

FABRICIO RAINHA RIBEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOSSIMBIONTES ASSOCIADAS AOS
ÁCAROS *Tetranychus evansi* E *Tetranychus urticae* (ACARI:
TETRANYCHIDAE) E SEUS EFEITOS NA MANIPULAÇÃO DO
MECANISMO DE DEFESA DO TOMATEIRO *Lycopersicon esculentum* MILL.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

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

T

R484i
2011

Ribeiro, Fabricio Rainha, 1982-

Identificação de bactérias endossimbiontes associadas aos ácaros *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e seus efeitos na manipulação do mecanismo de defesa do tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill. / Fabricio Rainha Ribeiro. – Viçosa, MG, 2011.

x, 56f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 47-56

1. *Tetranychus evansi*.
2. *Tetranychus urticae*.
3. Simbiose.
4. Pragas agrícolas. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 595.42

FABRICIO RAINHA RIBEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOSSIMBIONTES ASSOCIADAS AOS
ÁCAROS *Tetranychus evansi* E *Tetranychus urticae* (ACARI:
TETRANYCHIDAE) E SEUS EFEITOS NA MANIPULAÇÃO DO
MECANISMO DE DEFESA DO TOMATEIRO *Lycopersicon esculentum* MILL.**

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

APROVADA: 21 de julho de 2011

Prof. Joel Antonio de Oliveira
(Co-orientador)

Dr. Anderson Martins Pilon

Prof. Marisa Alves Nogueira Diaz

Dr. João Alfredo Marinho Ferreira

Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

A Deus.

A meus familiares.

A minha mãe Aderli Rainha Ribeiro.

A meu pai Manoel Vicente Ribeiro.

A meus irmãos Flávio, Fabio e Ediane.

A minha namorada Fernanda Cristina Silva.

A meus sobrinhos Gustavo e Gabriel.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCTIPP) pela concessão da bolsa de estudo.

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

À minha querida mãe, pelas orações, carinho, amor e preocupação. Não imagino a vida sem a senhora. A meu irmão Flávio, por todo apoio desde a época de cursinho, sem você não teria conseguido.

A meu pai Manoel Vicente Ribeiro que mesmo longe serve de exemplo.

A meu irmão Fabio e a minha irmã Ediane, pelo apoio e presença quando preciso. A meus sobrinhos Gustavo e Gabriel por tornar a vida mais alegre.

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

A meus demais familiares pelo apoio e torcida ao longo desses anos. Em particular a minha avó pelas orações e carinho, meus tios Glicério e Rosângela por sempre estarem presentes.

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

Ao professor Angelo Pallini Filho pela co-orientação e sugestões nos trabalhos.

Ao professor Joel Antônio de Oliveira pela co-orientação.

A professora Liliane Evangelista Visôto pela co-orientação, disponibilidade e sugestões nos trabalhos.

Ao pesquisador Arne Janssen pela colaboração e sugestões imprescindíveis na realização dos experimentos.

A Dr^a Camila Rocha da Silva que desde a primeira extração de DNA até a última análise enzimática contribuiu com orientações e conselhos. Agradeço muito sua disponibilidade e paciência.

Ao Dr. Anderson Martins Pilon pelas orientações e conselhos nos experimentos.

Ao Dr. Adalberto Sukumula Chiquete pela ajuda e disponibilidade para realização da eletroforese em gel com gradiente desnaturante.

Aos alunos de iniciação científica Elias e Ana Maria pelo compromisso, dedicação e responsabilidade demonstrada ao executarem os experimentos.

A Franciny e ao Eduardo pela ajuda e esclarecimento na Biologia Molecular, aos demais amigos do laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos: Mayara, Adriana, Eduardo Goes, Patricia, Solange, Franklin, Lídia, Ritinha, Fausto e Stephane pela convivência harmoniosa e divertida no dia a dia.

Aos amigos do laboratório de Acarologia: Felipe, Juliana, Elisa, Cleide e Livia pela receptividade no laboratório e sugestões na realização dos experimentos.

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.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: Albumina do soro bovino

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

DGGE: gel de eletroforese em gradiente desnaturante

dNTP: desoxirribonucleotídeo

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

L- BApNA: N-benzoil-L-argininil *p*-nitroanilida

MM: massa molecular

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

PCR: reação em cadeia da polimerase

rRNA: ácido ribonucléico ribossomal

SDS: dodecil sulfato de sódio

Tampão TBE: Tris-Borato-EDTA

Tampão TE: Tris-EDTA

Tampão SET: salina-EDTA-Tris

Tris: Tris (hidroximetil) amino metano

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo Geral	3
1.2. Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. TOMATE.....	4
2.2. ÁCARO <i>Tetranychus</i>	5
2.3. DEFESA DE PLANTAS.....	7
2.4. INTERAÇÕES ENTRE ARTROPODES E ENDOSSIMBIOTES	10
2.4.1. Bactérias associadas a artrópodes	11
2.4.2 Identificação de Bactérias Endossimbiontes	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	15
3.2. CULTIVO DAS PLANTAS DE TOMATE.....	15
3.3. CRIAÇÃO DE <i>Tetranychus evansi</i>	15
3.3.1. Obtenção de <i>T. evansi</i> sem endossimbiontes	16
3.3.2. Obtenção de <i>T. evansi</i> com endossimbiontes	17
3.4. EXPERIMENTAÇÃO.....	17
3.5. ANÁLISES MOLECULARES.....	18
3.5.1. Extração do DNA.....	18
3.5.2. Amplificação DNA por PCR (polymerase chain reaction).....	19
3.5.3. Amplificação DNA por PCR (polymerase chain reaction) para DGGE.....	20
3.5.4. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	20
3.5.5. Sequenciamento e Comparação de Seqüências	21
3.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	21
3.6.1. Obtenção do estrato foliar.....	21
3.6.2. Determinação dos inibidores de tripsina	22
3.6.3. Determinação da atividade de lipoxigenase.....	23
3.7. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	24
3.7.1. Avaliação do desenvolvimento.....	24
3.7.2. Determinação da taxa de oviposição.....	25

4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	27
4.1. IDENTIFICAÇÃO DAS DIVERSIDADES MICROBIANAS.....	27
4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	32
4.3. AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA	38
5. CONCLUSÕES.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	47

RESUMO

RIBEIRO, Fabricio Rainha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Identificação de bactérias endossimbiontes associadas aos ácaros *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) e seus efeitos na manipulação do mecanismo de defesa do tomateiro *Lycopersicon esculentum* MILL.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Orientadores: Liliane Evangelista Visôto, Angelo Pallini Filho e Joel Antônio de Oliveira.

A cultura do tomateiro é uma das mais importantes hortaliças produzidas no Brasil, apresentando destacada influência na economia e geração de empregos. Em países da América do Sul, Europa e África, o ácaro *Tetranychus evansi* é considerado uma importante praga dessa cultura. Recentes estudos demonstraram que este ácaro manipula a defesa da planta reduzindo seus produtos de defesa. O objetivo deste trabalho foi investigar se bactérias endossimbiontes associadas ao ácaro *T. evansi* tem função na manipulação de defesa de *T. evansi* no tomateiro. Para isso foi utilizado também o ácaro *T. urticae* como padrão, que é conhecido por induzir resposta de defesa de planta. Foi realizada a extração de DNA bacteriano de *T. evansi* e *T. urticae* com posterior corrida eletroforética em gel com gradiente desnaturante para comparar a diversidade bacteriana entre estas espécies, foi observado que *T. evansi* possui uma diversidade bacteriana superior ao *T. urticae*. Para avaliar se as bactérias associadas ao *T. evansi* proporcionam alguma vantagem ao seu desenvolvimento e reprodução, bem como na contribuição de suprimir as defesas das plantas, foram obtidos ácaros sem endossimbiontes através do tratamento destes, com solução de tetraciclina. Ácaros tratados com tetraciclina não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) no desenvolvimento, oviposição e mortalidade. Entretanto, as plantas atacadas por ácaros tratados apresentaram maior atividade de lipoxigenase e maior inibição de tripsina ($p < 0,05$), comparado com plantas limpas e plantas atacadas por ácaros não tratados com tetraciclina. Estes resultados evidenciam que plantas atacadas por *T. evansi* sem endossimbiontes bacterianos ativaram seu mecanismo de defesa. Sendo assim, estes resultados sugerem que as bactérias podem auxiliar os ácaros na manipulação da defesa da planta, deixando-as mais susceptíveis ao ataque e à alimentação.

ABSTRACT

RIBEIRO, Fabricio Rainha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Identification of endosymbiotic bacteria associated to the mites *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and their effects on manipulation of the defense mechanism of the tomato plant *Lycopersicon esculentum* MILL.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisers: Liliane Evangelista Visôto, Angelo Pallini Filho and Joel Antônio de Oliveira.

The tomato is one of the most important vegetables produced in Brazil, playing an important role in the economy and creating jobs. In countries of South America, Europe and Africa, the mite *Tetranychus evansi* is considered an important pest of this crop. Recent studies have shown that this mite manipulates the defense of the plant reducing its defensive products. The objective of this study was to investigate whether endosymbiotic bacteria associated with the mite *T. evansi* play a role in manipulating the defenses of the tomato plant. The mite *T. urticae* was used as a standard, which is known to induce plant defense response. Bacterial DNA was extracted from *T. evansi* and *T. urticae* with subsequent denaturing gradient gel electrophoresis to compare bacterial diversity between these species, observing that *T. evansi* has a higher bacterial diversity than *T. urticae*. To determine if bacteria associated with *T. evansi* provide some advantage for its development and reproduction, as well as contributing to suppress the defenses of plants, mites were obtained without endosymbionts by treating them with a tetracycline solution. Mites treated with tetracycline showed no significant differences ($p > 0.05$) in development, oviposition and mortality. However, plants attacked by treated mites showed higher lipoxygenase activity and increased inhibition of trypsin ($p < 0.05$) compared to clean plants and plants attacked by mites not treated with tetracycline. These results show that plants attacked by *T. evansi* without endosymbiotic bacteria activated their defense mechanism. Thus, these results suggest that bacteria may assist the mites in manipulating plant defense, making them more susceptible to attack.

1. INTRODUÇÃO

O tomate é uma das hortaliças mais produzidas no mundo, sendo uma importante fonte de substâncias benéficas à saúde, além de ser uma cultura economicamente importante para pequenos e médios agricultores. A cadeia produtiva do tomate destina-se a indústria de processamento (tomate rasteiro) e ao mercado *in natura* (tomate de mesa, também denominado estaqueado ou envarado). Entre os artrópodes pragas desta cultura destacam-se os ácaros do gênero *Tetranychus*, que apesar de serem pragas de importância secundária, em condições de alta infestação, podem provocar danos diretos às plantas e ocasionar o secamento das folhas, além de indução à maturação precoce (FLECHTMANN, 1985).

Além de serem atacadas por artrópodes as plantas estão sujeitas a diversos estresses tais como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar e ataque de patógenos. Durante a evolução, as plantas têm desenvolvido diversas estratégias de defesas contra herbívoros. Essas defesas são classificadas em diretas quando exercem impacto negativo imediato sobre os herbívoros, ou defesas indiretas que afetam indiretamente os herbívoros, como por exemplo, através da atração de predadores e parasitóides (PRICE et al, 1980). No instante em que um herbívoro danifica a folha, desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos que precedem alterações na expressão de genes de defesas de plantas que elevam os níveis de compostos como inibidores de proteases (MAFFEI et al, 2007). É postulado que inibidores de proteases têm função de proteger plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades proteolíticas de proteases presentes no intestino dos insetos (HILDER et al., 1987; RYAN, 1990). Quando ocorrem ferimentos em folhas, verifica-se um grande aumento na síntese de inibidores de proteases no local do ferimento (resposta local), e também por toda a planta (resposta sistêmica) (FARMER e 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 a via de sinalização que leva a indução destes compostos pode ser vulnerável à patógenos (NOMURA et al., 2006).

Contudo, os insetos também podem desenvolver mecanismos de adaptação aos compostos de defesa das plantas, como relatado para o aumento da síntese de enzimas proteolíticas no intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (PILON et al., 2009). Recentemente foi demonstrado que o herbívoro generalista *Tetranychus evansi* tem a capacidade de interferir no mecanismo de defesa de plantas de tomate manipulando o sistema de defesa fazendo estas apresentarem menores quantidades de inibidores de proteases que plantas limpas, favorecendo o desenvolvimento e reprodução deste herbívoro, uma vez que se torna uma fonte alimentar menos prejudicial (SARMENTO et al, 2011). Uma estratégia que pode estar sendo utilizada por *T. evansi* para superar as defesas da planta é a associação com micro-organismos. O aparelho digestivo de insetos abriga uma ampla diversidade de micro-organismos, devido a sua contínua exposição ao ambiente externo. Uma vez no intestino, os micro-organismos podem crescer, ser lisados por enzimas ou excretados (WALKER et al., 1999). Sabe-se que a contribuição nutricional da microbiota intestinal pode ocorrer de várias formas, melhorando a eficiência da digestão, maior aquisição de enzimas digestivas e aumentando abastecimento de vitaminas (DILLON & DILLON, 2004).

Neste contexto, o presente trabalho propôs determinar a diversidade de bactérias endossimbiontes associadas ao *T. evansi* que manipula a defesa de plantas de tomate e *T. urticae* que não tem essa capacidade. Também foi investigado o impacto que bactérias endossimbiontes apresentam no desenvolvimento e reprodução de *T. evansi*, como na via de resposta de defesa da planta, quando estas foram atacadas por *T. evansi* com e sem bactérias endossimbiontes.

1.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar se bactérias endossimbiontes de *T.evansi* são responsáveis pela manipulação da defesa do tomateiro

1.2. Objetivos Específicos

- Identificar através de técnicas moleculares a diversidade bacteriana presentes em *T. evansi* e *T. urticae*.
- Obter ácaros *T. evansi* livres de bactérias endossimbiontes susceptíveis ao antibiótico tetraciclina.
- Avaliar respostas de defesa induzida da planta, lipoxigenase e inibidor de protease, ao ataque do ácaro da espécie *T. evansi* tratados e não tratados com o antibiótico tetraciclina.
- Avaliar o efeito de bactérias endossimbiontes no desenvolvimento e mortalidade em ácaros da espécie *T. evansi*.
- Avaliar o efeito de bactérias endossimbiontes na oviposição de ácaros da espécie *T. evansi*.

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. Tomate

A cultura do tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill, está amplamente difundida em todo o mundo. A produção é direcionada para processamento industrial e consumo *in natura*. Ela é considerada uma das espécies hortícolas mais importantes do mundo (COSME, 2011). O tomateiro é produzido em todos os estados do Brasil sendo comercializado anualmente 3,63 milhões de toneladas, das quais 73,51% estão concentradas nos estados de São Paulo, Minas gerais, Goiás e região Sul (AGRIANUAL, 2011). Além da importância econômica, essa hortaliça possui propriedades alimentícias substancialmente benéficas para a saúde humana. O fruto é fonte de ácido fólico, vitamina C, potássio e carotenóides, sendo o licopeno (antioxidante) o mais destacado (SILVA et al, 2007). Essa cultura é reconhecida como poderosa fonte geradora de emprego e renda em todos os segmentos de sua cadeia produtiva, como relatado por Silva & Giordano (2000). A infestação de pragas na cultura do tomateiro pode levar a redução da produtividade da cultura, devido aos danos diretos, que comprometem o potencial produtivo da planta, em função de também serem, em alguns casos, transmissores de viroses (VILLAS BÔAS et al., 1997).

O tomateiro é atacado desde a germinação até a colheita por um grande número de patógenos e artrópodes-pragas, como observado em lavouras plantadas em larga escala. Os estresses bióticos são tão intensos que o tomateiro tem o status de hortaliça líder no emprego de agrotóxicos (VILLAS BÔAS et al., 2007). Aragão et al,(2000) observaram que inúmeras aplicações de produtos de amplo espectro não só elevam o custo da produção da lavoura, como também colabora para o ressurgimento de determinadas pragas e o aparecimento de novas até então desconhecidas. Portanto devemos procurar métodos mais econômicos e menos danosos de controle, sendo a exploração dos mecanismos fisiológicos de defesa da planta uma alternativa potencial. Entre os artrópodes-pragas que atacam a cultura do tomate, os ácaros, principalmente em condições de seca e elevadas temperaturas, são considerados um sério problema (ARAGÃO et al., 2002). Os ácaros fitófagos incluem espécies que se alimentam da parte aérea e subterrânea de plantas (MENEZEZ et al, 2010). Entre os eriofídeos, tem-se o ácaro-cinza-do-tomateiro [*Aceria lycopersici* (Wolffenstein)], o ácaro-do-

bronzeamento ou microácaro-do-tomateiro [*Aculops lycopersici* (Masse)]. Dentre os ácaros da família Tarsonemidae, destaca-se o ácaro branco [*Polyphagotarsonemus latus* (Banks)] e nos tetraniquídeos as principais espécies relatadas são o ácaro vermelho (*Tetranychus evansi* Baker & Pritchard) e o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Kock) (MORAES e FLECHTMANN, 2008).

2.2. Ácaros *Tetranychus*

Ácaros do gênero *Tetranychus* exibem como comportamento característico a produção de teia, fato que dificulta a ação de inimigos naturais, diminui a eficiência de agrotóxicos e oferece proteção a ele em caso de condições climáticas adversas (GERSON, 1985). Os ovos são esbranquiçados e colocados na parte inferior das folhas, eclodindo de quatro a sete dias após a postura. As larvas são incolores e translúcidas com tamanhos semelhantes ao de um ovo da mesma espécie. Com o início da alimentação, o ácaro apresenta um gradativo escurecimento. Na fase adulta, *Tetranychus* apresentam forma oval e coloração alaranjada. Os machos apresentam menores tamanhos com opistossoma afilado e as fêmeas são maiores e opistossoma arredondado (MORAES e FLECHTMANN, 2008). Os ácaros são pequenos artrópodes que apresentam quatro pares de patas quando adultos e não possuem antenas. Geralmente apresentam reduzida segmentação como principal característica. Este fato levou diversos taxonomistas e sistematas a considerá-los como artrópodes altamente especializados (FLECHTMANN, 1985).

Tetranychus evansi Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) apresenta melhor desenvolvimento em temperaturas elevadas e em ambiente seco (temperatura mínima de 10°C, temperatura ótima 34°C). Quando submetidos a uma temperatura de 36°C o tempo necessário para seu desenvolvimento é de aproximadamente de 6,3 dias, já à 25°C, o ciclo de vida é completado em 13,5 dias (EPPO, 2004; MORAES e FLECHTMANN, 2008). Bonato (1999), destaca que o Brasil apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento de *T. evansi*, pois possui uma temperatura ótima para o crescimento populacional.

O ácaro *T. evansi*, popularmente conhecido com ácaro vermelho (Figura 1) foi originalmente descrito de espécimes coletados em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) nas ilhas Maurícias (BAKER & PRITCHARD, 1960) e, desde então,

tem sido relatado sua ocorrência em várias partes do mundo. Em 1979, *T. evansi* foi encontrado em plantas de tabaco no Zimbábue, África (BLAIR, 1983; SAUNYAMA & KNAPP, 2003; MEYER, 1987). Posteriormente, sua presença foi relatada no Congo (BONATO, 1999), Marrocos (EL JAOUANI, 1988), Tunísia (BOLLAND et al., 1998), Ilhas Virgens (MORAES & MCMURTRY, 1987) e Estados Unidos (SCHUSTER, 1959; MORAES & MCMURTRY, 1987). Relatos da presença *T. evansi* em tomateiro indicam que este ácaro chegou à Zâmbia por volta de 1985 (MINGOCHI & JENSEN, 1986). Outros relatos sugerem a presença de *T. evansi* na Tanzânia, Senegal e Etiópia e em 2001, *T. evansi* foi encontrado no Quênia. O mesmo foi encontrado na Espanha (FERRAGUT & ESCUDERO, 1999) e em Portugal (BOLLAND & VALA, 2000). Atualmente, este ácaro é considerado uma praga-chave de solanáceas em diversos países do continente africano (KNAPP et al., 2003; SAUNYAMA E KNAPP, 2003) com relatos de perdas de até 90% da produtividade no Zimbabué (SARR et al., 2002). Na maioria dos países onde foi constatada a presença de *T. evansi*, foi demonstrada sua pronunciada preferência por solanáceas (MORAES & MCMURTRY, 1987). Entretanto, na Europa, parecem que estes ácaros atacam também plantas de diferentes famílias (FERRAGUT & ESCUDERO, 1999).

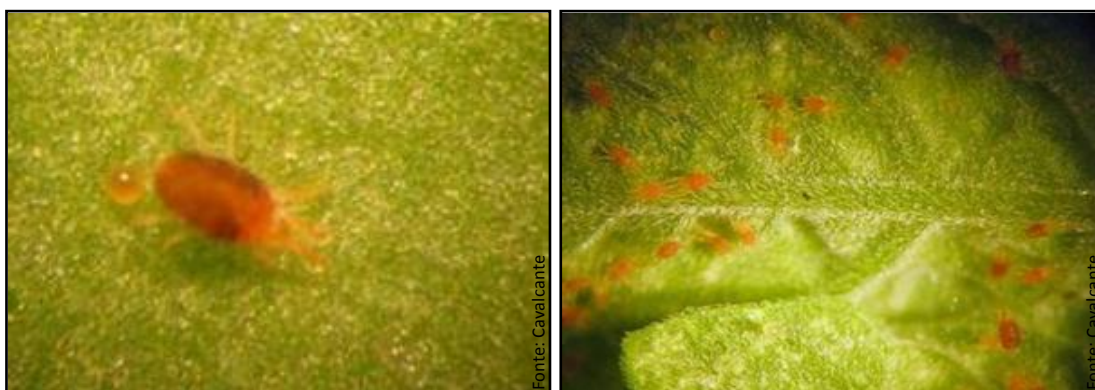


Figura 1 – *Tetranychus evansi*, o ácaro vermelho.

Outro ácaro de grande importância agrícola é o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* (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). Flechtmann (1985) relacionou as culturas do algodão, amendoim, feijão, ervilha, fava, soja, mamona, pessegueiro, flores, folhagens, morangueiro, roseira, tomate, berinjela e pimentão como as principais culturas atacadas por este ácaro no Brasil. Em

tomate as plantas atacadas por *T. urticae* apresentam injúria mecânica como consequência de sua alimentação. As folhas perfuradas são prejudicadas pela perda de água e clorofila resultando em redução na intensidade de fotossíntese (PAPA et al., 2003).

2.3. Defesa de plantas

Muitos são os tipos de estresses a que os vegetais estão sujeitos, tais como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pestes ou patógenos, dentre outros. Ao longo de uma co-existência de pelo menos 100 milhões de anos, plantas e insetos desenvolveram uma série de interações que podem ser benéficas ou maléficas (STOTZ et al, 1999), em uma relação constante, complexa e que é observada nos mais diversos ecossistemas. Esta interação pode ser mutuamente benéfica quando os insetos propiciam às plantas atividades como polinização e defesa, e quando as plantas propiciam aos insetos abrigo, local para reprodução e alimentação. Por outro lado, alguns insetos atacam as plantas e prejudicam seu desenvolvimento. No entanto, a capacidade das plantas responderem a seus agressores parece ser bem desenvolvida, apresentando estratégias de defesa contra organismos que vão desde vírus, bactérias, fungos, nematóides, ácaros e insetos a até mesmo mamíferos (DICKE et al., 2003). As habilidades das plantas em resistir ao ataque de insetos são baseadas em defesas constitutivas e induzidas, que visam reduzir o desempenho dos herbívoros (ARIMURA et al., 2005). Na defesa constitutiva, a planta expressa resistência de forma contínua, e este mecanismo de defesa não está ligado à presença ou ação de herbívoros. O aparato que compreende este tipo de defesa é formado por compostos químicos e estruturas morfológicas que dificultam o acesso dos insetos a planta, podendo prejudicar alguns parâmetros do ciclo biológico, como reprodução e desenvolvimento do herbívoro (KARBAN & BALDWIN, 1997). Esses componentes podem ser encontrados em todas as partes das plantas; e geralmente suas concentrações e quantidades variam com a idade da mesma (GOULD, 1998).

Defesas induzidas estão relacionadas às mudanças morfológicas e aumento do nível de metabólitos secundários ou proteínas relacionadas à defesa. Como tais eventos reduzem a qualidade nutricional do vegetal para os herbívoros, são consideradas como defesas diretas (KANT et al., 2004). A investigação de mecanismos de resistência

endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma tendência, servindo de ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas (GATEHOUSE, 2002; FERREIRA et al., 2004). Essas defesas precisam ser sincronizadas tanto no tempo quanto no espaço, através de complexas redes regulatórias que são influenciadas por interações com outras vias de sinalização. O resultado dessa integração de vias é um padrão característico de expressão gênica resultando, entre muitas outras atividades, na produção de metabólitos secundários que vão agir contra herbívoros ou patógenos. Interações sinérgicas e antagônicas podem fornecer uma resposta que regula a expressão gênica e assim controla a indução de proteínas de defesa, dependendo dos herbívoros e das plantas envolvidas (MAFFEI et al, 2007).

Uma das principais formas de defesa direta das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases. Nessa via, ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992; SCOTT et al., 2010; SHIVAJI et al., 2010).

Farmer & Ryan (1992) propuseram que em folhas de tomateiro, os jasmonatos são responsáveis por regular a expressão gênica em inibidores de proteases. No esquema proposto na Figura 2, uma importante etapa ocorre na interação dos sinais extracelulares com os receptores da membrana plasmática levando a ativação de lipases, com posterior liberação do ácido linolênico dentro do citoplasma. O ácido linolênico é convertido pela via das lipoxigenases a ácido jasmônico, o qual reage com um receptor e ativa a expressão de genes de inibidores de proteases.

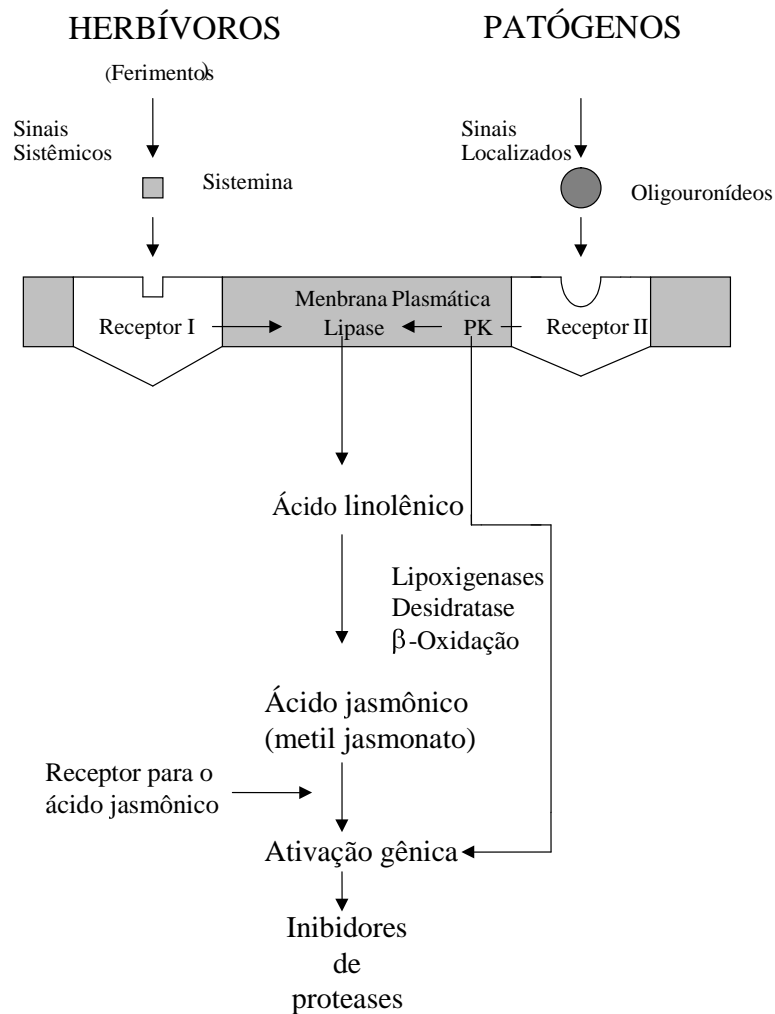


Figura 2 - Mecanismo esquemático da ativação da produção de inibidores de proteases por ferimento em folhas de tomate. **PK**=Proteína Quinase (FARMER & RYAN, 1992).

A ingestão de inibidores de proteases pelos insetos interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio. Os inibidores são considerados agentes anti-metabólicos, pois levam os insetos a uma deficiência protéica. Essa interferência na digestão diminui a disponibilidade de aminoácidos prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (SILVA-FILHO E FALCO, 2000; XAVIER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; PILON et al., 2006; PILON et al., 2009; SCOTT et al., 2010). A ativação destas respostas específicas requer o reconhecimento e respostas apropriadas ao ataque inimigo e a maioria destes eventos leva por fim à ativação de genes, por vias de sinalização celular, em poucos minutos (MAFFEI et al., 2007).

2.4. Interações entre artrópodes e endossimbiontes

Os organismos conseguem viver somente dentro de seus limites de tolerância, ou seja, entre os limites inferiores e superiores de uma série de fatores bióticos e abióticos, tais como, interações ecológicas, temperatura, intensidade luminosa, nutrientes, entre outros (HENRY-SILVA & CAMARGO, 2005). Eles não vivem isolados, normalmente eles estabelecem associações biológicas e estão sujeitos, simultaneamente, a diferentes tipos de interações, as quais podem ser classificadas dentro de categorias como competição, predação, parasitismo, mutualismo e detritívora (BEGON et al., 2007). A competição pode ser definida como qualquer interação que afeta negativamente o crescimento, a sobrevivência ou a fecundidade da população de determinada espécie, em decorrência da exploração por recursos ou interferência de indivíduos de outras espécies (BEGON et al. 1996). Predação representa a situação na qual um organismo mata o outro, ou ataca parte de outro organismo, estabelecendo a relação predador e presa. Já o parasitismo é definido como a interação em que um dos organismos adquire benefício em detrimento de um organismo hospedeiro (KLEPZIG et al. 2009). Em alguns casos a intensidade do parasitismo é tão intensa que pode produzir doença no hospedeiro logo após o início da interação. A interação entre duas espécies em que ambas se beneficiam é considerada mutualismo. Um exemplo notável é o sistema planta-polinizador (ODUM, 1971). A detritívora ocorre quando há o consumo de partes de organismos mortos (BEGON et al., 2007).

O termo simbiose foi usado pela primeira vez por De Bary em 1877, e desde então é um amplo termo utilizado para descrever duas ou mais espécies diferentes vivendo em uma associação íntima entre si. O caso em que uma espécie vive dentro da outra é classificada com endossimbiose. Assim, consideram-se as interações mutualísticas, comensais e parasitárias como simbióticas. Na simbiose comensal, ocorre uma associação em que um organismo obtém um benefício e o seu hospedeiro não experimenta nenhum tipo de benefício ou prejuízo. Na simbiose mutualística, ocorre uma relação harmônica na qual ambos se beneficiam de forma que se tornam dependentes um do outro. Já o parasitismo simbiótico é um fenômeno que ocorre quando um organismo sobrevive retirando nutrientes de outro, predominando uma forte dependência, onde um lado é beneficiado e o outro prejudicado (PARACER e AHMADJIAN, 2000; KLEPZIG et al., 2009). Estas relações são dinâmicas,

frequentemente havendo transição de um tipo para outro por influência de fatores externos ou internos (MC-CREADIE et al, 2005). Exemplos deste fenômeno de transição podem ser citados as relações com *Wolbachia* que pode incluir tanto elementos de parasitismo e mutualismo (RELMAN, 2008), também simbioses intestinais que normalmente não apresentam nenhum efeito deletério aparente aos seus hospedeiros, no entanto podem passar a exercer efeitos patogênicos após rompimento do intestino por entomopatógenos (BRODERIK et al, 2009).

2.4.1. Bactérias associadas a artrópodes

A ocorrência de interações simbióticas entre micro-organismos e insetos é bem conhecida. Em artrópodes existe uma enorme e diversa gama de bactérias simbioses, que na maioria das vezes são transmitidos verticalmente através do citoplasma do ovo (MORAN et al., 2008). 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 estes 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. Recentes pesquisas no campo da endossimbiose têm enfatizado a relação de como os micro-organismos interagem com os insetos (DILLON e DILLON, 2004).

A simbiose é denominada primária quando for essencial para o hospedeiro, como é o caso do pulgão com a bactéria *Buchnera aphidicola*. Suas interações são antigas e mostram padrões de co-especificações profundas. Simbioses secundárias são tipicamente facultativas e suas associações são mais recentes. Embora facultativas, elas desempenham importantes funções na ecologia e evolução dos hospedeiros (WERREN et al. 2008). Provavelmente a simbiose secundária mais estudada seja de artrópodes com a bactéria *Wolbachia*, onde cerca de 60% das espécies de insetos podem estar infectados por este microrganismo (HILGENBOECKER et al, 2008).

Os efeitos causados pela bactéria *Wolbachia* são diversos e dinâmicos, sendo conhecida a indução de incompatibilidade citoplasmática e distorção na taxa sexual, podendo causar morte de machos e indução de partenogênese (WERREN et al, 2008). Foi demonstrado em trabalho realizado por WEEKS & BREEUWER (2001) que seis espécies de ácaros do gênero *Bryobia* estavam infectadas por bactérias *Wolbachia*. A eliminação dessas bactérias alterou significativamente o número de machos na progênie.

Em trabalhos realizados por HOY e colaboradores, (2005) foi observado que um único micro-organismo compartilhado por predadores e presas era a bactéria *Wolbachia* e não foram encontradas diferenças genéticas na *Wolbachia* do predador e de sua presa.

Recentemente, trabalhos demonstraram que algumas bactérias são simbioses secundários de artrópodes, incluindo *Spiroplasma*, *Arsenophonus*, *Rickettsia* e *Cardinium*. *Cardinium* só foi descoberta na última década, e embora seus efeitos tenham sido estudados em poucos hospedeiros é conhecido por induzir diversas anomalias reprodutivas, incluindo incompatibilidade citoplasmática em ácaros e vespas parasitas (HUNTER et al., 2003; GOTOH et al., 2007; ROS e BREEUWER, 2009). PERLMAN et al. (2010) mostraram uma prevalência muito elevada de infecção de *Cardinium* em aranhas *Cybaeus*, sendo talvez a maior taxa de infecção conhecida para este simbiote em uma linhagem específica de artrópodes. Os mesmos autores revelaram uma alta prevalência de infecção por *Wolbachia*, embora sempre menores que *Cardinium*.

Considerando que o papel destes simbioses facultativos não é completamente compreendido, tem sido demonstrado que podem ser benéficos para seus hospedeiros em determinadas condições. Como por exemplo, o pulgão da ervilha *Acyrtosiphon pisum* com seus simbioses facultativos apresenta maior resistência ao ataque de vespas parasitoides (OLIVER, 2003) e contra fungos patogênicos (SCARBOROUGH, et al. 2005).

Afídeos e seus endossimbioses são um dos mais bem conhecidos sistemas de mutualismo. Todos os pulgões transportam bactérias do gênero *Buchnera* em suas células citoplasmáticas, com uma estimativa de 5,6 milhões de células por insetos. Esta é uma interação obrigatória, uma vez que sem ela os pulgões morreriam ou ficariam incapacitados de se reproduzir, como demonstrado mediante tratamento com antibióticos (DALE & MORAN, 2006). Por outro lado, os microssimbioses *B. aphidicola* sem a interação com os afídeos também não seriam capazes de sobreviver,

pois, no decorrer da evolução tem perdido genes necessários para vida livre (HOUK & GRIFFITHS, 1980). Bactérias do gênero *Buchnera* fornecem aminoácido triptofano, que é raro em seivas de plantas para o afídeo, bem como auxilia na produção de leucina e vitaminas (PARECER & AHMADJIAN, 2000).

Existem também exemplos de abelhas com relações simbióticas com bactérias (ROUBIK, 1983). No trato intestinal de abelhas da espécie *Melipona quadrifasciata* podem ser encontrados pelo menos cinco tipos de bactérias do gênero (*Bacillus* spp.), mas provavelmente apenas um mantém relações estreitas com esse inseto. As bactérias são encontradas tanto no intestino posterior da abelha como nos potes de alimento presentes na colônia (CRUZ-LANDIM, 1996).

VISÔTTO et al, (2009) investigaram a microbiota bacteriana de *Anticarsia gemmatalis*, uma das mais importantes pragas desfolhadoras da cultura da soja, e relataram a importância da contribuição da atividade bacteriana para o processo digestivo deste lepidóptera.

2.4.2. Identificação de Bactérias Endossimbiontes

Quando comparamos a grande importância das associações bacterianas, tanto para artrópodes quanto para o meio ambiente como um todo, é notável o quão pouco se sabe sobre eles. Relativamente poucos estudos analisam toda a comunidade bacteriana associada com artrópodes (REESON et al., 2003). HOFFMANN e colaboradores (1998) verificaram que a flora bacteriana de *Folsomia candida* é diversificada, apresentando 26 espécies de bactérias que são cultiváveis. Abelhas *Apis mellifera* abrigam uma ampla gama de bactérias em seu intestino (GILLIAM, 1997). Por um outro lado, gafanhotos da espécie *Melanoplus sanguinipes* contém uma abundante, mas relativamente simples microflora bacteriana, com os principais gêneros sendo de *Enterococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* (MEAD et al. 1998).

A maioria dos estudos que examinam a microflora de artrópodes comumente isolam e cultivam seus organismos constituintes. Como apenas uma pequena porção de bactérias associadas a artrópodes podem ser cultivadas usando as técnicas existentes, métodos alternativos tem sido propostos (HOFFMANN et al., 1998). MUYZER e colaboradores (1993), propuseram a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) que consiste de uma técnica baseada na mobilidade eletroforética de moléculas

de DNA parcialmente desnaturadas em geis de poliacrilamida que diminui sua migração pelo gel quando comparadas com a forma de dupla hélice da molécula. 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 eubactérias (HEUER et al., 1997) pelo fato de serem sequências conservadas, presentes em todas as bactérias (SMIT & READ, 1997), disponíveis em bancos de dados (KIRK et al., 2004).

No perfil de bandas gerado pelo gel, cada banda em teoria representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactérias (MUYZER & SMALLA, 1998) e conseqüentemente, o perfil da comunidade bacteriana pode ser visualizada em função do seu padrão de bandas no DGGE (IWAMAMOTO & NASÚ, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

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 e as avaliações biológicas foram realizadas no Laboratório de Acarologia/ Entomologia, UFV.

3.2. Cultivo das plantas de tomate

Foram utilizadas sementes da variedade Santa Clara I-5300 para a obtenção das plantas de tomate, uma vez que esta variedade é amplamente utilizada por agricultores no Brasil. As sementes foram plantadas em substrato comercial, composto por vermiculita e adubo orgânico, em bandejas de isopor (8 x 16 células), as quais foram mantidas em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa. Aos 23 dias após a semeadura, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos (1,5 L), uma planta por vaso, contendo mistura de solo e esterco bovino curtido 3:1 (v/v). As plantas foram utilizadas no experimento quando atingiram 45 dias de idade e 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 utilizando cano de PVC, revestidas com organza (Figura 4), evitando assim o ataque de fitófagos.

3.3. Criação do ácaro *Tetranychus evansi*

Os ácaros foram criados massalmente no Laboratório de Acarologia/Entomologia-UFV, alimentados com folhas de tomate da variedade Santa Clara I-5300. Quando as folhas das plantas estavam completamente desenvolvidas, foram coletadas com o auxílio de uma tesoura esterilizada e o pecíolo das folhas foram imediatamente colocados em um copo com água, e em seguida transportados para o Laboratório de Acarologia. Os ácaros foram transferidos para as folhas com o auxílio de

um pincel de cerdas macias. As colônias foram mantidas em sala climatizada sob condições controladas, 25 ± 5 °C, U.R. 70 ± 5 % e fotoperíodo de 12 h.

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

Para a obtenção do ácaro *T. evansi* sem endossimbiontes bacterianos, folhas de tomateiro foram submetidas à radiação ultra-violeta por 5 minutos em ambas as faces, para esterilização superficial. Foram cortados discos com 2,5 cm de diâmetro, mantendo estes, em placas de Petri, com a parte superior (adaxial) sobre algodão umedecido com solução de tetraciclina 0,1% (Figura 3). Em cada disco foram colocadas 50 fêmeas adultas do ácaro *T. evansi* que após 24 horas foram retiradas e observado o desenvolvimento dos ovos até a fase adulta dos ácaros. A solução de tetraciclina e os discos foliares foram substituídos a cada três dias. As fêmeas obtidas com esse tratamento originavam em sua prole ácaros livres de endossimbiontes bacterianos que foram utilizados no experimento.

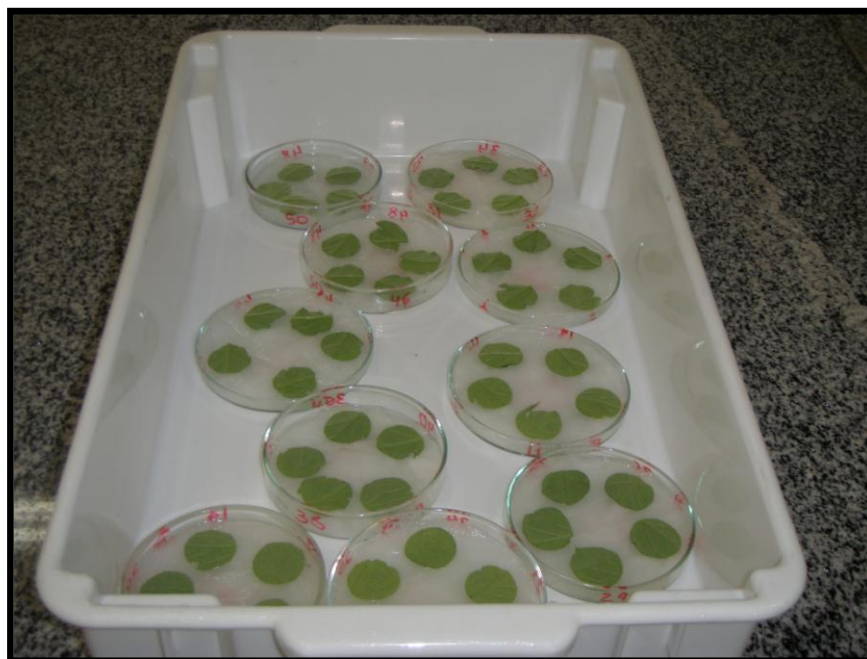


Figura 3. Discos foliares sobre algodão umedecido em placas de petri dentro de bandejas plásticas, para a criação de ácaro.

3.3.2. Obtenção do ácaro *T. evansi* com endossimbiontes

Para obtenção de ácaros com endossimbiontes bacterianos foi realizado um procedimento similar ao descrito acima no item 3.3.1., no entanto os discos foliares foram colocados em algodão umedecido com água destilada, ausente de tetraciclina.

Reação em cadeia da polimerase foram realizadas para confirmar a ausência dos endossimbiontes bacterianos nos ácaros da segunda geração, provenientes da primeira geração tratados com o antibiótico tetraciclina. As mesmas análises moleculares foram realizadas para confirmar a presença de endossimbiontes nos ácaros não tratados com antibiótico. Também foram analisados os endossimbiontes bacterianos presentes no ácaro *T. urticae* para comparar com os endossimbiontes bacterianos do ácaro *T. evansi*, uma vez que *T. urticae* induz a defesa da planta e *T. evansi* tem a capacidade de suprimi-las (SARMENTO et al., 2011).

3.4. Experimentação

Os tratamentos realizados para avaliar os efeitos dos endossimbiontes bacterianos na resposta de defesa das plantas foram os seguintes: Tratamento 1- plantas limpas (controle); Tratamento 2- plantas atacadas pelo ácaro *T. evansi* não tratados com tetraciclina (com endossimbiontes bacterianos); Tratamento 3- plantas atacadas pelo ácaro *T. evansi* tratados com tetraciclina (sem endossimbiontes bacterianos). As plantas de tomate foram infestadas utilizando 150 ácaros tratados ou não tratados com tetraciclina a 0,1% por planta. As plantas foram mantidas dentro de gaiolas de organza como descrito no item 3.2 (Figura 4). Para as análises enzimáticas, foram coletadas as segundas folhas das plantas de cada tratamento e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido, levadas para o laboratório e acondicionadas em freezer a – 80 °C. As coletas foram realizadas em três períodos de tempo: antes da infestação das plantas (dia 0), um dia e sete dias após a infestação. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições, constituindo cada planta uma unidade experimental.



Figura 4. Gaiolas utilizadas para criação massal de ácaros *T. evansi*, em casa de vegetal na Universidade Federal de Viçosa.

3.5. Análises Moleculares

3.5.1. Extração do DNA

50 fêmeas tratadas e 50 fêmeas não tratadas foram utilizadas para a extração do DNA. Os ácaros foram previamente esterilizados para retirada de micro-organismos da sua superfície. Para a esterilização superficial, inicialmente os ácaros foram colocados em álcool 70 %, em seguida lavados com solução de hipoclorito de sódio 0,1 %, posteriormente lavados em água estéril para retirada do excesso de hipoclorito de sódio e centrifugados a 5.000 rpm por cinco minutos.

Para a extração de DNA foi utilizada metodologia adaptada a partir de Pospiech e Neumann (1995). Os indivíduos 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 trituração imediata. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 500 rpm por três minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes. Os sobrenadante oriundo do passo anterior foram centrifugados a 5.000 rpm por cinco minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (100 mM Tris-HCl e 10 mM EDTA, pH 7,5) na presença de 1 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 8 µL de lisozima (50 mg/mL). O *pellet* foi incubado a 37 °C por uma hora em banho-maria, sendo homogeneizado em tempos espaçados. Posteriormente foram adicionados 60 µL de SDS 10 % (dodecil sulfato de sódio) e novamente a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Foram adicionados 60 µL de CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio Sigmaultra) 10 % e a reação incubada a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi tratada com a adição de um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos. A fase superior foi removida, seguida da adição de igual volume de isopropanol e centrifugada a 12.000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi incubada a -20°C por duas horas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 20 µL álcool etílico 70 %, centrifugado a 5.000 rpm por dois minutos e ressuscitado 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.

3.5.2. Amplificação DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)

As eubactérias foram identificadas utilizando primers de oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA, sendo 16SF (5'- AGAGTTTGATCMTGG-3') e 16SR (5'- TACCTTGTTACGACTT-3'), citado por (WEEKS et al.,2001). Cada reação foi realizada para um volume total de 25 µL, sendo 1 µL de amostra de DNA e 24 µL da mistura de reacional [2,5 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2,5 µL do tampão Tris 1X, 2 µL dos primers (16 SF e 16 SR), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de TAQ Polimerase (5 U/µL) e 16,8 µL de água deionizada autoclavada]. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e por fim, 72 °C por 5 minutos (SAMBROOK et al., 1989).

Os produtos das reações 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, a voltagem constante de 100 v. O gel foi visualizado e fotografado pelo sistema de captura de imagem digital LPIX – Loccus Biotecnologia, gravado eletronicamente e impresso para arquivo (SAMBROOK et al., 1989).

3.5.3. Amplificação DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) para DGGE

A região variável V3 do 16S rDNA foi amplificado por PCR com primers para região conservada dessa sequência. As sequências dos nucleotídeos dos primers são as seguintes: primer P1 (5'- ATTACCGCGGCTGCTGG-3') e primer P2 (5'- GCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCA GCAG-3'). A combinação dos primers P1 e P2 foi usada para amplificar a região do 16S rDNA em diferentes espécies bacterianas que correspondem às posições 341-534 em *Escherichia coli*. Cada reação foi realizada para um volume total de 25 µL, sendo 1 µL de amostra de DNA e 24 µL da mistura reacional [3 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 2,5 µL do tampão Tris 1X, 2 µL dos primers (P1 e P2), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,3 µL de TAQ Polimerase (5 U/µL), 1 µL de BSA (Soro Albumina Bovina) e 12,2 µL de água deionizada autoclavada]. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C/3 minutos. 10 Ciclos (94 °C/1 minuto, 42 °C/1,5 minutos, 72 °C/2 minutos.) 25 ciclos (94 °C/1minuto, 52 °C/1,5 minutos, 72 °C/2 minutos) e um período de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

3.5.4. 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 foram aplicados em um volume de 20 µL diretamente no gel de poliacrilamida 8 % (p/v) (acrilamida:metilbisacrilamida - 60:1), que foi preparado com gradiente desnaturante de 40 a 60 %. O 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 60 V 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 Eagle Eye (II, Still Video 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 70 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. Dois microlitros do sobrenadante foram utilizados para reamplificação do DNA utilizando os primers P1 e P2. As condições para amplificação das eluições do DGGE são as mesmas descritas no item anterior. Todo o produto desta amplificação foi aplicado em gel de agarose 1 %. As bandas foram excisadas e purificadas utilizando kit de purificação QIAquick GEL Extraction (QIAGEN), segundo instruções do fabricante. O DNA purificado foi encaminhado para sequenciamento.

3.5.5. Sequenciamento e Comparações de sequências

O sequenciamento das amostras foi realizado pela MacroGen Inc. na Coreia do Sul (www.macrogen.com). 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).

3.6. Análise da Atividade Enzimática

3.6.1. Obtenção do extrato foliar

Os extratos foliares foram obtidos da segunda folha desenvolvida 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 triturado com o auxílio de

pistilo e gral de porcelana até a obtenção de um pó que foi posteriormente pesado em balança analítica. Foi adicionado ao pó uma solução tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 e CaCl₂ 20 mM na proporção 1:3 (p/v), a mistura foi homogeneizada e em seguida 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 lipoxigenase e inibição trípica.

3.6.2. 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, adicionados em um tubo de ensaio. Para o controle da enzima, foram adicionados a outro tubo de ensaio, 550 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.

A mistura contida em cada tubo (teste e controle da enzima) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, 500 µL dessa mistura do teste e do respectivo controle foram retirados e adicionados a outro tubo contendo 500 µL 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.

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). O experimento foi constituído de quatro repetições por tratamento, sendo cada planta uma repetição. As análises foram realizadas em triplicata.

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

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

Em que:

A = absorbância em 410 nm do controle – absorbância em 410 nm da amostra;

B = diluição da amostra;

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

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

3.6.3. Determinação da atividade de lipoxigenase

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

A solução estoque de linoleato de sódio 10 mM foi preparada utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel alumínio 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 de 25 mL envolvido por papel alumínio e o volume aferido. A solução estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos micro-tubos de 1 mL envolvidos em papel alumínio e armazenados a -20 °C.

Para as análises das atividades de lipoxigenases, foram misturados em um tubo de ensaio 1,0 µL do extrato bruto foliar e 4,0 µL da solução estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato 50,0 mM, pH 6,0. A absorvância 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 o branco, que consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

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

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

onde :

A_{234} = absorvância a 234 nm

$\varepsilon = 25000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar dos hidroperóxidos do ácido linoléico a 234 nm).

$t = 120$ segundos (tempo de incubação).

$l = 1,0$ cm (caminho ótico).

As análises estatísticas das atividades enzimáticas foram realizadas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV). Foram feitas quatro repetições e os dados submetidos à análise de variância com aplicação do teste F ($p < 0,05$). As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.7. Avaliação Biológica

Com intuito de avaliar o efeito de endossimbiontes bacterianos no desenvolvimento e oviposição de ácaros *T. evansi*, e avaliar os possíveis efeitos tóxicos do antibiótico tetraciclina 0,1 % sobre esse ácaro, um experimento com seguintes tratamentos foi estabelecido: Tratamento 1 - ácaros mantidos por duas gerações consecutivas em discos foliares umedecidos com água destilada (AB1); Tratamento 2 - ácaros mantidos por duas gerações consecutivas em discos foliares umedecidos na solução de tetraciclina 0,1 % (AB2) e Tratamento 3 - ácaros mantidos em discos foliares umedecidos em solução de tetraciclina 0,1 % por uma geração e a geração seguinte mantidos em discos foliares umedecidos com água destilada (AB3).

3.7.1. Avaliação do desenvolvimento

Fêmeas do ácaro *T. evansi* da criação massal foram colocadas em discos de folhas de tomateiro e mantidas em algodão umedecido com água destilada ou tetraciclina 0,1%, como descrito anteriormente no item 3.3.1. As placas de Petri foram mantidas em bandejas plásticas, envolvidas e vedadas com parafilme a 25 °C, 70 ± 5 % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas. As fêmeas permaneceram nos discos por 24 horas, tempo necessário para oviposição. Os indivíduos provenientes desses ovos foram mantidos sob essas condições até a fase adulta. Os discos foliares juntamente com a água ou solução de tetraciclina a 0,1% eram trocados a cada três dias, a fim de manter uma condição ideal para o desenvolvimento dos ácaros. Ao atingir a fase adulta,

cinquenta fêmeas foram individualizadas em discos foliares umedecidos em água destilada. Essas fêmeas permaneceram por 24 horas nessas condições para ovipositarem. Transcorrido este período as fêmeas foram retiradas e do total de ovos presentes apenas um foi permitido desenvolver-se até a fase adulta.

Para os ácaros mantidos em discos foliares umedecidos em solução de tetraciclina a 0,1 %, 100 fêmeas destes ácaros foram individualizadas, sendo 50 ácaros mantidos em discos foliares umedecidos em solução de tetraciclina a 0,1 % e os outros 50 mantidos em discos foliares umedecidos em água destilada. Essas fêmeas permaneceram por 24 horas nessas condições para ovipositarem. Transcorrido este período as fêmeas foram retiradas e do total de ovos ovipositados apenas um foi permitido desenvolver-se até a fase adulta. O tempo para atingirem a fase adulta e mortalidade foi avaliado, sendo as avaliações realizadas a cada 24 horas. Cada fêmea correspondeu a uma repetição em cada tratamento. Os dados originais foram corrigidos de acordo com o número de repetição e transformados para raiz quadrada de x, para posterior análise das médias dos tratamentos através do teste de logrank ($p < 0,05$).

3.7.2. Determinação da taxa de oviposição

Fêmeas do ácaro *T. evansi* da criação massal foram colocadas em discos de folhas de tomateiro e mantidas em algodão umedecido com água destilada ou tetraciclina a 0,1 %, como descrito anteriormente no item 3.3.1. As placas de Petri foram mantidas em bandejas plásticas, envolvidas e vedadas com parafilme a 25 °C, 70 ± 5 % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas. As fêmeas permaneceram nos discos por 24 horas, tempo necessário para oviposição. Os indivíduos provenientes desses ovos foram mantidos sob essas condições até a fase adulta. Ao atingir a fase adulta, as fêmeas foram transferidas para novos discos foliares, porém foram mantidas as mesmas condições dos seus respectivos tratamentos. Posteriormente, essas fêmeas permaneceram nos discos foliares até atingirem a fase de teleocrisálida (último estágio antes da fase adulta). As teleocrisálicas correspondentes ao mesmo dia foram transferidas para outro disco foliar, sendo inseridos machos de forma proporcional para garantir que todas as fêmeas adultas fossem acasaladas. Fêmeas adultas de quatro dias foram individualizadas em discos foliares, segundo seu tratamento, sendo 25 fêmeas para o tratamento 1, 24 fêmeas para o tratamento 2 e 27 fêmeas para o tratamento 3.

Cada fêmea correspondeu a uma repetição. A taxa de oviposição foi determinada do quarto ao oitavo dia, período em que esta sofre menor variação. Os dados originais foram corrigidos de acordo com o número de repetições e transformados para raiz quadrada de x, para posterior análise de variância com o teste F ($p < 0,05$).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA

A presença de bactérias endossimbiontes nos ácaros *T. evansi* e *T. urticae* foi confirmada através do gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 5). A canaleta 1 demonstra a banda referente ao DNA bacteriano do ácaro *T. evansi* e a canaleta 2 refere-se ao DNA bacteriano de *T. urticae*. Breeuwer (1997) analisando o efeito de endossimbiontes na reprodução de ácaros relatou a associação de bactérias nos ácaros *T. urticae* e *T. turkestani*. Groot e colaboradores (2006), também encontraram espécies bacterianas em *Brevipalpus phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus*.

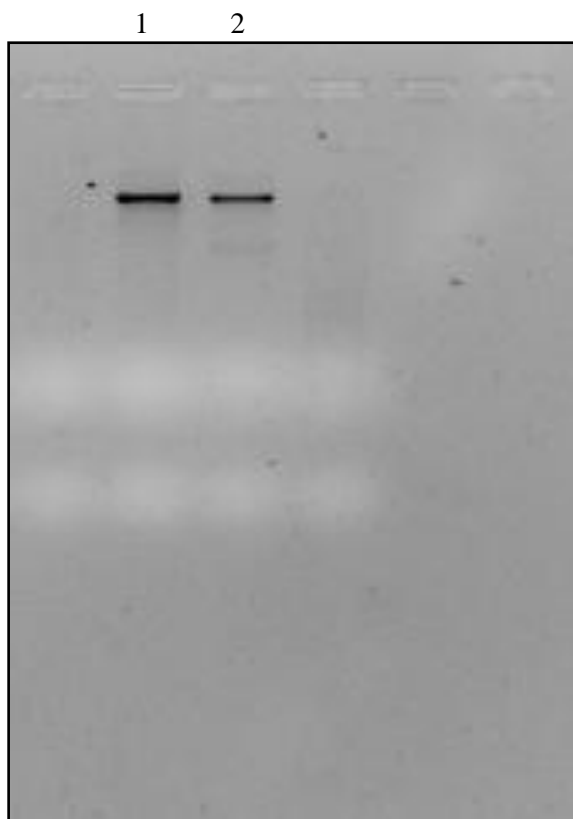


Figura 5. Gel de agarose 1% evidenciando a banda correspondente ao DNA bacteriano de endossimbiontes presentes nos ácaros *T. evansi* (canaleta 1) e *T. urticae* (canaleta 2).

Após a confirmação da presença de DNA bacteriano nas duas espécies de ácaros, a mesma amostra de DNA foi utilizada para realizar o PCR e posterior aplicação

no DGGE. A eletroforese em gel com gradiente desnaturante de fragmentos 16S rDNA amplificados apresentou um perfil de bandas para cada uma das espécies de ácaros (Figura 6). A canaleta 1 representa a diversidade bacteriana presente no ácaro *T. urticae*. A canaleta 2 representa a diversidade bactéria presente no ácaro *T. evansi*.

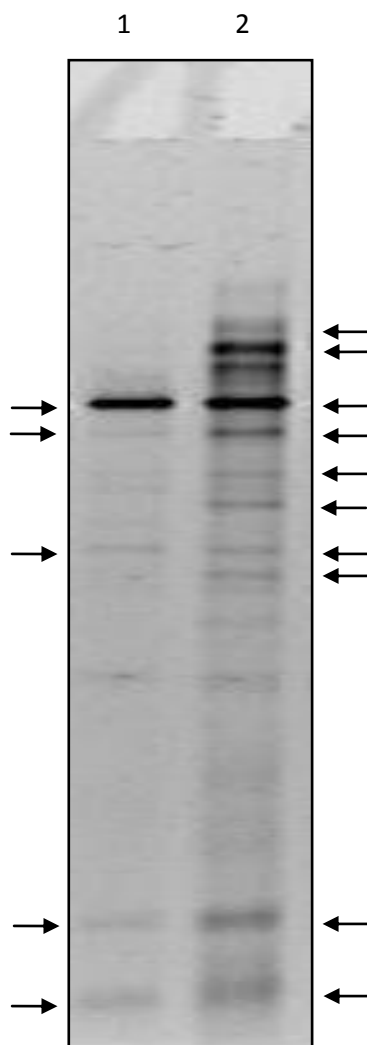


Figura 6. Gel de DGGE de poliacrilamida 8 % (p/v) corado com SYBR GOLD[®] 1X (Sigma-Aldrich). Diversidade bacteriana de *T. urticae* (Canaleta 1) e diversidade bacteriana de *T. evansi* (Canaleta 2).

A Figura 6 demonstra claramente a diferença entre as comunidades bacterianas existente nessas duas espécies. Para o ácaro *T. evansi* foram evidenciadas 10 bandas distintas, ou seja, a presença de 10 espécies ou grupos de espécies. Entretanto, para o ácaro *T. urticae* foi evidenciado a presença de cinco bandas distintas, ou seja, a presença

de cinco espécies ou grupos de espécies. Insetos são comumente co-infectados por múltiplos microrganismos, possibilitando a esses endossimbiontes interações como, competição ou relações sinérgicas dentro do hospedeiro (BROWNLIE & JOHNSON, 2009).

A alimentação é um fator que pode contribuir na diversidade bacteriana associada ao inseto. Os ácaros utilizados neste experimento foram mantidos, por várias gerações, em plantas de tomate como único substrato alimentar. Este fato evidencia que a diferença na diversidade bacteriana encontrada entre esses ácaros deve estar relacionado a outros fatores que não sejam a alimentação. Hayashi e colaboradores (2007) trabalhando com *Coptotermes formosanus* mostrou que a flora bacteriana deste inseto foi fortemente influenciada pelo tipo de alimentação.

Os diferentes fragmentos de DNA obtidos no gel de DGGE, para os dois ácaros, foram excisados, amplificados novamente, os produtos do PCR foram purificados e seqüenciados diretamente. Estes passos fornecem uma rápida e eficiente abordagem para análise da diversidade bacteriana em amostras de DNA (MUYZER, 1993).

As seqüências mostradas na Tabela 1 apresentaram elevadas similaridades com as seqüências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), bem como a cobertura da pesquisa no banco de dados e número de acesso das seqüências.

As amostras EVANSI 2, 5 e 9 apresentaram similaridade de 97 %, 95 % e 96 %, respectivamente, com a bactéria, *Azotobacter vinelandii*. Como a técnica de DGGE separa fragmentos de DNA de mesmo comprimento baseado em pequenas diferenças em suas seqüências de bases, é provável que estas amostras referem-se à diferentes cepas da mesma bactéria ou mutações nas seqüências destas bactérias. A maioria das amostras (9 das 14 amostras analisadas) apresentou similaridade com bactérias não cultivadas. Segundo Amman e colaboradores (1995) o estudo com técnicas moleculares tem revelado que mais de 99% dos micro-organismos existentes na natureza não podem ser isolados e mantidos por meios de cultura, uma vez que estes falham em reproduzir os nichos ecológicos e as complexas relações encontradas nos ambientes naturais destes micro-organismos (NOCKER et al., 2007). Pelo fato de serem bactérias não cultiváveis, trata-se de micro-organismos que tem relação de simbiose primária, ou seja, essas bactérias não têm a capacidade de sobreviver sem a presença dos ácaros. (DALE & MORAN, 2006) afirmaram que essas interações são muito antigas, 30 a 270 milhões de

anos atrás, com muitas simbioses sendo mais antigas que a própria origem dos mamíferos.

A amostra EVANSI 7 não apresentou um sequenciamento capaz de apontar alta similaridade com as sequências depositadas no NCBI. Quatro amostras, EVANSI 2, 5, 9 e URTICAE 14, apresentaram similaridade com a bactéria *Azotobacter vinelandii*, uma conhecida bactéria de vida livre fixadora de nitrogênio que pode ser encontrada em solos de todo mundo (SETUBAL et al, 2009). A amostra URTICAE 15 apresentou 100% de similaridade com a bactéria *Rickettsia*. Essa bactéria pertence à ordem Rickettsiales, subdivisão da classe proteobactéria (ROUX & RAOULT, 1995). Bactérias deste gênero são conhecidas por serem transmitidas por artrópodes e são responsáveis por doenças como a febre maculosa (DASCH & WEISS, 1992). Sakurai e colaboradores (2005) investigaram o efeito da bactéria *Rickettsia* no desenvolvimento do afídeo *Acyrtosiphon pisum* e na interação com o simbiote obrigatório *Buchnera*. Os autores constataram que a bactéria *Rickettsia* suprimiu significativamente populações de *Buchnera* e afetou negativamente o desenvolvimento de seu hospedeiro, principalmente nos estágios mais jovens do inseto.

A diversidade de bactérias endossimbiontes dos ácaros *T. evansi* e *T. urticae* foram analisadas pela capacidade desses ácaros de suprimirem e induzirem, respectivamente, a defesa das plantas. O resultado mostrou uma maior diversidade de endossimbiontes no ácaro *T. evansi*. Entretanto não há relatos na literatura em que as amostras sequenciadas são relacionadas com bactérias que interferem na defesa de plantas. Logo, procederam-se as análises biológicas e enzimáticas para investigar os efeitos dessas bactérias no ácaro *T. evansi*.

A grande vantagem da técnica PCR/DGGE é o estudo da comunidade bacteriana como um todo e não apenas a porção que pode ser cultivada com sucesso, uma vez que esta porção não representaria a diversidade total de bactérias presente em um organismo.

Tabela 1. Sequenciamento das bandas excisadas do DGGE.

Amostra	Cobertura da Pesquisa	Sequência com alta similaridade no Banco de Dados	% de identidade	N° de acesso
EVANSI 1	89 %	Uncultured bacterium clone 5b-iP-Ac13 16S ribosomal RNA gene,partial sequence.	93 %	HM470588
EVANSI 2	100 %	Azotobacter vinelandii isolate DNA101014 18S ribosomal RNA gene,partial sequence.	97 %	DQ299959
EVANSI 3	100 %	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band A8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	93 %	GU301190
EVANSI 4	100 %	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band B12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	90 %	GU301228
EVANSI 5	93 %	Azotobacter vinelandii isolate DNA101014 18S ribosomal RNA gene,partial sequence.	95 %	DQ299959
EVANSI 6	100 %	Uncultured bacterium clone ADFI7QG3A12HL50Z/1175 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100 %	FJ471462
EVANSI 8	41 %	Uncultured bacterium clone F12-G09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	97 %	FJ615954
EVANSI 9	94 %	Azotobacter vinelandii isolate DNA101014 18S ribosomal RNA gene,partial sequence.	96 %	DQ299959
EVANSI 10	100 %	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	91 %	EU697160
URTICAE 11	98 %	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band A8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	89 %	GU301190
URTICAE 12	100 %	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band B12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	92 %	GU301228
URTICAE 13	99 %	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band A8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	93 %	GU301190
URTICAE 14	95 %	Azotobacter vinelandii isolate DNA101014 18S ribosomal RNA gene,partial sequence.	91 %	DQ299959
URTICAE 15	98 %	Rickettsia secondary endosymbiont of Curculio sp. gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: P41_6.	100 %	AB604673

4.2. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOLÓGICOS

A Figura 7 mostra a amplificação do DNA bacteriano para os ácaros mantidos em discos foliares, de acordo com os tratamentos AB1, AB2 e AB3. Observou-se que somente os ácaros mantidos por duas gerações consecutivas em discos foliares umedecidos com água (AB1) apresentaram DNA bacteriano amplificado (canaleta 1). Não houve amplificação de DNA bacteriano (canaleta 2 e 3) para os ácaros mantidos por duas gerações em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % (AB2) e para aqueles mantidos na primeira geração em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % e segunda geração em algodão umedecidos com água (AB3). Este fato evidencia a eficiência do tratamento destes ácaros com o antibiótico tetraciclina a 0,1 %. Este antibiótico possui um amplo espectro de ação e, portanto, não permitiu uma sobrevivência significativa de bactérias nos ácaros tratados.



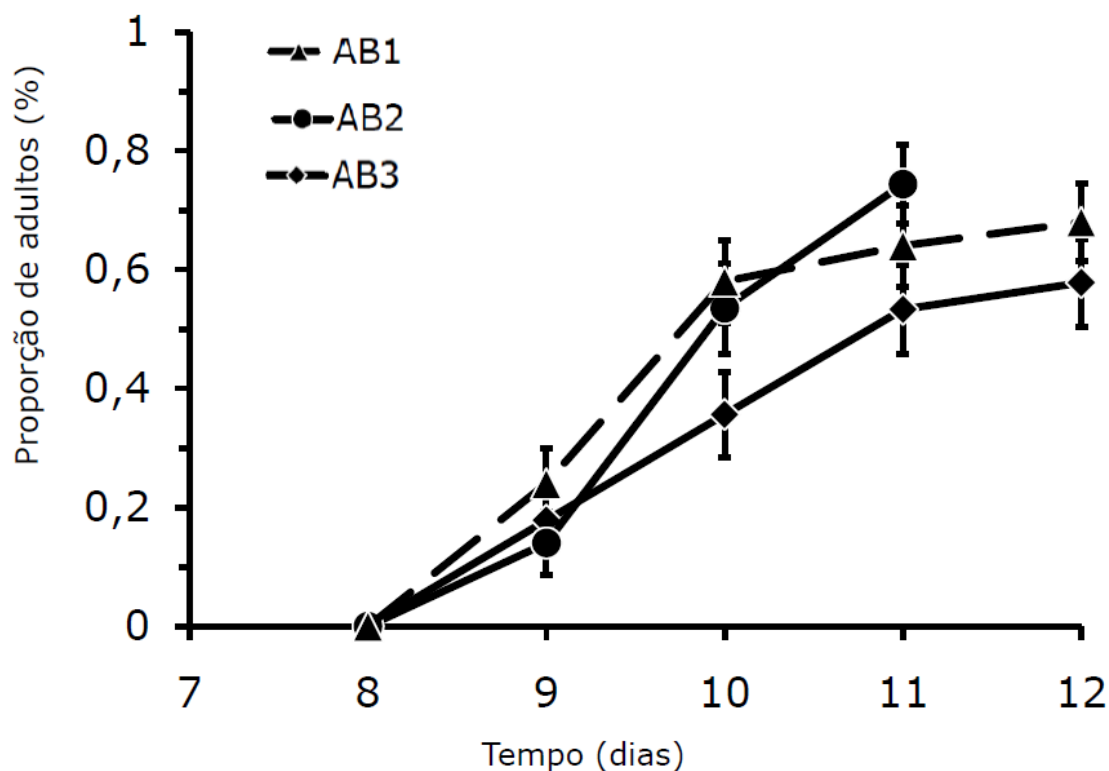
Figura 7. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1 (AB1): ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com água por duas gerações, Canaleta 2 (AB2): ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % por duas gerações, Canaleta 3 (AB3): ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % na primeira geração e a segunda geração em água.

A utilização de antibióticos para a eliminação de bactérias em artrópodes é frequente, devido à conveniência e ao baixo custo deste método. Soma-se a estas facilidades o fato de que a esterilização via administração oral de antimicrobianos facilita estudos fisiológicos e das possíveis relações da microbiota com seu hospedeiro (VISÔTTO et al, 2009).

Para verificar se bactérias endossimbiontes presentes nos ácaros *T. evansi* exercem alguma influência no seu ciclo biológico, foi avaliada a taxa de crescimento e oviposição dos ácaros de segunda geração obtidos através dos tratamentos AB1, AB2 e AB3. Segundo Dillon & Dillon (2004), o antibiótico pode causar efeitos tóxicos para o hospedeiro, isso pode levar a uma interpretação equivocada dos resultados. O tratamento AB2 foi realizado para avaliar possíveis efeitos tóxicos do antibiótico, uma vez que nesse tratamento os ácaros estariam sem bactérias e poderiam apresentar possíveis efeitos tóxicos pela ação da tetraciclina a 0,1 %.

Sendo assim, foi avaliado o efeito desses tratamentos no desenvolvimento e sobrevivência de fêmeas do ácaro *T. evansi*, além da sua influência na taxa de oviposição.

As curvas de sobrevivência dos ácaros submetidos aos tratamentos AB1, AB2 e AB3 estão descritas na Figura 8. As curvas foram estimadas e comparadas pelo teste de Logrank, não havendo efeito significativo entre os tratamentos para a análise de desenvolvimento ($p > 0,2058$) e para a análise de sobrevivência ($p > 0,227$).



AB1 - ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com água por duas gerações

AB2 - ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % por duas gerações

AB3 - ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % na primeira geração e a segunda geração em água

Figura 8. Representação da avaliação biológica de *T. evansi*. O eixo X representa o tempo (dias) necessário para os ácaros atingirem a fase adulta. A proporção de adultos é representada pelo eixo Y. E a mortalidade é obtida através da diferença da proporção total de ácaros existente (100%) pela proporção de ácaros adultos.

No tratamento AB2, os ácaros atingiram a fase adulta com menor tempo, 11 dias, comparado aos tratamentos AB1 e AB3, que atingiram a fase adulta aos 12 dias. O tratamento AB2 também foi aquele que apresentou menor mortalidade (25,58 %) comparado com os tratamentos AB1 e AB3, que apresentaram 32 % e 42,22 % de ácaros mortos até atingirem a fase adulta, respectivamente. Estes resultados indicaram que os endossimbiontes podem acarretar um custo no desenvolvimento dos ácaros. Ao contrário do que era esperado, o tratamento AB2 não apresentou resultados inferiores

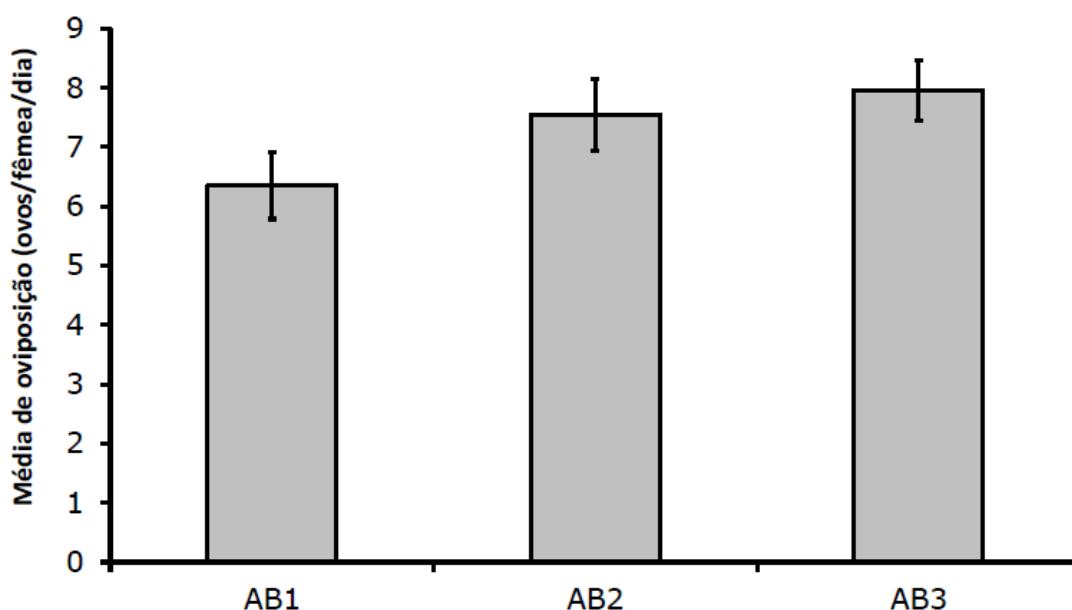
comparado aos outros tratamentos. Isso indica que a tetraciclina, nas concentrações usadas, 0,1 %, não apresentou efeito tóxico sobre os ácaros.

Para avaliar a oviposição, os dados foram transformados para raiz quadrada dos valores corrigidos e submetidos à análise de variância pelo teste F (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre as variâncias dos tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 2. Quadro da análise de variância para oviposição do ácaro *T. evansi*

FV	GL	SQ	QM	F _{cal}	P _{valor}
Tratamento	2	1,4278	0,71390	2,2472 ^{ns}	0,1132
Resíduo	71	22,556	0,31769		
Total	73	23,984			

Os tratamentos com tetraciclina a 0,1 %, AB2 e AB3, produziram valores médios de oviposição de, 7,54 e 7,95, respectivamente. Já o tratamento AB1 apresentou valor médio de oviposição de 6,35 ovos por dia (Figura 9). Este resultado mostrou uma tendência similar aos resultados obtidos com o experimento de desenvolvimento e sobrevivência, onde os ácaros tratados com tetraciclina a 0,1 % apresentaram melhor resultado comparado ao ácaro controle (não tratado). Não foi verificado efeito tóxico na oviposição dos ácaros tratados com tetraciclina a 0,1 % por duas gerações.



AB1 - ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com água por duas gerações

AB2 - ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % por duas gerações

AB3 - ácaros mantidos em discos foliares umedecidos com tetraciclina a 0,1 % na primeira geração e a segunda geração em água

Figura 9. Médias de oviposição de fêmeas durante um período de quatro dias.

Em semelhantes condições experimentais, Bonato (1999), determinando os parâmetros biológicos para o ácaro *T. evansi*, relatou que os ácaros necessitaram de 9,8 dias para atingirem a fase adulta, com mortalidade de 25 % e média de oviposição de 8,2 ovos por dia. Insetos é, indiscutivelmente, o grupo de animais de maior sucesso no planeta, ocorrendo em uma diversa gama de nichos ecológicos frequentemente facilitada por endossimbiontes (BROWNLIE & JOHNSON, 2009). Tipicamente, essas relações são observadas onde insetos ocupam ambientes pobres em nutrientes (BAUMANN, 1995). Os tipos de nutrientes fornecidos diferem entre várias associações. Afídeos se alimentam de seiva de plantas, uma fonte alimentar pobre em aminoácidos essenciais. Esses insetos só conseguem sobreviver devido a bactéria endossimbionte *Buchnera* que retém em seu genoma genes para a biossíntese desses aminoácidos (SHIG-ENOBU et al., 2000). A mosca tse-tse abriga a bactéria *Wigglesworthia* em uma associação obrigatória, onde essa bactéria fornece à mosca co-fatores que são ausentes

no sangue de vertebrados, sua principal fonte alimentar (WU et al., 2006). Os ácaros usados em nosso trabalho aparentemente não possuem nenhuma dessas interações simbióticas obrigatórias, uma vez que ao eliminar os endossimbiontes através do tratamento com tetraciclina a 0,1 %, estes ácaros apresentaram uma taxa de desenvolvimento e média de oviposição superior aos ácaros com essas bactérias.

A eliminação de bactérias do trato digestivo do ácaro *T. evansi* não afetou os parâmetros biológicos, como o tempo para atingir a fase adulta, mortalidade e oviposição. Ao contrário do esperado, a eliminação bacteriana apresentou relativa melhora nos parâmetros avaliados. Visôto e colaboradores (2009) relataram que as atividades de serino proteases e lipases foram significativamente inibidas após a eliminação de bactérias do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis* utilizando tetraciclina. Também foi observado neste trabalho um rápido aumento no peso larval, pupação prematura, inviabilidade pupal e uma mortalidade maior entre insetos tratados com tetraciclina do que entre insetos controle.

Enigl & Schausberger (2007), estabeleceram que a bactéria *Wolbachia* é amplamente dispersa em ácaros Tetranychus, como *Tetranychus gloveri*, *Tetranychus collyerae*, *Tetranychus lambi* e *Tetranychus urticae* e em ácaros predadores, como os ácaros *Neoseiulus barkeri*, *Neoseiulus bibens*, *Neoseiulus californicus*. Este gênero é composto por bactérias endossimbióticas que ocorrem no citoplasma e tecidos reprodutivos em muitas espécies de artrópodes. Estas bactérias são capazes de causar alterações reprodutivas em seus hospedeiros (BARR, 1980; BREEUWER et al., 1992; O'NEILL et al., 1992), partenogênese em vespas (STOUTHAMER et al., 1993), morte de machos em Coleoptera e Diptera (WERREN et al., 2008), e feminização de machos em isópodes (ROUSSET et al., 1992).

Breeuwer (1997) analisou o efeito do tratamento de ácaros *T. urticae* e *T. turkestanii* com o antibiótico tetraciclina e constatou que a incompatibilidade citoplasmática ocorrida entre cruzamentos de fêmeas não infectadas e machos infectados era devido a bactéria *Wolbachia*. Em nosso trabalho a eliminação de bactérias não resultou em nenhuma alteração em seu ciclo biológico. Resultados similares foram encontrados por Bordenstein & Werren (1999), onde estes relatam não haver diferenças no desenvolvimento e na fecundidade de *Nasonia vitripennis* infectadas e não infectadas com *Wolbachia*.

4.3. AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA

A análise de variância para os parâmetros atividade específica de Lipoxigenases e inibição triptica foram realizadas. A interação tratamento x dia foi significativa para ambos os parâmetros, a 5 % de probabilidade pelo teste F (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para os parâmetros atividade da lipoxigenases e Inibidor de tripsina sob tratamentos T1(controle), T2 (ácara com endossimbiontes) e T3 (ácaros sem endossimbiontes) ao longo de 7 dias.

FV	GL	LOX		IP	
		F	P	F	p
Tratamento	2	28,91	0,0000	19,84	0,0000
Resíduo (a)	9				
Dia	2	82,62	0,0000	1,36	0,2816
Trat x Dia	4	19,27	0,0000	4,28	0,0132
Resíduo	18				

Sendo assim, procedeu-se o desdobramento da interação e foi realizado o teste Tukey a 5 % de probabilidade para comparar os tratamentos em cada dia e para comparar os dias em cada tratamento. Os resultados do desdobramento da interação para a atividade da lipoxigenase são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Desdobramento da interação tratamentos x dias para atividade de lipoxigenases ($\mu\text{mol.s}^{-1}$)/(mg.ml^{-1}).

Dia	Tratamento		
	Controle	<i>T. evansi</i> nao tratado	<i>T. evansi</i> tratado
0	1,31050 Ab	1,24018 Aa	1,32320 Ab
1	1,43483 Ab	1,31064 Aa	1,53800 Ab
7	2,25962 Ba	1,33760 Ca	2,74053 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Observou-se que a atividade de lipoxigenases para plantas atacadas por ácaros com endossimbiontes (Tratamento 2) obteve um aumento de 7,85 % ao longo do tempo, não apresentando diferença estatística, entre os dias avaliados. Já para o controle (Tratamento 1) e para plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes (Tratamento 3), houve diferença significativa entre os dias analisados, sendo o 7º dia estatisticamente superior para estes tratamentos. O tratamento 1 apresentou um aumento de 57,48 % na atividade de LOX no 7º dia em comparação ao 1º dia. O tratamento 3 obteve no 7º dia, um aumento de 78,18 % na atividade de LOX comparado ao 1º dia (Figura 10). Isso evidencia que a ‘via das lipoxigenases’ apresentaram uma baixa atividade em plantas que foram atacadas por ácaros com endossimbiontes (*T. evansi* não tratado).

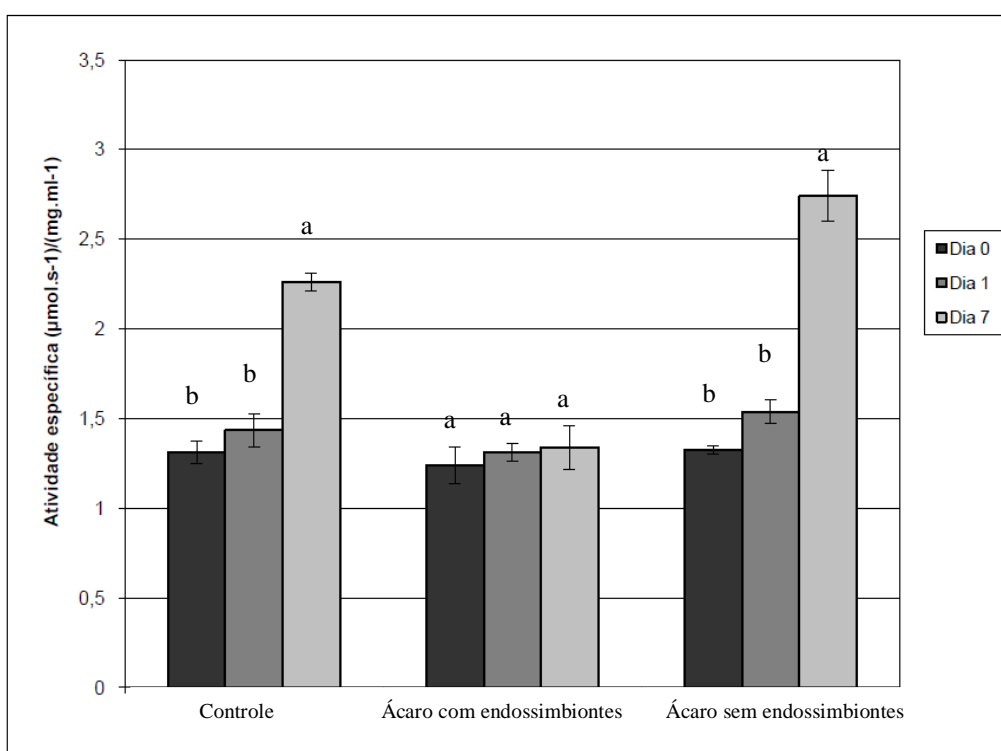


Figura 10. Atividade específica de LOX ($\mu\text{mol.s}^{-1}$)/(mg.ml^{-1}) no decorrer dos dias de avaliação para plantas limpas (controle), plantas atacadas por ácaros com endossimbiontes (*T. evansi* não tratado) e plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes (*T. evansi* tratado). Médias seguidas pela mesma letra em cada tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos nos dias 0 e 1, porém no dia 7 os três tratamentos apresentaram-se estatisticamente diferentes, sendo o tratamento 2 o que apresentou menor atividade $1,33760 \text{ } (\mu\text{mol.s}^{-1})/(\text{mg.ml}^{-1})$. Os tratamentos 1 e 3 apresentaram um aumento na atividade de LOX de 68,93 % e 104,88 %, respectivamente, em comparação ao tratamento 2 (Figura 11).

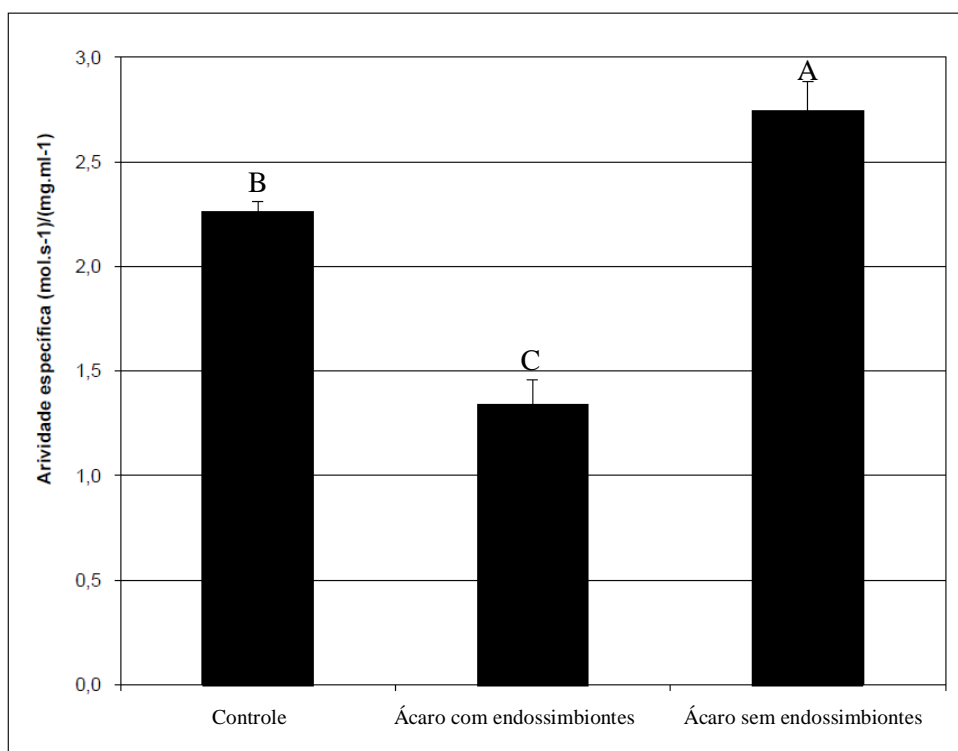


Figura 11. Atividade específica de LOX ($\mu\text{mol.s}^{-1})/(\text{mg.ml}^{-1})$ para plantas limpas (controle), plantas atacadas por ácaros com endossimbiontes (*T. evansi* não tratado) e plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes (*T. evansi* tratado), no 7º dia de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

Para a análise do inibidor de tripsina também procedeu-se o desdobramento da interação (Tabela 5), visto que a interação foi significativa na análise de variância.

Tabela 5. Desdobramento da interação tratamentos x dias para inibidor de tripsina (mg de tripsina inibida/g de proteína).

Dia	Tratamento		
	Controle	<i>T. evansi</i> não tratado	<i>T. evansi</i> tratado
0	51,6282 Aa	50,8782 Aa	52,1282 Aa
1	55,2185 Aa	40,3304 Ba	57,9673 Aab
7	57,5545 Aa	38,4956 Ba	69,4054 Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Não houve diferença estatística para inibição de tripsina ao longo do tempo para plantas controle e plantas atacadas por ácaro com endossimbiontes. Entretanto para plantas atacadas por ácaro sem endossimbiontes a quantidade de tripsina inibida foi aumentando gradativamente, sendo o dia 0 igual ao 1° dia, e o 1° dia igual ao 7 ° dia, porém o 7 ° dia foi estatisticamente diferente do dia 0. Isso mostra que as plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes foram capazes de induzir uma significativa quantidade de inibidores de proteases ao longo do tempo (Figura 12). Os valores médios de inibidor de tripsina para plantas atacadas por ácaro não tratado apresentaram uma redução na quantidade de inibidor ao longo do tempo, apesar de estas médias não terem apresentado diferença estatística.

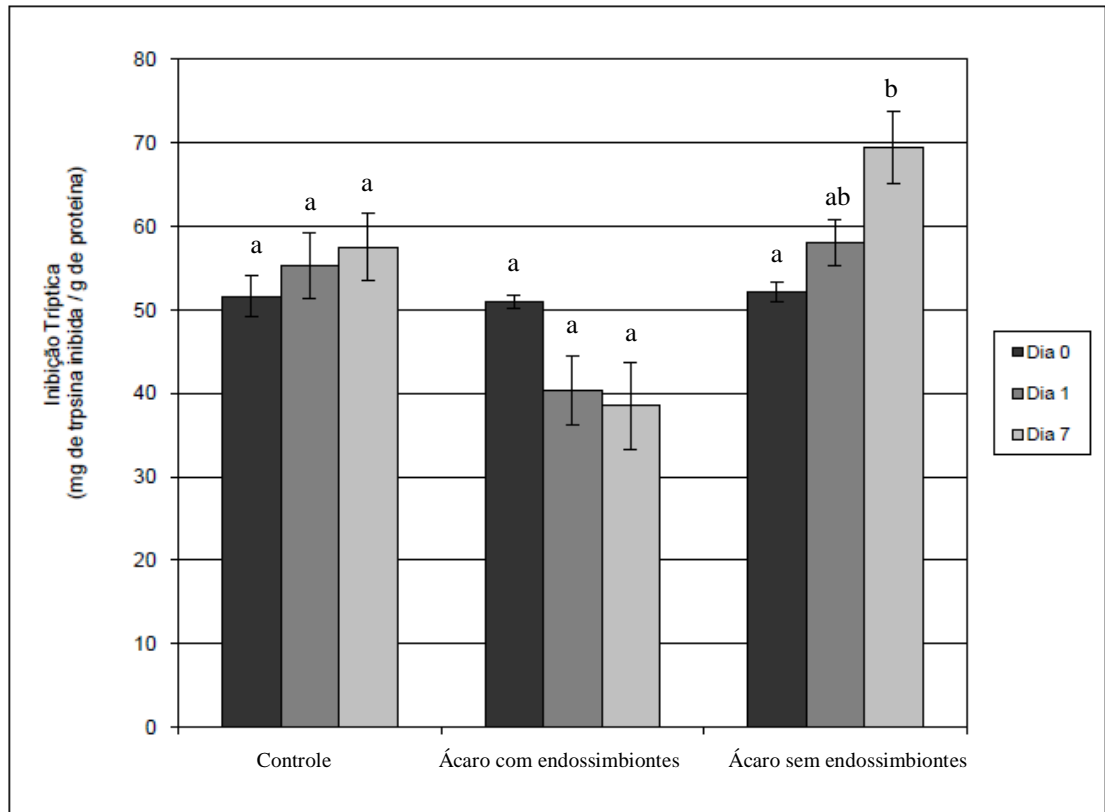


Figura 12. Inibição Triptica (mg de tripsina inibida/g de proteína), no decorrer dos dias de avaliação, para plantas limpas (controle), plantas atacadas por ácaros com endossimbiontes (*T. evansi* não tratado) e plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes (*T. evansi* tratado). Médias seguidas pela mesma letra em cada tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

No dia 0 não houve diferença estatística entre tratamentos para quantidade de tripsina inibida. Para os dias 1 e 7, plantas do tratamento controle e plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes foram estatisticamente iguais, entretanto diferiu-se das plantas danificadas por ácaro com endossimbiontes (Figura 13). Isso mostra que os ácaros com endossimbiontes suprimiram os níveis de inibidor produzidos pela planta. Sendo que os níveis dos inibidores de proteases foram inferiores aos de plantas que não foram atacadas pelo herbívoro (controle).

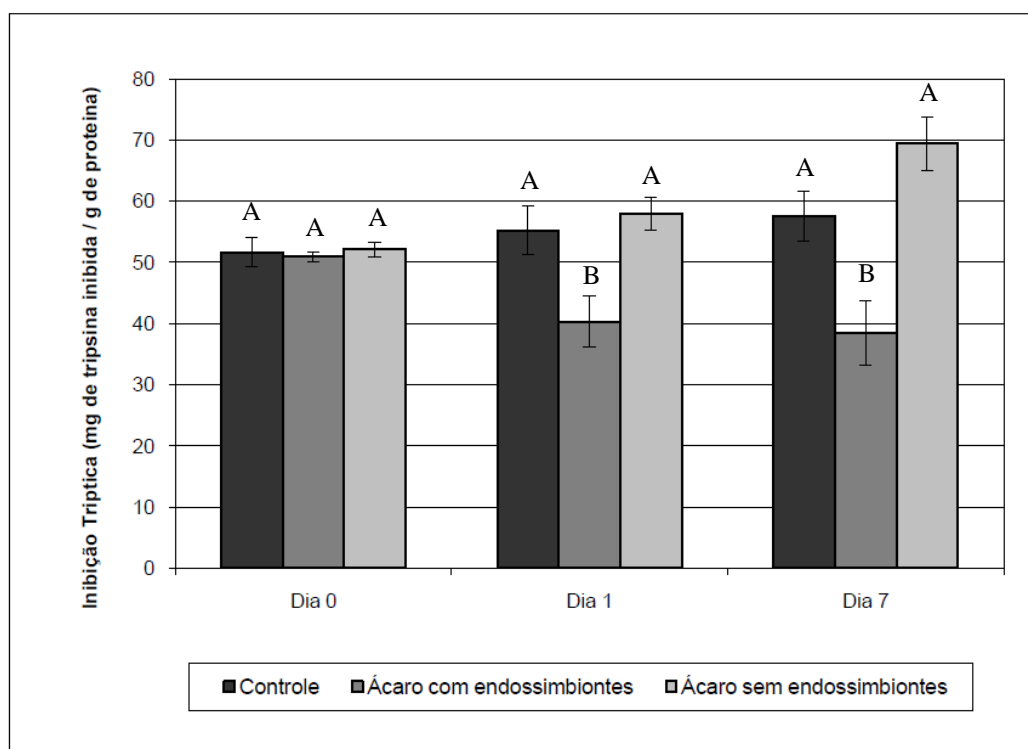


Figura 13. Inibição Tríptica (mg de tripsina inibida/g de proteína), em cada dia de avaliação, para plantas limpas (controle), plantas atacadas por ácaros com endossimbiontes (*T. evansi* não tratado) e plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes (*T. evansi* tratado). Médias seguidas pela mesma letra em cada dia avaliado não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Tem sido atribuído às lipoxigenases em plantas, além das funções de defesa, o envolvimento em processos de crescimento e desenvolvimento (HILDEBRAND, 1989; SIEDOW, 1991), senescência (ROUET-MAYER et al., 1992) e reserva vegetativa (TRANBARGER et al., 1991; BUNKER et al., 1995; STEPHENSON et al., 1998). Isso

justifica a atividade destas enzimas nas plantas limpas, que não receberam ataque de herbívoros. O aumento da atividade nestas plantas provavelmente esta relacionado a funções fisiológicas da planta.

No mecanismo de defesa vegetal, a rota octadecanóide resulta em aumento dos níveis de ácido jasmônico (AJ). O AJ é o hormônio vegetal que induz a expressão de genes relacionados à defesa da planta contra estresses. O início da sinalização para a biossíntese do ácido jasmônico se dá por meio de ligação de um peptídeo de 18 aminoácidos, chamado sistemina, a um receptor na membrana plasmática (FORTUNATO et al., 2004). Este processo envolve a interação de sinais extracelulares com receptores da membrana plasmática levando a ativação de lipases e com liberação do ácido linolênico dentro do citoplasma. O ácido linolênico é convertido pela via das lipoxigenases a ácido jasmônico (FARMER & RYAN, 1992).

No presente trabalho, plantas que foram atacadas pelo ácaro *T. evansi* com endossimbiontes bacterianos apresentaram baixos níveis de atividade para esta via de defesa, evidenciados pelos baixos níveis de atividade de lipoxigenases, que tiveram níveis de atividade quase constantes, apresentando discreto aumento. A pouca atividade dessas enzimas pode ser resultado da ausência de seus substratos, os ácido linolênico ou ácido linoléico. Os ácaros com endossimbiontes podem estar interferindo nos mecanismos de sinalização da planta, impedindo uma etapa anterior a indução de lipoxigenases.

Os ácaros que foram tratados com tetraciclina a 0,1 % e tiveram seus endossimbiontes bacterianos eliminados, apresentaram atividade de lipoxigenases crescente ao longo do tempo. Estes ácaros induziram a via de resposta ao estresse. Em processo de estresse, ocorre degradação sequencial de lipídeos pela lipoxigenases, estes formam hidroperóxidos de ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos (SILVA et al, 2001). Dentre eles, estão a traumatina, envolvida na resposta a ferimentos e na indução da divisão celular e formação de calos (SIEDOW, 1991); e o ácido jasmônico, associado à ativação de genes que codificam para a síntese de proteínas de reserva e inibidores de proteases (MELAN et al, 1993).

No 7 ° dia, os três tratamentos foram estatisticamente diferentes. Sendo que plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes apresentaram maior atividade de lipoxigenases comparados com o controle, e também pelas plantas atacadas por ácaros com endossimbiontes. Este fato evidencia que as bactérias podem estar interferindo nas

defesas da planta. Nomura e colaboradores (2006) relataram que bactérias tais como *Pseudomonas syringae* utilizam como estratégia ‘proteínas de virulência’ para eliminar componentes das vias de sinalização na parede celular da planta hospedeira e suprimir suas defesas.

Observou-se um aumento na produção de inibidores de proteases (IP) em plantas do tratamento controle e de ácaro sem endossimbiontes no decorrer dos dias de avaliação. No entanto, apenas em plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes obteve-se um aumento significativo (Figura 12). Esta maior concentração de IP está de acordo com a maior atividade de lipoxigenases nestas plantas, uma vez que no controle da atividade, sem a presença do herbívoro, a atividade não deve estar relacionada a funções de defesa. Ao contrário, as plantas submetidas aos ácaros com endossimbiontes apresentaram no 1º e 7º dias quantidades inferiores de tripsina inibida, em comparação ao dia 0, evidenciando uma redução nos níveis destes compostos (Figura 10).

As plantas do tratamento controle e plantas atacadas pelo ácaro sem endossimbiontes obtiveram uma maior inibição trípica em comparação às plantas atacadas por ácaro com endossimbiontes no 1º e 7º dia. Essa redução na quantidade de tripsina inibida em plantas atacadas por *T. evansi* foi descrita pela primeira vez por Sarmento e colaboradores (2011). Neste trabalho, os autores relataram que plantas atacadas por este ácaro apresentaram menos da metade da atividade de IP que foi observada para as plantas não atacadas. Além disso, esses ácaros tiveram altas taxas de oviposição e sobrevivência em plantas que foram previamente atacadas por ácaros da mesma espécie, quando comparado com plantas atacadas por *T. urticae*, um ácaro que tem sido relacionado com indução das defesas de plantas (KANT et al 2004). A alta taxa de oviposição em plantas previamente atacadas pelo ácaro *T. evansi* coincide com as plantas, que apresentaram baixos níveis de IP.

O nível de indução do gene WIPI-II, que é dependente de ácido jasmônico e ativado após ataque de herbívoros e patógenos foi avaliado por Sarmento e colaboradores (2011) em plantas atacadas pelo ácaro *T. evansi*, *T. urticae* e em plantas limpas. O ácaro *T. urticae* induziu expressivamente os níveis deste gene. Porém em plantas atacadas pelo ácaro *T. evansi* e plantas limpas não houve indução deste gene. Como a atividade de lipoxigenase é necessária para a biossíntese de ácido jasmônico, estes resultados estão de acordo com os baixos níveis de lipoxigenases encontrados nos tratamentos do presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

- Ácaros *T. evansi* apresentam uma maior diversidade de endossimbiontes bacterianos quando comparados aos ácaros *T. urticae*, sendo que a maioria das bactérias presentes nessas espécies, não cultivadas artificialmente em meio de cultura.
- A associação bactéria-ácaro não apresentou alterações maléficas ou benéficas no desenvolvimento e reprodução destes ácaros.
- Plantas atacadas por ácaros sem endossimbiontes aumentaram a atividade de lipoxigenase e inibidor de protease, conseqüentemente aumentando a defesa das plantas, indicando que esses ácaros têm a capacidade de induzir a defesa de plantas de tomateiro.
- O antibiótico tetraciclina a 0,1 % não apresentou efeito tóxico para os ácaros tratados por duas gerações. Este resultado permite, em trabalhos futuros, utilizar ácaros tratados na primeira geração, aumentando significativamente a praticidade na realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIBUS 2011: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2011.
- 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.
- AMMAN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Rev. Microbiol*, v.59, p.143-169, 1995.
- ARAGÃO, C. A.; MALUF, W. R.; DANTAS, B. F.; GAVILANES, M. L.; CARDOSO, M. D. Tricomas foliares associados a resistência ao ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch) em linhagens de tomateiro com alto teor de 2-tridecanona nos folíolos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.24, p.81-93, 2000.
- ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; BENITES, F.R.G. Efeito de aleloquímicos em tricomas foliares de tomateiro na repelência a ácaro (*tetranychus urticae* koch.) em genótipos com teores contrastantes de 2-tridecanona. *Acta bot. bras.*, v.16, n.1, p.83-88, 2002.
- ARIMURA, A.; KOST, C.; BOLANDT, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1734, p.91-111, 2005.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymol*, v.71, p.441-451, 1981.
- BAKER, E. W. & PRITCHARD, A. E. The tetranychid mites of Africa. *Hilgardia* v.29, p.455-574, 1960.
- BARR, A. R. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens* L. *Nature*, v. 283, p.71-72, 1980.
- 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. *Pesqui Agropecu Bras.*, v.37, p.1517-1524, 2002.
- BAUMANN, P. Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 49, p. 55-94, 1995.
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. Ecology individuals populations and communities. Blackwell Scientific Publications, Boston, 1996, 876 p.
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. *Ecology: from individuals to ecosystems*. 4 ed. Blackwell, Oxford., 2007.

- BLAIR, B.W. *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae): A New Pest of Tobacco in Zimbabwe. CORESTA *Phytopathology and Agronomy Study Groups*, Bergerac, France, p. 1-6, 1983.
- BOLLAND H R, GUTIERREZ J, FLECHTMANN C H W. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Boston, Köln, Brill, 1998, 392p.
- BOLLAND, H. R.; VALA, F. First record of the spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) from Portugal. *Entomol Berichten* 60, 2000, p.180.
- BONATO, O. The effect of temperature on life history parameters of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol*, v.23, p.11-19, 1999.
- BORDENSTEIN, S.R. & WERREN, J.H. Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*. *Heredity*, v.84 p.54-62, 1999.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- BREEUWER, J.A.J. *Wolbachia* and cytoplasmatic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity*, v.79, p.41-47, 1997.
- BREEUWER, J. A. J, STOUTHAMER, R., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., WEISBURG, W. G. AND WERREN, J. H. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera, Pteromalidae) based on 16 S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* v.1, p.25-36, 1992.
- BRODERICK, N.A.; ROBINSON, C.J.; MCMAHON, M.D.; HOLT, J.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K.F. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis* - induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biology*, v.7, p.11, 2009.
- BROWNLIE, J.C. AND JOHNSON, K.N. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends in Microbiology*, v.17, n.8 p. 348-354, 2009.
- 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.
- COSME, C.R.; DIAS, N.S.; OLIVEIRA, A.M.; OLIVEIRA, E.M.M.; NETO, O.N.S. Produção de tomate hidropônico utilizando rejeito da dessalinização na solução nutritiva aplicados em diferentes épocas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.15, n.5, p.499-504, 2011.
- CRUZ-LANDIM, C. Bacteria present in the intestinal tract of *Melipona quadrifasciata anthoioides* .Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *J. Hym. Res*, v.5, p.264-272, 1996.

- DALE, C.; MORAN, N.A. Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. *Cell* v.126, p. 453-465, 2006.
- DASCH, G. A. & E. WEISS. The genera Rickettsia, Rochalimaea, Ehrlichia, Cowdaria, and Neorickettsia, p. 2407–2470. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. 3. Springer-Verlag, New York, N.Y. 1992.
- DICKE, M.; VAN POECKE, R.M.P.; BOER, J.G. Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic Appl. Ecol.* v.4, p.27-42, 2003.
- DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* , v.49, p.71–92, 2004.
- EL-JAOUANI, N. Contribution à la connaissance des acariens phytophages au Maroc et étude bio-écologique det Tetranychus evansi Baker & Pritchard (Acarina: Tetranychidae). Thesis, Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II, Rabat, Morocco, 1988. 230p.
- ENIGL, M & SCHAUSBERGER, P. Incidence of the endosymbionts Wolbachia, Cardinium and Spiroplasma in phytoseiid mites and associated prey. *Exp Appl Acarol*, v.42, p.75–85, 2007.
- EPPO. Introduction of Tetranychus evansi in some mediterranean countries: Addition to the EPPO Alert List. EPPO Reporting Service, 5. 2004.
- FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound- inducible proteinase-inhibitors. *Plant cell*, v.4, p.129-134, 1992.
- FERRAGUT F, ESCUDERO. A Tetranychus evansi Baker & Pritchard (Acari, Tetranychidae), una nueva araña roja en los cultivos hortícolas españoles. *Bol San Veg Plagas*, v.25, p.157-164, 1999.
- FERREIRA,C.C.A.; OLIVEIRA, M.G.A.; OLIVEIRA, J.A.; ALMEIDA, F.T.; PIRES, C.V.; PIOVESAN, N.D.; MOREIRA, M.A. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à remoção dos primórdios florais. *Ciência e Agrotecnologia*, v.28, n.2, p.263-270, 2004.
- FLECHTMANN, C.H.W. Ácaros de importância agrícola. 6ª ed. São Paulo, Nobel, 1985. 189p.
- FORTUNATO, F.S.; OLIVEIRA,M.G.A.; BRUMANO,M.H.N.; ZANÚNCIO,J.C.; OLIVEIRA, J.A.; PILON, A. M.; ALMEIDA, F.T.; SEDIYAMA,C.S.; MOREIRA, M.A. Efeito da injuria causada por Anticarsia gemmatalis na atividade de lipoxigenase foliares de soja. *Biosci. J.*, v.20, n. 2, p. 37-46, 2004.
- GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*. v.156, p.145-169, 2002.

- GERSON, U. Webbing. In: HELLEW, SABELIS MW (eds) Spider mites: their biology, natural enemies and control. *Elsevier*, Amsterdam, p.223-232, 1985.
- GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett*, v. 155, p. 1–10, 1997.
- GOTOH, T.; NODA, H.; ITO, S. Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity*, v.98, p.13-20, 2007.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* v.43, p.701-726, 1998.
- GROOT, T.V.M. & BREEUWER, J.A.J. Cardinium symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Exp Appl Acarol*, v.39, p. 257–271, 2006.
- 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 BI OSCIENCE AND BI OENGINEERING © 2007, *The Society for Biotechnology*, v. 103, n. 4, p.358–367, 2007.
- HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Interações ecológicas entre as macrófitas aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes*. *Hoehnea*, v.32, n.3, p.445-452, 2005.
- 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.
- 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.
- HILDEBRAND, D.F. Lipoxygenases. *Physiol. Plantarum*, v.76, p.249-253, 1989.
- HILGENBOECKER, K., HAMMERSTEIN, P., SCHLATTMANN, P., TELSCHOW, A., WERREN, J.H. How many species are infected with Wolbachia? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* v.281, n.2, p.215-220, 2008.
- HOFFMANN, A.A.; HERCUS, M.; DAGHER, H. Population dynamics of the Wolbachia infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.148, p.221–231, 1998.
- 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.

- HOUK, E. J.; GRIFFITHS, G. W. Intracellular symbiotes of the Homoptera. *Annu. Rev. Entomol.* v.25, p.161-187, 1980.
- HUNTER, M.S., PERLMAN, S.J., KELLY, S.E. A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.Biol. Sci.* v.270, p.2185-2190, 2003.
- IWAMOTO, T.; NASU, M. Current Bioremediation Practice and Perspective. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 1-8, 2001.
- 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.
- 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.
- KARBAN, R.; I.T. BALDWIN. Induced responses to herbivory. Chicago, Univ. of Chicago Press, 1997. 275p.
- KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods*, v.58, p.169-188, 2004.
- KLEPZIG, K.D.; ADAMS, A.S.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K.F. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environ Entomol*, v.38, p. 67-77, 2009.
- KNAPP M, WAGENER B, NAVAJAS M. Molecular discrimination between the spider mites *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Afr Entomol*, v.11, p.300-304, 2003.
- 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.
- MCCREADIE, J.W.; BEARD, C. E.; ADLER, P.H. Context-dependent symbiosis between black flies (Diptera: Simuliidae) and trichomycete fungi (Harpellales: Legeriomycetaceae). *Oikos*, v.108, p.362-370, 2005.
- MEAD, L.J., KHACHATOURIANS, G.G. AND JONES, G.A. Microbial ecology of the gut in laboratory stocks of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.) (Orthoptera: Acrididae). *Appl Environ Microbiol*, v.54, p.1174-1181, 1988.
- MELAN, M.A., DONG, X., ENDARA, M.E., DAVIS, K.R., AUSUBEL, F.M., PETTERMAN, T.K. (1993). An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, 101:441-450.

- MENEZEZ, E.L.A.; AQUINO, A.M.; CORREIA; MENEZEZ, E.B. Ácaros: Taxonomia, Biotecnologia e sua Importância Agrícola. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicações/download/doc240.pdf>. Acessado em 01 de agosto de 2010.
- MEYER, M.K.P.S. African Tetranychidae (Acari: Prostigmata)-with reference to the World genera. *Entomology Mem.* v.69, 1987. 175p.
- MINGOCHI, D.S.; JENSEN, A. Pests and diseases in tomato cultivars in Zambia, their seasonal occurrence and possible control. *Acta Hort*, v.190, p.131-138, 1986.
- MORAES, G.J.; MCMURTRY, J. A Physiological effect of the host plant on the suitability of *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Entomophaga*, v.32, p.35-38, 1987.
- MORAES, G.J.; DE, FLECHTMANN, C.H.W. Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto, Holos Editora, 308p. 2008.
- MORAN, N.A., MCCUTCHEON, J.P., NAKABACHI, A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet.* v.42, p.165–190, 2008.
- 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.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITIERTLINDEN, 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.
- NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol.* 54: 276-289, 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
- ODUM, E.P. Fundamentals of ecology (3^a ed.) : W. B. Saunders, Comp. Philadelphia – London – Toronto, 1971.
- OHTA H, IDA S, MIKAMI B, MORITA Y Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol*, v.27, p.911-918, 1986
- OLIVEIRA, M.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.

- OLIVER, K.M.; RUSSELL, J.A.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.100, n.4, p.1803-1807, 2003.
- O'NEILL, S. L., GIORDANO, R., COLBERT, A. M. E., KARR, T. L. AND ROBERTSON, H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 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.
- PARACER, S., AHMADJIAN, V. Symbiosis: an introduction to biological associations. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 2000.
- PERLMAN, S.J.; MAGNUS, S.A.; COPLEY, C.R. Pervasive associations between Cybaeus spiders and the bacterial symbiont Cardinium. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.103, p.150-155, 2010.
- 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.
- 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.
- POSPIECH A, NEUMANN B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram positive bacteria. *Trends Genet*, v.11, p.217-218, 1995.
- PRICE, P. W.; BOUTON C E, GROSS P, MCPHERON B A, THOMPSON J N, WEIS A E. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annu Rev Ecol Syst*, v.11, p.41-65, 1980.
- 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 germanica*. *Insect Molecular Biology*, v.12, n.1, p.85-91, 2003.
- RELMAN, D. A. Ôtil death do us partô: coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology*. v.6, p.721-724, 2008.
- ROS, V.I.D.; BREEUWER, J.A.J. The effects of, and interactions between, Cardinium and Wolbachia in the doubly infected spider mite *Bryobia sarothamni*. *Heredity*, v.102, p.413-422, 2009.

- ROUBIK, D.W. Nest and colony characteristics of stingless bees from Panamá (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*. v.56, p.327-355, 1983.
- ROUET-MAYER, M., BUREAU, J., LAURIERI, C. Identification and characterization of lipoxygenase isoforms in senescing carnation petals. *Plant Physiol.*, v.98, p.971-978, 1992.
- ROUSSET,F.;BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P.; SOLIGNAC, M. Wolbachia endymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*. v. 250, p. 91 – 98, 1992
- ROUX, V., D. RAOULT. Phylogenetic analysis of the genus Rickettsia by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.*, v. 146, p. 385–396, 1995.
- RYAN C A. Protease inhibitors in plants - genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, v.28, p.425-449, 1990.
- SAKURAI, M.; KOGA, R.; TSUCHIDA,T.; MENG, X.; FUKATSU, T. Rickettsia Symbiont in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*: Novel Cellular Tropism, Effect on Host Fitness, and *Interaction with the Essential Symbiont Buchnera*. *Applied And Environmental Microbiology*, v.71, n.7, p. 4069–4075, 2005.
- 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.
- SARR, I., KNAPP, M., OGOL, C.K.P.O., BAUMGÄRTNER, J. Impact of Predators on *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard Populations and Damage on Tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Kenya. *International Congress of Acarology*. p.271, 2002.
- SAUNYAMA, I.G.M.;KNAPP, M. The effects of pruning and trellising of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on red spider mite (*Tetranychus evansi* Baker & Pritchard) incidence and crop yield in Zimbabwe. *Afri. Crop Sci. J*. v.11, p.269-277, 2003.
- SCARBOROUGH, C.L., FERRARI, J., AND GODFRAY, H.C. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, v.310, p.1781. 2005.
- SCHUSTER, M. F. Chemical control of *Tetranychus marianae* McGregor on tomatoes in the lower Rio Grande valley. *J Econ Entomol*, v.52, p.63-764, 1959.
- SCOTT, I.M.;THALER, J.S.; SCOTT, J.G. Response of a Generalist Herbivore *Trichoplusia ni* to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato. *J Chem Ecol*, v.36, p.490–499, 2010.

- SETUBAL, J.C.; SANTOS, P.; GOLDMAN, B.S. et al. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *Journal Of Bacteriology*, v.191, p. 4534-4545, 2009.
- SHIG-ENOBU, S.; WATANABE, H., HATTORU, M., SAKAKI, Y., AND ISHIKAWA, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, v.407, p. 81–86, 2000.
- SHIVAJI, R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J.H.; WILLIAMS, W.P.; WILKINSON, J.R.; LUTHE, D.S. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. *J Chem Ecol*, v.36, p.179–191, 2010.
- SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.42, p.145-188, 1991.
- SILVA, D.J.H.; FONTES, P.C.R.; MIZUBUTI, E.S.G.; PICANÇO, M.C. Tomate. In: EPAMIG (Org). 101 Culturas: Manual de tecnologia Agrícolas. Belo Horizonte, Epamig, 2007. 735-750.
- SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. Tomate para processamento industrial. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças. 2000, 168p.
- SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M. C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. *Biotecnol Cienc e Desenvol*, v.12, p.38-42, 2000.
- SILVA, M.D. DA.; OLIVEIRA, M.G. A.; LANNA, A.C.; PIRES, C.V.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C.; BATISTA, R.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a diáfora *phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(3): 316-328, 2001.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. Mycorrhizal Symbiosis. 2.ed. Academic Press, 605p, 1997.
- STEINHAUS, E.A. The importance of environmental factors in the insect-microbe ecosystem. *Archives of Bacteriological Reviews.*, 24: 365-373, 1960.
- STEPHENSON, L.C., BUNKER, T.W., DUBBS, W.E., GRIMES, H.D. Specific soybean lipoxygenases localize to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. *Plant Physiol.*, v.116, p.923-933, 1998.
- STOTZ, H.U.; KROYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T. Plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. v.2, p.268–272. 1999.

- STOUTHAMER, R.;BREEUWER, J. A. J.;LUCK, R. F.; WERREN, J. H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*. v. 361, p. 66-68, 1993
- TRANBARGER, T.J.;FRANCESCHI, V.R., HILDEBRAND, D.F., GRIMES, H.D. (1991). The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell.*, 3:973-987.
- VILLAS BOAS, G.L.;MELO, P.E.;BRANCO, M.C.; GIODANO, L.B.;MELO, W,F. Desenvolvimento de um modelo de produção integrada de tomate indústria- PITI. .In : ZAMBOLIM,L; LOPES,C,A; PICANÇO,M,C; COSTA,H,E. Manejo Integrado De Doenças e Pragas Hortalça: . Viçosa: : Suprema Gráfica e Editora Ltda , 2007. p.349-362.
- VILLAS BOAS, G.L.;FRANÇA, F.H.;ÁVILA, A.C.;BEZERRA, I.C.. Manejo integrado da mosca branca *Bemisia argentifolli*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 11p. (Circular Técnica, n.9).
- 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.
- 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 gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Biochemistry*, 102: 147-153, 2005.
- WALKER, A.J.; GLEN, D.M & SHEWRY, P.R. Bacteria associated with the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* are not required for protein digestion. *Soil Biology and Biochemistry*, v.31, p.1387-1394, 1999.
- 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.
- WERREN, J.H.; BALDO, L., CLARK, M.E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. v.6, p.741–751, 2008.
- WU, D., DAUGHERTY, S.C., VAN AKEN, S.E., PAI, G.H., WATKINS, K.L., KHOURI, H., TALLON, L.J., ZABORSKY, J.M., DUNBAR, H.E., TRAN, P.L. Metabolic complementarity and genomics of the dual symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.* v.4 E188, 2006.