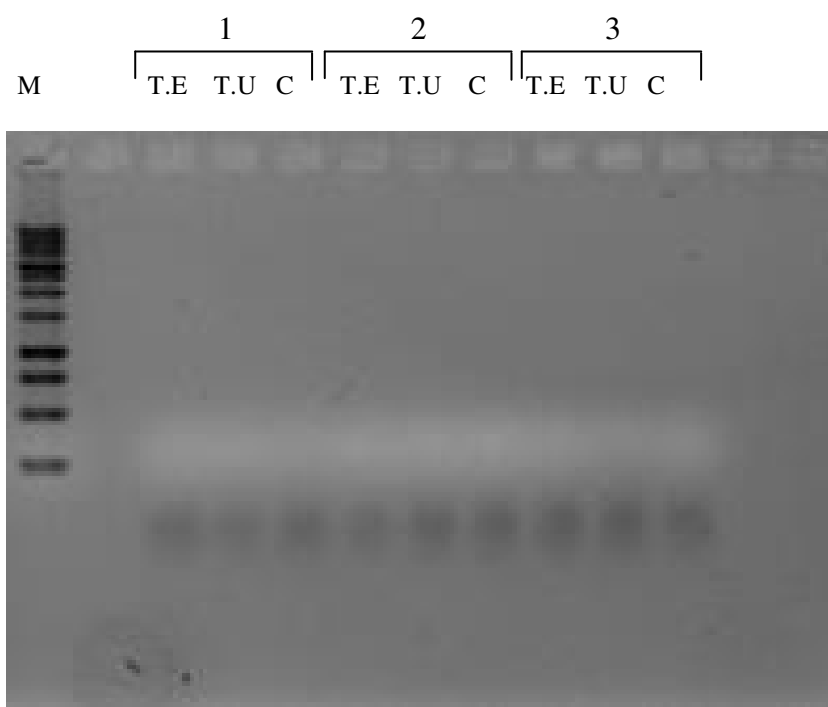


Figura 2 – Gel de agarose 1% com os *primers* para sequências 18S rRNA de fungos, confirmando a ausência desses fungos em ácaros *T. evansi* (T.E), *T. urticae* (T.U) e controle (sem DNA) (C). 1-NS3 GC/ YM951 R, 2- ITS1 GC/ ITS 2, 3-FF390/FR1 GC. M= Marcador 1Kb promega.

A amplificação, em gel agarose 1% (m/v), usando os *primers* 27F/1492R para verificar a presença de bactérias endossimbiontes em ácaros *T. evansi* e *T. urticae*

ocasionou formação de bandas (Figura 2), demonstrando a associação entre estes organismos.

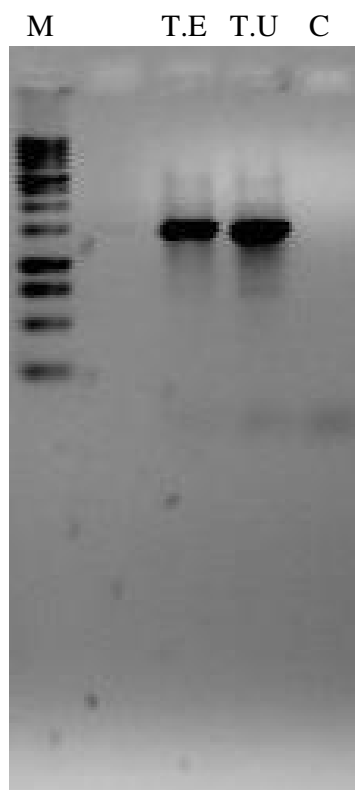


Figura 3- Gel de agarose 1% para sequêcia do gene 16S rRNA de bactérias em ácaros *T. evansi* e *T. urticae*, utilizando os primers 27F/1492R. M- Marcador 1Kb promega. T.E- *T. evansi*, T.U- *T. urticae* e C- controle (sem DNA).

Com o produto da primeira amplificação feita para as bactérias foi realizada a segunda PCR usando os primers 338F GC/518R, visando a amplificação de fragmentos de 200 pb que foram utilizados na DGGE. Para confirmar a amplificação dos fragmentos de DNA, esse produto da PCR foi aplicado em gel de agarose, podendo ser observado a amplificação para as duas espécies de ácaros. Assim, esse produto de PCR foi aplicado no DGGE e o perfil gerado pela eletroforese é apresentado na figura 5.

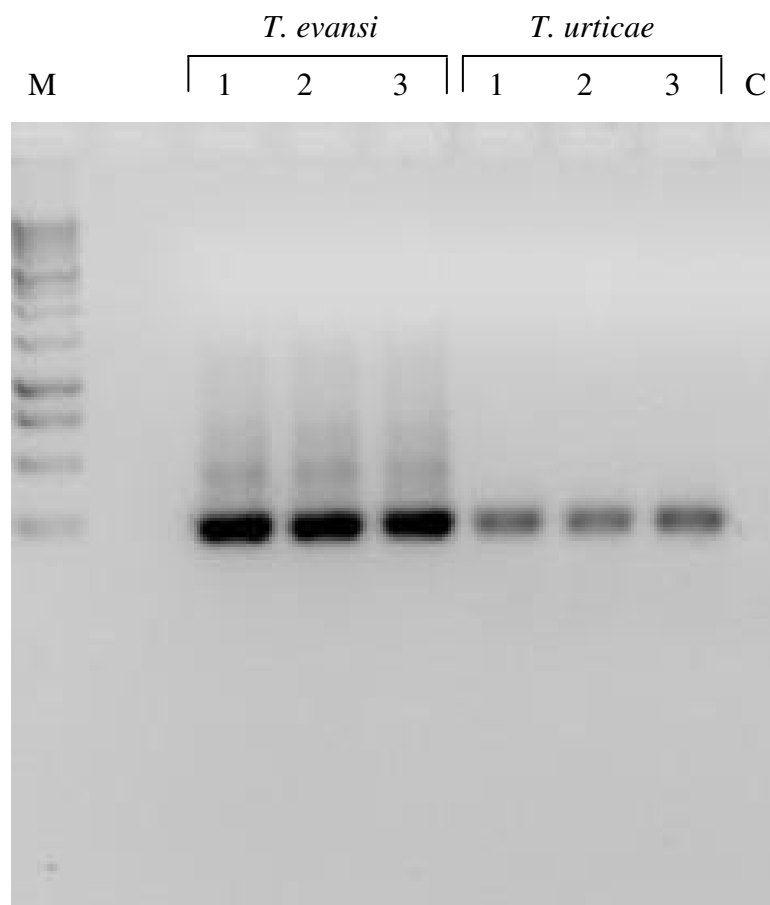


Figura 4: Gel de agarose 1% com *primers* 338 GC/518R para o produto da primeira PCR *T. evansi*, *T. urticae* e controle (sem DNA). M- Marcador 1Kb promega.

O perfil de bandas gerado pelo DGGE mostrou a diversidade bacteriana nas duas espécies de ácaros estudadas, sendo que esta diversidade foi superior em *T. evansi* em relação à de *T. urticae*. Após a revelação do DGGE, foram visualizadas 22 bandas (Figura 5), cada banda representando uma espécie de bactéria. Dessas, 11 estavam presentes apenas em *T. evansi*, seis eram exclusivas de *T. urticae* e cinco comuns aos dois ácaros.

Na técnica do DGGE fragmentos de DNA que possuem o mesmo comprimento, mas com diferentes sequências, podem ser separados baseados na parcial desnaturação da dupla fita de DNA e a conseqüente diminuição de sua mobilidade no gel de poliacrilamida (MUYZER & SMALLA, 1998).

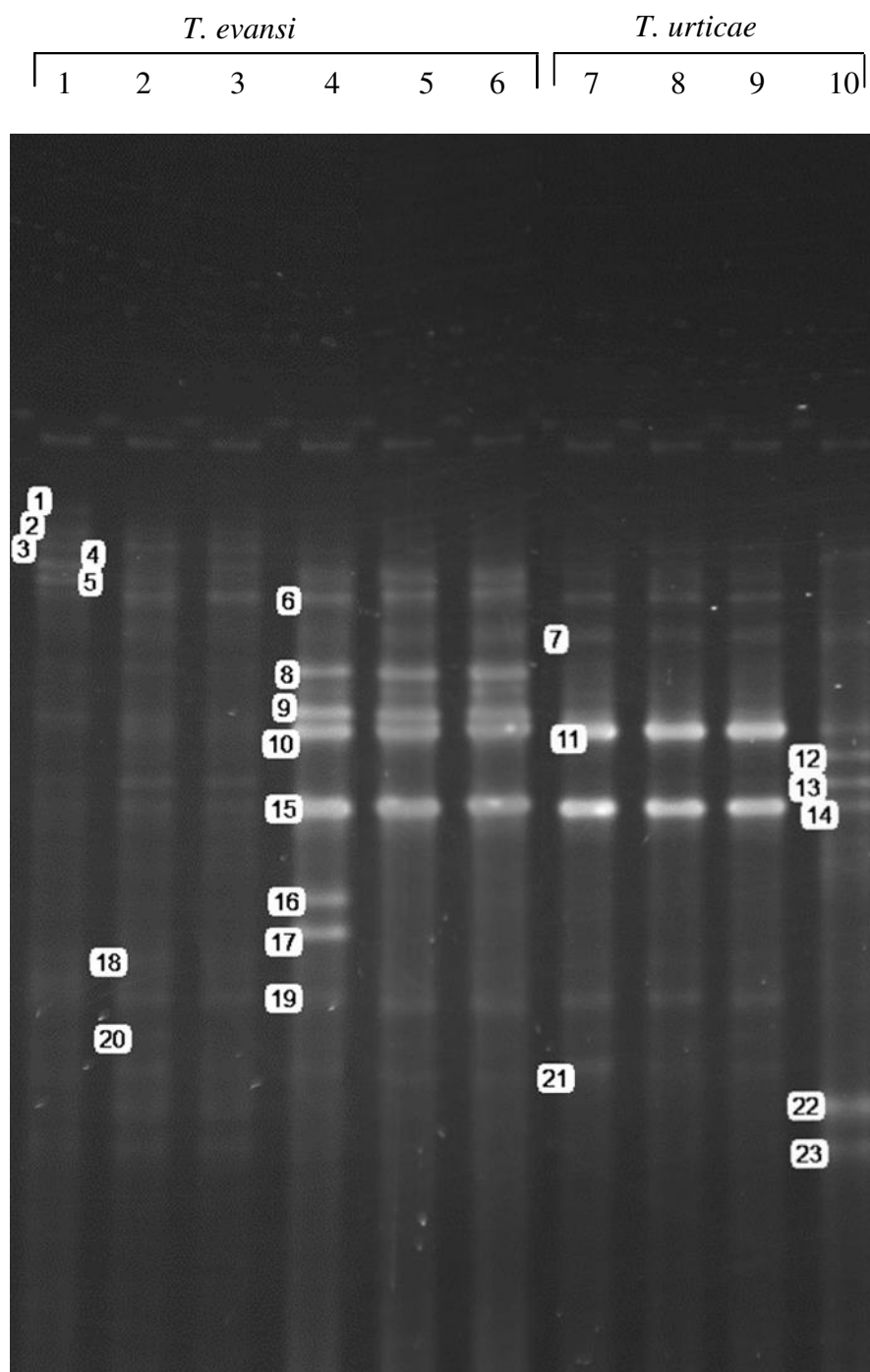


Figura 5: Gel de DGGE de poliacrilamida 8 % (p/v) corado com SYBR GOLD[®] 1X (Sigma-Aldrich). Canaletas 1-6 *T. evansi* e Canaletas 7-10 *T. urticae*.

A partir dos produtos formados do DGGE foi realizado o sequenciamento das bactérias (tabela 1).

1 **Tabela 1:** Sequenciamento das bandas excisadas do DGGE.

		Descrição	e-valor	Ident.	Acesso
<i>T. evansi</i>	1	Wolbachia endosymbiont of Glossinamorsitansmorsitans contig_0028, whole genome shotgun sequence	1e-48	93%	NZ_AWUH01000049
	2	OxalobacterformigenesHOxBLS genomic scaffold supercont2.1, whole genome shotgun sequence	8e-29	83%	NZ_KI392030
	3	Wolbachia endosymbiont of Onchocercaochengi complete genome, strain woo	1e-51	95%	NC_018267
	4	Paracoccusyei ATCC BAA-599 BU28DRAFT_scaffold00002.2_C, whole genome shotgun sequence.	7e-43	91%	NZ_JHWH01000002
	5	Ralstoniapickettii strain CW2 contig00014, whole genome shotgun sequence.	6e-30	89%	NZ_JFZH01000014
	8	Wolbachia endosymbiont strain TRS of Brugiamalayi, complete genome	3e-57	97%	NC_006833
	16	Bdellovibriobacteriovorus W, complete genome	9e-13	90%	NZ_CP002190
	17	Arthrobactercrystallopoietes BAB-32 contig28, whole genome shotgun sequence	2e-39	90%	NZ_ANPE02000028
	18	Wolbachia endosymbiont strain TRS of Brugiamalayi, complete genome	3e-52	95%	NC_006833
	20	Bradyrhizobiumelkanii WSM1741 YUODRAFT_scaffold_4.5_C, whole genome shotgun sequence	2e-53	96%	NZ_AXAU01000005
<i>T. urticae</i>	7	Wolbachia endosymbiont of Drosophila melanogaster, complete genome	5e-60	99%	NC_002978
	12	Wolbachia endosymbiont of Glossinamorsitansmorsitans contig_0028, whole genome shotgun sequence	2e-54	98%	NZ_KB223536
	23	Ralstoniapickettii strain CW2 contig00014, whole genome shotgun sequence	9e-58	95%	NZ_JFZH01000014
<i>T. evansie T. urticae</i>	6	Wolbachia endosymbiont of Drosophila simulanswNo, complete genome.	6e-59	98%	NC_021084
	9	Stenotrophomonasmaltophilia 5BA-I-2 SSCTG4, whole genome shotgun sequence	7e-54	92%	NZ_AZAE01000004
	10,11	Neorickettsiaristicii str. Illinois, complete genome	7e-34	89%	NC_013009
	15	Clostridium celatum DSM 1785 genomic scaffold Scfld51, whole genome shotgun sequence	5e-15	87%	NZ_KB291630
	19	Bradyrhizobiumelkanii WSM2783 YY7DRAFT_scaffold_137.138_C, whole genome shotgun sequence	6e-59	98%	NZ_AXAP01000139

As espécies de bactérias *Neorickettsia helminthoeca*, *Oxalobacter formigenes*, *Wolbachia w00*, *Paracoccus yeei*, *Ralstonia picketti* strain CW2, *Wolbachia TRS*, *Bdellovibrio bacteriovorus* W, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Neorickettsia risticii* strain Illinois, *Bradyrhizobium melkanii* WSM foram identificadas apenas na espécie *T. evansi*. Nesse grupo estão presentes duas diferentes cepas de bactéria gram-negativas do gênero *Neorickettsia* e também duas diferentes cepas de *Wolbachia*. Todas as bactérias mencionadas pertencem ao filo Proteobactéria, com exceção de *Arthrobacter* que pertence ao filo Actinobactéria.

Trabalhos indicam a presença de proteobactérias em simbiose com insetos (AKSOY *et al.*, 1994; MORAN *et al.*, 1993; MUNSON *et al.*, 1991; OLSEN *et al.*, 1994). Toft *et al.* (2009) mencionam a associação de proteobactérias com insetos como exemplo de alteração no estilo de vida de um organismo, onde uma bactéria livre torna-se um endossimbionte que pode estar diretamente ligado à geração de novas espécies. *Wolbachia* é uma proteobactéria matematicamente transmitida e representa o gênero de bactérias mais abundante entre os endossimbiontes de insetos (GLOWSKA *et al.*, 2015). Estima-se que diferentes cepas desses gêneros podem infectar mais de 65 % das espécies de insetos, bem como uma ampla gama de outros grupos de artrópodes e nematoides (HILGENBOECKER *et al.*, 2008; ZUG & HAMMERSTEIN, 2012).

Além da grande diversidade de cepas, diferentes cepas de *Wolbachia* podem infectar o mesmo hospedeiro (WERREN *et al.*, 2008), fato que ocorreu em no presente trabalho. Uma vez no hospedeiro, *Wolbachia* causa fenômenos como incompatibilidade citoplasmática, partenogêneses, feminização e morte de machos, sendo considerada um parasita reprodutivo (HILGENBOECKER *et al.*, 2008; WERREN *et al.*, 2008). Alterar a determinação do sexo do hospedeiro é vantajoso para essa bactéria, uma vez que ela é transmitida através do citoplasma do ovo e não pelo esperma masculino. Assim machos na população significa um entrave na dispersão desses endossimbionte (CORDAUX *et al.*, 2011).

Arthrobacter é uma bactéria comumente encontrada em simbiose com os cupins (Isoptera), sendo responsável por realizar a digestão de polissacarídeos e de compostos aromáticos (KÖNING, 2006; WENZEL *et al.*, 2002). Bactérias desse gênero também já foram encontradas no intestino de milípedes (DIPLOPODA) (BYZOV, 2005), artrópodes conhecidos popularmente como piolho-de-cobra. No presente trabalho, pela primeira vez, é mostrada a associação desta bactéria com estes ácaros.

Igualmente inédito, mostramos que *T. evansi* também é hospedeiro de *Bdellovibrio bacteriovorus*. Uma das características dos membros desse gênero é o comportamento parasita em outras bactérias (KADOURI, 2005). Sockett (2004) destaca que nos momentos atuais onde é crescente a preocupação com resistência a antibióticos, essas bactérias podem ter grande potencial de uso.

A espécie *T. urticae* apresentou duas cepas de *Wolbachia*. Essa bactéria foi encontrada em endossimbiose com seis espécies de ácaros polívoros do gênero *Bryobia* (WEEKS & BREEUWER, 2001). Nesse trabalho as fêmeas selvagens só apresentavam fêmeas em sua prole, mas uma vez tratadas com tetraciclina, passavam a apresentar uma relação aproximada de 50% machos e 50% de fêmeas. Esses dados evidenciam os efeitos que esse micro-organismo exerce sobre a reprodução de seu hospedeiro. Weeks & Jacobs (1996) descreveram *Wolbachia* infectando *T. urticae* e ácaros da família Phytoseiidae, nesse caso, a bactéria foi encontrada infectando indivíduos adultos e também os ovos.

A *Ralstonia pickettii*, uma bactéria gram-negativa. Foi identificada em *T. urticae*. Uma característica notável desse organismo é a capacidade de se desenvolver em ambientes muito úmidos, tais como solo, rios e lagos (PHILLIPS *et al.*, 1972; PICKETT & GREENWOOD, 1980). Esse micro-organismo, devido à sua grande capacidade metabólica, apresenta atividades biodegradáveis (RYAN *et al.*, 2007). Esse gênero também é conhecido por ser patógeno de diversas culturas (FREIRE & MOSCA; 2009; SCHELL, 2000; JONES, 2001). Hayward (2000) cita o pimentão, tomate, batata e banana como as principais culturas susceptível a esse patógeno.

Outra cepa de *Wolbachia* foi identificada nas duas espécies de ácaros. Trabalhos anteriores mostraram as espécies de ácaro predador *M. occidentalis* e *T. urticae* como hospedeiros da mesma espécie de *Wolbachia* (HOY & JEYAPRAKASH, 2004). Nesse caso, como se trata de uma relação presa-predador, possivelmente ocorre a transferência horizontal desse endossimbionte, ou seja, o predador adquire a bactéria ao se alimentar de sua presa. *Stenotrophomonas maltophilia* também presente nas duas espécies de ácaros tem sido relatada infectando todos órgãos de *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) (SOOD & NATH, 2002). *Stenotrophomonas maltophilia* apresenta grande capacidade metabólica de compostos orgânicos e aromáticos, devido a isso, tem sido apontada com grande potencial para biorremediação (DWINVED *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2012). *Neorickettsia sennetsu*, também comum

para as duas espécies, não existia relatos dessa bactéria associados à ácaros, entretanto, é um gênero bem conhecido pela comunidade veterinária por causar doenças em animais (PUSTERBA *et al.*, 2013). Insetos aquáticos podem ser hospedeiros intermediários dessa bactéria, mas não há relatos de quais seriam esses insetos (PUSTERBA *et al.*, 2013).

O gênero *Clostridium* representa bactérias anaeróbicas formadoras de esporos, compreendendo mais de 100 espécies (CASTAGNOLA & STOCK, 2014). Representantes deste gênero produzem toxinas, similar a *Bacillus*, que são ativadas por serino proteases, prejudicando o desenvolvimento do inseto (BARTH *et al.*, 2004). Gupta *et al.* (2014) mostraram em trabalho sobre a diversidade microbiana de *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae), popularmente conhecida como mosca-varejeira, que esse díptero também é hospedeiro de bactérias *Clostridium*.

O gênero *Bradyrhizobium*, também comum às duas espécies de ácaros, pode ter espécies associadas às leguminosas (SANZ-SÁES *et al.*, 2015) e também a *Sarcophaga* spp. (Diptera: Sarcophagidae) (GUPTA *et al.*, 2014). As bactérias associadas às leguminosas possuem grande potencial de fixação de nitrogênio, sendo responsáveis por maior produção de biomassa (SANZ-SÁES *et al.*, 2015). Entretanto os possíveis efeitos desse endossimbionte sobre insetos não tem sido estudados.

Análises com dendograma (Figura 6) mostram alta semelhança dentro das espécies de ácaros, com um mínimo de 65% de similaridade para *T. evansi* e de 85% para *T. urticae*. Quando comparamos as duas espécies, é mostrada uma semelhança de 40%, evidenciando a diferença na diversidade bacteriana entre os ácaros. O conhecimento da diversidade bacteriana de um organismo possibilita a compreensão das associações entre o hospedeiro e seus microorganismos (CARRASCAL *et al.*, 2014). Embora seja conhecido que endossimbiontes estão envolvidos em funções importantes como metabolismo de nutrientes e proteção contra bactérias invasivas (DAVIS & STONER 1994; ALDANA-ARANDA & PATIÑO, 1998), pouco é conhecido sobre a diversidade de micro-organismos associada a ácaros.

A composição microbiana do intestino dos insetos é influenciada pelo tipo de alimentação. Fonte alimentar rica em compostos de difícil digestão seleciona os micro-organismos que possuem habilidade em degradar esses compostos, sendo eliminados os que não possuem essa capacidade (HAYASHI *et al.*, 2007). No presente trabalho as

duas espécies de ácaros foram criadas por várias gerações sobre plantas de tomate, portanto as diferenças encontradas entre elas não é devido ao substrato alimentar.

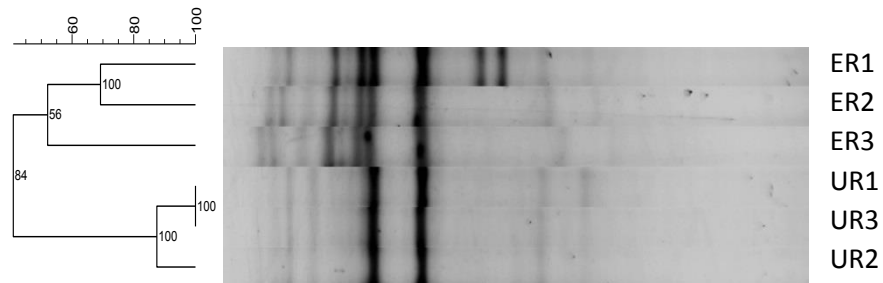


Figura 6: Coeficiente de similaridade obtido com Jaccard index para o perfil de bandas do DGGE. ER1, ER2, e ER3: repetições de *T. evansi*. UR1, UR2 e UR3: repetições de *T. urticae*.

No presente estudo, também buscamos identificar bactérias utilizando *primers* específicos. Identificar bactérias específicas utilizando esses *primers* é de grande importância, pois é uma ferramenta indispensável quando se deseja estudar os efeitos de um único endossimbionte sobre seu hospedeiro.

Os micro-organismos de interesse foram *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Wolbachia*. Porém, em nenhuma das reações foi detectado fragmentos de DNA amplificado (Figura 7).

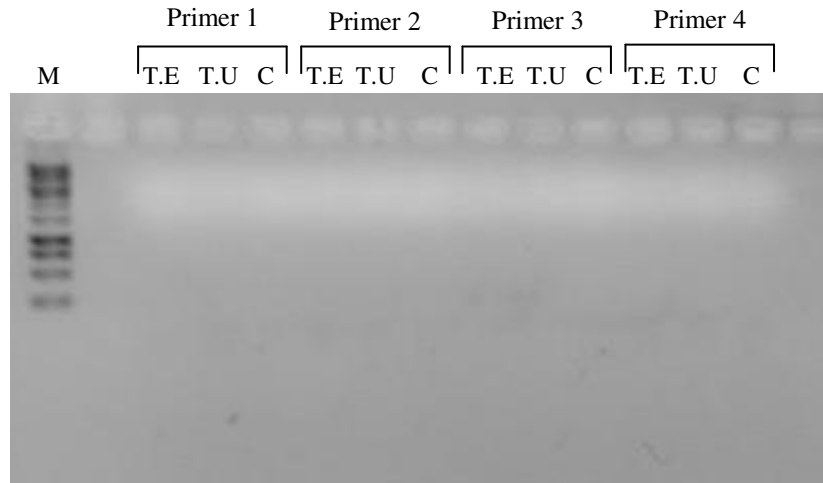


Figura 7: Gel de agarose 1 % dos produtos da amplificação para bactérias *Cardinium* (Primer 1), *Rickettsia* (Primer 2), *Spiroplasma* (Primer 3), *Wolbachia* (Primer 4) em *Tetranychus evansi* (T.E), *Tetranychus urticae* (T.U) e controle (sem DNA) (C). Primer 1: gyrBF/gyrBR, Primer 2: RICS741F/RCIT1197R, Primer 3: Spits-J04/Spits-N55, Primer 4: 76F/1012R. M= Marcador 1Kb promega.

Embora diferentes cepas de *Wolbachia* tenham sido encontradas nas duas espécies de ácaros, a reação de PCR com *primers* específicos para essa bactéria não apresentou fragmentos de DNA amplificados. A grande diversidade de cepas dessa bactéria e a recombinação que ocorre entre as cepas afeta várias regiões do genoma (WERREN *et al.*, 2008) o que provavelmente impediu a amplificação com os *primers* específicos usados.

4. CONCLUSÃO

Ambas as espécies de ácaros estudadas, *T. evansi* e *T. urticae*, não apresentaram associações com fungos endossimbiontes.

T. evansi e *T. urticae* são hospedeiros em comum das bactérias *Wolbachia simulans* No, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bradyrhizobium melkanii*, *Clostridium celatum*, *Eorickettsia risticii* str. *Illinois*.

As espécies de bactérias *Neorickettsia helminthoeca*, *Oxalobacter formigenes*, *Wolbachia w00*, *Paracoccus yei*, *Ralstonia picketti* strain CW2, *Wolbachia TRS*, *Bdellovibrio bacteriovorus* W, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Neorickettsia risticii* str. *Illinois*, *Bradyrhizobium melkanii* WSM foram identificadas apenas na espécie *T. evansi*.

A espécie *T. urticae* também apresentou duas cepas de *Wolbachia* e *Ralstonia picketti*.

Não houve amplificação de DNA com os *primers* específicos para *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Wolbachia*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSOY S, POURHOSSEINI AA, CHOW A. 1994. Mycetome endosymbionts of tsetse flies constitute a distinct lineage related to Enterebacteriaceae. *Insect Mol. Bioi.* 4: \5-22
- ALDANA-ARANDA D. & PATINˆO S.V. (1998) Overview of diets used in larviculture of three Caribbean conchs: queen conch *Strombus gigas*, milk conch *Strombus costatus* and fighting conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture* 167, 163–178.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403-410, 1990.
- BAKER, E. W. & PRITCHARD, A. E. The tetranychid mites of Africa. *Hilgardia* v.29, p.455-574, 1960.
- BARR KL, HEARNE LB, BRIESACHER S, CLARK TL, DAVIS GE (2010) Microbial Symbionts in Insects Influence Down-Regulation of Defense Genes in Maize. *PLoS ONE* 5(6): e11339. doi:10.1371/journal.pone.0011339
- BARTH, H.; AKTORIES, K.; POPOFF, M.; Binary bacterial toxins: Biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004, 68, 373±402.
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. *Ecology: from individuals to ecosystems*. 4 ed. Blackwell, Oxford., 2007.
- BOUBOU A., MIGEON A., RODERICK G. K., NAVAJAS M. (2010) Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. *Biological invasions* 13: 81-92.
- BOUBOU A., MIGEON A., RODERICK G., AUGER P., CORNUET J. M., NAVAJAS M. (2012). Test of colonisation scenarios reveals complex invasion history of the red tomato spider mite *Tetranychus evansi*. *Plos one* 74: e35601.
- BUNKER, T.W., KOETJE, D.S., STEPHENSON, L.C., CREELMAN, R.A., MULLET, J.E., GRIMES, H.D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell*, v.7, p.1319-1331, 1995.
- BYZOV, B.A. (2005) Intestinal Microbiota of Millipedes. In *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates* ed. Koˆnig, H. and Varma, A. pp. 89–114. Heidelberg: Springer Verlag.
- CARRASCAL.O.O.M.P; ELORZA.M.P; RESTREPO.G.E.C.R; HERRERA.X.M.H. Assessment of the bacterial community diversity associated with the queen conch *Strombus gigas* (Linnaeus, 1758) from the Caribbean coast of Colombia using denaturing gradient gel electrophoresis and culturing. *Aquaculture Research*, 2014, 45, 773–786
- CASS.B.N; DAUBE.N.M; KRUIH.L.I; BONDY.E.C; KELLY.S.E; HUNTER.M.S; FEIN.E.Z. Bacterial endosymbionts in field-collected samples of *Trialeurodes* sp. nr. *abutiloneus* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Research in Microbiology* 165 77 e 8 12014.

- CASTAGNOLA.A & STOCK.P. Common Virulence Factors and Tissue Targets of Entomopathogenic Bacteria for Biological Control of Lepidopteran Pests. *Insects* 2014, 5, 139-166; doi:10.3390/insects5010139
- CORDAX. R; BOUCHON. D; GREVE.P. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics* August 2011, Vol. 27, No. 8.
- DAVIS M. & STONER A.W. (1994) Trophic cues induce metamorphosis of Queen Conch larvae (*Strombus gigas* Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 180, 83–102.
- DAVIS M. J., YING Z., BRUNNER B. R., PANTOJA A., FERWERDA F. H. (1998). Rickettsial relative associated with papaya bunchy top disease. *Current microbiology* 36: 80-84.
- DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* , v.49, p.71–92, 2004.
- DOUGLAS AE: Microbial brokers of insect–plant interactions revisited. *J ChemEcol*, 39:952-961 2013.
- DWIVEDI S, SINGH BR, AL-KHEDHAIRY AA, ALARIFI S, MUSARRAT J. Isolation and characterization of butachlor-catabolizing bacterial strain *Stentrophomonas acidaminiphila* JS-1 from soil and assessment of its biodegradation potential. *Lett Appl Microbiol* 2010; 51:54–60.
- FREIRE. F.D.C.O & MOSCA. E.J.L. Patógenos associados a doenças de plantas ornamentais no Estado do Ceará. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* V.15, Nº 1, 2009, 83-89
- GARDES M., BRUNS T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* 2: 113-118.
- GANTER, P.F. 2006. Yeast and Invertebrate Associations, p. 302-370. In C.A. Rosa & G. Péter (eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts: The Yeast Handbook*. 1 ed. Springer Press, Germany 579 p.
- GLOWSKA.E; DRAGUN-DAMIAN.ANNA; DABERT.M; GERTH.M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Symbionidae). *Infection, Genetics and Evolution* 30 140–146 2015.
- GROOT T. V. M., BREEUWER J. A. J. (2006). Cardinium symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Experimental and applied acarology* 39: 257-271.
- GUPTA. A.K; RASTOGI. G; NAYDUCH. D; SAWANT. S.S; BHONDE. R.R and SHOUCHE. Y.S. Molecular phylogenetic profiling of gut-associated bacteria in larvae and adults of flesh flies. *Medical and Veterinary Entomology* (2014) 28, 345–354
- GUTIERREZ J., ETIENNE J. (1986). Les *Tetranychidae* de l'île de la Réunion et quelques-uns de leurs prédateurs. *Agronomie tropicale* 41: 84-91.

- HARUTA S., UENO S., EGAWA I., HASHIGUCHI K., FUJII A., NAGANO M., ISHII M., IGARASHI Y. (2006). Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International journal of food microbiology* 109: 79-87.
- HAYASHI, A.; AOYAGI, H.; YOSHIMURA, T.; TANAKA, H. Development of Novel Method for Screening Microorganisms Using Symbiotic Association between Insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki). *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* © 2007, The Society for Biotechnology, v. 103, n. 4, p.358–367, 2007.
- HEIKE FELDHAAR ROY GROSS. Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* 299 1–8 (2009).
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel- Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.3233-3241, 1997.
- HILGENBOECKER, K., HAMMERSTEIN, P., SCHLATTMANN, P., TELSCHOW, A., WERREN, J.H., 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 215–220.
- HOY, M.A.; JEYAPRAKASH, A. Microbial diversity in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Biological Control*, v.32, n.3, p.427-441, 2005, p.427-441, 2005.
- JONES, J. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Mundi-Presa. Madrid España. 28-29 p.
- KADOURI, D.; O'TOOLE, G. Susceptibility of Biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* Attack. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, July 2005, p. 4044–4051
- KANT, M.R.; AMENT, K.; SABELIS, M.W.; HARING, M.A.; SCHUURINK, R.C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology*, v.135, p.483-495, 2004.
- KIM T. W., LEE J., PARK M., KIM H. (2010). Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese and Chinese-fermented soybean pastes using nested PCR-DGGE. *Current microbiology* 60: 315-320.
- KONIG, H. *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil Invertebrates. *Journal compilation* ^a 2006 The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology* 101 (2006) 620–627
- KOPECKY, J; PEROTTI, M. A; NESVORNA, M; ERBAN, T; HUBERT, J. *Cardinium* endosymbionts are widespread in synanthropic mite species (Acari: Astigmata). *Journal of Invertebrate Pathology* 112 20–23 (2013).
- LANE D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (Ed. E. Stackebrandt & M. Goodfellow), pp. 115–175. New York, Wiley.

- LIN,M., DAUGHERTY,S.C., NAGARAJ,S., CHENG,Z., XIONG,Q., LIN,F.-Y., SENGAMALAY,N., OTT,S., GODINEZ,A., TALLON,L.J., SADZEWICZ,L., FRASER,C.M., DUNNING HOTOPP,J.C. AND RIKIHISA,Y. Sequencing and Comparison of Genomes and Transcriptome Profiles of Human Ehrlichiosis Agents. Submitted (14-MAR-2014) Institute for Genome Sciences, University of Maryland School of Medicine, 801 W. Baltimore St, Baltimore, MD 21201, USA Munson MA, Baumann P, Clark MA,
- MIGEON A, DORKELD F (2011) Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Available: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>. Accessed 2011/12/01.
- MIGEON M., FERRAGUT F., ESCUDERO-COLOMAR L. A., FIABOE K., KNAPP M., DE MORAES G. J., UECKERMANN E., NAVAJAS M. (2009). Modelling the potential distribution of the invasive tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and applied acarology* 48: 199-212.
- MORAN NA, MUNSON MA, BAUMANN P, ISHIKAWA H. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 253: 167-71 1993.
- MORAN, N. A. 1992. The evolution of aphid life-cycles. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 321-348
- MORAN, N.A., MCCUTCHEON, J.P., NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet.* v.42, p.165–190, 2008.
- MUNSON MA, BAUMANN P, CLARK MA, BAUMANN L, MORAN NA. 1991. Evidence for the establishment of aphideubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacterial.* 173:6321-24
- MUYZER,G.; WAAL, E.C.; UTIERLINDEN, A.G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, N.3, 1993.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.73, p.127–141, 1998
- NODA, H., N. KAWAHARA. 1995. Electrophoretic karyotype of intracellular yeast-like symbiotes in rice planthoppers and Anobiid beetles. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 118-124.
- OLIVER, K.M; MARTINEZ, A.J. How resident microbes modulate ecologically-important traits of insects. *Current Opinion in Insect Science*, 4:1–7 2014.
- OLSEN GJ. WOESE CR. OVERBEEK R. 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into micro-biology. 1. *Bacterial.* 1 76: 1-6
- O'Neill S. L., Giordano R., Colbert A. M. E., Karr L., Robertson H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic

incompatibility in insects. Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America 89: 2699-2702.

PAPA, G.; CELOTO, F.J.; ORTUNDO, M. Atividade de novo acaricida (Etoxazole) no controle do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), na cultura do tomate. Associação Brasileira de Horticultura, 2003.

PHILLIPS, I., EYKYN, S. AND LAKER, M. (1972) Outbreak of hospital infection caused by contaminated autoclaved fluids. *Lancet* 1, 1258–1260.

PICKETT, M.J. AND GREENWOOD, J.R. (1980) A study of the Va-1 group of pseudomonads and its relationship to *Pseudomonas pickettii*. *J Gen Microbiol* 120, 439–446.

POSPIECH A, NEUMANN B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram positive bacteria. *Trends Genet*, v.11, p.217-218, 1995.

PUSTERBA.N; HAGERTY.D; MAPES.S; VANGEEM.J; GROVES. L.T; DINUCCI. M; FIELDING. L.C; HIGGINS.J.C. Detection of *Neorickettsia risticii* from various freshwater snail species collected from a district irrigation canal in Nevada County, California. *The Veterinary Journal* 197 (2013) 489–491.

REESON, A.F; JANKOVIC,T; KASPER, M.L; ROGERS,S. AUSTIN,A.D. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespalagermânica*. *Insect Molecular Biology* 12(1), 85–91 (2003).

RYAN, M.P., PEMBROKE, J.T. AND ADLEY, C.C. (2007) *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. *J Appl Microbiol* 103, 754–764.

SAMBROOK.J, FRITSCH F, MANIATIS T *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

SANZ-SÁES.A; HEATH.KD; BURKE. P. B; AINSWORTH.E.A. Inoculation with an enhanced N₂-fixing *Bradyrhizobium japonicum* strain (USDA110) does not alter soybean (*Glycine max* Merr.) response to elevated [CO₂]. *Plant, Cell and Environment* (2015)

SCHELL, M. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia Solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology*, 38:263-92

SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2.ed. Academic Press, 605p, 1997.

SOCKETT, R. E., AND C. LAMBERT. 2004. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nat. Rev. Microbiol.* 2:669–675.

SOOD.P & NATH .A. Bacteria associated with *Bactrocera* sp. (Diptera: Tephritidae) - isolation and identification. Disponível em: 2002 Vol. 10 No. 1 pp. 1-9

STEINHAUS,E.A. The importance of environmental factors in the insect microbe ecosystem. *Archives of Bacteriological Reviews.*,24: 365-373, 1960.

- SWOFFORD, D. L & OLSEN, G. J. Phylogeny reconstruction. In D. M. Hillis and C. Moritz (eds.), *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland. V. 41, p.1-501. 1990.
- TANG, H; LI, J; HU, H; XU, PING. A newly isolated strain of *Stenotrophomonas* sp. hydrolyzes acetamiprid, a synthetic insecticide. *Process Biochemistry* 47 (2012) 1820–1825
- TOFT C, FARES MA (2009) Selection for translational robustness in *Buchnera aphidicola*, endosymbiotic bacteria of aphids. *Mol Biol Evol*.
- VAINIO E. J., HANTULA J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological research* 104: 927-936.
- VINCENT, C., GOETTEL, M.S., LAZAROVITS, G. (Eds), 2007. *Biological Control: a Global Perspective*. CAB International/AAFC, Wallingford, United Kingdom.
- VISÔTTO, L.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; RIBON, A.O.B.; GOOD-GOD, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Journal of Insect Physiology*, v.55, p.185–191, 2009.
- VON DER SCHULENBURG J. H. G., HURST G. D. D., TETZLAFF D., BOOTH G. E., ZAKHAROV I. A., MAJERUS M. E. N. (2002). History of infection with different male-killing bacteria in the two-spot ladybird beetle *Adalia bipunctata* revealed through mitochondrial DNA sequence analysis. *Genetics* 160: 1075-1086.
- WEEKS, A.R.; BREEUWER, J.A.J. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v.268, p.2245-2251, 2001.
- WENZEL.M; SCHONING.I; BERCHTOLD.M; KAMPFER.P AND KONING.H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92, 32±40
- WERREN, J.H., BALDO, L., CLARK, M.E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741–751.
- WILDING N, COLLINS NM, HAMMOND PM, WEBBER JF, 1989. *Insect– Fungus Interactions*. Academic Press, New York.
- WILKINSON, T.L. & H. ISHIKAWA. 2001. On the functional significance of symbiotic microorganisms in the Homoptera: a comparative study of *Acyrtosiphon pisum* and *Nilaparvata lugens*. *Physiol. Entomol.* 26: 86-93.
- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press, pp 315-322. San Diego.
- ZUG, R., HAMMERSTEIN, P., 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS ONE* 7, e38544.

CAPÍTULO II

RESPOSTA DEFENSIVA DO TOMATEIRO A *Tetranychus evansi* (ACARI: TETRANYCHIDAE) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ENDOSSIBIONTES E QUANDO INJURIADO POR ESTE ÁCARO E OUTROS HERBÍVOROS

RESUMO

A cultura do tomateiro está difundida mundialmente, sendo o Brasil um dos maiores produtores. É considerada uma cultura de alto risco devido a enorme suscetibilidade a doenças e artrópodes pragas. Entre as principais pragas do tomate estão: ácaros *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), *T. urticae* (KOCH, 1836) e a lagarta *Tuta absoluta*. A resistência do tomate a essas pragas é baseada em reações que elevam os níveis de composto de defesa, como os inibidores de proteases e quinonas. Entretanto, os artrópodes procuram estratégias para contornar as defesas vegetais, como aumento de proteases, produção de enzimas digestivas insensíveis aos inibidores e associação com micro-organismos endossimbiontes. Recentemente, foi mostrado que o ácaro *T. evansi* tem a capacidade de suprimir o mecanismo de defesa do tomateiro. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a possível interferência de bactérias associadas ao *T. evansi* sobre a defesa do tomateiro, avaliar a resposta de defesa induzida desta planta quando injuriada por este ácaro e suas possíveis associações com outros herbívoros; avaliar as atividades enzimáticas dos herbívoros quando alimentados com folhas de tomateiro injuriado; e avaliar o efeito da defesa do tomateiro na reprodução de *T. evansi*. Os tratamentos consistiram de plantas sem herbívoros, plantas infestadas com *T. evansi*, plantas infestadas por *T. evansi* tratados com tetraciclina, plantas infestadas por *T. urticae*, plantas infestadas por *T. evansi* + *T. urticae*, plantas infestadas por *T. evansi* + *T. absoluta*, plantas infestadas por *T. urticae* + *T. absoluta* e plantas infestadas por *T. absoluta*. Para análise da defesa da planta foram avaliadas as atividades de lipase, lipoxigenase (LOX), inibidores de proteases (IP) e polifenoloxidase (PPO). Foram avaliados os efeitos desses compostos de defesa sobre a oviposição de *T. evansi*. Nos herbívoros foram feitas análises de atividade de proteases totais, atividade amidásica de tripsina-like, atividade esterásica de tripsina-like, atividade de quimiotripsina-like e cisteíno protease. Essas análises foram feitas em *T. evansi*, *T. urticae*, *T. absoluta*, *T. evansi* quando atacou a planta com *T. urticae* e *T. evansi* quando atacou a planta com *T. absoluta*. *T. evansi* não tratado com tetraciclina

não induziu a via de defesa do tomateiro que resulta na produção de IP. Embora seu ataque tenha induzido uma maior atividade de PPO, isso não afetou sua oviposição. *T. evansi* tratado com tetraciclina induziu parcialmente a defesa do tomateiro. Quando esse ácaro ataca o tomateiro com outros herbívoros, os níveis de IP do tomateiro são aumentados. Todos os herbívoros apresentaram atividades para as enzimas digestivas testadas, sendo que para *T. evansi* tratado com tetraciclina, ocorreu uma diferença estatística na atividade de quimiotripsina-like e atividade de tripsina-like. Estes resultados mostram que bactérias endossimbiontes podem auxiliar o ácaro *T. evansi* a contornar as defesas do tomateiro. O tomate consegue responder ao *T. evansi* quando esse ataca o tomateiro simultaneamente com outros herbívoros e que as bactérias endossimbiontes de *T. evansi* alteram as atividades de suas enzimas digestivas.

CAPÍTULO II

TOMATO DEFENCE RESPONSE TO *Tetranychus evansi* (ACARI: TETRANYCHIDAE) IN PRESENCE AND ABSENCE OF ENDOSYMBIONTS WHEN INJURED FOR THIS MITE AND OTHER HERBIVORES

ABSTRACT

Tomato is a worldwide crop and Brazil is one of the major producer countries. It is considered a high risk crop due to enormous susceptibility to diseases and arthropod pests. Among the main tomato pests are the mites *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae), *T. urticae* (KOCH, 1836) and insects as *Tuta absoluta* larvae. Tomato resistance to these pests is based in biochemical reactions that increase levels of defence compounds as protease inhibitors and quinones. Meanwhile arthropods find out strategies to overcome plant defences as proteinases increments, production of digestive enzymes insensible to inhibitors and associations with endosymbiont microorganisms. Recently was revealed that the mite *T. evansi* has the capacity of suppress the defence mechanism of tomato plants. Thus, the objective of this work was to evaluate the possible interference of *T. evansi* associated bacteria over tomato defence. Besides to evaluate induced plant defence responds when injured by this mite and in simultaneous interactions with other herbivores. Also we aimed to evaluate herbivores enzymatic activity feeding on tomato under these different interactions and the effects of plant defences on *T. evansi* performance. Treatments consisted in plants without herbivores as control, plants infested with wild *T. evansi*, plants infested with *T. evansi* treated with tetracycline, plants infested with *T. urticae*, plants infested with *T. evansi* + *T. urticae*, plants infested with *T. evansi* + *T. absoluta*, plants infested with *T. urticae* with *T. absoluta* and plants infested with *T. absoluta*. For plant defences analysis were determined activities of lipases, lipoxygenases (LOX), proteinase inhibitors (PI) and polyphenol oxidases (PPD). *T. evansi* oviposition was measured as performance parameter. Therefore, total proteinase activities, amydasic trypsin-like activity, esterase trypsin-like activity, quimotrypsin-like activity and cysteine protease activity were determined from herbivore's digestive system. None treated *T. evansi* did not induce IP's although its injure induced a major PPO's activity and that did not affect their performance. *T. evansi* treated with tetracycline partially

induced plant defences. When *T. evansi* injured plants simultaneously with other herbivores the PI levels were increased. All herbivores reveal activities for each measured enzyme, but for *T. evansi* treated with tetracycline occurs a difference in quimotrypsin-like and trypsin-like activities. These results show that endosymbiont bacteria can help *T. evansi* to handle tomato defences. Tomato plants respond to *T. evansi* injuries when it interacts simultaneously with other herbivores and endosymbiont bacteria modifying their digestive enzymes.

1. INTRODUÇÃO

O tomate tem como possível centro de origem o litoral do pacífico entre o Equador até o norte do Chile, até a altitude de, aproximadamente, 2000 m nos Andes (SILVA *et al.*, 2007). Atualmente é cultivado em mais de 150 países, com produção total no ano de 2013 em torno de 163,9 milhões de toneladas (FAO, 2015a). No mesmo ano, o Brasil produziu 4,18 milhões de toneladas, ficando entre os 10 maiores produtores de tomate. Havendo destaque para as regiões Sudeste e Centro-Oeste, as quais foram responsáveis por 75,2 % da produção nacional (IBGE, 2015). Portanto essa cultura é de importância econômica para o país (FAO, 2015b). O Estado de Goiás é o maior produtor de tomate do país, no ano de 2013, teve uma produção de 1,3 milhão de toneladas, correspondendo a 31,5 % da produção brasileira (IBGE, 2015), seguido dos estados de São Paulo e Minas Gerais, com 885,9 e 563,3 mil toneladas, respectivamente.

O tomateiro é considerado uma cultura de alto risco de prejuízos devido a enorme suscetibilidade a artrópodes-praga e patógenos, tanto nas lavouras para consumo *in natura* como naquelas para produção industrial (LUZ *et al.*, 2007). A mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae), os pulgões *Myzus persicae* (Sulzer) e *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) e o tripses *Frankliniella schultzei* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) são importantes pragas sugadoras do tomate (PRATISSOLI *et al.*, 2015). Entre os ácaros, *Tetranychus evansi* e *T. urticae* se destacam por serem pragas cosmopolitas que causam prejuízos nesta cultura (MARUYAMA *et al.*, 2002; BOUBOU *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2013). Geralmente os ácaros injuriam as folhas medianas da planta, ocasionando amarelecimento e murcha (FLECHTMANN, 1972) o que resulta em uma menor produção e redução no tamanho dos frutos, além de induzir a maturação precoce com baixos teores de sólidos solúveis (MINAMI, 1980). Outra importante praga é a *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), conhecida popularmente como traça-do-tomateiro, que causa danos tanto em cultivos de campo como em ambiente protegido, em toda América Latina (MALUF *et al.*, 1997; HAJI *et al.*, 2002; BOGORNI *et al.*, 2008).

Uma vez que o herbívoro inicia sua alimentação, este se depara com os mecanismos de defesa físicos e induzidos da planta. A defesa física envolve alterações

morfológicas, por exemplo, no número e densidade de tricomas e acúlio. Estas estruturas são responsáveis por afetar o comportamento de alimentação e desempenho de insetos em vários estágios de suas vidas, reduzindo os danos causados às plantas (MATHUR *et al.*, 2011). Na defesa induzida, após o ataque do herbívoro, as plantas são capazes de reconhecer os sinais químicos destes organismos e também dos patógenos (WU & BALDWIN, 2009) e, com isso, produzir substâncias tóxicas e compostos de difícil digestão para estes indivíduos (VELZEN & ETIENNE, 2015). Os hormônios vegetais, ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS), desempenham importante papel na resposta de defesa induzida de plantas (BARI & JONES, 2009; PIETERSE *et al.*, 2009), sendo que o AJ é um sinalizador para a produção de inibidores de proteases (IP), compostos que afetam o desenvolvimento de herbívoros (FORTUNATO *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2005; OLIVEIRA, *et al.*, 2005). Por sua vez, que o SA é o hormônio responsável por sinalizar a resposta da planta contra patógenos, promovendo a síntese de enzimas oxidativas. Campos *et al.* (2004) observaram que plantas tratadas com AS apresentaram maior atividade da enzima polifenoloxidase. Essa enzima é encontrada em níveis elevados em plantas infectadas e são importantes por atuar em mecanismo de defesa e senescência dos vegetais (AGRIOS, 1997).

Os insetos, durante a evolução, adotaram estratégias para superar as defesas das plantas. Considerando que as plantas, para ativar seus complexos mecanismos de defesa, precisam reconhecer sinais provenientes das pragas (WU & BALDWIN, 2009), evitar ser percebidos é uma forma que os herbívoros e patógenos têm de contornar as defesas dos vegetais (WALLING, 2008). Contra os IP, os herbívoros produzem proteases insensíveis ao inibidor ou aumentam a ingestão de alimentos (JONGSMA & BOLTER, 1997). Além disso, os endossimbiontes associados aos herbívoros podem ajudar a superar estas defesas (CHUNG *et al.*, 2013; BARR *et al.*, 2010; DOUGLAS, 2013; REESON *et al.*, 2003). Recentemente foi mostrado que *T. evansi* consegue manipular a defesa da planta do tomateiro, diminuindo os níveis de inibidores de proteases, de forma a favorecer seu desenvolvimento e reprodução (SARMENTO *et al.*, 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível interferência de bactérias associadas ao *T. evansi* sobre a defesa do tomateiro. Além disso, foi estudada a resposta de defesa induzida desta planta quando injuriada por este ácaro e suas possíveis associações com outros herbívoros. Avaliaram-se, ainda, as atividades

enzimáticas dos herbívoros quando alimentados com folhas de tomateiro injuriado. Por fim, foi avaliado o efeito da defesa do tomateiro na reprodução de *T. evansi*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local

Os tomateiros foram cultivados em casa de vegetação e os ácaros foram criados no Laboratório de Acarologia/Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). As análises bioquímicas e moleculares foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO/UFV. As avaliações biológicas foram realizadas no Laboratório de Acarologia/ Entomologia, UFV.

2.2. Cultivo das plantas de tomate

Foram utilizadas sementes da variedade Santa Clara I-5300 para a obtenção das plantas de tomate. As sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial composto por vermiculita e adubo orgânico e, posteriormente, mantidas em casa de vegetação da UFV. Após 23 dias da semeadura, as plântulas foram transplantadas, individualmente, para vasos plásticos (1,5 L) contendo mistura de solo e esterco bovino curtido 3:1 (v/v). As plantas foram utilizadas no experimento quando atingiram 45 dias e estavam com quatro folhas completamente desenvolvidas. Durante todo o período experimental, as plantas permaneceram no interior de gaiolas (3,5 x 1,0 x 0,7 m) confeccionadas com cano de PVC e revestidas com tecido organza, para impedir a infestação de fitófagos.

2.3. Criações de *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*

Os ácaros foram criados massalmente com folhas de tomate da variedade Santa Clara I-5300. Quando as folhas desta planta estavam completamente desenvolvidas, elas foram coletadas, com o auxílio de uma tesoura esterilizada. Os pecíolos foram imediatamente colocados em copo com 50 mL de água e as folhas transportadas para o laboratório. Os ácaros foram transferidos da criação massal para as folhas com o auxílio

de um pincel de cerdas macias. Essas colônias foram mantidas em sala climatizada sob condições controladas, $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, U.R. $70 \pm 5 \%$ e 12h de fotofase. As duas espécies de ácaros foram mantidas em salas separadas e seguiram a mesma metodologia de criação.

2.4. Obtenção do ácaro *T. evansi* sem endossimbiontes bacterianos

A obtenção do ácaro *T. evansi* sem a associação bacteriana, folhas do tomateiro foram submetidas à radiação ultra-violeta por 5 minutos, em ambas as faces, para desinfecção superficial. Estas folhas foram cortadas em discos, com 2,5 cm de diâmetro, e mantidas em placas de Petri com a face adaxial sobre algodão umedecido com solução do antibiótico tetraciclina 0,1% (m/v). Em cada disco foram colocadas 50 fêmeas adultas de *T. evansi*, que após 24 horas foram retiradas e observado o desenvolvimento dos ovos até a fase adulta. A solução de tetraciclina e os discos foliares foram substituídos a cada três dias. As fêmeas obtidas foram utilizadas no experimento.

2.5. Obtenção do ácaro *T. evansi* e *T. urticae* com endossimbiontes bacterianos

A obtenção de ácaros com endossimbiontes bacterianos foi realizado por procedimento similar ao descrito no item anterior, mas usando algodão umedecido com água destilada e ausência de tetraciclina. Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para confirmar a presença de endossimbiontes bacterianos nos ácaros.

2.6. Experimentação

Os experimentos foram constituídos pelos seguintes tratamentos:

Tratamento 1: Controle – Plantas sem herbívoros

Tratamento 2: Plantas infestadas com *T. evansi*

Tratamento 3: Plantas infestadas com *T. evansi* tratados com tetraciclina

Tratamento 4: Plantas infestadas com *T. urticae*

Tratamento 5: Plantas infestadas com *T. evansi* e *T. urticae*

Tratamento 6: Plantas infestadas com *T. evansi* e *T. absoluta*

Tratamento 7: Plantas infestadas com *T. urticae* e *T. absoluta*

Tratamento 8: Plantas infestadas com *T. absoluta*

O experimento teve início com a colocação dos herbívoros na segunda folha, contada de baixo para cima, exceto o controle. As plantas foram mantidas dentro de gaiolas de organza. Os tratamentos 2, 3 e 4 foram constituídos de 100 ácaros. No tratamento 5 constava 50 ácaros de cada espécie. O tratamento 6 continha 50 ácaros e três lagartas de *T. absoluta* de segundo instar. Para o tratamento 8, cada planta foi infestada com três lagartas de segundo instar.

Para as análises de lipoxigenase, inibidor de protease, lipase e polifenoxidase, foi coletada a folha infestada sete dias após o início do experimento. Nesse mesmo momento foram coletadas folhas injuriadas de cada tratamento para avaliar o efeito da resposta de defesa sobre a oviposição de *T. evansi*. Os herbívoros foram coletados para análises de atividades das enzimas digestivas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O experimento foi composto de três repetições e a unidade experimental constituída de uma planta de tomate, exceto a análise de oviposição, cuja unidade experimental foi composta de 8 discos foliares. Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) ($\alpha= 5\%$) e quando necessário foi aplicado o teste de Tukey à 5% de significância utilizando o programa estatístico SISVAR.

2.7. ANÁLISES MOLECULARES

2.7.1. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando 70 fêmeas de cada espécie de ácaros. Estes ácaros foram previamente desinfestados superficialmente através da imersão em álcool 70% (v/v) por dois minutos, seguida de lavagem com solução de hipoclorito de sódio 0,1% (v/v) e posteriormente lavados em água estéril, para a retirada do excesso desse produto. Por fim, foram centrifugados a 5.000 rpm durante cinco minutos, para a eliminação de micro-organismos da sua superfície.

O DNA total dos indivíduos obtidos foi extraído a partir de uma adaptação da metodologia proposta por Pospiech & Neumann (1995). Os indivíduos, de cada espécie,

foram colocados em microtubos de 1,5 mL onde foi adicionado 200 µL de tampão SET (75 mM NaCl; 25 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) autoclavado a 120 °C/15 min, seguido por maceração imediata. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 500 rpm por três minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes, e o sobrenadante da centrifugação anterior usada na subsequente. O sobrenadante oriundo da terceira centrifugação foi centrifugado a 5.000 rpm por cinco minutos, posteriormente descartado e o precipitado formado (*pellet*) ressuspendido em 100 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCl e 10mM EDTA, pH 7,5) na presença de 1µL de proteinase K (20mg/mL) e 8 µL de lisozima (50 mg/mL). Essa suspensão foi incubada a 37°C por uma hora em banho-maria, sendo homogeneizados a cada 10 minutos ao longo da incubação. Em seguida foram adicionados 60 µL de SDS 10 % m/v (dodecil sulfato de sódio) e novamente incubado a 37°C, por 30 minutos. Foram adicionados 60 µL de CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio Sigma ultra) 10 % m/v e a reação incubada a 65°C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde adicionou-se igual volume de isopropanol e a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi incubada a -20°C por duas horas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 20 µL de álcool etílico 70%, centrifugado a 5.000 rpm por dois minutos e ressuspendido em 20 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCl e 10mM EDTA, pH 7,5). O material foi acondicionado a -20°C até o momento da amplificação.

2.7.2. Amplificação do DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)

As bactérias foram identificadas utilizando *primers* de oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA, sendo 16SF (5'- AGAGTTTGATCMTGG - 3') e 16SR (5'- TACCTTGTTACGACTT - 3'), utilizados por Weeks *et al.* (2001). Cada reação foi realizada para um volume total de 25 µL, sendo 1 µL da amostra de DNA e 24 µL da mistura de reação [2,5 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2,5µL do tampão Tris 1X, 2 µL dos *primers* (16 SF e 16 SR), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de TAQ Polimerase (5 U/µL) e 16,8 µL de água deionizada autoclavada]. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos, 94°C

por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e por fim, 72°C por 5 minutos (SAMBROOK *et al.*, 1989).

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

2.8. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FOLIAR

2.8.1. Obtenção do extrato foliar

Os extratos foliares foram obtidos da segunda folha desenvolvida (folhas infestadas) dos tomateiros. As folhas foram limpas com o auxílio de um pincel, para retirada de ácaros, teia e fezes, sendo imediatamente acondicionadas em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e transportadas ao laboratório, onde as amostras foram processadas.

O preparo do extrato bruto foi realizado a 4°C, de acordo com o método descrito por OHTA *et al.* (1986). O material vegetal foi macerado com o auxílio de pistilo e gral de porcelana até a obtenção de um pó que foi posteriormente pesado em balança analítica. Adicionou-se a esse pó uma solução de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 e CaCl₂ 20mM, na proporção 1:3 (m/L). Em seguida a mistura foi homogeneizada e depois centrifugada a 17.200 x g por 30 minutos a 4 °C (BATISTA *et al.*, 2002). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da concentração de proteína total, atividade de lipase e inibição trípica. Para a atividade de lipoxigenase, o tampão de extração usado foi tampão fosfato de Sódio 0,05 M, pH 6,5.

2.8.2. Determinação da concentração de proteína total

A determinação da concentração de proteína do extrato foi obtida pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando como padrão uma solução de 0,2 mg/mL de soro albumina bovina (BSA). As análises foram realizadas em triplicata.

2.8.3. Determinação da Atividade de Lipase

A atividade de lipase foi determinada utilizando-se o “kit” enzimático Bioclin®. Em um microtubo 1,5 mL foram adicionados 200 µL tampão tris (hidroximetilamino metano) 100 mM/L pH 8,5, 10 µL de extrato foliar, 10 µL de inibidor enzimático (Fenil Sulfonil Fruoreto) 8 mM/L e 20 µL do reagente de cor DTNB (Ácido ditionitrobenzóico, 3 mM/L, Acetato de Sódio 100 mM/L e azida sódica 3,08 mM/L). Essa mistura foi colocada em banho maria a 37° C por dois minutos, em seguida foi acrescentado 20 µL de substrato (tributiratoditio propanol 20 mmol/L). Novamente a mistura foi incubada a 37° C por trinta minutos. Depois foi adicionado 400 µL de acetona. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso durante três minutos, sendo posteriormente centrifugada a 3500 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da lipase em espectrofotômetro a 410 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o controle, apenas o substrato Tributiratoditio propanol 20 mmol/L não foi adicionado. O aparelho espectrofotômetro foi calibrado com água deionizada. O cálculo para lipase foi feito com a seguinte fórmula:

Lipase (UI): $(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Controle})/7 \times 1000$

2.8.4. Determinação da atividade da lipoxigenase

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

A solução estoque de linoleato de sódio 10 mM foi preparada utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como segue: a um erlenmeyer de 150 mL, envolvido por papel alumínio e contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de Tween 20 (SIGMA). A solução foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta automática, tomando-se o cuidado para não formar bolhas. O clareamento da solução foi realizado adicionando-se gotas de solução de NaOH 0,5 M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico (25 mL) envolvido por papel alumínio e o volume aferido. A solução estoque de linoleato de sódio foi armazenada em micro-tubos (1 mL) envolvidos em papel alumínio e armazenados a - 20 °C.

Para as análises das atividades de lipoxigenases, foram misturados em um microtubo de 1,5 mL: 1,0 µL do extrato bruto foliar e 4,0 µL da solução estoque de linoleato de sódio e 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,0. A absorbância da mistura de reação foi determinada a 234 nm, por um período de 2,5 minutos, utilizando espectrofotômetro modelo Spectrum SP 2000 UV. Sob as mesmas condições, foi realizado a leitura do branco, que consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A partir dos valores de absorbância obtidos a 234 nm foram calculadas as velocidades de formação dos produtos, utilizando-se a seguinte equação:

$$V = \frac{A_{234}}{\epsilon.l.t} \quad (1)$$

Onde :

A_{234} = absorbância a 234 nm

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

t = 120 s (tempo de incubação).

l = 1,0 cm (caminho ótico).

2.8.5. Determinação dos inibidores de tripsina

A presença de inibidores no extrato foliar foi determinada utilizando tripsina bovina. A determinação da atividade trípica foi baseada no seguinte procedimento analítico: 50 µL do extrato foliar; 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM; e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M, que foram adicionados em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Para o controle da enzima foram adicionados, em outro tubo, 550 µL do tampão Tris-HCl e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10⁻⁵ M.

A mistura contida em cada tubo foi incubada por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após esse tempo 500 µL da mistura foram retirados e adicionados em outro tubo contendo 500 µL de Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM 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, utilizando espectrofotômetro modelo Spectrum SP 2000 UV.

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

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

Em que:

A = Absorbância em 410 nm do controle – absorbância em 410 nm da amostra (Diferença entre a absorbância do controle e a absorbância da amostra);

B = Diluição da amostra;

P = Concentração de proteína dos extratos (g/mL); e

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

2.8.6. Determinação da atividade da polifenoloxidase (PPO)

A atividade de PPO foi determinada conforme método descrito por KAR & MISHRA (1976). A mistura de reação contendo 960 µL da solução de substrato catecol 0,2 M foi levada ao banho-maria, à 25 °C por 5 minutos, para estabilização. Após este tempo acrescentou-se 40 µL do extrato vegetal. O aumento da absorbância foi registrado no comprimento de onda 410 nm, no espectrofotômetro durante o período de 2,5 minutos, com intervalos de 30 segundos. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas. A atividade da enzima foi medida utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 1,47 mM⁻¹.cm⁻¹. Posteriormente, os resultados foram divididos pela concentração de proteína no extrato e foram expressos em M.min⁻¹/mg de proteína (atividade específica).

2.9. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS HERBÍVOROS

2.9.1. Obtenção do extrato enzimático dos ácaros

Cinquenta fêmeas adultas de *T. evansi* e de *T. urticae* foram colocadas em micro tubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de solução HCl 10⁻³ M a 4 °C. Os ácaros foram macerados com bastão de vidro estéril, adicionado 1 mL de solução HCl 10⁻³ M a 4 °C e

centrifugado a 10.000 g, por 10 min a 4°C (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005). O sobrenadante contendo o material solúvel, chamado de extrato bruto, foi utilizado para análises posteriores.

2.9.2. Obtenção do extrato enzimático das lagartas

Três lagartas entre 2° e 3° instar foram colocadas em micro tubo 1,5 mL contendo 1 mL de solução HCl 10^{-3} M a 4 °C. O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular dos tecidos em gral de porcelana, com auxílio de um pistilo, sobre banho de gelo e posteriormente centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C (PILON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005). O sobrenadante contendo o material solúvel, chamado de extrato bruto, foi utilizado para análises posteriores.

2.9.3. Determinação da atividade das proteases totais

A atividade proteásica foi determinada segundo o método descrito por Tomarelli *et al.*, (1949) utilizando-se azocaseína 2% (m/L) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 37°C. A mistura reacional consistiu em 50 µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático, sendo incubada por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/L). Após interromper a reação, as amostras foram homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso em gelo por 15 minutos. Logo após, os micro tubos de 2 mL contendo as amostras foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 25°C, para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 µL do sobrenadante foi transferida para outros tubos contendo 280 µL de NaOH 1M. As absorbâncias foram determinada a 440 nm e os valores divididos entre a concentração de proteínas total expressas em mg/mL para a obtenção da atividade específica.

2.9.4. Determinação de atividade de serino-proteases

Tripsina-like

A atividade amidásica foi determinada segundo o método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico para tripsina-like L-BApNA (*N*- α -Benzoil-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 500 μ L de substrato e 10 μ L de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 410 nm em função do tempo (2,5 min) a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto p-nitroanilida, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹cm⁻¹. A partir dos valores de absorbância obtidos foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

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

Onde :

A₄₁₀ = Absorbância a 410 nm

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

t = 150 s (tempo de incubação)

l = 1,0 cm (caminho ótico)

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

A atividade esterásica foi determinada utilizando-se o substrato L-TAME (*N*- α -Tosyl-L-argininemethylesterhydrochloride) na concentração final de 0,1 mM a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM CaCl₂. A mistura reacional consistiu de 500 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 500 μ L de substrato e 10 μ L de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida a 247 nm por 2,5 minutos, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de

extinção molar de $540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A partir dos valores de absorvância obtidos foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

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

Onde:

A_{247} = absorvância a 247 nm

$\epsilon = 540 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar)

$t = 150 \text{ s}$ (tempo de incubação)

$l = 1,0 \text{ cm}$ (caminho ótico)

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

Quimotripsina-like

A determinação da atividade de quimotripsina-like foi realizada pelo método de Erlanger *et al.*, (1961), utilizando-se o substrato cromogênico para quimotripsina-like L-BTpNA (*N*-Benzoil-L-tirosil *p*-nitroanilida) 60 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl_2 20 mM a 25 °C, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 500 μL de substrato e 10 μL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorvância da amostra foi obtida a 410 nm em função do tempo (2,5 min) a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A partir dos valores de absorvância obtidos foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

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

onde :

A_{410} = absorvância a 410 nm

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

$t = 150$ s (tempo de incubação)

$l = 1,0$ cm (caminho ótico)

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

2.9.5. Determinação da atividade de cisteíno-proteases

A atividade amidásica de cisteíno-proteases foi realizada pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961) com modificações conforme Mendonça *et al.*, (2011, 2012). Utilizaram-se 500 μ L do substrato cromogênico *N*-benzoil-L-arginil *p*-nitroanilina (L-BApNA) na concentração final de 0,5 mM a 25°C e 500 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 5 mM de Ditioneitol (DTT), para garantir que o resíduo de cisteína estivesse reduzido. Ao extrato foi adicionado 100 μ L do inibidor de serino-protease benzamidina na concentração final de 1mM, a qual corresponde ao K_i de inibição de tripsinas-*like* por benzamidina. A reação foi realizada durante 2,5 minutos com leitura de absorvância a 410 nm a cada 30 segundos. Para a determinação da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar do produto formado, *p*-nitroanilina, de 8800 M⁻¹.cm⁻¹. A partir dos valores de absorvância obtidos foram calculadas as atividades de formação dos produtos em M/s utilizando-se a seguinte equação:

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

onde :

A_{410} = absorvância a 410 nm

$\epsilon = 8800$ M⁻¹.cm⁻¹ (coeficiente de extinção molar)

$t = 150$ s (tempo de incubação)

$l = 1,0$ cm (caminho ótico)

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

2.10. COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE *T. evansi*

O experimento foi conduzido a 25 °C, 70 ± 5% de umidade relativa e 12 horas de fotofase. Para avaliar a oviposição, após sete dias da infestação feita com os tratamentos nas folhas do tomateiro, os herbívoros foram retirados das folhas para serem submetidos à análise enzimática e, subsequente, foram feitos discos das folhas expostas aos tratamentos. Os discos foram mantidos com a face adaxial em contato com algodão hidrófilo umedecido com água destilada no interior de placas de Petri (14 cm de diâmetro x 2 cm de profundidade). Foram avaliadas somente fêmeas de *T. evansi* sobre cada tratamento, em razão da interação dos herbívoros na resposta de defesa das plantas interferir na reprodução de qualquer um dos herbívoros em estudo. Foi colocada uma fêmea adulta por disco, obtidas da criação massal, sendo essas fêmeas de dois dias de idade e acasaladas. As fêmeas foram deixadas ovipositar por quatro dias e os ovos contabilizados a cada dia, durante um período de quatro dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise molecular

A figura 1 representa a amplificação de DNA para os ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com água nas canaletas 1 e 2, e umedecidos com solução de tetraciclina 0,1 % (m/L) na canaleta 3. Observou que apenas os ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com água apresentaram DNA bacteriano amplificado, ou seja, formação de banda. Isso mostra a eficiência do tratamento com o antibiótico tetraciclina para eliminar endossimbiontes bacterianos no ácaro *T. evansi*. Esse resultado nos permite avaliar o efeito dos endossimbiontes bacterianos de *T. evansi* não tratados sobre o mecanismo de defesa do tomateiro.

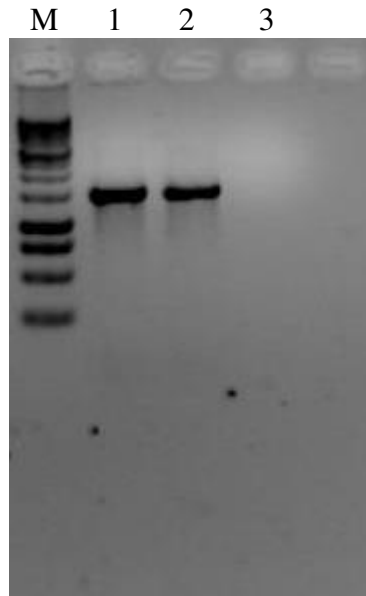


Figura 1. Amplificação de DNA para os ácaros *T. evansi* mantidos em discos foliares umedecidos com água (1 e 2) e com solução de tetraciclina 0,1 % (3). M – 1Kb promega.

Tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro e normalmente utilizado para tratar insetos com endossimbiontes bacterianos, permitindo determinar seus efeitos sobre os hospedeiros (BALLARD & MELVIN, 2007; SLADE & MORRISON, 2013). Além do baixo custo, Visôto *et al.* (2009) destacaram que a esterilização via tratamento oral de antimicrobianos facilita estudos fisiológicos e das possíveis relações da microbiota com seu hospedeiro.

3.2. Atividade Enzimática foliar

A atividade da lipase dos tratamentos contendo os herbívoros foi superior ao tratamento controle (Figura 2). Plantas infestadas com *T. evansi* apresentaram maior atividade de lipase que as plantas controle. Esse resultado mostra que o *T. evansi*, conhecido por reduzir a defesa do tomateiro (SARMENTO *et al.*, 2011), induziu o sistema de defesa da planta nesse ponto da via. As plantas infestadas com *T. evansi* tratadas com tetraciclina, ou seja, sem endossimbiontes bacterianos, apresentaram valores para atividade da lipase iguais às plantas injuriadas por *T. urticae*, por *T. evansi* e *T. absoluta*; por *T. urticae* e *T. absoluta*; e por apenas *T. absoluta*. O ácaro *T. urticae* tem mostrado ser capaz de induzir as defesas da planta dependentes de lipase (KANT *et*

al, 2004). Plantas injuriadas por *T. absoluta* apresentam maior atividade de lipase quando comparado com plantas não injuriadas, mostrando que esse herbívoro é capaz de induzir o mecanismo de defesa pela via dependente da atividade de lipase.

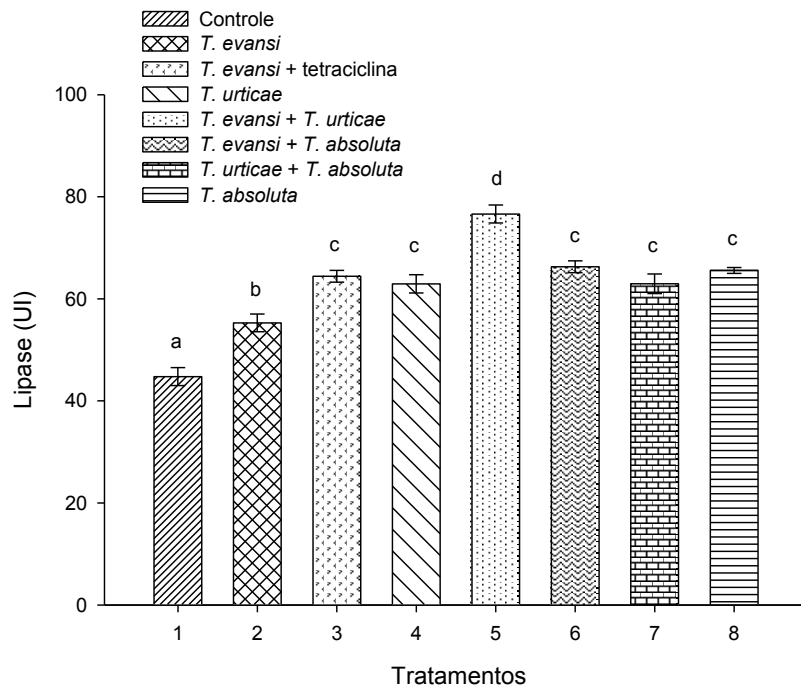


Figura 2. Atividade da lipase (UI) em plantas sem herbívoros, plantas infestadas com: *T. evansi*; *T. evansi* tratados com tetraciclina; *T. urticae*; *T. evansi* + *T. urticae*; *T. evansi* + *T. absoluta*; *T. urticae* + *T. absoluta*; e *T. absoluta*. Média seguida pela mesma letra, na coluna, não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

A atividade de lipase é maior quando as plantas estão sendo injuriadas por herbívoros e patógenos (OH *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008, HONG *et al.*, 2008). Essa maior atividade é resultado da interação de um peptídeo com receptor da membrana plasmática, sendo esse peptídeo um sinalizador da lesão dos herbívoros (CLARENCE, 2000; SCHILMILLER & HOWE, 2009). A maior atividade da lipase em plantas infestadas em relação ao controle mostra a capacidade dos herbívoros testados em induzir a defesa do tomateiro.

Plantas infestadas com *T. evansi* sem endossimbiontes apresentaram maior atividade da lipase quando comparadas às plantas infestadas por *T. evansi* com endossimbiontes. Segundo McCloudand & Baldwin (1997), as plantas conseguem identificar pistas de seus agressores, como compostos presentes na saliva ou o próprio material vegetal degradado, e assim responder de forma mais específica à injúria que está sofrendo. Baseado nisso, algum composto produzido pelas bactérias endossimbiontes de *T. evansi* pode ter interferido no reconhecimento da planta quando esta foi injuriada por esse ácaro.

Barr *et al.* (2010) relataram que bactérias do gênero *Wolbachia*, endossimbiontes *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), suprimem a defesa do milho. Igualmente, *T. evansi* é hospedeiro de uma cepa de *Wolbachia*, como se trata de uma bactéria que não pode ser cultivada em meios de cultura, o que torna difícil determinar os efeitos específicos dessa bactéria sobre o mecanismo de defesa do tomateiro. Foi mostrado que o tomateiro responde de forma diferente a ácaros com e sem bactérias, porém, não foi possível atribuir esse efeito a uma bactéria específica.

De forma geral, após serem injuriadas por herbívoros, as plantas respondem de forma inespecíficas a seus agressores (SCHALLER & FRASSON, 2001). Nas sequências de reações que levam ao aumento dos compostos de defesa das plantas, as que envolvem a transformação do ácido linolênico até metil jasmonato são bem conhecidas (ISHIGURO *et al.*, 2001), sendo a atividade da lipase uma das primeiras etapas desse processo. Essa enzima é responsável pela liberação de ácidos graxos no citosol, servindo como substrato para as lipoxigenases.

A enzima lipoxigenase nas plantas infestadas por ácaros *T. evansi* apresentaram concentrações iguais às plantas controle (Figura 3). *T. evansi* sem endossimbiontes, *T. urticae* e *T. absoluta* induziram de forma idêntica a defesa da planta. Nesse ponto da via de defesa da planta, fica evidente o efeito das bactérias do *T. evansi* na supressão da atividade de lipoxigenase. Igualmente à atividade da lipase, quando as plantas foram infestadas simultaneamente por herbívoros que induzem e suprimem a defesa da planta, o efeito da indução predominou.

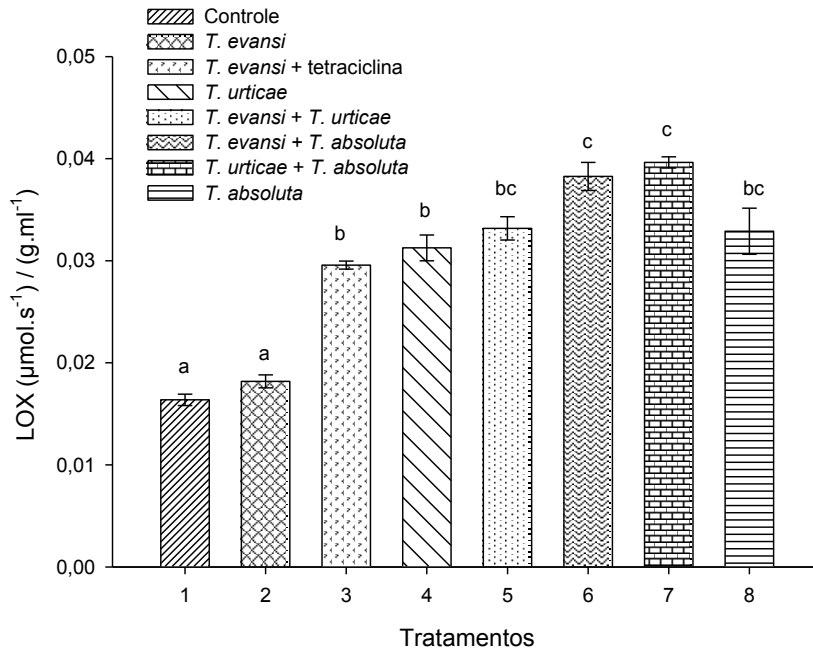


Figura 3. Atividade de lipoxigenase (LOX) ($\mu\text{mol.s}^{-1}$) / (g.ml^{-1}) em plantas sem herbívoros, plantas infestadas com: *T. evansi*; *T. evansi* tratados com tetraciclina; *T. urticae*; *T. evansi* + *T. urticae*; *T. evansi* + *T. absoluta*; *T. urticae* + *T. absoluta*; e *T. absoluta*. Média seguida pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste Tukey a 5 % de significância.

As injúrias causadas por *T. evansi* com endossimbiontes comprometeu significativamente a primeira etapa da via de defesa do tomateiro, reduzindo a atividade da LOX. Essa baixa de atividade LOX não pode ser explicada pela falta de substrato para essa enzima, uma vez que a atividade da lipase é alta em ácaros *T. evansi*.

Plantas infestadas por *T. evansi* sem endossimbiontes apresentaram atividade de LOX semelhantes a *T. urticae*, evidenciando os efeitos das bactérias sobre a atividade dessa enzima. Thaler *et al.* (2002) afirmam que o ataque de um herbívoro pode estar associado a ataques de outros organismos, como endossimbiontes que podem ser patógenos para plantas. Nesse caso, pode estar ocorrendo uma interação negativa entre as vias de sinalização para defesa das plantas a herbívoros e patógenos. A planta priorizando a defesa contra patógenos pode ficar mais susceptível ao ataque de herbívoros (KOORNNEEF & PIETERSE, 2008).

O comportamento alimentar dos herbívoros tem papel importante na interação planta-herbívoro. Gosset *et al.* (2009) mostraram que insetos mastigadores induzem

defesas de planta diferentes das induzidas por insetos sugadores. Pode ser observado nos nossos resultados que o herbívoro sugador *T. urticae* induziu a atividade de LOX de forma semelhante ao mastigador *T. absoluta*, evidenciando que o tomateiro não diferencia o tipo de injúria dessas pragas. O maior nível de LOX é observado quando esses dois herbívoros estão juntos na planta, provavelmente devido aos maiores danos causados. *T. evansi* na presença de outros herbívoros não conseguiu suprimir a defesa do tomateiro pela via das lipoxigenases.

A LOX atua sobre os ácidos linolênico e linoleico, que são liberados da membrana plasmática pela lipase, formando precursores do ácido jasmônico. Esse ácido é um importante hormônio das plantas, aumentando a resistência dessas contra microorganismos patogênicos e herbívoros (GAO, *et al.*, 2013), além de estar envolvido em processos de crescimento e desenvolvimento do vegetal (SHAN *et al.*, 2009; SCALSCHI *et al.*, 2013).

O ácido jasmônico é responsável pela indução e acúmulo de IP. Esses compostos fornecem uma forte barreira para os herbívoros, que não conseguem assimilar os aminoácidos essenciais da proteína ingerida (LI *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005; SCHILMILLER & HOWE, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005).

Para as análises de inibidores de proteases, plantas não infestadas e plantas infestadas com *T. evansi* na presença e ausência das bactérias apresentaram concentrações estatisticamente iguais dessa molécula proteica (Figura 4). Entretanto, plantas injuriadas por *T. evansi* sem bactérias também apresenta níveis de IP semelhantes às com *T. urticae*. Os níveis de IP são elevados quando *T. evansi* não tratados e herbívoros que induzem a defesa da planta atacam simultaneamente a planta, mostrando que a indução supera o efeito da supressão. Os maiores níveis de IP forma observados em plantas infestadas simultaneamente por *T. urticae* e *T. absoluta*.

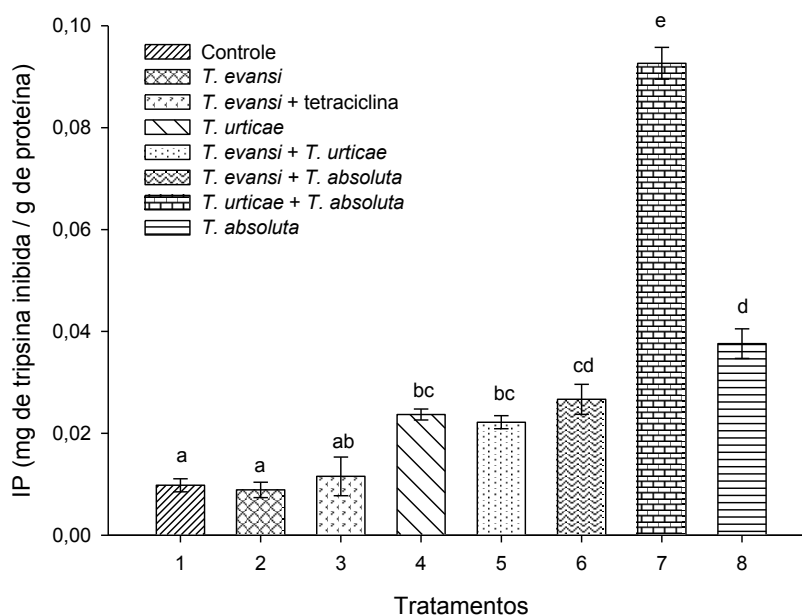


Figura 4. Atividade de inibidores de proteases (IP) em plantas sem herbívoros, plantas infestadas com: *T. evansi*; *T. evansi* tratados com tetraciclina; *T. urticae*; *T. evansi* + *T. urticae*; *T. evansi* + *T. absoluta*; *T. urticae* + *T. absoluta*; e *T. absoluta*. Média seguida pela mesma letra, na coluna, não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Plantas infestadas por *T. evansi* apresentaram níveis basais de IP, iguais às plantas não infestadas. Esses baixos valores para IP podem estar relacionado à baixa atividade de LOX observada em plantas infestadas com esse mesmo ácaro. A atividade de LOX é uma etapa crucial da via de resposta da planta que leva à produção de ácido jasmônico, sendo esse o sinalizador da expressão gênica de IP (DE VOS *et al.*, 2005). Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Sarmento *et al.* (2011), que avaliaram a indução gênica em tomateiro injuriado por *T. evansi* e *T. urticae*, separadamente. Ao contrário do que foi observado para *T. urticae*, os danos causados por *T. evansi* não levaram a uma maior expressão gênica para IP. Herbívoros que se alimentam em plantas com baixos níveis de IP apresentam desenvolvimento e reprodução superior quando comparados com alimentação sobre plantas com altos teores de IP (SARMENTO *et al.*, 2011).

Herbívoros da ordem Lepidoptera, como *T. absoluta*, são conhecidos por aumentar os níveis de IP em plantas infestadas (FORTUNATO *et al.*, 2007). Embora *T.*

absoluta seja uma importante praga do tomate, podendo levar a perdas de até 100% das plantações infestadas (DESNEUX *et al.*, 2010). Estudos tem enfatizado o risco dessa praga adquirir resistência aos agrotóxicos usados em seu controle (KHALID *et al.*, 2012; SILVA *et al.*,2015), mas não abordam como a planta responde a essa praga. O presente trabalho demonstrou que *T. absoluta* aumenta a atividade de lipase em tomateiro, iniciando a via de resposta da planta que resulta na produção de IP. O aumento da atividade do IP também foi observado em plantas atacadas por *T. urticae*. Essas espécies induzem o mesmo mecanismo de defesa no tomateiro, isso explica os altos valores de IP quando esses herbívoros atacaram juntos a planta.

A infestação dos ácaros simultânea com *T. absoluta* resultou em um aumento nos teores de IP (Figura 4). Isso mostra que capacidade de indução do mecanismo de defesa nas plantas de tomate. *T. evansi* não foi capaz de reduzir os níveis de IP quando se alimenta com outros herbívoros, mostrando que seus competidores não podem aproveitar da interferência desse ácaro na redução da defesa da planta.

Na figura 5, podemos observar que plantas infestadas por *T. evansi* não tratados com tetraciclina apresentaram alta atividade da enzima polifenoloxidase (PPO). Plantas infestadas por mais de um herbívoro, simultaneamente, elevaram os níveis de PPO acima dos níveis das plantas não infestadas. Plantas injuriadas por *T. absoluta* não aumentaram a atividade da PPO.

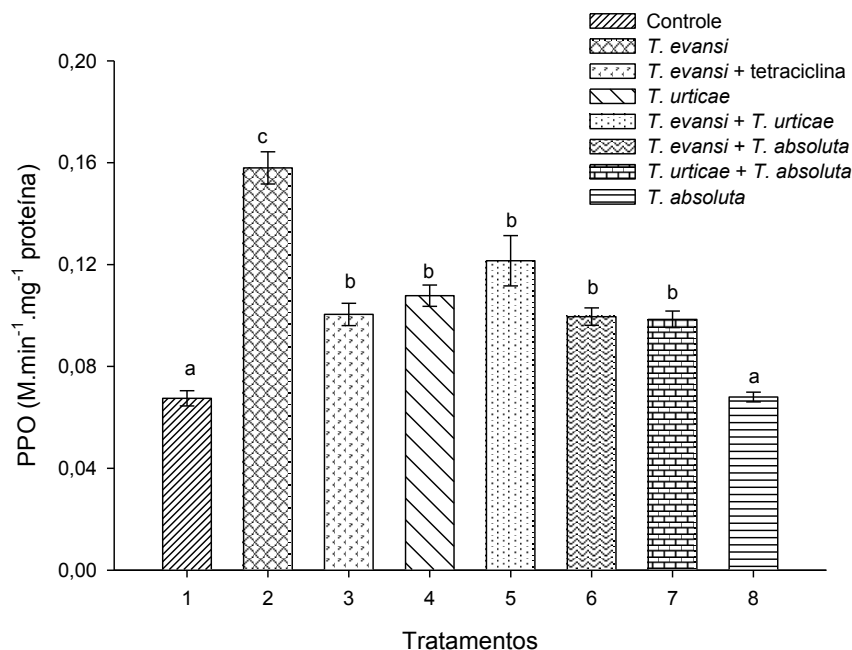


Figura 5. Atividade de polifenoloxidase (PPO) em plantas sem herbívoros, plantas infestadas com: *T. evansi*; *T. evansi* tratados com tetraciclina; *T. urticae*; *T. evansi* + *T. urticae*; *T. evansi* + *T. absoluta*; *T. urticae* + *T. absoluta*; e *T. absoluta*. Média seguida pela mesma letra, na coluna, não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Ao contrário do observado para LOX e IP, *T. evansi* apresentou maior indução de atividade para PPO quando comparado aos demais tratamentos (Figura 3, 4 e 5). PPO são enzimas que podem afetar o crescimento, desenvolvimento e reprodução de herbívoros (WAR *et al.*, 2012). Essas enzimas reduzem a qualidade nutricional, digestibilidade e palatabilidade dos tecidos vegetais para os herbívoros por produção de quinona através de compostos fenólicos. Essas quinonas complexam os aminoácidos deixando-os indisponíveis para os herbívoros (MAHANIL, *et al.*, 2008; BHONWONG, *et al.*, 2009). PPO pode ser induzida tanto por micro-organismo como por herbívoros (WAR *et al.*, 2012; THIPYAPONG *et al.*, 2007) o que pode explicar uma maior indução desta enzima pelo *T. evansi* com endossimbiontes, quando comparado com *T. evansi* sem bactérias. PPO tem atividade aumentada quando plantas são atacadas por fungos e bactérias, constituindo importante defesa contra micro-organismo. Thipyapong *et al.* (2007) mostraram, através da utilização de plantas transgênicas com reduzida

atividade de PPO, que essas são significativamente mais susceptíveis à infecção bacteriana, com crescimento bacteriano 55 vezes maior que em plantas controle.

Plantas de tomate infestadas por *T. absoluta* induziram a atividade de lipase, de lipoxigenase e a produção de inibidores de proteases, mas a atividade de PPO não foi alterada. Isso demonstra que o tomateiro responde a esse herbívoro especificamente pela via das lipoxigenases. Estudos apontam que as plantas possuem, mesmo que limitada, a capacidade de responder especificamente aos diferentes estresses provocados por herbívoros (STOUT, *et al.*, 1998). Plantas de milho produzem diferentes misturas de voláteis em resposta as injúrias de diferentes herbívoros, bem como quando lesionada pelo mesmo herbívoro em diferentes estágios do desenvolvimento (TAKABAYASHI & DICKE 1996).

Plantas infestadas por *T. evansi* e *T. absoluta*, simultaneamente, apresentaram menor indução do que plantas apenas com *T. evansi*, possivelmente devido à interação negativa entre as vias de defesa sendo ativadas ao mesmo tempo. Stout *et al.* (1998) relataram que o tomateiro, quando injuriado por um herbívoro mastigador, induz PPO e inibidor, mas não peroxidase. Por outro lado, quando atacado por um inseto sugador, induz peroxidase e LOX.

Quando diferentes herbívoros atacaram simultaneamente o tomateiro, a planta respondeu com a indução da PPO. Nesse caso, os níveis da atividade foram semelhantes entre todas as combinações de herbívoros avaliadas. Os efeitos da maior atividade observada para *T. evansi* ou a não indução de *T. absoluta* desaparecem quando os herbívoros estão juntos na planta. Alguns trabalhos investigaram o efeito negativo que pode ocorrer no mecanismo de defesa da planta, quando herbívoros e patógenos infestam simultaneamente a planta, e verificaram que um tipo de defesa pode ser ativado em detrimento a outro (BOSTOCK *et al.*, 2001; KUNKEL & BROOKS, 2002; SPOEL *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2004; KOORNNEEF & PIETERSE, 2008). Outros avaliaram a resposta da planta quando esta é injuriada por herbívoros com diferentes mecanismos de alimentação (STOUT *et al.*, 1998; GOSSSET *et al.*, 2009). Porém, o mecanismo de defesa da planta foi avaliado para cada indivíduo isoladamente. No presente trabalho, avaliamos como as principais enzimas envolvidas na defesa da planta são ativadas quando atacadas por herbívoros com diferentes mecanismos de alimentação, simultaneamente.

3.3. Enzimas digestivas dos herbívoros

A atividade de proteases totais dos herbívoros é apresentada na Figura 6. A presença de bactérias em *T. evansi*, ou a presença de *T. urticae* na mesma planta que o *T. evansi* não afeta a atividade das proteases totais desse ácaro. Entretanto, quando *T. absoluta* estava junto com *T. evansi* na planta, este apresentou cerca de cinco vezes mais atividade que os demais tratamentos.

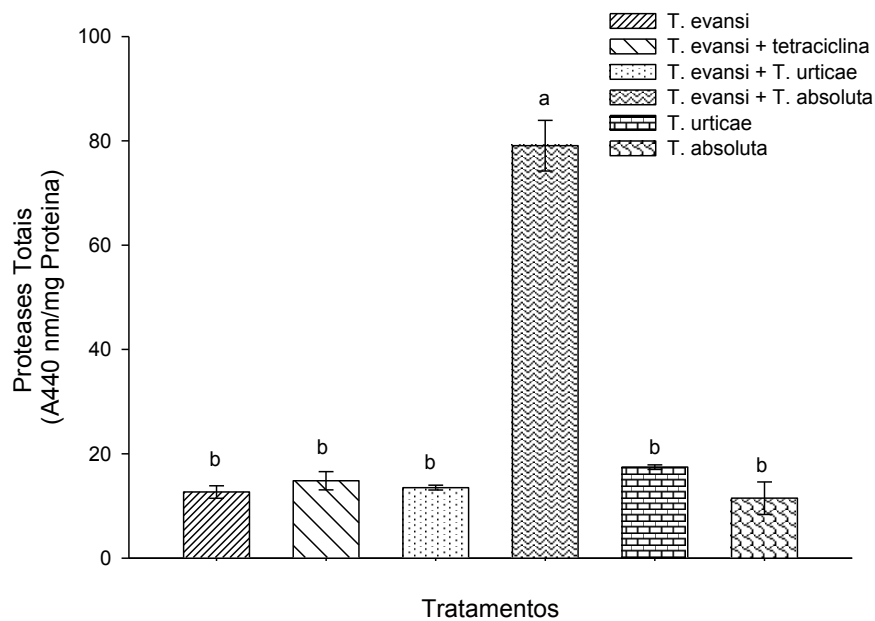


Figura 6: Atividade de proteases totais em *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* tratados com tetraciclina, em *T. evansi* associado com *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* com *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), em *T. urticae* e em *T. absoluta*, todos no tomateiro. Média seguida pela mesma letra não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

A atividade amidásica de tripsina-like foi semelhante em *T. evansi* com e sem bactérias, assim como em *T. evansi* junto com *T. absoluta* na mesma planta (Figura 7). Porém, quando *T. evansi* estava na companhia de *T. urticae*, essa atividade foi semelhante à *T. evansi* sem bactérias. Não houve diferença entre *T. urticae* e *T. absoluta* quando cada espécie estava na planta.

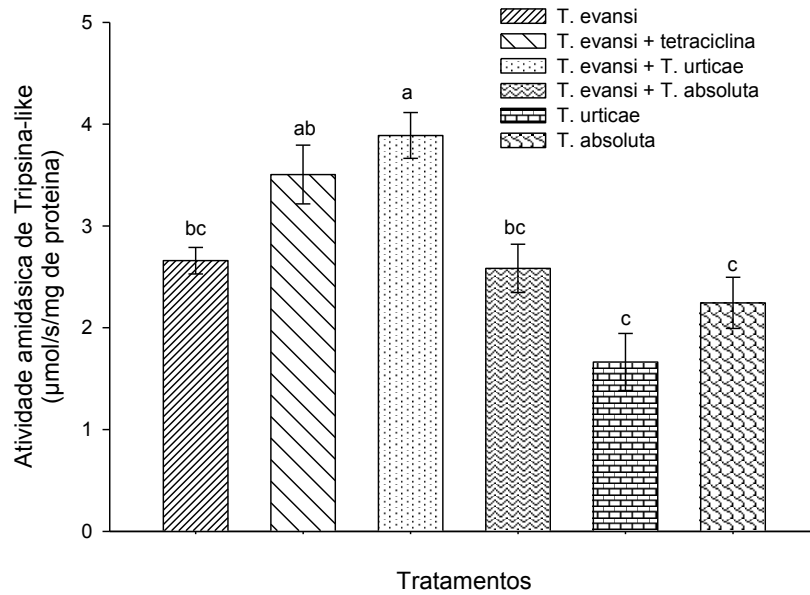


Figura 7. Atividade amidásica de tripsina-like em *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* tratados com tetraciclina, em *T. evansi* associado com *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* com *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), em *T. urticae* e em *T. absoluta*, todos no tomateiro. Média seguida pela mesma letra, não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

A atividade esterásica de tripsina-like em *T. evansi* sem bactérias, semelhante a *T. absoluta*, apresentou aproximadamente três vezes maior que *T. evansi* com bactérias. A presença de *T. urticae* não interferiu nessa atividade de *T. evansi* (Figura 8).

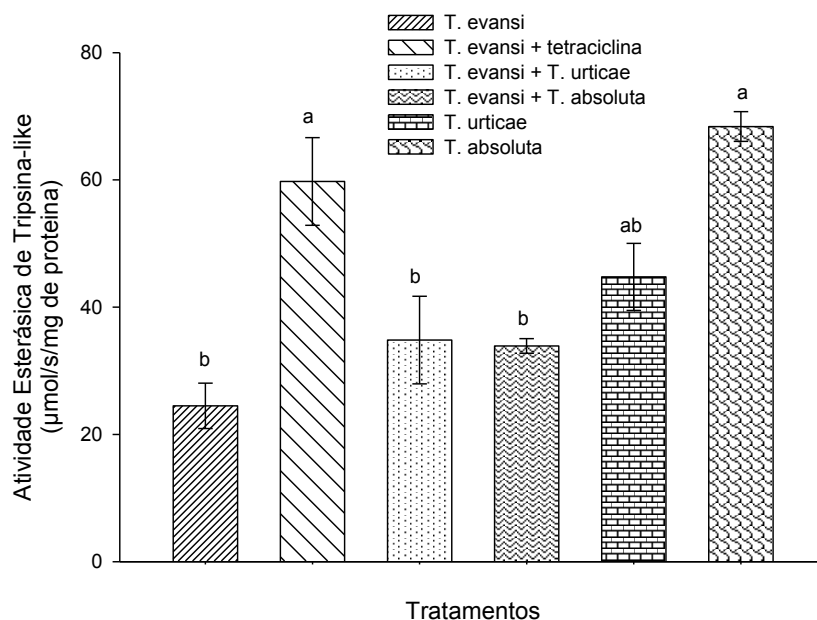


Figura 8. Atividade esterásica de tripsina-like em *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* tratados com tetraciclina, em *T. evansi* associado com *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* com *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), em *T. urticae* e em *T. absoluta*, todos no tomateiro. Média seguida pela mesma letra, não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

A atividade da quimiotripsina-like de *T. evansi* junto com *T. absoluta* na mesma planta foi estatisticamente igual à atividade da *T. absoluta* sozinha e de *T. evansi*. A ausência de bactérias reduziu aproximadamente 50% da atividade de quimiotripsina-Like em *T. evansi* (Figura 9).

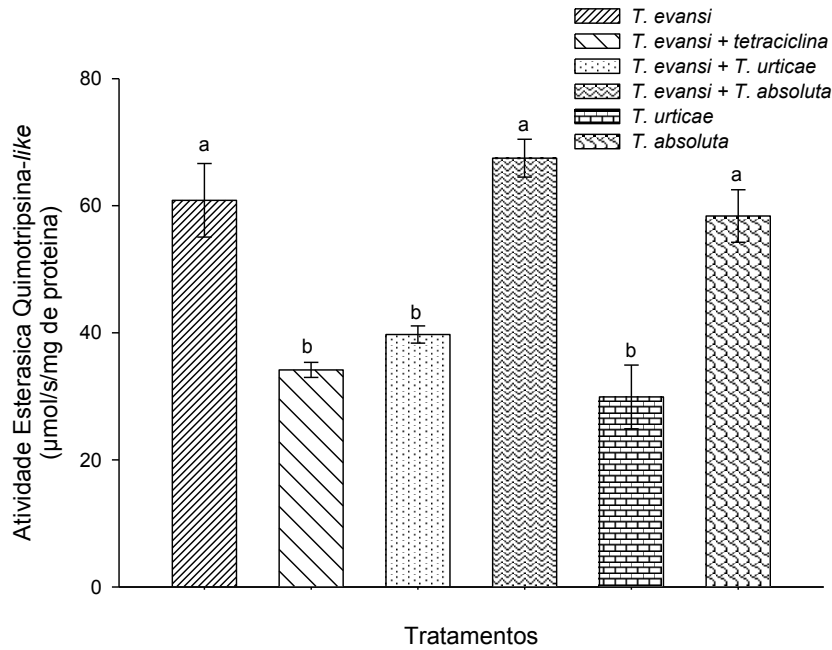


Figura 9: Atividade de quimiotripsina-like em *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* tratados com tetraciclina, em *T. evansi* associado com *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* com *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), em *T. urticae* e em *T. absoluta*, todos no tomateiro. Média seguida pela mesma letra, na coluna, não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Para atividade de cisteíno protease, não houve diferença entre a maioria dos tratamentos, com exceção para *T. urticae*, que apresentou valores inferiores quando comparado a outros herbívoros ou combinações de herbívoros (Figura 10).

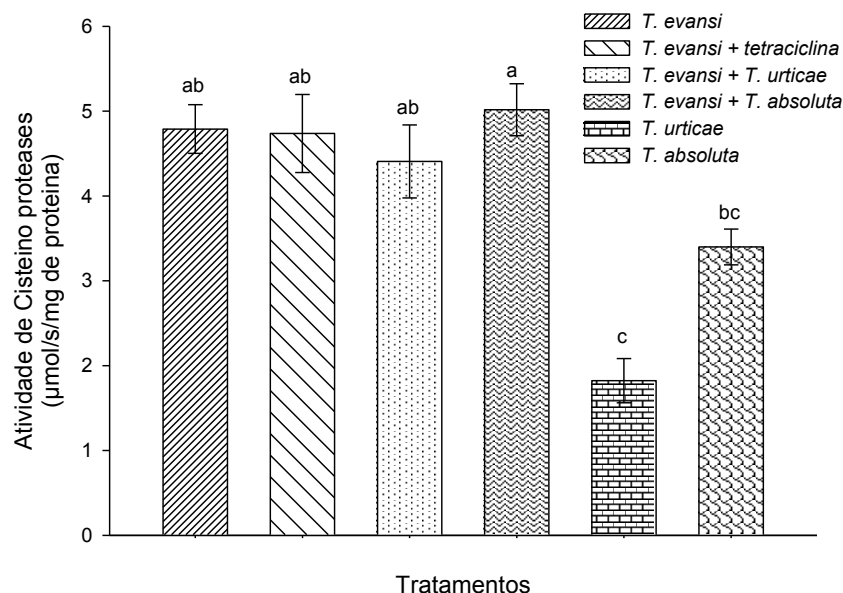


Figura 10. Atividade de cisteíno protease em *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* tratados com tetraciclina, em *T. evansi* associado com *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), em *T. evansi* com *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), em *T. urticae* e em *T. absoluta*, todos no tomateiro. Média seguida pela mesma letra não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

A atividade de proteases na maioria dos tratamentos foi semelhante (Figura 6), exceto quando *T. evansi* se alimentou da mesma planta que *T. absoluta*, apresentando, o ácaro sozinho, atividade superior de proteases totais. O mesmo comportamento foi observado para atividade amidásica de tripsina-like (Figura 7), sendo os valores para *T. evansi* junto com *T. urticae* superiores à *T. evansi* sozinho na planta. Como mostrado anteriormente, *T. absoluta* e *T. urticae* induziram a produção de IP, assim, essa maior atividade de protease e de tripsina-like pode ser uma tentativa do ácaro em contornar a defesa produzida pela planta. Pilon *et al.* (2006), trabalhando com a lagarta-da-soja, observaram uma maior atividade de proteases quando a lagarta era alimentada em dieta com altas concentrações de IP, demonstrando assim uma adaptação deste inseto a esta dieta.

Assim como em *T. evansi* tratados com tetraciclina, *T. absoluta* apresentou alta atividade esterásica. Para *T. absoluta*, esse resultado é semelhante ao observado para outras lepidópteras. Oliveira *et al.* (2005) e Xavier *et al.* (2005) mostraram que tripsina-*like* apresentam maior eficiência catalítica para o substrato esterásico, o qual foi relacionado ao mecanismo de ação da enzima. Aqui, indicamos que a atividade esterásica foi importante para essa praga da cultura do tomateiro.

Com a ausência de bactérias, a atividade de quimotripsina-*like* foi reduzida em quase 50%. Esse fato sugere que as bactérias podem sintetizar essa enzima e auxiliar o ácaro no seu processo digestivo. Visôttto *et al.* (2009) verificaram que a eliminação de bactérias endossimbiontes em *A. gemmatalis* reduz a produção de proteases e lipases extracelulares, prejudicando assim o processo digestivo do inseto. Ao contrário do encontrado para outra lepidóptera (VISÔTTO *et al.*, 2009), *T. absoluta* apresentou alta atividade de quimotripsina-*like*. Este resultado, assim como o obtido em *T. evansi* e em *T. urticae*, não corrobora com alguns autores, que relataram que esta atividade seja baixa nos insetos (CARRILHO *et al.*, 2011; SANTAMARÍA *et al.*, 2015). Isso sugere que as enzimas predominantes nos insetos devem estar relacionadas, principalmente, com o substrato alimentar.

Embora *T. urticae* seja a espécie que apresentou menor atividade para cisteíno protease, essa enzima tem sido recentemente estudada nesse ácaro. Santamaría *et al.*, (2015) apontaram que cisteíno proteases são importantes para o processo digestivo de *T. urticae* e que este ácaro tem capacidade de aumentar a expressão gênica para essa enzima em função da ingestão de inibidores. Além disso, Carrilho *et al.* (2011) mostraram que *T. urticae* tem o desenvolvimento e a reprodução afetadas quando se alimentam em plantas de milho que expressam inibidores de cisteíno proteases.

Um dos métodos de controle de doenças e pragas é a indução de resistência em plantas (MENEGHETTI *et al.*, 2010). Para esse propósito, torna-se de suma importância o conhecimento das principais enzimas digestivas dos herbívoros. Aqui mostramos as principais enzimas envolvidas no processo digestivo de *T. evansi*, *T. urticae* e *T. absoluta*.

3.4. Comportamento reprodutivo

T. evansi obteve oviposição significativamente maior em plantas previamente injuriadas por ácaros da mesma espécie, embora seja igual a oviposição em plantas sem e com injurias produzidas por *T. evansi* sem bactérias (Figura 11). A oviposição diminui quando *T. evansi* se alimenta em plantas previamente injuriadas por *T. urticae* ou por mais de um herbívoro. Sarmento *et al.* (2011) também relataram diminuição da taxa de oviposição de *T. evansi* em tomateiro previamente injuriados por *T. urticae*. Como evidenciado no presente trabalho (Figura 4) e por Kant *et al.* (2004), *T. urticae* induz IP e sabe-se que esses compostos são responsáveis pela redução na oviposição (SARMENTO *et al.*, 2011).

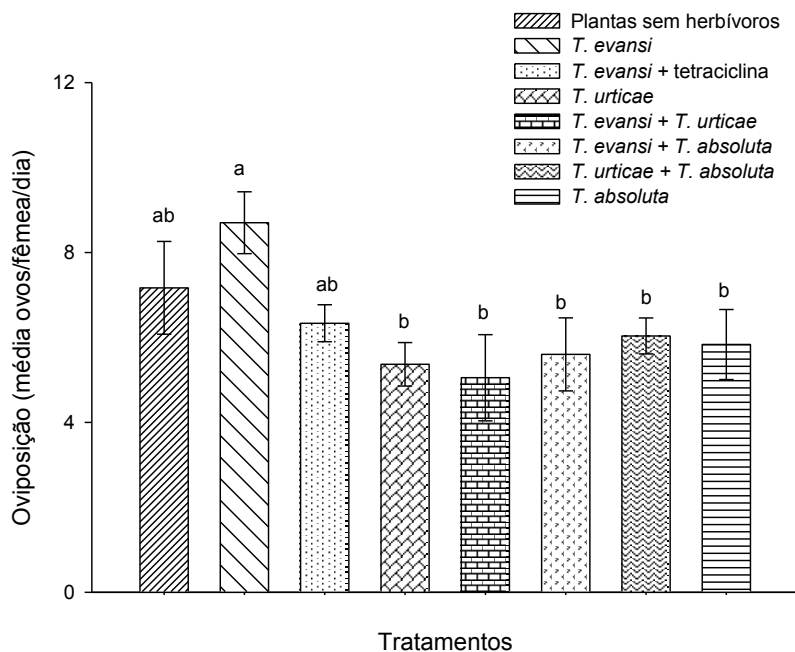


Figura 11. Média \pm erro padrão de oviposição de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, 1960 (Acari: Tetranychidae) em plantas sem injurias prévias e infestadas com: *T. evansi*, *T. evansi* tratados com tetraciclina, *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), *T. evansi* + *T. urticae*, *T. evansi* + *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), *T. urticae* + *T. absoluta* e *T. absoluta*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não difere pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Alguns trabalhos mencionam que herbívoros podem interferir no mecanismo de defesa da planta. Bede *et al.* (2006) mostraram que compostos na saliva da lagarta *Spodeptera exigua* reduzem a expressão de genes relacionados a defesa de plantas. Zarate *et al.* (2007) observaram que as injúrias de herbívoros podem ativar determinadas vias de resposta da planta em detrimento a outras defesas. Entretanto, em nenhum desses trabalhos foram avaliados parâmetros biológicos dos herbívoros, sendo que esse é um importante fator para avaliar a eficiência da defesa da planta. As maiores taxas de oviposição de *T. evansi* coincidiu com os tratamentos com menores níveis de IP, corroborando com estudos que verificaram que a presença desses compostos interferem negativamente neste comportamento dos insetos. Plantas injúriadas por *T. evansi* apresentaram alta atividade de PPO (Figura 5), o que sugere que este ácaro seja insensível aos compostos de defesa produzida por essa enzima.

Analisando as enzimas envolvidas na resposta de defesa da planta, *T. evansi* tratado com tetraciclina foi capaz de elevar o nível de indução da defesa da planta, quando comparado com *T. evansi* (Figura 2 e 3). Isso mostra que as bactérias podem auxiliar este ácaro a burlar a resistência da planta. Entretanto, esta possível capacidade de superar a defesa da planta não influenciou o comportamento de oviposição, pois a média da quantidade de ovos de *T. evansi* tratado com tetraciclina não diferiu da quantidade colocada por *T. evansi* e *T. urticae* (Figura 11). Isso evidencia que, em parte, a defesa da planta conseguiu prejudicar a reprodução do herbívoro.

A oviposição de *T. evansi* foi reduzida quando este alimentou-se em plantas previamente injúriada por *T. evansi* + *T. urticae* e *T. evansi* + *T. absoluta* (Figura 11). Foi mostrado que nessas circunstâncias a planta responde à herbivoria aumentando seus compostos de defesa (Figura 2, 3 e 4) e isso resultou em uma menor reprodução do ácaro. Esse é o primeiro trabalho a mostrar os níveis de atividade das enzimas envolvidas no mecanismo de defesa do tomateiro sob as injúrias de *T. absoluta* pela via LOX. Sendo observado, também, que esses níveis interferem negativamente na reprodução de *T. evansi*.

4. CONCLUSÕES

T. evansi tratados com tetraciclina induz parcialmente a defesa do tomateiro.

T. evansi não induz a defesa do tomateiro, porém esta defesa é induzida quando este acaro causa injuria em planta na presença dos outros herbívoros. Plantas injuriadas por *T. urticae*, por *T. absoluta* e a associação destas pragas também induzem a defesa do tomateiro.

Pela primeira vez é demonstrado os níveis de atividade das enzimas envolvidas no mecanismo de defesa do tomateiro sob as injurias de *T. absoluta* pela via LOX.

Todas as enzimas digestivas avaliadas apresentam atividades para todos os herbívoros estudados.

A defesa do tomateiro influencia negativamente a oviposição de *T. evansi* quando este utiliza plantas previamente injuriadas por outros herbívoros, sozinhos ou simultaneamente, e por indivíduos de sua espécie tratados com tetraciclina.

5. Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G.N. Plant pathology. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymol*, v.71, p.441-451, 1981.
- BALLARD, J. W. O. & MELVIN, R. G. Tetracycline treatment influences mitochondrial metabolism and mtDNA density two generations after treatment in *Drosophila*. *Insect Molecular Biology* 16(6), 799–802 (2007)
- BARI R, JONES JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 473–488
- BARR, K. L; HEARNE, L.B; BRIESACHER, S; CLARK, T.L; DAVIS, G.E. Microbial Symbionts in Insects Influence Down-Regulation of Defense Genes in Maize. *PLoS ONE* 5(6): e11339. doi:10.1371/journal.pone.0011339 2010.
- BATISTA R B, OLIVEIRA M G A, PIRES C V, PIOVESAN N D, REZENDE S T, MOREIRA M A Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesqu Agropecu Bras.*, v.37, p.1517-1524, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- BEDE, J.C., MUSSER, R.O., FELTON, G.W. & KORTH, K.L. Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.*, 60, 519–531. (2006).
- BHONWONG A, STOUT MJ, ATTAJARUSIT J, TANTASAWAT P. Defensive role of tomato Polyphenol oxidase against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and Beet armyworm (*Spodoptera exigua*). *J Chem Ecol*; 35:28-38; PMID:19050959; DOI:10.1007/s10886-008-9571-7 2009.
- BOGORNI, P. C.; PANSIERA, V. C.; VENDRAMIM, J. D.; RIBEIRO, L. D. P.; GONÇALVES-GERVÁSIO, R. D. R.; BRITO, J. B.; Evaluation of the effect of pyrroligeneous acid from three arboreal species on *Tuta absoluta* (Meyrick) Lepidoptera: Gelechiidae). *Bioikos*, Campinas, 22(2):109-115, 2008
- BOSTOCK, R. M; KARBAN, R; THALER, J. S; WEYMAN, P. D; GILCHRIST, D. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European Journal of Plant Pathology* 107: 103–111, 2001.
- BOUBOU. A; MIGEON.A; RODERICK.G.K; NAVAJAS.M. Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. *Biol Invasions* 13:81–92 (2011)
- CARRILLO, L., MARTINEZ, M., RAMESSAR, K., CAMBRA, I., CASTAÑERA, P., ORTEGO, F., DIAZ, I. Expression of a barley cystatin gene in maize enhances

- esistance against phytophagous mites by altering their cysteine-proteases. *Plant Cell Rep.* 30, 101–112: 2011.
- CHEN, G; HACKETT, R; WALKER, D; TAYLOR, A; ZHEFENG, L; GRIERSON, D. Identification of a Specific Isoform of Tomato Lipoxygenase (TomloxC) Involved in the Generation of Fatty Acid-Derived Flavor Compounds. *Plant Physiology*, September, Vol. 136, pp. 2641–2651 2005
- CHUNG, S. H.; ROSA, C.; SCULLY, .E. D.; PEIFFER, M.; TOOKER, J. F.; HOOVER, K.; LUTHE, D. S.; FELTON, G. W.; Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. 15728–15733 | *PNAS* | September 24, | vol. 110 | no. 39 2013
- CLARENCE A. RYAN. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477 112^121 (2000)
- COMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E.; Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.39, n.7, p.637-643, jul. 2004.
- DESNEUX, N., WAJNBERG, E., WYCKHUYS, K., BURGIO, G., ARPAIA, S., NARVÁEZ-VASQUEZ, C., GONZÁLEZ-CABRERA, J., CATALÁN RUESCAS, D., TABONE, E., FRANDON, J., PIZZOL, J., PONCET, C., CABELLO, T., URBANEJA, A., Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.* 83, 197e215. 2010.
- DE VOS, M., VAN OOSTEN, V.R., VAN POECKE, R.M.P., VAN PELT, J.A., POZO, M.J., MUELLER, M.J. *et al.* (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, 923–937.
- DOUGLAS AE: Microbial brokers of insect–plant interactions revisited. *J Chem Ecol*, 39:952-961. 2013.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278, 1961.
- FAOSTAT, Produção Agrícola. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 08 julho de 2015a.
- FAOSTAT, Ranque de produção agrícola. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 09 julho de 2015b.
- FLECHTMANN, C.H.W. Ácaros de importância agrícola. São Paulo, Ed. Nobel, 1972.
- FORTUNATO, F. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA, C. H. O.; GUEDES, R. N. C.; MOREIRA, M. A. M. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). *J. Pest. Sci.*, 80, 241–247 2007.

- GAO, Y.H; YU, Y; HU, X. G; CAO, Y. J; WU, J.Z. Imaging of jasmonic acid binding sites in tissue. *Analytical Biochemistry* 440 205–211 (2013).
- GOSSET, V. HARMEL; N. GOBEL C; FRANCIS, F; HAUBRUGE, E; WATHELET, J. P; JARDIN, P.D; FEUSSNER, I; FAUCONNIER, M.L. Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of Experimental Botany*, V. 60, N. 4, p. 1231–1240, 2009.
- HAJI, F. N. P.; PREZOTTI, L.; CARNEIRO, J. S.; ALENCAR, J. A. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro industrial. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, p. 477-494 2002.
- HONG J.K., H.W. CHOI, I.S. HWANG, D.S. KIM, N.H. KIM, D.S. CHOI, Y.J. KIM, B.K. HWANG, Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance, *Planta* 227 (2008) 539– 558.
- IBGE, Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp>>. Acesso em: 08 de julho de 2015.
- ISHIHURO, S; KAWAI-ODA, A; UEDA, J; NISHIDA, I; OKADA, K. The DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 13, 2191–2209, www.plantcell.org © American Society of Plant Biologists 2001
- KOORNNEEF, A & PIETERSE, A. M. J. Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology*, March 2008, Vol. 146, pp. 839–844, www.plantphysiol.org _ 2008 American Society of Plant Biologists.
- JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43 (10), 885–895 1997.
- KAKADE M L, RACKIS J J, MCGHEE J E, PUSKI G) Determination of trypsin-inhibitor activity of soy products - collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem* , v.51, n.3, p.376-382, 1974.
- KAR M. & MISHRA D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315–319 1976.
- KANT, M.R., AMENT, K., SABELIS, M.W., HARING, M.A. & SCHUURINK, R.C. (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol.*, 135, 483–495.
- KHALID, HADDI; MADELEINE, B; PABLO, B; DINA, C; LINDA , M. F.; KEVIN G. CARMELO RAPISARDA A, MARTIN S. WILLIAMSON B, CHRIS BASS. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42 506 e 513 (2012).

- KIM K.J., J.H. LIM, M.J. KIM, T. KIM, H.M. CHUNG, K.H. PAEK, GDSL-lipase1 (CaGL1) contributes to wound stress resistance by modulation of CaPR-4 expression in hot pepper, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 (2008) 693– 698 2008.
- KOORNNEEF, A., AND PIETERSE, C.M.J. *Plant Physiol.* 146, 839–844 (2008).
- KUNKEL, B and BROOKS, D. M; Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 2002, 5:325–331
- LACERDA, C. A.; CIOCIOLA, A. L.; CARDOSO, M. D. G.; SANTOS, C. D. D. S.; VEIGA, R. D.; Avaliação da repelência de tomateiros ao ácaro rajado. *Pesq. agropec. pernamb.*, Recife, v. 18, n. 1, p. 14-20, jan./jun. 2013
- LI, C.Y., WILLIAMS, M.M., Loh, Y.T., Lee, G.I. & Howe, G.A. Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid- signaling pathway. *Plant Physiol.*, 130, 494–503. (2002).
- LUZ, J. M .Q.; SHINZATO, A. V.; SILVA, M. A. D. Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. *Bioscience Journal*, v. 23, p. 7-15, 2007.
- MAHANIL S, ATTAJARUSIT J, STOUT MJ, THIPYAPONG P. Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. *Plant Sci*; 174:456-66; DOI:10.1016/j.plantsci.2008.01.006 2008.
- MALUF, W.R.; BARBOSA, L. & SANTA CECILIA, L.C. 2-tridecanone mediated mechanism of resistance to the South American tomato pinworm *Scrobipalpuloides absoluta* Meyrick (Lepidoptera-Gelechiidae) in *Lycopersicon* spp. *Euphytica*, 93(2):189-94 (1997).
- MARUYAMA, W.I.; TOSCANO, L.C.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; BARBOSA, J.C. Resistência de genótipos de tomateiro ao ácaro rajado. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 480-484, 2002.
- MATHUR, V.; GANTA, S.; RAAIJMAKERS, C. E.; REDDY, A. S.; VET, L. E. M.; DAM, N. M.; Temporal dynamics of herbivore-induced responses in *Brassica juncea* and their effect on generalist and specialist herbivores. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1–11, 2011
- MCCLLOUD ES, BALDWIN IT Herbivory and caterpillar regurgitants amplify the wound-induced increases in jasmonic acid but not nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 203: 430–435 (1997).
- MENDONÇA, E. G; VISÔTTO, L. E; COSTA, N. C. S; RIBEIRO, F. R; OLIVEIRA, J. A; OLIVEIRA, M. G. A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818). *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35: 446-454, 2011.
- MENDONÇA, E. G; OLIVEIRA, M. G. A; VISOTTO, L. E; GUEDES, R. N. C. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Huber). *Journal of Pest Science*, 85: 117-123, 2012

- MENEGHETTI, R.C.; BALARDIN, R.S.; CORTE, G.D.; FAVERA, D.D.; DEBONA, D. Avaliação da ativação de defesa em soja contra *Phakopsora pachyrhizi* em condições controladas. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.34, n.4, p.823-829, 2010.
- MINAMI, K. O tomateiro. Campinas, Fundação Cargill, 2. ed., 1980, 310 p.
- OH I.S., A.R. PARK, M.S. BAE, S.J. KWON, Y.S. KIM, J.E. LEE, N.Y. KANG, S. LEE, H. CHEONG, O.K. Park, Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against alternaria brassicicola, *Plant Cell* 17 2832–2847 (2005).
- OLIVEIRA, M.G.A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.140B, p.369-380, 2005
- POSPIECH A, NEUMANN B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram positive bacteria. *Trends Genet*, v.11, p.217-218, 1995.
- PIETERSE CMJ, LEON-REYES A, VAN DER ENT S, VAN WEES SCM Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308–316 (2009)
- PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A. ; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 23-29, 2006.
- PRATISSOLI.D; CARVALHO.J.R.D; PASTOTI.P.L; BUENO. R.C.D.F; ZAGO.H.B. Incidência de mosca-minadora e insetos vetores em sistemas de manejo de pragas em tomateiro. *Revista Ciência Agrônômica*, v. 46, n. 3, p. 607-614, 2015.
- OHTA H, IDA S, MIKAMI B, MORITA Y Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol*, v.27, p.911-918, 1986
- REESON, A.F; JANKOVIC,T; KASPER, M.L; ROGERS,S. AUSTIN,A.D. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germânica*. *Insect Molecular Biology* 12(1), 85–91 (2003).
- SANTAMARÍA, M. E; CABRERA, J. G; MARTÍNEZ, M; GRBIC, V; CASTAÑERA, P; DÍAZ, I; ORTEGO, F. Digestive proteases in bodies and faeces of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Journal of Insect Physiology* 78 69–77 (2015).
- SAMBROOK.J, FRITSCH F, MANIATIS T Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- SARMENTO, R.A.; LEMOS,F.; BLEEKER, P.M.; SCHUURINK,R.C.; PALLINI,A.; OLIVEIRA,M.G.A; LIMA, E.R.; KANT, M.; SABELIS,M.W.; JANSSEN, A. A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters*, v.14, p. 229–236, 2011.
- SCALSCHI, L. B. V; G. Camañes, E. Fernandez-Crespo, L. Lapeña, C. González- Bosch, P. García-Aqustín, Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Mol. Plant Pathol.* 14 342–355 2013.

- SCHALLER A, FRASSON D Induction of wound response gene expression in tomato leaves by ionophores. *Planta* 212: 431–435 2001.
- SCHILMILLER, A. L; HOWE, G. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 2005, 8:369–377 SHAN, X; Y. Zhang, W. Peng, Z. Wang, D. Xie, Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*, *J. Exp. Bot.* 60 3849–3860 2009.
- SILVA, D.J.H.; FONTES, P.C.R.; MIZUBUTI, E.S.G.; PICANÇO, M.C. Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: 101 Culturas Manual de tecnologias agrícolas. pag.735-750. 2007
- SILVA, T.B.M; SILVA, W.M; CAMPOS, M.R; SILVA, J.E; RIBEIRO, L.M.S; SIQUEIRA, H. A. A. Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. *Crop Protection* 79 80e86 2015.
- SLADE, G AND MORRISON, N. DEVELOPING GM insects for sustainable pest control in agriculture and human health. *BMC Proceedings*, 8(Suppl 4):O43 2014.
- SPOEL, S. H; KOORNNEF, A; CLAESSES, S. M. C; KORZELELIUS, J. P; PELT, J. A. V; MUELLER, M. J; BUCHALA, A. J; MÉTRAUX, J. P; BROWN, R; KAZAN, K; LOON, L. C. V; DONG, X; PIETERSE, C. M. J. NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell*, Vol. 15, 760–770, March, www.plantcell.org © 2003 American Society of Plant Biologists 2003.
- STOUT, M. J; WORKMAN, K. V. BOSTOCK, R. M; DUFFEY, S.S. Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* 113:74 1 1998.
- TAKABAYASHI, J, TAKAHASHI, S., DICKE, M. AND POSTHUMUS, M.A. 1997. Effect of the developmental stage of the herbivore *Pseudaletia separata* on the production of herbivore-induced synomone by corn plants. *J. Chem. Ecol.* 21:273–287.
- TAYLOR, J. E; HATCHER, P. E; PAUL, N. D. Crosstalk between plant responses to pathogens and herbivores: a view from the outside in. *Crosstalk in Plant Signal Transduction Special Issue*, pp. 159±168, January *Journal of Experimental Botany*, V. 55, N. 395, 2004.
- THALER, J. S.; KARBAN R.; ULLMAN, D.E.; BOEGE, K.; BOSTOCK, R.M. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia*. V.131, p.227–235, 2002.
- THIPYAPONG, P; STOUT, M.J; ATTAJARUSIT, J. Functional Analysis of Polyphenol Oxidases by Antisense/Sense Technology. *Molecules*, 12, 1569-1595 2007.
- TOMARELLI, R.M., CHARNEY, J., HARDING, M.L. *Journal Laboratory Clinical Medical* 34: 428, 1949.
- VELZEN, E. V. & ETIENNE. RAMPAL.S. The importance of ecological costs for the evolution of plant defense against herbivory. *Journal of Theoretical Biology* 372 89–99 2015.

- VISÔTTO, L.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; RIBON, A.O.B.; GOOD-GOD, P.I.V. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Insect Physiology*, v.55, p.185–191, 2009.
- WALLING, L.L. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloemfeeding insects. *Plant Physiol.*, 146, 859–866 2008.
- WAR, A. R; PAULRAJ, M. G; AHMAD, T; BUCROO, A.A; HUSSAIN, B; IGNACIMUTHU, S; SHARMA, H.C. Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. *Plant Signaling & Behavior* 7:10, 1306-1320 2012.
- WU, J.Q. & BALDWIN, I.T. Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant Cell Environ.*, 32, 1161–1174 2009.
- XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Biochemistry*, 102: 147-153, 2005.
- ZARATE, S.I., KEMPEMA, L.A. & WALLING, L.L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol.*, 143, 866–875 2007.