

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DETECÇÃO DE *Tobacco streak virus* EM *Nicotiana tabacum* E TRIPES
VETORES POR MEIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL E RESPOSTAS
QUIMIOTÁXICAS DE *Orius insidiosus* AO COMPLEXO *N. tabacum*, *Myzus*
persicae E FITORMÔNIOS

Dânia Vieira Branco Ozorio
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de concentração Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ozorio, Dânia Vieira Branco
DETECÇÃO DE Tobacco streak virus EM Nicotiana
tabacum E TRIPES VETORES POR MEIO DE RT-PCR EM TEMPO
REAL E RESPOSTAS QUIMIOTÁXICAS DE Orius insidiosus
AO COMPLEXO N. tabacum, Myzus persicae E FITORMÔNIOS
/ Dânia Vieira Branco Ozorio. -- 2018.

79 f.

Orientadora: Luiza Rodrigues Redaelli.

Coorientadora: Simone Mundstock Jahnke.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2018.

1. Tobacco streak virus. 2. TaqMan. 3. Tripes. 4.
Orius insidiosus. I. Redaelli, Luiza Rodrigues,
orient. II. Jahnke, Simone Mundstock, coorient.

III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DÂNIA VIEIRA BRANCO OZORIO
Engenheira Agrônoma - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 20.04.2018
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 18.12.2018
Por

LUIZA RODRIGUES REDAELLI
Orientadora
PPG Fitotecnia/UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coorientadora
PPG Fitotecnia/UFRGS

ROBERTA TOGNON
Bolsista PNPd - UFSM/RS

SARA HARTKE
IFRS - Campus Rolante/RS

THOR VINÍCIUS MARTINS FAJARDO
EMBRAPA - Uva e Vinho
Bento Gonçalves/RS

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo acesso a um curso de ensino superior gratuito e de qualidade.

À Dr^a Luiza Rodrigues Redaelli pela sua dedicada orientação, que sempre esteve disponível para ouvir, ajudar e conversar, o que foi muito importante para desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pela amizade, paciência, ensinamentos e por contribuir para meu desempenho profissional e pessoal durante este período.

Ao Dr. Edson Bertolini que ajudou muito para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Por toda dedicação, paciência e apoio.

À Dr^a Simone Jahnke e Dr. Josué Sant' Ana pelas importantes contribuições para o desenvolvimento e conclusão de um trabalho com qualidade e para minha formação profissional.

À minha família que sempre me incentivou a estudar e me motivou a seguir na área da pesquisa. Que se alegraram comigo a cada conquista e me apoiaram nos momentos difíceis. Esta conquista também é de vocês.

Ao Heitor Lopes pelo companheirismo e apoio. Que me ajudou em muitos momentos durante meu trabalho.

Aos amigos do Bioecolab e Leeqi, Jucélio, que me ajudou em algumas etapas do trabalho; Cláudia, Camila, Roberta R., Paloma, Patrícia P., Fabi, que proporcionaram bons momentos de risadas, conversas, desabafos, que foram essenciais para mim durante estes dois anos. Em especial aos que começaram junto comigo essa caminhada, Nelson, que contribuiu com questionamentos construtivos, ao Joel com material de experimento. Agradeço a todos do grupo por contribuírem de várias maneiras com este trabalho.

À Geluse Medronha minha companheira de coletas.

À Fernanda Borges pelo auxílio com a preparação das soluções químicas.

À Rosane de Marco, que disponibilizou sua área de cultivo para as coletas.

À Mariana Flores Lindner e Adriano Cavalleri pela identificação dos espécimes de tripes.

Ao Dr. Fabrício Coelho e à Souza Cruz, por oportunizar e viabilizar o trabalho de detecção do vírus.

Aos técnicos da Souza Cruz, Claudionei Konopka, Maicon Pontarolo e Márcia Peripolli pelo auxílio em diferentes etapas do trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

**DETECÇÃO DE *Tobacco streak virus* EM *Nicotiana tabacum* E TRIPES
VETORES POR MEIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL E RESPOSTAS
QUIMIOTÁXICAS DE *Orius insidiosus* AO COMPLEXO *N. tabacum*, *Myzus
persicae* E FITORMÔNIOS¹**

Autora: Dânia Vieira Branco Ozorio
Orientadora: Luiza Rodrigues Redaelli
Coorientadora: Simone Mundstock Jahnke

RESUMO

A cultura do tabaco, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), tem grande importância para a região Sul do Brasil, pelo elevado valor comercial do produto e pela capacidade de geração de empregos, desde o cultivo até a industrialização. O *Tobacco streak virus* (TSV), gênero *Ilarvirus*, agente causal da necrose branca do fumo tem sido registrado no Paraná provocando perdas de produtividade e qualidade nas lavouras de fumo. Os métodos convencionais de detecção apresentam falhas na identificação do TSV por terem baixa sensibilidade e especificidade. Além disso, os modelos de RT-PCR convencionais requerem a purificação do ácido nucleico, o que é laborioso e aumenta o risco de contaminação. *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera, Anthocoridae) é um predador mundialmente usado como agente de controle biológico de tripes e pulgões, vetores responsáveis pela ocorrência de diversas viroses do fumo. Assim, este trabalho teve como objetivos: a) desenvolver e validar um protocolo de preparação de amostras direto e de RT-PCR em tempo real com uso de sonda TaqMan para detecção do TSV em plantas de tabaco e tripes e b) avaliar as respostas quimiotáticas de fêmeas de *O. insidiosus* frente a *N. tabacum* infestada ou não com *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae); ao pulgão e a plantas de tabaco aspergidas com ácido salicílico e metil jasmonato. Foi comparado o protocolo de purificação de RNA baseado em kit comercial (Promega), com o método de diluição do extrato vegetal para uso direto na RT-PCR em tempo real, com a sonda TaqMan desenvolvida. A RT-PCR em tempo real amplificou tanto a partir de amostras de RNA purificado como de extrato vegetal diluído, e através das diluições se mostrou mais sensível que a RT-PCR em tempo real com o uso de SYBR-Green e ELISA. O protocolo de preparação de amostras e de amplificação por RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan, permitiu a detecção do TSV em material vegetal e em tripes, de maneira sensível, específica e precisa. Em relação às respostas quimiotáticas, fêmeas de *O. insidiosus* foram atraídas apenas às plantas infestadas com pulgões ($p < 0,001$). Nenhuma das doses de fitormônios gerou resposta das fêmeas, pois podem não ter alterado o perfil químico das plantas.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (79f.) Abril, 2018.

**DETECTION OF *Tobacco streak virus* IN *Nicotiana tabacum* AND THRIPS
BY REAL TIME RT-PCR AND CHEMOTACTIC RESPONSES OF *Orius
insidiosus* (HEMIPTERA, ANTHOCORIDAE) TO *N. tabacum*, *Myzus persicae*
(HEMIPTERA, APHIDIDAE) COMPLEX AND PHYTOHORMONES¹**

Author: Dânia Vieira Branco Ozorio
Advisor: Luiza Rodrigues Redaelli
Co-advisor: Simone Mundstock Jahnke

ABSTRACT

Tobacco crop, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) has a great importance in the Southern Brazil, due to the high commercial value of the product and the capacity to employment generation from farming to industrialization. *Tobacco streak virus* (TSV), genera *Ilarvirus*, is the causal agent of the streak in tobacco plants and it has been recorded in Paraná causing losses of productivity and quality in tobacco crops. The conventional methods may present flaws in the identification of TSV because they have low sensitivity and specificity. Besides, conventional PCR templates require purification of the nucleic acid, which is laborious and time consuming and increases the risk of contamination. *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera, Anthocoridae) is worldwide predator used as a biological control agent for thrips and aphids, which are vectors responsible for the occurrence of several tobacco viruses. Thus, this work aimed: a) to develop and validate a protocol for direct sample preparation and real-time RT-PCR amplification, with TaqMan probe, to detect TSV in tobacco plants and thrips; and b) to evaluate chemotactic responses of *O. insidiosus* females against *N. tabacum* infested or not by *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), to aphids and tobacco plants sprayed with salicylic acid and methyl jasmonate. The protocol using purified RNA targets by commercial kit (Promega) was compared with crude plant extracts for direct real time RT-PCR. The real time RT-PCR designed, amplified both purified RNA and crude plant extracts. Using serial dilutions of plant extracts, TaqMan real-time RT-PCR was the most sensitive when compared with SYBR-Green and ELISA techniques. The protocol developed here allows the detection of TSV in crude vegetal extract and in thrips in a sensitive, specific and accurate way. Concerning the chemotactic responses, females of *O. insidiosus* were attracted only to infested plants with aphids ($p < 0,001$). None of the phytohormones doses induced response of females, because they may not have altered the chemical profile of the plants.

¹ Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (79p.) April, 2018.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Cultura do fumo.....	4
2.2 Viroses do fumo	6
2.2.1 <i>Tobacco streak virus</i> – TSV	6
2.3 Principais insetos-praga associados ao fumo	12
2.4 Predadores de tripes e pulgão	15
2.5 Comunicação interespecífica predador-presa.....	18
2.6 Referências Bibliográficas	20
3 CAPÍTULO 1 DETECÇÃO DE <i>Tobacco streak virus</i> EM <i>Nicotiana tabacum</i> E TRIPES VETORES ATRAVÉS DE RT-PCR EM TEMPO REAL.....	29
3.1 Introdução.....	30
3.2 Material e Métodos.....	32
3.2.1 Coleta de material	32
3.2.2 Preparo das amostras	33
3.2.3 Detecção por ELISA	34
3.2.4 Desenho de iniciadores e sonda TaqMan	34
3.2.5 Reações de RT-PCR em tempo real	35
3.3 Resultados e Discussão	37
3.3.1 Reações de RT-PCR em tempo real	37
3.3.1.1 RT-PCR SYBR-Green.....	37
3.3.1.2 Iniciadores e sonda TaqMan e condições da RT-PCR em tempo real .	37
3.3.2 Comparação de sensibilidade.....	40
3.3.3 Detecção do TSV em amostras naturalmente infectadas.....	43
3.3.4 Prevalência de sintomas associados ao TSV em lavouras de fumo.....	46
3.3.5 Detecção do TSV em tripes	47
3.6 Referências Bibliográficas	50
4 CAPÍTULO 2 RESPOSTAS QUIMIOTÁXICAS DE <i>Orius insidiosus</i> AO COMPLEXO <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Myzus persicae</i> E FITORMÔNIOS.....	53
4.1 Introdução.....	54
4.2 Material e Métodos.....	55
4.2.1 Insetos	56
4.2.2 Plantas.....	56
4.2.3 Soluções	57

	Página
4.2.4 Procedimentos experimentais	57
4.2.5 Bioensaios	58
4.2.6 Análise estatística	59
4.3 Resultados e Discussão	59
4.4 Referências Bibliográficas	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1	
1. Comparação da sensibilidade de detecção das técnicas ELISA e RT-PCR em tempo real utilizando SYBR-Green e sonda TaqMan para detecção de <i>Tobacco streak virus</i> em diluições seriadas de extrato vegetal e de RNA purificado de planta de tabaco infectada.	41
2. Relação das amostras de folhas coletadas apresentando sintomas típicos do TSV, de outras necroses e seus respectivos resultados da TRT-PCR em tempo real com sonda TaqMan para o TSV.....	44
3. Resultado da detecção do TSV em tripes através de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan.	48

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1	
1. Curva de amplificação de RT-PCR em tempo real com SYBR-Green com iniciadores de Dutta <i>et al.</i> (2015) (A) e gráfico com temperaturas de <i>melting</i> (B) de amostras de RNA purificado de material coletado em Ivaí, Paraná.	37
2. Comparação das sequências utilizadas para o desenho de iniciadores e da sonda TaqMan.	38
3. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan de amostras com purificação de RNA (A), de diluição do extrato vegetal sem purificação de RNA (B) e com o esmagado de tripes sem purificação de RNA (C).	39
4. Folhas de tabaco expressando diferentes tipos de sintomas: A e B: sintomas típicos do TSV, presença de manchas necróticas angulares associadas às nervuras (A) e folhas afiladas (B); manchas arredondadas que coalescem entre as nervuras (C) e necroses avermelhadas entre as nervuras (D), não características de TSV.	45
CAPÍTULO 2	
1. Percentual de respostas de fêmeas de <i>O. insidiosus</i> expostas: A) plantas de tabaco e ao vaso com substrato (controle); B) plantas de tabaco infestadas com pulgão e não infestadas (controle) e C) <i>Myzus persicae</i> e ao ar (controle). Valores sobre as barras correspondem ao número de insetos responsivos e, entre parênteses, aos não responsivos. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).	60
2. Percentual de respostas de fêmeas de <i>Orius insidiosus</i> expostas a plantas de tabaco tratadas com diferentes doses de fitormônios e não tratadas. Valores sobre as barras correspondem ao número de insetos responsivos e, entre parênteses, aos não responsivos. Asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).	63

1 INTRODUÇÃO

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Solanaceae) é uma planta não alimentícia cultivada com importância econômica para aproximadamente 130 países, principalmente para o Brasil. A cultura mantém o país como o principal exportador desde 1993 e o segundo maior produtor mundial. A região Sul se destaca pela maior produtividade e qualidade do tabaco, ou fumo, o qual é a principal fonte de renda de pequenos produtores rurais. Diversas doenças atacam plantas de fumo, como a necrose branca que é causada pelo *Tobacco streak virus* (TSV) (*Bromoviridae*, *Ilarvirus*). Este vírus também pode infectar uma ampla gama de hospedeiros desde plantas cultivadas até as consideradas daninhas e ser transmitido para a cultura do fumo por específicos vetores da ordem Thysanoptera, que fazem parte das principais pragas do fumo juntamente com afídeos, coleópteros e lepidópteros. As plantas doentes no geral não morrem, mas apresentam diminuição na produção e redução na qualidade do tabaco após a cura das folhas. Os sintomas iniciais são confundidos com aqueles causados por outros vírus que infectam o fumo, como *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Potato virus Y* (PVY), dificultando uma diagnose correta a campo, o que faz necessário a utilização de métodos de detecção precisos e confiáveis. Atualmente, a detecção do TSV é realizada por meio de métodos sorológicos mediante a técnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) com antissoros policlonais e por métodos moleculares com a utilização das técnicas de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e em tempo real com uso de SYBR-Green. Estas

técnicas apresentam certas limitações principalmente relacionadas com a especificidade e a sensibilidade, proporcionando um diagnóstico pouco preciso. A RT-PCR em tempo real com uso de sonda TaqMan é uma opção mais eficiente e precisa, não somente pela sua maior sensibilidade e especificidade, mas também por não necessitar de RNA viral purificado para a realização da amplificação. O desenvolvimento e uso de métodos de detecção para o diagnóstico preciso são de extrema importância para adoção de medidas de prevenção e controle da doença.

As medidas de prevenção e controle estão baseadas na eliminação de plantas doentes e na aplicação de inseticidas químicos para o controle dos vetores. Devido ao insucesso na contenção dos vetores e na tentativa de evitar a necessidade de maior número de aplicações de inseticidas, medidas alternativas ao controle químico têm sido buscadas. Sabe-se que o uso de inimigos naturais tem se tornado cada vez mais comum e muitas espécies de predadores e de parasitoides já são conhecidas por serem capazes de controlar populações de insetos pragas em diversas culturas. *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera, Anthocoridae) é mundialmente conhecido e considerado eficiente predador de tripes e pulgões, mas seu comportamento em lavouras de fumo nunca foi avaliado.

Para encontrar suas presas no ambiente, predadores se guiam através de compostos orgânicos voláteis liberados pelas plantas quando estão sofrendo herbivoria. Como mecanismo de defesa, as plantas produzem substâncias químicas que podem repelir herbívoros ou atrair inimigos naturais e estas são produzidas por fitormônios pelas vias metabólicas secundárias. Conhecer o comportamento destes predadores em lavouras de fumo é importante para possibilitar a liberação destes como uma ferramenta de controle biológico.

Neste sentido, o trabalho teve como objetivos: 1) desenvolver um protocolo de preparação de amostras e de RT-PCR em tempo real com uso de sonda TaqMan para

detecção do TSV em plantas de tabaco e tripes e 2) avaliar as respostas quimiotáticas de *O. insidiosus* frente a voláteis de plantas de *N. tabacum* infestadas ou não com o pulgão *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae), somente ao pulgão e a voláteis de plantas tratadas com os fitormônios metil jasmonato e ácido salicílico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do fumo

Nicotiana tabacum é uma planta nativa das Américas tropical e subtropical e pertencente à família das solanáceas (Soares *et al.*, 2008). Caracterizada por suas folhas grandes e pegajosas, é uma planta herbácea de ciclo anual podendo atingir até aproximadamente dois metros de altura (Oliveira & Costa, 2012). O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking de produção de tabaco em folha (12%), atrás somente da China que contribui com 40% da produção mundial, seguido da Índia (10%) e dos Estados Unidos da América (6%), estando todos vinculados às grandes agroindústrias internacionais (PARANÁ, 2017).

O Brasil ocupa o primeiro lugar em exportação desde 1993 e comercializa o tabaco para cerca de 100 países, sendo o continente Europeu o principal destino com 51% da exportação, seguido pelo Extremo Oriente (26%), América do Norte (13%) e América Latina (5%) (PARANÁ, 2017). Este destaque do Brasil é devido à alta qualidade do fumo produzido no país, que o torna mais competitivo no mercado internacional, devido aos custos de produção serem mais baixos comparados a outros países (PARANÁ, 2017).

O cultivo do fumo está concentrado na região Sul do País, em áreas de colonização alemã e italiana sendo o restante, distribuído nos estados da Bahia,

Alagoas, Paraíba, Ceará e São Paulo (Heeman, 2009). Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul somam 97% da produção nacional (PARANÁ, 2017). Segundo a mesma fonte, o Rio Grande do Sul contribuiu com 418 mil toneladas na safra 2016/2017, Santa Catarina com 256 mil e Paraná com 184 mil toneladas. No caso do Paraná, a produção vem aumentando ao longo dos últimos oito anos e sua participação passou de 11% para aproximadamente 21,4% na safra de 2016/17 (PARANÁ, 2017).

A cultura do fumo é uma importante fonte de renda para milhares de famílias, pois proporciona maior rentabilidade mesmo em pequenas áreas cultivadas, já que o fumicultor brasileiro se caracteriza por cultivar em pequena propriedade rural, podendo ser classificado como mini, pequeno e ainda arrendatário (PARANÁ, 2017). Segundo a AFUBRA (2017), os produtores de fumo da região Sul possuem em média 15,3 hectares de terra o que dificulta a exploração de culturas que exigem maiores extensões como a soja, em que, principalmente, a mecanização é necessária. A produção de tabaco é considerada mais rentável que outras culturas pelo fato de conseguir-se produzir mais em menos hectares, razão pela qual se torna a principal fonte de renda para pequenos produtores (Fernandez, 2010). Além disso, por ser pouco mecanizada, exige muita mão-de-obra, a qual é constituída principalmente pela própria família do agricultor, além de contratar trabalhadores (Heemann, 2009).

O cultivo do fumo se inicia com a produção de mudas em canteiros e termina com a colheita, secagem e armazenamento, estendendo-se praticamente durante todo o ano (Almeida, 2005). O sistema *floating* é o mais utilizado para produção de mudas, que geralmente se concentra nos meses de junho e julho (Heemann, 2009). De acordo com o autor, as sementes são colocadas em bandejas de isopor de 150 a 200 células com substrato, depositadas em piscinas de lona, onde recebem adubação química e tratamentos com fungicidas, bactericidas e inseticidas. Após cerca de 50 dias, as mudas

são transplantadas manualmente para a área da lavoura, onde também vão receber tratamentos culturais e fitossanitários aplicados com pulverizadores (Almeida, 2005). O ciclo vegetativo do tabaco possui aproximadamente 210 dias e após a colheita, inicia-se o processo de cura e secagem, pré-classificação e enfardamento do produto.

2.2 Viroses do fumo

A cultura do tabaco pode ser afetada por uma ampla gama de doenças, desde as causadas por fungos e bactérias quanto por vírus, levando a diminuição de produtividade e a perda de qualidade do produto (Oliveira & Costa, 2012). Embora, segundo os autores, sejam utilizadas variedades tolerantes ou resistentes para a maioria das doenças, algumas não apresentam níveis satisfatórios de resistência.

Atualmente as viroses são os principais problemas fitossanitários para o cultivo do tabaco e dentre os vírus mais importantes que afetam a cultura estão o *Tobacco mosaic virus* (TMV), gênero *Tobamovirus* (Levy *et al.*, 2013), o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), gênero *Tospovirus* (Mumford *et al.*, 1996), o *Potato virus Y* (PVY) do gênero *Potyvirus* (Pulcinelli & Massola, 2016) e o *Tobacco streak virus* (TSV), gênero *Ilarvirus* (Almeida *et al.*, 2005).

2.2.1 *Tobacco streak virus* – TSV

O TSV, conhecido como causador da necrose branca do fumo, pertence ao gênero *Ilarvirus* da família *Bromoviridae* (Almeida *et al.*, 2005), a qual é considerada uma das principais famílias de viroses de plantas. Este gênero, além do TSV, engloba mais 14 espécies de vírus, sendo o maior gênero da família. Os *Ilarvirus* têm por característica genoma tripartido que codificam de quatro a cinco proteínas (Pallás *et al.*, 2012). O TSV possui genoma de RNA de cadeia positiva, de fita simples, separado em três segmentos lineares designados RNA 1 a 3, que são encapsidados separadamente

(Pallás *et al.*, 2012). O RNA 1 e RNA 2 codificam para a proteína de replicação viral (RP) e para a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), respectivamente e o RNA 3 codifica para a proteína de movimento (MP) e um RNA subgenômico 4 que é traduzido para a proteína capsial (CP) (Pallás *et al.*, 2012).

Assim como outros *Ilarvirus*, o TSV possui diversos hospedeiros, incluindo mais de 140 gêneros de plantas, das famílias Solanaceae e Leguminosae (Almeida *et al.*, 2005). No Brasil, foi identificado pela primeira vez em plantas de tabaco em 1940 (Costa, 1945) e é atualmente conhecido por infectar não somente plantas cultivadas de importância agrícola como algodão (*Gossypium hirsutum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), tabaco, soja (*Glycine max* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.) (Almeida *et al.*, 2005), como também plantas invasoras presentes em bordas dos cultivos agrícolas, as quais podem servir como fonte de inóculo para as culturas (Dutta *et al.*, 2015).

O TSV é transmitido por espécies de tripses que ocorrem em diversos hospedeiros, além de plantas de tabaco (Jones, 2005). Os tisanópteros da família Thripidae, *Thrips tabacci* Linderman, *Frankliniella occidentalis* Pergande (Kaiser *et al.*, 1982) e *Microcephalothrips abdominalis* (Crawford) (Greber *et al.*, 1991) já foram referidos como vetores do vírus. O mecanismo de transmissão se dá através do pólen infectado carregado no corpo destes insetos e transmitido através de ferimentos causados durante a alimentação dos tripses na superfície foliar. Até o momento não existem outros trabalhos que descrevam uma relação biológica entre vetor e o vírus (Klose *et al.*, 1996; Reddy, 2002).

Devido ao hábito de se alimentarem de pólen, os tripses estão associados ao florescimento das plantas hospedeiras do TSV, facilitando assim, a transmissão para outras plantas sadias (Sdoodee & Teakle, 1987). Para Klose *et al.* (1996), o sucesso da

transmissão depende do contato do vírus, presente no pólen e carregado pelo tripes, nos ferimentos da superfície da folha, causados durante o processo de alimentação. Elevada frequência de transmissão foi observada ao espalhar partículas de pólen de *Ageratum houstonianum* Mill. TSV-positivo em plantas de pepino infestadas com tripes de diferentes espécies, visto que em todas as plantas testadas as feridas de alimentação eram visíveis (Klose *et al.*, 1996). Por outro lado, os autores verificaram que a transmissão não ocorreu nas plantas em que havia apenas pólen ou apenas tripes. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por de Sharman *et al.* (2015) onde foi observado 100% de transmissão em plantas de *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. & Hook. f. ex A. Gray através das espécies *Frankliniella schultzei* Trybom (Thysanoptera, Thripidae), *M. abdominalis* e *T. tabaci*, porém, quando testados isoladamente, o pólen ou os tripes, não houve transmissão do TSV. No mesmo estudo, não foi constatada a transmissão para plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) infestadas com ácaro *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) utilizando pólen de *Parthenium hysterophorus* L. (Asteraceae) infectado. Tripes que se alimentaram apenas de folhas infectadas de girassol não transmitiram o vírus quando colocados em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) (Reddy, 2002). Segundo Sdoodee & Teakle (1993) o nível de transmissão pode ser mais afetado pelo isolado do TSV do que por espécies de tripes como vetores.

Alguns estudos relatam a transmissão do TSV por sementes, mas segundo Walter *et al.* (1995), esta depende do isolado do vírus e da espécie de planta. Ghanekar & Schwenk (1974) observaram transmissão do TSV por sementes de soja, mas não ocorrendo em tabaco.

Em diversos países este vírus já foi reportado como o agente causal de muitas doenças, em 1971 o vírus foi registrado pela primeira vez na Austrália em *P.*

hysterophorus e em seguida, detectado em tabaco, morango (*Fragaria vesca* L.), dália [*Dahlia variabilis* (Willd.)] e em espécies daninhas na região de Queensland (Greber, 1971; Sharman *et al.*, 2008). Mais recentemente foi detectado em cultivo de girassol e feijão-mungo (Sharman *et al.*, 2008). Na Índia, o TSV é o agente causal de uma doença considerada grave, devido a perdas econômicas significativas, a necrose em plantas de girassol, também detectado em algodão, feijão-mungo e grão-de-bico (Bhat *et al.*, 2002; Prasada Rao *et al.*, 2003; Sharman *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos da América foi detectado em soja (Rabedoux *et al.*, 2005).

O vírus raramente causa a morte da planta de fumo, mas provoca diminuição na produção e redução na qualidade das folhas, tornando-as impróprias para comercialização. Os sintomas iniciais causados pelo TSV são as necroses brancas ao redor das nervuras, podendo ser observadas pequenas manchas esbranquiçadas de forma angulosa, raramente circular, com o desenvolvimento da planta, estas manchas se atenuam ficando as necroses restritas ao ápice das folhas. Porém, na última fase da doença as folhas novas passam a ser pecioladas e semelhantes às de couve e apresentam estreitamento (Pulcinelli & Massola, 2016). Segundo mesmos autores, os sintomas severos que ocorrem mais raramente são o escurecimento generalizado das nervuras, do caule e queda das folhas, gerando grandes danos às plantas infectadas.

Os sintomas causados pelo TSV são semelhantes aos de outras viroses que também causam necroses, como o vira-cabeça causado pelo TSWV em que folhas novas apresentam palidez e necrose nas nervuras, assim como a necrose das nervuras causada pelo PVY (Lima & Viana, 2015). Por isso, dependendo do estágio de desenvolvimento em que se encontram as plantas, estas viroses são facilmente confundidas dificultando o diagnóstico correto, se baseado apenas nos sintomas. Outros sintomas de pequenas manchas necróticas são causados pela ozoniose, que ocorre

principalmente durante a fase de acelerado crescimento vegetativo (Pulcinelli & Massola, 2016). Estes sintomas se caracterizam por pequenas lesões distribuídas em toda a folha, mas se concentram no ápice e podem coalescer formando áreas de tecido necrosado.

A prevalência do TSV no Brasil tem sido frequente na região sul do Paraná e norte de Santa Catarina atingindo até 80% de infecção provocando mais de 50% de dano na lavoura (Pulcinelli & Massola, 2016).

A detecção do TSV é realizada por meio de métodos sorológicos utilizando a técnica ELISA e de métodos moleculares com o uso da RT-PCR convencional e em tempo real utilizando SYBR-Green (Prasada Rao *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2005; Untiveros *et al.*, 2010; Dutta *et al.*, 2015).

O uso dos métodos sorológicos de detecção revolucionou a diagnose de doenças virais em plantas, principalmente através da técnica ELISA adaptada por Clark e Adams (1977), que permitiu maior precisão, análises em grande escala com rapidez e menor custo, comparada às técnicas biológicas utilizadas na época (López *et al.*, 2009). Esta técnica baseia-se na reação entre anticorpos conjugados com uma enzima e epítomos da proteína do capsídeo viral (antígeno) (Cambra *et al.*, 2011).

Para o TSV a técnica ELISA com anticorpos policlonais tem sido aplicada em estudos que envolvem testes de transmissão por sementes, inoculação mecânica e detecção de hospedeiros naturalmente infectados (Almeida *et al.*, 2005; Abtahi & Habibi, 2008; Vemana & Jain, 2010). A detecção do TSV por ELISA, em levantamento de populações de *P. hysterophorus* infectadas, também foi realizada em estudo de Sharman *et al.* (2009). Porém, em casos onde há baixa concentração do vírus, esta técnica se torna inadequada devido a sua baixa sensibilidade (Cambra *et al.*, 1989).

Além disso, o uso de anticorpos policlonais pode apresentar reações cruzadas com outros vírus relacionados, diminuindo a precisão do diagnóstico (Cabra *et al.*, 1989).

Por outro lado, os métodos moleculares, baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitem as detecções qualitativa e quantitativa de sequências de ácidos nucleicos, com maiores sensibilidade e especificidade, proporcionando maior precisão do diagnóstico (López *et al.*, 2009). Desenvolvida por Kary Banks Mullis em 1993, o princípio básico da PCR consiste na síntese enzimática de múltiplas cópias de fragmentos de ácidos nucleicos, e apresenta a capacidade de amplificar quantidades mínimas de material genético (Mackay *et al.*, 2002). Uma das limitações desta técnica no diagnóstico de vírus em material vegetal é a necessidade de purificação de RNA para as reações de amplificação (Wetzel *et al.*, 1992; Olmos *et al.*, 1996).

A PCR em tempo real é uma variação desenvolvida a partir das técnicas tradicionais de PCR (Zerbini & Alfenas-Zerbini, 2016). Ao contrário da convencional, em que a detecção do produto amplificado ocorre após a reação, a PCR em tempo real é capaz de detectar e quantificar o produto a cada ciclo de reação, ou seja, de forma simultânea à amplificação do DNA alvo (Zerbini & Alfenas-Zerbini, 2016). Segundo os mesmos autores, isto é possível devido a utilização de fluoróforos, que emitem fluorescência durante o processo de amplificação. Desse modo, a fluorescência é proporcional à quantidade de material amplificado a cada ciclo, o que permite o acompanhamento em tempo real de toda a reação. O SYBR-Green é um dos fluoróforos utilizados nesta técnica, pois possui capacidade de se intercalar com alta afinidade entre qualquer fita dupla de DNA. Outra forma de detectar a fluorescência é com o uso de sondas TaqMan, que são sequências específicas do DNA alvo ligadas a determinados fluoróforos (Zerbini & Alfenas-Zerbini, 2016).

A PCR em tempo real possui diversas aplicações como quantificação da concentração viral e da expressão de genes específicos, genotipagem e detecção de patógenos (Zerbini & Alfenas-Zerbini, 2016). Segundo De Boer & López (2012) possui vantagens com relação a PCR convencional porque é mais sensível e confiável. Por isso, muitos estudos têm desenvolvido primers e sondas TaqMan para possibilitar a detecção de concentrações mínimas do alvo e aumentar a precisão do resultado (Osman, 2006). Além disso, com o uso de sondas TaqMan é possível utilizar diretamente o extrato vegetal sem a necessidade da etapa de purificação do RNA (Capote *et al.*, 2009). Para a detecção do TSV, foi publicado um protocolo de RT-PCR em tempo real com SYBR-Green para amplificar um novo isolado presente em plantas de soja em Oklahoma, EUA (Dutta *et al.*, 2015), porém, não existe nenhum protocolo publicado com o uso de sondas TaqMan.

2.3 Principais insetos-praga associados ao fumo

Patógenos e insetos causam perdas significativas no rendimento e na qualidade do tabaco, desde a produção das mudas no sistema *floating* até a colheita (Seebold *et al.*, 2008). No Brasil existe um número restrito de pragas que são comuns no cultivo do tabaco, incluindo espécies de lepidópteras como a lagarta-rosca, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Noctuidae), *Heliothis virescens* (Fabricius) (Noctuidae) e o marandová-do-fumo, *Manduca* spp. (Sphingidae), este último conhecido por causar danos em lavouras do mundo todo (Guedes & Costa, 2006). Além destas ocorrem a broca-do-fumo, *Faustinus cubae* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae), a larva-aramé, *Conoderus* spp. (Coleoptera: Elateridae), *F. schultzei*, o pulgão verde *M. persicae* e a pulga-do-fumo, *Epitrix* spp., (Coleoptera: Chrysomelidae) (Monteiro *et al.*, 1999; Guedes *et al.*, 2006).

A maioria desses insetos interfere diretamente na produtividade e no crescimento da planta, mas também pode prejudicar a cultura de forma indireta, por serem vetores de vírus importantes do tabaco, como os tripses e pulgões (Seebold *et al.*, 2008). As infestações de afídeos podem iniciar durante a produção de mudas nos canteiros e, por ocasião do transplante, estes são levados para a lavoura (Seebold *et al.*, 2013).

Myzus persicae, conhecido como pulgão verde, é uma espécie polífaga distribuída mundialmente e considerada praga em diversos países que cultivam tabaco (Van Emden *et al.*, 1969; Ramsey *et al.*, 2014). São insetos de corpo pequeno, aproximadamente 2,5 mm de comprimento, caracterizados por possuírem dois processos abdominais alongados, denominados sifúnculos, aparelho bucal do tipo picador sugador e por ocorrerem em colônias na face inferior das folhas e brotos (Van Emden *et al.*, 1969).

Nas regiões produtoras de tabaco, *M. persicae* tem reprodução partenogenética (Van Emden *et al.*, 1969; Salvadori & Salles, 2002), a qual possibilita o rápido aumento de sua população na cultura. Fêmeas aladas são formadas quando o hospedeiro se encontra altamente infestado, possibilitando assim, que migrem em busca de uma nova planta hospedeira (Cividanes & Souza, 2003).

Além de causarem danos diretos devido a sua alimentação, a importância dos pulgões na lavoura de fumo dá-se pelo fato de muitas espécies transmitirem vírus, como (PVY), *Cucumber mosaic virus* (CMV), para os quais *M. persicae* é apontado como o principal vetor. A transmissão é de forma não persistente e ocorre através de picadas de prova (Pulcinelli & Massola, 2016). Assim, o vírus é adquirido em períodos curtos de alimentação e pode ser inoculado imediatamente após ser adquirido, sendo a partícula

viral retida em locais dentro do estilete e do canal alimentar, entretanto, o período durante o qual o vetor permanece virulífero é curto (James & Perry, 2004).

Assim como os pulgões, espécies de tripes são vetores de vírus (Jones, 2005). Estes se caracterizam por apresentar peças bucais incomuns entre os insetos, constituídas de uma única mandíbula (esquerda), dois estiletos maxilares e o labro, formando um aparelho bucal picador-sugador (Lewis, 1973; Mound, 2005). Os tripes são insetos minúsculos, cujos adultos medem de 0,5 a 15 mm de comprimento (Mound & Marullo, 1996). A reprodução em *F. occidentalis* ocorre por partenogênese arrenótoca, em que fêmeas não fertilizadas põe ovos que originam machos enquanto que, as fertilizadas, dão origem a fêmeas (Loomans *et al.*, 1995). Já foram descritas como vetores de TSV os tisanópteros, *F. occidentalis*, *F. schultzei*, *T. tabaci* e *M. abdominalis* (Jones, 2005).

Espécies do gênero *Frankliniella* podem colonizar tanto as folhas quanto as flores das plantas Mound & Teulon (1995). Ninfas de primeiro ínstar são pequenas e brancas, iniciando a alimentação logo após a eclosão. Segundo Lopes & Alves (2000), a partir do segundo ínstar possuem coloração amarelada e, geralmente, apresentam a porção intestinal esverdeada, em função da alimentação constante na folha, este é o ínstar que provoca danos mais significativos, representados por manchas deprimidas e prateadas no limbo foliar, que reduzem a capacidade fotossintética da folha. O tempo de desenvolvimento médio para a espécie, da eclosão das primeiras ninfas até a emergência dos primeiros adultos, foi em torno de nove dias para Lopes & Alves (2000) utilizando plantas de feijão-de-porco *Canavalia ensiformis* (L.). A longevidade dos adultos pode alcançar entre 9 e 14 dias, neste período as fêmeas podem colocar, em média, 9,5 ovos (Gaum *et al.*, 1995; Lowry *et al.*, 1992).

2.4 Predadores de tripes e pulgão

Dentre os inimigos naturais de pulgões estão incluídos predadores, patógenos e parasitoides (Bugg *et al.*, 2008). *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera, Aphidiidae) e *Lysuphlebus testaceus* Cresson (Hymenoptera, Aphidiidae) são parasitoides associados às espécies *Aphis gossypii* Glover e *M. persicae* em cultivo de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* L.) (Carvalho *et al.*, 2006). Predadores como *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus), *Scymnus* sp. e *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera, Coccinellidae), *Pseudodorus clavatus* (Fabricius) (Diptera, Syrphidae) e *Chrysoperla* sp., (Neuroptera, Chrysopidae) são comumente associados às espécies de pulgões (Seagraves & Lundgren, 2012).

Os inimigos naturais de tripes podem incluir fungos, nematoides, parasitoides e predadores (Tommasini, 2003). Parasitoides que atacam tripes são pouco conhecidos, sendo citados apenas indivíduos do gênero *Ceraninus* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando *F. occidentalis* e *T. tabaci* (Tommasini, 2003). Em relação aos predadores de tripes, são referidas, geralmente, espécies polífagas de diferentes ordens e famílias como Hemiptera, Anthocoridae e Miridae, Diptera, Syrphidae e Cecidomyiidae, Neuroptera, Chrysopidae, além de Thysanoptera (van Lenteren & Loomans, 1998).

Dentre os predadores em comum de *M. persicae* e *F. occidentalis* estão os percevejos antocorídeos do gênero *Orius* Wolff (Janssen *et al.*, 1998). Espécies de *Orius* são consideradas generalistas e são caracterizadas pelo seu pequeno tamanho, 1,4 a 4 mm (Bueno, 2009). No Brasil, onde estes predadores ainda não são comercializados, diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar sua capacidade de predação frente a diversas presas utilizando diferentes plantas hospedeiras, tendo em vista conhecer sua eficiência como agentes de controle biológico (Funderburk *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Na Europa e nos Estados Unidos da

América, espécies de *Orius* são produzidas e comercializadas desde a década de 1990, para controle de pragas em hortaliças e em cultivos em casas de vegetação, devido ao sucesso destas como agentes de controle biológico (Bueno, 2009).

A oviposição de *Orius* spp. é endofítica em folhas e caules tenros, locais mais protegidos de outros predadores e que proporcionam umidade suficiente para o desenvolvimento dos embriões (Richards & Schmidt, 1996; Bueno, 2009). Geralmente as plantas utilizadas para oviposição têm características semelhantes como, floração anual e ausência de vasos lenhosos, sendo que neste grupo se enquadra a maioria das plantas cultivadas e invasoras (Bueno, 2009). Insetos deste gênero têm o hábito de ficarem em locais escondidos e protegidos e por isso são, geralmente, encontrados entre as pétalas e sépalas das flores e nas axilas das folhas (Silveira *et al.*, 2005).

A espécie Neártica *O. insidiosus* é a mais comum no Brasil, associada a sistemas de cultivo como algodoeiro, milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), soja (*Glycine max* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.) e crisântemo, além de plantas consideradas invasoras como picão preto (*Bidens pilosa* L.), caruru (*Amaranthus* sp.), losna-branca (*P. hysterothorus*), apaga-fogo (*Alternanthera ficoidea* L.) e rubim (*Leonurus sibiricus* L.) (Silveira *et al.*, 2003). Estas plantas servem como refúgio durante o período de entressafra, fornecendo abrigo e alimento através de presas alternativas, pólen e seiva, que *O. insidiosus* e outras espécies utilizam como recursos alimentares para complementar sua dieta (Armer *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2013).

Embora considerado o principal inimigo natural de tripes, muitos trabalhos sobre capacidade de predação e desenvolvimento de *O. insidiosus* foram realizados também com pulgões (Mendes *et al.*, 2003; Costamagna & Landis, 2007; Guedes *et al.*, 2008). De Bortoli & Oliveira (2006) observaram esta espécie predando *A. gossypii* e *M.*

persicae em algodoeiro e *M. persicae* em milho. Costamagna & Landis (2007) registraram em campos de soja, *O. insidiosus* predando *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). Em condições de laboratório, durante a fase ninfal (13 dias), um indivíduo consumiu, em torno de 60 pulgões e, um adulto, aproximadamente 13 pulgões por dia (Mendes *et al.*, 2003). Os autores verificaram que a capacidade de predação de *O. insidiosus* frente ao aumento da densidade de *A. gossypii* foi crescente.

Um adulto de *Orius* pode se alimentar de 5 a 20 tripes por dia, sendo que as fêmeas consomem mais presas que os machos. Para *O. insidiosus* Bueno (2009) registrou consumo médio total de 150 tripes por adulto e uma média de 13 tripes por dia.

O acasalamento nas espécies de *Orius* ocorre logo após os insetos atingirem a fase adulta, e após dois dias inicia-se a oviposição. O desenvolvimento do ovo ao adulto leva cerca de 20 dias em condições de casa-de-vegetação e maior tempo no campo. Sua longevidade é em torno de três a quatro semanas, em que seu desenvolvimento é influenciado principalmente pela temperatura e disponibilidade de alimento (Bueno, 2009). Tanto adultos quanto ninfas de *O. insidiosus* são predadores eficientes e movimentam-se rapidamente a procura de suas presas nas folhas das plantas (Mendes & Bueno, 2001). Os autores observaram o comportamento de *O. insidiosus* predando *F. occidentalis*, em arenas feitas com placas de Petri contendo uma folha de feijão e verificaram que o predador percorria rapidamente toda a folha a procura da presa, mantendo o rostro estendido. Segundo Yan (1997), *Orius majusculus* (Reuter) pode detectar a presa em um raio de 5 cm e assim, orienta suas antenas em direção a mesma, sendo que o contato é feito com toques da antena e do rostro. Guedes *et al.* (2008) observaram que fêmeas de *O. insidiosus* demonstraram certa deficiência visual pois tiveram dificuldade em fixar o estilete no pulgão *A. gossypii* antes de consumi-lo.

Segundo Lattin (1999), os percevejos do gênero *Orius* utilizam estímulos químicos para auxiliar na localização de suas presas.

2.5 Comunicação interespecífica predador-presa

A comunicação entre insetos de diferentes espécies ocorre de diversas maneiras, sendo a química a principal, a qual é mediada por semioquímicos, ou seja, substâncias químicas voláteis que ativam no indivíduo receptor estímulos fisiológicos, e conseqüentemente, reações comportamentais específicas (Zarbin *et al.*, 2009).

Através da recepção e emissão de sinais químicos os insetos desempenham suas funções ecológicas no ambiente, desse modo encontram parceiros para acasalamento, alimento, têm reações de defesa contra inimigos e escolhem locais para oviposição (Arimura *et al.*, 2005). Quando a comunicação é intraespecífica os semioquímicos são chamados de feromônios, e de aleloquímicos quando atuam nas interações interespecíficas (Zarbin *et al.*, 2009). Os aleloquímicos que beneficiam o indivíduo receptor são chamados de cairomônios (Arimura *et al.*, 2005).

A herbivoria gera na planta ativação de genes que estão envolvidos na biossíntese de fitormônios e de metabólitos secundários da planta, relacionados a mecanismos de defesa indiretos (Arimura *et al.*, 2005). Desse modo, a planta emite aleloquímicos que podem afetar a alimentação, desenvolvimento e oviposição da espécie fitófaga, atrair seus predadores e parasitoides e sinalizar às plantas vizinhas a herbivoria (Halitschke *et al.*, 2000). Assim, a alimentação de herbívoros desencadeia a produção destes compostos através de indutores específicos, como os grupos conjugados de ácidos graxos e aminoácidos conhecidos na saliva de insetos mastigadores. Estes, por sua vez, ativam rotas de sinalização de genes, mediados pelo ácido salicílico e metil jasmonato, envolvidos na defesa. Os indutores de insetos

sugadores, por sua vez, ainda não foram elucidados (Kessler & Baldwin, 2001; Wu & Baldwin, 2010).

Existem duas principais rotas metabólicas envolvidas na ativação de mecanismo de defesa, uma delas é mediada pelo composto fenólico ácido salicílico, o qual é geralmente associado com insetos fitossuccívoros, como os afídeos (Walling, 2000). A outra é a rota do ácido jasmônico associada à alimentação de insetos mastigadores. Portanto, a ativação de uma determinada rota vai depender do tipo de herbívoro, do tipo e da extensão do dano causado (Walling, 2000). Assim, a emissão de aleloquímicos pelas plantas constitui um dos mecanismos de defesa ativados pela herbivoria (Walling, 2000).

A busca dos insetos entomófagos por alimento no ambiente depende da detecção dos compostos orgânicos voláteis liberados por plantas danificadas, ou mesmo dos produtos provenientes das suas presas (Stepanycheva *et al.*, 2014). Espécies de *Anthocoris* e *Orius* são capazes de detectar os voláteis emitidos por plantas atuando como cairomônios de localização de presas (Van Laerhoven *et al.*, 2000). Os efeitos de salicilato de metila e metil jasmonato foram observados em *O. laevigatus* por Stapanicheva *et al.* (2014) em olfatômetro, utilizando filtros de cigarro impregnados com as substâncias. Os autores constataram uma resposta positiva e significativa aos dois compostos, entretanto, em altas doses estas tiveram efeito repelente. Os mesmos autores sugeriram que outras espécies de *Orius* podem, da mesma maneira, responder a estes compostos. *Orius insidiosus* e *Orius sauteri* (Poppius) responderam ao estímulo de plantas danificadas pela alimentação de *F. occidentalis* e de *Thrips palmi* Karny, respectivamente (Mochizuki & Yano, 2007; Carvalho *et al.*, 2010).

Em plantas de *Nicotiana sylvestris* Speg et Comes (Solanaceae) a resposta à herbivoria é caracterizada pelo aumento da concentração de nicotina que resulta,

principalmente, da elevação da síntese que em grande parte ocorre nas raízes (Baldwin, 1996). Em espécies de *Nicotiana*, como *N. attenuata* (Torrey ex. Watson), além da nicotina, a aplicação de metil jasmonato também pode aumentar a produção de outros compostos defensivos tais como inibidores de proteinase (IPs) e polifenóis oxidases (Heath *et al.*, 1997). Assim como o metil jasmonato, concentrações de ácido salicílico aumentaram com o ataque de fitossuccívoros *Tupiocoris notatus* (Distant) (Hemiptera: Miridae) e do afídeo *Myzus nicotianae* Blackman em plantas de *N. attenuata* (Heidel & Baldwin, 2004). O parasitoide *Cardiochiles negriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) foi mais atraído para plantas de tabaco infestadas com seu hospedeiro, *H. virescens*, do que para plantas não infestadas (De Moraes & Mescher, 2004).

As respostas e o comportamento de forrageamento de inimigos naturais, que são influenciados pelos compostos químicos complexos emitidos por diferentes espécies de plantas infestadas por herbívoros, são importantes para compreender as interações plantas-herbívoros-inimigos naturais (De Moraes & Mescher, 2004; Gebreziher & Nakamuta, 2016).

2.6 Referências Bibliográficas

ABTAHI, F. S.; HABIBI, M. K. Host range and some characterization of *Tobacco streak virus* isolated from lettuce in Iran. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 23, p. 4260-4264, 2008.

AFUBRA - ASSOCIAÇÃO DOS FUMICULTORES DO BRASIL. [Dados disponíveis na página]. [2017]. Disponível em: <<http://www.afubra.com.br>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Biological and molecular characterization of an isolate of Tobacco streak virus obtained from soybean in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n.4, p. 366-373, 2005.

ALMEIDA, G. E.G. **Fumo**: servidão moderna e violações de direitos humanos. Curitiba: Terra de Direitos, 2005.

ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n.2, p. 91–111, 2005.

ARMER, C. A.; WIEDENMANN, R. N.; BUSH, D. R. Plant feeding site selection on soybean by the facultatively phytophagous predator *Orius insidiosus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 86, n. 2, p. 109–118, 1998.

BALDWIN, I. T. Methyl jasmonate-induced nicotine production in *Nicotiana attenuata*: inducing defenses in the field without wounding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 80, p. 213-220, 1996.

BHAT, A. I. et al. Serological and coat protein sequence studies suggest that necrosis disease on sunflower in India is caused by a strain of Tobacco streak ilarvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 3, p. 651–658, 2002.

BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. 430 p.

BUGG, R. L. et al. **Flower flies (Syrphidae) and other biological control agents for aphids in vegetable crops**. Oakland, CA: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 2008. (ANR Publication, n. 8285).

CALIXTO, A. M. et al. Effect of different diets on reproduction, longevity and predation capacity of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1245-1255, 2013.

CAMBRA, M. et al. Immunology and immunological assays applied to the detection. Diagnosis and control of fruit tree viruses. In: HADIDI, A. et al. (Ed). **Virus and virus-like disease of pome and stone fruits**. Minnesota: APS, 2011. p. 303-310.

CAMBRA, M. et al. Distinction of populations infected with severe and common strains of *Citrus tristeza virus* in Spain, by ELISA-DASc (quantitative). **Fruits**, Paris, v. 44, p. 335–341, 1989.

CAPOTE, N. et al. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, Madrid, v. 12, p. 1-6, 2009.

CARVALHO, L. M.; BUENO, V. H. P.; CASTAÑE, C. Olfactory response towards its prey *Frankliniella occidentalis* of wild and laboratory-reared *Orius insidiosus* and *Orius laevigatus*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 135, n. 3, p. 177-183, 2010.

CARVALHO, L. M.; BUENO, V. H. P.; MENDES, S. M. Ocorrência e flutuação populacional de tripes, pulgões e inimigos naturais em crisântemo de corte em casa de vegetação. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.1, p.139-146, 2006.

CARVALHO, C. B. **Relação socioeconômica dos fumicultores-fumageiras da região de Sombrio, SC e uma proposta de transição agroecológica**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CIVIDANES, F. J.; SOUZA, V.P. Exigências térmicas e tabelas de vida de fertilidade de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 413-419, 2003.

COSTA, A. S. Moléstias de vírus do fumo no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v.4, p. 710-738, 1945.

COSTAMAGNA, A. C. C.; LANDIS, D. A. Quantifying predation on soybean aphid through direct field observations. **Biological Control**, Orlando, v. 42, n. 1, p. 16–24, 2007.

DE BOER, S. H.; LOPEZ, M. M. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 197–218, 2012.

DE BORTOLI, S. A.; OLIVEIRA, J. E. M. Densidade populacional e comportamento de predação de *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae) em agroecossistemas de algodoeiro e milho. **Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas**, Madrid, v.32, n.4, p.465-471, 2006.

DE MORAES, M. C.; MESCHER, M. C. Biochemical crypsis in the avoidance of natural enemies by an insect herbivore. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 24, p. 8993-8997, 2004.

DUTTA, M.; ALIB, A.; MELCHERA, U. Detection, discrimination and discovery of a new Tobacco streak virus strain. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 221, p. 15–21, 2015.

FERNANDEZ, M. S. **Da diversificação à especialização: origem e evolução dos sistemas produtivos de tabaco em Sobradinho/RS**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FUNDERBURK, J.; STAVISKY, J. J.; OLSON, S. Predation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in field peppers by *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 29, n. 2, p. 376-382. 2000.

GAUM, W. G.; GILIOMEE, J.H.; PRINGLE, K.L. Life history and life tables of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), on English cucumbers. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 84, n.2, p. 219-224, 1994.

GEBREZIHER, H. G.; NAKAMUTA, K. Responses of a predatory bug to a mixture of herbivore-induced plant volatiles from multiple plant species. **Arthropod-Plant Interactions**, Helsinki, v.10, n.5, p. 429-444, 2016.

GHANEKAR, A.M.; SCHWENK, F.W. Seed transmission of *Tobacco streak virus* in six cultivars of soybeans. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 112–114, 1974.

GREBER, R. S. Some characteristics of *Tobacco streak virus* isolates from Queensland. **Queensland Journal of Agriculture and Animal Sciences**, Brisbane, v. 28, p. 105-114, 1971.

GREBER, R. S.; KLOSE, M. J.; TEALKE, D. S. High incidence of *Tobacco streak virus* in tobacco and its transmission by *Microcephalothris abdominalis* and pollen from *Agerantum houstonianum*. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 75, p. 450-452, 1991.

GUEDES, I. V. et al. Aspectos biológicos de fêmeas adultas de *Orius insidiosus* (SAY, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae) alimentadas com diferentes densidades de *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (Hemiptera: Aphididae). **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p. 34-40, 2008.

GUEDES, J. V. C.; COSTA, I. F. D. **Pragas e doenças da cultura do fumo**. Santa Maria: Orium, 2006. 88 p.

HALITSCHKE, R. et al. Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. **Oecologia**, Berlin, v. 124, n. 3, p. 408-417, 2000.

HEATH, R. L. Proteinase inhibitors from *Nicotiana alata* enhance plant resistance to insect pests. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, n. 9, p. 833–842, 1997.

HEEMAN, F. **O cultivo do fumo e condições de saúde e segurança dos trabalhadores rurais**. 2009. 170 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

HEIDEL, A. J.; BALDWIN, I. T. Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.27, n. 11, p. 1362–1373, 2004.

JAMES, C. K. N. G.; PERRY, L. K. Transmission of plant viruses by aphid vectors **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.5, n.5, p. 505-511, 2004.

JANSSEN, A. et al. Behaviour and indirect interactions in food webs of plant-inhabiting arthropods. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 22, n. 9, p. 497-521, 1998.

JONES, D. R. Major review: plant viruses transmitted by thrips. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.113, n. 2, p. 119–157, 2005.

KAISER, J. W.; WYATT, S. D.; PESHO, G. R. Natural hosts and vectors of *Tobacco streak virus* in Eastern Washington. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1508-1512, 1982.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, Washington, v. 291, n. 5511, p. 2141- 2144, 2001.

- KLOSE, M. J. et al. Transmission of the strains of *Tobacco streak virus Ilarvirus* by different thrips species using virus-infected pollen. **Journal of phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 6, p. 281-284, 1996.
- LATTIN, J. D. Bionomics of the Anthocoridae. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 207–231, 1999.
- LEVY, A.; ZHENG, J. Y.; LAZAROWITZ, S. G. The tobamovirus turnip vein clearing virus 30-kilodalton movement protein localizes to novel nuclear filaments to enhance virus infection. **Journal of Virology**, Berlin, v. 87, n. 11, p. 6428–6440, 2013.
- LEWIS, T. **Thrips: their biology, ecology, and economic importance**. London: Academic Press, 1973. 349 p.
- LIMA, T.; VIANA, F. Streak. In: JACK, A.; FISHER, C. (Ed.). **Field guide to integrated pest management**. Paris: Coresta, 2015. p. 50-52.
- LOOMANS, A. J. M.; VAN LENTEREN, J. C.; TOMASINI, M. G. **Biological control of thrips pests**. Wageningen: Agricultural University Papers, 1995. 201 p.
- LOPES, R. B.; ALVES, S. B. Criação e observações preliminares da biologia de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) em Feijão-de-Porco *Canavalia ensiformis* (L.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n.1, p. 39-47, 2000.
- LÓPEZ, M. M. et al. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, Wyomndham, v. 11, n.1, p. 13-46, 2009.
- LOWRY, V.K.J.W.; SMITH, J.R.; MITCHELL, F.L. Life-fertility tables for *F. fusca* (Hinds) and *F. occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) on peanut. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 85, n. 6, p. 744–754, 1992.
- MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Survey and summary real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 1292–1305, 2002.
- MENDES, S. M.; BUENO, H. P. Biologia de *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) alimentado com *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Thysanoptera: Thripidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 423-428, 2001.
- MENDES, S. M. et al. Efeito da densidade de ninfas de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera, Aphididae) no consumo alimentar e aspectos biológicos de *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera, Anthocoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 19-24, 2003.
- MOCHIZUKI, M.; YANO, E. Olfactory response of the anthocorid predatory bug *Orius sauteri* to thrips-infested eggplants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 123, n. 1, p. 57-62, 2007.

MONTEIRO, R. C.; MOUND, L. A.; ZUCCHI, R. A. Thrips (Thysanoptera) as pests of plant production in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 43, n. 3-4, p. 163-171, 1999.

MOUND, L. A.; MARULLO, R. The thrips of Central and South America: an introduction (Thysanoptera: Thripidae). **Memoirs on Entomology International**, Gainesville, v. 6, p.1-487, 1996.

MOUND, L. A.; TEULON, D. A. Thysanoptera as phytophagous opportunist. In: PARKER, B. L. (Ed.). **Thrips biology and management**. Londres: Plenum Press, 1995. p. 3-20.

MOUND, L. A. Thysanoptera: diversity and interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, n.1, p.247-269, 2005.

MUMFORD, R. A.; BARKER, I.; WOOD, K R. The biology of the tospoviruses. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 128, n.1, p. 159-183, 1996.

OLIVEIRA, F.; COSTA, M. C. F. **Dossiê técnico: cultivo de fumo (*Nicotiana tabacum* L.)**. São Paulo: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2012. 23 p.

OLIVEIRA, J. E. et al. Capacidade predatória de *Orius insidiosus* predando *Aphis gossypii* sob o efeito da temperatura e variação da umidade relativa e fotoperíodo. **Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas**, Madrid, v. 34, n. 3, p. 319-327, 2008.

OLMOS, A. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 12192-12193, 1996.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam. v. 133, n. 2, p. 130–136, 2006.

PALLAS, V. et al. Ilarviruses of *Prunus* spp.: review: a continued concern for fruit trees. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 12, p. 1108-1120, 2012.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. **Prognóstico fumo**. Curitiba, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/Fumo_2017_18.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2018.

PRASADA RAO, R. D. V. J. et al. The host range of *Tobacco streak virus* in India and transmission by thrips. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 142, p. 365-368, 2003.

PULCCINELLI, C.E.; MASSOLA, N.S. Doenças do fumo. In: AMORIN, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2016. p. 413-432.

RADBEOUX, P. F. Seasonal progression and agronomic impact of *Tobacco streak virus* on soybean in Wisconsin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 4, p. 391-396, 2005.

RAMSEY, J. S. Adaptation to nicotine feeding in *Myzus persicae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 40, n. 8, p. 869-877, 2014.

REDDY, A. S. Occurrence of *Tobacco streak virus* on peanut (*Arachis hypogea*) in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 2, p. 173-178, 2002.

RICHARDS, E. C.; SCHMIDT, J. M. The suitability of some natural and artificial substrates as oviposition sites for the insidious flower bug, *Orius insidiosus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 80, n. 2, p. 325-333, 1996.

SALVADORI, J.R.; SALLES, L.A.B. Controle biológico dos pulgões do trigo. In: PARRA, J.R.P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 54-63.

SDOODE R.; TEAKLE, D. S. Studies on the mechanism of transmission of pollen-associated *Tobacco streak ilarvirus* virus by *Thrips tabaci*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, n.1, p. 88-92, 1993.

SEAGRAVES, M. P.; LUNDGREN, J. G. Effects of neonicotinoid seed treatments on soybean aphid and its natural enemies. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 85, n.1, p. 125-132, 2012.

SEEBOLD, K. W. et al. **2013-2014 Kentucky & Tennessee tobacco production guide**. 2013. Disponível em: <https://uknowledge.uky.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1073&context=anr_reports>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SEEBOLD, K.; GREEN, J.D.; TOWNSEND, L. Insect control. In: SEEBOLD, K.; PALMER, G. (Ed.). **2007 Kentucky tobacco production guide**. Lexington: University of Kentucky Cooperative Extension Service Publications, 2008. p. 30-37.

SHARMAN, M.; THOMAS, J. E.; PERSLEY, D. M. Distribution in Australia and seed transmission of *Tobacco streak virus* in *Parthenium hysterophorus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 7, p. 708-712, 2009.

SHARMAN, M.; THOMAS, J. E.; PERSLEY, D. M. Natural host range, thrips and seed transmission of distinct *Tobacco streak virus* strains in Queensland, Australia. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 167, n. 2, p. 197-207, 2015.

SHARMAN, M.; THOMAS, J. E.; PERSLEY, D. M. First report of *Tobacco streak virus* in sunflower (*Helianthus annuus*), cotton (*Gossypium hirsutum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and mung bean (*Vigna radiata*) in Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 3, p. 27-29, 2008.

SILVEIRA, L. C. P. et al. Percevejos predadores (*Orius* spp.) (Hemiptera: Anthocoridae) e Tripes (Thysanoptera): interação no mesmo habitat? **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n.5, p. 767-773, 2005.

SILVEIRA, L. C. P. et al. Plantas cultivadas e invasoras como habitat para predadores do gênero *Orius* (Wolff) (Heteroptera: Anthocoridae). **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 261-265, 2003.

SILVEIRA, L. C.P.; BUENO, V. H. P.; VAN LENTEREN, J. C. *Orius insidiosus* as biological control agent of thrips in greenhouse chrysanthemums in the tropics. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 57, n. 2, p. 103-109, 2004.

SOARES, E. L. C. et al. A família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 177-188, 2008.

STEPANYCHEVA, E. A. et al. The behavioral response of the predatory bug *Orius laevigatus* Fieber (Heteroptera, Anthocoridae) to synthetic volatiles. **Entomological Review**, Washington, v. 94, n. 8, p. 1053–1058, 2014.

TOMMASINI, M. G. **Evaluation of *Orius* species for biological control of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)**. 2003. 215 f. Thesis (Ph.D.) - Wageningen University, Wageningen, 2003.

UNTIVEROS, M.; PEREZ-EGUSQUIZA, Z.; CLOVER, G. PCR assays for the detection of members of the genus *Ilarvirus* and family *Bromoviridae*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 97–104, 2010.

VAN EMDEN, H.F. et al. The ecology of *Myzus persicae*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 14, p. 197-270, 1969.

VAN LAERHOVEN, S.; GILLESPIE, D. R.; MCGREGOR, R. R. Leaf damage and prey type determine search effort in *Orius tristicolor*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n. 2, p. 167-174, 2000.

VAN LENTEREN, J. C.; LOOMANS, A. J. M. **Is there a natural enemy good enough for biological control of thrips?** In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE: PESTS AND DISEASES, 2., 1998, Brighton. **Proceedings...** Brighton: BCPC, 1998. p. 401-408.

VEMANA K.; JAIN, R. K. New experimental hosts of *Tobacco streak virus* and absence of true seed transmission in leguminous hosts. **Indian Journal of Virology**, Hisar, v. 21, n. 2, p. 117–127, 2010.

WALLING, L. L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, n. 2, p. 195-216, 2000.

WALTER, M.H.; WYATT, S. D.; KAISER, W. J. Comparison of the RNAs and some physiochemical properties of the seed transmitted *Tobacco streak virus* isolate Mel 40 and the infrequently seed-transmitted isolate Mel. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n.11, p. 1394-1399, 1995.

WETZEL, T. et al. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 21-37, 1992.

XU, X.; BORGEMEISTER, C. A.; POEHLING, H. M. Interactions in the biological control of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and two-spotted

spider mite *Tetranychus urticae* Koch by the predatory bug *Orius insidiosus* Say on beans. **Biological Control**, Orlando, v. 36, n. 1, p. 57-64, 2006.

YAN, H. **Apprentissage et prédation chez *Orius majusculus* (Reuter) (Heteroptera: Anthocoridae)** "Approche comportementale". 1997. 160 f. These (Doctorat) - Université Paul Sabatier de Toulouse, Toulouse, 1997.

ZARBIN, P.H.G. et al. Alarm pheromone system of stink bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 424-428, 2009.

ZERBINI, F.M.; ALFENAS-ZERBINI, P. Métodos em virologia vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). 2. ed. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016. Cap. 12, p. 297-353.

3 CAPÍTULO 1

**Detecção de *Tobacco streak virus* em *Nicotiana tabacum* e tripes vetores
através de RT-PCR em tempo real**

3.1 Introdução

O *Tobacco streak virus* (TSV) pertence ao gênero *Ilarvirus* que engloba, na sua maioria, espécies conhecidas por infectar árvores frutíferas de importância econômica. O TSV é uma das poucas espécies deste gênero, que também infecta plantas herbáceas (Untiveros *et al.*, 2010). Este vírus, descrito no Brasil na década de 1940, em plantas de tabaco (Costa, 1945), possui ampla gama de hospedeiros e está presente nos cinco continentes (EPPO, 2017). Sua ocorrência em plantas cultivadas como fumo, soja, algodão, girassol e também em daninhas é conhecida em muitos países (Sharman *et al.*, 2015). No Brasil o TSV foi relatado em plantas de soja e de fumo nas regiões Sul e Sudeste (Lourenção *et al.*, 1989; Greber *et al.*, 1991). O histórico da incidência do TSV concentrada nos estados do Paraná e de São Paulo é atribuído à presença natural de hospedeiros perenes ou semi-perenes do vírus, além de espécies de tripes vetores (Almeida, 2008).

Isolados de TSV apresentam variabilidade em relação à gama de hospedeiros, relação sorológica e sequência genômica relacionada a diferentes hospedeiros e regiões geográficas (Sharman & Thomas, 2013). Além disso, segundo os autores, isolados de um mesmo hospedeiro e de regiões geográficas próximas podem diferir geneticamente.

O TSV é transmitido por pólen de maneira natural e por vetores. A transmissão através do pólen infectado foi confirmada em muitos estudos que relataram espécies de tisanópteros como vetores (Sdoode & Teakle, 1987; Prasada Rao *et al.*, 2003; Sharman *et al.*, 2015). Segundo esses autores, entre plantas de espécies diferentes, os tripes são vetores do pólen infectado, que é carregado em seu corpo e, através das feridas causadas durante o processo de alimentação ocorre a transmissão às plantas sadias.

Em plantas de fumo o TSV causa a doença conhecida como necrose branca, que provoca danos ao cultivo e grandes prejuízos ao produtor. Os sintomas desta doença são

manchas necróticas angulares que seguem um padrão ao redor das nervuras, afilamento e estreitamento foliares (Pulccini & Massolla, 2016). Os sintomas de necrose podem ser confundidos a campo com outras viroses que também causam esse padrão de sintoma (Lima & Viana, 2015). Portanto, métodos de detecção são de fundamental importância para um diagnóstico correto entre estas viroses.

A detecção do TSV é baseada em métodos sorológicos e moleculares. Anticorpos policlonais estão disponíveis comercialmente e são utilizados por meio da técnica ELISA para a detecção do TSV em plantas de soja (Rabedeaux *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2005; Sharman *et al.*, 2009). Porém, esta técnica apresenta baixa sensibilidade e em alguns casos pode produzir reações cruzadas com outros vírus. A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e em tempo real com o uso de SYBR-Green também tem sido utilizada para a identificação do TSV (Almeida *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2013), possibilitando a detecção do vírus com maior especificidade e sensibilidade. No entanto, para evitar a interferência de inibidores vegetais na reação da PCR é necessária a purificação do RNA do material vegetal, porém essa etapa pode ser cara, laboriosa e demorada e também pode aumentar o risco de contaminação entre amostras (Olmos *et al.*, 1996; López *et al.*, 2009; Teresani *et al.*, 2014). Contudo, estudos evidenciaram a possibilidade de utilizar diretamente extratos de amostras em reações de RT-PCR em tempo real com o uso de sondas TaqMan (Osman & Rowhani, 2006; Bertolini *et al.*, 2008; Capote *et al.*, 2009).

Assim, este trabalho objetivou desenvolver protocolo de preparação de amostras sem a etapa de purificação de RNA e desenhar iniciadores e sonda TaqMan para detecção do TSV em plantas de tabaco e em tripes vetores por RT-PCR em tempo real.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta de material

As observações e coletas de material foram realizadas em quatro propriedades de produtores atendidos pela empresa Souza Cruz Ltda, localizadas na região de Ivaí (24°50'53" S; 50°49'53" O), Paraná e que possuem histórico de ocorrência da doença. As áreas de coleta foram identificadas numericamente, tendo a propriedade 1, área cultivada de 5,2 ha com a cultivar CSC 4704; a 2, de 7,2 ha cultivada com CSC 439 e 497; a 3, de 7,0 ha cultivada com CSC 447 e a propriedade 4, de 5,7 ha com a cultivar CSC 439.

Foram coletadas três ou quatro folhas, de no mínimo cinco plantas de tabaco, que apresentavam sintomas associados ao TSV (necroses e/ou estreitamento foliar) ou com outras manchas necróticas semelhantes à doença, em cada lavoura. No total foram coletadas amostras de 35 plantas. As coletas foram realizadas em novembro de 2017, aproximadamente 90 dias após o plantio. Todo o material vegetal foi mantido em pacotes de papel pardo acondicionados em câmara fria, a aproximadamente 5 °C, até ser processado.

Foram coletados tripes em plantas de tabaco que apresentavam sintomas de manchas necróticas angulares em linhas laterais da lavoura, próximas a vegetação herbácea e ervas daninhas. Com auxílio de um pincel, foram coletados de 50 a 60 tripes por lavoura, e armazenados em álcool 70% em tubos Eppendorf de 1,5 ml, devidamente identificados de acordo com o local de coleta. Para análise por RT-PCR em tempo-real, foram utilizadas duas amostras de tripes identificadas como A e B coletadas nas áreas 2 e 4, respectivamente.

Para a análise da prevalência de sintomas, que poderiam estar associados ao TSV, as plantas foram avaliadas visualmente, realizando-se caminhamento em

zigzague; 30 plantas entre duas linhas das laterais e entre as linhas centrais da lavoura, anotando-se presença ou ausência de determinado sintoma. Os sintomas avaliados foram: i) presença de manchas necróticas angulares associadas às nervuras, ii) manchas arredondadas que coalescem entre as nervuras, iii) necroses avermelhadas entre as nervuras e iv) folhas afiladas. Foram avaliadas no total 150 plantas em cada uma das quatro lavouras prospectadas.

3.2.2 Preparo das amostras

Os extratos vegetais foram obtidos a partir de 1,5 a 2,0 g de tecido foliar de cada amostra macerados em bolsas plásticas na presença de tampão de extração [PBS buffer (pH 7,2) + 2% polivinil-pirrolidona (PVP) e 0,2% dietil ditiocarbamato de sódio (DIECA)] na proporção de 1 peso em 20 volumes (1P:20V). Alíquotas de 1,5 ml foram transferidas para tubos Eppendorf e armazenadas a -20 °C. Todas as preparações de amostras e as análises foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade e no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura, localizados na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Diluições seriadas (1:10 a 1:10⁶ v/v) do extrato vegetal de uma amostra TSV-positiva foram preparadas em tampão PBS. As diluições foram analisadas diretamente por ELISA e, logo após, a purificação de RNA, por RT-PCR em tempo real com SYBR-Green e com sonda TaqMan, para posterior comparação da sensibilidade entre os métodos.

A purificação de RNA de todas as amostras vegetais e das diluições foi realizada utilizando-se o kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega), seguindo protocolo proposto pelo fabricante, a partir de 100 µl das diluições seriadas e do extrato

vegetal obtido previamente e conservados a -20 °C. RNA purificado de uma amostra de campo mostrando os sintomas típicos causados pelo TSV foi utilizado como controle positivo nas reações de RT-PCR em tempo real.

Quinze tripes de cada uma das amostras A e B foram separados para serem usados na RT-PCR em tempo real. De cada amostra, foram realizadas as seguintes análises: dez tripes de maneira individual, um grupo com cinco tripes e uma análise com o lavado dos tripes. Tendo em vista que os tripes carregam partículas de pólen no corpo, insetos foram lavados no álcool 70% onde estavam armazenados que foi centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 50 µl de PBS. Os tripes, individuais ou em grupos de cinco, foram esmagados em tubos Eppendorf com auxílio de ponteira de pipeta, em presença de tampão PBS. Assim, os insetos e o lavado foram analisados por RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan para detecção do TSV.

3.2.3 Detecção por ELISA

Para a realização dos ensaios ELISA foram utilizados anticorpos policlonais comerciais (SRA 25500/1000 AGDIA, IN-EUA) seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante. Os anticorpos de revestimento e o conjugado foram utilizados em uma diluição 1:1.000 em volume de 100 µl. Controles positivos e negativos foram utilizados em cada teste. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

3.2.4 Desenho de iniciadores e sonda TaqMan

Para o desenho dos iniciadores e da sonda TaqMan, realizado com o auxílio dos softwares BLAST 2.0 e Geneious, as seguintes sequências de nucleotídeos de isolados de referência do TSV disponíveis na base de dados GenBank foram utilizadas para comparação: AY354406 (soja), FJ403377.1 (soja), FJ655169.1 (tagetes), FJ655171.1

(feijão-de-corda), JX073658.1 (tabaco), JX463339. (verbesina) e KX523132.1 (algodão). A região conservada da sequência da proteína do capsídeo (CP) do isolado de TSV de soja (AY354406) foi utilizada para o desenho dos iniciadores e da sonda com o uso do programa Primer Express, seguindo a metodologia descrita por Olmos *et al.* (2005).

Para avaliar a especificidade, os iniciadores e a sonda TaqMan foram testados com isolados de TSV de fumo e de soja de plantas coletadas no Paraná e com espécies de vírus do gênero *Ilarvirus* [*Apple mosaic virus* (ApMV) e *Prune dwarf virus* (PDV)] e com outros isolados que tem o tabaco como hospedeiro: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), *Lettuce mosaic virus* (LMV), , *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV), *Banana bract mosaic virus* (BBMV), *Peanut stunt virus* (PSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV).

3.2.5 Reações de RT-PCR em tempo real

A RT-PCR em tempo real com SYBR-Green seguiu as recomendações de Dutta *et al.* (2015). As reações foram realizadas utilizando o Máster Mix Go-Taq 1-Step RT-qPCR System (Promega) em volume final de 20 µl. Os componentes e suas quantidades do coquetel de RT-PCR foram: 10,0 µl de 2x Master Mix, 0,4 µl de 50x RT-Mix, 0,4 µl do iniciador TSV1789Fnd (25 µM), 0,4 µl do iniciador TSV1982Rnd (25 µM), 0,2 µl ROX e 4 µl de amostra. As amplificações foram realizadas no termociclador “7300 - Real time PCR System” (Thermo Fisher) nas seguintes condições: 1 ciclo a 37 °C por 15 minutos e 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 60 °C

por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos. Após a amplificação as amostras foram submetidas à análise da curva de *melting* com temperaturas entre 60 e 95 °C. Controles positivos e negativos foram utilizados em cada reação e cada amostra foi analisada em duplicata.

Para as reações de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan as reações foram realizadas utilizando o Kit Master Mix GoTaq® Probe 1- Step RT-qPCR System (Promega) em volume final de 20 µl. Os componentes e suas quantidades nas reações foram: 10 µl de 2x Master Mix, 0,4 µl 50x RT-Mix, 0,4 µl de cada iniciador F (25 µM) e iniciador R (25 µM), 0,3 µl sonda (5 µM), 0,2 µl ROX e 4 µl de amostra. As condições das reações foram: 1 ciclo de 45 °C por 15 minutos e 95 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 45 segundos). Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios de amplificação. As leituras da fluorescência foram realizadas utilizando-se o termociclador “7300 - Real time PCR System” (Thermo Fisher) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisadas com o software do mesmo equipamento. O resultado foi expresso em valor de Ct, que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Reações de RT-PCR em tempo real

3.3.1.1 RT-PCR SYBR-Green

Os resultados obtidos pela RT-PCR em tempo real com SYBR-Green utilizando os iniciadores e as condições descritas por Dutta et al. (2015) foram variáveis. A temperatura de *melting* do controle positivo de TSV girou em torno de 82 °C, mas com variações de mais de um 1 °C em diferentes reações. Embora as amostras tenham produzido curvas de amplificação (Figura 1A) a temperatura de *melting* obtida variou de 80 a 85 °C (Figura 1B), impossibilitando uma detecção precisa. Além disso, quando se usaram as diluições de material vegetal sem purificação de RNA, não se produziram curvas de amplificação ou a temperatura de *melting* ficou abaixo de 80 °C.

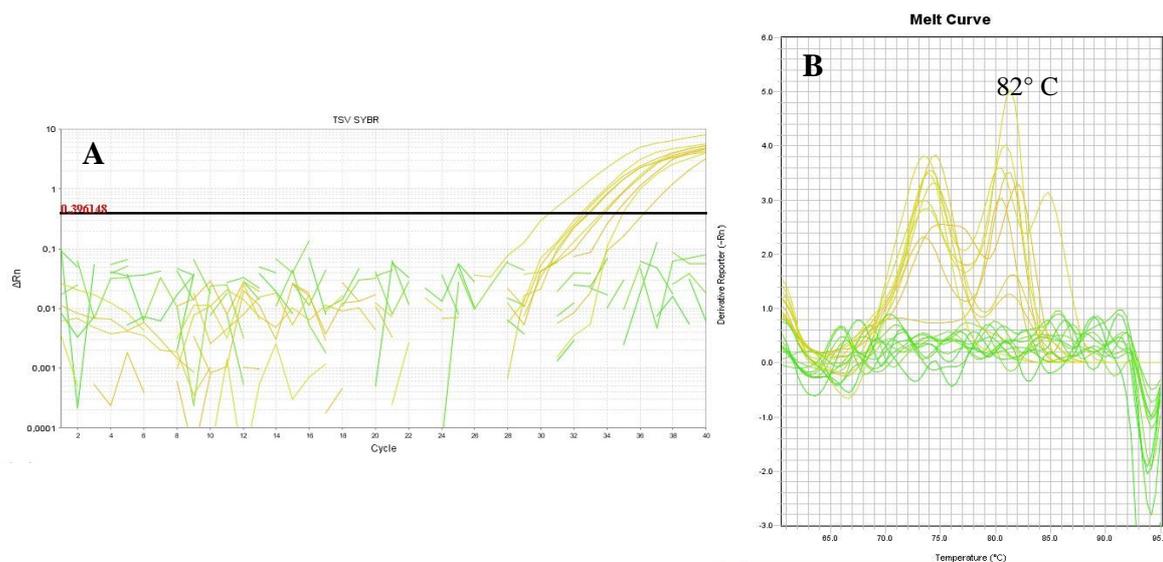


FIGURA 1. Curva de amplificação de RT-PCR em tempo real com SYBR-Green com iniciadores de Dutta *et al.* (2015) (A) e gráfico com temperaturas de *melting* (B) de amostras de RNA purificado de material coletado em Ivaí, Paraná.

3.3.1.2 Iniciadores e sonda TaqMan e condições da RT-PCR em tempo real

A partir do alinhamento das sequências utilizadas para comparação (Figura 2) foram obtidos os iniciadores TSVR (5' -TGCGGCAACTCGGTATCAC -3') e TSVF (5' - CGGATATTGGTTAGCCATATCCA -3') e sonda TaqMan (5'- FAM-CGCCCCCTTAATGCCACCAAGA - 3' BHQ).

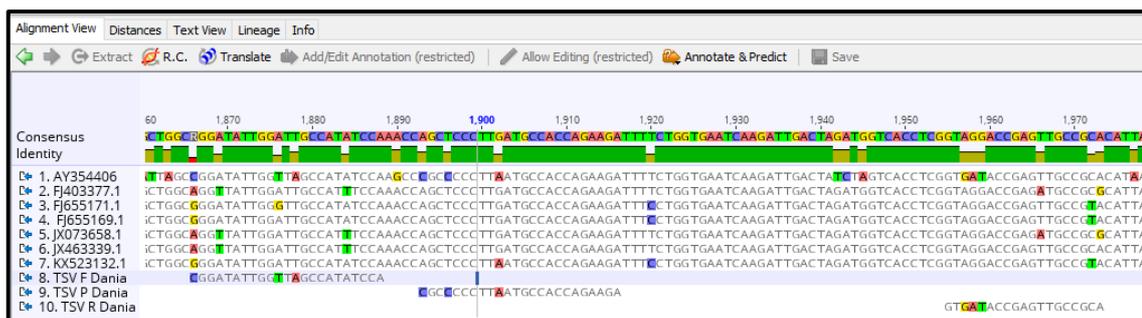


FIGURA 2. Comparação das sequências utilizadas para o desenho de iniciadores e da sonda TaqMan.

A amplificação por RT-PCR em tempo real com os iniciadores e a sonda TaqMan desenhados gerou curvas de amplificação típicas quando testados com RNA de diferentes isolados de TSV. Não foram obtidas amplificações de plantas de tabaco sadias utilizadas como controle negativo, nem com RNA de outros *Ilarvirus* como ApMV e PDV e tampouco com RNA de outros vírus que infectam plantas de tabaco (AMV, BBMV, CMV, PVX, PVY, TMV, ToRSV, TRSV, TSWV, LMV, ACLSV, ASPV, CABMV). Estes resultados demonstram a especificidade do protocolo desenhado, que amplifica um produto de 108 pb específico de TSV.

Os diferentes métodos de preparação do RNA não interferiram na especificidade da RT-PCR. Foram obtidas curvas típicas de amplificação utilizando RNA purificado (Figura 3A), ou utilizando diluições diretas do extrato vegetal sem purificação de RNA (Figura 3B). Também foram obtidas curvas de amplificação com o esmagado de tripes sem purificação de RNA (Figura 3C).

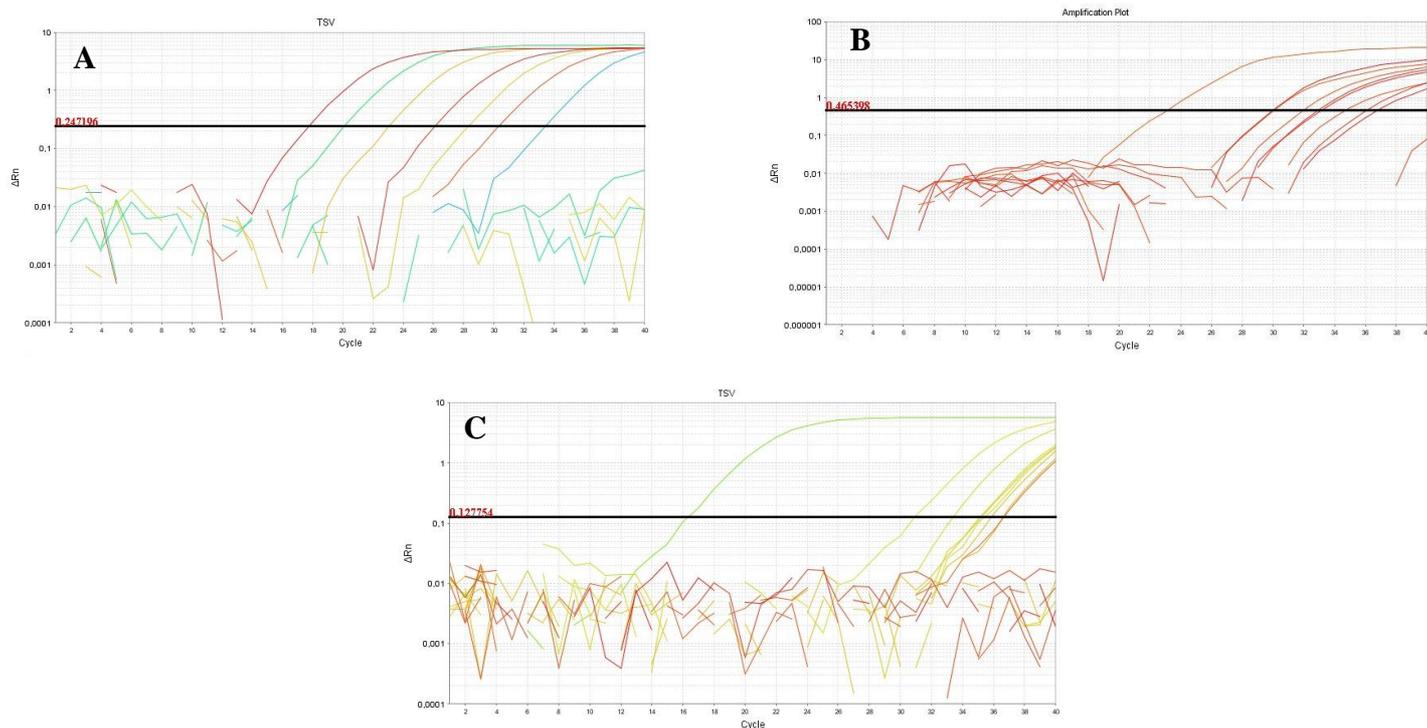


FIGURA 3. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan de amostras com purificação de RNA (A), de diluição do extrato vegetal sem purificação de RNA (B) e com o esmagado de tripes sem purificação de RNA (C).

Apesar da alta variabilidade presente entre diferentes isolados de TSV (Sharman & Thomas, 2013), estudos *in silico* das sequências disponíveis em bases de dados permitiram observar que os isolados de TSV descritos em soja no Brasil possuem alta homologia de sequência na região da proteína capsial (CP) onde foram desenhados os iniciadores. Sendo assim, o protocolo de RT-PCR em tempo real desenhado neste trabalho seria capaz de detectar todos os isolados de TSV identificados no Brasil até o momento. Estudos *in silico* mostraram que isolados da Austrália de TSV-parthenium e de girassol compartilham 99-100% e 98%, respectivamente, de similaridade da sequência do RNA-3 com isolados do TSV-BR de plantas de soja (Sharman *et al.*, 2008; Sharman & Thomas, 2013) e, portanto, a sonda e os iniciadores desenvolvidos poderiam detectar também estes isolados de TSV. Os mesmos autores relataram que, ao contrário do que se verificou no Brasil, existe uma diversidade significativa entre

isolados de TSV presentes no leste da Austrália. Devido a esta variabilidade existente entre diferentes isolados, o protocolo descrito neste trabalho não é um protocolo de detecção universal para todos os isolados do TSV a nível mundial e se recomenda a utilização de outras técnicas de princípio não molecular para confirmação de resultados negativos quando não se conhece a origem e a procedência da amostra.

Outros trabalhos foram desenvolvidos com sonda TaqMan para a detecção de espécies de vírus que apresentam alta variabilidade de sequência entre diferentes isolados. Osman *et al.* (2008) desenharam sonda TaqMan para a detecção de isolados de *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) onde os ensaios desenvolvidos revelaram-se sensíveis, específicos e robustos. Bertolini *et al.* (2010) também desenharam sondas TaqMan para detecção de *Arabis mosaic virus* (ArMV) e *Grapevine fleck virus* (GFkV) e apesar da alta variabilidade existente entre os isolados, a RT-PCR em tempo real foi a que apresentou resultados mais precisos quando comparada com técnicas sorológicas em prospecções realizadas na Espanha.

3.3.2 Comparação de sensibilidade

Houve diferença na sensibilidade de detecção das diferentes técnicas utilizadas (Tabela 1). Através dos ensaios com diluições seriadas foi possível verificar que a RT-PCR em tempo real utilizando sonda TaqMan foi claramente a técnica mais sensível quando comparada ao ELISA e com RT-PCR em tempo real com SYBR-Green, permitindo a detecção do TSV até a diluição 1:10⁵, tanto em amostras de RNA purificado quanto diretamente em diluições dos extratos vegetais. A técnica ELISA foi capaz de detectar a presença do vírus até a diluição 1:100 enquanto a RT-PCR com SYBR-Green até a diluição 1:50 com purificação de RNA e não foi capaz de detectar o vírus em diluições diretas do extrato vegetal Neo presente estudo a RT-PCR em tempo

real com SYBR-Green teve menor sensibilidade que a técnica ELISA, provavelmente devido aos iniciadores não apresentarem 100% de homologia com os isolados de TSV do Brasil, o que diminui a eficiência da reação. Em trabalho publicado por Capote *et al.* (2009) na detecção do *Plum pox virus* (PPV) diluições de extrato vegetal sem purificação de RNA foram amplificadas por RT-PCR em tempo real com o uso do SYBR-Green.

TABELA 1. Comparação da sensibilidade de detecção das técnicas ELISA e RT-PCR em tempo real utilizando SYBR-Green e sonda TaqMan para detecção de *Tobacco streak virus* em diluições seriadas de extrato vegetal e de RNA purificado de planta de tabaco infectada.

Amostra	Diluições	ELISA	RT-PCR tempo real			
			SYBR-Green		TaqMan (Ct) ^a	
		IgG 1:1000	Diluição	RNA	Diluição	RNA
Fumo 2.31	1:10	+	-	+	18.7	16.3
	1:50	+	-	+	21.4	23.9
	1:100	+	-	-	20.9	23.1
	1:500	-	-	-	27.0	30.2
	1:10 ³	-	-	-	24.0	28.8
	1:10 ⁴	-	-	-	24.4	29.3
	1:10 ⁵	-	-	-	30.4	32.4
	1:10 ⁶	-	-	-	Indet.	Indet.
Controle negativo	1:100	-	-	-	Indet.	Indet.
Controle positivo	1:100	+	-	+	23.5	22.5

Sinais de + indicam amostras positivas e de - amostras negativas. Indet. = Indeterminado. Todas as análises foram realizadas por duplicata e os valores de Ct são a média das duas repetições.

^a Número de ciclos.

Os ensaios com SYBR-Green produziram fluorescência para controle positivo resultando em temperatura de *melting* do fragmento de DNA amplificado de $82,2 \pm 0,2$ °C. Apenas amostras de RNA em diluições 1:10 e 1:50 tiveram temperaturas de *melting* semelhantes à do controle ($82,2 \pm 0,1$ °C). O restante das amostras, assim como o controle negativo, resultou em temperaturas próximas a 75 °C, desse modo, indicando amostras negativas. Assim, a RT-PCR em tempo real com SYBR-Green utilizando os primers e o protocolo de Dutta *et al.* (2015) foi a técnica menos sensível na detecção do

TSV. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Olmos *et al.* (2004) em que RT-PCR com sonda TaqMan foi mais sensível que com o uso do intercalante SYBR-Green na detecção de PPV. Segundo os autores, a baixa sensibilidade da RT-PCR em tempo real com SYBR-Green poderia estar associada à menor eficiência da PCR e à maior interferência de inibidores de origem vegetal.

O uso combinado de métodos com diferentes propriedades (moleculares, sorológicas e/ou biológicas) é recomendado na maioria dos estudos envolvendo protocolos de detecção a fim de aumentar a precisão nos resultados de detecção (Cambra *et al.*, 2011). O ensaio com o método sorológico foi utilizado para comparar uma técnica não molecular com a RT-PCR em tempo real, a fim de confirmar resultados de TSV-positivo. Amostras de tabaco, positivas por RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan, foram testadas pela técnica ELISA e confirmadas como positivos verdadeiros (dados não mostrados). Por outro lado, embora tenha sido capaz de detectar o TSV em algumas amostras, a sensibilidade da técnica ELISA foi 1.000 vezes menor (Tabela 1) e provavelmente não seria capaz de confirmar todos os resultados positivos obtidos por RT-PCR em tempo real com TaqMan.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Olmos *et al.* (2005), que utilizando diluições seriadas de um extrato de *Nicotiana benthamiana* Domin, verificaram que a sensibilidade alcançada pela RT-PCR em tempo real foi 1.000 vezes maior do que o método DAS-ELISA ou mesmo que a RT-PCR convencional, para a detecção de *Plum pox virus*. Semelhantemente, Fabre *et al.* (2003) comprovaram que a sensibilidade da técnica ELISA foi 1.000 vezes menor que PCR em tempo real na detecção de isolados de *Barley yellow dwarf virus*. A detecção de vírus em plantas muitas vezes é dificultada pela baixa quantidade viral na amostra, o que pode ocorrer por variações sazonais, estágio fenológico ou pelo tempo de infecção, e, nestes casos, o

teste ELISA não seria sensível e confiável o suficiente para a detecção (Osman *et al.*, 2008).

Através da utilização de sonda TaqMan foi possível a detecção direta do TSV em extrato do material vegetal de tabaco com o mesmo limite obtido com purificação do RNA. Desse modo, o uso de sonda TaqMan possibilitou a simplificação do protocolo de preparação das amostras, reduzindo o tempo do processo, os riscos de contaminação e consequentemente os custos das análises. Outros estudos em que foram desenvolvidos protocolos de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan também verificaram que esta técnica é capaz de detectar o RNA alvo a partir do extrato vegetal sem a necessidade de purificação de RNA (Osman *et al.*, 2008; Capote *et al.*, 2009), desse modo possibilitando o uso de preparo direto de amostras para as reações de amplificação (Bertolini *et al.*, 2008). Um protocolo rápido e fácil de preparação de amostras e uma técnica de RT-PCR em tempo real específica, sensível e precisa são de grande valia para laboratórios de detecção e diagnóstico e também em estudos epidemiológicos onde se faz necessária a análise de um grande número de amostras.

Devido as suas características a PCR em tempo real com sonda TaqMan tem sido cada vez mais utilizada em substituição ao uso da PCR convencional. Ao mesmo tempo, o número de protocolos tem crescido e cada vez mais laboratórios estão usando esta técnica de modo rotineiro (López *et al.*, 2009).

3.3.3 Detecção do TSV em amostras naturalmente infectadas

Por meio da RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan, das 35 amostras coletadas, 12 foram positivas par o TSV (Tabela 2). Destas TSV-positivas, seis apresentavam os sintomas de necroses brancas de padrão angular seguindo as nervuras (Figura 4 A) ou de folhas afiladas (Figura 4 B), em três foram observados os sintomas

de folhas afiladas e as outras três não apresentavam nenhum sintoma associado ao TSV (Tabela 2). Das 23 amostras negativas por RT-PCR em tempo real, 16 não mostravam nenhum sintoma associado ao TSV (Tabela 2). Das demais sete amostras negativas, seis mostravam sintomas de folha afilada e uma o sintoma de necroses brancas de padrão angular seguindo as nervuras (Tabela 2).

TABELA 2. Relação das amostras de folhas coletadas apresentando sintomas típicos do TSV, de outras necroses e seus respectivos resultados da TRT-PCR em tempo real com sonda TaqMan para o TSV.

Amostras	Sintomas			RT-PCR TaqMan
	TSV		Outros sintomas	
	Necrose	Folha estreita		
1	x	X	X	+
2	x	X	X	+
3	x	X	X	+
4	x	X	X	+
5	x	X	X	+
6	x	X	X	+
7		X		+
8		X		+
9		X		+
10			X	+
11			X	+
12			X	+
13			X	-
14			X	-
15			X	-
16			X	-
17			X	-
18			X	-
19			x	-
20			x	-
21			x	-
22			x	-
23			x	-
24			x	-
25			x	-
26			x	-
26			x	-
28			x	-
29		X		-
30		X		-
31		X		-
32		X		-
33		X		-
34		X		-
35	x			-

A identificação dos sintomas do TSV a campo foi dificultada devido à presença simultânea, em uma mesma folha, de outras manchas necróticas brancas arredondadas e coalescentes (Figura 2 C) ou necroses avermelhadas entre as nervuras (Figura 2 D).



FIGURA 4. Folhas de tabaco expressando diferentes tipos de sintomas: A e B: sintomas típicos do TSV, presença de manchas necróticas angulares associadas às nervuras (A) e folhas afiladas (B); manchas arredondadas que coalescem entre as nervuras (C) e necroses avermelhadas entre as nervuras (D), não características de TSV.

A maioria das amostras com sintomas típicos do TSV foi confirmada por PCR, por outro lado, algumas amostras que apresentavam sintomas não associados ao TSV também foram positivas (10, 11 e 12 Tabela 2), indicando que a RT-PCR em tempo real pode detectar a presença do vírus mesmo em plantas assintomáticas. Em função disso, a análise visual dos sintomas a campo pode mascarar uma estimativa da prevalência do TSV e de danos e prejuízos que realmente são causados pelo TSV. Apenas uma amostra (número 35 da Tabela 2) apresentando sintomas característicos do TSV não foi confirmada por RT-PCR em tempo real. Este resultado pode ser devido à ação de inibição da reação da RT-PCR ao utilizar diretamente os extratos vegetais sem purificação de RNA. A falta de uma metodologia definida para sua avaliação a campo se torna um obstáculo para elaboração de medidas de controle da doença, visto que, uma análise subestimada pode levar a maiores prejuízos.

3.3.4 Prevalência de sintomas associados ao TSV em lavouras de fumo

Apesar das limitações para distinção dos sintomas a campo, foi realizado levantamento da prevalência da virose nas lavouras. Assim, o índice de prevalência foi de 55%, 27%, 32% e 25% nas lavouras 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Considerando que o período de colheita se inicia no final de novembro, quando foram realizadas as observações, estendendo-se até o final de fevereiro, o nível de prevalência é alto. Isto porque a cultura permanece no campo por aproximadamente mais 90 dias e mais plantas que estão infectadas, porém assintomáticas, podem vir a expressar os sintomas característicos do TSV, o que aumentaria ainda mais a prevalência. Da mesma maneira que outros estudos que relacionam a ocorrência do TSV à presença do vetor e de plantas daninhas hospedeiras do TSV próximas aos cultivos (Greber *et al.*, 1991; Prasada Rao *et al.*, 2003), neste trabalho, em todas as áreas de coleta foi registrada a presença dos

insetos vetores e de vegetação herbácea hospedeira de tripes e de TSV. A maior incidência observada nas linhas laterais de plantio de tabaco em Queensland foi associada à presença de *Ageratum houstonianum* próximo ao local (Greber *et al.*, 1991). Contudo, neste trabalho, não foi possível verificar diferença da prevalência entre as linhas laterais e as centrais da lavoura, ou associá-la à presença de uma determinada espécie de planta, no momento da prospecção.

3.3.5 Detecção do TSV em tripes

Considerando-se a alta sensibilidade da RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan conforme demonstrado, foi desenvolvido um teste visando a detecção do TSV em tripes individuais (Tabela 3).

O lavado de ambas as amostras de tripes foi TSV-positivo, o que indica que o TSV está presente nas partículas de pólen que são carregadas pelos tripes. Na amostra A o TSV foi detectado somente quando se utilizou a amostra delavado dos tripes, mas não foi possível a detecção nem no grupo de cinco, nem quando os 10 tripes foram analisados individualmente. Na amostra B, além da detecção no lavado, foi possível a detecção no grupo de cinco e também em cinco tripes analisados individualmente. Apesar de terem sido coletados em plantas de tabaco sintomáticas, estas não estavam em período de florescimento, provavelmente indicando que os tripes TSV-positivos carregavam pólen, proveniente de plantas hospedeiras próximas ao cultivo.

Muitos estudos relatam a transmissão do TSV por tripes em testes de transmissão das plantas infectadas para sadias e associam esta sempre à presença de pólen infectado, mas não mencionam um mecanismo de transmissão do TSV mediada por tripes, como circulativa ou não circulativa (Prasada Rao *et al.*, 2003; Sharman *et al.*, 2015). Porém, em nenhum destes trabalhos se realizou a detecção do TSV nos insetos.

Com o protocolo de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan, desenvolvido no presente estudo, foi possível a detecção de TSV em amostras individuais de tripes, mesmo depois destes terem sido lavados, indicando que as partículas virais podem estar presentes não somente no pólen aderido a superfície, como também no interior do corpo dos tripes. As partículas de TSV detectadas em tripes lavados podem estar associadas ao pólen ingerido pelo inseto ou poderiam estar associadas a outras estruturas do aparelho bucal e/ou digestivo do tripes.

TABELA 3. Resultado da detecção do TSV em tripes através de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan.

Amostras	Lavado (valor Ct)	Tripes (Ct)		
		Grupo de 5	Individuais	
A	+ (36)	-	1	-
			2	-
			3	-
			4	-
			5	-
			6	-
			7	-
			8	-
			9	-
			10	-
B	+ (31)	+ (35)	1	+ (36)
			2	-
			3	+ (35)
			4	-
			5	+ (35)
			6	-
			7	-
			8	-
			9	+ (35)
			10	+ (33)

Sinais de + indicam amostras positivas e de – amostras negativas.

Esta técnica de detecção em tripes de maneira individual é uma excelente ferramenta para desenvolver novos estudos visando melhor compreender os

mecanismos de transmissão do TSV por espécies de tripes vetores. Além disso, é importante ressaltar que a detecção foi possível utilizando diretamente amostras de tripes esmagados em solução tampão sem a purificação de RNA, proporcionando uma análise rápida e com menor custo. Neste sentido, muitos trabalhos de PCR em tempo real com sondas TaqMan têm sido publicados nos últimos anos utilizando métodos diretos de preparação de amostras na detecção e quantificação de vírus e bactérias em insetos vetores (Olmos *et al.*, 2005, Bertolini *et al.*, 2008; 2014; Moreno *et al.*, 2009).

Espécies de *Frankliniella* também são vetores do TSWV que infecta tabaco e devido a sua importância, diferentes métodos de detecção do vírus neste vetor foram descritos. Boonham *et al.* (2002) desenvolveram um protocolo de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan para detecção do TSWV em *F. occidentalis* e sugeriram que a interpretação dos resultados com TaqMan é consideravelmente mais fácil e menos subjetivo do que outros métodos publicados para a detecção do TSWV em tripes.

Diante da especificidade, sensibilidade e precisão proporcionada pela RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan desenhada neste trabalho, foi possível associar os principais sintomas exibidos pelo TSV em plantas de fumo, cultivadas na região de Ivaí, com TSV. Esta ferramenta de diagnóstico é de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de manejo e controle, o que contribui para a redução dos danos diretos à cultura e dos prejuízos causados ao agricultor por esta doença. Além disso, o protocolo desenvolvido possibilita a detecção de isolados do TSV presentes no Brasil através do uso direto de material vegetal, sendo uma ferramenta útil para laboratórios de detecção e diagnóstico. A possibilidade de detecção em tripes individuais permitirá aprofundar o conhecimento dos mecanismos de transmissão do TSV pelo vetor e facilitará estudos epidemiológicos, visto que permite o uso direto de insetos na diagnose, viabilizando assim a detecção em grande número de amostras.

Este é o primeiro relato de desenvolvimento de um protocolo de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan para a detecção do TSV em material vegetal e em tripes individuais usando métodos diretos de preparação de amostras.

3.6 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A. M. R. (Ed.). **Viroses da soja no Brasil: sintomas, etiologia e controle**. Londrina: Embrapa Soja, 2008.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Biological and molecular characterization of an isolate of Tobacco streak virus obtained from soybean in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n.4, p. 366–373, 2005.

BERTOLINI, E. et al. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 128, n. 3, p. 283-287, 2010.

BERTOLINI, E. et al. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphid by Real-Time RT-PCR. **Plant Pathology**, Oxford, v. 120, n. 2, p. 177-188, 2008.

BERTOLINI, E. et al. Tissue-print and squash real-time PCR for direct detection of ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in citrus plants and psyllid vectors. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 63, p. 1149-1158, 2014.

BOONHAM, N. et al. The detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 101, n. 1-2, p. 37-48, 2002.

CAMBRA, M. et al. Immunology and immunological assays applied to the detection. Diagnosis and control of fruit tree viruses. In: HADIDI, A. et al. (Ed). **Virus and virus-like disease of pome and stone fruits**. Minnesota: APS, 2011. p. 303-310.

CAPOTE, N. et al. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, Madrid, v. 12, p. 1-6, 2009.

COSTA, A. S. Moléstias de vírus do fumo no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v.4, p. 710-738, 1945.

DUTTA, M.; ALIB, A.; MELCHERA, U. Detection, discrimination and discovery of a new Tobacco streak virus strain. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 221, p. 15–21, 2015.

EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEA PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **PQR - EPPO database on quarantine pests**. 2017. Disponível em: <<http://www.eppo.int>>. Acesso em: 21 set. 2016.

FABRE, F. Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 110, n.1, p. 51-60, 2003.

GREBER, R. S.; KLOSE, M. J.; TEALKE, D. S. High incidence of *Tobacco streak virus* in tobacco and its transmission by *Microcephalothris abdominalis* and pollen from *Agerantum houstonianum*. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 75, p. 450-452, 1991.

LIMA, T.; VIANA, F. Streak. In: JACK, A.; FISHER, C. (Ed.). **Field guide to integrated pest management**. Paris: Coresta, 2015. p. 50-52.

LÓPEZ, M. M. et al. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, Wymondham, v. 11, n.1, p. 13-46, 2009.

LOURENÇÃO, A. L.; COSTA, A. L; MIRANDA, M. A. C. Resistência de campo ao vírus da queima-do-broto em genótipos de soja resistentes a insetos. **Bragantia**, Campinas, v. 48, n. 2, p. 209-214, 1989.

MORENO, A.; FERERES, A.; CAMBRA, M. Quantitative estimation of plum pox virus targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 9, p. 1391-1399, 2009.

OLMOS, A. et al. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 128, n. 1-2, p. 151–155, 2005.

OLMOS, A. et al. Real-Time RT-PCR for quantitative detection of plum pox vírus. **Acta horticulturae**, The Hague, v. 657, n. 19, p. 149-153, 2004.

OLMOS, A. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 12192-12193, 1996.

OSMAN, F.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays and low density array detection of viruses associated with rugose wood complex of grapevine. In: ANNUAL NATIONAL VITICULTURE RESEARCH CONFERENCE, 2., 2008, Davis. **Proceedings...** Davis: University of California, 2008. p. 63-66.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam. v. 133, n. 2, p. 130–136, 2006.

PRASADA RAO, R. D. V. J. et al. The host range of *Tobacco streak virus* in India and transmission by thrips. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 142, p. 365-368, 2003.

PULCCINELLI, C.E.; MASSOLA, N.S. Doenças do fumo. In: AMORIN, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2016. p. 413-432.

RADBELOUX, P. F. Seasonal progression and agronomic impact of *Tobacco streak virus* on soybean in Wisconsin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 4, p. 391-396, 2005.

SDOODE R.; TEAKLE, D. S. Studies on the mechanism of transmission of pollen-associated *Tobacco streak ilarvirus* virus by *Thrips tabaci*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, n.1, p. 88-92, 1993.

SDOODE, R.; TEAKLE, D. S. Transmission of *Tobacco streak virus* by *Thrips tabaci*: a new method of plant virus transmission. **Plant Pathology**, Oxford. v. 36, n. 3, p. 377-380, 1987.

SHARMAN, M.; THOMAS, J. E. Genetic diversity of subgroup 1 ilarviruses from eastern Australia. **Archives of Virology**, New York, v. 158, p. 1637-1647, 2013.

SHARMAN. M.; THOMAS, J. E.; PERSLEY, D. M. Distribution in Australia and seed transmission of *Tobacco streak virus* in *Parthenium hysterophorus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 7, p. 708-712, 2009.

SHARMAN, M.; THOMAS, J. E.; PERSLEY, D. M. Natural host range, thrips and seed transmission of distinct *Tobacco streak virus* strains in Queensland, Australia. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 167, n. 2, p. 197-207, 2015.

SHARMAN, M.; THOMAS, J. E.; PERSLEY, D. M. First report of *Tobacco streak virus* in sunflower (*Helianthus annuus*), cotton (*Gossypium hirsutum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and mung bean (*Vigna radiata*) in Australia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 3, p. 27-29, 2008.

TERESANI, G. R. et al. Association of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' with a vegetative disorder of celery in Spain and development of a Real-Time PCR method for its detection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, n. 8, p. 804-811, 2014.

UNTIVEROS, M.; PEREZ-EGUSQUIZA, Z.; CLOVER, G. PCR assays for the detection of members of the genus *Iilarvirus* and family *Bromoviridae*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 97-104, 2010.

4 CAPÍTULO 2

**Respostas quimiotáticas de *Orius insidiosus* ao complexo *Nicotiana tabacum*,
Myzus persicae e fitormônios**

4.1 Introdução

Orius insidiosus, originário das Américas, é a espécie de antocorídeo de ocorrência mais comum no Brasil (Bueno, 2009; Silveira *et al.*, 2003). Este predador é considerado onívoro por se alimentar de vários tipos de presas além de pólen e seiva de plantas, assim podendo ser encontrado em diversos agroecossistemas (Coll, 1997). A presença de *O. insidiosus* em lavouras de feijão e algodão, a título de exemplo, está associada à presença de pragas como, tripses e pulgões, respectivamente (Silveira *et al.*, 2005).

A produção e comercialização de espécies de *Orius* é uma realidade em países da Europa desde a década de 90 (Bueno, 2009). *Orius insidiosus* e outras espécies deste gênero, são comercializadas por países como Estados Unidos da América, Austrália e Japão para controle de pragas em casas de vegetação (Van Lenteren *et al.*, 1997). No Brasil, *O. insidiosus* é considerado um potencial predador e tem sido estudado para sua aplicação em programas de controle biológico (Bueno, 2009).

Fêmeas de vários antocorídeos se orientam pela detecção não só de compostos voláteis de suas potenciais presas, já que feromônios de alarme de fitófagos podem ser utilizados como pistas de forrageamento para inimigos naturais (van Laerhoven *et al.*, 2000), como também de compostos orgânicos voláteis liberados pelas plantas danificadas pela herbivoria, denominados VIPHs (Voláteis Induzidos por Plantas em Herbivoria) (Mochizuki & Yano, 2007; Hatano *et al.*, 2008). Carvalho *et al.* (2010), por exemplo, observaram que *O. insidiosus* foi mais atraído por plantas de pimentão e de algodão infestadas com *F. occidentalis* do que aquelas não infestadas.

A emissão de VIPHs ocorre pela ativação de vias hormonais mediadas, principalmente, pelo ácido salicílico e metil jasmonato que irão atuar na indução da defesa de plantas (Arimura *et al.*, 2005). A aplicação exógena de fitormônios nas

plantas também pode desencadear respostas de defesa direta (prejudicando a performance do herbívoro) ou indireta (atraindo inimigos naturais) (Rohwer & Erwin, 2008; Hamm *et al.*, 2010). Metil jasmonato aplicado em plantas de gérbera provocou a atração de fêmeas do ácaro predador, *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) (Gols *et al.*, 1999).

Nicotiana tabacum é uma planta hospedeira de pulgões e de tripes os quais podem atuar como vetores de viroses (Pulcinelli & Massola, 2016). A nicotina presente em plantas do gênero *Nicotiana*, entretanto, pode ter ação repelente e/ou afetar o desenvolvimento de fitófagos (Kliot *et al.*, 2014). Isso foi demonstrado em trabalho no qual larvas de *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae), que se alimentaram de plantas de *N. attenuata* Torr. ex Wats tratadas com metil jasmonato, tiveram o tempo de desenvolvimento prolongado e maior mortalidade, além disso, quando colocadas sobre a planta tratada apresentavam o comportamento de abandono do local (van Dam *et al.*, 2000).

Considerando o potencial de *O. insidiosus* como agente de controle biológico de pulgões e do uso de fitormônios na defesa de plantas, este trabalho objetivou avaliar as respostas quimiotáxicas de fêmeas de *O. insidiosus* frente a *N. tabacum* infestada ou não com *M. persicae*; ao pulgão e a plantas de tabaco aspergidas com ácido salicílico e metil jasmonato.

4.2 Material e Métodos

Os bioensaios foram conduzidos nos Laboratórios de Biologia, Ecologia e Controle Biológico de Insetos (BIOECOLAB) e no Laboratório Etologia e Ecologia Química de Insetos (LEEQI) da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2.1 Insetos

Os adultos de *O. insidiosus* foram fornecidos pela empresa PROMIP - Manejo Integrado de Pragas. Estes eram alimentados com ovos de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) e recebiam como substrato de oviposição, brotos de feijão tipo carioquinha, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae). Os predadores foram enviados semanalmente e até serem usados nos experimentos, foram mantidos em recipientes de plásticos (17 cm de altura x 11 cm de diâmetro), contendo tiras de papel para refúgio e algodão umedecido como fonte de água. Os recipientes permaneceram em câmara climatizada (26 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ UR, fotofase 14 horas), seguindo metodologia proposta por Bueno (2009).

Os pulgões, *M. persicae*, foram coletados em cultivo orgânico de couve localizado em Viamão ($30^{\circ}06'19''S$; $50^{\circ}55'41''O$), RS. No laboratório foram mantidos em gaiolas plásticas (38 x 28,5 x 18 cm), com aberturas recobertas por tecido voile, contendo plantas de feijão que serviram para alimentação dos mesmos.

4.2.2 Plantas

Plantas de tabaco cultivar CSC 4704 foram cultivadas a partir de sementes fornecidas pela empresa Souza Cruz Ltda, utilizando substrato Humosolo Substrato para Plantas - Vida e mantidas por, aproximadamente, 60 dias em sistema *floating* recebendo, a cada 20 dias, adubação de NPK (20-10-20). Após este período foram transplantadas para recipientes plásticos (250 ml) contendo o mesmo substrato e permaneceram em estufa na área experimental da Faculdade de Agronomia até atingirem entre três a quatro folhas desenvolvidas, quando foram utilizadas nos bioensaios.

4.2.3 Soluções

As soluções alcoólicas 30 % (v/v) foram preparadas a partir da diluição de metil jasmonato 95% Sigma-Aldrich® na concentração de 5 mM e da diluição de ácido salicílico 99% Sigma-Aldrich® nas concentrações de 1 e 2 mM.

4.2.4 Procedimentos experimentais

Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada, 25 ± 5 °C, 60 ± 10 % UR, sob luz fluorescente (60 W, luminância igual a 290 lux). As respostas quimiotáticas de trinta fêmeas de *O. insidiosus* com idade entre três e dez dias foram observadas em olfatômetro de vidro, de dupla escolha, com diâmetro de 4 cm, arena inicial de 17 cm, bifurcada em dois braços de 22 cm cada. O fluxo de ar, previamente filtrado com carvão ativo, foi conduzido para dentro do sistema com o auxílio de uma bomba a vácuo conectada a um fluxímetro e um umidificador, a uma taxa de 0,8 l/min. O olfatômetro foi invertido no sentido horizontal (rotação 180°) a cada seis repetições e, a cada dez, lavado com sabão neutro e seco em estufa de esterilização a 150 °C, sendo, então, os tratamentos substituídos.

Antes do início dos experimentos, os insetos foram acondicionados individualmente em frascos de vidro (0,5 x 3 cm) tampados com algodão, não alimentados, por no mínimo, duas horas na sala de testes. Após, cada indivíduo foi colocado na extremidade inicial do olfatômetro e exposto a cada um dos tratamentos. As respostas foram consideradas positivas quando os insetos percorreram, pelo menos, 4 cm dentro dos braços contendo os tratamentos e permaneceram nesta área por, no mínimo, um minuto. Foram considerados não responsivos os que não se movimentaram nos primeiros 5 minutos ou quando não percorriam, pelo menos, 4 cm em algum dos dois braços do olfatômetro. Foram realizadas 30 repetições/tratamento.

4.2.5 Bioensaios

Respostas quimiotáticas a plantas. As respostas de fêmeas de *O. insidiosus* foram avaliadas expondo, em uma das extremidades do olfatômetro, plantas de tabaco com o vaso recoberto com papel alumínio e na outra apenas o vaso com substrato, também recoberto com este papel (controle). Os vasos foram colocados em cubas de vidro (29,5 x 12,5 cm), com duas aberturas acopladas ao sistema do olfatômetro.

Respostas quimiotáticas a voláteis de plantas de tabaco infestadas com *M. persicae*. Plantas de tabaco foram infestadas, com auxílio de pincel, com 60 indivíduos de *M. persicae* e mantidas em gaiolas plásticas (38 x 28,5 x 18 cm). Após três dias, estas plantas foram contrastadas com as não infestadas sendo colocadas no olfatômetro da mesma forma descrita acima.

Respostas quimiotáticas a voláteis de *M. persicae*. Foi contrastado o odor de *M. persicae* com o ar (controle). Sessenta pulgões foram acondicionados em recipiente cilíndrico (5 x 3 cm) de acrílico com as duas aberturas recobertas com tecido voile, sendo colocados na extremidade de um dos braços do olfatômetro. Na outra, havia somente o fluxo de ar filtrado.

Respostas quimiotáticas a voláteis de plantas de tabaco tratadas com fitormônios. Quatro grupos de plantas de tabaco foram aspergidos cada um com uma das doses dos fitormônios: metil jasmonato na concentração de 5 mM, ácido salicílico nas concentrações 1 e 2 mM, água e álcool (30%), solvente utilizado nas diluições. A aspersão foi feita utilizando um recipiente plástico (75 ml), com válvula spray, até o ponto de escorrimento nas folhas, aproximadamente 5 ml por planta. Após a aspersão, as plantas permaneceram por três dias, separadas, em câmara climatizada (24 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ UR, fotofase 14 horas). Decorrido este período, as respostas de *O. insidiosus* foram contrastadas entre plantas com fitormônios e com o solvente (controle).

4.2.6 Análise estatística

Os percentuais de respostas quimiotáxicas foram comparados pelo teste de Qui-quadrado de heterogeneidade. As análises foram realizadas utilizando-se o programa BioEstat 5.0® (Ayres *et al.*, 2007), ao nível de significância de 5%.

4.3 Resultados e Discussão

Um maior número de fêmeas de *O. insidiosus* se direcionou ao vaso somente com substrato quando contrastadas com os que continham plantas de tabaco ($p = 0,0422$) (Figura 1). Este resultado pode estar relacionado ao fato da nicotina ser um alcaloide que pode causar repelência a herbívoros como exemplificado por Delphia *et al.* (2007) para *F. occidentalis*. Além disso, a nicotina pode ser tóxica aos insetos (Parr & Thurston, 1972), como constatado em *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera, Aleyrodidae), a qual teve sua capacidade reprodutiva reduzida após alimentar-se de *N. tabacum* (Kliot *et al.*, 2014). Assim, neste tratamento as plantas e tabaco não foram atrativas para as fêmeas por não apresentar vantagens para seu desenvolvimento, como presença de alimento ou para oviposição.

Assim, neste tratamento, a ausência de presas pode ser sido a causa da falta de resposta das fêmeas de *O. insidiosus*. Segundo Tatemoto & Shimoda (2008) espécies de *Orius* são capazes de explorar voláteis induzidos pela herbivoria como pistas para forrageamento. Além destes, o feromônio de alarme de pulgões e o *honeydew* também são utilizados por inimigos naturais para encontrar suas presas (de Vos *et al.*, 2007).

O hábito generalista de *O. insidiosus* também pode ter influenciado o comportamento das fêmeas neste resultado. Predadores de pulgões que são generalistas, geralmente, não são atraídos pelo odor de plantas não danificadas e sem evidência dos pulgões (Hatanno *et al.*, 2008). Por outro lado, frequentemente, podem visitar plantas

em florescimento com a finalidade de complementar sua alimentação, através tanto da seiva quanto do pólen, mesmo na ausência de pulgões, como foi observado em coccinelídeos (Michaud & Qureshi, 2005). Dessa maneira, plantas utilizadas no presente estudo não foram atrativas para *O. insidiosus*.

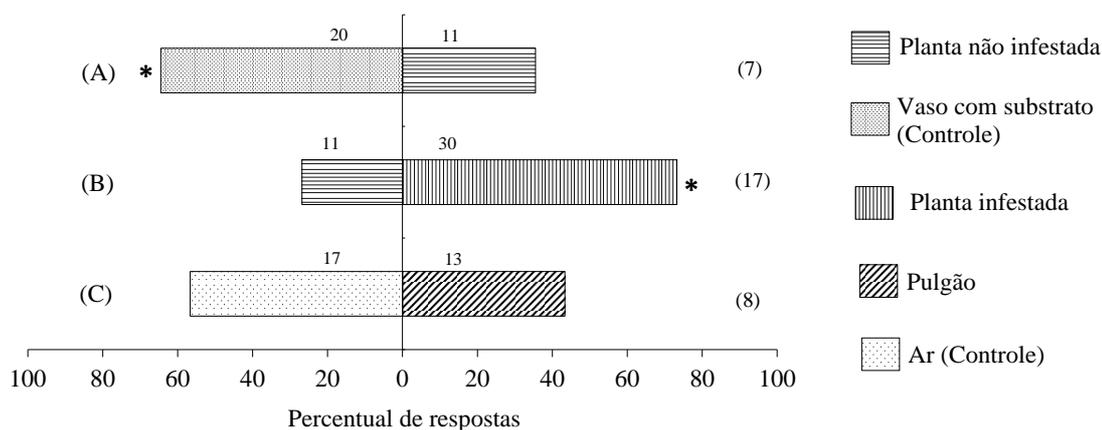


FIGURA 1. Percentual de respostas de fêmeas de *O. insidiosus* expostas: A) plantas de tabaco e ao vaso com substrato (controle); B) plantas de tabaco infestadas com pulgão e não infestadas (controle) e C) *Myzus persicae* e ao ar (controle). Valores sobre as barras correspondem ao número de insetos responsivos e, entre parênteses, aos não responsivos. Asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

Quando expostas a plantas infestadas com *M. persicae*, as fêmeas foram significativamente mais atraídas para estas em relação às não infestadas ($p < 0,001$) (Figura 1). Venzon *et al.* (1999) já haviam constatado que *O. laevigatus* era capaz de distinguir plantas infestadas tanto com *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) quanto com *F. occidentalis*, das não infestadas, devido a detecção de voláteis produzidos pelas plantas e não pelos fitófagos, o que corrobora os resultados do presente estudo. Parece evidente que espécies de *Orius* utilizam odores para detectar plantas infestadas com potenciais presas, conforme demonstrado por Mochizuki & Yano (2007), em estudo realizado com a espécie *O. sauteri* a qual respondeu apenas para as plantas de berinjela infestadas com adultos de *Thrips palmi* Karny

(Thysanoptera: Thripidae) em relação às não infestadas. Da mesma forma, adultos de *O. strigicollis* Poppius responderam aos voláteis de folhas de pepineiro previamente infestadas com *T. tabaci* (Tatemoto & Shimoda, 2008), assim como fêmeas de *O. sauteri* foram mais atraídas por tomateiros contendo *M. persicae* em relação as que não estavam infestadas (Tan & Liu, 2014). Estes resultados são explicados pois insetos predadores podem ser atraídos ou repelidos pelos voláteis produzidos por plantas submetidas à herbivoria (VIPH), em função da mudança do perfil químico destas (Tatemoto & Shimoda, 2008). Além disso, o hábito alimentar destes insetos está associado à ativação da rota do ácido salicílico.

Xue *et al.* (2010) já haviam observado alterações nos metabólitos secundários das plantas de *N. tabacum* após a alimentação de *B. tabaci*. Injúrias causadas pelos pulgões podem resultar em um aumento significativo de ácido jasmônico (JA), o qual está envolvido em estratégias de defesa das plantas, atraindo inimigos naturais dos insetos praga (Arimura *et al.*, 2005; Dicke, 2009). Por outro lado, apenas o dano mecânico não atraiu *O. strigicollis* e *O. sauteri*, o que evidencia a importância do herbívoro nesta interação (Turlings *et al.*, 1990; Mattiaci *et al.*, 1994). Desta forma, possivelmente, a causa da atração de *O. insidiosus* pela planta de tabaco infestada, mesmo contendo nicotina, pode ser devido aos VIPHs.

A resposta de fêmeas expostas simultaneamente ao ar e a pulgões não diferiu significativamente ($p = 0,4386$) (Figura 1). Estes resultados corroboram os de Tatemoto & Shimoda (2008), os quais também não observaram comportamento quimiotático significativo de *O. strigicollis* na presença de *T. tabaci*. Segundo os autores, *O. strigicollis* tem a capacidade de explorar voláteis de plantas infestadas por herbívoros, mas não utilizam o odor da presa para guiar seu forrageamento. Discussões a respeito da atratividade de predadores a feromônios de defesa de pulgões (a dizer (E)- β -

farnaseno) são recorrentes. Avaliando a ação destes a diferentes inimigos naturais, Joachim & Waisser (2015) concluíram que a quantidade de feromônios liberada por pulgões em condições naturais não é suficiente para atuar como cairomônio para predadores ou parasitoides. Isto pode ter ocorrido no presente trabalho, associado ao fato de que os pulgões não se encontravam na presença de inimigos naturais, portanto, possivelmente, não produziram o feromônio de alarme.

Outro aspecto que pode influenciar a resposta negativa de *O. insidiosus* à presença de *M. persicae* está relacionado ao hábito generalista de predadores, os quais não se orientam por cairomônios específicos das presas e sim pela interação destas com as plantas. Esta estratégia já foi observada para o ácaro predador *Neoseiulus cucumeris* Oudemans (Acari: Phytoseiidae) na busca de *F. occidentalis* em pepineiros (Janssen *et al.*, 1998). Para predadores do gênero *Orius* a planta, além de servir como substrato de oviposição, também é usada como fonte de água e nutrientes (Coll *et al.*, 1997), o que justifica a maior resposta aos odores da planta danificada do que especificamente a uma espécie de presa.

Os percevejos deste estudo eram provenientes de criações em laboratório e não tiveram experiência prévia com os pulgões em teste, sendo este outro aspecto que deve ser levado em consideração, uma vez que, segundo Ardanuy *et al.* (2016), a partir da experiência, espécies de *Orius* podem mudar seu comportamento. Este fato ficou evidenciado por Carvalho *et al.* (2010) em adultos de *O. insidiosus*, os quais responderam significativamente mais ao odor proveniente do complexo planta-herbívoro do que insetos que não tiveram esta experiência.

Fêmeas de *O. insidiosus* não responderam significativamente a plantas tratadas com ácido salicílico ($p = 0,1967$ para 1 mM e $p > 0,05$ para 2 mM) e metil jasmonato ($p = 0,2113$) em comparação com às não tratadas (Figura 2). Embora a aplicação exógena

de ácido salicílico possa induzir a liberação de metil salicilato, forma volátil do ácido salicílico, simulando a mesma resposta à herbivoria em plantas de *N. sylvestris* Speg & Comes (Baldwin *et al.*, 1997), no presente estudo não houve uma resposta dos predadores aos odores de plantas de tabaco tratadas com fitormônios.

Sabe-se que a inserção do estilete de afídeos provoca a ativação da via do ácido salicílico (Thompson & Goggin, 2006). Da mesma forma, a aplicação de metil jasmonato poderia estimular as respostas de defesa das plantas, como em *N. attenuata* (Baldwin, 1996). No entanto, neste trabalho, a aplicação exógena deste fitormônio não foi suficiente para atrair o predador.

Em geral as pesquisas têm demonstrado que aplicação de metil jasmonato em plantas de *Nicotiana* provoca o aumento na biossíntese de nicotina, influenciando de forma negativa o comportamento e desenvolvimento de insetos herbívoros (Baldwin, 1996; Zhang & Baldwin, 1997; Baldwin, 1998; Halitschke *et al.*, 2000; van Dam *et al.*, 2000; Delphia *et al.*, 2006; Delphia *et al.*, 2007). Entretanto, o efeito deste e de outros fitormônios associados a plantas de *Nicotiana* em relação à atratividade de inimigos naturais, não é conhecido.

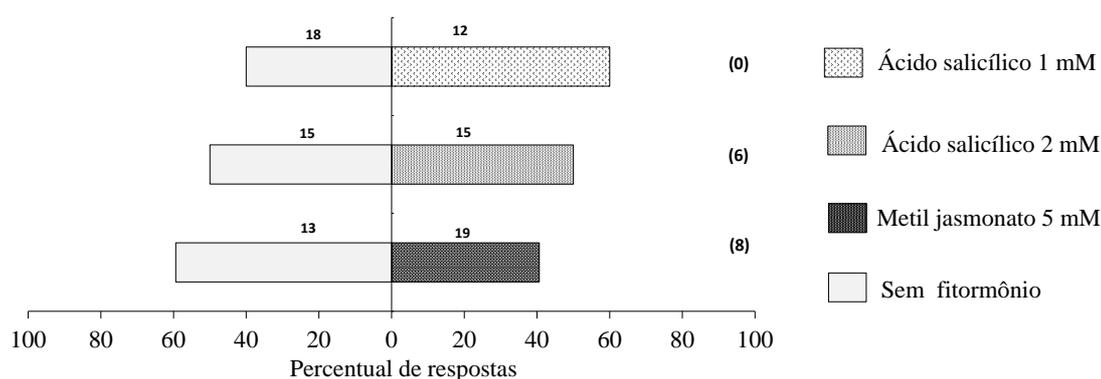


FIGURA 2. Percentual de respostas de fêmeas de *Orius insidiosus* expostas a plantas de tabaco tratadas com diferentes doses de fitormônios e não tratadas. Valores sobre as barras correspondem ao número de insetos responsivos e, entre parênteses, aos não responsivos.

A possível alteração do teor de nicotina e de outros voláteis liberados pelas plantas com fitormônios não foi percebida pelo predador como um indicativo da presença de presas, ao contrário do observado quando plantas de tabaco foram infestadas com pulgões (Figura 1).

Considerando que as doses de fitormônios utilizadas neste experimento foram menores que as de Baldwin (1996), de 500 µg de metil jasmonato em 10 ml de água aplicada no solo, próximo às raízes de *N. attenuata*, é possível que a mudança no perfil químico das plantas tenha sido pequena, não sendo percebida pelos predadores. O local de aspersão também pode ter influenciado os resultados já que a biossíntese de nicotina ocorre nas raízes e posteriormente é transportada para o restante da planta (Zhang & Baldwin, 1997). Maior síntese de nicotina foi obtida quando o metil jasmonato foi aplicado diretamente nas raízes de *N. attenuata* por solução hidropônica do que quando aplicado nas folhas (Baldwin, 1996). Porém, o autor não avaliou o comportamento de insetos, logo, não se sabe o efeito da quantidade de nicotina na resposta de herbívoros ou de inimigos naturais.

Com base nos resultados deste trabalho, assim como os resultados obtidos em outros estudos, conclui-se que espécies de *Orius* associam os voláteis liberados por plantas induzidos pela herbivoria para encontrar potenciais presas no ambiente. Da mesma forma que observado para outras plantas, a atração de inimigos naturais constitui um dos mecanismos de defesa indireta em plantas de tabaco.

4.4 Referências Bibliográficas

- ARDANUY, A.; ALBAJES, R.; TURLINGS, T. C. Innate and learned prey-searching behavior in a generalist predator. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 42, n. 6, p. 497-507, 2016.
- ARIMURA, G. I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 5, p. 911-923, 2005.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007. 354 p.
- BALDWIN, I. T. et al. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. **Planta**, Berlin, v. 201, n. 4, p. 397-404, 1997.
- BALDWIN, I. T. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 14, p. 8113-8118, 1998.
- BALDWIN, I. T. Methyl jasmonate-induced nicotine production in *Nicotiana attenuata*: inducing defenses in the field without wounding. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 80, p. 213-220, 1996.
- BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas**: produção massal e controle de qualidade. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. 430 p.
- CARVALHO, L. M.; BUENO, V. H. P.; CASTAÑE, C. Olfactory response towards its prey *Frankliniella occidentalis* of wild and laboratory-reared *Orius insidiosus* and *Orius laevigatus*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 135, n. 3, p. 177-183, 2010.
- COLL, M.; SMITH, L. A.; RIDGWAY, R. L. Effect of plants on the searching efficiency of a generalist predator: the importance of predator-prey spatial association. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 83, n. 1, p. 1-10, 1997.
- DELPHIA, C. M. et al. The role of insect-derived cues in eliciting indirect plant defenses in tobacco, *Nicotiana tabacum*. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 1, n. 5, p. 243-250, 2006.
- DELPHIA, C. M.; MESCHER, M. C.; DE MORAES, C. M. Induction of plant volatiles by herbivores with different feeding habits and the effects of induced defenses on host-plant selection by thrips. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 5, p. 997-1012, 2007.
- DE VOS, M., KIM, J.H., JANDER, G. Biochemistry and molecular biology of Arabidopsis-aphid interactions. **BioEssays**, Cambridge, n. 29, v. 9, p. 871-883, 2007.
- DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 654-665, 2009.

GOLS, R.; POSTHUMUS, M. A.; DICKE, M. Jasmonic acid induces the production of gerbera volatiles that attract the biological control agent *Phytoseiulus persimilis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 93, n. 1, p. 77-86, 1999.

HALITSCHKE, R. et al. Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. **Oecologia**, Berlin, v. 124, n. 3, p. 408-417, 2000.

HAMM, J. C.; STOUT, M. J.; RIGGIO, R. M. Herbivore- and elicitor-induced resistance in rice to the Rice Water Weevil (*Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 36, n. 2, p. 192-199, 2010.

HATANO, E. et al. Chemical cues mediating aphid location by natural enemies. **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 105, n. 5, p. 797-806, 2008.

JANSSEN, A. et al. Behaviour and indirect interactions in food webs of plant-inhabiting arthropods. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 22, n. 9, p. 497-521, 1998.

JOACHIM, C.; WEISSER, W. W. Does the aphid alarm pheromone (E)- β -farnesene act as a kairomone under field conditions? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 267-275, 2015.

KLIOT, A. et al. Adaptation to nicotine in the facultative tobacco-feeding hemipteran *Bemisia tabaci*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, n. 10, p. 1595-1603, 2014.

MATTIACI, L.; DICKE, M.; POSTHUMUS, M. A. Induction of parasitoid attracting synomone in Brussels sprout plants feeding on *Pieris brassicae* larvae: role of mechanical damage and herbivore elicitor. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 9, p. 2229-2247, 1994.

MICHAUD, J. P.; QURESHI, J. A. Induction of reproductive diapause in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) hinges on prey quality and availability. **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 102, n. 3, p. 483-487, 2005.

MOCHIZUKI, M.; YANO, E. Olfactory response of the anthocorid predatory bug *Orius sauteri* to thrips-infested eggplants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 123, n. 1, p. 57-62, 2007.

PARR, J. C.; THURSTON, R. Toxicity of nicotine in synthetic diets to larvae of the tobacco hornworm. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.65, n. 5, p. 1158-1188, 1972.

PULCCINELLI, C.E.; MASSOLA, N.S. Doenças do fumo. In: AMORIN, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2016. p. 413-432.

ROHWER, C. L.; ERWIN, J. E. Horticultural applications of jasmonates: a review. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 83, n. 3, p. 283-304, 2008.

SILVEIRA, L. C. P. et al. Percevejos predadores (*Orius* spp.) (Hemiptera: Anthocoridae) e Tripes (Thysanoptera): interação no mesmo habitat? **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n.5, p. 767-773, 2005.

SILVEIRA, L. C. P. et al. Plantas cultivadas e invasoras como habitat para predadores do gênero *Orius* (Wolff) (Heteroptera: Anthocoridae). **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 261-265, 2003.

TAN, X.; LIU, T. Aphid-induced plant volatiles affect the attractiveness of tomato plants to *Bemisia tabaci* and associated natural enemies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 151, n. 3, p. 259-269, 2014.

TATEMOTO, S.; SHIMODA, T. Olfactory responses of the predatory mites (*Neoseiulus cucumeris*) and insects (*Orius strigicollis*) to two different plant species infested with Onion Thrips (*Thrips tabaci*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 5, p. 605-613, 2008.

THOMPSON, G. A.; GOGGIN, F. L. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 755-766, 2006.

THORPE, K. W.; BARBOSA, P. Effects of consumption of high and low nicotine tobacco by *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) on survival of gregarious endoparasitoid *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 12, n. 6, p. 1329-1337, 1986.

TURLINGS, T. C. J.; TUMLINSON, J. H.; LEWIS, W. J. Exploitation of herbivore-inducer plant odors by host-seeking parasitic wasps. **Science**, Washington, v.250, n. 4985, p. 1251-1253, 1990.

VAN DAM, N. M.; HADWICH, K.; BALDWIN, I. T. Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. **Oecologia**, Berlin, v. 122, p. 371-379, 2000.

VAN LAERHOVEN, S.; GILLESPIE, D. R.; MCGREGOR, R. R. Leaf damage and prey type determine search effort in *Orius tristicolor*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n. 2, p. 167-174, 2000.

VAN LENTEREN, J. C.; MICHEL, M. R.; TIMMER, R. Commercial mass production and pricing of organisms for biological control of pests in Europe. **Biological Control**, Orlando, v. 10, n. 2, p. 143-149, 1997.

VENZON, M.; JANSSEN, A.; SABELIS, M. W. Attraction of a generalist predator towards herbivore-infested plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 305-314, 1999.

XUE, M. et al. Induced defense by *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) in tobacco against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, n. 3, p. 883-891, 2010.

ZHANG, Z.; BALDWIN, I. T. Transport of [2-¹⁴C] jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in *Nicotiana sylvestris*. **Planta**, Berlin, v. 203, n. 4, p. 436-441, 1997.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a importância econômica da cultura do tabaco, principalmente para pequenos produtores da região Sul do Brasil e os danos causados pela necrose branca do fumo, os trabalhos de pesquisa relacionados à detecção do agente causal e o conhecimento dos aspectos epidemiológicos da doença são imprescindíveis para estabelecer estratégias de manejo e controle.

O presente trabalho apresenta metodologias simples e de baixo custo que facilitam a detecção precisa e confiável do vírus TSV em material vegetal e em vetores. O protocolo de RT-PCR em tempo real baseado no uso de sonda TaqMan, desenhado neste trabalho, é uma ferramenta chave para o diagnóstico e detecção dos isolados de TSV em diferentes hospedeiros no Brasil. Considerando que outras manchas necróticas observadas em folhas de tabaco podem ser semelhantes aos sintomas do TSV, as avaliações de incidência da doença a campo com base apenas nos sintomas podem ser errôneas e prejudicar as estratégias de controle. A RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan é uma técnica importante que pode ser aplicada tanto em laboratórios de detecção como em estudos que visem esclarecer ou conhecer novos aspectos do mecanismo de transmissão do TSV por tripes.

Este é o primeiro relato de desenvolvimento de um protocolo de RT-PCR em tempo real com sonda TaqMan para a detecção do TSV em material vegetal e em tripes individuais usando métodos diretos de preparação de amostras. Com base nos resultados

obtidos neste trabalho, a utilização de uma metodologia adequada para detecção do vírus em material vegetal e vetores é fundamental para estabelecer medidas de controle eficazes.

Orius insidiosus, neste trabalho, mostrou que tem a capacidade de detectar compostos voláteis produzidos por plantas de tabaco sob a ação de herbivoria e utilizá-los para encontrar sua presa no ambiente. O conhecimento sobre comportamento destes predadores frente a plantas cultivadas e suas pragas pode sustentar futuras pesquisas que visem avaliar seu potencial uso como predadores em lavouras de tabaco. As doses de fitormônios aplicadas nas folhas de tabaco, entretanto, não foram capazes de alterar o comportamento de fêmeas de *O. insidiosus* sugerindo que novos estudos devem ser realizados mensurando outras doses e condições.

Além disso, conhecer o efeito que a nicotina presente em *N. tabacum* pode causar aos predadores é importante, visto que este composto pode ser prejudicial ou repelente a algumas espécies de entomófagos que consomem herbívoros que se alimentam em fumo.

Os resultados indicam que *O. insidiosus* tem potencial para atuar como predador de importantes pragas do fumo, como os pulgões e talvez o tripses, vetor do TSV. Entretanto, outros trabalhos a respeito da sua biologia e do seu desenvolvimento em lavouras de tabaco devem ser realizados para determinar o papel efetivo da espécie na cultura do fumo.

Vale ressaltar que o emprego de medidas alternativas ao controle químico na cultura do tabaco contribui não apenas para redução dos danos causados pelos agrotóxicos ao ambiente, mas também para melhorar a qualidade de vida do produtor e do produto colhido.