

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA INFESTAÇÃO DO ÁCARO
FITÓFAGO *Schizotetranychus oryzae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) EM
PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Giseli Buffon

Lajeado, janeiro de 2015.

Giseli Buffon

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA INFESTAÇÃO DO ÁCARO
FITÓFAGO *Schizotetranychus oryzae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) EM
PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), do Centro Universitário UNIVATES, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Raul Antonio Sperotto

Coorientador: Dr. Noeli Juarez Ferla

Lajeado, janeiro de 2015.

Giseli Buffon

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA INFESTAÇÃO DO ÁCARO
FITÓFAGO *Schizotetranychus oryzae* (ACARI: TETRANYCHIDAE) EM
PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

A banca examinadora abaixo aprova a dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Agroalimentar:

Prof. Dr. Raul Antônio Sperotto – Orientador
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Noeli Juarez Ferla – Coorientador
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva
Centro Universitário UNIVATES

Prof. Dr. Eduardo Périgo
Centro Universitário UNIVATES

Prof^a. Dr^a. Joséli Schwambach
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Lajeado, janeiro de 2015.

Dedico este trabalho

A minha mãe, Maria e ao meu noivo, Felipe.
Obrigado pelo apoio nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao meu orientador, Dr. Raul Antonio Sperotto pela confiança e pelo aprendizado adquirido. Agradeço por você ser um orientador paciente, dedicado e amigo. Muito obrigada!

Agradeço ao Dr. Walter e a Dr^a. Lucélia por terem contribuído na realização do trabalho, além disso, pelos conselhos, aprendizados e amizade, não tenho palavras para descrever a gratidão e o carinho que sinto por vocês.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Noeli Juarez Ferla por ter acreditado no meu potencial de pesquisadora e ter me proporcionado o primeiro contato com a pesquisa.

Agradeço a instituição na qual a pesquisa está atrelada, o Centro Universitário UNIVATES.

Ao Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA, Cachoeirinha do Sul, RS) por ter gentilmente cedido as amostras utilizadas na pesquisa.

Ao Setor de Paleobotânica do Centro Universitário UNIVATES, pelo empréstimo da câmera e estereomicroscópio para aquisição de algumas imagens deste trabalho.

Ao corpo docente, coordenação e funcionários do Programa de Pós Graduação Mestrado em Biotecnologia (PPGBiotec) do Centro Universitário UNIVATES, pelos ensinamentos e pela ótima estrutura proporcionada.

Às funcionárias do Laboratório de Biotecnologia e Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES, que sempre estiveram dispostas a auxiliar na manipulação de equipamentos e materiais.

À todos os colegas de mestrado.

À minha colega de mestrado, Andressa Dametto, pelo companheirismo, amizade e motivação.

À todos os bolsistas do grupo de pesquisa do arroz e em especial a bolsista, Édina Aparecida dos Reis Blasi por ter me auxiliado nos experimentos, pela amizade e motivação.

Agradeço a minha família, em especial a minha irmã, Márcia B. Bulher pelo apoio.

À minha mãe, Maria exemplo de caráter e dignidade, por amar a família acima de tudo. Devo tudo que tenho e sou a você. Graças a Deus e ao nosso trabalho passamos por muitas coisas juntas. Te amo!

A meu noivo Felipe, pela paciência, companheirismo, atenção e amor. Você é uma pessoa incrível. Obrigado por acreditar no meu potencial e apoiar as minhas escolhas. Enfim, por me amar acima dos meus defeitos.

À todos que de uma forma ou outra ajudaram na realização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O arroz está entre os cultivos de maior importância, tanto no ponto de vista de consumo, quanto de geração de renda. O Brasil possui um papel de destaque na produção mundial de arroz, sendo o nono maior produtor mundial. Dentre as pragas que infestam a cultura de arroz, destaca-se o ácaro fitófago *Schizotetranychus oryzae*. Recentemente, este ácaro foi observado em lavouras de arroz do RS causando danos visíveis nas folhas e podendo acarretar danos econômicos. Para que isso não ocorra, as plantas precisam criar tolerância a esse estresse, o que está relacionado com a expressão coordenada de respostas de defesas após a infestação. Este trabalho teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente expressas (PDE's) em folhas de arroz após infestação do ácaro fitófago *S. oryzae*. Plantas de arroz foram crescidas em casas de vegetação e infestadas com os ácaros. As amostras foram submetidas à extração de proteínas e analisadas através da técnica de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*). Foram identificadas 925 PDE's. Aumentando a estrringência, foram selecionadas 109 proteínas com no mínimo 10 contagens espectrais. Foi visto que o aparato fotossintético é drasticamente afetado pela presença do ácaro, principalmente o fotossistema II. Outras proteínas diferencialmente expressas evidenciam que as plantas de arroz alteram diversas rotas metabólicas, tentando resistir à infestação dos ácaros, como resposta a estresse oxidativo, síntese de ácido jasmônico, metabolismo de aminoácidos, carboidratos e lipídios, modificação e degradação proteica e fosfatases, o que leva à modulação de várias respostas celulares. O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação do ácaro com a planta, através de técnicas de análise de expressão em nível proteico, pode contribuir para acelerar os processos de melhoramento da espécie cultivada. Nossos dados revelam várias proteínas promissoras para inúmeras abordagens biotecnológicas que buscam, futuramente, a tolerância do arroz ao ácaro *S. oryzae* e também a outros herbívoros.

Palavras-chave: Proteínas, estresse biótico, expressão diferencial, fotossistema II.

ABSTRACT

Rice is one of the most important crops on both the point of view of consumption, as income generation. Brazil has a leading role in world production of rice, being the ninth largest producer world. Among the pests that infest rice culture, highlights the phytophagous mite *Schizotetranychus oryzae*. Recently, this mite was observed in the RS rice fields causing visible damage to the leaves and economic damage. To avoid this, plants need to create tolerance to stress, which is related to the coordinated expression of defense responses after infestation. This study aimed to identify differentially expressed proteins (DEP's) in rice leaves after infestation of phytophagous mite *S. oryzae*. Rice plants were grown in greenhouses and infested with mites. Samples were subjected to protein extraction and analyzed by MudPIT technique (*Multidimensional Protein Identification Technology*). We identified 925 DEP's. Increasing the stringency, we identified 109 proteins with at least 10 spectral counts. It was seen that photosynthetic apparatus is dramatically affected by the mite presence, especially photosystem II. Other DEP's demonstrate that rice plants modify several metabolic pathways, trying to resist to the mite infestation, including response to oxidative stress, jasmonic acid synthesis, amino acid, lipid and carbohydrate metabolisms, protein degradation and modification, and phosphatases, which lead to modulation of various cellular responses. Understanding the molecular mechanisms involved in the interaction between rice plants and mite by expression analysis in protein levels can contribute to accelerate the improvement process of crop species. Our data revealed several promising proteins for numerous biotechnological approaches that seek the rice tolerance to the mite *S. oryzae* and also to other herbivores.

Keywords: Proteins, biotic stress, differential expression, photosystem II.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa da produção de arroz no Brasil, safra 2012/13.....	21
Figura 2- Infestação dos ácaros fitófagos <i>Steneotarsonemus furcatus</i> , <i>Steneotarsonemus spinki</i> , <i>Schizotetranychus oryzae</i> e <i>Oligonychus oryzae</i> em plantas de arroz e seus sintomas.....	24
Figura 3-Mudanças fisiológicas e moleculares em plantas infestadas com ácaros fitófagos	27
Figura 4- Esquema representativo da identificação das proteínas aplicando a técnica de MudPIT.....	33
Figura 5- Plantas mantidas em casas de vegetação.....	36
Figura 6- Folhas de arroz coletadas de plantas controle, pouco infestadas e muito infestadas pelo ácaro <i>Schizotetranychus oryzae</i>	36

Figura 7- Diagrama de Venn mostrando a dispersão de proteínas identificadas nas amostras de plantas controle e pouco infestadas pelo ácaro *Schizotetranychus oryzae*.....41

Figura 8- Confirmação dos resultados encontrados no MudPIT por RT-qPCR.....46

Figura 9- Parâmetros fotossintéticos analisados nas folhas de plantas controle e pouco infestadas pelo ácaro *Schizotetranychus oryzae*.....47

LISTA DE QUADROS

Quadro1- Quadro comparativo de área, produtividade e produção de arroz, nos estados produtores de arroz no Brasil.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de <i>primers</i> desenhados para utilizar no RT-qPCR.....	38
Tabela 2- Lista das proteínas diferencialmente expressas identificadas em folhas de arroz na condição controle e infestadas pelo ácaro <i>Schizotetranychus oryzae</i>	42
Tabela 3- Novas proteínas com potencial biotecnológico de tolerância a estresses bióticos e suas estratégias.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJ	Ácido jasmônico
AS	Ácido salicílico
MO	Monóxido de carbono
ERO'S	Espécies reativas de oxigênio
GSTs	Glutathione S-transferases
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL	Cromatografia líquida
LOX	Lipoxigenase
MS	Espectrometria de massa
MudPIT	Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas
NO	Óxido nítrico
PDE'S	Proteínas diferencialmente expressas
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida

RSI	Resistência Sistêmica Induzida
RT-qPCR	PCR em tempo real
SO ₂	Dióxido de enxofre
T _m	Temperatura de <i>melting</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Problema.....	18
1.2 Hipótese.....	18
1.3 Objetivos.....	18
1.3.1 Objetivo Geral.....	18
1.3.2 Objetivo Específico.....	18
1.4 Justificativa.....	19
 2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	 20
2.1 O arroz.....	20
2.2 Incidência de ácaros na cultura de arroz: danos visuais e perdas na produção.....	22
2.3 Alterações moleculares e fisiológicas causadas por ácaros fitófagos.....	26
2.4 Técnicas de análise de expressão diferencial de proteínas	30
2.5 MudPIT (<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>) ou Tecnologia Multidimensional de Identificação de Proteínas.....	31
 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	 34
3.1 Colaboradores do trabalho.....	34
3.2 Material vegetal.....	35
3.2.1 Extração de proteínas.....	37
3.2.2 Espectrometria de massas.....	37

3.2.3 Análise de bioinformática.....	37
3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	38
3.3.1 Desenho dos <i>primers</i> específicos para os genes que codificam as proteínas de interesse.....	38
3.3.2 PCR em Tempo Real (RT-qPCR).....	38
3.4 Parâmetros fotossintéticos.....	39
3.5 Análise estatística.....	39
 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 40
4.1 Identificação de proteínas diferencialmente expressas.....	40
4.2 Confirmação dos padrões de expressão encontrados no MudPIT utilizando RT-qPCR.....	45
4.3 Alterações no sistema fotossintético.....	47
4.4 Estresse oxidativo e síntese de ácido jasmônico.....	49
4.5 Alterações no metabolismo de aminoácidos e carboidratos.....	51
4.6 Proteínas envolvidas com modificação e degradação proteica.....	52
4.7 Metabolismo de lipídios.....	53
4.8 Proteínas fosfatases modulando várias respostas celulares.....	54
4.9 Outras proteínas diferencialmente expressas.....	55
 5 CONCLUSÃO.....	 57
 6 CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	 59
 REFERÊNCIAS.....	 61
 ANEXO.....	 79

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das culturas mais importantes, sendo a principal fonte de carboidratos para a metade da população mundial (DUAN; SUN, 2005). De acordo com a FAO (2013), o arroz pode fornecer 20% da energia e 15% da proteína diária necessária para um adulto, em uma porção de 100g. No cenário mundial, o Brasil é o maior produtor de arroz fora do continente asiático. Nos estados do sul do Brasil (RS, SC e PR) está localizada a principal região produtora de arroz, correspondendo a 75% do total de 13,5 milhões de toneladas produzidos no país (EMBRAPA, 2013). O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional, sendo responsável por mais de 65% do arroz colhido no país. A média do rendimento de grãos de arroz irrigado no estado do RS é de aproximadamente 7,5 t/ha, bem acima da média brasileira, que é de 4,5 t/ha. Este cenário demonstra claramente o papel de destaque exercido pelo arroz produzido no RS para a agricultura brasileira (EMBRAPA, 2013).

A evolução positiva da produtividade de arroz no Rio Grande do Sul atribui-se ao desenvolvimento e recomendação de novos cultivares, que atendem às exigências de mercado e apresentam alta produtividade, boa qualidade de grão, estabilidade de produção e, principalmente, melhor adaptação aos estresses bióticos e abióticos (EMBRAPA, 2013). Para atender as exigências do mercado, o melhoramento genético enfrenta hoje o desafio de produzir cultivares para sistemas de produção sustentáveis e de conservação dos recursos naturais. Para cumprir esta meta, é necessário o desenvolvimento de culturas adaptadas aos diversos ambientes de cultivo e que minimize sua vulnerabilidade aos principais fatores bióticos.

Um fator biótico relevante nas lavouras de arroz no estado do Rio Grande do Sul é a presença do ácaro fitófago *Schizotetranychus oryzae* Rossi de Simons, verificado em grande número populacional nas lavouras de arroz do cultivar IRGA 424 no município de Cachoeirinha e Taquari, causando danos visíveis nas folhas (FERLA et al., 2013). Até o presente momento, não é possível estimar o dano econômico causado pela infestação desse ácaro nas lavouras. Porém, já se tem conhecimento que, ao alimentar-se, o ácaro introduz o estilete nas células, provocando lesões, inibindo o seu crescimento e destruindo suas estruturas fotossintéticas e órgãos de armazenamento, prejudicando assim a formação do grão (SCHMIDT, 2014). O metabolismo primário das plantas infestadas é perturbado, alterando especificamente o metabolismo de aminoácidos e carboidratos, bem como o potencial hídrico das suas células. O transporte de nutrientes também pode ser interrompido para dificultar o acesso do fitófago (NACHAPPA et al., 2013). Nesse contexto, vários genes têm sua expressão modulada, podendo reduzir o efeito do estresse e levando a um reajustamento celular, o que pode resultar em resistência da planta ao estresse (RAMANJULU; BARTELS, 2002; MAHAJAN; TUTEJA, 2006).

As plantas estão continuamente expostas ao ataque de patógenos e insetos. Porém, tendo em vista a inexistência de resposta imune mediada por anticorpos, as plantas desenvolveram, durante o processo de evolução, mecanismos diferenciados de defesa que, quando acionados, traduzem essa percepção em uma resposta adequada e de forma adaptativa (PIETERSE et al., 2005; SHEWRY; LUCAS, 1997; WIT, 2007). A resistência da planta a um determinado patógeno é definida, sob o aspecto genético funcional, como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (NOJOSA et al., 2005; ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005). Assim, a proteômica é uma ferramenta importante, pois auxilia na identificação de proteínas relacionadas com a defesa em resposta a estresses bióticos e abióticos em arroz (AGRAWAL et al., 2011; KIM et al., 2014). Estudos proteômicos têm refinado o conhecimento da interação planta-patógeno em diversos níveis: molecular, bioquímico e fisiológico (RAMPITSCH et al., 2012; VANDERSCHUREN et al., 2013).

As informações disponíveis na literatura sobre as mudanças causadas por ácaros fitófagos nas plantas hospedeiras são escassos e normalmente limitados aos efeitos visuais da infestação, enquanto que as modificações moleculares, bioquímicas

e fisiológicas são muitas vezes negligenciadas. Com base nesse cenário, escrevemos um artigo de revisão (Anexo 1), publicado no periódico *International Journal of Acarology*, onde discutimos os principais danos causados pelo ácaro em plantas e suas estratégias de defesa.

O presente trabalho visa o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação do ácaro fitófago *S. oryzae* com plantas de arroz, caracterizando as proteínas diferencialmente expressas (PDE's) nas folhas de arroz em decorrência da infestação do ácaro.

1.1 Problema

Quais proteínas estão envolvidas na resposta das plantas de arroz à infestação do ácaro fitófago *S. oryzae*?

1.2 Hipótese

Plantas de arroz respondem à infestação dos ácaros modulando a expressão de diversas proteínas.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Identificar proteínas envolvidas na resposta de plantas de arroz à infestação do ácaro *Schizotetranychus oryzae*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Obter plantas de arroz do cultivar IRGA424 infestadas pelo ácaro *Schizotetranychus oryzae*.

- Extrair proteína e RNA das folhas de planta de arroz não infestadas (controle) e infestadas pelo ácaro.
- Identificar proteínas diferencialmente expressas (PDE's) através da técnica de MudPIT e *Shotgun Proteomics*.
- Correlacionar os níveis de expressão de RNA e proteína através de PCR em Tempo Real (RT-qPCR).
- Verificar a capacidade fotossintética das plantas.

1.4 Justificativa

Este trabalho é o primeiro estudo de identificação de proteínas de arroz na interação com um ácaro fitófago. Ácaros dessa família (Tetranychidae) já foram relatados em arroz em várias partes do mundo, causando graves danos econômicos (KARMAKAR, 2008). É de fundamental importância compreender esses mecanismos de interação, pois um dos grandes obstáculos para a estabilidade da produção nacional de arroz reside na susceptibilidade dos cultivares existentes a estresses bióticos.

A identificação e caracterização das proteínas identificadas e a comprovação do envolvimento delas na interação ácaro-planta contribuirão para o esclarecimento dos mecanismos moleculares, determinando seus padrões de expressão em resposta aos estresses. Assim, a incorporação de novas ferramentas de genômica funcional pode permitir o desenvolvimento de cultivares com maior produtividade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) está entre os cereais mais consumidos e cultivados no mundo, sendo utilizado tanto para consumo humano como para ração animal (FAO, 2013). O arroz é uma cultura de destaque mundial, sendo cultivada em todos os continentes, exceto na Antártida. Assim, posiciona-se entre os cultivos de maior importância, tanto no ponto de vista de consumo, quanto de geração de renda (AGRIANUAL, 2008). Nos próximos anos, o setor arrozeiro mundial enfrentará uma grande demanda, pois se estima que no ano de 2020 a população mundial seja de 8,3 bilhões de habitantes, dos quais 50% serão consumidores de arroz. Para atender a esta demanda, a produção mundial de arroz deverá aumentar cerca de 70% (SANINT, 2006).

O Brasil destaca-se na produção mundial como sendo o nono maior produtor e o principal produtor de arroz fora do continente asiático (FAO, 2013). Atualmente, o Rio Grande do Sul é considerado estabilizador da safra nacional, sendo o estado com maior produção. Na safra 2012/13, foram cultivados no Rio Grande do Sul 1,0 milhão de hectares de arroz irrigado, com produção aproximada de 8 milhões de toneladas (IRGA, 2013), representando mais de 65 % da produção brasileira (CONAB, 2014). Nesse cenário, percebe-se claramente o papel de destaque da produção de arroz no estado do Rio Grande do Sul, conforme representado na Figura 1.

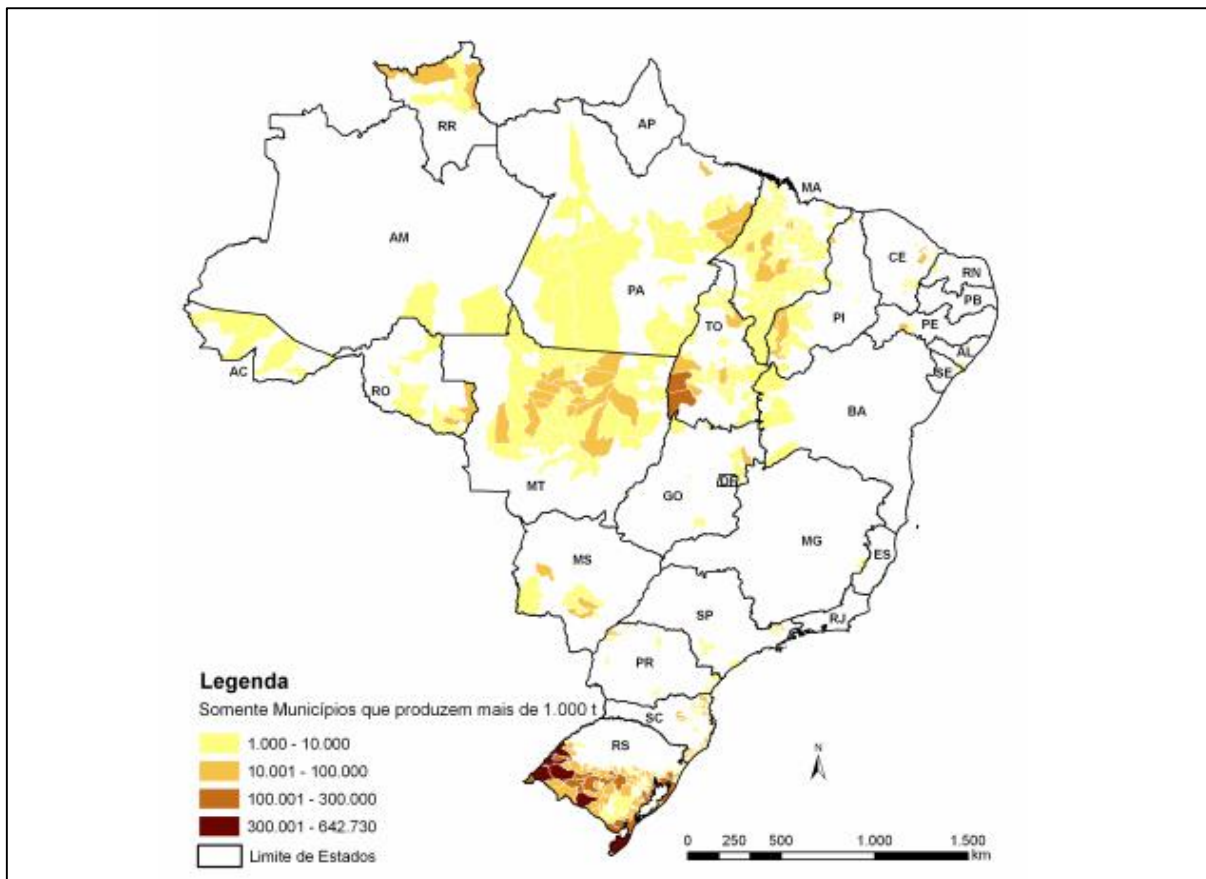


Figura 1. Mapa da produção de arroz no Brasil, safra 2012/13.

Fonte: Conab/IBGE

O aumento na produção e a maior participação do arroz gaúcho no mercado internacional ocorrem devido ao desenvolvimento de cultivares melhor adaptadas aos diversos ambientes (MENEZES et al., 2012). O Rio Grande do Sul é o estado que melhor desempenha essa função, conforme o Quadro 1, onde é possível constatar uma maior produtividade por hectare, atingindo em 2014 a maior média de produção já registrada (7,46 t/ha) (CONAB, 2014).

REGIÃO/UF	ÁREA (Em mil ha)			PRODUTIVIDADE (Em kg/ha)			PRODUÇÃO (Em mil t)		
	Safra 12/13 (a)	Safra 13/14 (b)	VAR. % (b/a)	Safra 12/13 (c)	Safra 13/14 (d)	VAR. % (d/c)	Safra 12/13 (e)	Safra 13/14 (f)	VAR. % (f/e)
NORTE	291,9	293,6	0,6	3.530	3.490	(1,1)	1.030,2	1.024,5	(0,6)
RR	20,0	20,0	-	5.452	5.387	(1,2)	109,0	107,7	(1,2)
RO	48,0	48,5	1,0	2.765	2.680	(3,1)	132,7	130,0	(2,0)
AC	13,2	13,2	-	1.326	1.416	6,8	17,5	18,7	6,9
AM	2,9	2,9	-	2.110	2.037	(3,5)	6,1	5,9	(3,3)
AP	2,1	2,1	-	900	1.092	21,3	1,9	2,3	21,1
PA	86,6	86,6	-	2.278	2.153	(5,5)	197,3	186,4	(5,5)
TO	119,1	120,3	1,0	4.750	4.767	0,4	565,7	573,5	1,4
NORDESTE	588,2	570,0	(3,1)	1.271	1.395	9,8	747,3	795,5	6,4
MA	416,2	395,4	(5,0)	1.191	1.200	0,8	495,7	474,5	(4,3)
PI	125,1	127,0	1,5	726	1.158	59,5	90,8	147,1	62,0
CE	22,3	22,3	-	2.426	2.643	8,9	54,1	58,9	8,9
RN	1,1	1,1	-	2.520	2.840	12,7	2,8	3,1	10,7
PB	0,2	0,2	-	96	750	681,3	-	0,2	-
PE	2,5	2,5	-	5.677	5.680	0,1	14,2	14,2	-
AL	3,0	3,0	-	5.877	5.858	(0,3)	17,6	17,6	-
SE	9,9	9,9	-	6.500	6.500	-	64,4	64,4	-
BA	7,9	8,6	9,0	980	1.800	83,7	7,7	15,5	101,3
CENTRO-OESTE	216,5	218,7	1,0	3.223	3.238	0,5	697,7	708,1	1,5
MT	166,3	169,6	2,0	3.175	3.167	(0,3)	528,0	537,1	1,7
MS	15,2	15,5	2,0	6.200	6.200	-	94,2	96,1	2,0
GO	35,0	33,6	(4,0)	2.157	2.230	3,4	75,5	74,9	(0,8)
SUDESTE	44,6	41,0	(8,1)	3.106	3.190	2,7	138,5	130,8	(5,6)
MG	22,8	20,5	(10,1)	1.956	2.068	5,7	44,6	42,4	(4,9)
ES	1,0	0,7	(30,0)	2.700	2.713	0,5	2,7	1,9	(29,6)
RJ	1,4	1,0	(28,0)	3.100	3.515	13,4	4,3	3,5	(18,6)
SP	19,4	18,8	(3,0)	4.480	4.415	(1,5)	86,9	83,0	(4,5)
SUL	1.249,7	1.297,9	3,9	7.308	7.368	0,8	9.132,9	9.562,8	4,7
PR	33,0	31,1	(5,8)	5.291	5.490	3,8	174,6	170,7	(2,2)
SC	150,1	150,1	-	6.828	7.050	3,3	1.024,9	1.058,2	3,2
RS	1.066,6	1.116,7	4,7	7.438	7.463	0,3	7.933,4	8.333,9	5,0
NORTE/NORDESTE	880,1	863,6	(1,9)	2.020	2.107	4,3	1.777,5	1.820,0	2,4
CENTRO-SUL	1.510,8	1.557,6	3,1	6.599	6.678	1,2	9.969,1	10.401,7	4,3
BRASIL	2.390,9	2.421,2	1,3	4.913	5.048	2,7	11.746,6	12.221,7	4,0

Quadro 1. Quadro comparativo de área, produtividade e produção de arroz, nos estados produtores de arroz no Brasil, conforme levantamento feito pela Conab no mês de dezembro de 2014.

Fonte: Conab.

2.2 Incidência de ácaros na cultura de arroz: danos visuais e perdas na produção

Os ácaros pertencem ao Filo Arachnida (que inclui as aranhas, escorpiões, pseudo-escorpiões e afins), e ao Subfilo Chelicerata. Constituem um grupo de pequenos invertebrados que podem ser encontrados praticamente em todo o planeta. O total de espécies conhecidas destes organismos, hoje, é estimado em 50.000 (IBSP, 2013). Como acontece em diversos grupos de organismos, entre os ácaros também são encontradas diversas formas de vida. Quanto à sua alimentação, podem ser fitófagos, saprófagos, coprófagos, necrófagos, parasitos ou predadores (PEROTTI

et al., 2009). O efeito da alimentação dos fitófagos sobre as plantas são severos em curto e longo prazo. As estimativas para as perdas potenciais causadas por pragas nas lavouras estão em torno de 25% em nível mundial (OERKE, 2006). Os fitófagos causam estresse, inibem o desenvolvimento das plantas, destruindo suas estruturas fotossintetizantes e órgãos de reserva (RAVEN et al. 1996, SCHMIDT, 2014). Logo após a infestação, o metabolismo primário da planta infestada é perturbado, especificamente alterando o metabolismo de aminoácidos e carboidratos, bem como alterando o potencial hídrico das suas células. O transporte de nutrientes pode também ser interrompido para impedir o acesso do fitófago, o que nem sempre é eficaz (NACHAPPA et al. 2013). O que se sabe é que muitos dos predadores alimentam-se de ácaros que danificam as plantas, desempenhando importante função no equilíbrio ecológico. Por outro lado, vários ácaros são pragas (causam dano econômico), sendo responsáveis por muitos danos às plantas cultivadas em todo o mundo (IBSP, 2013). Espécies de ácaros que parasitam as culturas de arroz, juntamente com os sintomas visuais associados, estão resumidos na Figura 2.

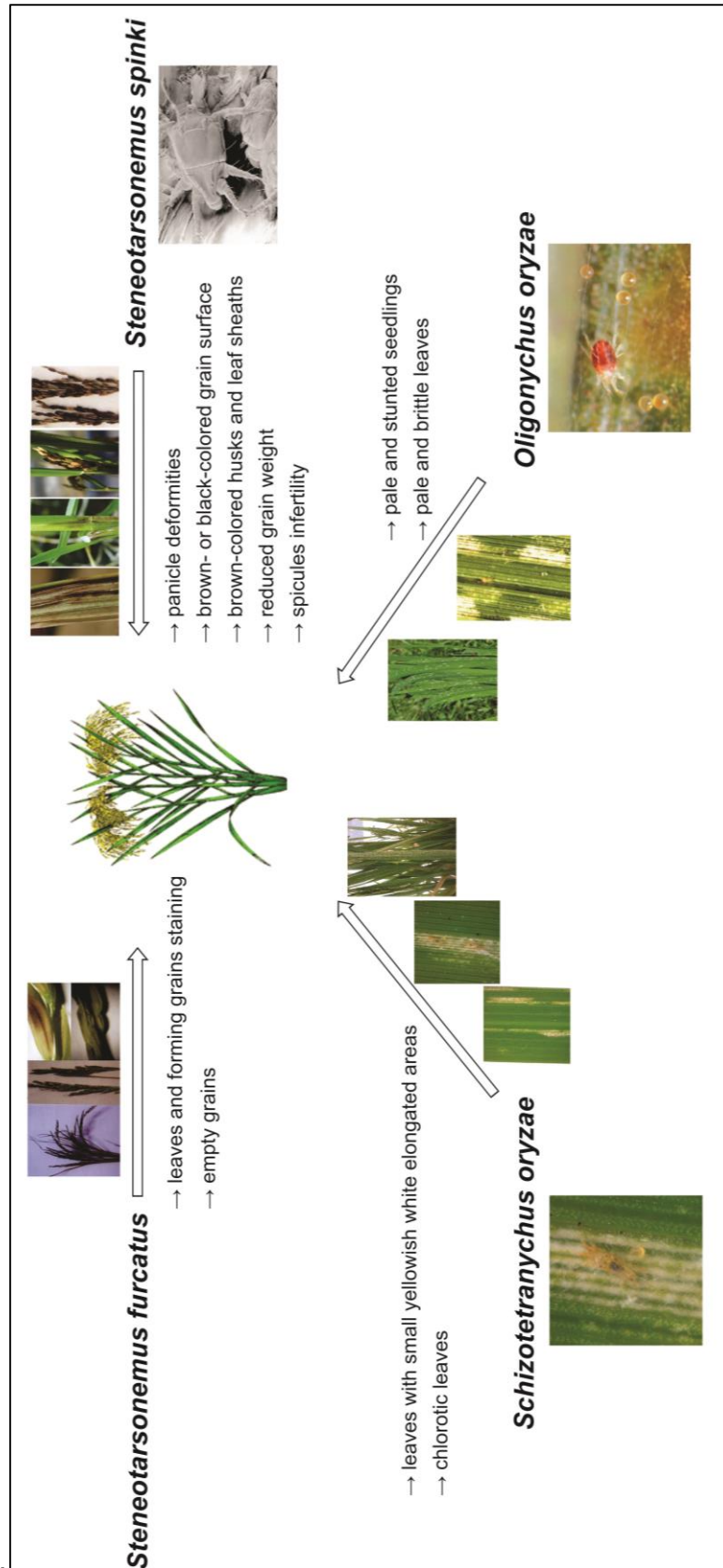


Figura 2. Infestação dos ácaros fitófagos *Steneotarsonemus furcatus*, *Steneotarsonemus spinki*, *Schizotetranychus oryzae* e *Oligonychus oryzae* em plantas de arroz e seus sintomas. Fonte: Modificado de BUFFON et. al, 2014.

Nas culturas de arroz no Brasil, os ácaros fitófagos das famílias Tarsonemidae e Tetranychidae já foram relatados. Entre os ácaros Tarsonemidae destaca-se o ácaro *Steneotarsonemus furcatus* (De Leon), encontrado no estado do Mato Grosso do Sul, provocando manchas nas folhas e problemas na formação dos grãos, o que impede o desenvolvimento das panículas e resulta em grãos vazios (NAVIA et al., 2006). Em uma plantação do genótipo Primavera, foram observadas reduções de 30 a 50% no rendimento devido à presença desse ácaro (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

Outro ácaro da família Tarsonemidae é a espécie *Steneotarsonemus spinki* Smiley, que não foi relatada até o momento no Brasil, mas que é capaz de provocar danos econômicos significativos à cultura de arroz na China e Taiwan desde 1970. Na década seguinte (anos 80), foi considerada uma praga nas culturas de arroz em toda a Ásia Tropical (KARMAKAR, 2008). Em 1990, *S. spinki* foi relatado na América Latina, sendo identificado em algumas culturas de arroz da República Dominicana e Cuba (FERLA et al., 2013), também sendo encontrado nos EUA em 2007 (HUMMEL et al., 2009). Foram relatadas reduções drásticas na produção (de até 90%). Este ácaro provoca deformidades nas panículas das plantas infestadas e na superfície do grão, adquirindo uma cor marrom ou preta. A superfície interna da bainha da folha e as cascas dos grãos atacados também se tornam castanhas (CHO et al. 1999).

Da família Tetranychidae é relatado o ácaro *Oligonychus oryzae* Hirst, que é considerado uma das principais pragas que infestam plantações de arroz na Índia e outros países asiáticos, sendo responsável por perdas consideráveis e redução na produção de arroz (RADHAKRISHNAN; RAMARAJU, 2009). Mudanças de arroz tornam-se pálidas e atrofiadas, e as folhas demonstram uma textura frágil (NIAZI; SINGH, 2001). Três espécies de Tetranychidae são relatadas no Brasil na cultura do arroz: *Aponychus schultzi* (Blanchard), *Oligonychus grypus* Baker & Pritchard e *Schizotetranychus oryzae* Rossi de Simons.

S. oryzae foi descrito em Corrientes (Argentina) e Rio Grande do Sul (Brasil) (FLECHTMANN, 1985), e também foi relatado nos estados de São Paulo (ROSSETO et al., 1971), Rio de Janeiro e Espírito Santo (BARCELLOS et al. 1979). As plantas atacadas por *S. oryzae* apresentam sintomas visuais que se assemelham à deficiência de nitrogênio, com pequenas áreas branco-amareladas, que podem ser

visíveis na face adaxial da folha, semelhantes a infecções virais. Estas áreas correspondem a pequenas colônias de ácaros, normalmente na face abaxial da folha. Os ácaros estão protegidos pela fina teia que tecem e que, com o passar do tempo, coalescem, formando listras brancas ao longo das nervuras (BARCELLOS et al., 1979). Folhas infestadas apresentam áreas cloróticas nas superfícies abaxial e adaxial. De acordo com Ferla et al. (2013), *S. oryzae* é o ácaro fitófago mais representativo na cultura do arroz no Estado do Rio Grande do Sul.

2.3 Alterações moleculares e fisiológicas causadas por ácaros fitófagos

Poucos estudos têm sido relatados a respeito dos mecanismos de defesa de plantas de arroz contra artrópodes. A maioria dos estudos é realizada em dicotiledôneas (principalmente tomate - *Solanum lycopersicum* L.) (BALMER et al., 2013). As alterações moleculares e fisiológicas, bem como os mecanismos de defesa promovidos pela infestação de ácaros fitófagos, são mostrados na Figura 3. Esta figura não é baseada na cultura do arroz, mas certamente a maioria dos processos descritos aqui é semelhante, com base no pressuposto de que as plantas contam com mecanismos de defesa conservados para se defenderem da infestação de pragas (WU et al., 2014).

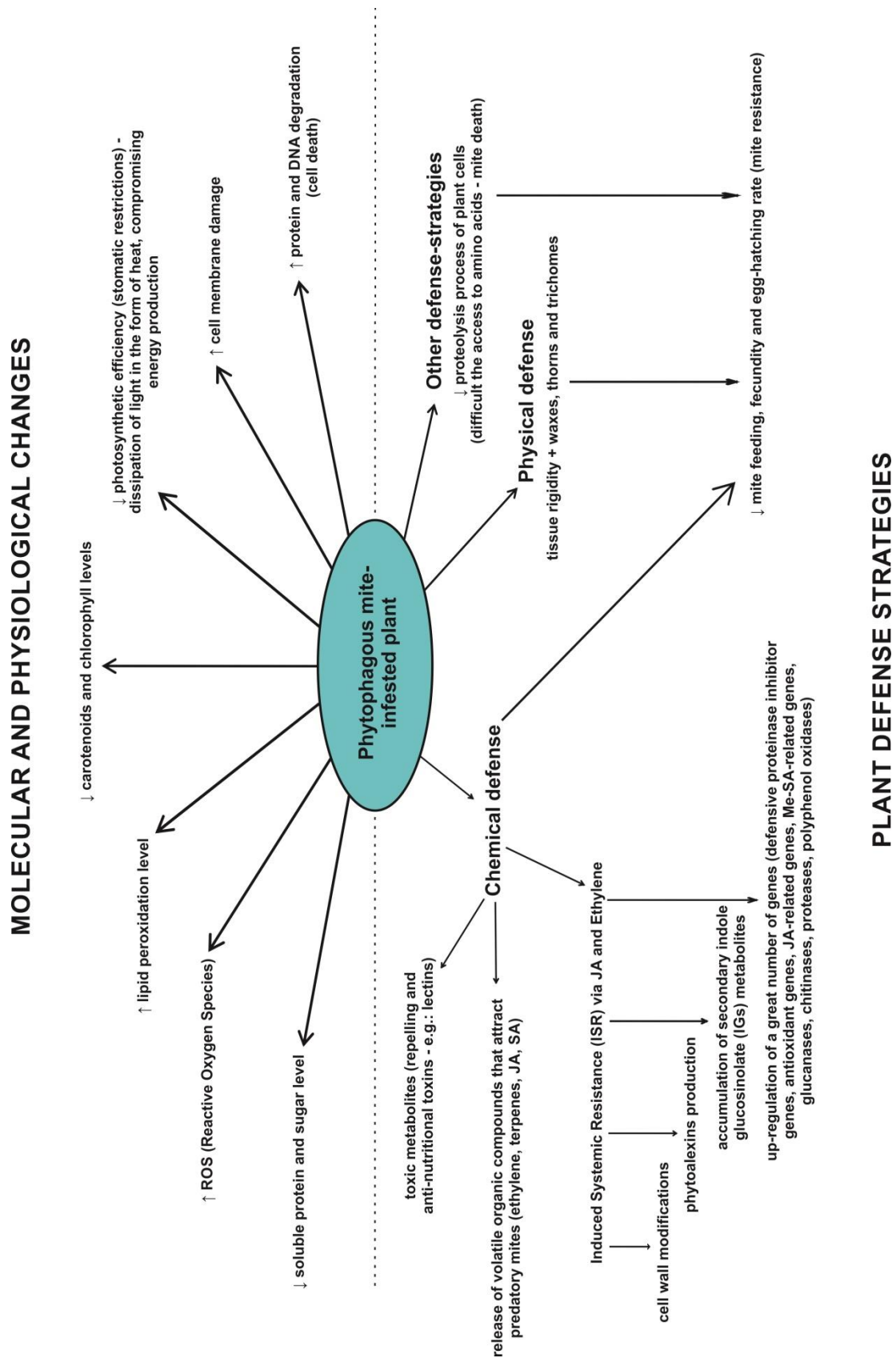


Figura 3- Mudanças fisiológicas e moleculares em plantas infestadas com ácaros fitófagos e estratégias de defesa utilizadas pelas plantas.

Fonte: BUFFON et. al, 2014.

As respostas das plantas contra os artrópodes são geralmente desencadeadas por receptores que reconhecem elicitores associados aos herbívoros e conjugados de ácidos graxos-aminoácidos, que são os principais componentes da secreção oral de insetos herbívoros (GILARDONI et al., 2010). Estas moléculas são essenciais para a resposta específica da planta contra o herbívoro (HALITSCHKE et al., 2003). Em resposta à infestação de artrópodes, o ácido linoleico é liberado a partir de lipídios de membrana e, continuamente, convertido em ácido jasmônico, que causa a ativação transcricional de genes que levam a um aumento na produção de compostos relacionados à defesa (HEIL; BOSTOCK, 2002). Além disso, a infestação pode reduzir os níveis de proteínas solúveis, bem como a concentração de açúcares, o que resulta em parada no crescimento da planta (PETANOVIC; KIELKIEWICZ, 2010).

Espécies reativas de oxigênio (ERO's) estão presentes em todas as células animais e vegetais. São geradas como subproduto de reações metabólicas aeróbias em várias organelas celulares, tais como mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e membranas celulares (SCHMITT et al., 2014). A produção de ERO's, que é aumentada pela infestação de ácaros, pode afetar a produção de biomassa vegetal. O estresse oxidativo também pode afetar a eficácia fotossintética, devido a restrições estomáticas, assim como danificar a membrana celular, aumentar a taxa de degradação de proteínas e de DNA e, conseqüentemente, levar à morte da célula. Algumas proteínas do aparato fotossintético podem ser inativadas pelo estresse oxidativo, acarretando a dissipação de luz sob a forma de calor, comprometendo assim a produção de energia (SCHMITT et al., 2014). Segundo Fadini et al. (2004), os ácaros fitófagos danificam as células do mesófilo foliar e estimulam o fechamento dos estômatos, causando uma diminuição na taxa fotossintética em plantas altamente infestadas.

As estratégias de defesa utilizadas pelas plantas contra diferentes artrópodes podem ser químicas ou físicas (ZHANG et al., 2013). A primeira defesa química é a síntese de metabolitos tóxicos para os herbívoros, e em seguida, as proteínas que, em longo prazo, criam defesas físicas, como um aumento na densidade de tricomas (WORRAL et al., 2012). A expressão de lectinas (proteínas anti-insetos produzidas pelas plantas, capazes de afetar negativamente o crescimento populacional da praga) é alterada após o ataque de herbívoros (MICHIELS et al., 2010). As defesas químicas incluem ainda a síntese de metabólitos secundários que atenuam a sua

digestibilidade para uma ampla gama de potenciais consumidores (STRAUSS; ZANGERL, 2002). A defesa física inclui rigidez dos tecidos e a presença de ceras, espinhos e tricomas, que diminuem o acesso dos fitófagos aos tecidos vegetais, além de interferir na alimentação (VET, 1999).

As defesas das plantas podem apresentar outras duas classificações: constitutiva, que está sempre presente, independente se há ou não invasores; ou induzida, que ocorre somente depois que a planta foi atacada, sendo específica para os fitófagos que estão infestando a mesma (FADINI et al., 2004). Após ter sido exposto a um agente indutor, os mecanismos de Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI) são ativados, permitindo a ativação de mecanismos de defesa, não somente no local da indução, mas também em outros locais (CONRATH et al., 2006). RSA caracteriza-se pela liberação de um sinal no local da infestação, o que gera a necrose do tecido e a translocação deste sinal para outras partes da planta, induzindo reações de defesa que vão proteger a planta de agressões subsequentes. Na RSI, principal linha de defesa contra os ácaros fitófagos, o indutor não causa sintomas como a necrose no local de infestação, mas induz a planta a proteger-se sistemicamente. Podem ser citados como mecanismos de defesa induzidos, as transformações da parede celular, a produção de fitoalexinas e um aumento na expressão de diversos genes (WARD et al., 1991), incluindo aqueles que codificam proteínas relacionadas com patogênese (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). As plantas também se defendem através da produção de toxinas repelentes e anti-nutricionais, assim como a liberação de compostos orgânicos voláteis que atraem ácaros predadores que se alimentam de ácaros fitófagos. É importante lembrar que estes compostos, além de ajudar a planta, alertam as plantas ao redor, que começam a se preparar para uma provável futura agressão do herbívoro.

Genes de defesa envolvidos nas vias de síntese de ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e etileno são responsáveis pela produção de proteínas de defesa (glucanases, quitinases, proteases, polifenol oxidases, inibidores da protease), que restringem os danos a que a planta está sujeita. Também são ativados os genes envolvidos na detoxificação celular, tais como peroxidases, catalases e superóxido dismutases (GRINBERG et al., 2005; NACHAPPA et al. 2013). Através de uma abordagem metabolômica e transcriptômica, Kant et al. (2004) indicaram que um dia após a infestação de um ácaro fitófago em folhas de tomate, as respostas diretas de

defesa (como a atividade de inibidores de protease e de transcrição de genes envolvidos na síntese de AJ, AS e etileno) já haviam sido ativadas. Embora o aumento na expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de monoterpenos e diterpenos já ocorria no primeiro dia, um aumento significativo na emissão de terpenoides voláteis ocorreu apenas no quarto dia, coincidindo com um aumento na preferência olfativa de ácaros predadores (*Phytoseiulus persimilis*) por plantas infestadas. Estes dados indicam que plantas de tomate acionam suas defesas indiretas (produção de compostos voláteis) para complementar a resposta de defesa direta contra a infestação de ácaros fitófagos.

Os compostos produzidos pelas plantas podem alterar o comportamento de ácaros fitófagos, bem como causar intoxicação. Ácaros têm a capacidade de se adaptar a esses compostos, e desta forma, as plantas precisam sintetizar outras substâncias que esses agressores ainda não estejam adaptados (DERMAUW et al., 2013). Uma vez atacadas, as plantas tornam-se mais sensíveis por meio de um processo chamado "*priming*", que torna a planta mais rápida na resposta a novos estresses bióticos (HEIL; BOSTOCK, 2002). Efeitos *priming* podem ser provocados através de indutores químicos, como o ácido β -aminobutírico (JAKAB et al., 2001). Este mecanismo ainda não é completamente entendido, mas implica a ativação de proteínas sinalizadoras, fatores de transcrição e genes de defesa. Desta forma, o *priming* é um mecanismo de tolerância em longo prazo desenvolvido pelas plantas. Porém, estes mecanismos causam um gasto energético, que podem levar a perdas de produtividade (WORRAL et al., 2012).

2.4 Técnicas de análise de expressão diferencial de proteínas

A proteômica diferencial, que envolve a identificação de proteínas mais ou menos expressas em determinado tecido, tem se destacado como uma ferramenta de extrema importância na descoberta de proteínas envolvidas em diversos processos. O termo proteômica é definido como o conjunto de proteínas produzidas a partir do material genético disponível (WILKINS et al., 1995).

A proteômica utiliza-se de técnicas de separação de proteínas, que posteriormente são identificadas por espectrometria de massas. Muitas metodologias

vêm sendo utilizadas para a separação de proteínas, porém, as mais citadas são a eletroforese em gel bidimensional (2DE, do inglês *two-dimensional gel electrophoresis*) (O'FARRELL 1975; BJELLQVIST et al., 1982), que tem seu potencial analítico reconhecido, pois é capaz de gerar informações importantes como modificações pós-traducionais (GORG et al., 2007); e a separação por cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), desenvolvido em amostras com misturas proteicas mais complexas (MOTOYAMA; YATES, 2008). A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) identifica as proteínas anteriormente separadas. Para isso existem diversos tipos de ionizadores, analisadores de massas e fragmentadores de íons, que possibilitam uma análise mais refinada do proteoma nessa técnica em comparação com o gel 2DE (HAN et al., 2008; YATES et al., 2009).

A aplicação de técnicas de análise proteômica em grande escala utilizando a abordagem de separação do extrato proteico por cromatografia líquida multidimensional seguida de espectrometria de massas (*Multidimensional Protein Identification Technology* - MudPIT) já é descrita, porém, a identificação de proteínas de defesa da planta na interação ácaro-planta é um estudo totalmente inovador.

A proteômica vem sendo utilizada para identificar a localização de proteínas em diferentes tecidos (CAPRIOLI et al., 1997; CHAURAND et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2008), na análise de interações proteína-proteína (ARENKOV et al., 2000; JACKMAN et al., 2008), na elucidação de processos fisiológicos (KOLKMAN et al., 2006; MATHESIUS, 2008) e na caracterização de diferentes regiões celulares (EUBEL et al. 2008), assim contribuindo no conhecimento da interação planta-parasito (WANG et al., 2005; COUMANS et al. 2009; SHAH et al. 2009; RAMPITSCH et al., 2012; VANDERSCHUREN et al., 2013).

2.5 MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*) ou Tecnologia Multidimensional de Identificação de Proteínas

A tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT) é o método escolhido para a análise de amostras de proteína em que são necessárias técnicas de separação mais elaboradas, onde se consegue identificar proteínas com menor peso molecular, que são praticamente indetectáveis utilizando a técnica de

2DE, conseguindo assim uma maior representação do proteoma da amostra de interesse (CHOE et al., 2005).

MudPIT é uma técnica proteômica baseada em cromatografia, onde uma mistura complexa de peptídeos é gerada por clivagem proteolítica e carregada dentro de uma coluna bifásica (microcapilar), empacotada em sequência com uma matriz de troca catiônica forte (SCX, do inglês *strong cation exchange*) e outra de fase reversa (RP, do inglês *reverse phase*) (BEYS DA SILVA et al., 2014). Depois que a mistura complexa de peptídeos é injetada na coluna bifásica microcapilar, esta é colocada diretamente em linha com um espectrômetro de massas. Os dados gerados por espectrometria de massas em uma corrida de MudPIT são depois analisados para determinar a diversidade de proteínas da amostra original (BEYS DA SILVA et al. 2014), conforme a Figura 4. A análise quantitativa pode ser baseada na contagem espectral (*spectral count*), onde o número total de espectros MS/MS é linearmente correlacionado com a abundância de proteína ao longo de um alcance dinâmico de duas ordens de magnitude. Além disso, a contagem espectral mostrou que tem maior reprodutibilidade técnica em comparação com outras amostragens estatísticas, como a cobertura na sequência e a contagem de peptídeos (LIU et al., 2004; ZHANG et al., 2006)

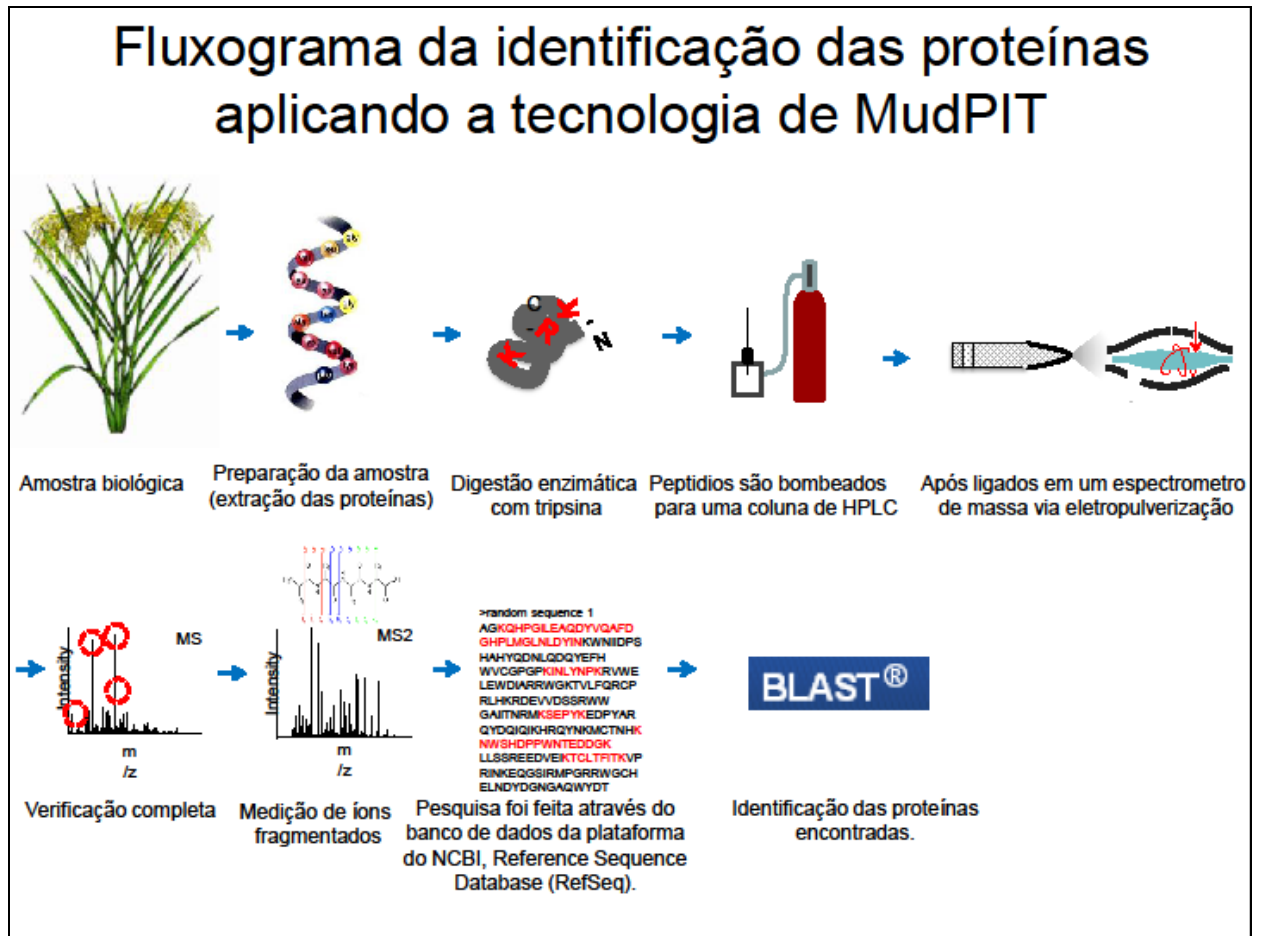


Figura 4. Esquema representativo da identificação das proteínas aplicando a técnica de MudPIT.

Primeiro é feita a preparação da amostra biológica de interesse, extração das proteínas e quantificação das proteínas extraídas por BCA. Uma mistura complexa de peptídeos é gerada por clivagem proteolítica com a enzima tripsina. Esses peptídeos são bombeados para HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), após ligados via eletropulverização a um espectrômetro de massas. Após, é feita a verificação e medição dos íons fragmentados. Com as sequências geradas são feitas buscas no banco de dados (RefSeq) e a identificação das proteínas pelo Blast (figura gentilmente cedida pelo Dr. Walter Orlando Beys da Silva, com algumas modificações).

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Os trabalhos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Biotecnologia e de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES e no laboratório do Dr. John Yates III (The Scripps Research Institute, San Diego, CA, Estados Unidos), nos anos de 2013/2014.

3.1 Colaboradores do trabalho

- Dr. Raul Antonio Sperotto, Doutor em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado – RS (orientador).
- Dr. Noeli Juarez Ferla, Doutor em Ciências, Laboratório de Acarologia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado – RS (coorientador).
- Dr. Walter Orlando Beys da Silva, Doutor em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado – RS.
- Dra. Lucélia Santi, Doutora em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado – RS.
- Ms. Janete Mariza Adamski, Mestre em Fisiologia Vegetal, Doutoranda em Botânica, Laboratório de Fisiologia Vegetal – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.
- Édina Aparecida dos Reis Blasi, graduanda de Ciências Biológicas, bolsista de Iniciação Científica, Laboratório de Biotecnologia – Centro Universitário

UNIVATES, Lajeado – RS.

3.2 Material vegetal

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) da cultivar BR-IRGA424 foram esterilizadas e germinadas por quatro dias em uma incubadora BOD (28°C) em placas de petri com papel umedecido com água destilada. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para um substrato formado por vermiculita:solo, numa mistura 1:3, sendo mantidas por 14 dias em incubadora e depois transferidas para baldes de plástico contendo solo e água, em condição ambiente de casa de vegetação, com umidade controlada de 70% (Figura 5). Um balde de plástico contendo cinco plantas de arroz altamente infestadas por *S. oryzae* foi gentilmente cedido pelo Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA, Cachoeirinha do Sul, RS) e foi usado para infestar as plantas de arroz por aproximação. Plantas controle (sem infestação de *S. oryzae*) foram mantidas isoladas para evitar a infestação de ácaros. O experimento foi composto por folhas controle (C) e dois níveis de infestação de ácaros (infestação inicial ou PI: pouco infestadas; e tardia ou MI: muito infestadas). As folhas de plantas PI apresentavam dano parcial na folha e presença de aproximadamente 20 ácaros por folha; as folhas de plantas MI apresentavam dano total na folha e presença de aproximadamente 180 ácaros por folha (Figura 6). Nesse trabalho utilizamos somente as amostras controle e pouco infestadas, porém, as amostras de folhas muito infestadas foram armazenadas para trabalhos futuros. As folhas foram coletadas e mantidas em freezer a -80°C até o momento em que foram pulverizadas em nitrogênio líquido para a extração de proteínas e RNA.



Figura 5. Plantas mantidas em casas de vegetação



Figura 6. Folhas de arroz coletadas de plantas controle, pouco infestadas e muito infestadas com o ácaro *Schizotetranychus oryzae*. Da esquerda para a direita: Controle: sem infestação do ácaro e sem dano na folha. Pouco infestadas: com dano parcial da folha (infestação precoce). Muito infestadas: com dano total da folha (infestação tardia).

3.2.1 Extração de proteínas

Três amostras (aproximadamente 250 mg) de folhas controle e pouco infestadas foram submetidas à extração de proteínas utilizando-se o Kit Total Plant Protein Extraction, Sigma. A concentração das proteínas extraídas foi quantificada pelo método BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL). A depleção da proteína Rubisco foi realizada utilizando o método de (KRISHNAN; NATARAJAN.,2009).

3.2.2 Espectrometria de massas

As proteínas foram digeridas com tripsina (Promega, Madison, WI) por 16 horas a 37 °C, conforme metodologia previamente descrita para MudPIT (BEYS DA SILVA et al., 2014). O procedimento foi realizado no laboratório do Dr. John Yates III (Department of Chemical Physiology - The Scripps Research Institute, La Jolla, San Diego, CA, EUA). Os espectros MS/MS foram analisados utilizando o site (<http://www.integratedproteomics.com/>). As proteínas foram identificadas utilizando-se o banco de dados específico para arroz da plataforma do NCBI, Reference Sequence Database (RefSeq).

3.2.3 Análises de bioinformática

O software PatternLab foi utilizado para identificar as proteínas diferencialmente expressas ou exclusivas de uma das condições, encontradas nas amostras controle em comparação às amostras pouco infestadas. Comparações pareadas entre as duas condições foram realizadas utilizando dados de contagem espectrais em uma versão atualizada do PatternLab's TFold. A análise dessas proteínas se baseou nos seguintes parâmetros: as proteínas que não foram detectadas em pelo menos quatro das seis corridas por tratamento não foram consideradas, utilizando o valor de q-value de 0,05 e um F-stringency de 0,01. Proteínas de baixa abundância, com baixos p-value e um significativo *fold change*, mas baixos valores espectrais foram removidos usando L-stringency de 0.4. Além

disso, um *fold change* absoluto maior que dois foi usado para selecionar as proteínas diferencialmente expressas (PDE's).

3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras de folhas de arroz foi extraído com o kit NucleoSpin Plant RNA (Macherey-Nagel) e armazenado a - 80°C. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com o kit SMART PCR cDNA Synthesis, utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV e 2 µg de RNA.

3.3.1 Desenho dos *primers* específicos para os genes que codificam as proteínas de interesse

Foram desenhados *primers* específicos para os genes que codificam as proteínas diferencialmente expressas de interesse. A expressão diferencial destes genes foi confirmada por RT-qPCR (PCR em Tempo Real). Estes *primers* foram desenhados para amplificar entre 100 e 150 pares de bases na extremidade 3' não-traduzida e para que a temperatura de *melting* (T_m) fosse 60 ± 2°C. Tabela 1.

Tabela 1 – Lista de *Primers* utilizados no RT-qPCR.

Mais expressos ou expressas somente na condição controle		
Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 3'-5'
Chlorophyll A-B binding protein	GGGACCGTAGCTTAGCAGTG	TCATCTCGTCGCACTAAACC
Photosystem II reaction center protein	ATTCAGACCTCGCAACCAGA	TCGGTGTAATGACTCGACAAA
Cytochrome b6-f complex subunit 4	TTGGTTAGGTATTGGAGCAACA	GCACGGTACTTCACGATTGA
Expressas somente na condição de infestação		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	TACATTCGCTCGCTGACTTG	CGACAGGATGTGACCAACAC
Ubiquitin-conjugating enzyme	GAGTCGGATGAAAAGGGTGA	AAGAAAAGCATGCACGGACT
3-isopropylmalate dehydratase large Aconitase	GGTTTGTCCTTGGGTAAT	GCAAAATCATGTCCACCAAA
Glutathione S-transferase C-terminal	CTTTCACCATCTCTGCCGTA	GCACCACTGGGAAGGAATAA
Controle		
OsUBQ5	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	ACGATTGATTAAACCAGTCCATGA

3.3.2 PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

As análises de RT-qPCR foram realizadas no aparelho StepOne da Applied Biosystems, em placas de 48 poços. A reação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C (captação dos dados de fluorescência). Após, foi realizada uma curva de dissociação que consiste no aumento gradual da temperatura (0,3°C por segundo).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 20 µL, constituído por 10 µL do cDNA das amostras diluídas 100 vezes, 4,25 µL de água Milli-Q, 2 µL de Tampão PCR 10X, 1,2 µL de MgCl₂ 50mM, 0,1 µL de dNTP's 10mM, 0,4 µL dos pares de *primers* 10µM, 2,0 µL de SYBR Green (1:10.000) e 0,05 µL de Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/µL, Invitrogen).

Os níveis de expressão dos genes de interesse foram avaliados em relação ao gene controle Ubiquitina 5 (*OsUBQ5*) (JAIN et al. 2006). Para tanto, a expressão gênica relativa foi calculada e avaliada de acordo com o método $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) modificado, que leva em conta as eficiências de amplificação de cada par de *primers* ($\text{Expressão Relativa}_{\text{GENE TESTE}} / \text{GENE CONTROLE} = (\text{effPCR}_{\text{GC}})^{Ct_{\text{GC}}} / (\text{effPCR}_{\text{GT}})^{Ct_{\text{GT}}}$). Cada amostra foi avaliada em quatro repetições técnicas e três repetições biológicas.

3.4 Parâmetros fotossintéticos

Para a verificação da capacidade fotossintética das plantas foi utilizado um fluorímetro portátil (OS30p, Optisciences, UK) (STRASSER et al. 2000, 2004; TSIMILLI et al., 2008). Foram analisadas 10 folhas (2ª ou 3ª abaixo da folha bandeira) de cada condição (controle e pouco infestadas). Regiões centrais da folha foram mantidas por 20 minutos no escuro (envoltas em papel alumínio) e depois receberam

um pulso de luz de 3,000 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Foram analisados 16 parâmetros do JIP test.

3.5 Análise estatística

As médias foram comparadas através do Teste *t* de Student, utilizando-se dois níveis de significância ($p \leq 0,05$ e $0,01$). Nas análises estatísticas foi empregado o software SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas proteínas expressas em folhas de plantas de arroz controle (sem infestação) e pouco infestadas (com infestação precoce do ácaro *S. oryzae*, com dano parcial na folha e aproximadamente 20 ácaros por folha), procurando identificar proteínas com possibilidade de participação no processo de defesa da planta.

4.1 Identificação das proteínas diferencialmente expressas

Foram identificadas 2.466 proteínas na condição de infestação e 1.593 na condição controle. A maioria destas proteínas estavam presentes em ambas as condições (1.574 proteínas, que corresponde a 63,83%) destas 32 foram mais expressas na condição controle e nenhuma mais expressa na condição de infestação. Das proteínas exclusivas, 19 foram expressas somente na condição controle e 872 expressas somente na condição de infestação.

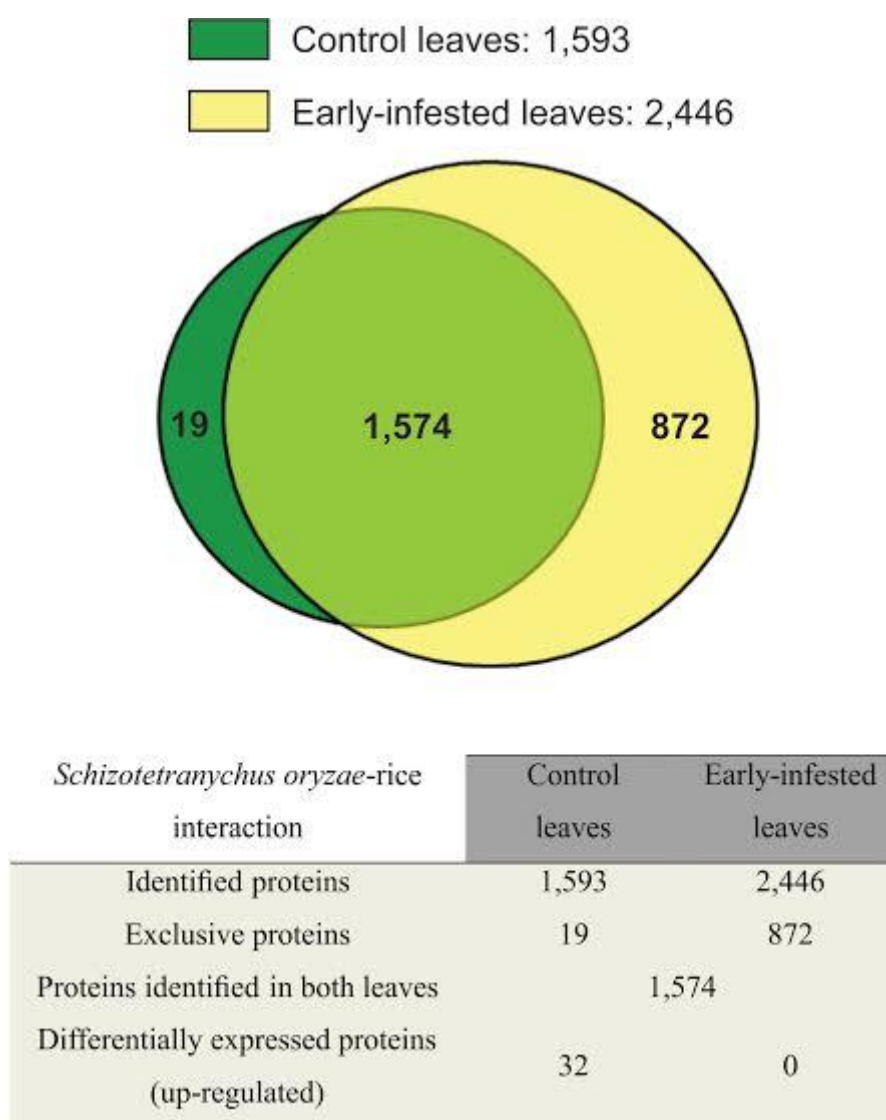


Figura 7 - Diagrama de Venn mostrando a dispersão de proteínas identificadas entre as condições Controle e Pouco Infestada, utilizando 0,001 de probabilidade.

Aumentando a estringência dessas análises, foram selecionadas somente as proteínas com 10 ou mais contagens espectrais. Desta maneira, os resultados tornam-se ainda mais significativos. Com a seleção das proteínas com 10 ou mais contagens espectrais foram relacionadas 109 proteínas, das quais 37 encontram-se mais expressas nas folhas controle e 72 mais expressas nas folhas infestadas (Tabela 2).

Tabela 2. Lista das proteínas diferencialmente expressas identificadas em folhas de arroz nas condições controle e infestada pelo ácaro *Schizotetranychus oryzae*. As proteínas em negrito foram confirmadas em RT-qPCR.

DOWN-REGULATED PROTEINS IN EARLY INFESTED RICE LEAVES					
Functional categories	Description	Locus	E-value	Spec counts Control/ Infested	Fold Change
Photosynthesis	Oxygen evolving enhancer protein 3 domain	LOC_Os07g36080	7.e-152	795/42	18.93
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os04g38410	4.e-180	428/34	12.59
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os11g13890	0	502/42	11.95
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os07g37550	0	557/48	11.6
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os06g21590	9.e-180	259/23	11.26
	Ribulose biphosphate carboxylase large	LOC_Os10g21268	8.e-137	6018/549	10.96
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os09g17740	0	703/68	10.34
	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur	LOC_Os07g37030	2.e-166	443/45	9.84
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os01g41710	0	551/57	9.67
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os01g52240	0	351/39	9.00
	Ribulose biphosphate carboxylase large	LOC_Os01g58020	4.e-104	1560/176	8.86
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os07g38960	0	257/34	7.56
	Ribulose biphosphate carboxylase large	LOC_Os10g21268	2.e-125	4332/573	7.56
	Plastocyanin, chloroplast precursor	LOC_Os06g01210	2.e-107	1038/140	7.41
	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os08g33820	0	192/33	5.82
	Photosystem II reaction center protein	LOC_Os08g15296	3.e-50	37	-
	Cytochrome b6-f complex subunit 4	LOC_Os10g21326	8.e-95	29	-
Carbohydrate metabolism and energy production	Lactate/malate dehydrogenase	LOC_Os01g61380	0	96/12	7.54
	Lactate/malate dehydrogenase	LOC_Os03g56280	0	533/71	7.51
	Glycosyl hydrolases family 17	LOC_Os01g71820	0	58/9	6.44
	Glycosyl hydrolases family 17	LOC_Os01g71830	0	44/4	6.44
	ATP synthase gamma chain	LOC_Os07g32880	0	537/96	5.59
	NAD dependent epimerase/dehydratase	LOC_Os05g01970	0	106/23	4.61
	ATP synthase epsilon chain	LOC_Os01g58000	2.e-94	173/42	4.12

	Glycosyl hydrolases family 17	LOC_Os01g71860	0	10	-
	Starch synthase	LOC_Os06g04200	0	19	-
Oxidative stress-related	Thioredoxin	LOC_Os12g08730	1.e-124	214/23	9.3
	Copper/zinc superoxide dismutase	LOC_Os03g22810	7.e-105	58/8	7.25
	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplast	LOC_Os04g33970	2.e-52	135/23	5.87
Protease inhibitors	LTPL113 - Protease inhibitor/seed storage/LTP	LOC_Os02g44320	4.e-86	289/19	15.21
	LTPL122 - Protease inhibitor/seed storage/LTP	LOC_Os04g46830	7.e-91	141/11	12.82
Lipid metabolism	Enoyl-acyl-carrier-protein reductase	LOC_Os08g23810	0	65/17	3.8
Others	Actin	LOC_Os12g44350	0	94/8	11.75
	Cupin	LOC_Os08g35760	7.e-152	318/53	6.00
	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	LOC_Os06g48750	0	123/38	4.4
	Ubiquitin	LOC_Os05g38310	2.e-57	24	-
Unknown	Expressed protein	LOC_Os05g48630	2.e-97	289/17	17.00

Obs: - = exclusive of control condition.

UP-REGULATED PROTEINS IN EARLY INFESTED RICE LEAVES

Functional categories	Description	Locus	E-value	Spec counts Control/Infested	Fold Change
Protein modification/degradation	Aspartyl aminopeptidase	LOC_Os12g13390	0	19	-
	OsPOP12 - Putative Prolyl Oligopeptidase	LOC_Os06g11180	0	18	-
	Puromycin-sensitive aminopeptidase	LOC_Os08g30810	0	16	-
	Zinc_peptidase	LOC_Os02g46520	0	15	-
	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	LOC_Os01g08200	0	14	-
	Aspartic proteinase oryzain-1 precursor	LOC_Os05g49200	0	13	-
	Peptidase, M24	LOC_Os05g28280	0	12	-
	Ubiquitin-conjugating enzyme	LOC_Os09g12570	1.e-109	12	-
	Proteasome/cyclosome repeat containing	LOC_Os04g51910	0	10	-
Amino acid metabolism	3-isopropylmalate dehydratase large Aconitase	LOC_Os02g03260	0	15	-
	Aminotransferase, classes I and II	LOC_Os01g08270	0	14	-
	Cysteine desulfurase 1, mitochondrial	LOC_Os09g16910	0	13	-
	D-aminoacylases	LOC_Os05g08930	0	13	-
	Peptidyl-prolyl isomerase	LOC_Os08g41390	0	11	-
	Argininosuccinate lyase	LOC_Os03g19280	0	10	-
	Aspartate aminotransferase	LOC_Os09g28050	0	10	-
	Amine oxidase, flavin-containing	LOC_Os03g08570	0	10	-
Carbohydrate metabolism and energy production	UDP-glucose 6-dehydrogenase	LOC_Os03g55070	0	12	-
	UDP-glucose 6-dehydrogenase	LOC_Os12g25690	0	12	-
	Soluble starch synthase 3, chloroplast	LOC_Os04g53310	0	11	-
	Beta-galactosidase	LOC_Os01g72340	0	10	-
	Citrate synthase,	LOC_Os02g13840	0	10	-

	NAD dependent epimerase/dehydratase	LOC_Os05g32140	0	10	-
	Sucrase-related	LOC_Os02g49320	0	10	-
Lipid metabolism	Acyl-coenzyme A oxidase 1.2, peroxisomal	LOC_Os06g01390	0	14	-
	2-oxo acid dehydrogenases acyltransferase	LOC_Os12g08170	0	13	-
	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	LOC_Os10g31950	0	11	-
	3,4-dihydroxy-2-butanone kinase	LOC_Os03g51000	0	11	-
	phosphatidylinositol-specific phospholipase	LOC_Os09g36520	0	11	-
Oxidative stress related	Oxidoreductase, aldo/keto reductase	LOC_Os07g04990	0	21	-
	Glutathione S-transferase, C-terminal	LOC_Os08g43680	0	18	-
	Leucoanthocyanidin reductase	LOC_Os04g53810	0	17	-
	Glutathione S-transferase	LOC_Os10g38780	2.e-168	11	-
Translation-related	Tyrosyl-tRNA synthetase	LOC_Os01g31610	0	20	-
	Methionyl-tRNA synthetase	LOC_Os06g31210	0	18	-
	Cysteinyl-tRNA synthetase	LOC_Os09g38420	0	10	-
Transport related	Mitochondrial import receptor subunit	LOC_Os01g69250	2.e-151	12	-
	Importin subunit beta	LOC_Os12g38110	0	10	-
	Cysteine-rich repeat secretory	LOC_Os05g02200	0	10	-
Jasmonic acid synthesis	Lipoxygenase 2.1, chloroplast precursor	LOC_Os12g37260	0	39	-
	Lipoxygenase	LOC_Os12g37350	0	14	-
	COP9 signalosome complex subunit 5b	LOC_Os04g56070	0	11	-
Phosphatase	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os01g49690	0	11	-
	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os02g57450	0	10	-
General metabolic processes	Aldehyde dehydrogenase	LOC_Os02g07760	1.e-130	14	-
	Aldehyde dehydrogenase	LOC_Os01g40860	0	11	-
Stress-response	Cyclophilin	LOC_Os09g39780	1.e-131	13	-
	WD domain, G-beta repeat domain containing	LOC_Os06g19660	0	10	-
Metabolism purine and pirimydin	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	LOC_Os07g39070	0	12	-
	Adenylosuccinate synthetase, chloroplast	LOC_Os03g49220	0	11	-
RNA related-Stress	TUDOR protein with multiple SNc domains	LOC_Os02g32350	0	19	-
Detoxification	Metallo-beta-lactamase	LOC_Os01g47690	0	15	-
Hormone signaling	Gibberellin receptor GID1L2	LOC_Os07g06830	0	15	-
Hormone-related	Nitrilase	LOC_Os02g42330	0	14	-
Chitin- related	Pro-resilin	LOC_Os06g12580	0	12	-
Nitrogen gene metabolismo	NifU	LOC_Os05g06330	0	12	-
Calcium-signaling	Peflin	LOC_Os11g04480	0	10	-
Signal transduction	Ras-related protein	LOC_Os06g35814	4.e-159	10	-
Others	Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase	LOC_Os12g08760	0	15	-
	Transposon protein, putative, CACTA	LOC_Os11g06570	1.e-103	14	-
	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	LOC_Os10g32730	0	13	-

	Villin	LOC_Os03g24220	0	12	-
	O-methyltransferase	LOC_Os08g06100	0	11	-
	Lissencephaly type-1-like homology motif	LOC_Os03g14980	0	11	-
	HEAT	LOC_Os07g38760	0	11	-
	MA3 domain-containing protein	LOC_Os08g02690	0	11	-
	PDI	LOC_Os03g29190	0	11	-
	DnaK	LOC_Os02g48110	0	10	-
	CGMC_MAPKCMGC_2_ERK.12 - CGMC includes	LOC_Os06g06090	0	10	-
Unknown	expressed protein	LOC_Os03g58372	5.e-08	15	-
	expressed protein	LOC_Os01g70400	9.e-126	12	-
	expressed protein	LOC_Os11g21990	0	11	-

As proteínas foram agrupadas arbitrariamente em categorias funcionais, conforme sua possível função molecular. As proteínas mais expressas ou expressas somente na condição controle enquadraram-se nas seguintes categorias: fotossíntese, metabolismo de carboidratos e produção de energia, estresse oxidativo, inibidores de proteases e metabolismo de lipídios.

As proteínas expressas somente nas folhas infestadas compreendem as seguintes categorias: modificação e degradação de proteínas, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos e produção de energia, metabolismo de lipídios, estresse oxidativo, tradução, transporte, síntese de ácido jasmônico, fosfatases, processos metabólicos gerais, resposta a estresse, metabolismo de purina e pirimidina, RNA relacionado a estresse, detoxificação, sinalização de hormônios, metabolismo de nitrogênio, sinalização de cálcio e transdução de sinal.

4.2 Confirmação dos padrões de expressão encontrados no MudPIT utilizando RT-qPCR

As proteínas em negrito da Tabela 2 foram correlacionadas em nível de RNA por RT-qPCR. As proteínas correlacionadas por RT-qPCR foram selecionadas conforme busca feita em referencial teórico. Chlorophyll A-B binding protein, Photosystem II reaction center protein e Cytochrome b6-f complex subunit foram selecionadas por estarem envolvidas com o processo fotossintético, grupo funcional

mais afetado pela infestação dos ácaros. Outro grupo selecionado foi o relacionado a processos de ubiquitinação (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase e Ubiquitin-conjugating enzyme). As proteínas 3-isopropylmalate dehidratase large Aconitase e Glutathione S-transferase C-terminal foram selecionadas por estarem envolvidas com estresse oxidativo, que é ocasionado por diversos estresses abióticos e bióticos

Para validar os resultados encontrados no MudPIT e correlacionar a expressão das proteínas envolvidas na resposta ao ácaro, foram projetados *primers* específicos para os genes selecionados.

Os sete genes testados foram correlacionados por RT-qPCR, conforme mostrado na Figura 8. Destes, três foram mais expressos na condição controle e quatro mais expressos na condição de infestação, correlacionando em nível de RNA os resultados encontrados no MudPIT (em nível de proteína).

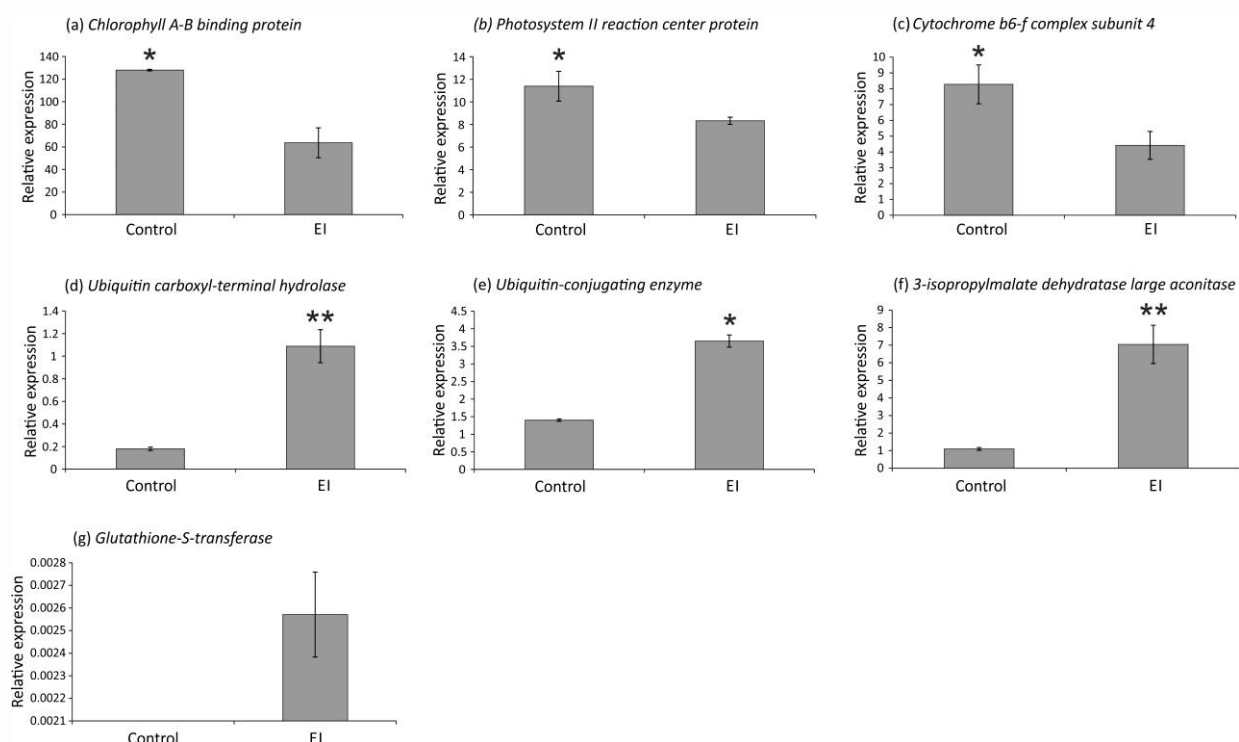


Figura 8 – Correlação dos níveis de expressão encontrados no MudPIT por RT-qPCR. Os valores representam a média de três amostras $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$.

4.3 Alterações no sistema fotossintético

Quando as plantas são expostas a condições estressantes, realizam uma transição metabólica, saindo de uma condição de crescimento e reprodução para uma condição defensiva. Durante esta mudança metabólica, ocorre a modulação na expressão de diversas proteínas, incluindo algumas envolvidas com o aparato fotossintético (BILGIN et al., 2010)

A categoria funcional mais diferencialmente representada foi a da fotossíntese, com um total de 17 proteínas mais expressas na condição controle. A proteína Oxygen evolving enhancer protein 3 domain, seguida da Chlorophyll A-B binding foram as mais diferencialmente expressas (em torno de 19 e 12 vezes menos expressas nas folhas infestadas, respectivamente). Com esses resultados, percebe-se claramente que a maquinaria fotossintética da planta é prejudicada após a infestação do ácaro, diminuindo a expressão de proteínas relacionadas com essa via e provavelmente afetando a capacidade da planta de obter energia via fotossíntese.

A medição de clorofila com fluorescência é um método não-invasivo, amplamente utilizado para monitoramento de diferentes espécies de plantas (PERCIVAL et al., 2003). Neste estudo, os parâmetros fotossintéticos foram analisados para verificar a ocorrência de estresse causado pelo ácaro e confirmar se as proteínas fotossintéticas encontradas no MudPIT realmente têm sua função alterada. Entre os parâmetros usados estão o PI_{ABS} que revela o índice de desempenho fotossintético, PI_{ABS} mede os fótons absorvidos pela antena FSII. Os outros 2 parâmetros estão relacionados com a fluorescência que são N e S_m que medem número de reações redox até que a intensidade máxima de fluorescência seja alcançada e o número de elétrons transportados, os três parâmetros alterados estão relacionados ao fotossistema II.

No nosso trabalho, também verificamos uma diminuição destes parâmetros com a interação arroz-ácaro, conforme Figura 9.

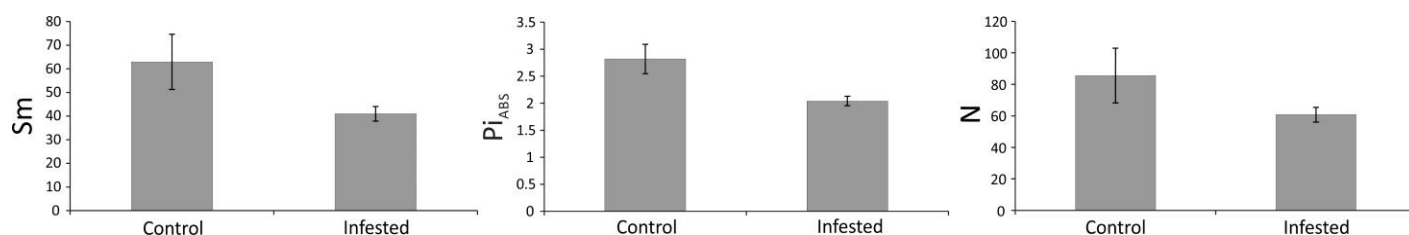


Figura 9– Parâmetros fotossintéticos (S_m , PI_{ABS} e N) analisados nas folhas controle e infestadas pelo ácaro *Schizotetranychus oryzae*.

PI_{ABS} é um dos parâmetros fotossintéticos mais abrangentes, pois considera todos os principais processos fotoquímicos (SIMIC et al., 2014). Em estudos anteriores, PI_{ABS} foi utilizado para estimar a vitalidade da planta em resposta a diferentes estresses ambientais (STRASSERS et al., 2000). A diminuição de PI_{ABS} em resposta à salinidade foi principalmente devido a uma diminuição da eficiência fotoquímica e no transporte de elétrons (BACARIN et al., 2011). O índice de desempenho fotossintético também é relatado como um ótimo indicador de estresse hídrico, conforme estudos feitos com plantas de trigo os valores de PI_{ABS} foram reduzidos devido a desidratação (ZIVCAK et al., 2008). Estudo feito por Jafarinia et al. (2012) mostrou que PI_{ABS} e N foram alterados em plantas de canola por diferentes concentrações de NaCl, com o aumento das quantidades de sal ocorre uma significativa diminuição dos valores desses dois parâmetros.

Outros estudos também verificaram que alguns parâmetros fotossintéticos foram alterados por diferentes estresses, como no morango com a presença em altas quantidades dos gases como NO, CO e SO₂ (MUNEER et al., 2014), em algas por estresse salino (DEMETRIOU et al., 2007) e em feijão (*Vigna radiata*) por deficiência mineral (MUNEER et al., 2012, 2013). Acredita-se que pode haver uma transferência menor de elétrons e um menor investimento em energia na maquinaria bioquímica dessas plantas quando submetidas a esses estresses, pois elas não conseguem explorar de forma eficiente a energia devido à presença do estresse oxidativo (MUNEER et al., 2014). A quantidade de estudos analisando os parâmetros fotossintéticos a diversos estresses é extensa, porém, relatos da identificação de proteínas envolvidas e que têm sua expressão alterada por esses estresses ainda são escassos.

Com base em nossos resultados, sugerimos que o fotossistema II é afetado em resposta a infestação de *S. oryzae*, sendo provavelmente o primeiro e principal alvo de estresse biótico no aparato fotossintético das plantas de arroz. Estes dados são reforçados pela identificação de mudanças nos níveis de expressão de proteínas e dos parâmetros fotossintéticos do fotossistema II. Assim, os dados encontrados nesse estudo são muito significativos, pois mostram pela primeira vez que o sistema fotossintético II é alterado por estresse biótico.

4.4 Estresse oxidativo e síntese de ácido jasmônico

A rápida produção de ROS (do inglês *reactive oxygen species*) é muito citada em plantas como uma resposta ao estresse biótico (MORAN; THOMPSON, 2001; APEL; HIRT, 2004). Em níveis fisiologicamente baixos, a função das ROS é de mensageiros na sinalização intracelular, enquanto o excesso de ROS induz a modificação oxidativa de macromoléculas, inibição do funcionamento de proteínas e promoção de morte celular. Um aumento na quantidade de substâncias oxidantes induzidas por estresses ambientais pode ser altamente tóxico (KELLY; GIBBS, 1973; CIRCU; AW, 2010). Uma das consequências da atividade de ROS é o dano oxidativo na integridade da membrana, devido a processos de peroxidação lipídica, podendo resultar na geração de compostos altamente citotóxicos (GATEHOUSE, 2002). Para manter a homeostase em condições de estresse, as plantas precisam fortalecer os mecanismos de resistência, tais como de defesa celular. Assim, as plantas reagem produzindo enzimas detoxificantes para manter os níveis de ROS em tecidos infectados com patógenos (SHARMA et al., 2012).

Neste estudo foram identificadas diversas enzimas antioxidantes com expressão diferencial. As proteínas Oxidoreductase, aldo/keto reductase e a Glutathione S-transferase foram expressas somente nas folhas infestadas. Os genes que codificam essas proteínas também apresentaram maiores expressões em nível de RNA, conforme visto na Figura 8. Esses resultados sustentam a hipótese de que o estresse oxidativo é induzido após o início da infestação dos ácaros. As Glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas que desempenham um papel fundamental na

detoxificação celular de compostos xenobióticos e de ROS, sendo uma proteína muito citada em estresses abióticos, mostrando que sua expressão é alterada por inúmeros estresses. GSTs já foram citadas como diferencialmente reguladas por vários estresses abióticos, incluindo seca (BIANCHI et al., 2002), uso de herbicidas (EDWARDS; DIXON, 2005), dano mecânico nas folhas (VOLLENWEIDER et al., 2000), baixas temperaturas (ANDERSON; DAVIS, 2004), baixo teor de oxigênio nos tecidos (MOONS, 2003), altos níveis de peróxido de hidrogênio (LEVINE et al., 1994), luz UV (LOYALL et al., 2000), deficiência de fósforo (EZAKI et al., 1995), excesso de metais (EZAKI et al., 2004) e estresse salino (ROXAS et al., 2007; JHA et al., 2011).

A partir de um estudo recente, verificou-se que as GSTs estavam envolvidas na regulação do alongamento celular e floração em resposta à luz (CHEN et al., 2007). A superexpressão de genes GST em arroz melhora sua tolerância à baixa temperatura (TOSHIKAZU et al., 2002) e em plantas de tabaco aumentaram a resistência ao estresse oxidativo (YU et al., 2003). De acordo com Sharma et al. (2014) o aumento na expressão do gene *GSTU4* de arroz em plantas de *Arabidopsis* resultou em sensibilidade reduzida aos hormônios vegetais auxina e ácido abscísico. Entretanto, as plantas transgênicas revelaram maior tolerância quando expostas a estresse salino e estresse oxidativo, o que pode ser atribuído à menor acumulação de ROS e maior atividade de GST. Alguns estudos têm demonstrado que a expressão de GSTs é ativada também por estresse biótico, tais como ataques de patógenos e elicitores fúngicos (EDWARDS et al., 2000). Assim podemos verificar que a atividade de GST em plantas protege as células de diversos tipos de estresses abiótico e biótico enfatizando a importância da proteína verificada no nosso estudo.

Quando a planta é infestada por herbívoros, múltiplas vias de sinalização são ativadas, incluindo as do ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e etileno (ET). Estas vias elicitam as respostas de defesa e resistência da planta aos herbívoros (BOSTOCK 2005; HOWE; JANDER, 2008). O AJ é um hormônio fundamental para o desenvolvimento de respostas das plantas também aos estresses abióticos (WASTERNAK; HAUSE, 2013). Este hormônio desempenha um papel fundamental na biossíntese de metabólitos secundários (DE GEYTER et al., 2012). Está envolvido na resposta ao estresse oxidativo, uma vez que ativa o ciclo ascorbato-glutationa para a redução de ROS (SASAKI-SEKIMOTOS et al., 2005).

Proteínas relacionadas à via de síntese do ácido jasmônico foram verificadas com elevada expressão, como Lipoxigenase (LOX) e COP9 signalosome complex subunit 5b, foram expressas somente nas folhas infestadas. Em um estudo recente realizado por Tianpei et al. (2015), o gene *LqhIT2* de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, que codifica uma toxina de escorpião anti-insetos, foi introduzido em arroz para melhorar a sua resistência contra lagartas. A expressão de LOX foi significativamente aumentada em plantas transgênicas que continham o gene *LqhIT2*, em comparação com o tipo selvagem. Isto sugere que *LqhIT2* regulou a expressão de LOX, embora seja desconhecido esse funcionamento. LOX é um marcador da sinalização de AJ, e a indução de LOX deve ter induzido a biossíntese de AJ, o que é crucial para a regulação das defesas da planta contra herbívoros. LOX desempenha um papel importante na biossíntese de AJ e também está envolvido na resposta de defesa da planta a fatores ambientais. Dessa forma, a regulação das lipoxigenases encontradas pode ser importante para a defesa da planta contra o ácaro.

4.5 Alterações no metabolismo de aminoácidos e carboidratos

Quando a planta sofre um estresse, as alterações metabólicas ocorridas não estão limitadas a produção de ROS, mas se estendem a todo o metabolismo primário da planta. O estresse oxidativo induz e provoca alterações dinâmicas no metabolismo de carboidratos e aminoácidos (LEHMAN et al., 2009). Nesse estudo encontramos várias proteínas relacionadas aos metabolismos de carboidratos e aminoácidos. A proteína 3-isopropylmalate dehydratase large, aconitase que foi expressa somente nas folhas infestadas (Tabela 2), e seu aumento de expressão foi confirmado também em nível de RNA por RT-qPCR (Figura 8). Não encontramos estudos que abordam essa proteína relacionada a estresses, porém, essa proteína apresenta um domínio aconitase, normalmente relacionado a ROS.

A proteína mais abundante na categoria funcional metabolismo de carboidratos foi a UDP-glucose 6 desidrogenase. Karkonen et al. (2005) mostrou que a proteína UDP-glucose 6 desidrogenase desempenha um papel importante na biossíntese das pentoses da parede celular durante o crescimento pós-germinativo de plantas de

milho. A atividade enzimática da UDP-glucose 6 desidrogenase é dependente de fosforilação, sendo desligada quando defosforilada. No estudo feito por Yin et al. (2014) a UDP-glicose-6-desidrogenase foi fosforilada em resposta ao estresse de inundação, indicando que ela estava ativa em condições de estresse e que pode desempenhar um papel importante na proteção e preservação da parede celular em plantas de soja.

4.6 Proteínas envolvidas com modificação e degradação proteica

No presente estudo também foram encontradas nove proteínas relacionadas à degradação e modificação de proteínas como sendo mais expressas nas folhas infestadas pelo ácaro, sendo assim a categoria funcional mais representativa das proteínas mais expressas em condições de infestação. As proteínas Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase e Ubiquitin-conjugating enzyme foram também confirmadas em nível de RNA por RT-qPCR (Figura 8). Os mecanismos de ubiquitinação estão normalmente envolvidos em todos os processos celulares, sendo responsáveis pela remoção de peptídeos defeituosos e por agir como regulador. Sendo assim, possibilita que as células respondam rapidamente aos sinais intracelulares através de modificações em reguladores-chave. Acredita-se que a ubiquitinação permite que as plantas respondam rapidamente às mudanças ambientais (YATES; SADANANDOM, 2013).

Liu et al., (2012) verificaram, através de análise proteômica, que várias proteínas relacionadas à ubiquitinação foram mais expressas em plantas de arroz na presença de quantidades elevadas de sal, porém, nenhuma dessas proteínas foram encontradas no nosso estudo. Outro estudo realizado por Patel et al. (2014), mostrou que o aumento na expressão do gene *LpHUB1* relacionado a ubiquitinação melhora a tolerância à seca e o crescimento de *Lolium perenne*, pastagem típica da Europa. Análises adicionais revelaram que as plantas transgênicas de *L. perenne* geralmente exibiam maior teor relativo de água na folha, maior teor de clorofila e aumento da taxa fotossintética quando submetidas ao estresse hídrico. Estes resultados sugerem que

LpHUB1 pode desempenhar um papel importante na tolerância de *L. perenne* a estresses abióticos.

4.7 Metabolismo de lipídios

O metabolismo lipídico é uma das maiores redes de sinalização desencadeadas em plantas como uma resposta adaptativa após exposição a vários estresses. Nesse trabalho foram encontradas várias proteínas diferencialmente expressas que estão relacionadas ao metabolismo de lipídios. Entre elas Acyl-coenzyme A oxidase peroxisomal, 2-oxo acid dehydrogenases acyltransferase, 3-ketoacyl-CoA thiolase peroxisomal, 3,4-dihydroxy-2-butanone kinase, phosphatidylinositol-specific phospholipase, (Tabela 2). O maior impacto inicial de um estresse acontece normalmente na membrana celular e conduz à hidrólise de lipídios de membrana. Este processo é mediado por fosfolipases, que catalisam o passo inicial de quebra dos fosfolipídios e a geração de múltiplos lipídios que são derivados de mensageiros secundários (BARGMANN, MUNNIK, 2006; TUTEJAT, SOPORY, 2008).

No nosso trabalho encontramos a proteína phosphatidylinositol-specific phospholipase expressa somente nas folhas infestadas pelo ácaro. Um estudo feito por Nokhrina et al. (2014) mostrou que o aumento na expressão do gene *BnPLC2* a espécie *Brassica napus*, conhecida popularmente como canola, a demonstrar maior tolerância à seca, modulando vários genes envolvidos em diferentes processos levou e influenciando os níveis hormonais em diferentes tecidos. O estudo também examinou, em nível metabólico, seus efeitos sobre fatores abiótico (baixa temperatura) e biótico (doença da podridão branca), dois tipos de estresse encontrados em canola. Foi demonstrado que o aumento na expressão do gene *BnPLC2* parece ter desencadeado a síntese de diferentes padrões de metabólitos, de acordo com o estresse abiótico ou biótico, fazendo com que a planta desenvolvesse fenótipos de tolerância e resistência a esses dois estresses, respectivamente. Assim, o aumento na expressão da proteína phosphatidylinositol-specific phospholipase

encontrada no nosso estudo pode ser uma promissora ferramenta para processos biotecnológicos que aumentem a resistência da cultivar IRGA 424.

4.8 Proteínas fosfatases modulando várias respostas celulares

Proteínas fosfatases são os principais componentes de uma série de vias de sinalização que modulam várias respostas celulares. Fosfatases, juntamente com proteínas quinases, regulam a fosforilação e desfosforilação de proteínas, e desempenham papéis importantes nas respostas aos estresses bióticos (SINGH et al., 2010; HE et al., 2012). Essas proteínas são importantes na transdução de sinal, que regulam muitos processos biológicos, incluindo crescimento e divisão celular, resposta a hormônios e a estímulos ambientais e controle metabólico (LUAN, 2000). Durante a fosforilação, uma proteína quinase adiciona um grupo fosfato a um substrato. Proteínas fosfatases invertem este processo removendo o grupo fosfato. Em muitos casos, a adição ou a remoção de um grupo fosfato ativa ou desativa uma enzima. Deste modo, proteínas quinases e fosfatases desempenham um papel fundamental no controle da atividade de uma enzima e regulam o processo bioquímico pelo qual a enzima é responsável.

Encontramos neste trabalho duas proteínas fosfatases do tipo Ser/Thr protein phosphatase. Estas foram expressas somente nas folhas infestadas pelos ácaros, podendo ser proteínas importantes nos processos de ativação ou desativação de outras enzimas. Encontramos inúmeros trabalhos que relacionam proteínas fosfatases com vários estresses, entre eles o estudo de Singh et al. (2010) onde foram identificados vários genes que codificam proteínas fosfatases. A expressão e a caracterização desses genes sugerem o envolvimento deles em um grande número de vias de sinalização desencadeada por estresse abiótico (salinidade, frio e seca) e seu possível papel no desenvolvimento da planta. Estudo feito por He et al. (2012) mostrou que a superexpressão do gene *OsPFA-DSP2* que codifica a proteína tyrosine phosphatases em arroz, aumentou a sensibilidade da planta à *Magnaporthe grisea*, inibindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e suprimindo a expressão de genes PR relacionados à patogênese após a infecção fúngica.

4.9 Outras proteínas diferencialmente expressas

Outros grupos funcionais tiveram um menor número de proteínas relacionadas, porém, isso não exclui a possibilidade desses grupos serem importantes no processo de resistência à infestação dos ácaros. Entre esses grupos funcionais estão os aldeídos, que são intermediários em várias rotas metabólicas fundamentais, incluindo a síntese de carboidratos, vitaminas, esteroides, lípidos e aminoácidos (YOSHIDA et al., 1998; VASILIOU et al., 1999). Eles também são produzidos em resposta a estresses ambientais, incluindo salinidade, seca, frio e calor. Moléculas de aldeído são quimicamente reativas em altas concentrações, podendo ser tóxicas e impactar negativamente o crescimento da célula, o rendimento de sementes e a sobrevivência (KOTCHONI et al., 2006; SHIN et al., 2009). Aldeído desidrogenases são um grupo evolutivamente conservado de enzimas que catalisam a oxidação de uma vasta gama de moléculas de aldeído reativo endógenas nos seus ácidos carboxílicos correspondentes (KOTCHONI et al., 2006). Encontramos em nosso trabalho duas proteínas Aldehyde dehydrogenase, que foram expressas somente nas folhas infestadas. Estudos já relataram que a perda de função de ALDH7 no endosperma de arroz leva ao escurecimento da semente durante a dessecação e o armazenamento, sugerindo que OsALDH7 é fundamental para a maturação da semente (SHIN, 2009). O aumento na expressão dos genes *ALDH3I1* e *ALDH7B4* em *Arabidopsis thaliana* foi suficiente para aumentar a tolerância à seca, salinidade e estresse oxidativo (SUNKAR et al., 2003; KOTCHONI et al., 2006).

Encontramos no nosso estudo também a proteína Nitrilase, expressa somente nas folhas infestadas. Nitrilase é uma enzima envolvida na biossíntese de auxina. Estudo feito por Xu et al. (1998) mostrou que uma proteína nitrilase-like interage com proteínas de ligação ao DNA envolvidas nas rotas do etileno e em respostas de defesa.

Outra proteína citada em plantas é a Tudor-SN (TSN). Esta proteína foi caracterizada bioquimicamente como tendo uma atividade de ligação à RNA, associada ao citoesqueleto (FREY et al. 2010). Em um estudo de Frey et al. (2010),

foi investigado o papel fisiológico da TSN isolando mutações nulas para dois genes homólogos em *Arabidopsis thaliana*. O estudo mostrou que TSN é importante para a estabilidade do RNA e para a tolerância a alta salinidade. Assim, TSN deve atuar nos mRNAs que entram na via secretora. No nosso estudo, encontramos TUDOR protein with multiple Snc domains 19 vezes mais expressa nas folhas infestadas pelos ácaros.

Proteínas do tipo Ciclofilinas estão presentes em todos os compartimentos celulares. Estão envolvidas em uma ampla variedade de processos, incluindo transporte e maturação de proteínas, apoptose, sinalização a partir de receptores, processamento de RNA, resposta imune, montagem de proteínas, atividade de miRNA e montagem do complexo de silenciamento RISC (KUMARI et al., 2014). Encontramos a proteína Cyclophilin expressa somente nas folhas infestadas pelos ácaros, sugerindo que esta proteína deve participar da resposta à infestação. Estudo feito por Kumari et al. (2014) sugere que o gene *OsCyp2-P* é regulado por diferentes condições de estresse. O aumento na expressão de *OsCyp2-P* resultou em múltiplas tolerâncias a estresses abióticos em plantas de tabaco transgênicas, evidenciado pelo maior comprimento das raízes e maior teor de clorofila. Plantas transgênicas também mostraram reduzido teor de peroxidação lipídica, vazamento de eletrólitos e conteúdo de superóxido, sugerindo melhor homeostase de íons nas plantas. Estudos de localização confirmaram que *OsCyp2-P* está localizada no citosol e no núcleo, indicando sua possível interação com outras proteínas. *OsCyp2-P* opera na via de eliminação de ROS e na homeostase iônica e, portanto, é um promissor gene candidato para melhorar a resistência à infestação de herbívoros em plantas cultivadas.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho tem uma importância regional, pois o estudo partiu da presença do ácaro *Schizotetranychus oryzae* em lavouras de arroz das cidades de Taquari e Cachoeirinha. Entretanto, tem um impacto mundial, pois é o primeiro estudo proteômico da interação arroz-ácaro fitófago.

Observamos nesse estudo que proteínas participantes do fotossistema II tiveram sua expressão reduzida na presença do ácaro. Outras proteínas mostraram maior expressão após infestação dos ácaros, evidenciando a busca pela sobrevivência da planta. Entre elas, proteínas relacionadas com estresse oxidativo e síntese de ácido jasmônico, metabolismo de aminoácidos e carboidratos, modificação e degradação proteica, metabolismo de lipídios e fosfatases.

Nossos dados revelaram várias proteínas que poderiam ser utilizadas em futuras abordagens biotecnológicas que buscam a resistência do arroz ao ácaro *Schizotetranychus oryzae* (Tabela 3).

Tabela 3 -Novas proteínas com potencial biotecnológico de resistência a estresses bióticos e suas estratégias.		
Estratégia	Proteína	Locus
Aumentando a taxa fotossintética e melhorando a síntese de carboidratos	Chlorophyll A-B binding	LOC_Os09g17740
	Photosystem II reaction center protein	LOC_Os08g15296
	Cytochrome b6-f complex subunit 4	LOC_Os10g21326
Detoxificando a célula	Glutathione S-transferase, C-terminal	LOC_Os08g43680
Ativando a síntese de AJ e respostas de defesa	Lipoxygenase 2.1, chloroplast precursor	LOC_Os12g37260
	Lipoxygenase	LOC_Os12g37350
Protegendo e preservando a parede celular	UDP-glucose 6-dehydrogenase	LOC_Os03g55070
	UDP-glucose 6-dehydrogenase	LOC_Os12g25690
Modificando e degradando proteínas mal formadas	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	LOC_Os01g08200
	Ubiquitin-conjugating enzyme	LOC_Os09g12570
Modulando vários genes envolvidos em diferentes processos e influenciando os níveis hormonais em diferentes tecidos	Phosphatidylinositol-specific phospholipase	LOC_Os09g36520
Modulando várias respostas celulares	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os01g49690
	Ser/Thr protein phosphatase	LOC_Os02g57450
Auxiliando nos processos metabólicos	Aldehyde dehydrogenase	LOC_Os02g07760
	Aldehyde dehydrogenase	LOC_Os01g40860
Interagindo com proteínas de ligação ao DNA envolvidas em rotas do etileno e em respostas de defesa	Nitrilase	LOC_Os02g42330
Atuando nos mRNAs que entram na via secretora	TUDOR protein with multiple SNc domains	LOC_Os02g32350
Operando na via de eliminação de ROS e na homeostase iônica	Cyclophilin	LOC_Os09g39780

6 CONTINUIDADE DO TRABALHO

Este trabalho é pioneiro na identificação de proteínas de arroz diferencialmente expressas durante a interação arroz-ácaro. As proteínas identificadas neste trabalho permitem a obtenção de informações muito importantes sobre os processos de interação ácaro-planta e seus processos de defesa. Entre as inúmeras perspectivas de continuidade deste trabalho, podemos citar:

- ✓ Ensaios enzimáticos para confirmar a expressão das proteínas encontradas;
- ✓ Categorização funcional das proteínas encontradas através do Gene Ontology;
- ✓ Compreender funções e utilidades do sistema biológico dessas proteínas através do programa Kegg;
- ✓ Identificar e caracterizar as proteínas das folhas muito infestadas pelo ácaro *Schizotetranychus oryzae*;
- ✓ Verificar o nível de expressão de outros genes importantes através de RT-qPCR;
- ✓ Aumentar ou diminuir a expressão dos genes encontrados, buscando a resistência ao ácaro;

- ✓ Caracterização das proteínas não citadas nessa discussão e desconhecidas até o momento.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL G. K.; Rakwal, R. Rice proteomics: A move toward expanded proteome coverage to comparative and functional proteomics uncovers the mysteries of rice and plant biology. **Proteomics**, v.11, p.1630-1649, 2011.
- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP. p.186-191, 2008.
- ANDERSON J.V.; DAVIS D.G. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiol Plant**, v.120, p.421–433, 2004.
- APEL, K.; HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol**, v.55, 373–399, 2004.
- ARENKOV P.; KUKHTIN A.; GEMMELL A.; VOLOSHCHUK S.; CHUPEEVA V.; MIRZABEKOV A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. **Analytical Biochemistry**, v.278, p.123-131, 2000.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. de; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; VILELA DE RESENDE, M. L.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13. p. 51-80, 2005.

BACARIN M. A.; DEUNER S.; SILVA S. P.; CASSOL D.; SILVA D. M. Chlorophyll a fluorescence as indicative of the salt stress on *Brassica napus* L. **Brazilian society of plant physiology**, v.23(4), p.245-253, 2011.

BALMER D.; PLANCHAMP C.; MAUCH-MANI B. On the move: induced resistance in monocots. **J. Exp Bot**, v.64, p.1249-1261, 2013.

BARCELLOS, D.F.; OLIVEIRA A. M.; SUDO S.; OLIVEIRA A. B.; FLECHTMANN C. H. W. Ocorrência do Acaro do arroz nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Brasília, **Pesq. Agropec. Brasil**, v.14, p.181 – 184, 1979.

BARGMANN B.O.; MUNNIK T. The role of phospholipase D in plant stress responses. **Curr Opin Plant Biol**, v.9, p.515–522, 2006.

BEYS-DA-SILVA W.O.; SANTI L.; BERGER M.; CALZOLARI D.; PASSOS D.O.; GUIMARÃES J.A.; MORESCO J.J.; YATES J.R. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **J. Proteome Res**. 2014

BIANCHI M.W.; ROUX C.; VARTANIAN N. Drought regulation of GST8, encodes the Arabidopsis homologue of ParC/Nt107 glutathione transferase/peroxidase. **Physiol Plant**, v.116, p.96–105, 2002.

BILGIN D.D.; ZAVALA J.A.; ZHU J.; CLOUGH S. J.; ORT D. R. DeLucia E. H. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. **Plant Cell Environ**, v.33, p.1597-1613, 2010.

BJELLQVIST B.; EK K.; RIGHETTI P.G.; GIANAZZA E.; GORG A.; WESTERMEIER R.; POSTEL W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **Journal of Biochemistry and Biophysic Methods**, v.6, p.317-339, 1982.

BOSTOCK R.M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annu Rev Phytopathol**, v.43, p.545–580, 2005.

BUFFON G.; BLASI E.A.R.; SILVA R.Z.; STEIN C.; DAMETTO A.; FERLA N.J.; BEYS DA SILVA W.O.; SPEROTTO R.A. Alterations in rice, corn and wheat plants infested by phytophagous mite. **Journal of acarology**, p.37-41, 2014.

CAPRIOLI R.M.; FARMER T.B.; GILE J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical Chemistry**, v.69, p.4751-4760, 1997.

CHAURAND P.; SANDERS M.E.; JENSEN R.A.; CAPRIOLI R.M. Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. **American Journal of Pathology**, v.165, p.1057-1068, 2004.

CHEMIN B.F. **Manual da Univates para trabalhos acadêmicos**: planejamento, elaboração e apresentação. 2. ed. Lajeado: Univates, 2012. E-book. Disponível em: <www.univates.br>. Acesso em: 10 outubro, 2013.

CHEN I.C.; HUANG I.C.; LIU M.J.; WANG Z.G.; CHUNG S.S. Glutathione Stransferase interacting with far-red insensitive 219 is involved in phytochrome A mediated signaling in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v.143, p.1189–1202, 2007.

CHO M.R.; KIM D.S.; IM D.S. A new record of tarsonemidae mite, *Steneotarsonemus spinki* (Acari, Tarsonemidae) and its damage on rice in Korea. **Kor J. Appl Entomol**, v.38, p.157-164, 1999.

CHOE L.H.; AGGARWAL K.; FRANCK Z.; LEE K.H. A comparison of the consistency of proteome quantitation using two-dimensional electrophoresis and shotgun isobaric tagging in Escherichia coli cells. **Electrophoresis**, v.26, p.2437-49, 2005.

CIRCU M.L.; AW T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.48, p.749–762, 2010.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Disponível em: <http://www.conab.gov.br >. Acesso em: 07 nov. 2014.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCÍA AGUSTÍN, P. JAKAB, G.; MAUCH, F.; PRIME-A-PLANT GROUP, et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, p. 1062–1071, 2006.

COUMANS J.V.; POLJAK A.; RAFTERY M.J.; BACKHOUSE D.; PEREG-GERK L. Analysis of cotton (*Gossypium hirsutum*) root proteomes during a compatible interaction with the black root rot fungus *Thielaviopsis basicola*. **Proteomics**, v.9, p.335-349, 2009.

DE GEYTER N.; GHOLAMI A.; GOORMACHTIG S.; GOOSSENS A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. **Trends Plant Sci**, v.17, p.349-359, 2012.

DEMETRIOU G.; CHRISTINA N.; ELENI N.; KIRIAKOS K. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—the protective role of polyamines, **Biochim Biophys Acta**, v.1767, p.272–280, 2007.

DERMAUW W.; WYBOUW N.; ROMBAUTS S.; MENTEN B.; VONTAS J.; GRBIC M.; CLARK R. M.; FEYEREISEN R.; VAN LEEUWEN T. A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.110, p.113-122, 2013.

DUAN M.; SUN S.S.M. Profiling the expression of genes controlling rice grain quality. **Plant Mol Biol**, v.59, p.165-178, 2005.

EDWARDS R.; DIXON D.P. Plant glutathione transferases. **Methods Enzymol**, v.401, p.169–186, 2005.

EDWARDS R.; DIXON D.P.; WALBOT V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. **Trends Plant Sci**, v.5, p.193–198, 2000.

EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/pesquisa/arrozirrigado.php>>. Acesso em 27 de outubro de 2013.

EUBEL H.; MEYER E.H.; TAYLOR N.L.; BUSSEL J.D.; OTOOLE N.; HEAZLEWOOD J.L.; CASLEDEN I.; SMALL I.D.; SMITH S.M.; MILLAR A.H. Novel proteins, putative membrane transporters and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. **Plant Physiology**, v.148, p.1809-1829, 2008.

EZAKI B.; SUZUKI M.; MOTODA H.; KAWAMURA M.; NAKASHIMA S, Mechanism of gene expression of Arabidopsis glutathione S-transferase, AtGST1 and AtGST11 in response to aluminum stress. **Plant Physiol**, v.134, p.1672–1682, 2004.

EZAKI B.; YAMAMOTO Y.; MATSUMOTO H. Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in tobacco cultured cells. **Physiol Plant**, v.93, p.11–18, 1995.

FADINI M.A.M.; LEMOS W.P.; PALLINI A.; VENZON M.; MOURÃO A.S. Does herbivory of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) induce direct defense in strawberry? **Neotrop Entomol**, v.33, p. 293-297, 2004.

FAO, **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**. Disponível em: <<http://www.rlc.fao.org/pt/paises/brasil/noticias/producao-mundial-de-cereais-deve-atingir-alta-historica-em-2013/>>. Acesso em 27 de outubro de 2013.

FERLA, N.J.; ROCHA, M. S.; FREITAS, T. F. S. . Fluctuation of Mite Fauna Associated to Rice Culture (*Oryza sativa* L.: Poales, Poaceae) in Two Regions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 3, p. 525-533, 2013.

FLECHTMANN, C. H. W. On The Morphological Variation On The Aedaeagus Of *Schizotetranychus Oryzae*' (Acari, Prost. Tetr.). **Anais da Esc. Sup. Agric.**, v.42, n. 1, p. 29-32, 1985.

FREY N. F.; MULLER P.; JAMMES F.; KIZIS D.; LEUNG J.; PERROT---
RECHENMANN C.; BIANCHIA M.W. The RNA Binding Protein Tudor-SN Is Essential
for Stress Tolerance and Stabilizes Levels of Stress Responsive mRNAs Encoding
Secreted Proteins in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 22, p.1575–1591, 2010.

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction.
New Phytologist, v.156, p.145-169, 2002.

GILARDONI P.A.; SCHUCK S.; JUNGLING R.; ROTTER B.; BALDWIN I. T.;
BONAVENTURE G. SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome
after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect
responses. **BMC Plant Biol**, v.10, p.66, 2010.

GORG A.; KLAUS A.; LUCK C.; WEILAND F.; WEISS W. Two-dimensional
electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis – **A laboratory
manual**, 2007.

GRINBERG M., PERL-TREVES R., PALEVSKY E., SHOMER I., SOROKER V.
Interaction between cucumber plants and the broad mite, Polyphagotarsonemus latus:
from damage to defense gene expression. **Entomologia Experimentalis Et
Applicata**, v.115, p.135–144, 2005.

HALITSCHKE R.; GASE K.; HUI D.; SCHMIDT D.D.; BALDWIN I. T. Molecular
interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera,
Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals
that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino
acid conjugates. **Plant Physiol**, v.131, p.1894-1902, 2003.

HANX.; ASLANIAN A.; YATES J.R. 'Mass spectrometry for proteomics', **Current
Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 483 – 490, 2008.

HE H.; SUJ S.; ZHANG Y.; AO Y.; LIU B.; FENG D.; WANG J.; WANG H. Two
Homologous Putative Protein Tyrosine Phosphatases, OsPFA-DSP2 and AtPFA-

DSP4, Negatively Regulate the Pathogen Response in Transgenic Plants. **PLoS ONE**, v.7(4), p.e34995. doi:10.1371/journal.pone.0034995, 2012.

HEIL M.; BOSTOCK R.M. Induced Systemic Resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Ann Bot**, v.89, p. 503-512, 2002.

HOWE G.A.; JANDER G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu Rev Plant Biol**, v.59, p.41–66, 2008.

HUMMEL N.A.; CASTRO B.A.; MCDONALD E.M.; PELLERANO M.A.; OCHOA R. The panicle rice mite, *Steneotarsonemus spinki* Smiley, a re-discovered pest of rice in the United States. **Crop Protect**, v.28, p.547-560, 2009.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <www.ibge.gov.br>. Acesso em 30 de novembro de 2013.

IBSP, **Instituto Biológico de São Paulo**. Disponível em <<http://www.biologico.sp.gov.br/acaros.php>>. Acesso em 1º de novembro de 2013.

IRGA – **Instituto Rio Grandense do arroz**. Custo de produção do arroz irrigado no Rio Grande do Sul sistema semidireto. Disponível em <http://www.irga.rs.gov.br/upload/20131030170141resumo_custo_2012_13.pdf> Acesso em 13 dezembro de 2013.

JACKMAN J.E.; GRAYHACK E.J.; PHIZICKY E.M. The use of *Saccharomyces cerevisiae* proteomic libraries to identify RNA-modifying proteins. **Methods in Molecular Biology**, v.488, p.383-393, 2008.

JAIN M.; TYAGI A.K.; KHURANA J.P. Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). **BMC Plant Biol**, v.6, p.1., 2006.

JAKAB G.; COTTIER V.; TOQUIN V.; RIGOLI G.; ZIMMERLI L.; MÉTRAUX J.P.; MAUCH-MANI B. β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. **Europ J. Plant Pathol**, v.107, p.29-37, 2001.

JHA B.; SHARMA A.; MISHRA A. Expression of SbGSTU (tau class glutathione S-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance. **Mol. Biol. Rep.**, v.38, p.4823–4832, 2011.

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 Physiol**, v.135, p. 483-495, 2004.

KARKONEN A.; MURIGNEUX A.; MARTINANT J.; PEPEY E.; TATOUT C.; DUDLEY B.; FRY S. UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis. **Biochem. J.**, v.391, p.409-415, 2005

KARMAKAR K. *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) - a yield reducing mite of rice crops in West Bengal, India. **Int. J. Acarol**, v.34, p.95-99, 2008.

KELLY G.J.; GIBBS M. Nonreversible d-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of plant tissues. **Plant Physiology**, v.52, p.111–118, 1973.

KIM S. T.; KIM S. G.; AGRAWAL G. K.; KIKUCHI S.; RAKWAL R. Rice proteomics: A model system for crop improvement and food security. **Proteomics**, p. 1-18, 2014.

KOLKMAN A.; DARAN-LAPUJADE P.; FULLAONDO A.; OLSTHOORN M.M.A.; PRONK J.T.; SLIJPER M.; HECK A.J. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. **Molecular Systems Biology**, v.2, p.1-16, 2006.

KOTCHONI S.O.; KUHNS C.; DITZER A.; KIRCH H.H.; BARTELS D. Overexpression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. **Plant Cell Environ**, v.29, p.1033–1048, 2006.

KRISHNAN H.B.; NATARAJAN S.S. A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. **Phytochemistry**, v70, p.1958-1964, 2009.

KUMARI S.; JOSHI R.; SINGH K.; ROY S.; TRIPATHI A. K.; SINGH P.; SINGLA-PAREEK S. L.; PAREEK A. Expression of a cyclophilin OsCyp2-P isolated from a salt-tolerant landrace of rice in tobacco alleviates stress via ion homeostasis and limiting ROS accumulation. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2014.

LEHMANN M.; SCHWARZLANDER M.; OBATA T.; SIRIKANTARAMAS S.; BUROW M.; OLSEN C.E. The metabolic response of Arabidopsis roots to oxidative stress is distinct from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. **Mol. Plant**, v.2, p.390 – 406, 2009

LEVINE A.; TENHAKEN R.; DIXON R.; LAMB C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, p.583–593, 1994.

LIU C.; HSU Y.; CHENG Y.; YEN H.; WU Y.; WANG C.; LAI C. Proteomic analysis of salt-responsive ubiquitin-related proteins in rice roots. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v.26, p.1649–1660, 2012.

LIU H.; SADYGOV R.G.; YATES J.R.3rd: A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Anal Chem**, v.76, p.4193-4201, 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOYALL L.; UCHIDA K.; BRAUN S.; FURUYA M.; FROHNMEYER H. Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. **Plant Cell**, v12, p.1939–1950, 2000.

LUAN S. Protein phosphatases: structure, regulation, and function. **Adv. Bot. Res.** v.32, p.67-107, 2000.

MAGALHÃES B.S.; MELO J.A.; LEITE J.R.; SILVA L.P.; PRATES M.V.; VINECKY F.; BARBOSA E.A.; VERLY R.M.; MEHTA A.; NICOLI J.R.; BEMQUERER M.P.; ANDRADE A.C.; BLOCH J. C. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.337, p.1057-1061, 2008.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview; **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, p.139–158, 2006.

MATHESIUS U. Comparative proteomic studies of root-microbe interactions. **Journal of Proteomics**. In press, 2008.

MENEZES V. G. et al. Projeto 10 – estratégias de manejo para aumento da produtividade e da sustentabilidade da lavoura de arroz irrigado do RS: avanços e novos desafios. Cachoeirinha: IRGA/Estação Experimental do Arroz, **Boletim técnico**, 2012.

MICHIELS K.; VAN DAMME E.J.M.; SMAGGHE G. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? **Archiv Insect Biochem Physiol**, v.73, p.193-212, 2010.

MOONS A. Osgstu3 and Osgstu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. **FEBS Lett**, v.553, p.427–432, 2003.

MORAES G.J.; FLECHTMANN C.H.W. **Manual de Acarologia - Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil**. Ribeirão Preto, Holos Editora, p.308, 2008.

MORAN P. J.; THOMPSON G. A.; Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defence pathways. **Plant Physiol**, v.125, p.1074–1085, 2001.

MOTOYAMA, A.; YATES III, J.R. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. **Analytical chemistry**, v.80, n.19, p.7187-7193, 2008.

MUNEER S.; AHMAD J.; QURESHI M.I. Involvement of Fe nutrition in modulating oxidative stress and the expression of stress responsive proteins in leaves of *Vigna radiata* L. **Aust. J. Crop Sci** , v.7 (9), p. 1333–1342, 2013.

MUNEER S.; KIM T. H.; CHOI B. C.; LEE B. S.; LEE J. H. Effect of CO, NO_x and SO₂ on ROS production, photosynthesis and ascorbate–glutathione pathway to induce *Fragaria annasa* as a hyperaccumulator. **Redox Biology**, v.2, p. 91–98, 2014.

MUNNER S.; Kim T.H.; QURESHI M.I. Fe modulates Cd-induced oxidative stress and the expression of stress responsive proteins in the nodules of *Vigna radiata*. **Plant Growth Regul**, v.68, p.421–443, 2012.

NACHAPPA P.; MARGOLIESargolies D.C.; NECHOLS J.R.; WHITFIELD A.E.; ROTENBERG D. Tomato Spotted Wilt Virus benefits a non-vector arthropod, *Tetranychus urticae*, by modulating different plant responses in tomato. **PLoS ONE**, v. 8, p. e75909, 2013.

NAVIA D.; MENDES M.A.S.; OCHOA R. *Steneotarsonemus furcatus* de Leon (Prostigmata: Tarsonemidae) infesting rice crops in Brazil. **Int. J. Acarol**, v.32, p. 219-222, 2006.

NIAZI F.R.; SINGH J. Effect of mite *Oligonychus oryzae* infestation on *Rice tungro* acquisition and transmission by *Nephotettix virescens*. **Indian Phytopath**, v. 54, p. 380, 2001.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 139-153, 2005.

NOKHRINA K.; RAY H.; BOCK C., GEORGES F. Metabolomic shifts in *Brassica napus* lines with enhanced *BnPLC2* expression impact their response to low temperature stress and plant pathogens. **GM Crops and Food**, v.5:2, p.1–12, 2014.

OERKE E.C. Crop losses to pests. **J. Agricult Sci**, v.144, p.31-43, 2006.

O'FARRELL P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.4007-4021, 1975.

PATEL M.; MILLA-LEWIS S.; ZHANG W.; TEMPLETON K.; REYNOLDS W. C.; RICHARDSON K.; BISWAS M.; ZULETA M. C.; DEWEY R. E.; QU R.; SATHISH P. Overexpression of ubiquitin-like LpHUB1 gene confers drought tolerance in perennial ryegrass. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1–11, 2014.

PERCIVAL G.C.; FRASER G.A.; OXENHAM G. Foliar salt tolerance of acer genotypes using chlorophyll fluorescence. **J. Arboricult**, v.29, p.61-65, 2003.

PEROTTI A.M.; GOFF L.M.; BAKER A.S.; TURNER B.D.; BRAIG H.R. Forensic acarology: an introduction. **Exp. Appl. Acarol**. v. 49, p.3-13, 2009.

PETANOVIC R.; KIELKIEWICZ M. Plant-eriophyoid mite interactions: cellular biochemistry and metabolic responses induced in mite-injured plants. **Part I. Exp Appl Acarol**, v.51, p.61-80, 2010.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LEÓN-KLOOTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; RESENDE, M. L. V.; VAN LOON, L. C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 277- 295, 2005.

RADHAKRISHNAN V.; RAMARAJU K. Development durations, colonization and insecticide efficacy of leaf mite, *Oligonychus oryzae* Hirst on rice. **Trop. Agric. Res.** v.21, p.30-38, 2009.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant Cell Environment**, v.25, p.141–151, 2002.

RAMPITSCH C.; BYKOVA N. V. Proteomics and plant disease: advances in combating a major threat to the global food supply. **Proteomics**, v.12, p. 673-690, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EECHHORN, S.E. Biologia Vegetal. **Guanabara Koogan**, p.728, 1996.

ROSSETO, C.J.; S. SILVEIRA N.; D. LINK; J. GRAZIA-VIEIRA; E. AMANTE; D.M.SOUZA; N.V. BANZATTO; A.M. OLIVEIRA. Pragas do Arroz no Brasil. In: contribuições técnicas da delegação brasileira. Reunião do comitê do arroz internacional da FAO, **M.A./DNPEA**, p. 149 – 238. 1971.

ROXAS V.P.; SMITH R.K. Jr.; ALLEN E.R.; ALLEN R.D. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Nat. Biotechnol** , v.15, p.988–991, 1997.

SANINT L.; La semilla de arroz: un universo de conocimientos en un grano milimétrico. **Revista del Foro Arrocero Latinoamericano**. Noviembre 2006.

SASAKI-SEKIMOTO Y.; TAKI N.; OBAYASHI T.; AONO M.; MATSUMOTO F.; SAKURAI N.; SUZUKI H.; HIRAI M.Y.; NOJI M.; SAITO K.; MASUDA T.; TAKAMIYA K.; SHIBATA D.; OHTA H. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in Arabidopsis. **Plant J.** v. 44, p.653 668, 2005.

SCHMIDT R.A. Leaf structures affect predatory mites (Acari: Phytoseiidae) and biological control: a review. **Exp. Appl. Acarol**, v.62, p.1-17, 2014.

SCHMITT F.J.; RENGGER G.; FRIEDRICH T.; KRESLAVSKI V.D.; ZHARMUKHAMEDOV S.K.; LOS D.A.; KUZNETSOV V.V.; ALLAKHVERDIEV S.I. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-

signaling in phototrophic organisms. **Biochim Biophys Acta**, v.1837, p.835-848, 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nat. Protoc.**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SHAH P.; ATWOOD J.A.; ORLANDO R.; EL MUBAREK H.; PODILA G.K.; DAVIS M.R. Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. **Journal of Proteome Research**, in press, 2009.

SHARMA P.; JHA A. B.; DUBEY R. S.; PESSARAKLI M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **J. Botany**. 2012.

SHARMA R.; SAHOO A.; DEVENDRAN R.; JAIN M. Over-Expression of a Rice Tau Class Glutathione S-Transferase Gene Improves Tolerance to Salinity and Oxidative Stresses in Arabidopsis. **PLoS ONE**, v. 9(3), p. e92900, 2014.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SHIN J.H.; KIM S.R.; AN G. Rice aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability. **Plant Physiol**, v.149, p.905–915, 2009.

SIMIC S.; LEPEDUS H.; JURKOVIC V.; ANTUNOVIC J.; CESAR V. Quantitative genetic analysis of chlorophyll a fluorescence parameters in maize in the field environments. **Journal of Integrative Plant Biology**, 2014.

SINGH A.; GIRI J.; KAPOOR S.; TYAGI A.K.; PANDEY G.K. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. **BMC Genomics**, v.11, p.435, 2009.

STRASSER R. J.; TSIMILLI-MICHAEL M.; SRIVASTAVA A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, GC, Govindjee, (eds) Chlorophyll a Fluorescence: a signature of photosynthesis. **Springer**, v. 14, p.321-362. 2004.

STRASSER R.J.; SRIVASTAVA A.; TSIMILLI-MICHAEL M. et. al. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation. **Taylor & Francis**, p.443-480, 2000.

STRAUSS S.Y.; ZANGERL A.R.. Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. Em: Plant-animal interactions: an evolutionary approach (C.M. Herrera & O. Pellmyr, eds.). **Blackwell Science**, Oxford, p. 77-106, 2002.

SUNKAR R.; BARTELS D.; KIRCH H. H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **Plant J.**, v.35, p.452–464, 2003.

TIANPEI X.; LIB D.; QIUA P.; LUOB J.; ZHUA Y.; LI S. Scorpion peptide LqhIT2 activates phenylpropanoid pathways via jasmonate to increase rice resistance to rice leafrollers. **Plant Science**, v.230, p.1–11, 2015.

TOSHIKAZU T.; MINAKO I.; HIROYUKI K.; NANAKO K.; IKUO N. Over-expression of f glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. **Mol. Breed**, v.9, p.93–101, 2002.

TSIMILLI M.; STRASSER R. J. In vivo assessment of plants vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants. **Mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology**, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics, 2008.

TUTELJA N.; SOPORY S. K. Plant signaling in stress: G-protein coupled receptors, heterotrimeric G-proteins and signal coupling via phospholipases. **Plant Signal Behav**, v.3, p.79–86, 2008.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

VANDERSCHUREN H.; LENTZ E.; ZAINUDDIN I.; GRUISSEM W. Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. **J. Proteomics**, v.93, p.5-19, 2013.

VASILIOU V.; BAIROCH A.; TIPTON K.F.; NEBERT D.W. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. **Pharmacogenetics**, v.9, p.421–434, 1999.

VET, L.E.M Evolutionary aspects of plant-carnivore interactions. Em: Insect-plant interactions and induced plant defense (D.J. Chadwick & J.A. Goode, eds). **Novartis Foundation**, Chichester, p. 3-20, 1999.

VOLLENWEIDE S.; WEBER H.; STOLZ S.; CHE´TELAT A.; FARMEE E.E. Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. **Plant J.**, v.24, p.467–476, 2000.

WANG C.; HU G.; ST LEGER R.J. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudates and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, v.42, p.704-718, 2005.

WARD E. R.; UKNES S. J.; WILLIAMS S. C.; DINCHER S. S.; WIEDERHOLD D. L.; ALEXANDER D. C.; AHL GOY P.; MÉTRAUX J. P.; RYALS J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p.1085-1094, 1991.

WASTERNAK C.; HAUSE B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development: an update to the 2007 review in Annals of Botany. **Ann. Bot.**, v.111, p.1021-1058, 2013.

WILKINS M.R.; SANCHEZ J.C.; GOOLEY A.A.; APPEL R.D.; HUMPHERY-SMITH I.; HOCHSTRASSER D.F.; WILLIAMS K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and now to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19-50, 1995.

WIT P. J. G. M. Visions & reflections (minireview) - How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 64, p. 2726-2732, 2007.

WORRALL D.; HOLROYD G.H.; MOORE J.P.; GLOWACZ M.; CROFT P.; TAYLOR J.E.; PAUL N.D.; ROBERTS M.R. Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. **New Phytologist**, v.193, p.770–778, 2012.

WU L.; CHEN H.; CURTIS C.; FU Z. Q. Go in for the kill: how plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. **Virulence**. v.5, p.710–721, 2014.

XU P.; NARASIMHAN M. L.; SAMSON T.; COCA M. A.; HUH G.; ZHOU J.; MARTIN G.B.; HASEGAWA P.M.; BRESSAN R. A. A Nitrilase-Like Protein Interacts with GCC Box DNA-Binding Proteins Involved in Ethylene and Defense Responses. **Plant Physiol.**, v.118, p. 867–874, 1998.

YATES J.R.; RUSE C.I.; NAKORCHEVSKY A. "Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances and Applications. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v.11, p.49–79, 2009.

YATES, G.; SADANANDOM, A. Ubiquitination in plant nutrient utilization. **Plant Science** , v. 4, p. 1-5, 2013.

YIN X.; SAKATA K.; KOMATSU S. Phosphoproteomics Reveals the Effect of Ethylene in Soybean Root under Flooding Stress. **J. Proteome Res.**, 2014.

YOSHIDA A.; RZHETSKY A.; HSU L.C.; CHANG C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. **Eur J. Biochem**, v.251, p.549–557, 1998.

YU T.; LI Y.S.; CHEN X.F.; HU J.; CHANG X. Transgenic tobacco plants over expressing cotton glutathione S- transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen. **J. Plant Physiol**, v.160, p.1305–1311, 2003.

ZAFARINIA M.; SHARIATI M.M. Effects of salt stress on photosystem II of canola plant (*Barassica napus*, L.) probing by chlorophyll a fluorescence measurements. **Iranian Journal of Science & Technology**, v.1, p.71-76, 2012.

ZHANG B.; VERBERKMOES N. C.; LANGSTON M. A.; UBERBACHER E.; HETTICH R. L.; SAMATOVA N.F. Detecting Differential and Correlated Protein Expression in Label-Free Shotgun Proteomics. **J.Proteome Res.** v. 5, p. 2909- 2918, 2006.

ZHANG Y.; LUBBERSTEDT T.; XU M. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. **J. Genet Genomics**, v.40, p.23-35, 2013.

ZIVCAK M.; BRESTIC M.; OLSOVSKA K.; SLAMKA P. Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. **Plant Soil Environ**, v.4, p.133-139, 2008.

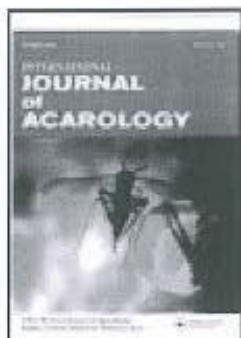
Anexo 1

This article was downloaded by: [177.11.34.200]

On: 08 December 2014, At: 14:36

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



International Journal of Acarology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.tandfonline.com/loi/taca20>

Alterations in rice, corn and wheat plants infested by phytophagous mite

Édina A.R. Blasi^a, Giseli Buffon^b, Ronize Z. da Silva^a, Cláudia Stein^a, Andressa Dametto^b, Noeli J. Ferla^{abc}, Walter O. Beys-da-Silva^{ab} & Raul A. Sperotto^{ab}

^a Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil (emails: ; ; ;)

^b Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil (emails: ;)

^c Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento (PPGAD), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil (email:)

Published online: 04 Dec 2014.

To cite this article: Édina A.R. Blasi, Giseli Buffon, Ronize Z. da Silva, Cláudia Stein, Andressa Dametto, Noeli J. Ferla, Walter O. Beys-da-Silva & Raul A. Sperotto (2014): Alterations in rice, corn and wheat plants infested by phytophagous mite, *International Journal of Acarology*, DOI: [10.1080/01647954.2014.988643](https://doi.org/10.1080/01647954.2014.988643)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01647954.2014.988643>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

Alterations in rice, corn and wheat plants infested by phytophagous mite

Édina A.R. Blasi^a, Giseli Buffon^b, Ronize Z. da Silva^a, Cláudia Stein^a, Andressa Dametto^b, Noeli J. Ferla^{a,b,c}, Walter O. Beys-da-Silva^{a,b} and Raul A. Sperotto^{a,b}

^aCentro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil (emails: earblasi@yahoo.com.br; ronizezeno@ig.com.br; clastein@hotmail.com; walterbeys@yahoo.com.br; rasperotto@univates.br);

^bPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil (emails: gisi@univates.univates.br; andressa_d7@yahoo.com.br); ^cPrograma de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento (PPGAD), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil (email: nferla@univates.br)

(Received 1 August 2014; accepted 12 November 2014)

Phytophagous mites (Acari) are agricultural pests that cause productivity and economic losses. Mite infestation is stressful for plants, hindering the development and harming photosynthetic structures and storage organs. In order to combat such damage, plants utilize molecular and physiological modifications, as well as the production of mite-inhibitory compounds. In this review, we focus on the main phytophagous mites that infest the most commercially important cereals – rice (*Oryza sativa* L.), corn (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) – summarizing the responses of the plants – physiological and molecular alterations – to mite infestation.

Keywords: maize; physiological modifications; plant damage; rice; wheat

1. Introduction

Phytophagous mites are capable of causing damage to plants, inhibiting their growth and destroying their photosynthetic structures and storage organs (Schmidt 2014). The primary metabolism of infested plants is disturbed, specifically changing the metabolism of amino acids and carbohydrates, as well as changing the hydric potential of their cells. Nutrient transportation can also be interrupted to hinder feeding, but this is not always effective (Nachapapa et al. 2013).

Rice, corn and wheat are the most consumed cereals worldwide. In harvested tons, more corn is grown than any other cereal worldwide, followed by rice and wheat. When referring to planted area (hectares), wheat places first, followed by corn and rice (FAO 2013). Rice is the main source of carbohydrates for half of the world population (Duan and Sun 2005). It is cultivated in approximately 150 million hectares, and its annual yield is close to 610 million tons (<http://beta.irri.org/>). The estimates for the potential losses caused by animal pests are around 25% worldwide (Oerke 2006). According to FAO (2013), rice may provide 20% of the daily energy and 15% of the daily protein necessary for an adult with a 100 g portion. Most corn is cultivated in the USA, and the predicted worldwide production for the next year is 1000 million tons (FAO 2013). The potential losses due to animal pests are about 16% (Oerke 2006). Corn seeds are important for animal feeding, for which they amount to 70% of nutrient sources. In human nutrition, the grain is a crucial item in the diet of the population of several countries. Wheat is extremely important for human nutrition. It

is consumed in processed foods and, when its quality is not satisfactory, may also be used to feed animals. According to FAO (2013), global wheat production is about 700 million tons and is estimated that approximately 9% can be potentially lost to animal pests (Oerke 2006).

There is a growing interest in the development of plants that efficiently resist phytophagous mite infestation. However, the information available about changes caused by phytophagous mites in their host plants is normally limited to the visual effects of the infestation. Meanwhile, a comprehensive view of the molecular and physiological plant modifications is missing. Therefore, the aim of this work is an integrative and more in-depth understanding of the plant molecular and physiological mechanisms induced by phytophagous mite infestation. Here, we focus on phytophagous mites that feed on rice (*Oryza sativa* L.), corn (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) and the consequences of infestation regarding molecular and visual modifications.

2. Incidence of mites in rice, corn and wheat cultures: visual damage and production losses

Mite species which parasitize rice, corn and wheat cultures, along with associated visual symptoms, are summarized in Figure 1. Phytophagous mites of the Tarsonemidae and Tetranychidae families are observed for rice culture in Brazil. Among the tarsonemids, we highlight the *Steneotarsonemus fuscatus* De Leon (Acari: Tarsonemidae) mite found in Mato Grosso do Sul state, which causes stains on leaves and forming

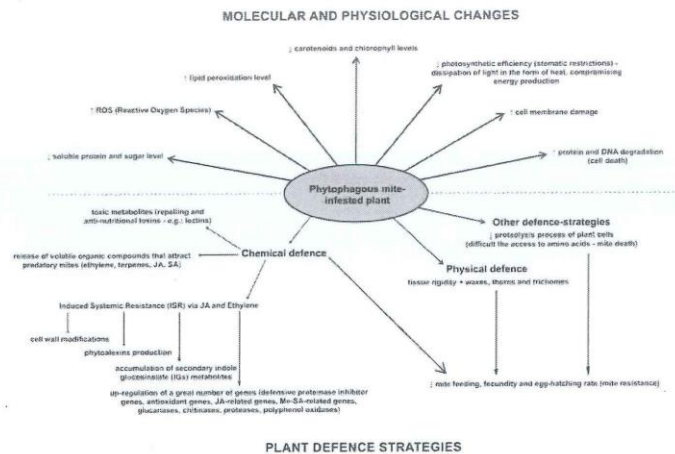


Figure 2. Molecular and physiological changes and defence mechanisms induced by phytophagous mite infestation in plants. JA: jasmonic acid; SA: salicylic acid.

and of peroxidase increase in proportion to TSSM population and lipid peroxidation levels in soybean leaves. Also, the levels of resistance in soybean genotypes were strongly correlated with cumulative lipid peroxidation of the tissues and loss of carotenoids and chlorophyll. Bronner et al. (1991) also showed that the total peroxidase activity increases in resistant *Solanum dulcamara* leaves following infestation by gall mite *Aceria cladophthirus* Nalepa (Acari: Eriophyoidea).

Plants have two classical defence strategies, chemical and physical, against herbivore arthropods (Zhang et al. 2013). Their first chemical defence is to synthesize toxic metabolites followed by proteins that will, in the long term, create physical defences, such as an increase in the density of trichomes (Worral et al. 2012). The production of toxic metabolites that can reduce plant digestibility is a common chemical defence described for a wide range of potential consumers (Strauss and Zangerl 2002). Examples include cyanogenic glycosides, glucosinolates, alkaloids and terpenoids; others are macromolecules and include latex or proteinase inhibitors (Mithöfer and Boland 2012). Among the proteins expressed as part of the plant defences, we highlight lectins. These molecules are described as anti-insect proteins which negatively affect development or population growth. The expression of these proteins is commonly induced upon herbivore attack (Michiels et al. 2010). Vandenborre et al. (2009) showed that the induction of the *Nicotiana tabacum* agglutinin (a lectin) expression depends on the feeding style. For instance, chewing caterpillars and cell-content-feeding spider mites (such as TSSM) induce lectin expression, while infestation with phloem-feeding herbivores, such as aphids and whiteflies, does not. Although chemical defences are recognized as crucial to the plant defence against

herbivores like insects and phytophagous mites, their physical defence also plays an important role in preventing pest attack. Physical defence comprises structures or barriers that make it difficult for herbivores to access or process foliage (Moles et al. 2013). Carmona et al. (2011) reported no general association between the concentrations of secondary metabolites and herbivore susceptibility in a meta-analysis. Surprisingly, they were able to correlate physical resistance traits with variation in herbivore susceptibility. Physical defence also includes tissue rigidity, spines, hairs, latex, hardness of the leaf and the presence of waxes, thorns and trichomes, reducing the access of the phytophagous to vegetal tissues and interfering with their feeding (Vet 1999; Carmona et al. 2011; Moles et al. 2013).

Plant defences present yet another two classifications: constitutive, which is continuously present, or induced, which only occurs after the plant has been attacked, targeting a specific phytophage that is infesting it (Fadini et al. 2004). After being exposed to an inducing agent, the induced systemic resistance mechanism is activated, triggering the defence mechanisms of the plant systemically, and not only at the site of induction (Conrath et al. 2006). Cell wall modifications, the production of phytoalexins and, simultaneously, an increase in the expression of several pathogenesis-related genes (Ward et al. 1991; Van Loon and Van Strien 1999) can be cited as induced defence mechanisms.

Plant defences may also occur through the production of repelling and anti-nutritional toxins, as well as the release of volatile organic compounds (VOCs) that attract predators of the phytophagous pest, such as the mites described in Section 2. It is important to stress that these VOCs, released by plants attacked by herbivores, are

visual symptoms that resemble nitrogen deficiency. Accordingly, leaves may present small yellowish white elongated areas visible on the upper side of the leaf. This visual damage corresponds to small mite colonies in different stages of development, usually on the lower surface of the leaves. Infested leaves also exhibit chlorotic areas at both abaxial and adaxial surfaces (Ferla et al. 2013). *Oligonychus oryzae* Hirst, another tetranychid mite, is considered one of the main pests that infest rice plantations in India and other Asian countries and is responsible for considerable losses and 25% reductions in rice yield (Niazi and Singh 2001; Radhakrishnan and Ramaraju 2009). Rice seedlings become pale and stunted, and leaves acquire a brittle texture after mite infestation (Niazi and Singh 2001).

In Mexico and the USA, there are records of mites as pests in corn and wheat plantations. One such example is *Oligonychus pratensis* Banks (Acari: Tetranychidae), which primarily attacks corn and, when that plant is undergoing senescence, migrates to wheat and other adjacent plants (Fadini et al. 2012). Heavy populations of *O. pratensis* can kill small plants and reduce kernel size in larger plants (Peairs 2005). Another important pest is *Aceria tosichella* Keifer (Acari: Eriophyidae), which can cause direct yield losses in corn and wheat. Probably, the main damage caused by this mite extends from its ability to transmit and spread multiple damaging viruses to the corn and wheat plants, including HPV (high plains virus) and WSMV (wheat streak mosaic virus), which cause chlorosis and necrosis on the leaves, and may result in total loss of the crop (Navia et al. 2013). Generalized chlorosis is common in wheat, while outbreaks of yellow and red stripes is the main occurrence in corn (Skare et al. 2006). *Aceria tosichella* infestations also cause dwarfism in plants, as leaf development is severely impaired. This organism is considered the main mite infesting wheat, being responsible for most of the losses in wheat farming in Australia, North America, Northern Africa, Europe and Asia (Miller et al. 2012), and it has also been found in Argentina and Brazil (Pereira et al. 2009). It is important to highlight another very common mite species, *Tetranychus urticae* Koch (two-spotted spider mite or TSSM – Tetranychidae), which infests corn farms around the world. This mite promotes similar visual damages to the ones described above, such as chlorosis, and yellow or white discoloration of leaves. Obviously, it causes important losses mainly related to a reduction in productivity and decreased grain quality (Cullen and Schramm 2009; Van Leeuwen et al. 2010).

3. Molecular and physiological changes caused by phytophagous mites

Given that mite infestation on the three most commercially important grains – rice, corn and wheat – causes obvious visual effects, it is logical to expect a great impact on the physiology and metabolism of the plants. Defence mechanisms against mites have been extensively studied

in the Dicotyledoneae, but responses in monocotyledonous plants, including most crop plants like wheat, maize and rice, are less well known (Balmer et al. 2013). For this reason, the following section is not restricted to the aforementioned plant species, but certainly most of the processes described here are similar in monocotyledonous plants, based on the assumption that plants rely on conserved defence mechanisms to defend themselves against phytophagous mite infestation (Wu et al. 2014). One could say that we should dedicate a part of the review to the analysis performed on rice, corn and wheat interaction with arthropod herbivore other than phytophagous mites, as these organisms would interact with the same core molecular defence elements. However, it is already known that host plant modifications induced by different arthropod herbivore taxa are not similar. According to Kessler and Baldwin (2002), the plant's wound response is frequently altered by insect-specific elicitors, giving plants the potential to optimize their defences. Also, Tong et al. (2012) indicated that jasmonic acid (JA) plays positive roles in rice resistance to the chewing herbivore striped stem borer (*Chilo suppressalis*), but a negative role in resistance to the phloem feeder brown planthopper (*Nilaparvata lugens*), while green leaf volatiles positively mediates resistance to both herbivores in rice. Molecular and physiological changes and defence mechanisms promoted by phytophagous mite infestation are summarized in Figure 2.

Plant responses against arthropods are generally triggered by receptor complexes that recognize herbivore-associated elicitors and fatty amino acid conjugates, which are the major components in the oral secretion of feeding insects (Gilardoni et al. 2010). These molecules are necessary for the triggering of herbivore-specific plant response (Halitschke et al. 2003). In response to arthropod feeding, linolenic acid is released from membrane lipids and then converted enzymatically into JA, which causes the transcriptional activation of genes, resulting in increased production of defence-related compounds (Heil and Bostock 2002). Also, according to Petanović and Kielkiewicz (2010), mite infestation can reduce soluble protein levels as well as the concentration of sugars, which result in cellular dysfunction and impairment in plant growth.

The production of reactive oxygen species is increased by mite infestation and affects plant biomass production. Oxidative stress may also affect photosynthetic efficiency due to stomatic restrictions. It can also harm the cell membrane, raise degradation rates of protein and DNA and, consequently, lead to cell death. Some proteins of the photosynthetic apparatus can be inactivated due to oxidative stress and cause a dissipation of light in the form of heat, compromising energy production (Schmitt et al. 2014). According to Fadini et al. (2004), TSSM harms the leaf mesophyll and stimulates stomata closing, causing a reduction in the photosynthetic ratio of highly infested plants. According to Hildebrand et al. (1986), the activity of the pro-oxidant enzyme lipoxygenase (LOX)

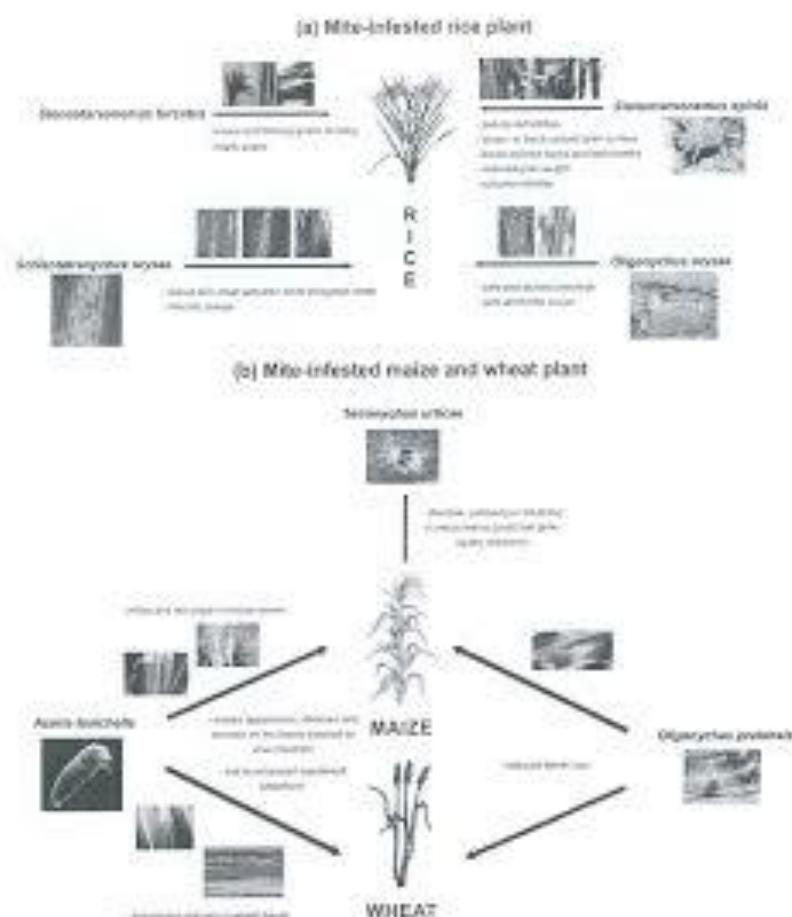


Figure 1. Major phytophagous mite species which infest rice (a) and maize and wheat (b) plants, along with visual damages caused by mite infestation. *Stenotarsonemus latus* pictures were obtained from Navia et al. (2006) (with kind permission from Taylor & Francis). *Stenotarsonemus spinis* pictures were obtained from Hummel et al. (2009) (with kind permission from Elsevier) and Cho et al. (1999) (with kind permission from Korean Society of Applied Entomology). *Oligonychus oryzae* pictures were obtained from Wikipedia and http://grittech.tnra.ac.in/griev_schemes_services/aspquality_xcl.html. *Tetranychus urticae* picture was obtained from <http://steadwalk.blogspot.com.br/2011/12/mite-guano.html>. *Oligonychus pratensis* pictures were obtained from <http://www.fishcrimages.org/browal-detail.cfm?imgname=5361145>. *Aceria kochii* pictures were obtained from <http://www.dgweb.net/home>, <http://www.climaticapocornal.com.br/pesquisadores-do-brasil-e-do-argentina-unem-forcas-no-controle-da-praga-agricola-2/>, <http://centrode.usp.br/ppd/per/pv.htm> and http://www.usask.ca/agriculture/plants/winter_cereals/winter_wheat_production-manual/chapter-22/viruses.php. *Schizotetranychus oryzae* pictures were obtained from personal collection of the authors.

grains, hinders the development of attacked panicles and results in empty grains (Navia et al. 2006). In a plantation of the Primavera genotype, reductions of 30% to 50% in yield were observed (Moraes and Flechtmann 2008). The *Stenotarsonemus spinis* Smiley mite, also a tarsonemid, has caused significant damage to rice cultures in China and Taiwan since the 1970s. In the following decade, it was considered one of the most important pests for rice cultures throughout Tropical Asia (Kannakar 2008). In the 1990s, this parasite was also found in Cuban and Dominican Republic plantations (Parks et al. 2013), and also in the USA in 2007 (Hummel et al. 2009). This mite causes deformities in the panicles of infested plants, and

the surface of the grain acquires a brown or black colour. The internal surface of the leaf sheath and the blades of the attacked grains also turn brown (Cho et al. 1999). According to Lakshmi et al. (2006), the population of mites on the sheath has a negative correlation with the weight of the grains, and in addition, infertility in the spicules of infested plants is usual. Drastic reductions in production (up to 90%) have been reported (Hummel et al. 2009).

Schizotetranychus oryzae Rosá de Simoes, a spider mite (Acari: Tetranychidae), primarily found in Argentina, has also been reported in rice plantations in Brazil and other South American countries. Infested plants present

recognized by the surrounding plants to alert them of the herbivore proximity/attack. This volatile signalling in plant–plant interactions triggers the first defence mechanisms of the surrounding plants, even before they are attacked. Analysis of global gene expressions and signalling cascades of VOC-exposed plants suggests that plants “eavesdrop” on VOCs to prime direct and indirect defences and to hone competitive abilities (Baldwin et al. 2006). Thus, the accumulation of these compounds may reduce the ratio of mite oviposition on the plant or on a specific group of plants (Muroi et al. 2011). Ozawa et al. (2000) showed that *Lotus japonicus* infested with herbivorous mites (such as TSSM) emits volatile compounds (six-carbon (Z)-3-hexenyl acetate, terpenoids (E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene and germacrene D, along with 1-octen-3-ol and methyl salicylate) that attract predatory mites (*Phytoseiulus persimilis*). These compounds are considered TSSM-induced plant volatile compounds (Ozawa et al. 2000).

Chemical compounds produced by plants may also change the behaviour of phytophagous mites, as well as intoxicate them. Mites such as TSSM have the ability to develop resistance to those compounds; therefore, the plants need to synthesize other substances to which these aggressors are not yet adapted (Dermauw et al. 2013). Once attacked, the plants become more sensitive through a process called “priming,” “conditioning” or “sensitization,” which helps them to promptly respond to new biotic stresses (Heil and Bostock 2002). Priming effects can be elicited by chemical inducers, such as β -aminobutyric acid (Jakab et al. 2001). This mechanism is yet to be explained, but it implicates the activation of signalling proteins, transcription factors and defence genes. Therefore, priming is a long-term resistance mechanism developed by plants. These defence mechanisms, however, cause an energetic expenditure that may lead to productivity losses (Worral et al. 2012).

Gaseous phytohormones such as ethylene and a series of terpenes, as well as JA and salicylic acid (SA) (Zhang et al. 2009), are released by plants and act on several defence signalling mechanisms (Muroi et al. 2011). Ethylene is produced in response to injuries or infection by pathogens, by exposure to elicitors of defence mechanisms and through various metabolic processes (Grosskopf et al. 1991). JA and its by-products are distributed in several plant tissues, participating in several anatomic–physiological processes, such as root growth, the opening of stomata and senescence (Koda 1992). Delaney et al. (1994) have demonstrated that an accumulation of SA is essential for the expression of resistance mechanisms. Through the analysis of an isogenic tomato mutant line (*defenseless-1* [*def-1*]) deficient in the biosynthesis of JA, Li et al. (2002) showed that TSSM feeding and fecundity on *def-1* plants was significantly greater than on wild-type plants. Decreased resistance of *def-1* plants was correlated with reduced JA accumulation and expression of defensive proteinase inhibitor genes, which were induced in mite-damaged wild-type leaves. The treatment of *def-1* plants

with methyl-JA restored resistance to TSSM feeding and reduced the fecundity of female mites. Using the same tomato mutant, Ament et al. (2004) showed that the hatching rate of eggs on *def-1* was significantly higher, suggesting that JA-dependent direct defences enhanced egg mortality or increased the time needed for embryonic development. Also, *def-1* had lower levels of JA-related transcripts but higher levels of SA-related transcripts after one day of TSSM infestation. Furthermore, the indirect defence response was absent in *def-1*, since the typical TSSM-induced tomato volatiles (including MeSA) were not induced. Similarly, the expression of the MeSA biosynthesis gene *SAMT* (salicylic acid methyltransferase) was induced by TSSM in wild-type plants but not in *def-1*. Exogenous application of JA to *def-1* induced the accumulation of *SAMT* transcripts and restored the emission of MeSA on herbivores, suggesting that JA is, therefore, necessary to induce the enzymatic conversion of SA into MeSA. It also suggests that JA is essential for establishing the TSSM-induced indirect defence response. Recently, Miyazaki et al. (2014) showed that high expression levels of JA-related genes (LOX, AOS and OPR) were observed in mite-infested diploid cotton (*Gossypium arboreum*) plants, suggesting that JA is associated with resistance to TSSM. It is important to note that intraspecific variation within a single herbivore species can lead to resistance or susceptibility to JA-dependent defences of a host plant, as previously shown by Kant et al. (2008). These authors characterized three distinct lines of TSSM that differentially induce JA-related defence genes and metabolites while feeding on tomato plants. Similar results were observed by Ozawa et al. (2011), who described two strains of mites which were able to induce different blends of volatiles in lima bean plants infested by either strain.

Defence genes involved in the pathways of JA, SA and ethylene are responsible for the production of defence proteins (glucanases, chitinases, proteases, polyphenol oxidases, protease inhibitors) that limit the damage to the attacked plant. Genes involved in cellular detoxification are also up-regulated, signalling for the production of antioxidant enzymes such as peroxidases, catalase and superoxide dismutase (Grinberg et al. 2005; Nachappa et al. 2013). Through a combined metabolomics and transcriptomics approach, Kant (2004) showed that one day after infestation by TSSM on tomato leaves, direct defence responses (such as proteinase inhibitor activity and transcription of genes involved in JA-, SA-, and ethylene-regulated defences) had already been activated. Although transcriptional up-regulation of enzymes involved in the biosynthesis of monoterpenes and diterpenes already occurred on day one, a significant increase in the emission of volatile terpenoids was delayed until day four, which coincided with the increased olfactory preference of predatory mites (*Phytoseiulus persimilis*) for infested plants. These data indicate that the plant activates its indirect defences (volatile production) to complement the direct defence response against TSSM. Interestingly, the

invasive mite *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard suppresses the induction of the JA- and SA-signalling pathways involved in induced plant defences. This was demonstrated by the lower levels of inducible defence compounds, such as proteinase inhibitors in mite-infested plants when compared to non-infested ones. Consequently, in this case, mites perform much better on previously attacked plants than on non-attacked plants (Sarmiento et al. 2011; Navajas et al. 2013). Yet, Zhurov et al. (2014) used a microarray analysis to assess gene expression changes in *Arabidopsis thaliana* leaves in response to a TSSM attack, showing that mites induce conserved defence pathways against many different biotic stressors. Some of the induced programs are effective against TSSM, including JA-regulated accumulation of secondary indole glucosinolate (IG) metabolites that affect the ability of spider mites to infect *Arabidopsis*. The analysis of spider mite responses indicate that IGs are perceived by the spider mite, but changes in the expression of genes implicated in the detoxification of xenobiotics are insufficient to fully detoxify IGs.

Proteolytic digestion in phytophagous mite species is based mostly on cysteine peptidase activities (Carrillo et al. 2011). This is consistent with the proliferation of cysteine peptidase gene family, mainly of C1A papain and C13 legumain classes, found in the *T. urticae* genome in comparison to other sequenced arthropod species (Grbić et al. 2011). Another defence strategy used by plants to impair many physiological activities of mites, such as their nutrition, reproduction and development, is related to the peptidase activity inhibition modulated by specific inhibitors. Two of the most abundant plant protease inhibitors are the cystatins (family I25) which inhibit cysteine peptidases C1A and C13 and cereal trypsin/ α -amylase inhibitors (family I6). Such inhibition of the proteolysis content of vegetal cells and tissues decreases mite access to essential amino acids and causes higher mite mortality (Santamaria et al. 2012). Some of these plant inhibitors transgenically expressed in plants have conferred resistance against several arthropods, including *T. urticae* in maize (Carrillo et al. 2011), the lepidopteran *Sitotroga cerealella* in wheat (Altpeter et al. 1999) and the coleopteran *Sitophilus oryzae* in rice (Alfonso-Rubí et al. 2003).

4. Concluding remarks and future perspectives

Cereal crops are of great importance to worldwide nutrition, and alternatives should be sought for controlling damages caused by phytophagous mite infestations. This review article is meant to contribute to the knowledge on phytophagous mite species commonly found infesting rice, corn and wheat cultures and their potential influence in plant physiology, biochemistry and development. It is noticeable that specific studies about molecular and physiological plant responses and changes promoted by mites are still not completely understood. This scenario is even worse in monocotyledonous species and, although the great economic impact on the production of the cereals

presented in this article is caused by these widespread pests, it seems that this specific research topic has been neglected.

Host plants probably present a great variability in their gene pools as found for abiotic stress tolerance, allowing the identification of cultivars resistant to phytophagous mite infestation. Applying conventional breeding and selection techniques, cultivars with elevated resistance level may be bred into high-producing lines. The identification of molecular markers associated with resistance would be helpful in such breeding programs (Miedaner and Korzun 2012), and, as more information on the molecular and physiological plant modifications induced by mite infestation becomes available, more resistance-related genes can be used for plant genetic manipulation. However, the genetic diversity available within existing germplasm collections sets the limit to the extent of mite infestation improvement that can be achieved through breeding. Therefore, transgenic approaches are possibly necessary to enable effective and significant phytophagous mite infestation resistance. This approach may have a long-lasting effect on pest population, does not directly affect their natural enemies and exempts the farmer from any previous knowledge of the pest in order to control it. Using genetic engineering, Bleeker et al. (2012) showed that the addition of two enzymes of the terpenoid-biosynthetic pathway from a wild relative alter insect-choice behaviour and improve herbivore resistance in cultivated tomato.

The demand for alternative mite control methods has risen over the past years, since the use of chemical defences for controlling pests in agriculture represents risks to the environment and human health. A promising alternative to chemical defences is the biological control of phytophagous mites, a sustainable technique that does not pollute the environment or cause ecological imbalances. It could be a green alternative to combat harmful species and to reduce losses caused by mite infestation. Among the organisms used in mite biocontrol, arthropod pathogenic fungi are probably the most promising. Regarding these fungi, some works suggest that the effects in non-host organisms are minimal, making them a safe alternative in integrated pest control programs (Goettel and Hajek 2000; Pell et al. 2001). It is already known that different crops can influence the control efficacy of fungi on phytophagous mites, as shown for *Beauveria bassiana* infecting *Tetranychus urticae* (Gatarayih et al. 2010). However, the molecular and physiological mechanisms which control such associated activities against the phytophagous mite are not well understood.

One important gap in the understanding of plant responses to phytophagous mite infestation is the knowledge about the relative contribution of each type of defence response. The identification and characterization of new genes, proteins, metabolites and other molecules, as well as their involvement in mite-plant interactions may contribute to reveal the molecular and physiological mechanisms that determine the success or failure of the

interaction. Biotechnologically, these research approaches may also aid the development of new strategies towards raising plant resistance to phytophagous mite infestation.

Funding

The authors thank Centro Universitário UNIVATES, FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and Felipe Klein Ricachenevsky for critical reading of the manuscript.

References

- Alfonso-Rubi J, Ortego F, Castañera P, Carbonero P, Diaz I. 2003. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in *indica* and *japonica* rice, confers resistance to the weevil *Sitophilus oryzae*. *Transgenic Research* 12:23–31.
- Altpeter F, Diaz I, McAuslane H, Gaddour K, Carbonero P, Vasil IK. 1999. Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe. *Molecular Breeding* 5:53–63.
- Ament K, Kant MR, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC. 2004. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology* 135:2025–2037.
- Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, Von Dahl CC, Preston CA. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. *Science* 311:812–815.
- Balmer D, Planchamp C, Mauch-Mani B. 2013. On the move: induced resistance in monocots. *Journal of Experimental Botany* 64:1249–1261.
- Bleeker PM, Mirabella R, Diergaarde PJ, VanDoorn A, Tissier A, Kant MR, Prins M, De Vos M, Haring MA, Schuurink RC. 2012. Improved herbivore resistance in cultivated tomato with the sesquiterpene biosynthetic pathway from a wild relative. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:20124–20129.
- Bronner R, Westphal E, Dreger F. 1991. Enhanced peroxidase activity associated with the hypersensitive response of *Solanum dulcamara* to the gall mite *Aceria cladophthirus* (Acari: eriophyoidea). *Canadian Journal of Botany* 69:2192–2196.
- Carmona D, Lajeunesse MJ, Johnson MTJ. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology* 25:358–367.
- Carrillo L, Martinez M, Ramessar K, Cambra I, Castañera P, Ortego F, Diaz I. 2011. Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by altering their cysteine-proteases. *Plant Cell Reports* 30:101–112.
- Cho MR, Kim DS, Im DS. 1999. A new record of tarsonemidae mite, *Steneotarsonemus spinki* (Acari, Tarsonemidae) and its damage on rice in Korea. *Korean Journal of Applied Entomology* 38:157–164.
- Conrath U, Beckers GJ, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM, Poinssot B, Pozo MJ, et al. 2006. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1062–1071.
- Cullen E, Schramm S. 2009. Two-spotted spider mite management in soybean and corn. University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension Publishing. Article A3890 [cited 2014 May]. Available from: <http://corn.agronomy.wisc.edu/Management/pdfs/A3890.pdf>
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, et al. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247–1250.
- Dermauw W, Wybouw N, Rombauts S, Menten B, Vontas J, Grbic M, Clark RM, Feyereisen R, Van Leeuwen T. 2013. A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:E113–E122.
- Duan M, Sun SSM. 2005. Profiling the expression of genes controlling rice grain quality. *Plant Molecular Biology* 59:165–178.
- Fadini MAM, Araujo OG, Mendes SM, Marinho CGS. 2012. Ocorrência do ácaro fitófago *Catarhinus tricholaenae* Keifer (Acari: Dptilomiopidae) em cultivares de milho Bt. *Ciência Rural* 42:1524–1527.
- Fadini MAM, Lemos WP, Pallini A, Venzon M, Mourão AS. 2004. Herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: tetranychidae) induz defesa direta em morangueiro? *Neotropical Entomology* 33:293–297.
- FAO. 2013. Cereal supply and demand brief [cited 2014 Jun]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/019/i3473e/i3473e.pdf>
- Ferla NJ, Rocha MS, Freitas TFS. 2013. Fluctuation of mite fauna associated to rice culture (*Oryza sativa* L.: poales, Poaceae) in two regions in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal of Agricultural Science and Technology* 3:525–533.
- Gatarayia MC, Laing MD, Miller RM. 2010. Effects of crop type on persistence and control efficacy of *Beauveria bassiana* against the two spotted spider mite. *BioControl* 55:767–776.
- Gilardoni PA, Schuck S, Jüngling R, Rotter B, Baldwin IT, Bonaventure G. 2010. SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses. *BMC Plant Biology* 10:66.
- Goettel MS, Hajek AE. 2000. Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. In: Wajnberg E, Scott JK, Quimby PC (Org), editors. *Evaluating indirect ecological effects of biological control*. Wallingford (UK): CAB International; p. 81–97.
- Grbić M, Van Leeuwen T, Clark R, Rombauts S, Rouzé P, Grbić V, Osborne EJ, Dermauw W, Thi Ngoc PC, Ortego F, et al. 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* 479:487–492.
- Grinberg M, Perl-Treves R, Palevsky E, Shomer I, Soroker V. 2005. Interaction between cucumber plants and the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus*: from damage to defense gene expression. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 115:135–144.
- Grosskopf DG, Felix G, Boller T. 1991. A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension cultured tomato cells. *Journal of Plant Physiology* 138:741–746.
- Halitschke R, Gase K, Hui D, Schmidt DD, Baldwin IT. 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. *Plant Physiology* 131:1894–1902.
- Heil M, Bostock RM. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* 89:503–512.
- Hildebrand DF, Rodriguez JG, Brown GC, Luu KT, Volden CS. 1986. Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 79:1459–1465.

- Hummel NA, Castro BA, McDonald EM, Pellerano MA, Ochoa R. 2009. The panicle rice mite, *Steneotarsonemus spinki* Smiley, a re-discovered pest of rice in the United States. *Crop Protection* 28:547–560.
- Jakab G, Cottier V, Toquin V, Rigoli G, Zimmerli L, Métraux J-P, Mauch-Mani B. 2001. β -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107:29–37.
- Kant MR. 2004. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiology* 135:483–495.
- Kant MR, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC. 2008. Intraspecific variation in a generalist herbivore accounts for differential induction and impact of host plant defences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275:443–452.
- Karmakar K. 2008. *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: tarsonemidae) – a yield reducing mite of rice crops in West Bengal, India. *International Journal of Acarology* 34:95–99.
- Kessler A, Baldwin IT. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53:299–328.
- Koda Y. 1992. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. *International Review of Cytology* 135:155–199.
- Lakshmi VJ, Krishnaiah NV, Pasalu IC, Katti G. 2008. Bioecology and management of rice mites - a review. *Agricultural Reviews* 29:31–39.
- Li C, Williams MM, Loh YT, Lee GI, Howe GA. 2002. Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology* 130:494–503.
- Michiels K, Eijn VD, Smaghe G. 2010. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 73:193–212.
- Miedaner T, Korzun V. 2012. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding. *Phytopathology* 102:560–566.
- Miller AD, Umina PA, Weeks AR, Hoffmann AA. 2012. Population genetics of the wheat curl mite (*Aceria tosichella* Keifer) in Australia: implications for the management of wheat pathogens. *Bulletin of Entomological Research* 102:199–212.
- Mithöfer A, Boland W. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* 63:431–450.
- Miyazaki J, Stiller WN, Truong TT, Xu Q, Hocart CH, Wilson LJ, Wilson IW. 2014. Jasmonic acid is associated with resistance to two spotted spider mites in diploid cotton (*Gossypium arboreum*). *Functional Plant Biology* 41:748–757.
- Moles AT, Peco B, Wallis IR, Foley WJ, Poore AGB, Seabloom EW, Vesik PA, Bisigato AJ, Cella-Pizarro L, Clark CJ, et al. 2013. Correlations between physical and chemical defences in plants: tradeoffs, syndromes, or just many different ways to skin a herbivorous cat? *The New Phytologist* 198:252–263.
- Moraes GJ, Flechtmann CHW. 2008. *Manual de Acarologia - Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil*. Ribeirão Preto (Brazil): Holos Editora; 308 pp.
- Muroi A, Ramadan A, Nishihara M, Yamamoto M, Ozawa R, Takabayashi J, Arimura G. 2011. The composite effect of transgenic plant volatiles for acquired immunity to herbivory caused by inter-plant communications. *PLoS ONE* 6:e24594.
- Nachappa P, Margolies DC, Nichols JR, Whitfield AE, Rotenberg D. 2013. Tomato Spotted Wilt Virus benefits a non-vector arthropod, *Tetranychus urticae*, by modulating different plant responses in tomato. *PLoS ONE* 8:e75909.
- Navajas M, Moraes GJ, Auger P, Migeon A. 2013. Review of the invasion of *Tetranychus evansi*: biology, colonization pathways, potential expansion and prospects for biological control. *Experimental & Applied Acarology* 59:43–65.
- Navia D, Mendes MAS, Ochoa R. 2006. *Steneotarsonemus furcatus* de Leon (Prostigmata: tarsonemidae) infesting rice crops in Brazil. *International Journal of Acarology* 32:219–222.
- Navia D, Mendonça RS, Skoracka A, Szydio W, Knihinicki D, Hein GL, Da Silva Pereira PR, Truol G, Lau D. 2013. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops. *Experimental & Applied Acarology* 59:95–143.
- Niazi FR, Singh J. 2001. Effect of mite *Oligonychus oryzae* infestation on *Rice tungro* acquisition and transmission by *Nephotettix virescens*. *Indian Phytopathology* 54:380.
- Oerke E-C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144:31–43.
- Ozawa R, Matsushima R, Maffei M, Takabayashi J. 2011. Interaction between *Phaseolus* plants and two strains of Kanzawa spider mites. *Journal of Plant Interactions* 6:125–128.
- Ozawa R, Shimoda T, Kawaguchi M, Arimura G, Horiuchi J, Nishioka T, Takabayashi J. 2000. *Lotus japonicus* infested with herbivorous mites emits volatile compounds that attract predatory mites. *Journal of Plant Research* 113:427–433.
- Pears FB. 2005. Insect-series crops (mites in wheat). *Fact Sheet* 5:578.
- Pell JK, Eilenberg J, Hajk AE, Steinkraus DC. 2001. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. In: Tm B, Jackson C, Magan N, editors. *Fungal as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford (UK): CAB International; p. 77–153.
- Pereira PRVS, Navia D, Salvadori JR, Lau D. 2009. Occurrence of *Aceria tosichella* in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:539–542.
- Petanović R, Kielkiewicz M. 2010. Plant-erriophyoid mite interactions: cellular biochemistry and metabolic responses induced in mite-injured plants. Part I. *Experimental and Applied Acarology* 51:61–80.
- Radhakrishnan V, Ramaraju K. 2009. Development durations, colonization and insecticide efficacy of leaf mite, *Oligonychus oryzae* Hirst on rice. *Tropical Agricultural Research* 21:30–38.
- Santamaría ME, Cambra I, Martínez M, Pozanco C, Gonzalez-Melendi P, Grbic V, Castanera P, Ortego F, Diaz I. 2012. Gene pyramiding of peptidase inhibitors enhances plant resistance to the Spider Mite *Tetranychus urticae*. *PLoS ONE* 7:e43011.
- Sarmiento RA, Lemos F, Bleeker PM, Schuurink RC, Pallini A, Oliveira MGA, Lima ER, Kant M, Sabelis MW, Janssen A. 2011. A herbivore that manipulates plant defence. *Ecology Letters* 14:229–236.
- Schmidt RA. 2014. Leaf structures affect predatory mites (Acari: phytoseiidae) and biological control: a review. *Experimental and Applied Acarology* 62:1–17.
- Schmitt F-J, Renger G, Friedrich T, Kreslavski VD, Zharmukhamedov SK, Los DA, Kuznetsov VV, Allakhverdiev SI. 2014. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837:835–848.
- Skare JM, Wijkamp I, Denham I, Rezende JA, Kitajima EW, Park JW, Desvoves B, Rush CM, Michels G, Scholthof KB, et al. 2006. A new eriophyid mite-borne membrane-enveloped virus-like complex isolated from plants. *Virology* 347:343–353.
- Strauss SY, Zangerl AR. 2002. Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. In: Herrera CM, Pellmyr O, editors. *Plant*

- animal interactions: an evolutionary approach. Oxford: Blackwell; p. 77–106.
- Tong X, Qi J, Zhu X, Mao B, Zeng L, Wang B, Li Q, Zhou G, Xu X, Lou Y, et al. 2012. The rice hydroperoxide lyase OsHPL3 functions in defense responses by modulating the oxylipin pathway. *The Plant Journal* 71:763–775.
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L. 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40:563–572.
- Vandenborre G, Ejm VD, Smaghe G. 2009. *Nicotiana tabacum* agglutinin expression in response to different biotic challenges. *Arthropod-Plant Interactions* 3:193–202.
- Van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85–97.
- Vet LE. 1999. Evolutionary aspects of plant-carnivore interactions. *Novartis Foundation Symposia* 223:3–13; discussion 13–20, 39–42.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JP, Ryals JA. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 3:1085–1094.
- Worrall D, Holroyd GH, Moore JP, Glowacz M, Croft P, Taylor JE, Paul ND, Roberts MR. 2012. Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytologist* 193:770–778.
- Wu L, Chen H, Curtis C, Fu ZQ. 2014. Go in for the kill: how plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* 5:710–721.
- Zhang P-J, Zheng S-J, Van Loon JJ, Boland W, David A, Mumm R, Dicke M. 2009. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:21202–21207.
- Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M. 2013. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* 40:23–35.
- Zhurov V, Navarro M, Bruinsma KA, Arbona V, Santamaria ME, Cazaux M, Wybouw N, Osborne EJ, Ens C, Rioja C, et al. 2014. Reciprocal responses in the interaction between *Arabidopsis* and the cell-content-feeding chelicerate herbivore spider mite. *Plant Physiology* 164:384–399.