

## Inibidores de protease não explicam defesa induzida direta ao ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) em morangueiro\*

P. S. ARGOLO, H. G. OLIVEIRA, M. A. M FADINI, E. F. OLIVERIA, M. G. A. OLIVEIRA, A. PALLINI

As plantas ao reconhecerem o ataque de fitófagos ativam seu sistema de defesa, que pode ocorrer de forma direta ou indireta. Visando aprimorar o controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae*, neste trabalho foi estudado o efeito da defesa induzida direta sobre o desempenho populacional de coespecíficos em plantas de morango. Uma vez que, este ácaro é uma das principais pragas do morangueiro. Com o intuito de induzir a produção de substâncias de defesa, foram utilizadas para os ensaios plantas de morangueiro previamente atacadas pelo ácaro rajado, plantas injuriadas mecanicamente e plantas não atacadas (controle). Adicionalmente, foi determinada a concentração de inibidores de proteases em amostras de folhas coletadas de cada tratamento. A flutuação populacional de *T. urticae* foi menor nas plantas previamente atacadas, diferindo dos demais tratamentos. A infestação prévia em plantas de morangueiro com o ácaro *T. urticae*, induziu a produção de inibidores de proteases por essas plantas, que por sua vez, promoveu o decréscimo populacional deste fitófago. As plantas quando injuriadas mecanicamente apresentam maior concentração de inibidores de proteases do que os demais tratamentos, no entanto, o número de ácaros nesse tratamento não correspondeu a essa resposta. É discutida, então, a importância da infestação prévia no controle de populações de ocorrência posterior na planta e a possibilidade de outros compostos bioquímicos terem sido induzidos por esses fitófagos.

P. S. ARGOLO\*\*, H. G. OLIVEIRA, M. A. M FADINI, E. F. OLIVERIA, M. G. A. OLIVEIRA, A. PALLINI. Unidad de Entomología IVIA. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, IVIA, Ctra. Moncada-Náquera Km. 4,5. 46113 Moncada, Valencia.  
\*\*E-mail: [pargolo@ivia.es](mailto:pargolo@ivia.es)

**Palavras chave:** ácaros fitófagos, defesa de plantas, protease.

### INTRODUÇÃO

As plantas induzem modificações físicas e químicas no tecido vegetal após serem injuriadas por fitófagos (KARBAN & BALDWIN, 1997; AGRAWAL, 2000). Tais modificações, quando aumentam a aptidão (=fitness) das plantas, podem ser divididas em defesa direta ou indireta (PICKETT, 1999; HOWE & SCHALLER, 2008). As defesas induzidas diretas

reduzem a qualidade nutricional da planta ou atuam como deterrentes e tóxicos alimentares, ocasionando menor performance da população do fitófago. As defesas induzidas indiretas aumentam a chance de ocorrência de populações de inimigos naturais sobre as plantas atacadas através de sinalização por voláteis, podendo reduzir a população do fitófago (KARBAN & BALDWIN, 1997).

\* Parte da dissertação da primeira autora apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, financiada pela CAPES.

Em resposta ao ataque dos fitófagos, os mecanismos de defesa induzida direta com ação antinutricional podem atuar na pré-ingestão ou na pós-ingestão. As plantas hospedeiras na fase da pré-ingestão dos fitófagos limitam a oferta do alimento através da formação de barreiras físicas, fortalecimento da parede celular ou produção de compostos repelentes aos fitófagos. Na pós-ingestão, o alimento perde seu valor nutritivo através da remoção de nutrientes essenciais e/ou da inibição de enzimas digestivas dos fitófagos. Nesta categoria estão incluídos os inibidores de proteases (IPs)  $\alpha$ -amilase, enzimas oxidativas (p.e. mironases, peroxidases, lipoxigenases), proteínas tóxicas como lectinas e arcelinas e metabólitos secundários (KOIWA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2005; CHEN, 2008). Dentre esses compostos, os IPs atuam dificultando a digestão das proteínas e a assimilação de nutrientes no intestino, afetando o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos fitófagos (VILA *et al.*, 2005; MARSARO *et al.*, 2006). A interferência negativa da ingestão de inibidores de proteases já foi verificada sobre o desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) (POMPERMAYER *et al.* 2003); de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (OLIVEIRA *et al.* 2005) e de *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) (MURDOCK *et al.*, 1988). Poucos são os registros para ácaros. Um exemplo é o ataque do ácaro-vermelho *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) ao tomateiro que induz o aumento da concentração do inibidor de protease tripsina-like no tecido vegetal (SARMENTO, 2007).

O sistema em estudo formado por plantas de morango *Fragaria x ananassa* e pelo ácaro-rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), espécie polífaga e praga-chave na cultura, foi observado em trabalhos anteriores (FADINI *et al.*, 2004) que o ataque prévio não alterou os parâmetros biológicos do ácaro na reinfestação. Tal resultado contradiz resultados encontrados na literatura. Sabe-se que a defesa induzida em morangueiro caracteriza-

se pelo aumento quantitativo e/ou qualitativo de defesas químicas ou físicas, resultando na redução da taxa de herbivoria (KIELKIEWICZ, 1988). Entretanto, não há estudos que investigaram o efeito dos danos causados por *T. urticae* na indução de respostas de defesa, como o acúmulo de inibidores de proteases em plantas de morango. E também, como os mecanismos de defesa atuam sobre os parâmetros biológicos de *T. urticae* (GREEN *et al.* 1987, KIELKIEWICZ 1988, SHANKS & DOSS 1989, STEINITE & LEVINSH 2002, FADINI *et al.* 2004). Espera-se, então, identificar mecanismos dos inibidores de protease em planta de morangueiro atacadas por *T. urticae*.

Objetivou-se avaliar a resistência induzida direta em morangueiro *F. ananassa* atacado pelo ácaro-rajado *T. urticae*. Testou-se a hipótese que a infestação prévia induz inibidores de proteases que afetam o crescimento populacional de *T. urticae* teria em infestação subsequente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Criações estoques

As criações do ácaro-rajado *T. urticae* foram iniciadas a partir de coletas de espécimes realizadas em plantios comerciais de morango nos municípios de Barbacena, Caldas e Pouso Alegre, Estado de Minas Gerais. As criações foram mantidas em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* DC.), cultivadas em vasos plásticos de 2.0 l, dentro de gaiolas de madeira recobertas com tecido organza para evitar a entrada de outros artrópodes, em casa-de-vegetação na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Viçosa, MG (13-38 °C, 40-60% UR, 13:11 L:D).

### Defesa induzida direta em morangueiro

Para avaliar a possibilidade da indução de defesa direta em morangueiro estudou-se a

flutuação populacional de *T. urticae* em reinfestações e a atividade dos inibidores de proteases nas folhas de plantas de morango. Foram utilizadas um total de 60 plantas de morangueiro da cultivar tradicional IAC Campinas com três meses de idade e com uma média de três folhas compostas formadas. Os morangueiros foram cultivados em vasos de 2,0 L, em pratos com água e mantidos em casa-de-vegetação (13-38 °C, 40-60% UR, 13:11 L:D). Ainda assim, para evitar o acesso de ácaros e insetos, as plantas foram mantidas sobre estrados de madeira, sob uma estrutura montada com ferro galvanizado e recoberta com tecido organza. Em cada estrutura era mantido apenas um tratamento. Vinte plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: i) Pré-infestação com *T. urticae* - submetidas à infestação de 20 fêmeas adultas de *T. urticae* por dez dias; ii) Injúria mecânica - folhas perfuradas por um conjunto de vinte alfinetes entomológicos montados em um disco plástico e, iii) Controle - plantas com folhas que não sofreram ataque de *T. urticae* e injúria mecânica.

Para a avaliação da atividade dos inibidores de proteases, foi isolada uma folha trifoliada em cada planta por meio de uma malha fina (organza) e cordão. Na base do pecíolo de cada folha foi colocada cola entomológica para evitar o acesso de ácaros. O mesmo procedimento foi realizado em todos os tratamentos.

Nas plantas de pré-infestadas, 20 fêmeas adultas de *T. urticae* foram transferidas das criações em feijoeiro para cada planta de morango utilizando-se pincel de cerdas finas. Decorridos dez dias da infestação, as folhas previamente isoladas de cada planta foram retiradas e utilizadas para a determinação dos níveis de inibidores de proteases. Após a coleta das folhas para análise, a população de *T. urticae* remanescente sobre as plantas pré-infestadas foi exterminada, aplicando-se o produto Organic Neem® (2% A/L, Dalneem), dose recomendada (3.262 ppm do ingrediente ativo azadiractina). Tal aplicação não só foi realizada nas plantas pré-infestadas, como também nas plantas

controle e injuriadas mecanicamente, para manter as mesmas condições experimentais. Após cinco dias da aplicação do produto, infestou-se com cinco fêmeas adultas de *T. urticae* folha recém formada. Tal procedimento teve por objetivo manter constante a qualidade nutricional do alimento oferecido ácaros na infestação subsequente (=reinfestação). As fêmeas permaneceram sobre as plantas de morangueiro por 15 dias. O número de *T. urticae* nas folhas recém formadas e infestadas foi avaliado diariamente com o auxílio de lupa manual (10x).

### Inibidores de protease

O extrato foliar das plantas de morangueiro foi obtido a partir da amostra de um folíolo não danificado, das folhas previamente isoladas, de cada uma das 20 plantas de cada tratamento: plantas pré-infestadas, injuriadas mecanicamente e controle. As folhas retiradas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. No Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da Universidade Federal de Viçosa, o preparo do extrato bruto foi realizado a 4 °C (OHTA *et al.* 1986). No laboratório, as folhas foram pesadas e trituradas com auxílio do almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão 0,1M Tris-HCl, pH 8,2 e 20mM CaCl<sub>2</sub>; 1:3 (p/v), e em seguida centrifugado a 17.200 g por 60 minutos a 4 °C (BATISTA *et al.*, 2002). O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi coletado e utilizado para a determinação da concentração de proteína total e da concentração de inibidores de proteases.

A presença de inibidores no extrato foliar foi determinada utilizando-se tripsina purificada. A determinação da atividade trípica baseou-se no seguinte procedimento analítico: 50 µL do extrato; 500 µL de Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio; e 50 µL da solução de tripsina 4,7 xM foram adicionados em um tubo de ensaio. Para o controle da enzima, foram adicionados a outro tubo de ensaio, 550 µL

de Tris-HCl 0,1M; pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio; e 50 µL da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M. A mistura contida em cada tubo (teste e controle da enzima) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, 500 µL dessa mistura e do respectivo controle foram retirados e adicionados a outro tubo contendo 500 µL Tris-HCl 0,1M; pH 8,2 contendo 20 mM de cloreto de cálcio; e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorbância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas em triplicatas.

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

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

Em que: *A* = absorbância em 410 nm do padrão – 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 µL de tripsina ativa sobre o substrato L-BApNA dará a leitura de absorbância em 410 nm de 0,019 (KAKADE *et al.*, 1974).

### Análises estatísticas

Utilizando valores médios das formas móveis dos ácaros encontrados em uma folha amostrada/planta somando-se 20 plantas por tratamento, foi possível comparar o efeito do tratamento durante toda a dinâmica populacional observada no experimento. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados relativos ao número médio de ácaros, *T. ur-*

*ticae* foram transformados em Log<sub>x</sub> para estabilizar a variância. Utilizou-se o sistema estatístico R (R Development Core Team, 2006) para a Análise de Covariância (ANCOVA), tendo o tempo como covariável, seguido pelo teste Tukey a 5% de significância (CRAWLEY, 2007). Os dados de quantidade de tripsina inibida foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Tukey a 5% de significância.

### RESULTADOS

O número de ácaros *T. urticae* na re-infestação foi menor em plantas de morangueiro pré-infestadas com o coespecífico do que em plantas de morangueiro injuriadas mecanicamente e controle (Figura 1) ( $P < 0,05$ ). O tempo, covariável da análise, apresentou efeito significativo sobre a variável dependente, número de ácaros medido na reinfestação do coespecífico ( $P < 0,05$ ).

Em teste de comparação de médias, o número médio de ácaros *T. urticae* em plantas pré-infestadas foi significativamente menor ( $21,43 \pm 3,5$ ) que os demais tratamentos (Figura 2). Não foi observada diferença significativa no número médio de *T. urticae* entre as plantas injuriadas mecanicamente ( $48,43 \pm 4,4$ ) e as plantas controle ( $34,05 \pm 9,2$ ) (Figura 2) ( $P < 0,05$ ).

Diferenças significativas nas concentrações de inibidores de proteases foram observadas entre plantas de morangueiro injuriadas mecanicamente, pré-infestadas com *T. urticae* e o controle ( $P < 0,05$ ) (Figura 1). As maiores concentrações de inibidores de proteases foram encontradas nas plantas injuriadas mecanicamente [ $192,20 \pm 13,98$  tripsina inibida (mg)/proteína(g)], seguidas das plantas pré-infestadas com *T. urticae* [ $154,08 \pm 8,09$  tripsina inibida (mg)/proteína(g)], e das plantas controle [( $61,11 \pm 7,96$  tripsina inibida (mg)/proteína(g)] (Figura 3) ( $P < 0,05$ ).

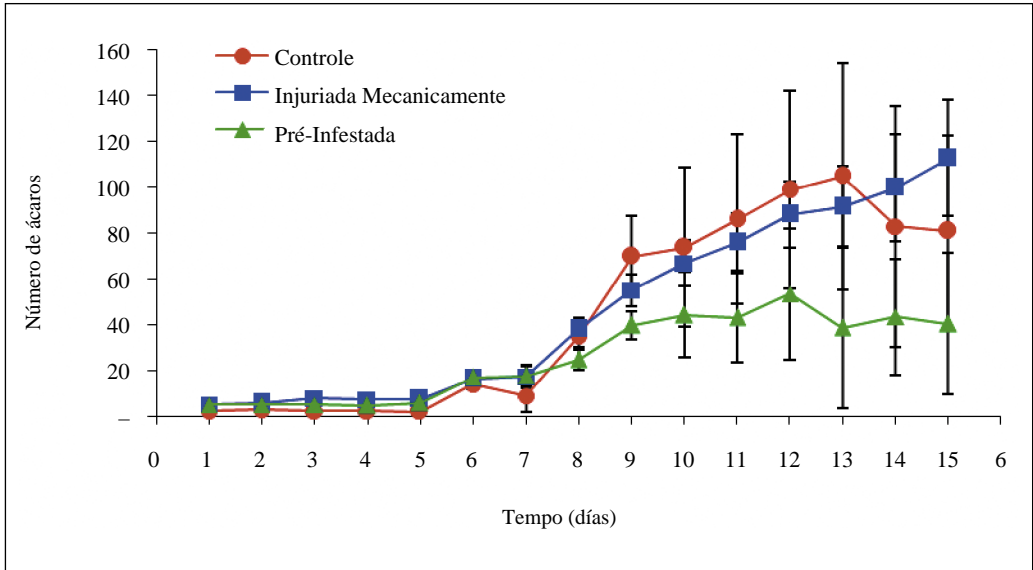


Figura 1. Número de indivíduos do ácaro rajado *Tetranychus urticae* por plantas de morangueiro controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas com o coespecífico ao longo do período de avaliação estudado, mantidas em casa-de-vegetação sob condições controladas (13-38 °C, 40-60% UR, 13:11 L:D)

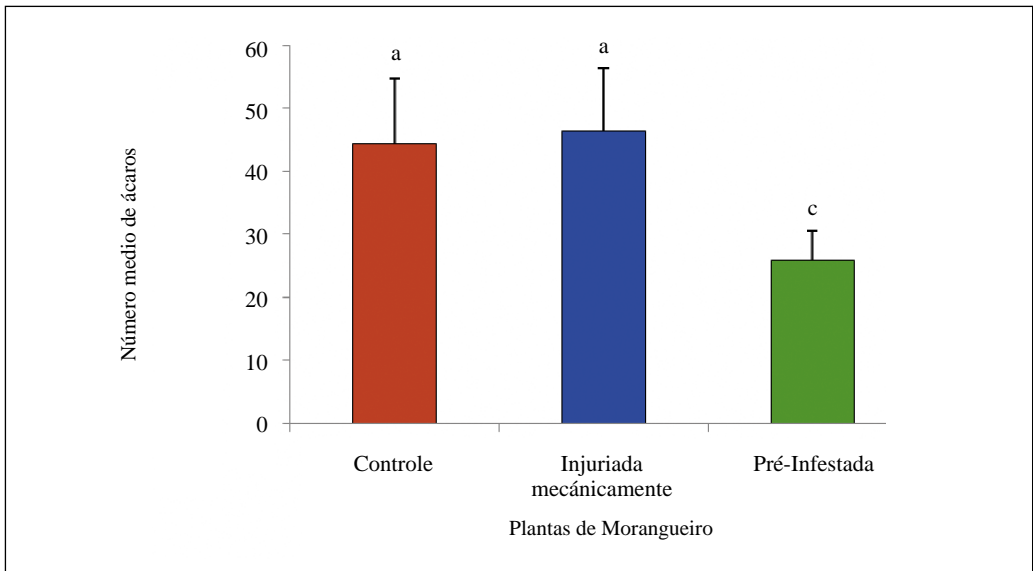


Figura 2. Número médio ( $\pm$  D.P.) do ácaro rajado *Tetranychus urticae* por planta de morangueiro relativo ao período de avaliação, para os tratamentos: controle, injuriadas mecanicamente e pré-infestadas com o coespecífico, mantidas em casa-de-vegetação sob condições controladas (13-38 °C, 40-60% UR, 13:11 L:D). Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

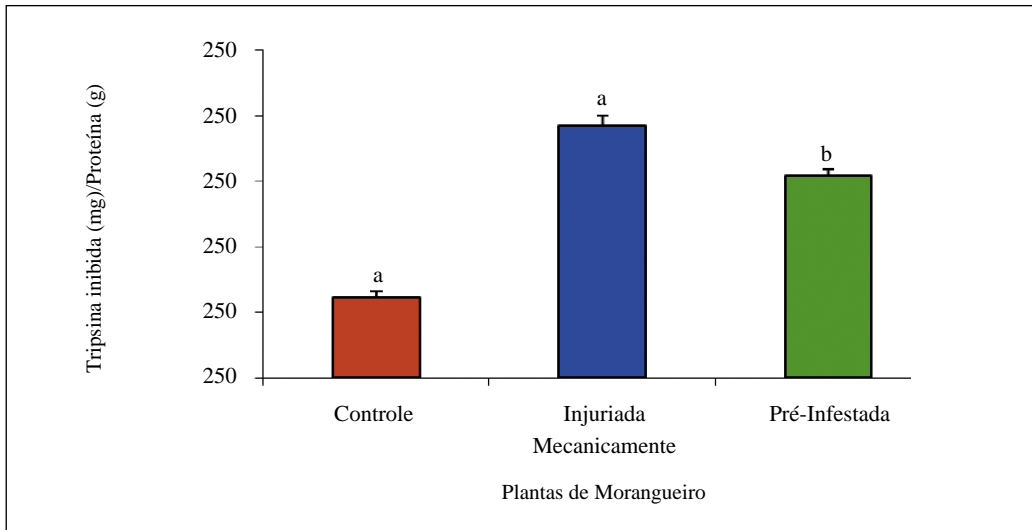


Figura 3. Quantidade média ( $\pm$  D.P.) de tripsina inibida (mg)/proteína(g) presente no extrato foliar de plantas de morangueiro controle, injuriadas mecanicamente e plantas pré-infestadas com o ácaro rajado *Tetranychus urticae*. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

## DISCUSSÃO

O número médio de *T. urticae* sobre plantas pré-infestadas foi menor do que em plantas controle e injuriadas mecanicamente. Isso indica que a infestação em plantas de morangueiro, provocou a redução do crescimento populacional de *T. urticae* em plantas de morangueiro previamente infestadas por este fitófago. Segundo Karban y BALDWIN (1997) reduções no crescimento populacional de plantas previamente infestadas são provocadas pela produção de compostos de defesa pelo sistema de defesa induzido das plantas como uma resposta a ação do fitófagos.

Em termos de plantas de morangueiro resultados divergentes têm sido encontrados por diferentes autores. FADINI *et al* (2004) não encontraram diferenças na densidade populacional de *T. urticae* que passaram por duas gerações sobre plantas limpas (controle) e plantas previamente atacadas. Porém estes autores argumentaram que os resultados encontrados poderiam estar relacionados com a metodologia aplicada. OLIVEIRA *et al* (2009) demonstraram que plantas de morangueiro previamente atacadas por *T. urticae*

foram mais atrativas ao ácaro predador *Phytoseiulus macropilis* em experimentos de olfatometria em laboratório e em casa de vegetação. Estes autores concluíram que os resultados encontrados se deviam a ativação do sistema de defesas dessas plantas que passavam a produzir compostos de defesa que tanto agem na atração dos predadores como também agem para diminuir a produção do crescimento populacional dos fitófagos.

Pelos resultados encontrados nesse trabalho, possivelmente os compostos que provocam a diminuição do crescimento populacional de *T. urticae* em plantas pré-infestadas de morangueiro são os inibidores de protease em folhas de morangueiro. Proteases são enzimas presentes no intestino médio dos artrópodes que realizam a degradação da proteína do alimento ingerido. Uma vez que a enzima é inibida, a assimilação de nutrientes pelos fitófagos é reduzida e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos fitófagos é afetado. POMPERMAYER *et al* (2003) verificaram a interferência negativa da ingestão de inibidores de proteases sobre o desenvolvimento de lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). OLIVEI-

RA *et al.* (2005) obtiveram resultados positivos utilizando o inibidor de protease SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor) contra a lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Outros estudos também têm demonstrado o efeito anti-nutricional desses inibidores contra espécies da ordem Coleoptera (*Callosbruchus maculatus* Fabricius) (MURDOCK *et al.*, 1988).

SHANKS & DOSS (1989) observaram em plantas de morangueiro previamente infestadas por *T. urticae* o decréscimo no número de indivíduos da população seguinte, explicado por possíveis mudanças ocorridas nas plantas tornando-as menos adequadas aos ácaros. Esse fato também foi observado por KARBAN & CAREY, (1984), que verificaram que plantas de algodão previamente infestadas por *Tetranychus turkestanii* Ugarov & Nikolski se mostraram inadequadas a esse fitófago na população futura. Entretanto, esses trabalhos não apresentaram avaliações das possíveis modificações bioquímicas e morfológicas das plantas de morangueiro induzidas pelo ataque de *T. urticae* que as tornassem mais resistentes em reinfestações do coespecífico. Desse modo o presente trabalho é o primeiro a avaliar o efeito de inibidores de protease sobre a biologia de ácaros fitófagos em plantas de morangueiro.

Espera-se encontrar maior concentração de inibidores de proteases em plantas pré-infestadas com *T. urticae*, uma vez que esse tipo de defesa se caracteriza por ser induzida pela ação de herbivoria sobre as plantas. Entretanto, aumento na produção de inibidores de enzimas digestivas em algumas plantas devido à ação de injúrias mecânicas, stress ou dano físico às células vegetais. Estes fatores provocam degra-

dação sequencial de lipídeos, possivelmente pela ação das enzimas lipoxigenases (FARMER & RYAN, 1992; VIEIRA *et al.*, 2001). Possivelmente esta tenha sido a explicação pela concentração elevada de inibidores de protease encontrada nas plantas injuriadas mecanicamente no presente trabalho.

As lipoxigenases vegetais são isoenzimas que estão envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, tais como o ácido traumático, o ácido jasmônico e aldeídos voláteis (ANDERSON *et al.*, 1989; BUNKER *et al.*, 1995). O ácido jasmônico está associado à ativação de genes que codificam para a síntese de inibidores de proteases (ANDERSON *et al.*, 1989; FORTUNATO *et al.*, 2007). Sugere-se, portanto que em virtude da injúria causada pelos alfinetes, maior nível de inibidores foi verificado nessas plantas. VIEIRA *et al.* (2001) também obtiveram aumento dos níveis de inibidores de enzimas lipoxigenases em plantas de soja submetidas à injúria mecânica nas folhas.

Pelos resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que plantas de morangueiro atacadas por *T. urticae* tem aumentada a concentração de inibidores de protease nas suas folhas. Estes provocam redução da geração seguinte deste fitófago sobre plantas previamente atacadas. Outro importante passo a ser dado nesta linha de pesquisa é a identificação dos inibidores de proteases e a possível sintetização dos mesmos em laboratório visando à aplicação destes produtos em campo para o controle de *T. urticae* sobre plantas de morangueiro. Isto contribuiria para uma produção limpa, diminuindo o risco de contaminação de consumidores, trabalhadores e conseqüentemente diminuiria a contaminação do meio ambiente pela aplicação de pesticidas sintéticos.

#### RESUMEN

ARGOLO, P. S., H. G. OLIVEIRA, M. A. M. FADINI, E. F. OLIVERIA, M. G. A. OLIVEIRA, A. PALLINI. 2010. Inibidores de proteasas no explican la defensa inducida directa a araña roja *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) en plantas de fresa. *Bol. San. Veg. Plagas*, **36**: 139-147.

Hay que indicar, por una parte, que las plantas, al ser dañadas por fitófagos, activan sus sistemas de defensa que pueden ser de dos tipos: directos o indirectos. Por otra parte, la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) es una de las principales

plagas de la fresa. En función de lo anterior, para tratar de mejorar el control de este fitófago plaga, se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de las respuestas inducidas en plantas de fresa, previamente atacadas, sobre el desarrollo de sus coespecíficos. En los ensayos se utilizaron plantas de fresa previamente dañadas por araña roja, plantas lesionadas mecánicamente y plantas no dañadas (control). Igualmente, se determinó la concentración de inhibidores de proteasas de muestras de hojas recolectadas de cada uno de dichos tratamientos. En los resultados se ha encontrado que el nivel de población de *T. urticae* fue menor en las plantas previamente infestadas, difiriendo significativamente de los demás tratamientos (lesiones mecánicas y control); en estas plantas, se detectó la producción de inhibidores de proteasas y, conjuntamente, las mismas presentaron la menor población de estos fitófagos. A su vez, las plantas que fueron sometidas al tratamiento de lesiones mecánicas, aunque presentaron el mayor valor de la concentración de inhibidores de proteasas, soportaron un nivel de población alto, similar al control. Estos resultados se incluyen y discuten en el presente trabajo; conjuntamente con la importancia que puede tener la infestación previa en el control de poblaciones de esta plaga en posteriores infestaciones. Igualmente, se discute la posibilidad de que existan otros compuestos bioquímicos inducidos por el fitófago que puedan jugar un papel en la dinámica de sus poblaciones.

**Palabras clave:** arañas, defensa de plantas, proteasas.

#### ABSTRACT

ARGOLO, P. S., H. G. OLIVEIRA, M. A. M. FADINI, E. F. OLIVERIA, M. G. A. OLIVEIRA, A. PALLINI. 2010. Proteases Inhibitors do not explain the direct induced defense to the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) in strawberry. *Bol. San. Veg. Plagas*, **36**: 139-147.

The plants when recognize the attack by phytophagous, activate its defense system that may occur directly or indirectly. It is known that the spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) is a major pest of strawberry. To improve the control of this phytophagous, we studied the effect of induced responses of strawberry plants previously attacked on the performance of co-specifics. For the assays, we used strawberry plants previously attacked by spider mite, plants mechanically injured and plants not attacked. Additionally, we determined the concentration of protease inhibitors on leaf samples collected from each treatment. The population dynamics of *T. urticae* was lower in plants previously attacked from the other treatments. A previous infestation of strawberry plants with *T. urticae* induced the production of protease inhibitors in these plants which then, promoted the decline of population phytophagous. Plants mechanically injured presented a higher concentration of protease inhibitors, than the other treatments; however, the number of mites in this treatment did not correspond to that answer. It is discussed, the importance of previous infestation in the control of a posterior population in the plant and the possibility of other biochemical compounds have been induced by these phytophagous.

**Keywords:** Phytophagous mites, plant defense, protease.

#### REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. A. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **3** (4): 329-335.
- ANDERSON, J. M., SPILATRO, S. R., KLAUER, S. F., FRANCESCHI, V. R. 1989. Jasmonic acid-dependent increase in the level of vegetative storage proteins in soybean. *Plant Science*, **62** (1): 45-52.
- BATISTA, R. B., OLIVEIRA, M. G. D. A., PIRES, C. V., PIOVESAN, N. D., REZENDE, S. T. D., MOREIRA, M. A. 2002. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **37**: 1517-1524.
- BRADFORD, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2): 248-254.
- BUNKER, T. W., KOETJE, D. S., STEPHENSON, L. C., CREELMAN, R. A., MULLET, J. E., GRIMES, H. D. 1995. Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase messenger-RNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low *Plant Cell*, **7** (8): 1319-1331.



- CHEN, M. S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, **15** (2): 101-114.
- CRAWLEY, M. J. 2007. *The R book*. John Wiley & Sons, West Sussex. 942 pp.
- FADINI, M. A. M., LEMOS, W. P., PALLINI, A., VENZON, M., MOURÃO, S. A. 2004. Herbivoria de *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae) induz defesa direta em morangueiro? *Neotropical Entomology*, **33** (3): 293-297.
- FARMER, E. E., RYAN, C. A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase-inhibitors *Plant Cell*, **4** (2): 129-134.
- FORTUNATO, F. S., OLIVEIRA, M. G. A., BRUMANO, M. H. N., SILVA, C. H. O., GUEDES, R. N. C., MOREIRA, M. A. 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). *Journal of Pest Science*, **80** (4): 241-247.
- GREEN, R. H., M. R. BUTCHER, D. R. PENMAN, R. R. SCOTT. 1987. Population dynamics of two-spotted spider mite in multiple year strawberry crops in Canterbury. *New Zeal. J. Zool.* **14**: 509-517.
- HOWE, G. A., SCHALLER, A. 2008. Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. p.7-29 In.: Schaller, A (ed). Induced plant resistance to herbivory. *Springer Science Business Media*. 462 p.
- KAKADE, M. L., RACKIS, J. J., MCGHEE, J. E., PUSKI, G. 1974. Determination of Trypsin-Inhibitor Activity of Soy Products - Collaborative Analysis of an Improved Procedure. *Cereal Chemistry*, **51** (3): 376-382.
- KARBAN, R., BALDWIN, I. T. 1997. *Induced Response to Herbivory*. The University of Chicago Press, Chicago. 317 pp.
- KARBAN, R., CAREY, J. R. 1984. Induced Resistance of Cotton Seedlings to Mites. *Science*, **225**: 4657, 53-54.
- KIELKIEWICZ, M. 1988. Susceptibility of previously damaged strawberry plants to mite attack. *Entomol. Exp. Appl.* **47**: 201-203.
- KOIWA, H., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, **2**: 379-384.
- MARSARO, A. L., MOURÃO, M., PAIVA, W. R. S. C. D., BARRETO, H. C. D. S. 2006. Inibidores de enzimas digestivas de insetos-praga. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais*, **4** (1): 57-61.
- MURDOCK, L. L., SHADE, R. E., POMEROY, M. A. 1988. Effects of E-64, a cysteine proteinase-inhibitor, on cowpea weevil growth, development and fecundity. *Environmental Entomology*, **17** (3): 467-469.
- OHTA, H., IDA, S., MIKAMI, B., MORITA, Y. 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedlings during germination. *Plant Cell Physiol.*, **27** (5): 911-918.
- OLIVEIRA, M. G. A., DE SIMONE, S. G., XAVIER, L. P., GUEDES, R. N. C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **140** (3): 369-380.
- OLIVEIRA, H. G., FADINI, M. A. M., VENZON, M., REZENDE, D. D. M., REZENDE, F., PALLINI, A. 2009. Evaluation of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) as a biological control agent of the two-spotted spider mite on strawberry plants under greenhouse conditions. *Experimental and Applied Acarology*, **47** (4): 275-283.
- PICKETT, J. A. 1999. *Insect-Plant Interactions and Induced Plant Defence*. Novartis Foundation. 290 pp.
- POMPERMAYER, P., FALCO, M. C., PARRA, J. R. P., SILVA-FILHO, M. C. 2003. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **109** (3): 217-224.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2006). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- SARMENTO, R. D. A. 2007. Tomato induced defenses mediating ecological interactions among arthropods. Tese de Doutorado-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 118p.
- SHANKS, C. H., DOSS, R. P. 1989. Population Fluctuations of Twospotted Spider-Mite (Acari, Tetranychidae) on Strawberry. *Environmental Entomology*, **18** (4): 641-645.
- STEINITE, I., IEVINSH, G. 2002. Wound-induced responses in leaves of strawberry cultivars differing in susceptibility to spider mite. *Journal of Plant Physiology*, **159** (5): 491-497.
- VIEIRA, A. A., OLIVEIRA, M. G. A., JOSÉ, I. C., PIOVE-SAN, N. D., REZENDE, S. T. D. E., MOREIRA, M. A., BARROS, E. G. D. E. 2001. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **13**: 05-12.
- VILA, L., QUILIS, J., MEYNARD, D., BREITLER, J. C., MARF, VICTORIA, MURILLO, I., VASSAL, J. M., MESSEGUER, J., GUIDERDONI, E., SAN SEGUNDO, B. 2005. Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal*, **3**: 187-202.

(Recepción: 10 febrero 2010)

(Aceptación: 2 septiembre 2010)

