

**JOÃO PEDRO LAURINDO ROCHA**

**MORTE CELULAR PROGRAMADA MEDIA A RESISTÊNCIA DE EUCALIPTO  
AO INSETO GALHADOR *Leptocybe invasa***

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

Orientador: Wagner L. Araújo

Coorientadoras: Auxiliadora Oliveira Martins  
Maíra Ignacio Sarmiento

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

R672m  
2023

Rocha, João Pedro Laurindo, 1998-  
Morte celular programada media a resistência de eucalipto  
ao inseto galhador *Leptocybe invasa* / João Pedro Laurindo  
Rocha. – Viçosa, MG, 2023.  
1 dissertação eletrônica (43 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Vegetal, 2023.

Referências bibliográficas: f. 39-43.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.684>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Eucalipto - Anatomia. 2. Eucalipto - Doenças e pragas.  
3. Expressão gênica. 4. Morte celular. I. Araújo, Wagner Luiz,  
1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia  
Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 634.973766

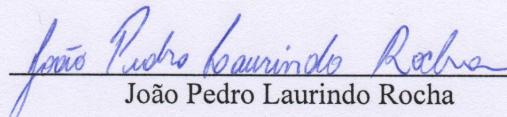
JOÃO PEDRO LAURINDO ROCHA


MORTE CELULAR PROGRAMADA MEDIA A RESISTÊNCIA DE EUCALIPTO  
AO INSETO GALHADOR *Leptocybe invasa*

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

APROVADA: 02 de agosto de 2023.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
João Pedro Laurindo Rocha  
Autor

  
\_\_\_\_\_  
Wagner L. Araújo  
Orientador

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus,  
por me proporcionar mais essa vitória, ao meu  
pai e minha mãe que não mediram esforços  
para me apoiar nesta etapa da minha vida,  
dedico também aos meus irmãos e aos meus  
amigos que sempre me incentivaram nos  
momentos de dificuldade.*

*A vocês!*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por possibilitar que meus objetivos fossem alcançados permitindo que eu finalizasse a graduação e desenvolvesse esse trabalho.

Quero agradecer aos meus pais, Humberto Caetano da Rocha e Silvonete L. L. C. Rocha, pelo apoio e incentivo a minha formação pessoal, acadêmica e profissional, quero agradecer também aos meus irmãos Pedro Augusto Laurindo Rocha e Vitório Augusto Laurindo Rocha, por estarem presentes e por todo apoio que me deram sempre que precisei.

Ao meu orientador, professor Wagner L. Araújo, e às minhas coorientadoras, professora Maíra Ignacio Sarmiento e a doutora Auxiliadora Oliveira Martins, por me proporcionarem experiências e aprendizados de cunho profissional e pessoal, por estarem sempre presentes e me orientando nos momentos que necessitei, independentemente do horário, demonstrando, assim, o seu compromisso, dedicação e paciência ao decorrer de todo esse processo. Tais orientações fizeram grande diferença no andamento deste trabalho.

Aos amigos que fiz em Viçosa, Welder, Priscilla, Isabela, Yasmin, Julia, Daniel, Fran, Rita, Mateus, Welson, Analu, Jean, Bianca, Lucas, Baruch, Jefferson, Lana, Débora, os amigos que fiz no LCT, e especial o Claudinei, que tem sido um grande companheiro. Sou muito grato a todos, por todos os momentos que compartilhamos e pelos inúmeros desafios que me ajudaram a superar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Por fim, a todos que de maneira direta ou indiretamente participaram e contribuíram para que fosse possível a conclusão de mais esta etapa, sou infinitamente grato.

*“A felicidade não é a ausência de conflito e sim a habilidade de lidar com ele. Uma pessoa feliz não tem o melhor de tudo, mas ela torna tudo melhor”.*

(Desconhecido)

## RESUMO

ROCHA, João Pedro L., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Morte celular programada media a resistência de eucalipto ao inseto galhador *Leptocybe invasa*.** Orientador: Wagner L. Araújo. Coorientadoras: Auxiliadora Oliveira Martins e Maíra Ignacio Sarmiento.

O gênero *Eucalyptus* L'Hér. têm sido a principal escolha para as florestas plantadas devido à sua elevada produtividade, ao seu rápido crescimento e adaptabilidade. Registre-se, que, com as futuras e esperadas mudanças climáticas, regimes alterados de temperatura e precipitação irão aumentar a frequência e a intensidade de secas, fator que pode limitar a produtividade dessa cultura. Em adição, outro fator limitante no cultivo de eucalipto são as perdas ocasionadas pelo inseto galhador *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). Sabe-se também que a presença do inseto *L. invasa* causa alterações hormonais em híbridos de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, no período entre 24 e 96 horas após o ataque. Ainda, no clone resistente a esse inseto, ocorre um aumento nos níveis de aminoácidos precursores tanto do processo de sinalização responsiva, quanto de mecanismos associados a morte celular programada. Neste contexto, este trabalho investigou as alterações anatômicas e os mecanismos envolvidos na sinalização hormonal e no processo de morte celular programa de tecidos de plantas de eucalipto após ataque do inseto galhador *L. invasa*. Foram utilizados dois clones híbridos de *E. tereticornis* Sm. × *E. camaldulensis* Dehnh., um susceptível e outro com menor susceptibilidade (resistente) à *L. inavasa*. As características anatômicas, trocas gasosas e a expressão de genes relacionados com sinalização hormonal e morte celular programada foram avaliadas. O clone resistente quando infestado aumentou a espessura da parede celular realizando o isolamento das células que possivelmente sofrerão morte celular programada e, em adição, acumulou compostos fenólicos nas células saudáveis que se encontram próximas a região atacada pelo inseto. Ambos os clones, após 24 horas de infestação, sofreram reduções na taxa de transpiração e na concentração intercelular de CO<sub>2</sub>. Após 96 horas, os mesmos clones sofreram reduções na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> e transpiração. Quando infestado, o clone resistente apresentou maiores expressões de *PAD4* e *ERS2*, genes associados com AS e ET, respectivamente e, maiores expressões de *NAC1* que é um gene envolvido com morte celular programada. Tomados em conjunto, os resultados aqui obtidos indicam que uma vez atacado pelo inseto *L. invasa*, nas primeiras 24 horas, o clone resistente aumenta a espessura da parede celular das células ao redor da região atacada, onde a morte celular programada se inicia. Com efeito, 96 horas após a infestação, o clone resistente acumula compostos fenólicos nas células

ao redor dessa região atacada impedindo que as mesmas sofram também uma morte celular programada. Em síntese, o presente trabalho apresenta um potencial mecanismo capaz de explicar, ainda que parcialmente, a tolerância diferencial à *L. invasa* em clones de *Eucalyptus*.

**Palavras-chave:** Anatomia. Compostos Secundários. Expressão Gênica. Morte Celular Programada.

## ABSTRACT

ROCHA, João Pedro L., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Programmed cell death mediates eucalyptus resistance to the galling insect *Leptocybe invasa***. Adviser: Wagner L. Araújo. Co-advisers: Auxiliadora Oliveira Martins and Maíra Ignacio Sarmento.

The genus *Eucalyptus* L'Hér. has been the main choice for planted forests due to their high productivity, rapid growth, and adaptability. Register that, with future and expected climate changes, altered temperature and precipitation regimes will increase the frequency and intensity of droughts. Among the *Eucalyptus* species with greater drought tolerance are *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, and their hybrids. In addition, another limiting factor in eucalyptus cultivation is the losses caused by the galling insect *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). It is also known that the presence of the insect *L. invasa* causes hormonal alterations in hybrids of *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, in the period between 24 and 96 hours after the attack. Furthermore, in the clone tolerant to this insect, there is an increase in the levels of amino acid precursors of both the responsive signaling process and the mechanisms associated with programmed cell death. In this context, this work investigated the anatomical alterations and the mechanisms involved in the hormonal signaling and in the programmed cell death process of eucalyptus plant tissues after attack by the galling insect *L. invasa*. Two hybrid clones of *E. tereticornis* Sm. × *E. camaldulensis* Dehnh., one susceptible and one less susceptible (tolerant) to *L. invasa*. We evaluated the anatomical characteristics, gas exchange, and the expression of genes related to hormonal signaling and programmed cell death. The tolerant clone, when infested, increased the thickness of the cell wall by isolating cells that would possibly undergo programmed cell death and, in addition, accumulated phenolic compounds in healthy cells that are close to the region attacked by the insect. Both clones, after 24 hours of infestation, suffered reductions in the transpiration rate and in the intercellular CO<sub>2</sub> concentration. After 96 hours, both clones were characterized by reductions in CO<sub>2</sub> assimilation and transpiration. When infested, the tolerant clone was characterized by increased expression of *PAD4* and *ERS2*, which are genes associated with AS and ET, respectively, as well as an elevated expression of *NAC1*, which is a gene involved in programmed cell death. Taken together, the results obtained here indicate that once attacked by the insect *L. invasa*, in the first 24 hours, the tolerant clone increases the cell wall thickness of the cells around the attacked region, where programmed cell death begins. Indeed, 96 hours after infestation, the tolerant clone accumulates phenolic compounds in the cells surrounding the attacked region, preventing them from also suffering programmed cell death. In summary, the current work presents a

potential mechanism capable of explaining, at least partially, the differential tolerance *to L. invasa* observed in *Eucalyptus* clones.

**Keywords:** Anatomy. Secondary Compounds. Gene expression. Programmed Cell Death.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01.** Anatomia de ápices caulinares (secção transversal) em dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. .... 22
- Figura 02.** Avaliação de características anatômicas de ápices caulinares (secção transversal) de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. .... 24
- Figura 03.** Variação de parâmetros de trocas gasosas em folhas completamente expandidas de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. .... 27
- Figura 04.** Expressão relativa de genes associados com ácido salicílico e que são sinalizadores para indução de morte celular programada em ápices caulinares de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. .... 28
- Figura 05.** Expressão relativa de genes associados com etileno e que são sinalizadores para indução de morte celular programada em ápices caulinares de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. .... 30
- Figura 06.** Expressão relativa de genes associados a morte celular programada em ápices caulinares de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. .... 33

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>A</i>	taxa de assimilação foliar líquida de CO <sub>2</sub>
AJ	ácido jasmônico
ANOVA	análise de Variância
AS	ácido salicílico
C <sub>i</sub>	concentração de CO <sub>2</sub> intercelular
<i>E</i>	transpiração
ET	Etileno
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	espécies reativas de oxigênio
g <sub>s</sub>	condutância estomática
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
MeJa	metil jasmonato
n.s.	não significativo
PSII	fotossistema II
PVP	polivinilpirrolidona
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Área de estudo .....	16
2.2 Material vegetal .....	16
2.3 Criação e infestação de <i>Leptocybe invasa</i> .....	16
2.4 Delineamento estatístico .....	16
2.5 Análises anatômicas.....	17
2.6 Trocas gasosas foliares .....	17
2.7 Expressão gênica (qRT-PCR).....	18
2.8 Análises estatísticas .....	19
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 Infestação por <i>L. invasa</i> desencadeia acúmulo diferencial de compostos fenólicos em ápices caulinares .....	21
3.2 Ataque por <i>L. invasa</i> afeta anatomia celular em plantas susceptíveis de <i>Eucalyptus</i> ...	23
3.3 Impactos negativos na fotossíntese foram observados após infestação de <i>L. invasa</i> em <i>Eucalyptus</i> .....	25
3.4 Modificações transcricionais são desencadeadas em respostas ao ataque por <i>L. invasa</i> .....	27
3.4.1 Expressão de genes associados com ácido salicílico .....	27
3.4.2 Expressão de genes associados com etileno .....	29
3.4.3 Expressão de genes associados com morte celular programada.....	31
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupou, no ano de 2020, aproximadamente 0,2% de toda a área de floresta plantada no mundo com plantios de *Eucalyptus*, destacando-se como um dos mais importantes produtores mundiais (FAO, 2021). Com área total de 7,53 milhões de hectares e uma produção igual à  $38,9 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ , a eucaliptocultura no Brasil conta com plantios distribuídos em todas as suas regiões (IBA, 2022). O gênero *Eucalyptus* L'Hér. têm sido a principal escolha para as florestas plantadas devido à sua elevada produtividade, ao seu rápido crescimento, adaptabilidade e, principalmente, pelo fornecimento de matérias-primas para as indústrias de papel e celulose (Rosado; Rosado; Alves, 2012).

Em cenários de alterações climáticas é previsto que regimes alterados de temperatura e precipitação aumentem a frequência e a intensidade dos períodos de secas nas principais regiões produtoras de *Eucalyptus* afetando, negativamente, o crescimento e a sustentabilidade das florestas plantadas comerciais (Wu; Verbug; Tang, 2014). Com efeito, emissões de gases do efeito estufa aumentam os estresses ocasionados pela seca e calor e favorecem, por exemplo, surtos de pragas e fogo relacionados ao clima (Allen et al., 2010). Entre as espécies de *Eucalyptus* com maior tolerância à seca, estão *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e híbridos resultantes de seus cruzamentos (Gonçalves et al., 2013). Diante disso, têm-se buscado por genótipos mais resistentes à estresses abióticos, principalmente a limitação hídrica.

Outro fator limitante para o cultivo de eucalipto são as perdas ocasionadas por insetos-praga. Alguns desses insetos são originários da Austrália, mesmo local de origem do gênero *Eucalyptus* (Wingfield et al., 2009). Quando inseridos em um ambiente exótico, tais insetos-praga se deparam com uma grande quantidade de alimento e com a ausência de inimigos naturais, o que favorece, em larga escala, a disseminação dos mesmos nos plantios de eucalipto (Wingfield et al., 2009). Um desses insetos-praga é o inseto galhador *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), uma microvespa que ataca principalmente mudas em viveiros e/ou plantas jovens no campo. A fêmea oviposita abaixo da epiderme das nervuras centrais, nos pecíolos de primórdios foliares e nos entrenós dos ápices dos ramos das plantas de eucalipto, causando galhas onde o inseto se desenvolve (Sarmiento et al., 2020). As galhas modificam a circulação normal da seiva nos tecidos vasculares, alterando a produção de metabólitos associados ao processo fotossintético afetando, em última instância, o desenvolvimento das plantas infestadas e culminando em taxas de crescimento mais lentas (Isaias et al., 2018).

A formação de galhas por *L. invasa* resulta de um processo de desdiferenciação do tecido, quando a célula vegetal hospedeira se desenvolve em um novo tipo de célula da galha, com funções especializadas (Isaias et al., 2018). Esse processo se inicia com a oviposição da fêmea adulta nos tecidos jovens das plantas, tendo seu desenvolvimento mediado pela ação de hormônios e elicitores. O inseto galhador assume a maquinaria das células parasitadas, induzindo-as a retornarem a sua condição meristemática (Isaias et al., 2018), alterando sua fisiologia, morfologia e anatomia em seu favor.

*L. invasa* causa alterações nos teores de hormônios nas plantas atacadas, tais como, giberelinas, auxinas e ácido abscísico (Li et al., 2017). Em adição, a dinâmica de nitrogênio, compostos fenólicos e taninos nessas plantas é também modificada pela presença do inseto (Li et al., 2017). Tais compostos estão diretamente relacionados aos mecanismos bioquímicos da defesa das plantas e, quando em situação de ataque, as plantas respondem aumentando a biossíntese desses compostos secundários (Kuster et al., 2019).

A defesa das plantas frente ao forrageamento de artrópodes herbívoros é o resultado de uma combinação entre defesa constitutiva e induzida. Os principais reguladores das defesas induzidas de plantas são reconhecidamente o ácido jasmônico (AJ), o ácido salicílico (AS) e o etileno (ET) (Pieterse et al., 2012). Registre-se que a maneira e o momento em que a planta irá acionar seus mecanismos de defesas são determinados pela interação entre estes hormônios, os quais são responsáveis pela ativação de genes envolvidos na produção de compostos de defesa, tais como, inibidores de protease, peptidases, proteínas degradadoras de aminoácidos, polifenol oxidases, lecitinas, proteínas relacionadas à patogenicidade, pequenas proteínas de defesa ricas em cisteína, fenóis, isoprenóides, alcalóides, entre outros (Kant et al., 2015).

As defesas induzidas dependem de sistemas específicos de detecção de presença de patógenos ou herbívoros bem como de rotas de transdução de sinal, de modo a alterar eficientemente a expressão gênica e o metabolismo de defesa vegetal (Aljory & Chen, 2018). Dessa forma, a defesa induzida permanece desativada até a detecção do ataque do inseto, evitando gastos metabólicos (Oates et al., 2016). Para dar início à sua defesa, a planta deve, portanto, ser capaz de perceber o ataque do inseto, o que ocorre através de elicitores, que são compostos produzidos pelo inseto e, posteriormente, injetados nos tecidos vegetais, como constituintes de secreção oral ou fluidos de oviposição (Kant et al., 2015). Tais elicitores ativam rotas de hormônios responsáveis pela defesa da planta, como ET, AJ e AS, estes que desencadeiam uma resposta de transdução de sinal que regula a expressão gênica, culminando nas respostas de defesa na planta (Mitchell et al., 2016).

Em resposta às condições de estresse aumentos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) são usualmente observados em plantas (Tariq et al., 2019). Essas EROs, que incluem íons superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ocasionam danos consideráveis a proteínas, DNA e lipídios, podendo inibir o crescimento vegetal (Tariq et al., 2019). Entretanto, aumentos nos níveis de EROs funcionam como mediador do estresse para a planta. Neste contexto, quando a intensidade de um fator estressante é elevada, a indução da morte celular programada funciona como um mecanismo de defesa. Este é um processo ativo, geneticamente controlado, que é iniciado para isolar e remover tecidos danificados garantindo, assim, a sobrevivência da planta (Petrov et al., 2015).

No período entre 24 e 96 horas após a infestação com *L. invasa* híbridos resistentes de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis* foram caracterizados não apenas por uma alteração hormonal, mas também por aumentos nos níveis de aminoácidos precursores tanto do processo de sinalização responsiva (AJ, AS, ET), quanto de mecanismos associados à morte celular programada, sendo alguns desses precursores a alanina, ornitina e a putrecina (Carvalho, 2019; Sarmiento, 2019; Pinto et al., 2022). Todavia, os processos de sinalização e reprogramação metabólica que culminam na tolerância ao inseto não foram ainda completamente elucidados. Diante disso, nossa hipótese é de que a tolerância diferencial ao ataque do inseto *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) seja mediada por uma rápida reprogramação metabólica que culmina na morte celular programada e isolamento completo da região ovopositada. Para tanto, essa resposta seria possivelmente desencadeada não apenas por alterações hormonais, mas também pela presença de compostos secundários no local atacado por esse inseto galhador, bem como por alterações nos padrões de expressão de genes envolvidos nessa resposta.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Área de estudo**

O experimento foi conduzido em Casa de Vegetação na Estação Experimental de Pesquisa da Universidade Federal do Tocantins – UFT, no Campus Universitário de Gurupi (11°43' S e 49°04' O 284 m de altitude). O clima da região é do tipo Aw, com uma temperatura média anual de 26,1 °C e pluviosidade em torno dos 1776,4 mm anuais (Köppen, 2023).

### **2.2 Material vegetal**

Foram utilizados dois clones híbridos de *Eucalyptus tereticornis* Sm. × *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., com diferentes origens seminais. O clone VS 058 é susceptível à *L. invasa* (denominado como susceptível) (Aarmento et al., 2021), enquanto que o VS 062 é menos susceptível (denominado como resistente). Esses clones foram doados pelo viveiro S&D Florestal Viveiro, localizado no Município de Martinho Campos, Estado de Minas Gerais, Brasil. As mudas utilizadas neste trabalho são provenientes de matrizes desses clones, a partir delas foram produzidas as mudas no viveiro do Laboratório de Fitossanidade - Ecologia Aplicada e Funcional, da UFT. Aos 120 dias de idade, as mudas produzidas em tubetes foram transplantadas para vasos com capacidade de 3,6 litros, contendo substrato comercial. Posteriormente, as mudas foram aclimatadas por um período de 30 dias, sendo irrigadas diariamente e adubadas quinzenalmente com 3 g de NPK (4:14:8).

### **2.3 Criação e infestação de *Leptocybe invasa***

A criação de *L. invasa* foi iniciada através de mudas parasitadas do clone VS 058. Essas mudas foram colocadas em gaiolas de madeira, revestidas com tecido organza (2,5 m de largura; 2,6 m comprimento 3,0 m de altura), denominada de gaiola de criação. A partir dessa gaiola de criação foram retiradas as vespas que foram usadas no experimento. Cada planta do experimento teve aproximadamente 6 galhos envolvidos por uma sacola de organza contendo um microtubo de centrifugação contendo duas vespas. Os microtubos foram abertos para que as vespas saíssem para realizar a oviposição. Após 24 horas de infestação, as vespas foram retiradas juntamente com as sacolas. As plantas controle, que não foram infestadas, também foram envolvidas com sacolas de organza.

### **2.4 Delineamento estatístico**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições por tratamento, sendo eles: clone susceptível controle, clone susceptível

infestado, clone resistente controle e clone resistente infestado. Foram realizados dois pontos de coleta, 24 e 96 horas após a infestação do inseto, para as análises anatômicas e moleculares.

## 2.5 Análises anatômicas

Foi avaliado o corte transversal de ápices ovipositados pelo inseto *L. invasa* e ápices das plantas do tratamento controle, isso nos dois tempos, 24 e 96 horas após a infestação do inseto. Os ápices foram coletados e fixados em FAA50 (formaldeído, ácido acético, etanol 50% na proporção de 5:5:9 v/v), por 48 h, posteriormente desidratados em série etanólica e incluídos em historesina (Leica, Heidelberg, Germany). O material foi cortado transversalmente (5  $\mu\text{m}$ ) em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, LEICA, Heidelberg, Germany), com a utilização de navalhas de vidro. As secções foram coradas, sendo posteriormente montados segundo técnicas usuais de anatomia vegetal (Kraus & Arduin, 1997).

As análises anatômicas e a documentação fotográfica referentes a microscopia de luz foram realizadas em fotomicroscópio Olympus AX 70 com sistema U-Photo. Foi utilizado o reagente azul de toluidina para detecção de compostos fenólicos. O azul de toluidina foi preparado na concentração de 0,05% em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 6,5. Os cortes foram colocados na solução de azul de toluidina por 2 minutos, em seguida foram lavados em água (O'Brien; Feder; Mccully, 1964). Além da função de corar compostos fenólicos, o azul de toluidina cora paredes celulósicas permitindo visualizar a espessura das paredes bem como as dimensões das células nos tecidos avaliados. Com isso, foi mensurado a espessura de parede, o número e área de células nos tecidos atacados pelo inseto *L. invasa*.

## 2.6 Trocas gasosas foliares

As medições de trocas gasosas foram realizadas com sistema IRGA de troca de gás LCi-SD (ADC Bioscientific, Hoddesdon, Inglaterra). Taxa foliar líquida de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), transpiração ( $E$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e, concentração de carbono intercelular ( $C_i$ ) foram determinados. Os dados foram registrados quando os parâmetros medidos eram estáveis (2-4 min). Dentro da câmara, as seguintes condições foram mantidas durante todas as medições:  $C_a$  (concentração ambiental de  $\text{CO}_2$ ): 418  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; fluxo de ar: 400  $\mu\text{mol s}^{-1}$ ; temperatura do bloco (temperatura ambiental)  $\cong 35$   $^\circ\text{C}$ ; humidade relativa da entrada de ar: 35-50%. A intensidade da luz utilizada foi de aproximadamente 980  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de acordo com a curva de disponibilidade luminosa máxima do local de realização dos experimentos. Foi utilizada a primeira folha completamente expandida das plantas.

## 2.7 Expressão gênica (qRT-PCR)

A análise quantitativa de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada com RNA total isolado de ápices caulinares coletados 24 e 96 horas após a infestação com *L. invasa*. O protocolo utilizado para a extração de RNA foi adaptado de Doyle & Doyle (1987). Antes de iniciar o processo de extração foi preparado o tampão de extração (CTAB 2%; PVP-40 2,5%; NaCl 2M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 25 mM; 2 µL de 2-mercapto-etanol por mL de tampão) que foi aquecido em banho-maria por 30 min à 65 °C. Com o tampão de extração ainda quente, adicionou-se 700 µL do tampão em cada tubo contendo 15 mg de ápice liofilizado e macerado. Com a adição do tampão os tubos foram vortexados, em seguida eles foram incubados no termomixer por 20 min e 300 rpm à 65 °C. Feito isso, dentro da capela de exaustão foi adicionado 600 µL de CIA (Clorofórmio–Álcool isoamílico, 24:1), em seguida os tubos foram vortexados e invertidos por 5 min até fazer uma emulsão homogênea. Posteriormente os tubos foram centrifugados em temperatura ambiente à 14 rpm por 5 min, feito isso ~540 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo juntamente com 50 µL de uma solução CTAB 10% (CTAB 10%; NaCl 2%), em seguida os tubos foram vortexados até formar uma solução homogênea. Logo após, repetimos a extração com CIA, seguida de uma centrifugação à 4 °C com 15000 rpm por 10 min. Depois da centrifugação, ~400 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos novos juntamente com 270 µL de isopropanol gelado (-20 °C), feito isso os tubos foram misturados calmamente e levados para o freezer -20 °C onde permaneceu por um intervalo de 2 horas. Após esse intervalo de tempo os tubos foram centrifugados à 4 °C com 15000 rpm por 5 min, em seguida o sobrenadante foi descartado e então iniciou-se a etapa de lavagem do pellet. Primeiramente os pellets foram lavados 2 vezes em 1 mL de álcool 70% gelado e centrifugados à 4 °C com 12000 rpm por 5 min. A seguir realizou-se uma lavagem com etanol absoluto gelado com centrifugação à 4 °C com 12000 rpm por 10 min. Por último os pellets foram deixados para secar ao ar livre por 10 min, e só então foram ressuspensos em 20 µL de H<sub>2</sub>O RNase free.

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose a 1% (p/v) e a concentração determinada, antes e após a digestão com DNase I, usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (<http://www.nanodrop.com/>). A digestão com DNase I (Ambion; <http://www.ambion.com/>) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total usando a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen; <http://www.invitrogen.com/>) de acordo com as instruções do fabricante.

A PCR quantitativa foi realizada utilizando o kit Power Syber Green, master mix. As amostras foram amplificadas segundo o programa: 94 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 56 °C por 15 s e 72 °C por 15 s. Para confirmar a presença de um único produto de amplificação, específico para cada reação, uma curva de desnaturação foi realizada imediatamente após a amplificação.

Os primers para cada gene alvo foram desenhados usando a ferramenta Primer-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)). Foram usados dois genes de referência, um que codifica proteínas contendo domínio SAND (*SAND*), e outro que codifica fatores de alongamento 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ). Os genes associados com as vias do ácido salicílico que foram avaliados incluem o *NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1* (*NPR1*), *PEPTIDYL ARGININE DEIMINASE 4* (*PAD4*), e o *SALICYLIC-ACID-INDUCTION DEFICIENT 2* (*SID2*). Com relação aos genes associados com vias do etileno, avaliou-se o *ETHYLENE-INSENSITIVE PROTEIN 2* (*EIN2*), *ARABIDOPSIS A-FIFTEEN* (*AAF*), e o *ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2* (*ERS2*). Também avaliamos genes associados com a morte celular programada, como o que codificam proteínas contendo domínio NAC (*NAC1*), o *VACUOLAR-PROCESSING ENZYME* (*VPE*), o *BINDING PROTEIN* (*BiP*), e por último o gene do fator de transcrição *WRKY 12* (*WRKY12*). Os respectivos primers dos genes avaliados estão descritos na Tabela 01. As leituras foram realizadas no equipamento Applied Biosystem StepOnePlus™ Software v2.0. O cálculo das expressões gênicas relativas foi realizado usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001), com três réplicas biológicas.

## 2.8 Análises estatísticas

Para verificar os efeitos dos fatores clone (susceptível e resistente), vespa (plantas controle e plantas infestadas) e a interação entre os fatores uma Análise de Variância (ANOVA) foi realizada. Tais análises foram realizadas, de modo isolado, em cada tempo de avaliação. Quando aplicável, um teste de comparações múltiplas (Teste Tukey), com nível de significância ( $p < 0,05$ ) foi realizado no software Sisvar.

Tabela 01. Primers utilizados para qRT-PCR.

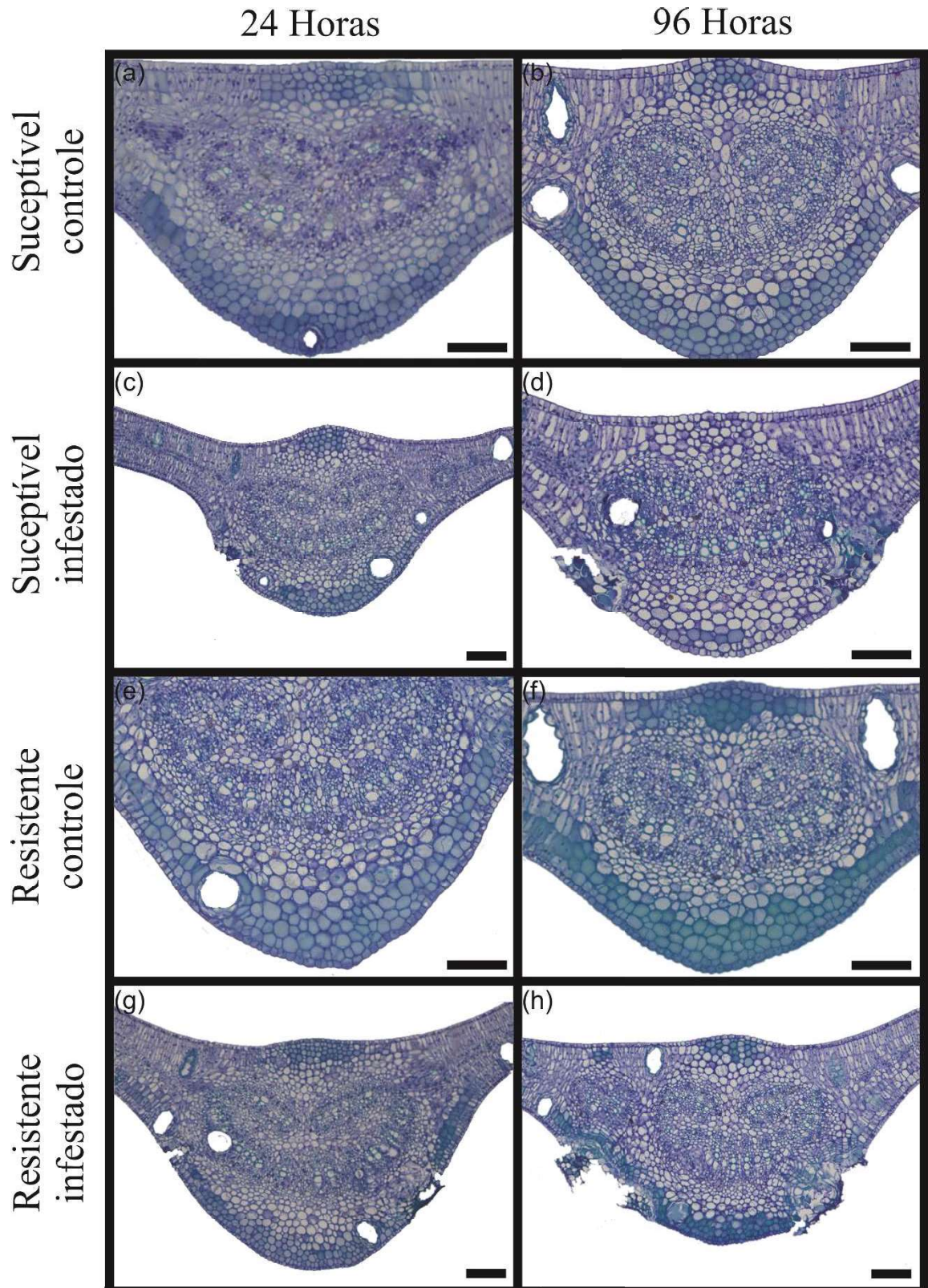
Nome	Locus	Sequência de Nucleotídeos (5' -3')	Referência	Homologo	Acesso
<i>SAND</i>	-	F <sub>w</sub> - CGTGTATGTCAAATGGGTGAAAG	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Eucgr.B02502.1
		R <sub>v</sub> - TAGCAGGCAATACATCACCAAG			
<i>EF1α</i>	-	F <sub>w</sub> - TGCTTTGCTCGCTTTCACTC	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Eucgr.B02473.1
		R <sub>v</sub> - TTCATCGTACCTTGCCCTTGG			
<i>NPRI</i>	LOC104438079	F <sub>w</sub> - TCGTGAGGTCCCATTGAGTAGC	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.004754m
		R <sub>v</sub> - AAGCGTTTGCCGAGTTCCAC			
<i>NAC</i>	LOC108961078	F <sub>w</sub> - GAACTGTTTCCACATGCTCCTACC	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.003193m
		R <sub>v</sub> - AGCCTGAAATCCAAAGTCCATCAAG			
<i>BiP</i>	LOC104444086	F <sub>w</sub> - TTGGATGTGGCTCCCTTGACTC	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.004242m
		R <sub>v</sub> - ACACCTGAATGGATACGGTGGTC			
<i>PAD4</i>	LOC104420106	F <sub>w</sub> - GCTGAAAGGCTCTCAACCCAAAG	NCBI	<i>S. penelli</i>	Egrandis_v1_0.016859m
		R <sub>v</sub> - GCTCTTGTCTGAACCAAGGTTT			
<i>VPE</i>	LOC104437823	F <sub>w</sub> - AAAGCTGTTAACCCAGCGGGATG	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.010520m
		R <sub>v</sub> - CCTTCAGGAGCTTTACGGAACTTG			
<i>SID2</i>	LOC104444070	F <sub>w</sub> - CTATTGTCCTGACGGGAATGAGTG	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.000133m
		R <sub>v</sub> - GCCAGTTGCTTCAAAGGTTGGG			
<i>EIN2</i>	LOC104425071	F <sub>w</sub> - GGGAAATGGCACACGCACATAAATC	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.000559m
		R <sub>v</sub> - AGTTTGGCCCTTGCAGTTCTCCA			
<i>AAF</i>	LOC104422158	F <sub>w</sub> - CGTGCACGTC AAGATGTTGCTA	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.016145m
		R <sub>v</sub> - AGTATCCTCTCTTGCCCCGAGCA			
<i>ERS2</i>	LOC104414557	F <sub>w</sub> - GCAAAATGGCTAGTACAGTTGATGC	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.003595m
		R <sub>v</sub> - AGTGGGAACCGTAGGACAAGTG			
<i>WRKY12</i>	LOC104441359	F <sub>w</sub> - AGTGAAGGCAACAATTCGTGGTG	NCBI	<i>A. thaliana</i>	Egrandis_v1_0.029035m
		R <sub>v</sub> - TGTAGCCATCGTCCCAACACATCC			

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Infestação por *L. invasa* promove acúmulo diferencial de compostos fenólicos em ápices caulinares

Quando corados com o corante azul de toluidina, os cortes anatômicos apresentam coloração esverdeada nas regiões em que ocorre acúmulo de compostos fenólicos. Diante disso, observamos que no período de 24 horas a presença de compostos fenólicos no clone resistente foi mais marcante que a observada no clone susceptível, para ambos os controles (Figura 1a, e). Quando infestado pelo inseto *L. invasa*, o clone resistente continua, aparentemente, apresentando compostos fenólicos, além de realizar um isolamento do tecido danificado pelo ataque do inseto (Figura 1g). Por outro lado, 24 horas após a infestação, no clone susceptível não se observou acúmulo de compostos fenólicos, muito menos o isolamento dos tecidos danificados, e assim uma extensa desorganização celular foi visualizada (Figura 1c).

Após o período de 96 horas, a coloração esverdeada manteve-se mais marcante nas plantas do clone resistente em condições controle do que nas plantas controle do clone susceptível, indicando uma presença naturalmente maior de compostos fenólicos no clone resistente (Figura 1b, f). Neste mesmo período, observamos também o isolamento do tecido danificado e o acúmulo de compostos fenólicos nas células ao redor da área atacada no clone resistente infestado, em que as plantas aparentemente iniciaram a formação de uma nova epiderme, retornando para sua conformação anterior ao ataque do inseto galhador *L. invasa* (Figura 1h). Para o clone susceptível infestado, ainda nos deparamos com a ausência de compostos fenólicos e com a desorganização celular associada com a formação da galha (Figura 1d).



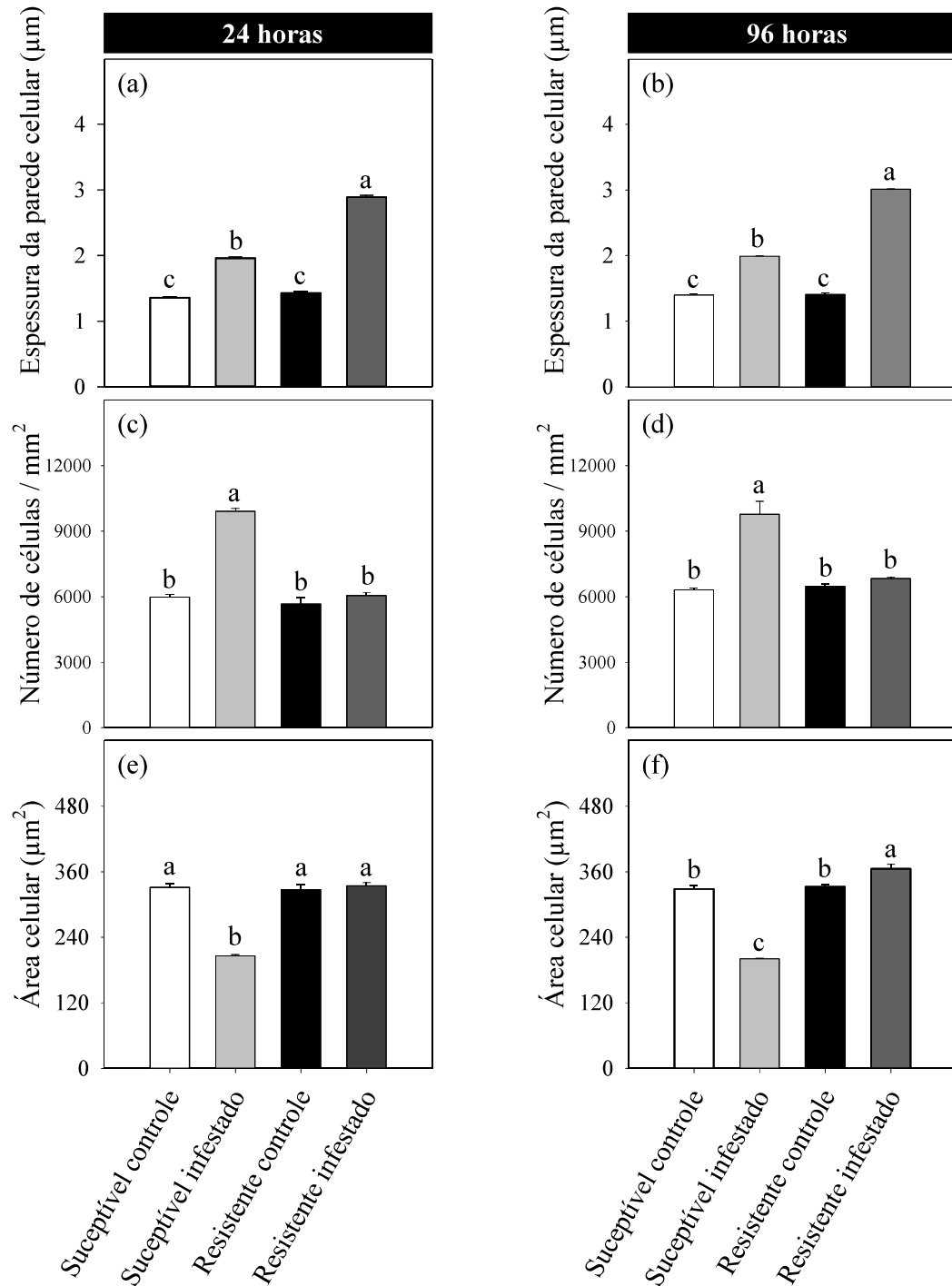
**Figura 01.** Anatomia de ápices caulinares (secção transversal) em dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. (a) susceptível controle 24 horas. (b) susceptível controle 96 horas. (c) susceptível infestado 24 horas. (d) susceptível infestado 96 horas. (e) resistente controle 24 horas. (f) resistente controle 96 horas. (g) resistente infestado 24 horas. (h) resistente infestado 96 horas. Escala = 20  $\mu\text{m}$  (a, b, d, e, f), 10  $\mu\text{m}$  (c, g, h).

### **3.2 *L. invasa* afeta anatomia celular em plantas susceptíveis de *Eucalyptus***

No período de 24 horas, observamos que a espessura da parede celular das plantas infestadas foi maior do que a das plantas controles, sendo maior no clone resistente infestado, seguido pelo susceptível infestado (Figura 2a). Após 96 horas, comportamento semelhante ao observado no período anterior se repetiu, onde maiores espessuras foram as do clone resistente infestado, seguido pelo susceptível infestado (Figura 2b).

Devido a desorganização celular observada no clone susceptível infestado, resolvemos avaliar as densidades e a área celulares na região atacada pelo inseto *L. invasa*, nos tempos de 24 e 96 horas. Nas primeiras 24 horas, o clone susceptível infestado apresentou um maior número de células por mm<sup>2</sup> do que as plantas dos demais tratamentos (Figura 2c). Com 96 horas o padrão se repetiu, e o clone susceptível infestado apresentou o maior número de células (Figura 2d).

As plantas do clone susceptível infestado, após 24 horas, apresentaram uma menor área celular, ou seja, na região atacada, suas células apresentaram um tamanho menor quando comparadas com os demais tratamentos (Figura 2e). Já com 96 horas, as plantas do clone resistente apresentaram uma maior área celular, enquanto as plantas do clone susceptível infestado continuaram apresentando uma área celular menor do que os demais tratamentos, estes que não diferiram entre si (Figura 2f).

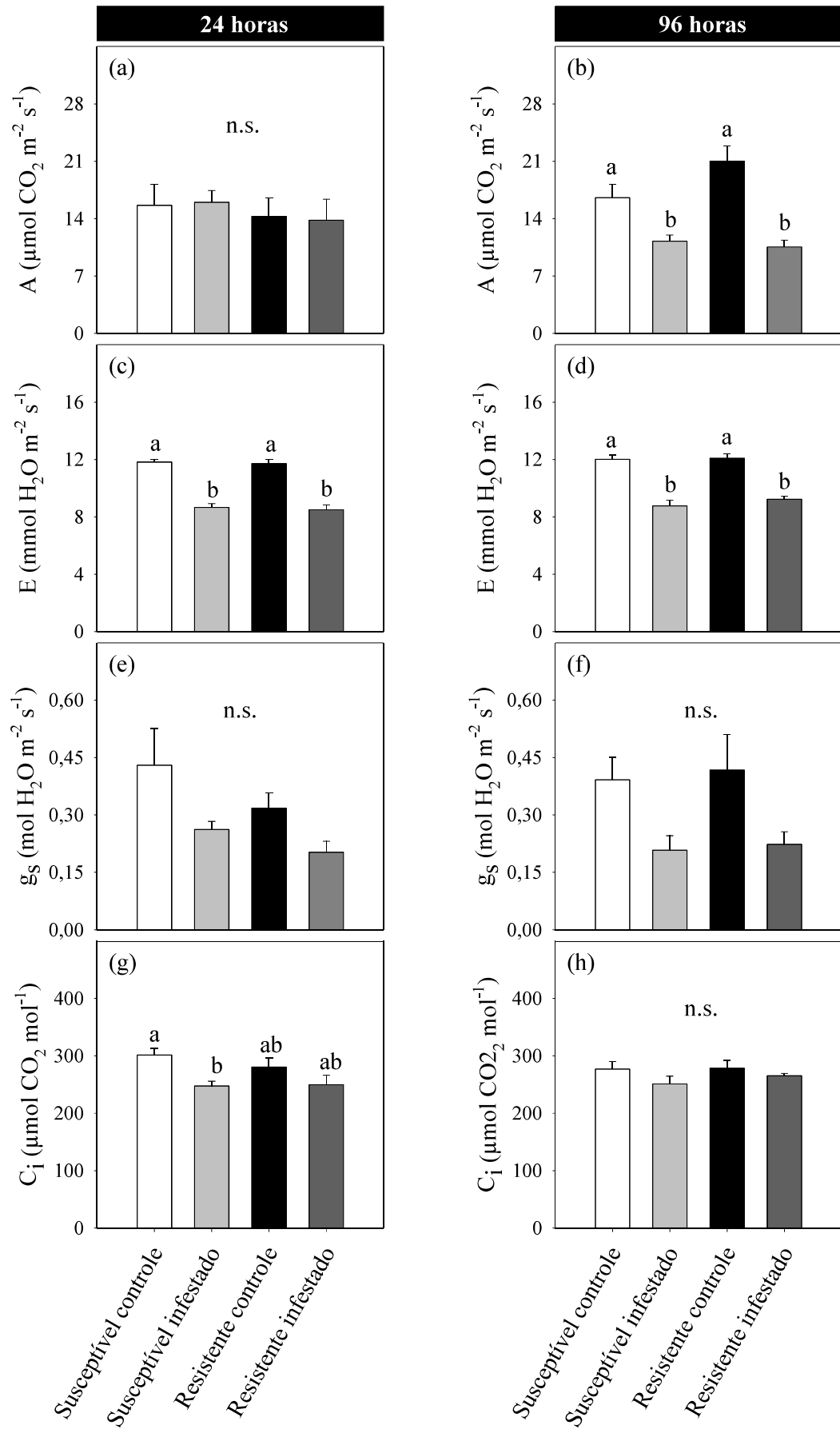


**Figura 02.** Avaliação de características anatômicas de ápices caulinares (secção transversal) de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. (a) espessura da parede celular com 24 horas, (b) espessura da parede celular com 96 horas, (c) número de células por mm<sup>2</sup> com 24 horas, (d) número de células por mm<sup>2</sup> com 96 horas, (e) área das células com 24 horas, (f) área das células com 96 horas. As barras correspondem à média  $\pm$  erro-padrão. Comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), diferentes letras significam diferença entre os tratamentos.

### **3.3 Impactos negativos na fotossíntese foram observados após infestação de *L. invasa* em *Eucalyptus***

Com 24 horas observamos que para a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> não houve diferença entre os tratamentos (Figura 3a). Entretanto, após 96 horas observamos que tanto o clone resistente infestado como o clone susceptível infestado sofreram reduções equivalentes à 45,13% e 32,13%, respectivamente, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 3b). Com relação a transpiração, com 24 horas as plantas infestadas (clones susceptível e resistente) apresentaram reduções quando comparados com seus controles (Figura 3c). Em 96 horas observou-se o mesmo comportamento do período anterior, onde tanto o clone susceptível infestado como o clone resistente infestado sofreram reduções quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 3d).

Ao se analisar a condutância estomática, não foram observadas alterações significativas entre os clones e tratamentos em nenhum dos tempos avaliados (Figura 3e, f). No que se refere a concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, observamos que com 24 horas os valores observados para o clone susceptível infestado foram inferiores aos observados para o susceptível controle, enquanto que para os clones resistente controle e resistente infestado não foram encontradas diferenças significativas (Figura 3g). Com 96 horas não houve diferenças significativas entre os valores de concentração intercelular CO<sub>2</sub> para os tratamentos aqui avaliados (Figura 3h).

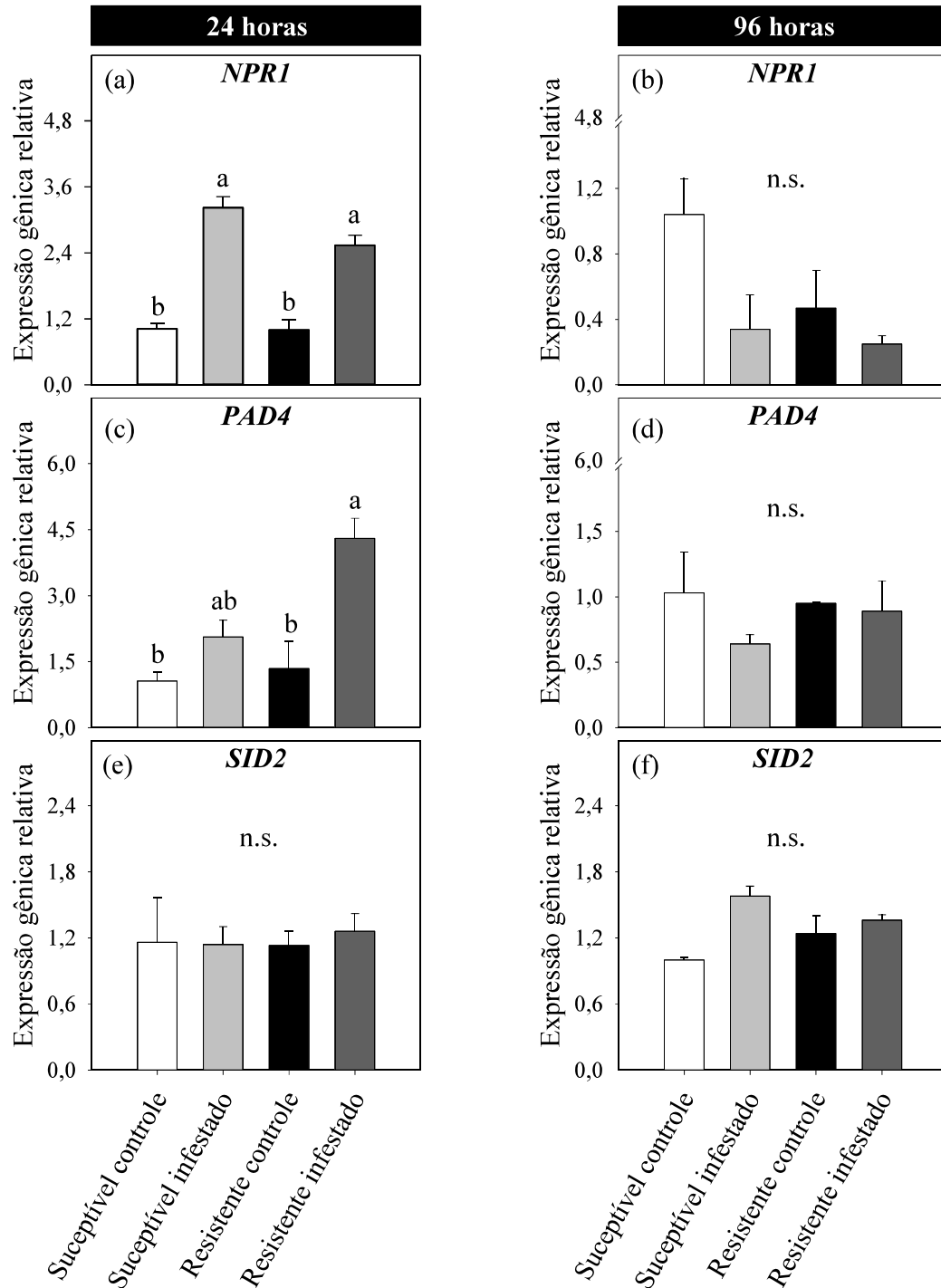


**Figura 03.** Variação nos parâmetros de trocas gasosas em folhas completamente expandidas de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. (a) assimilação líquida de CO<sub>2</sub> com 24 horas, (b) assimilação líquida de CO<sub>2</sub> com 96 horas, (c) transpiração com 24 horas, (d) transpiração com 96 horas, (e) condutância estomática com 24 horas, (f) condutância estomática com 96 horas, (g) concentração de carbono intercelular com 24 horas, (h) concentração de carbono intercelular com 96 horas. As barras correspondem à média ± erro-padrão das repetições. Comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), diferentes letras significam diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

### **3.4 Modificações transcricionais são desencadeadas em respostas ao ataque por *L. invasa***

#### **3.4.1 Expressão de genes associados com ácido salicílico**

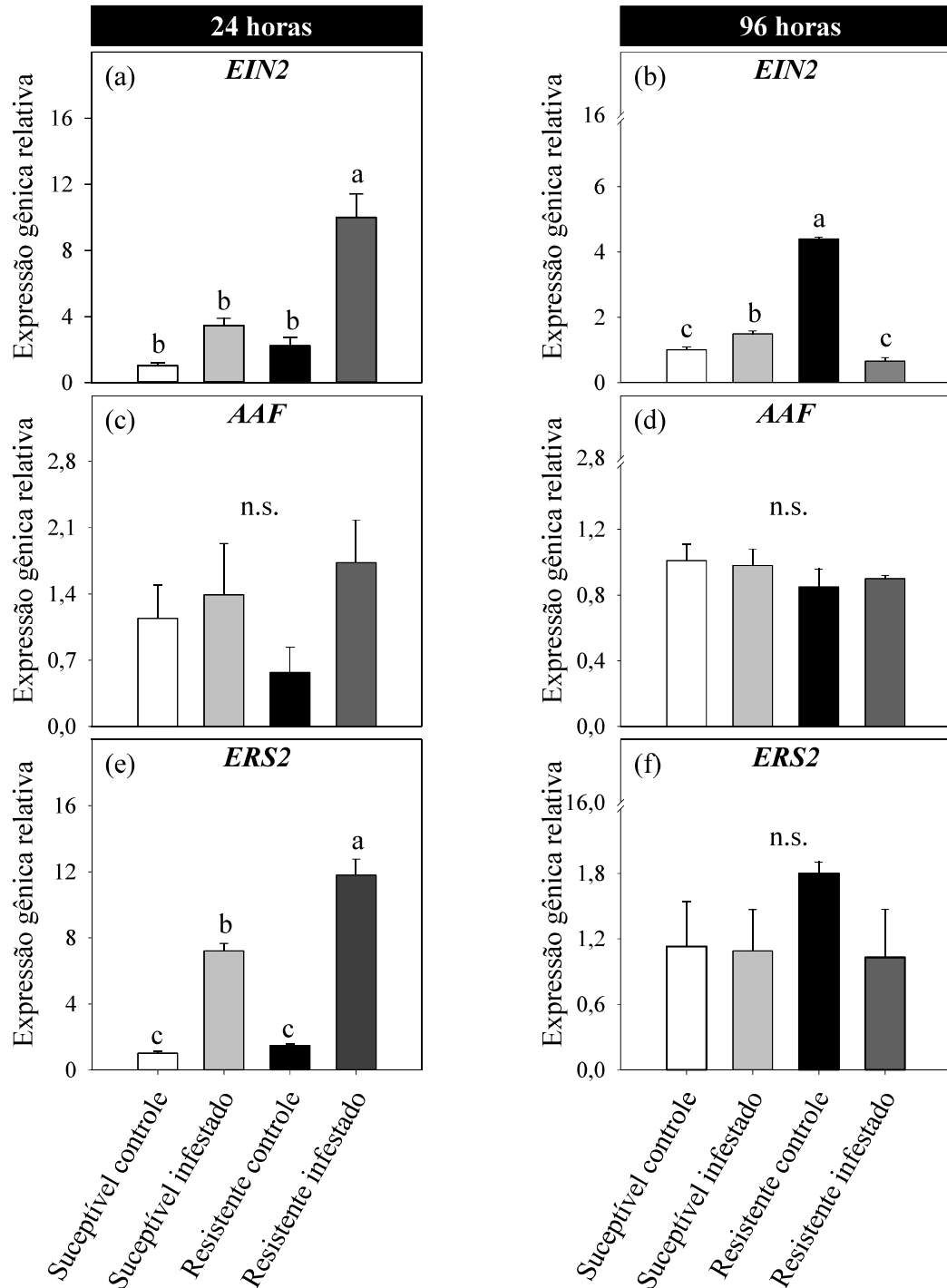
Assim, para o gene *NPR1*, observamos que 24 horas após a infestação houve uma maior expressão nos clones infestados quando comparados aos controles (Figura 4a), enquanto que no período de 96 horas não foi encontrada expressão significativa do gene *NPR1* nos tratamentos avaliados (Figura 4b). Quando comparado aos demais tratamentos observamos que o gene *PAD4* foi mais expresso com 24 horas no clone resistente infestado (Figura 4c). Já com 96 horas não foram identificadas diferenças significativas entre os clones nas condições controle e infestado (Figura 4d). No que se refere ao gene *SID2* não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados (Figura 4g, h).



**Figura 04.** Expressão relativa de genes associados com ácido salicílico e que são sinalizadores para indução de morte celular programada em ápices caulinares de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. Os dados de expressão gênica foram relativizados pela média dos valores do tratamento susceptível controle. (a) expressão relativa do gene *NPR1* com 24 horas, (b) expressão relativa do gene *NPR1* com 96 horas, (c) expressão relativa do gene *PAD4* com 24 horas, (d) expressão relativa do gene *PAD4* com 96 horas, (e) expressão relativa do gene *SID2* com 24 horas, (f) relativa expressão do gene *SID2* com 96 horas. As barras correspondem à média  $\pm$  erro-padrão de três réplicas biológicas. Comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), diferentes letras significam diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

### 3.4.2 Expressão de genes associados com etileno

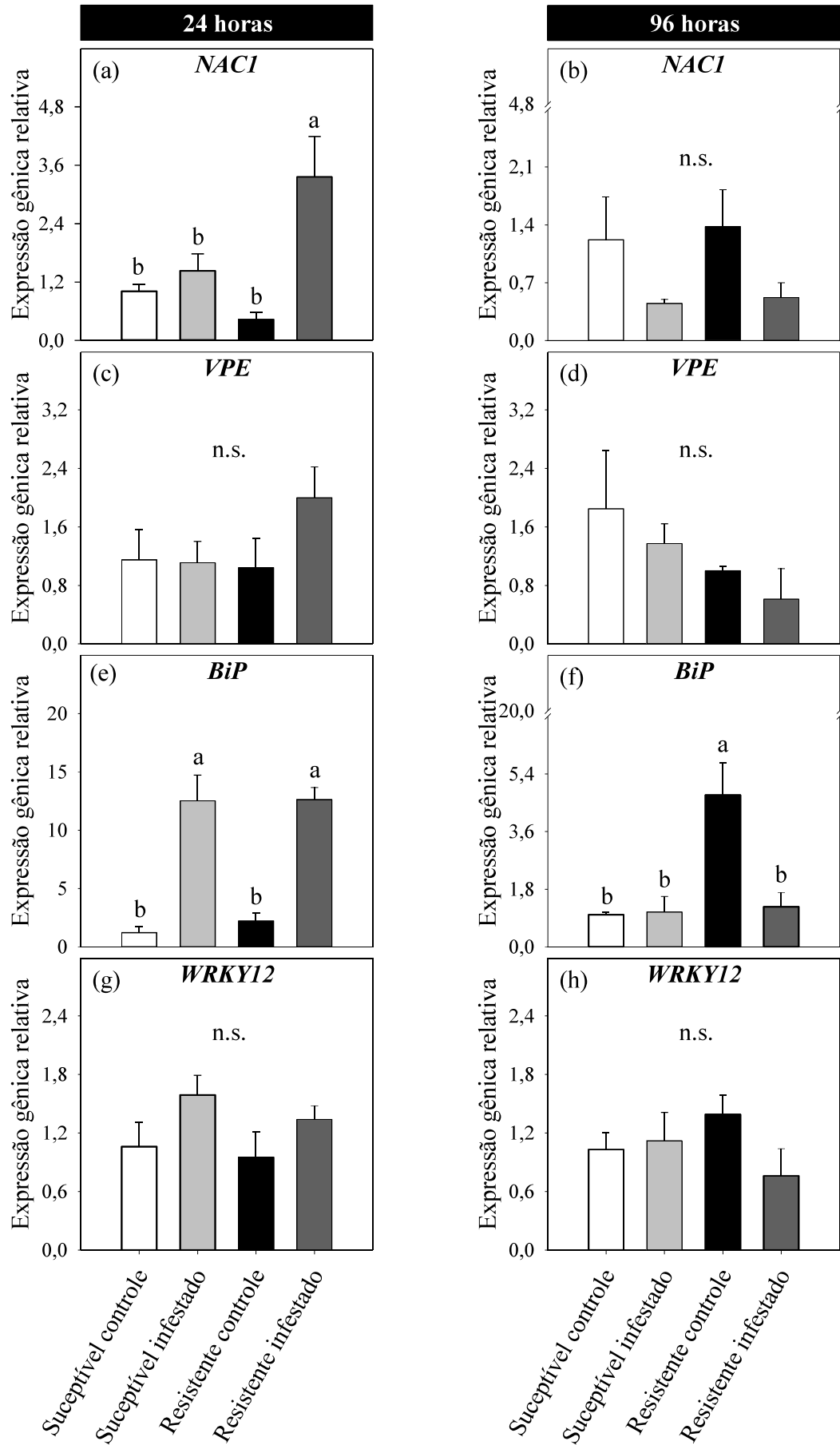
Após 24 horas, a expressão do gene *EIN2* foi maior nas plantas dos clones infestados do que nas dos controles (Figura 5a). Já após 96 horas houve uma maior expressão do gene *EIN2* nas plantas do clone resistente infestado quando comparado com os demais tratamentos. Contudo, observamos também que as plantas do clone susceptível infestado também apresentaram uma expressão maior do gene *EIN2* quando comparado com os controles (Figura 5b). Com relação ao gene *AAF*, tanto no período 24 horas quanto no período 96 horas não foram identificadas diferenças significativas entre os clones infestados e seus respectivos controles (Figura 5c, d). Ao se analisar o gene *ERS2*, observamos que após 24 horas as plantas dos clones infestado apresentaram uma expressão significativamente maior em relação aos clones em condições controle (Figura 5e). Já no período de 96 horas para esse gene não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (Figura 5f).



**Figura 05.** Expressão relativa de genes associados com etileno e que são sinalizadores para indução de morte celular programada em ápices caulinares de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. Os dados de expressão gênica foram relativizados pela média dos valores do tratamento susceptível controle. (a) expressão relativa do gene *EIN2* com 24 horas, (b) expressão relativa do gene *EIN2* com 96 horas, (c) expressão relativa do gene *AAF* com 24 horas, (d) expressão relativa do gene *AAF* com 96 horas, (e) expressão relativa do gene *ERS2* com 24 horas, (f) relativa expressão do gene *ERS2* com 96 horas. As barras correspondem à média  $\pm$  erro-padrão de três réplicas biológicas. Comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), diferentes letras significam diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

### 3.4.3 Expressão de genes associados com morte celular programada

Após 24 horas de infestação, observou-se que o clone resistente infestado expressou maior expressão do gene *NAC1* que os demais tratamentos; entretanto, tal comportamento não foi observado após 96 horas de infestação, não sendo observado diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 6a, b). Já com o gene *VPE*, em nenhum dos períodos de avaliação foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (Figura 6c, d). No período de 24 horas após a infestação observamos que a expressão do gene *BiP* foi maior para ambos os clones infestados quando comparados aos tratamentos controles (Figura 6e). De forma contrária, observamos que, após 96 horas de infestação, a expressão do gene *BiP* foi maior no clone resistente controle que nos demais tratamentos (Figura 6f). Para o gene *WRKY12*, tanto no período de 24 horas quanto no período de 96 horas após a infestação não foram identificadas diferenças significativas entre os clones infestados e em condição controle (Figura 6g, h).



**Figura 06.** Expressão relativa de genes associados à morte celular programada em ápices caulinares de dois clones de *Eucalyptus* com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa*, com 24 e 96 horas após a infestação com a vespa. Os dados de expressão genica foram relativizados pela média dos valores do tratamento susceptível controle. (a) expressão relativa do gene *NAC1* com 24 horas, (b) expressão relativa do gene *NAC1* com 96 horas, (c) expressão relativa do gene *VPE* com 24 horas, (d) expressão relativa do gene *VPE* com 96 horas, (e) expressão relativa do gene *BiP* com 24 horas e (f) relativa expressão do gene *BiP* com 96 horas. (g) expressão relativa do gene *WRKY12* com 24 horas. (H) relativa expressão do gene *WRKY12* com 96 horas. As barras correspondem à média  $\pm$  erro-padrão de três réplicas biológicas. Comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), diferentes letras significam diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos anteriores sugerem que híbridos de *Eucalyptus tereticornis* Sm. × *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. com resposta diferencial de susceptibilidade à *L. invasa* provavelmente usam da morte celular programada para suprimir o desenvolvimento deste inseto uma vez que este se encontra dentro da planta (Sarmiento, 2019; Pinto et al., 2022). Os resultados aqui obtidos, com análises anatômicas, demonstram que as plantas do clone resistente, nas primeiras 24 horas após a infestação, foram capazes de isolar os tecidos danificados pelo ataque do inseto (Figura 1g). Com efeito, tal fato foi ainda confirmado com as análises realizadas em plantas 96 horas após a infestação (Figura 1h). Aparentemente, o espessamento da parede celular das células próximas ao local de oviposição de *L. invasa* demonstrou ter um importante papel no isolamento dessa região (Figura 1g, h). Em consonância com os resultados aqui obtidos, que demonstram a maior expressão de genes associados com AS (Figura 3), foi demonstrado anteriormente que o AS apresenta não apenas a capacidade de promover a expressão de genes envolvidos na biossíntese de paredes celulares, mas promove também o aumento da recalcitrância das paredes celulares em *Brachypodium distachyon* (Napoleão et al., 2017).

Apesar desse comportamento ter sido também observado no clone susceptível infestado, o espessamento das paredes celulares foi menor quando comparados ao clone resistente, mesmo apresentando também a maior expressão do gene *NPR1*, gene este associado a AS. Esse resultado parece estar associado, ao menos em parte, ao fato de o clone susceptível apresentar um aumento da quantidade de AJ 24 horas após a infestação (Sarmiento, 2019), uma vez que quantidades de MeJA (um derivado do AJ) podem causar redução na expressão de sintases de celulose e de genes que desempenham um papel fundamental na biossíntese da parede celular secundária (Napoleão et al., 2017). Por outro lado, é plausível sugerir que o espessamento da parede celular nas plantas do clone susceptível não foi suficientemente eficaz no isolamento pois, além de apresentar um maior número de células por unidade de área que os demais tratamentos, essas plantas apresentaram células com área menor (Figura 1c, d). Em outras palavras, as células apresentaram menores tamanhos que é um indicativo de intensa divisão celular, processo característico da formação de galha em plantas. Quando o inseto *L. invasa* oviposita em linhas nas nervuras centrais e nos pecíolos das faces abaxiais dos primórdios foliares (Isaias et al., 2018), o parênquima associado aos tecidos vasculares passa por um processo denominado hiperplasia, que consiste no processo onde as células sofrem uma série de divisões mitóticas ao redor dos ovos depositados (Gonzalez & Solís, 2015).

A maior quantidade de compostos fenólicos nas células dos ápices caulinares do clone resistente controle (Figura 1e, f) é um indicador de importante resposta de defesa constitutiva à

*L. invasa*. E, como resposta de defesa induzida, esse mesmo clone também acumulou ainda mais compostos fenólicos ao redor da região atacada pelo inseto, 96 horas após a infestação. Os fenóis constituem um dos grupos mais comuns e importantes de compostos metabólitos secundários, que desempenham um papel vital nas respostas de defesa das plantas contra doenças, nematoides e insetos fitófagos (Misra et al., 2023). Tais compostos podem atuar tanto fisicamente, bloqueando patógenos e insetos, através da lignina, um heteropolímero fenólico, quanto quimicamente, atuando na redução cíclica de EROs, como ânion superóxido e radicais hidroxila, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigênio singleto (Misra et al., 2023). O aumento nos níveis de EROs é utilizado como mediador do sinal de estresse para a planta, sendo capaz não apenas de ativar genes, mas também de induzir mecanismos associados a morte celular programada (Petrov et al., 2015). Diante disso, parece razoável inferir que o clone tolerante quando atacado pelo inseto *L. invasa* nas primeiras 24 horas aumenta a espessura da parede celular das células ao redor da região atacada, onde está ocorrendo a morte celular programada das células atacadas; em adição, 96 horas após a infestação, o clone tolerante acumula compostos fenólicos nas células ao redor da região atacada impedindo que as mesmas aumentem seus níveis de EROs e sofram também uma morte celular programada.

Tanto a morte celular programada quanto a formação de galhas, ambos processos induzidos pelo inseto *L. invasa* (Sarmiento, 2019; Pinto et al., 2022), promoveram reduções significativas nas trocas gasosas nos clones avaliados. Com 24 horas, os clones infestados apresentaram reduções tanto na transpiração quanto na concentração interna de CO<sub>2</sub>. Os fitormônios AS, AJ e ET quando encontrados em níveis elevados dentro das plantas foram descritos como participantes na redução da condutância estomática em plantas sob condições de estresse (Ullah et al., 2018). Apesar de não encontrarmos uma diferença significativa entre os tratamentos no intervalo de 24 horas, podemos observar certa tendência na redução da condutância estomática nos clones infestados o que poderia explicar, ao menos em parte, as reduções na transpiração para os clones infestados, e a reduzida concentração intercelular de CO<sub>2</sub> para as plantas do clone susceptível infestado. No intervalo de 96 horas, observamos também que além de reduções na transpiração, as plantas dos clones infestados apresentaram reduções na assimilação de CO<sub>2</sub>. A elevação nos teores de MeJA parece diminuir a eficiência da fotossíntese, por comprometer o fotossistema II (PSII), um dos elementos mais sensíveis da maquinaria fotossintética, além de ser altamente responsivo a condições de estresse (Kurowska et al., 2020). Esse fato explicaria a redução da fotossíntese para o clone susceptível infestado uma vez que Sarmiento (2019) verificou aumentos em AJ, um antecessor do MeJA, em plantas desse clone 24 horas após a infestação. Cabe ressaltar também que o AS pode afetar direta ou

indiretamente vários processos fisiológicos, incluindo a fotossíntese. Níveis elevados de SA estão associados com condutância estomática reduzida, menores taxas máximas de assimilação de CO<sub>2</sub>, diminuição da eficiência máxima e rendimento quântico do PSII (Janda et al., 2014).

Os resultados relativos à expressão de genes envolvidos na sinalização de morte celular programada através do AS indicam que, 24 horas após a infestação, ambos os clones infestados foram caracterizados por uma maior expressão do gene *NPR1*; entretanto, somente o clone resistente infestado apresentou uma elevada expressão do gene *PAD4* (Figura 3). A interação da proteína PAD4 com EDS1 produz um complexo nucleocitoplasmático, que promove o acúmulo de moléculas de sinalização de defesa da planta, como o próprio AS (Pegadaraju et al., 2007; Castel & Chae, 2021). Além disso, a expressão de *PAD4*, como verificado no trabalho de Pegadaraju et al., (2007), foi capaz de promover uma morte celular mais rápida em tecidos vegetais de *A. thaliana* atacados por insetos.

Com relação a expressão de genes relacionados ao ET, também sinalizadores de morte celular programada, a expressão do gene *ERS2* com 24 horas foi aumentada para ambos os clones infestados; todavia, o clone resistente infestado apresentou uma maior expressão em relação aos demais tratamentos (Figura 5). Outro gene relacionado ao ET, o *EIN2*, apresentou uma maior expressão também no clone resistente infestado. Tanto o gene *ERS2* quanto o gene *EIN2*, foram anteriormente descritos como promotores de morte celular programada em plantas (Li et al., 2012). Entretanto, outros trabalhos demonstraram que o gene *EIN2* ativa, de maneira direta ou indireta, fatores de transcrição da família NAC que estão associados à senescência e que coordenam não apenas o catabolismo celular, mas também os processos de morte celular programada (Kim et al., 2014). Aqui, observamos que o clone susceptível infestado também apresentou uma maior expressão do gene *EIN2*, mas o mesmo ocorreu com 96 horas (Figura 5b); entretanto, parece razoável sugerir que essa expressão tardia tenha sido ineficaz no impedimento completo do desenvolvimento inseto, uma vez que neste período observamos que os processos de formação de galha já teriam sido iniciados (Figura 1c, d). Outra possível explicação para esse aumento na expressão do gene *EIN2*, seria a de que o ovo do inseto nesse período tenha eclodido e que a galha já tenha começado a entumescer, deste modo o inseto precisará do aparato da galha para se alimentar (Sarmiento et al., 2021). Assim, nesse momento o inseto faz uso da sinalização de ET para sequestrar a rede de sinalização de defesa e suprimir as defesas da planta ora atacada (Broekgaarden et al. 2015).

Dentre os genes associados com morte celular programada avaliados, observamos que 24 horas após a infestação, o gene *BiP* foi expresso em ambos os clones infestados, enquanto que o gene *NAC1* foi mais expresso apenas no clone resistente infestado (Figura 6). O gene *BiP*

parece regular positivamente genes envolvidos no processo de morte celular programa desencadeado por estresse biótico, além do mais a superexpressão de *BiP* parece resultar também na diminuição da taxa de fotossíntese e na indução de genes associados à senescência (Carvalho et al., 2014). Os membros da família de genes *NAC* desempenham papéis importantes na regulação da reprogramação transcricional associada às respostas de estresse em planta (Nuruzzaman; Sharoni; Kikuchi, 2013). Tais genes atuam principalmente na defesa vegetal, uma vez que os genes *NAC* estão intimamente relacionados com EROs e senescência, e além disso, esses genes podem ainda modular a regulação fito-hormonal da rede celular sob estresse biótico (Nuruzzaman; Sharoni; Kikuchi, 2013). As proteínas contendo domínio NAC são mediadores críticos da morte celular induzida por estresse em plantas (Reis & Fontes, 2012) e é, portanto, plausível sugerir que os mesmos tenham função importante na tolerância diferencial a *L. invasa* em clones de eucalipto. Trabalhos futuros devem investigar, em detalhes, o papel desses genes nas respostas precoce e tardia à infestação pelo inseto galhador *L. invasa*.

## 5. CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados aqui obtidos demonstram que ao longo do intervalo de tempo entre infestação com o inseto *L. invasa* e 96 horas, diferentes processos estão ocorrendo nos clones estudados de modo a minimizar, de modo diferencial, os impactos do ataque desse inseto. Neste contexto, o clone resistente realiza o isolamento da área a ser necrosada através do espessamento de parede e acúmulo de fenóis. Cabe ressaltar também que, apesar de apresentarem diferentes respostas ao ataque da vespa, ambos os clones apresentaram reduções nas trocas gasosas quando infestados.

Nos clones infestados, expressão diferencial aumentada foi observada tanto para genes associados com sinalização via fitormônios para morte celular programada (*NPR1*, *ERS2*), quanto genes envolvidos diretamente com a morte celular programada (*BiP*). Entretanto, o clone resistente, quando infestado, foi caracterizado por aumentos na expressão dos genes *PAD4* e *ERS2*, associados com AS e ET, respectivamente, e também do *NAC1*, envolvido com morte celular programada. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que o clone resistente quando infestado sinaliza, via AS e ET, para que a morte celular programada ocorra nas células atacadas pelo inseto *L. invasa*.

Trabalhos futuros serão ainda necessários para compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de morte celular programada que está ocorrendo no clone resistente. É plausível sugerir que a aplicação exógena de ethrel no clone susceptível poderia nos fornecer mais informações acerca desses mecanismos moleculares. Com efeito, será também necessário entender a dinâmica desse processo com fatores ambientais, uma vez que tais estudos serão de suma importância para aprimorar o manejo de eucaliptos em um cenário de mudanças climáticas. Dentro desse cenário é esperado o aumento da temperatura global, o que provavelmente irá impactar o desenvolvimento das plantas, bem como a imunidade das mesmas, uma vez que se sabe que tal condição ambiental pode afetar a interação entre fitormônios envolvidos na defesa das plantas.

## REFERÊNCIAS

- Aljbory Z, Chen MS** (2018) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science* **25**: 2-23. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12436>.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg E, Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Correndo SW, Semerci A, Cobb N** (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* **259**: 660-684. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001>.
- Broekgaarden C, Caarls L, Vos IA, Pieterse CM, Van Wees SC** (2015) Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant physiology*, **169**: 2371-2379. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01020>
- Carvalho PHN** (2019) Respostas metabólicas em *Eucalyptus* spp. infestados por *Leptocybe invasa* com susceptibilidade diferencial à praga. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Tocantins.
- Carvalho HH, Silva PA, Mendes GC, Brustolini OJ, Pimenta MR, Gouveia BC, Valente MAS, Ramos HJO, Ramos JRLS, Fontes EP** (2014) The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiology* **164**: 654-670. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231928>.
- Castel B, Chae E** (2021) Nucleocytoplasmic trafficking during immunity. *Molecular Plant* **14**: 1612-1614. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.08.008>.
- Doyle JJ, Doyle JL** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.
- Food and Agriculture Organization. FAO** (2020) FAOSTAT: Statistics database. Food and Agriculture Organization, Rome. Disponível em:  
<https://www.fao.org/3/cb4477en/cb4477en.pdf>. Acessado em 29 de maio de 2023.
- Gonçalves JLM, Alvares CA, Higa AR, Silva LD, Alfenas AC, Stahl J, Ferraz SFB, Lima WP, Brancalion PHS, Hubner A, Bouillet JPD, Laclau JP, Nouvellon Y, Epron D** (2013)

Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. *Forest Ecology and Management* **301**: 6-27. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.12.030>.

**Gonzalez AM, Solís SM** (2015) Anatomía y morfogénesis de las agallas producidas por *Leptocybe invasa* en plantas de *Eucalyptus*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **50**: 141-151.

**Indústria brasileira de árvores – IBÁ** (2022) Relatório Ibá. Disponível em: <<https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf>>. Acesso em 25 de maio de 2023.

**Isaias RMDS, Ferreira BG, Alvarenga DRD, Barbosa LR, Salminen JP, Steinbauer MJ** (2018) Functional compartmentalisation of nutrients and phenolics in the tissues of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). *Austral Entomology* **57**: 238-246. <https://doi.org/10.1111/aen.12336>.

**Janda T, Gondor OK, Yordanova R, Szalai G, Pál M** (2014) Salicylic acid and photosynthesis: signaling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**: 2537-2546. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1620-y>.

**Kant MR, Jonckheere W, Knecht B, Lemos F, Liu J, Schimmel BCJ, Villarreal CA, Ataíde LMS, Dermauw W, Glas JJ, Egas M, Janssen A, Leeuwen TV, Schuurink RC, Sabelis MW, Alba JM** (2015) Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Annals of Botany* **115**: 1015-1051. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv054>.

**Kim HJ, Hong SH, Kim YW, Lee IH, Jun JH, Phee BK, Rupak T, Jung H, Lee Y, Hong BS, Nam HG, Woo HR, Lim PO** (2014) Gene regulatory cascade of senescence-associated NAC transcription factors activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-mediated leaf senescence signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4023-4036. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru112>.

**Kraus JE, Arduin M** (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal.

**Kurowska MM, Daszkowska-Golec A, Gajecka M, Kościelniak P, Bierza W, Szarejko I** (2020) Methyl jasmonate affects photosynthesis efficiency, expression of HvTIP genes and

nitrogen homeostasis in barley. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 4335. <https://doi.org/10.3390/ijms21124335>.

**Kuster VC, Rezende UC, Cardoso JCF, Isaias RMS, Oliveira DC** (2020) How galling organisms manipulate the secondary metabolites in the host plant tissues? A histochemical overview in Neotropical gall systems. Co-evolution of secondary metabolites 823-842. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_29).

**Li XQ, Liu YZ, Guo WF, Solanki MK, Yang ZD, Xiang Y, Ma ZC, Wen YG** (2017) The gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) stimulates different chemical and phytohormone responses in two *Eucalyptus* varieties that vary in susceptibility to galling. *Tree Physiology* **37**: 1208-1217. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx098>.

**Li Z, Peng J, Wen X, Guo H** (2012) Gene Network Analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of *Arabidopsis* leaf senescence F. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**: 526-539. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01136.x>.

**Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**: 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

**Misra D, Dutta W, Jha G, Ray P** (2023) Interactions and regulatory functions of phenolics in soil-plant-climate nexus. *Agronomy* **13**: 280. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020280>.

**Mitchell C, Brennan RM, Graham J, Karley AJ** (2016) Plant defense against herbivorous pests: exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1132. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01132>.

**Napoleão TA, Soares G, Vital CE, Bastos C, Castro R, Loureiro ME, Giordano A** (2017) Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Science* **263**:46-54. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.06.014>.

**Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S** (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* **4**: 248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00248>.

**Oates CN, Denby KJ, Myburg AA, Slippers B, Naidoo S** (2016). Insect gallers and their plant hosts: from omics data to systems biology. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 1891. <https://doi.org/10.3390/ijms17111891>.

**Pegadaraju V, Louis J, Singh V, Reese JC, Bautor J, Feys BJ, Cook G, Parker JE, Shah J** (2007) Phloem-based resistance to green peach aphid is controlled by Arabidopsis PHYTOALEXIN DEFICIENT4 without its signaling partner ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1. *The Plant Journal* **52**: 332-341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03241.x>.

**Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, Gechev TS** (2015) ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**: 69. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00069>.

**Pieterse CM, Does, DV, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Wees SCV** (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489-521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>.

**Pinto IO, Sarmiento MI, Martins AO, Rocha JPL, Pinto G, Araújo WL, Soares AMVM, Sarmiento RA** (2022) Cell death and changes in primary metabolism: the onset of defence in *Eucalyptus* in the war against *Leptocybe invasa*. *Pest Management Science* **78**: 1721-1728. <https://doi.org/10.1002/ps.6791>.

**Reis PA, Fontes EP** (2012) N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 628-632. <https://doi.org/10.4161/psb.20111>.

**Rosado AM, Rosado TB, Alves AA, Laviola BG, Bhering LL** (2012) Simultaneous selection of eucalyptus clones based on yield, stability and adaptability. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **47**: 964-971. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700013>.

**Sarmiento MI** (2019) Respostas fisiológicas e metabolômicas para seleção precoce de *Eucalyptus* spp resistentes à seca e pragas. Tese de Doutorado. Universidade de Aveiro.

**Sarmiento MI, Pinto G, Araújo WL, Silva RC, Lima CHO, Soares AM, Sarmiento RA** (2021) Differential development times of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera:

Eulophidae) reveal differences in susceptibility between two *Eucalyptus* clones. *Pest Management Science* **77**: 1042-1051. <https://doi.org/10.1002/ps.6119>.

**Tariq A, Pan K, Olatunji OA, Graciano C, Li Z, Li N, Dagang C, Sun F, Wu X, Dakhil MA, Xiaoming S, Zhang L** (2019) Impact of phosphorus application on drought resistant responses of *Eucalyptus grandis* seedlings. *Physiologia Plantarum* **166**: 894-908. <https://doi.org/10.1111/ppl.12868>.

**Ullah A, Manghwar H, Shaban M, Khan AH, Akbar A, Ali U, Ali E, Fahad S** (2018) Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental Science and Pollution Research* **25**: ?. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3364-5>.

**Wingfield MJ, Slippers B, Hurley BP, Coutinho TA, Wingfield BD, Roux J** (2008) Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* **70**: 139-144. <https://doi.org/10.2989/SOUTH.FOR.2008.70.2.9.537>.

**Wu W, Verburg PH, Tang H** (2014) Climate change and the food production system: impacts and adaptation in China. *Regional Environmental Change* **14**: 1-5. <https://doi.org/10.1007/s10113-013-0528-1>.