



Maíra Ignacio Sarmiento Respostas fisiológicas e metabolômicas para a seleção precoce de *Eucalyptus* spp tolerantes à seca e pragas

Physiological and metabolomics responses for the early selection of *Eucalyptus* spp tolerant to drought and pests



Maíra Ignacio Sarmiento Respostas fisiológicas e metabolômicas para a seleção precoce de *Eucalyptus* spp. tolerantes à seca e pragas

Physiological and metabolomics responses for the early selection of *Eucalyptus* spp tolerant to drought and pests

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia e Ecologia das Alterações Globais, realizada sob a orientação científica do Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e da Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto, Investigadora do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Escrita da Tese apresentada em conformidade com a Língua Portuguesa Brasileira ou Português do Brasil - pt-BR

Apoio financeiro do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil, e bolsa CNPq - Brasil (Projeto: 204521/2014-9).

Dedico este trabalho às minhas duas mães: Maria Aparecida Lacerda Pina Ignacio e Jacira Almeida Sarmiento pelo incansável apoio.

o júri

presidente

Prof. Doutor Vítor António Ferreira da Costa
professor catedrático da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutor Wagner Luiz Araújo
professor adjunto da Universidade Federal de Viçosa

arguente

Doutora Lia-Tânia Rosa Dinis
investigadora de pós-doutoramento Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

arguente

Doutora Sandra Isabel Marques Correia
investigadora da Universidade de Coimbra

arguente

Doutor Artur João da Costa Peixoto Alves
professor auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

co-orientadora

Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto
doutorada (nível 1) da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Programa Doutoral em Biologia e Ecologia das Alterações Globais, em especial ao Prof. Amadeu Soares, orientador, pela oportunidade e exemplo de sabedoria, tornando o complicado e inatingível em simples e paupável.

À Profa. Glória Pinto, co-orientadora, amiga e parceira, pela enorme “força” e disponibilidade em ajudar em todos os momentos. Também Matias, Catarina e familiares pela alegre acolhida em Portugal.

Aos colegas João Pestana e Lísia pela calorosa recepção portuguesa.

À Fundação Universidade Federal do Tocantins (UFT), Brasil, em especial ao Colegiado de Engenharia Florestal, seus professores e estudantes.

Ao Prof. Wagner Araújo, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Brasil, pelo apoio nas análises.

Ao Prof. Carlos Frederico Wilcken, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAUNESP), Brasil, pela identificação do inseto.

Aos colegas Marçal, Marciane, Carlos Henrique, Mariela, Nádia, Sara, Pablo, Ismael, Dora, Nelita e Althiéris, e Profs. Alex, Danival e Eduardo pelo apoio.

Ao Prof. Arne Janssen pela inspiração científica e pessoal, e todos os momentos de convivência produtiva.

Aos meus avós (*In memoriam*), Antônio Pereira Pina e Odete Lacerda Pina e à toda “família Pina”, pelo exemplo de família e suporte de sempre.

Ao meu pai, Wagner Ignacio, e avós, Anibal Ignacio e Nair Bico Ignacio, e à toda “família Ignacio”, pelas lições de vida.

Ao meu tio, Rogério Lalier, pela presença carinhosa em momentos difíceis.

Às minhas irmãs, Nara Ignacio e Tainá Ignacio pelo companheirismo de todas as horas, alegres e não tão alegres.

Ao meu sogro, Roberto Sarmiento (*In memoriam*), pelo exemplo de força de vontade, determinação e caráter.

Ao meu amado esposo, Renato de Almeida Sarmiento, pela dedicação incansável como orientador diário, científico e pessoal, e filhos, Roberto e Eduardo, pela cumplicidade diária. A eles devo a inspiração em ser a cada dia, uma pessoa melhor.

À Deus pela onipresença, onisciência e onipotência.

palavras-chave

eucalipto, defesa de planta, grau de susceptibilidade da planta hospedeira, *Leptocybe invasa*, vespa-da-galha, ciclo de vida do inseto, fisiologia de planta, fitohormônio, mecanismo de defesa antioxidante, estresse biótico.

resumo

Eucalyptus é o gênero arbóreo mais plantado em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. A área mundial total ocupada por florestas plantadas desse gênero somam cerca de 20 milhões de hectares. Nas últimas décadas, a preocupação com as consequências do aquecimento global e do surgimento de surtos de pragas à medida que as plantações de *Eucalyptus* se expandem no mundo, levou à procura de genótipos mais tolerantes ao estresse abiótico e biótico. Um exemplo foi o aparecimento da praga *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), que, em menos de dez anos, estava espalhada em todas as plantações de *Eucalyptus* espalhadas pelo mundo. Essa praga é uma vespa galhadora que provoca danos, principalmente, em mudas e plantios novos de eucaliptos e, em genótipos muito susceptíveis, pode levar as plantas à morte. Ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa de plantas contra insetos galhadores, pois estudos que demonstrem as respostas fisiológicas e hormonais de plantas considerando os diferentes estádios de desenvolvimento da galha e do inseto, utilizando hospedeiros com diferentes graus de susceptibilidade são ainda escassos. No entanto, o conhecimento desses mecanismos pode ser facilmente traduzido em ferramentas de seleção e terão impacto positivo nos programas de melhoramento de plantas. O objetivo desse trabalho foi investigar a plasticidade de resposta de *Eucalyptus* ao ataque de *L. invasa*, através da comparação morfológica, bioquímica, fisiológica e hormonal em hospedeiros com diferentes graus de susceptibilidade a essa praga, ao longo das principais fases de desenvolvimento da galha e do inseto. Foram selecionados dois clones híbridos de *Eucalyptus tereticornis* Sm. e *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., com diferente origem seminal, tendo em conta as respostas diferenciais de susceptibilidade à vespa no campo e em viveiro. A resposta de defesa inicial de *Eucalyptus* contra *L. invasa* é modulada pelo etileno. O ácido salicílico segue-se como sinalizador dessa defesa juntamente com o aumento do estresse oxidativo, ainda na fase que antecede o aparecimento da galha. Durante a fase de galha, a defesa indireta é acionada pelo aumento do metil jasmonato e o crescimento e desenvolvimento da galha e do inseto são inibidos pela diminuição de auxinas e de açúcares solúveis totais. A indução da galha, por outro lado, é estimulada pela combinação de ácido jasmônico, metil jasmonato e zeatina. Este trabalho demonstrou que a resposta de defesa de *Eucalyptus* à *L. invasa* está pautada em uma combinação de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e hormonais, que se sucedem e se modificam ao longo de todo o período de desenvolvimento da galha (da oviposição até a emergência). Essa resposta é dependente dos fatores planta hospedeira, inseto galhador e da interação entre ambos. O resultado dessas interações nos diferentes genótipos de plantas hospedeiras pode ser percebido através de diferenças temporais de desenvolvimento da galha e de desenvolvimento do inseto.

keywords

eucalypt, plant defense, susceptibility degrees of host-plant, *Leptocybe invasa*, gall wasp, insect life cycle, plant physiology, phytohormone, antioxidant defense mechanism, biotic stress.

abstract

Eucalyptus is the most planted tree genus in tropical and subtropical regions around the world. The total global area occupied by planted forests of this genus amounts to around 20 million hectares. In the last decades, concern about the consequences of global warming and the emergence of pest outbreaks as *Eucalyptus* plantations expand in the world has led to the search for genotypes that are more tolerant to abiotic and biotic stress. One example was the appearance of the pest *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), which, in less than ten years, was spread on all the *Eucalyptus* plantations scattered around the world. This pest is a galling wasp that causes damage mainly to seedlings and early eucalyptus plantations and, in very susceptible genotypes, can lead to death. Little is known about the mechanisms of plant defense against galling insects. Because studies that using plant hosts with different degrees of susceptibility to demonstrate the physiological and hormonal responses of plants over time of development of the gall and the insect are scarce. However, knowledge of these mechanisms can be easily translated into selection tools and will have a positive impact on plant breeding programs. The objective of this work was to investigate the plasticity of *Eucalyptus* response to the attack of *L. invasa*, through morphological, biochemical, physiological and hormonal comparison in hosts with different degrees of susceptibility to this pest, throughout the main stages of development of the gall and of the insect. Two clones, with different seminal origin, hybrid of *Eucalyptus tereticornis* Sm. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., were selected, due to their differential susceptibility responses to the wasp in the field and in the nursery. The early defense response of *Eucalyptus* against *L. invasa* is modulated by ethylene. Salicylic acid follows as a sign of this defense together with the increase of oxidative stress, still in the phase that precedes the appearance of the gall. During the gall stage, the indirect defense is triggered by the increase of methyl jasmonate at the same time as the growth and development of the gall and insect are inhibited by the decrease of auxins and of total soluble sugars. On the other hand, the induction of the gall is stimulated by the combination of jasmonic acid, methyl jasmonate and zeatin. This work demonstrates that the defense response of *Eucalyptus* to *L. invasa* is based on a combination of biochemical, physiological and hormonal parameters, which are followed and modified throughout the development period of the gall (from oviposition to emergence). This response is dependent on the factors host genotype, galling insect and the interaction between both. The result of these interactions in the different genotypes of host plants can be perceived through temporal differences in development of the gall and in the development of the insect.

ABREVIACOES

A	taxa de assimilação foliar luida de CO ₂
AA	auxinas
ABA	cido abscísico
ACC	aminociclopropanocarboxílico
AJ	cido jasmônico
ANOVA	Análise de Variância
AS	cido salicílico
AST	açúcares solúveis totais
BHT	hidroxitolueno butlico
Ca	clcio
CAT	catalase
C _i	concentração de CO ₂ intercelular
CKs	citocininas
d.a.i.	dias após a infestação
E	transpiração
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
ERO	espécies reativas de oxignio
g _s	condutância estomática
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
MDA	malondialdeído
MeJa	metil jasmonato
n.s.	não significativo
NBT	cloreto de azul nitrotetrazólio
PVP	polivinilpirrolidona
S	enxofre
SOD	superóxido dismutase
TBA	cido tiobarbitúrico
TCA	cido tricloroacético
T _{máx}	temperatura do ar máxima
T _{mín}	temperatura do ar mínima
U.R. _{máx}	umidade relativa do ar máxima
U.R. _{mín}	umidade relativa do ar mínima
Z	zeatina

Zn	zinco
ΔDS	incremento do diâmetro do caule ao nível do solo
ΔH	incremento da altura da planta

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Introdução Geral	1
REFERÊNCIAS	9
CAPÍTULO 2. Tempo diferencial nas respostas morfológicas induzidas por <i>Leptocybe invasa</i> (Hymenoptera: Eulophidae) revelam diferenças na susceptibilidade entre dois clones de <i>Eucalyptus</i>	17
RESUMO	17
INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS	20
RESULTADOS.....	24
DISCUSSÃO.....	37
AGRADECIMENTOS.....	39
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 3. Contrastando mecanismos de respostas de <i>Eucalyptus</i> durante ataque por <i>Leptocybe invasa</i> : o papel dos hormônios.....	42
RESUMO.....	42
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS	46
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO.....	72
AGRADECIMENTOS.....	75
REFERÊNCIAS	75
CAPÍTULO 4. Etileno como modulador da resistência em clones de eucalipto com respostas diferenciais de susceptibilidade à <i>Leptocybe invasa</i>	80
RESUMO.....	80
INTRODUÇÃO.....	81
MATERIAL E MÉTODOS	83
RESULTADOS.....	87
DISCUSSÃO.....	94
AGRADECIMENTOS.....	96
REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO 5. Discussão Geral	100
REFERÊNCIAS	106

CAPÍTULO 1. Introdução Geral

Eucalyptus L'Hér. é um gênero pertencente à família botânica Myrtaceae Juss., que compreende cerca de 665 a 723 espécies (Bayly 2016). Esse gênero forma um grupo monofilético com *Corymbia* K.D. Hill & L.A.S. Johnson, *Angophora* Cav., *Arillastrum* Pancher ex Baillon, *Allosyncarpia* S.T. Blake, *Eucalyptopsis* C.T. White e *Stockwellia* D.J. Carr, S.G.M. Carr & B. Hyland, denominado “grupo eucalipto” (eucalypt group) (Ladiges et al. 2003). Sendo que, as espécies comerciais mais importantes são *E. camaldulensis* Dehnh., *E. dunnii* Maiden, *E. globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill, *E. nitens* (H. Deane & Maiden) Maiden, *E. pellita* F. Muell., *E. saligna* Sm., *E. tereticornis* Sm. e *E. urophylla* S.T. Blake (Harwood 2011) são endêmicas do continente australiano (Paine et al. 2011). Esse gênero arbóreo é plantado em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Dittrich-Schröder et al. 2018, Koskela et al. 2014, Wingfield et al. 2015). As florestas plantadas de *Eucalyptus* no mundo somam cerca de 20 milhões de hectares (Wingfield et al. 2015). O Brasil possui cerca de 7,5 milhões de hectares de florestas de *Eucalyptus*, de um total de cerca de 10 milhões de hectares de florestas plantadas (SNIF 2017). Esta distribuição é consequência de um conjunto de características, tais como, grande adaptabilidade a climas e solos (Prober et al. 2016), rápido crescimento, curtas rotações, adequação para o plantio em larga escala (Paine et al. 2011), extensa variedade de madeiras e produtos relacionados e alto benefício econômico (Cubbage et al. 2010). Além de altos investimentos privados e governamentais em pesquisa e melhoramento desse grupo de plantas (Koskela et al. 2014). A preocupação mundial com as consequências do aquecimento global nas florestas (Allen et al. 2010) também levou à procura de genótipos mais tolerantes à estresse abiótico, principalmente, hídrico. As emissões de gases estufa são responsáveis pela mortalidade de florestas em todo o mundo. Essas emissões 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 advindos de seus cruzamentos (Gonçalves et al. 2013). A hibridação e a propagação clonal em *Eucalyptus* são utilizadas como importantes ferramentas para aumentar a qualidade dos produtos madeireiros (Grattapaglia e Kirst 2008). A hibridação entre espécies do grupo eucalipto é utilizada em programas de melhoramento de todo o mundo para selecionar

materiais mais resistentes a estresses abióticos e bióticos (Grattapaglia e Kirst 2008, Wingfield et al. 2013). Outra preocupação recente que ameaça as florestas plantadas de *Eucalyptus* é o estresse biótico (Paine et al. 2011, Wingfield et al. 2013, Wingfield et al. 2015). À medida que as plantações de *Eucalyptus* se expandem no mundo, o movimento conjunto de insetos e patógenos ameaçam a sua produtividade (Paine et al. 2011), o que é facilitado pela globalização que aumenta o movimento de produtos e pessoas. Um exemplo é o aparecimento de uma praga do eucalipto, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), no início deste século (Mendel et al. 2004). Descoberta há pouco mais de quinze anos (Mendel et al. 2004), *L. invasa* já está amplamente distribuída em todo o mundo. Inicialmente, essa microvespa foi encontrada em plantações de *Eucalyptus* no continente africano (Mendel et al. 2004, Nyeko 2007). Além de migrar para outras partes do continente africano (Nadel e Slippers 2011, FAO 2012), *L. invasa* já é encontrada no continente asiático (Prabhu 2010, Nadel e Slippers 2011, FAO 2012, Udagedara e Karunaratne 2014), europeu (Nadel e Slippers 2011, FAO 2012), americano, este representado pela América do Sul (Wilcken e Berti Filho 2008, Nadel e Slippers 2011, FAO 2012, Jorge et al. 2016) e América do Norte (Wiley e Skelley 2008) e na Oceania (FAO 2012). Diversas espécies de *Eucalyptus* e respectivos genótipos ficaram ameaçados com o aparecimento dessa praga (Mendel et al. 2004). Inclusive *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e seus híbridos, por serem altamente susceptíveis à *L. invasa* (Gonçalves et al. 2013).

Leptocybe invasa é uma vespa galhadora de plantas dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* (Mendel et al. 2004, Thu et al. 2009). Essa vespa provoca danos, principalmente, em mudas e plantios novos de eucaliptos e, em genótipos muito susceptíveis, pode levar as plantas à morte (Mendel et al. 2004). Inicialmente, ela era considerada a única espécie do gênero *Leptocybe* Fisher & La Salle (Mendel et al. 2004). Kim (2008) encontrou outras nove espécies de *Leptocybe* na Austrália e, de acordo com estudos recentes (Dittrich-Schröder et al. 2018), podem existir pelo menos duas espécies diferentes de *Leptocybe* nas áreas de plantios de *Eucalyptus* invadidas por essa vespa. Sendo que, conforme esse mesmo estudo, os espécimes da América do Sul foram todos identificados como *L. invasa*. As fêmeas adultas de *Leptocybe* spp. medem entre 1,1 e 1,4 mm (Mendel et al. 2004, Zhu et al. 2015), enquanto os machos adultos medem de 0,97 a 1,16 mm (Zhu et al. 2015). Todas as outras fases de vida dessa vespa ocorrem dentro da

planta hospedeira (Mendel et al. 2004). Os estádios de desenvolvimento de *Leptocybe* spp. são, basicamente, divididos em ovo, larva, pupa e adulto (Mendel et al. 2004, Zhu et al. 2015). Entretanto, é possível identificar estádios intermediários, tais como, larva pequena, larva madura, pré-pupa e pré-adulto (Mendel et al. 2004). O tempo total de desenvolvimento dentro do hospedeiro (ovo até emergência do adulto) varia, em função da temperatura, entre 43,3 a 374,7 dias (Zhu et al. 2015). Uma fêmea adulta pode viver cerca de 9,0 dias após a emergência, enquanto o macho adulto vive um pouco mais de 12,8 dias após a emergência com suprimento alimentar a base de mel e temperatura de 23 °C (Zhu et al. 2015).

As galhas induzidas por *L. invasa* têm formato muito variável, pois podem conter uma ou mais câmaras com insetos em seu interior (Mendel et al. 2004, Gonzalez e Solís 2015). São estruturas globosas isoladas ou coalescentes localizadas nas nervuras centrais ou pecíolos das folhas (Mendel et al. 2004, Gonzalez e Solís 2015, Isaias et al. 2018). Primeiramente, o inseto oviposita em linhas nas nervuras centrais e nos pecíolos das faces abaxiais dos primórdios foliares (Mendel et al. 2004, Isaias et al. 2018). Então, à medida que a folha cresce, as galhas crescem junto com elas. Estudos da morfologia externa e anatomia da galha demonstram haver de três a cinco estádios de desenvolvimento da galha, podendo variar esse número de acordo com o genótipo da planta em estudo (Mendel et al. 2004, Gonzalez e Solís 2015). Três estádios são semelhantes nesses trabalhos, quais são, cicatriz suberificada (cork scar), galha esverdeada brilhante (glossy green gall) e orifícios de emergência (emergence hole) (Mendel et al. 2004, Gonzalez e Solís 2015). Ainda foram citados, também, os estádios galha rosada brilhante (glossy pink gall) e galha opaca vermelho claro ou escuro (light or dark red gall with loss of the glossiness) (Mendel et al. 2004). Estudos anatômicos com *E. grandis* e *E. camaldulensis* mostram que os ovos são depositados próximos ao feixe vascular e o canal formado é fechado por células necrosadas. No tecido epidérmico e subepidérmico se produz uma ligeira suberificação. Então, o parênquima associado aos tecidos vasculares sofre uma série de divisões mitóticas ao redor dos ovos depositados (Gonzalez e Solís 2015). As galhas maduras induzidas por *L. invasa* em *E. camaldulensis* apresentam dois compartimentos de tecidos ao redor da câmara larval: um compartimento interno e outro externo. O compartimento interno, ou tecido nutritivo, é formado por células parenquimáticas, em constante divisão celular, para nutrir o parasita. Esse compartimento é rico em lipídeos e proteínas. O compartimento

externo, ou tecidos de proteção e estoque de energia, é formado pelo tecido vascular, parênquima, colênquima e epiderme. Esse último, é rico em fenóis em todos os tecidos e, grãos-de-amido e antocianinas, no parênquima (Isaias et al. 2018).

Os primeiros testes de interação entre possíveis hospedeiros indicavam que *L. invasa* era indutora de galhas em várias espécies pertencentes a alguns subtaxa do gênero *Eucalyptus* L'Hér., tais como, *E. botryoides*, *E. bridgesiana*, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. gunii*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. viminalis* (Mendel et al 2004). À medida que as pesquisas avançam, a lista de espécies hospedeiras e híbridos derivados dessas espécies aumenta, sendo incluídas nessa lista *E. coolabah*, *E. microcorys*, *E. moluccana*, *E. pellita*, *E. pilularis*, *E. smithii*, *E. urophylla* (Thu 2009), *E. exserta*, *E. propinqua* (Zhu et al. 2012), assim como, a espécie *Corymbia polycarpa* (Thu 2009), pertencente a outro gênero. Estudos demonstram que há enorme variação de susceptibilidade à *L. invasa* e que esta variação é inter e intra-específica (Durand et al. 2011, Dittrich-Schröder et al. 2012, Luo et al. 2014), e as espécies *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* (Luo et al. 2014), que são os parentais dos híbridos utilizados neste estudo não são exceção. Esses genótipos foram classificados desde muito susceptíveis até resistentes, distribuídos ao longo de todas as zonas já invadidas por essa vespa (Mendel et al. 2004, Nyeko et al. 2009, Thu et al. 2009, Nyeko et al. 2010, Zhu et al. 2012). Entretanto, esses estudos utilizam somente índices baseados na contagem de galhas nas plantas em viveiros ou no campo para determinar a susceptibilidade dos genótipos. Outros estudos, exploram o papel de alguns metabólitos (Durand et al. 2011, Rocha et al. 2013, Oates et al. 2015, Mohamed 2016, Li et al. 2017, Isaias et al. 2018) e genes (Zhang et al. 2018) que participam dessa interação, diferentes genótipos de *Eucalyptus* e *L. invasa*. Apesar disso, ainda muito falta saber sobre os mecanismos de defesa utilizados por plantas com graus de susceptibilidade diferenciais à vespa. A maioria dos trabalhos supracitados enfatiza a praga e seus mecanismos de indução do crescimento e desenvolvimento das galhas em detrimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

A defesa das plantas contra artrópodes herbívoros é o resultado de uma combinação entre defesa constitutiva e induzida (Howe e Jander 2008). A defesa constitutiva está constantemente presente na planta e pode-se citar como exemplo, barreiras mecânicas, tais como, tricomas (Eisner et al. 1998, Glas et al. 2012), cutícula cerosa (Eigenbrode e Shelton 1990), folhas coriáceas com paredes celulares lignificadas (Choong 1996) e substâncias

fitoquímicas tóxicas que permanecem com concentrações similares antes e depois do ataque de um herbívoro à uma planta (Wittstock e Gershenzon 2002). Enquanto que, a defesa induzida, pode ser acionada após a planta ser atacada por um determinado herbívoro (Baldwin e Preston 1999). As defesas induzidas de plantas podem ser diretas ou indiretas. Quando a planta reconhece o agente agressor, ela direciona seus mecanismos de defesa para atuarem diretamente contra aquele agressor. Exemplos de defesa induzida direta são o reforço das barreiras físicas, tais como, o aumento de tricomas pela indução (Traw e Dawson 2002) ou o aumento nas concentrações de compostos fitoquímicos tóxicos aos herbívoros, tais como, nicotina no tabaco (Steppuhn et al. 2004), glucosinolatos em *Arabidopsis* sp. (Thatcher et al. 2005, Grubb e Abel 2006), inibidores de protease (Chen et al. 2005) e emissão de terpenóides em tricomas glandulares (van Schie et al. 2007) em tomateiro. Além disso, as plantas podem se defender indiretamente, por meio da produção de compostos químicos voláteis que atraem inimigos naturais dos herbívoros (Sabelis et al. 2001). Exemplos já foram demonstrados para, por exemplo, plantas de *Nicotiana attenuata* (Kessler e Baldwin 2001), *Arabidopsis* sp. (Van Poecke et al. 2001) e tomateiro (Kant et al. 2004). O ataque de herbívoros ou patógenos às plantas induz o acúmulo de fitohormônios responsáveis pela regulação dessas defesas. Os principais reguladores das defesas induzidas de plantas são reconhecidamente o ácido jasmônico (AJ) (Howe e Jander 2008) e o ácido salicílico (AS) (Kaloshian e Walling 2005). Entretanto, outros fitohormônios também podem ser produzidos durante o ataque de herbívoros e/ou patógenos, tais como, ácido abscísico (ABA), auxinas (AA), brassinosteróides, citocininas (CKs), etileno e giberelinas (Pieterse et al. 2012, Berens et al. 2017). A interação entre esses fitohormônios irá determinar a maneira e o momento em que a planta irá acionar seus mecanismos de defesas (Kant et al. 2015). Pois, esses hormônios são responsáveis pela ativação de genes que resultam 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). Quando uma planta é atacada por um herbívoro ou patógeno, uma das duas rotas metabólicas principais pode ser acionada como uma resposta de defesa da planta: a rota dependente de AJ ou a dependente de AS (Broekgaarden et al. 2015, Kant et al. 2015, Berens et al. 2017). O ácido jasmônico é reconhecidamente um hormônio relacionado às respostas de defesa contra

artrópodes (Howe e Jander 2008). Por sua vez, a combinação do etileno com o ácido jasmônico está associada a respostas de defesa contra patógenos necrotróficos. Estes, primeiramente, destroem as células do hospedeiro para se alimentarem do seu conteúdo. Por outro lado, as plantas geralmente os repelem através da produção de compostos antimicrobianos (Glazebrook, 2005). Já o ácido salicílico está relacionado com as respostas de defesa contra herbívoros que se alimentam do floema (Kaloshian e Walling 2005). Por sua vez, a combinação etileno e ácido salicílico está relacionada com as respostas de defesa contra patógenos biotróficos. Estes estabelecem uma relação duradoura com as células vivas dos hospedeiros e se alimentam dos nutrientes produzidos por essas células. Nesse caso, as plantas geralmente se defendem através da morte programada de suas próprias células (Glazebrook 2005). O ácido abscísico pode modular defesas dependentes de ácido jasmônico e etileno, mas, também, suprimir respostas de defesa dependentes de AS (Ton et al. 2009, Cao et al. 2011).

Apesar dos insetos galhadores de plantas serem artrópodes herbívoros (Stone e Schönrogge 2003), sua relação com o hospedeiro é tão íntima que alguns já foram comparados com patógenos (Kaloshian e Walling 2005). Esses insetos são capazes de induzir a planta hospedeira a produzir galhas em seus próprios tecidos (Stone e Schönrogge 2003). Essas galhas induzidas por insetos demandam um aporte de nutrientes, tais como, açúcares solúveis totais e aminoácidos livres (Huang et al. 2015), além de terem o proteoma modificado com relação aos tecidos do hospedeiro não parasitados (Pawlowski et al. 2017). Entretanto, apesar dessa necessidade de nutrientes, trabalhos demonstram que os tecidos das galhas podem conter menos clorofilas e carotenóides do que os tecidos de folhas sem galhas. Por outro lado, esse mesmo estudo mostrou que essas quantidades são semelhantes quando se compara folhas com galhas e sem galhas (Huang et al. 2015). Sendo que, a capacidade fotossintética e a condutância estomática podem não ocorrer na galha em si (Huang et al. 2015). Folhas com galhas também podem ter sua taxa fotossintética diminuída com relação a folhas sem galhas (Larson et al. 1998). Em plantas de *E. camaldulensis* parasitadas por *L. invasa*, foi observado decréscimo na taxa de assimilação de CO₂, na condutância estomática e no conteúdo de clorofilas quando comparadas com plantas não parasitadas (Tong et al. 2016). Por isso, galhas produzidas por insetos foram consideradas estruturas drenadoras de nutrientes das plantas hospedeiras (Huang et al. 2015). Nas células ao redor do ovo depositado pelo inseto galhador, ocorre

um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas paredes celulares, na região do apoplasto, em diferentes espécies de plantas e insetos. Esse acúmulo de ERO é responsável pela diferenciação celular e hipertrofia dessas células que serão as células-mães das galhas. Ao mesmo tempo, ocorre um aumento do estresse oxidativo no simplasto. Esse aumento, entretanto, é diminuído pelos mecanismos de dissipação de estresse induzidos pelo próprio inseto galhador. Nos tecidos das galhas em formação observa-se a presença de plastoglobulos, tocoferol e antioxidantes, bem como, o acúmulo de carboidratos e a ocorrência de compostos fenólicos. Todos esses compostos estão relacionados com a diminuição do estresse oxidativo. Isso, possivelmente, impede uma resposta de hipersensibilidade da planta que bloquearia a formação da galha (Isaias et al. 2015). A resposta de hipersensibilidade é uma resposta bem conhecida na defesa de plantas contra patógenos. Consiste na morte programada das células para limitar o acesso dos patógenos a água e nutrientes (Glazebrook 2005). Portanto, o acúmulo de ERO também está relacionado à defesa das plantas, inclusive como sinalizador de defesa contra artrópodes herbívoros (Kant et al. 2015). Assim, o acúmulo de ERO nas células das plantas em geral pode estar relacionado tanto ao crescimento e desenvolvimento celular, bem como, às respostas a estresses abióticos e bióticos. O papel que ERO irá desempenhar depende de fatores espaciais e temporais coordenados com outros compostos fitoquímicos, inclusive, fitohormônios (Baxter et al. 2014). As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) participam dos mecanismos de desintoxicação das ERO dentro do simplasto das células das plantas (Zebelo e Maffei 2015). Entretanto, elas podem ser inibidas como uma resposta de defesa das plantas à herbívoros (Kant et al. 2015). Mas, na interação planta e inseto galhador, elas possivelmente são induzidas pelo próprio inseto para bloquear a resposta de defesa da planta (Isaias et al. 2015). O malondialdeído (MDA) é um composto utilizado como indicador de estresse oxidativo (Sinnhuber et al. 1958) e a prolina como indicador de tolerância a estresses bióticos e abióticos (Khedr et al. 2003, Verbruggen e Hermans 2008). O MDA é um subproduto formado durante a autooxidação e degradação enzimática dos ácidos graxos poliinsaturados nas células, por isso, é utilizado para estimar a peroxidação lipídica (Sinnhuber et al. 1958). O aumento de MDA foi observado em galhas induzidas por insetos quando comparado a tecidos sem galha (Huang et al. 2015). A prolina é um aminoácido derivado do glutamato ou da ornitina e contribui para o equilíbrio do potencial osmótico da célula. Mas também tem sido relacionada a tecidos em rápida

divisão celular (Verbruggen e Hermans 2008, Lehmann et al. 2010). ABA e AJ estão relacionados tanto com o desenvolvimento de galhas induzidas por *L. invasa* em eucalipto, quanto com a defesa dessas plantas (Oates et al. 2015). Também AS foi relacionado à defesa de planta à inseto galhador (Zhu et al. 2011). Enquanto os hormônios CKs, giberelinas e AA já foram relacionados ao desenvolvimento de galhas induzidas por insetos (Mapes e Davies 2001a, Mapes e Davies 2001b, Straka et al. 2010, Jiang et al. 2018), inclusive por *L. invasa* em eucalipto (Li et al. 2017).

A aparente contradição entre esses resultados para as rotas de defesa utilizadas pelas plantas contra insetos galhadores, bem como, para os papéis desempenhados por hormônios, tais como, ABA e AJ, podem estar relacionadas a duas premissas básicas nos estudos de defesa de plantas: o tempo de resposta de defesa da planta e o efeito das respostas sistêmicas (Kant et al. 2015). A resposta de defesa direta de plantas de tomate contra um ácaro herbívoro ocorre após um dia de infestação, enquanto a resposta de defesa indireta ocorre somente a partir do terceiro dia e se acentua no quarto dia (Kant et al. 2004). Portanto, a presença ou não de galhas deve ser consequência do que ocorre nas primeiras horas e/ou poucos dias após a infestação. Entretanto, a maioria dos estudos supracitados analisaram tecidos de folhas com galhas em desenvolvimento (Mapes e Davies 2001a, Mapes e Davies 2001b, Straka et al. 2010, Li et al. 2017, Jiang et al. 2018) e/ ou de plantas submetidas a vários dias de infestação (Oates et al. 2015, Li et al. 2017, Jiang et al. 2018). Porém, estudos que demonstram as respostas fisiológicas e hormonais de plantas considerando os diferentes estádios de desenvolvimento da galha e do inseto e utilizando hospedeiros com diferentes graus de susceptibilidade são escassos. Apesar dos avanços no entendimento sobre a defesa de plantas nas últimas décadas (Dangl e Jones 2001, Howe e Jander 2008, Pieterse et al. 2012, Kant et al. 2015, Berens et al. 2017), um grupo de insetos ainda foi pouco estudado quanto aos mecanismos relacionados à defesa: os himenópteros indutores de galha (Tooker et al. 2014, Oates et al. 2015, Li et al. 2017, Jiang et al. 2018). O conhecimento desses mecanismos pode ser facilmente traduzido em ferramentas de seleção e terão impacto positivo nos programas de melhoramento florestal.

Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi investigar a plasticidade de resposta de *Eucalyptus* ao ataque de *L. invasa*, através da comparação morfológica, bioquímica, fisiológica e

hormonal em hospedeiros com diferentes graus de susceptibilidade a essa praga, ao longo das principais fases de desenvolvimento da galha e do inseto. Para tanto, foram utilizadas mudas de dois clones híbridos de *Eucalyptus tereticornis* Sm. × *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., com diferente origem seminal, selecionados devido suas respostas diferenciais de susceptibilidade à vespa no campo e em viveiro.

Objetivos específicos

1- investigar as respostas morfológicas externas (desenvolvimento da galha) induzidas por *L. invasa* e o próprio ciclo de vida do inseto em clones de *Eucalyptus* com diferentes graus de susceptibilidade à *L. invasa*;

2- entender que mecanismos fisiológicos, bioquímicos e hormonais são acionados pelo hospedeiro em resposta ao ataque por *L. invasa*, durante os diferentes estádios de desenvolvimento da galha e do inseto;

3- investigar a resposta de defesa inicial dos dois clones de eucalipto com respostas diferenciais de susceptibilidade à praga, através do perfil hormonal.

Referências

- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H. (Ted), Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.-H., Allard, G., Running, S.W., 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>
- Baldwin, I.T., Preston, C.A., 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208, 137–145. <https://doi.org/10.1007/s004250050543>
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65, 1229–1240. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
- Bayly, M.J., 2016. Phylogenetic studies of eucalypts: fossils, morphology and genomes. *Proceedings of the Royal Society of Victoria* 128, 12. <https://doi.org/10.1071/RS16002>
- Berens, M.L., Berry, H.M., Mine, A., Argueso, C.T., Tsuda, K., 2017. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* 55, 401–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035544>
- Broekgaarden, C., Caarls, L., Vos, I.A., Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., 2015. Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiology* pp.01020.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01020>

- Cao, F.Y., Yoshioka, K., Desveaux, D., 2011. The roles of ABA in plant–pathogen interactions. *Journal of Plant Research* 124, 489–499. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0409-y>
- Chen, H., Wilkerson, C.G., Kuchar, J.A., Phinney, B.S., Howe, G.A., 2005. From The Cover: Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 19237–19242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509026102>
- Choong, M.F., 1996. What Makes a Leaf Tough and How This Affects the Pattern of *Castanopsis fissa* Leaf Consumption by Caterpillars. *Functional Ecology* 10, 668. <https://doi.org/10.2307/2390178>
- Cubbage, F., Koesbandana, S., Mac Donagh, P., Rubilar, R., Balmelli, G., Olmos, V.M., De La Torre, R., Murara, M., Hoeflich, V.A., Kotze, H., 2010. Global timber investments, wood costs, regulation, and risk. *Biomass and Bioenergy* 34, 1667–1678. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.05.008>
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- Dittrich-Schröder, G., Wingfield, M.J., Hurley, B.P., Slippers, B., 2012. Diversity in *Eucalyptus* susceptibility to the gall-forming wasp *Leptocybe invasa*. *Agricultural and Forest Entomology* 14, 419–427. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2012.00583.x>
- Dittrich-Schröder, G., Hoareau, T.B., Hurley, B.P., Wingfield, M.J., Lawson, S., Nahrung, H.F., Slippers, B., 2018. Population genetic analyses of complex global insect invasions in managed landscapes: a *Leptocybe invasa* (Hymenoptera) case study. *Biological Invasions* 20, 2395–2420. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1709-0>
- Durand, N., Rodrigues, J. C., Mateus, E., Boavida, C., Branco, M., 2011. Susceptibility variation in *Eucalyptus* spp. in relation to *Leptocybe invasa* and *Ophelimus maskelli* (Hymenoptera: Eulophidae), two invasive gall wasps occurring in Portugal. *Silva Lusitana* n° especial, 19–31.
- Eigenbrode, S.D., Shelton, A.M., 1990. Behavior of Neonate Diamondback Moth Larvae (Lepidoptera: Plutellidae) on Glossy-Leafed Resistant Brassica oleracea L. *Environmental Entomology* 19, 1566–1571. <https://doi.org/10.1093/ee/19.5.1566>
- Eisner, T., Eisner, M., Hoebeke, E.R., 1998. When defense backfires: Detrimental effect of a plant's protective trichomes on an insect beneficial to the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4410–4414. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4410>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2012. *Leptocybe invasa*: blue gum chalcid Hymenoptera: Eulophidae. Forest pest species profiles August 2012. Disponível em <http://www.fao.org/forestry/13569-05912e0e2fe9054c3ed4904ae597e3310.pdf>
- Glas, J., Schimmel, B., Alba, J., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R., Kant, M., 2012. Plant Glandular Trichomes as Targets for Breeding or Engineering of Resistance to Herbivores. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 17077–17103. <https://doi.org/10.3390/ijms131217077>

- Glazebrook, J., 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Gonçalves, J.L. de M., Alvares, C.A., Higa, A.R., Silva, L.D., Alfenas, A.C., Stahl, J., Ferraz, S.F. de B., Lima, W. de P., Brancalion, P.H.S., Hubner, A., Bouillet, J.-P.D., Laclau, J.-P., 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, A.M., Solís, S.M., 2015. Anatomía y morfogénesis de las agallas producidas por *Leptocybe invasa* en plantas de *Eucalyptus*. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 2 50, 141–151.
- Grattapaglia, D., Kirst, M., 2008. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* 179, 911–929. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02503.x>
- Grubb, C.D., Abel, S., 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.006>
- Harwood, C., 2011. New introductions - doing it right, in: *Developing a Eucalypt Resource: Learning from Australia and Elsewhere*. John Walker, Wood Technology Research Centre, University of Canterbury, Canterbury, New Zealand, pp. 43–54.
- Howe, G.A., Jander, G., 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59, 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>
- Huang, M.-Y., Huang, W.-D., Chou, H.-M., Chen, C.-C., Chen, P.-J., Chang, Y.-T., Yang, C.-M., 2015. Structural, biochemical, and physiological characterization of photosynthesis in leaf-derived cup-shaped galls on *Litsea acuminata*. *BMC Plant Biology* 15, 61. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0446-0>
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Moreira, A.S.F.P., Soares, G.L.G., Carneiro, R.G.S., 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850, 1509–1517. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>
- Isaias, R.M. dos S., Ferreira, B.G., Alvarenga, D.R. de, Barbosa, L.R., Salminen, J.-P., Steinbauer, M.J., 2018. Functional compartmentalisation of nutrients and phenolics in the tissues of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae): Nutrients and phenolics in *Leptocybe invasa* galls. *Austral Entomology* 57, 238–246. <https://doi.org/10.1111/aen.12336>
- Jacob, J. P., Devaraj, R., Natarajan, R., 2007. Outbreak of the invasive gall inducing wasp *Leptocybe invasa* on eucalypts in India. *Newsletter of the Asia-Pacific Forest Invasive Species Network* 8, 4–5.
- Jiang, Y., Veromann-Jürgenson, L.-L., Ye, J., Niinemets, Ü., 2018. Oak gall wasp infections of *Quercus robur* leaves lead to profound modifications in foliage photosynthetic and volatile emission characteristics. *Plant, Cell & Environment* 41, 160–175. <https://doi.org/10.1111/pce.13050>
- Jorge, C., Martínez, G., Gómez, D., Bollazzi, M., 2016. First record of the eucalypt gall-

- wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) from Uruguay. *Bosque (Valdivia)* 37, 631–636. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000300020>
- Kaloshian, I., Walling, L.L., 2005. Hemipterans as Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 491–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135944>
- Kant, M.R., Ament, K., Sabelis, M.W., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2004. Differential Timing of Spider Mite-Induced Direct and Indirect Defenses in Tomato Plants. *Plant Physiology* 135, 483–495. <https://doi.org/10.1104/pp.103.038315>
- Kant, M.R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B.C.J., Villarroel, C.A., Ataíde, L.M.S., Dermauw, W., Glas, J.J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R.C., Sabelis, M.W., Alba, J.M., 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>
- Kessler, A., Baldwin, I.T., 2001. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* 291, 2141–2144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>
- Khedr, A.H.A., 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 54, 2553–2562. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
- Kim, I., 2008. Evolution of gall inducing Eulophidae (Hymenoptera:Chalcidoidea) on Myrtaceae in Australia. PhD thesis, Australian National University
- Koskela, J., Vinceti, B., Dvorak, W., Bush, D., Dawson, I.K., Loo, J., Kjaer, E.D., Navarro, C., Padolina, C., Bordács, S., Jamnadass, R., Graudal, L., Ramamonjisoa, L., 2014. Utilization and transfer of forest genetic resources: A global review. *Forest Ecology and Management* 333, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.07.017>
- Ladiges, P.Y., Udovicic, F., Nelson, G., 2003. Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae: Australian biogeographical connections. *Journal of Biogeography* 30, 989–998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00881.x>
- Larson, K.C., 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia* 115, 161–166. <https://doi.org/10.1007/s004420050503>
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39, 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>
- Li, X.Q., Liu, Y.Z., Guo, W.F., Solanki, M.K., Yang, Z.D., Xiang, Y., Ma, Z.C., Wen, Y.G., 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>
- Luo, J., Arnold, R., Lu, W., Lin, Y., 2014. Genetic variation in *Eucalyptus camaldulensis* and *E. tereticornis* for early growth and susceptibility to the gall wasp *Leptocybe*

- invasa in China. *Euphytica* 196, 397–411. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1042-8>
- Mapes, C.C., Davies, P.J., 2001a. Cytokinins in the ball gall of *Solidago altissima* and in the gall forming larvae of *Eurosta solidaginis*. *New Phytologist* 151, 203–212. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00158.x>
- Mapes, C.C., Davies, P.J., 2001b. Indole-3-acetic acid and ball gall development on *Solidago altissima*. *New Phytologist* 151, 195–202. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00161.x>
- Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N., La Salle, J., 2004. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. *Australian Journal of Entomology* 43, 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2003.00393.x>
- Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N., La Salle, J., 2004. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. *Australian Journal of Entomology* 43, 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2003.00393.x>
- Mohamed, M.E.S., 2016. The interaction between the gall wasp *Leptocybe invasa* and *Eucalyptus camaldulensis* leaves: A study of phyto-volatile metabolites. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 8, 90–98. <https://doi.org/10.5897/JPP2015.0384>
- Nadel, R., Slippers, B., 2011. *Leptocybe invasa*, the blue gum chalcid wasp. Information Sheet ICFR. Disponível em <http://www.forestry.co.za/uploads/File/home/notices/2011/ICFR%20IS01-2011gallwasp.pdf>
- Nyeko, P., Mutitu, E.K., Day, R.K., 2007. Farmers' knowledge, perceptions and management of the gall-forming wasp, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), on *Eucalyptus* species in Uganda. *International Journal of Pest Management* 53, 111–119. <https://doi.org/10.1080/09670870601185230>
- Nyeko, P., Mutitu, E.K., Day, R.K., 2009. *Eucalyptus* infestation by *Leptocybe invasa* in Uganda. *African Journal of Ecology* 47, 299–307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.2008.01004.x>
- Nyeko, P., Mutitu, K.E., Otieno, B.O., Ngae, G.N., Day, R.K., 2010. Variations in *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) population intensity and infestation on eucalyptus germplasm in Uganda and Kenya. *International Journal of Pest Management* 56, 137–144. <https://doi.org/10.1080/09670870903248835>
- Oates, C.N., Külheim, C., Myburg, A.A., Slippers, B., Naidoo, S., 2015. The Transcriptome and Terpene Profile of *Eucalyptus grandis* Reveals Mechanisms of Defense Against the Insect Pest, *Leptocybe invasa*. *Plant and Cell Physiology* 56, 1418–1428. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv064>
- Paine, T.D., Steinbauer, M.J., Lawson, S.A., 2011. Native and Exotic Pests of *Eucalyptus* : A Worldwide Perspective. *Annual Review of Entomology* 56, 181–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144817>
- Pawłowski, T.A., Staszak, A.M., Karolewski, P., Giertych, M.J., 2017. Plant development reprogramming by cynipid gall wasp: proteomic analysis. *Acta Physiologiae Plantarum* 39. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2414-9>

- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 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>
- Van Poecke, R.M.P., Posthumus, M.A., Dicke, M., 2001. Herbivore-Induced Volatile Production by *Arabidopsis thaliana* Leads to Attraction of the Parasitoid *Cotesia rubecula*: Chemical, Behavioral, and Gene-Expression Analysis. *Journal of Chemical Ecology* 27, 1911–1928. <https://doi.org/10.1023/A:1012213116515>
- Prabhu, J. S. T., 2010. Susceptibility of eucalyptus species and clones to gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher and La Salle (Eulophidae: Hymenoptera) in Karnataka. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 23, 220–221.
- Prober, S.M., Potts, B.M., Bailey, T., Byrne, M., Dillon, S., Harrison, P.A., Hoffmann, A.A., Jordan, R., McLean, E.H., Steane, D.A., Stock, W.D., Vaillancourt, R.E., 2016. Climate adaptation and ecological restoration in eucalypts. *Proceedings of the Royal Society of Victoria* 128, 40. <https://doi.org/10.1071/RS16004>
- Rocha, S., Branco, M., Boas, L.V., Almeida, M.H., Protasov, A., Mendel, Z., 2013. Gall induction may benefit host plant: a case of a gall wasp and eucalyptus tree. *Tree Physiology* 33, 388–397. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt009>
- Sabelis, M.W., 2001. ECOLOGY: Enhanced: The Enemy of My Enemy Is My Ally. *Science* 291, 2104–2105. <https://doi.org/10.1126/science.1059939>
- van Schie, C.C.N., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2007. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Molecular Biology* 64, 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9149-8>
- Sinnhuber, R.O., Yu, T. C., Yu, Te Chang, 1958. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Journal of Food Science* 23, 626–634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1958.tb17614.x>
- SNIF (Sistema Nacional de Informações Florestais), 2017. Boletim SNIF 2017. Ministério do Meio Ambiente, Brasil.
- Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., Baldwin, I.T., 2004. Nicotine's Defensive Function in Nature. *PLoS Biology* 2, e217. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020217>
- Stone, G.N., Schönrogge, K., 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 512–522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Straka, J.R., Hayward, A.R., Emery, R.J.N., 2010. Gall-inducing *Pachypsylla celtidis* (Psyllidae) infiltrate hackberry trees with high concentrations of phytohormones. *Journal of Plant Interactions* 5, 197–203. <https://doi.org/10.1080/17429145.2010.484552>
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P., Singh, K.B., 2005. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32, 1. <https://doi.org/10.1071/FP04135>

- Thu, P. Q., Dell, B., Burgess, T. I., 2009. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and young plantations in Vietnam. *Science Asia* 35, 113–117.
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* 14, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>
- Tong, Y.-G., Ding, X.-X., Zhang, K.-C., Yang, X., Huang, W., 2016. Effect of the Gall Wasp *Leptocybe invasa* on Hydraulic Architecture in *Eucalyptus camaldulensis* Plants. *Frontiers in Plant Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00130>
- Tooker, J.F., Helms, A.M., 2014. Phytohormone Dynamics Associated with Gall Insects, and their Potential Role in the Evolution of the Gall-Inducing Habit. *Journal of Chemical Ecology* 40, 742–753. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0457-6>
- Traw, B.M., Dawson, T.E., 2002. Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. *Oecologia* 131, 526–532. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0924-6>
- Udagedara, U. K. S. K., Karunaratne, W. A., 2014. Biology, damage and parasitoids of the *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), infesting *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) in Maragamuwa plantation, Sri Lanka. *International Journal of Tropical Insect Science* 34, 179–189. <https://doi.org/10.1017/S1742758414000344>
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Wilcken, C. F., Berti Filho, E., 2008. Vespa-da-galha-do-eucalipto (*Leptocybe invasa*) (Hymenoptera: Eulophidae): nova praga de florestas de eucalipto no Brasil. Preprint at <http://www.ipef.br/protecao/alerta-leptocybe.invasa.pdf>
- Wiley, J., Skelley, P. A., 2008. A *Eucalyptus* pest, *Leptocybe invasa* Fisher and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae), genus and species new to Florida and North America. Preprint at https://www.freshfromflorida.com/content/download/68487/1614796/Pest_Alert_-_Leptocybe_invasa,_Blue_Gum_Chalcid.pdf
- Wingfield, M.J., Roux, J., Slippers, B., Hurley, B.P., Garnas, J., Myburg, A.A., Wingfield, B.D., 2013. Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to *Eucalypt* plantations. *Forest Ecology and Management* 301, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.09.002>
- Wingfield, M.J., Brockerhoff, E.G., Wingfield, B.D., Slippers, B., 2015. Planted forest health: The need for a global strategy. *Science* 349, 832–836. <https://doi.org/10.1126/science.aac6674>
- Wittstock, U., Gershenzon, J., 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 300–307. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00264-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00264-9)
- Zebelo, S.A., Maffei, M.E., 2015. Role of early signalling events in plant-insect

- interactions. *Journal of Experimental Botany* 66, 435–448. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru480>
- Zhang, M., Zhou, C., Song, Z., Weng, Q., Li, M., Ji, H., Mo, X., Huang, H., Lu, W., Luo, J., Li, F., Gan, S., 2018. The first identification of genomic loci in plants associated with resistance to galling insects: a case study in *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20780-9>
- Zhu, L., Chen, M.-S., Liu, X., 2011. Changes in Phytohormones and Fatty Acids in Wheat and Rice Seedlings in Response to Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Infestation. *Journal of Economic Entomology* 104, 1384–1392. <https://doi.org/10.1603/EC10455>
- Zhu, F., Ren, S., Qiu, B., Huang, Z., Peng, Z., 2012. The Abundance and Population Dynamics of *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) Galls on *Eucalyptus* spp. in China. *Journal of Integrative Agriculture* 11, 2116–2123. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60470-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60470-5)
- Zhu, F., Ren, S., Qiu, B., Wu, J., 2015. Effect of temperature on life table parameters of *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae): Effect of temperature on *Leptocybe invasa*. *Austral Entomology* 54, 71–78. <https://doi.org/10.1111/aen.12094>

CAPÍTULO 2. Tempo diferencial nas respostas morfológicas induzidas por *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) revelam diferenças na susceptibilidade entre dois clones de *Eucalyptus*

Maíra Ignacio Sarmento, Glória Pinto, Eduardo Andrea Lemus Erasmo, Renata Carvalho
Silva, Amadeu M.V.M. Soares, Renato Almeida Sarmento

Resumo

Estudos que demonstrem o papel das respostas morfológicas de hospedeiros na susceptibilidade contra insetos galhadores são escassos na área florestal. O objetivo desse trabalho foi investigar as respostas morfológicas (desenvolvimento de galha) induzidas pela vespa galhadora *Leptocybe invasa* e de desenvolvimento do inseto em dois clones de *Eucalyptus* no período de um ciclo de vida do inseto. Os resultados demonstraram um novo estágio de desenvolvimento da galha ainda não reportado na literatura. Esse estágio foi denominado anel amarronzado. Ambos os hospedeiros mostraram estádios de desenvolvimento da galha similares entre si. Embora *L. invasa* ovipositou igualmente em ambos os clones, as comparações da morfologia externa das galhas ao longo do tempo revelam uma resposta diferencial em número de galhas entre os dois clones estudados. Esse resultado confirma que o número de galhas é um importante parâmetro para mensuração de susceptibilidade entre clones de *Eucalyptus*. Comparações no tempo de desenvolvimento de cada estágio da galha e inseto entre os dois clones estudados sugerem que os mecanismos de defesa da planta contra *L. invasa* são ativados logo após a oviposição da vespa e antes do início do entumescimento da galha. Esse é o primeiro estudo que demonstra que o tempo diferencial das respostas morfológicas induzidas por um inseto galhador, mesmo antes da formação da galha, demonstra diferenças na susceptibilidade entre diferentes hospedeiros.

Introdução

L. invasa é uma vespa galhadora considerada praga de uma gama de hospedeiros do gênero *Eucalyptus* L'Hér. e do gênero *Corymbia* K.D. Hill & L.A.S. Johnson (Mendel et al. 2004, Thu 2009, Zhu et al. 2012). O primeiro relato cientificamente comprovado de *L. invasa* ocorreu no ano de 2000 (Mendel et al. 2004) e, em menos de dez anos, essa espécie já estava espalhada em todos os continentes do mundo com florestas plantadas de *Eucalyptus*, quais são, África, Ásia, América do Norte, América do Sul, Europa e Oceania (Mendel et al. 2004, Jacob et al. 2007, Nyeko et al. 2007, Wilcken et al. 2008, Wiley e Skelley 2008, Nadel e Slippers 2011, FAO 2012). Insetos galhadores têm a capacidade de controlar parte dos genes de plantas hospedeiras para que estas produzam em seus próprios tecidos um ambiente favorável para o desenvolvimento desses mesmos insetos (Stone e Schönrogge 2003). Galhas formadas nos tecidos dos hospedeiros têm diferentes formatos, sendo o resultado da interação entre ambos, inseto galhador e planta hospedeira (Stone e Schönrogge 2003, Isaias et al. 2014). As fêmeas de *L. invasa* medem entre 1,10-1,40 mm de comprimento (Mendel et al. 2004, Zhu et al. 2015), enquanto os machos são um pouco menores medindo de 0,97 a 1,16 mm (Zhu et al. 2015). Uma fêmea adulta pode viver cerca de 9,0 dias após a emergência, enquanto o macho adulto vive um pouco mais de 12,8 dias após a emergência (Zhu et al. 2015). Todas as outras fases de vida dessa vespa ocorrem dentro da galha do hospedeiro (Mendel et al. 2004). Os estádios de desenvolvimento do inseto *L. invasa* são basicamente ovo, larva, pupa e adulto (Zhu et al. 2015). Entretanto, é possível identificar estádios intermediários, tais como, larva pequena e larva madura, pré-pupa e pré-adulto (Mendel et al. 2004). O tempo total de desenvolvimento de ovo a adulto é de 43,3 a 374,7 dias, a depender das condições da temperatura ambiental em que o hospedeiro se encontra (Zhu et al. 2015).

As espécies de *Eucalyptus* comprovadamente hospedeiras de *L. invasa* são *E. botryoides* Sm., *E. bridgesiana* R.T. Baker, *E. camaldulensis*, *E. coolabah* Blakely & Jacobs, *E. dunnii* Maiden, *E. exserta* F. Muell., *E. globulus* Labill., *E. grandis* W. Hill, *E. gunnii* Hook. f., *E. microcorys* F. Muell., *E. moluccana* Roxb., *E. pellita* F. Muell., *E. pilularis* Sm., *E. propinqua* H. Deane & Maiden, *E. robusta* Sm., *E. saligna* Sm., *E. smithii* R.T. Baker, *E. urophylla* S.T. Blake, *E. tereticornis* e *E. viminalis* Labill. (Mendel et al. 2004, Nyeko et al. 2009, Thu et al. 2009, Nyeko et al. 2010, Zhu et al. 2012), bem como,

híbridos dessas espécies (Durand et al. 2011, Dittrich-Schröder et al. 2012, Zhu et al. 2012). Além da espécie *Corymbia polycarpa* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (Thu et al. 2009). Existe variação de susceptibilidade à essa vespa entre indivíduos de uma mesma espécie de planta (Durand et al. 2011, Dittrich-Schröder et al. 2012, Luo et al. 2014). Entretanto, a maioria desses trabalhos se limita a estudar se determinado genótipo é ou não susceptível recorrendo à contagem do número de galhas desenvolvidas nas plantas quer em viveiros quer em campo. Trabalhos recentes apontam alguns metabólitos (Rocha et al. 2013, Oates et al. 2015, Tong et al. 2016, Li et al. 2017) e genes (Zhang et al. 2018) que participam nesta interação. Mas não esclarecem se os genótipos das plantas utilizadas podem afetar o tempo de desenvolvimento dos diferentes estádios das galhas. Baseado nesses estudos, não é possível determinar os estádios de desenvolvimento da galha ou do ciclo biológico do inseto em que os mecanismos de defesa de cada genótipo de planta é mais atuante. Já que os estádios que precedem o entumescimento da galha, não foram considerados por esses estudos. E o tempo de duração de cada estágio de desenvolvimento da galha e do inseto também não foram controlados. Os mesmos tipos de estresses bióticos e abióticos podem desencadear diferentes respostas de defesa em indivíduos fenotipicamente muito similares, dependendo do genótipo (Atkinson e Urwin 2012, Correia et al. 2014). Assim, é possível que plantas hospedeiras de mesma espécie, respondam diferentemente ao mesmo parasita em potencial com diferentes mecanismos de respostas, incluindo sinais hormonais, fisiologia, bioquímica e modificações metabólicas e estruturais (Isaias et al. 2015).

O principal objetivo desse estudo foi investigar as respostas morfológicas (desenvolvimento da galha) induzidas por *L. invasa* ao longo do tempo, bem como, de desenvolvimento do inseto, em genótipos de *Eucalyptus* com diferentes graus de susceptibilidade à *L. invasa*. Dois clones advindos de hibridação de *Eucalyptus tereticornis* Sm. e *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., de diferente origem seminal, foram selecionados. Esses clones apresentam diferentes graus de susceptibilidade à *L. invasa* e eram amplamente plantados em regiões com alternância de períodos secos e chuvosos antes do aparecimento dessa vespa. Genótipos de espécies de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* eram extremamente promissores para regiões com alguma deficiência hídrica antes do aparecimento de *L. invasa*, porque são extremamente resistentes à seca, porém, altamente susceptíveis a essa praga (Gonçalves et al. 2013). Primeiramente, as mudanças de

morfologia externa durante o desenvolvimento da galha foram descritas ao longo de um ciclo de desenvolvimento do inseto (da oviposição até a emergência). Já que existem variações nas características entre diferentes materiais genéticos e até em materiais semelhantes (Gonzalez e Solís 2015). Assim, foi possível comparar as respostas temporais de desenvolvimento de cada estágio da galha e do inseto nesses dois clones de *Eucalyptus*. Também foi possível acompanhar o desenvolvimento da galha através das mudanças morfológicas externas ao longo do tempo em cada hospedeiro e definir o melhor tempo (dias após a infestação) para comparação dessas mudanças entre os clones.

Material e Métodos

Plantas hospedeiras e criação do inseto parasita

Dois clones híbridos de *Eucalyptus tereticornis* Sm. × *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., com diferente origem seminal, foram selecionados devido suas respostas diferenciais de susceptibilidade à vespa no campo e em viveiro: VS058, altamente susceptível (susceptível) e VS062, menos susceptível (tolerante). Estacas enraizadas desses clones foram produzidas e doadas pelo viveiro S&D Florestal Viveiro, localizado no Município de Martinho Campos, Estado de Minas Gerais, Brasil. As estacas enraizaram em tubetes com palha de arroz carbonizada e fibra de coco até atingirem a altura inicial de 30 cm e 6 meses de idade. Em seguida, foram transplantadas para vasos plásticos de 3,8 l com 250 ml de hidrogel (4 g/l) (copolímero poliacrílico de potássio poliacrilamida) hidratado Forth® (Empresa TECNUTRI do Brasil, Município de Tietê, Estado de São Paulo, Brasil), substrato comercial Bioflora® (Empresa Bioflora Substratos Agrícolas, Município de Prata, Estado de Minas Gerais, Brasil) misturado a palha de arroz carbonizada (7,5:3) e 5,6g de adubo granulado 05-25-15, adicionado de Ca (4%), S (2%) e Zn (0,2%). Essas mudas foram irrigadas diariamente durante todo o período do experimento para evitar estresse hídrico e adubadas quinzenalmente com a mesma quantidade e tipo do adubo supracitado para o plantio. Imediatamente após terem sido transplantadas, 76 plantas (38 de cada clone) foram colocadas dentro de uma gaiola (altura de 2,95 m, comprimento de 5,92 m e largura de 2,45 m) revestida com organza em casa de vegetação coberta com sombrite 50% de luz e mantidas para aclimação por um período de 45 dias até o início dos experimentos. Essa gaiola foi denominada de gaiola de experimento. Durante o período dos experimentos, todas as plantas foram mantidas em

temperatura média diária de 27,4°C ($T_{\text{máx}}$ 35,8°C e $T_{\text{mín}}$ 20,2°C) e umidade relativa do ar média de 61,0% (U.R._{máx} 86,6% e U.R._{mín} 33,9%).

A criação de *L. invasa* foi iniciada através de mudas do híbrido susceptível parasitadas pela vespa e doadas pela empresa Braxcel Florestal S.A. Essas mudas foram colocadas dentro de outra gaiola (altura de 2,77 m, comprimento de 2,83 m e largura de 2,70 m) revestida com organza, em casa de vegetação coberta com sombrite 50%, denominada a partir de agora de gaiola de criação, juntamente com mudas sadias desse mesmo híbrido para serem ovipositadas. Exemplares da vespa retirados da criação foram enviados ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken do Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAUNESP), que confirmou a identificação da espécie.

Delineamento Experimental

Sessenta e quatro mudas de cada clone de eucalipto supracitado foram infestadas com a vespa-da-galha-do eucalipto e desinfestadas após vinte e quatro horas. Seis ápices de ramos de cada planta (192 ápices de cada clone) foram envolvidos com uma sacola de organza contendo um microtubo de centrifugação de 2,0 ml fechado, com duas vespas fêmeas coletadas da gaiola de criação. Após lacrar cada sacola com elástico, os microtubos foram abertos para que as vespas pudessem sair para ovipositar. Para garantir a sobrevivência das vespas pelo período supracitado, cada microtubo foi umedecido com água destilada. No momento da desinfestação, foi confirmada a sobrevivência e atividade de cada par de microvespa utilizado por planta. Após, as vespas foram sacrificadas manualmente antes que a sacola fosse aberta. Outras doze mudas, seis de cada clone, também foram envolvidas com a sacola de organza (72 ápices no total), porém, deixadas livre de vespas para servir de comparação na descrição dos estádios de desenvolvimento da galha.

Dessas mudas supracitadas, 48 infestadas (144 ápices de cada clone) e as 12 não-infestadas (36 ápices de cada clone) foram utilizadas para a descrição e comparação dos estádios de desenvolvimento da galha em cada clone. Essas avaliações foram realizadas diariamente do primeiro até o 10º dia e de três em três dias do 11º até o 53º dia após a infestação. Seis amostras (ápices de ramos com primórdios foliares ovipositados ou folhas), sendo uma amostra por planta em ambos os clones, foram coletadas para cada avaliação. As amostras foram observadas e fotografadas em estereomicroscópio óptico

binocular Leica® com câmera acoplada Leica® EC3. Os estádios de desenvolvimento da galha foram adaptados de Mendel et al. (2004).

Respostas temporais de desenvolvimento de cada estágio da galha e do inseto

Primeiramente, foram avaliadas a duração (dias) de cada estágio de desenvolvimento da galha e do ciclo biológico da vespa. Para tanto, as galhas coletadas das 48 mudas iniciais foram utilizadas. Essas galhas foram dissecadas para verificar os estádios de desenvolvimento dos insetos. Para facilitar a identificação, esses estádios foram divididos em ovo, larva pequena, larva madura, pré-pupa (larva com ocelo) e pupa (Mendel et al. 2004). Cada galha dissecada foi considerada uma repetição para o tempo de duração (dias) de cada estágio de desenvolvimento do ciclo biológico de *L. invasa*. Nas galhas em que havia mais de um estágio de desenvolvimento do inseto, foi considerado o estágio predominante sobre os demais. As galhas dissecadas e os diferentes estádios de desenvolvimento da vespa encontrados em cada galha foram fotografados em estereomicroscópio óptico binocular Leica® com câmera acoplada. Subsequentemente, a contagem do número de orifícios de emergência como explicada abaixo foi utilizada para definir, em dias, a duração do período de desenvolvimento de ovo até a vespa adulta (média \pm erro padrão; cada novo orifício de emergência foi considerado um indivíduo, pois um adulto emerge por orifício). Sendo que, cada orifício foi considerado uma repetição. Para o clone susceptível foram obtidas 323 repetições. Para o clone tolerante somente nove repetições foram obtidas, pois somente nove vespas emergiram dos orifícios em todas as plantas do experimento.

Mudanças morfológicas externas de desenvolvimento da galha ao longo do tempo

As 16 mudas infestadas restantes (48 ápices, de cada clone) foram utilizadas para comparar as respostas dos hospedeiros através dos seguintes parâmetros: número de plantas ovipositadas, número de plantas com galhas, número de plantas com orifícios de emergência (expressos como porcentagem, sendo oito plantas o correspondente a 100%); número de ápices ou folhas por planta nos quais ocorreu oviposições aos um, sete, 14 e 21 dias após a infestação (d.a.i.), número de entrenós por planta nos quais ocorreram oviposições aos um, sete, 14 e 21 d.a.i., número de galhas nas folhas por planta aos 21, 28, 35 e 42 d.a.i. e número de galhas nos entrenós por planta aos 21, 28, 35 e 42 d.a.i.

(expressos como média \pm erro-padrão de oito plantas por tratamento). Análises morfométricas das galhas através do comprimento e largura (média \pm erro-padrão) das mesmas ao longo do tempo aos 14, 28, 35, 42 e 52 d.a.i.. Essas medidas foram realizadas utilizando um paquímetro manual Insize® com exatidão $\pm 0,05$ mm (Insize do Brasil Imp. Exp. Com. Ltda., Município de Belenzinho, São Paulo, Brasil). Os entrenós foram envolvidos com fitas coloridas para marcar os locais com galhas em desenvolvimento. Finalmente, o número total de orifícios de emergência por planta (média \pm erro padrão de oito plantas por tratamento) foi avaliado diariamente do primeiro até o último dia de emergência de todas as galhas marcadas, advindas do momento da infestação.

Análises Estatísticas

O tempo de duração (dias) de cada estágio de desenvolvimento da galha e o tempo de duração (dias) de cada estágio do ciclo biológico da vespa-da-galha-do-eucalipto foram testados através de uma análise de variância (ANOVA) seguida por um teste de comparações múltiplas (Teste Tukey), com intervalo de confiança de 95%. Para a comparação das mudanças de morfologia externa da galha ao longo do tempo entre os clones, inicialmente, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para cada clone em separado, seguida de um teste de comparações múltiplas (teste de Tukey) com intervalo de confiança de 95%, para cada um dos parâmetros medidos ao longo do tempo de desenvolvimento da galha (número de primórdios foliares ou folhas por planta nos quais ocorreu oviposições, número de entrenós por planta nos quais ocorreram oviposições, número de galhas nas folhas por planta, número de galhas nos entrenós por planta, comprimento e largura das galhas). O que permitiu definir o momento (dias após a infestação) mais apropriado para realizar a comparação entre os clones para cada parâmetro (ou seja, a data de amostragem cujos parâmetros estavam estabilizados em ambos os clones). Definidos os pontos de comparação entre os clones, foi realizado o teste F, seguido do teste t com intervalo de confiança de 95%. Finalmente, o número total de orifícios de emergência por planta foi testado através do teste F, seguido do teste t com intervalo de confiança de 95%. Essas análises foram realizadas no Programa Action Stat v3.

Resultados

Descrição dos estádios de desenvolvimento da galha nos dois clones

Os dois clones de *Eucalyptus* estudados apresentaram, visualmente, os mesmos estádios de desenvolvimento da galha. O primeiro estágio (E1) é marcado pelo aparecimento de uma mancha amarronzada em forma de anel ao redor do local da oviposição. Esse estágio inicial de desenvolvimento da galha ainda não foi relatado na literatura. Ele foi aqui denominado de anel amarronzado (Figuras 1A, 1B) e precede o estágio 1 reportado por Mendel et al. (2004) e Gonzalez e Solís (2015). O segundo estágio (E2) é identificado pela presença de um tecido suberificado no local da oviposição. E2 descrito nesse estudo, denominado cicatriz suberificada (Figuras 1C, 1D), corresponde ao estágio 1 reportado por Mendel et al. (2004) e Gonzalez e Solís (2015). Ele é mais facilmente visualizado a olho nu do que o estágio anel amarronzado. O terceiro estágio (E3) é a galha propriamente dita, de coloração esverdeada brilhante. E3, denominado de galha esverdeada (Figuras 1E, 1F), corresponde ao estágio 2 de Mendel et al. (2004) e Gonzalez e Solís (2015). Indivíduos nos estádios de larva, pupa e pré-adulto foram encontrados nessas galhas esverdeadas brilhantes. Ao contrário de Mendel et al. (2004) que encontraram somente larvas pequenas nesse estágio de desenvolvimento da galha. O quarto estágio (E4) é identificado pela mudança na coloração da galha, de verde para rosado ou avermelhado, sugerindo a proximidade da emergência. E4 aqui descrito corresponde ao estágio 3 de Mendel et al. (2004), mas pode variar entre genótipos em termos de presença ou ausência (Gonzalez e Solís 2015). Esse estágio é denominado de galha avermelhada (Figuras 1G, 1H) e foi encontrado ausente em diferentes galhas observadas no mesmo genótipo aqui estudado. Nesse estudo, ocorreram emergências em galhas de coloração esverdeada brilhante, ou seja, sem a mudança da galha de E3 para E4. Entretanto, E4 pode ser utilizado como um indicador de proximidade do período de emergência, já que muitas galhas com essa coloração foram observadas antes da emergência (Figura 2D). Além do mais, galhas observadas em ambos os clones estudados estavam sempre brilhantes até o momento da emergência, corroborando com os resultados encontrados por Gonzalez e Solís (2015). Portanto, não foi encontrado o estágio 4 da galha relatado por Mendel et al. (2004), os quais descrevem este como a perda de brilho dos tecidos externos na região da galha. O quinto e último estágio (E5) é identificado pela presença de orifícios de

emergência nas galhas, causados pela saída das vespas adultas de *L. invasa*. Após a saída das vespas, a região da galha muda a coloração de esverdeada ou rosada/avermelhada para amarronzada novamente, mas com aparência de tecido morto ao redor do orifício (Figura 1I, 1J). O estágio E5 corresponde ao quinto estágio da galha reportado por Mendel et al. (2004) e terceiro reportado por Gonzalez e Solís (2015).

Resposta temporal de desenvolvimento da galha

A duração de E1 e E2 foi mais longa no clone tolerante do que no susceptível ($F_{1,7} = 26,88$, $P = 0,0012$ para E1, Figura 2A; $F_{1,7} = 17,06$, $P = 0,0044$ para E2, Figura 2B). O estágio anel amarronzado no clone susceptível durou cerca de $5,5 \pm 0,2$ d.a.i., enquanto no tolerante, cerca de $10,3 \pm 1,1$ dias, respectivamente. O estágio cicatriz suberificada teve a duração aproximada de $2,3 \pm 0,2$ e $10,0 \pm 1,5$ dias nos clones susceptível e tolerante, respectivamente. Ao contrário, E3 foi mais longo no clone susceptível do que no tolerante ($F_{1,21} = 47,98$, $P < 0,0001$; Figura 2C), cujos valores para o tempo de duração foram de aproximadamente $33,0 \pm 0,9$ e $21,7 \pm 0,8$ dias, respectivamente. A duração de E4 foi significativamente similar em ambos os clones ($F_{1,14} = 0,00$, $P = 1,0000$; Figura 2D), sendo $7,0 \pm 0,6$ dias para o clone susceptível e $7,0 \pm 1,0$ dias para o clone tolerante.

A emergência nas galhas marcadas durante a infestação (advindas da primeira oviposição) iniciou no 45º d.a.i. e terminou no 98º d.a.i., no clone susceptível, enquanto que iniciou no 48º d.a.i. e terminou no 57º d.a.i., no clone tolerante. Apesar de todas as avaliações terem sido realizadas nas mesmas galhas marcadas, não é possível garantir que as primeiras vespas que emergiram não tenham ovipositado novamente nas galhas já com vespas em desenvolvimento. Assim, não é possível garantir que as emergências que ocorreram após o 90º dia (tempo total mínimo para dois ciclos de vida no híbrido susceptível, ou seja, 45x2) sejam advindas da primeira oviposição. Portanto, considerando que o 84º dia foi o último dia de emergência (pois não houve emergência entre o 85º e o 90º dia), o intervalo de emergência considerado para o clone susceptível foi de 39 dias e, para o clone tolerante, de 9 dias. Foi possível observar que durante a emergência das galhas desenvolvidas no clone susceptível, as folhas caem antes de saírem todas as vespas e, algumas emergem das folhas caídas e outras morrem sem conseguir sair. Essas emergências que ocorreram após a abscisão foliar também foram contabilizadas.

O tempo médio que as vespas de *L. invasa* levaram da infestação até a emergência das galhas, ou, em outras palavras, o tempo total de desenvolvimento de ovo até adulto, foi significativamente semelhante entre os dois clones ($F_{1,330} = 0,3428$, $P = 0,5586$; Figura 2E). Sendo de $52,39 \pm 0,50$ dias para o clone susceptível e $51,55 \pm 0,90$ dias para o clone tolerante.

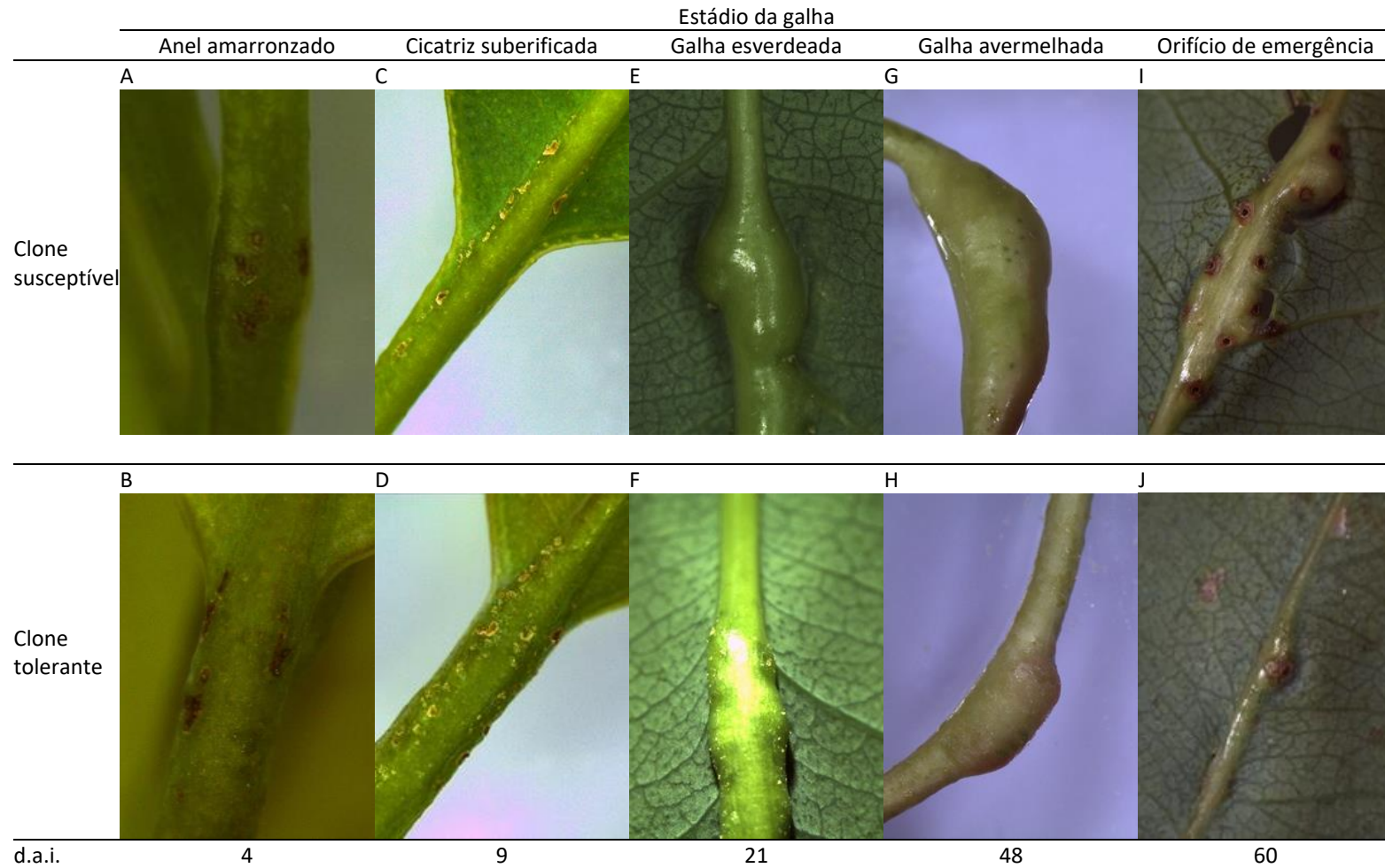


Figura 1. Estádios de desenvolvimento da galha induzidos por *L. invasa*, em dois clones de *Eucalyptus*. Anel amarronzado no local da oviposição por *L. invasa*, quatro dias após a infestação (d.a.i.), em pecíolos de primórdios foliares do clone susceptível (A) e tolerante (B); cicatriz suberificada no local de oviposição, nove d.a.i., nas nervuras centrais e pecíolos de folhas do clone susceptível (C) e tolerante (D); galhas esverdeadas nas nervuras centrais de folhas do clone susceptível (E) e tolerante (F), 21 d.a.i.; galhas avermelhadas no pecíolo de folhas do clone susceptível (G) e tolerante (H), 48 d.a.i.; orifícios de emergência causados pela saída dos adultos de *L. invasa* localizados nas nervuras centrais de folhas do clone susceptível (I) e tolerante (J), 60 d.a.i..

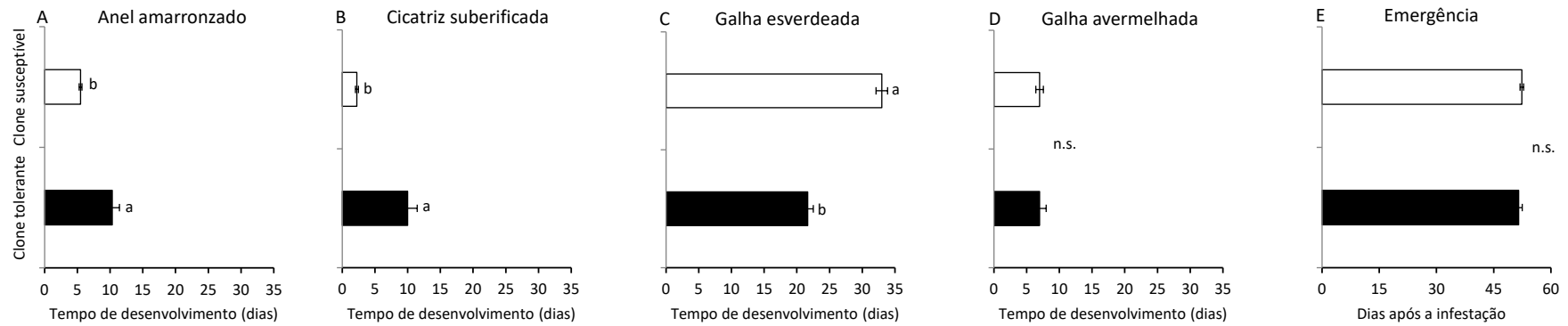


Figura 2. Duração (dias) de cada estágio de desenvolvimento da galha induzida por *L. invasa*: anel amarronado (A), cicatriz suberificada (B), galha esverdeada (C) e galha avermelhada (D). Período da infestação até a emergência (E) em dias após a infestação. Clone de *Eucalyptus* susceptível (□) e tolerante (■) à *L. invasa*. As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significam diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

Resposta temporal de desenvolvimento do inseto

A fase de ovo (Figura 3A) teve menor tempo de duração no clone susceptível do que no tolerante, sendo aproximadamente $8,33 \pm 1,35$ e $18,25 \pm 2,88$ dias, respectivamente ($F_{1,8} = 9,5320$, $P = 0,0149$; Figura 3F). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os clones quanto ao tempo de duração de larva pequena (Figura 3B), sendo aproximadamente de $6,50 \pm 0,46$ e $11,0 \pm 3,27$ dias, nos clones susceptível e tolerante, respectivamente ($F_{1,7}=2,7391$, $P=0,1419$; Figura 3G). A fase de larva madura (Figura 3C) foi mais longa no clone susceptível ($19,50 \pm 1,33$ dias) do que no tolerante ($13,75 \pm 0,65$ dias) ($F_{1,14} = 5,3052$, $P = 0,0371$; Figura 3H). As fases de pré-pupa (Figura 3D) e pupa (Figura 3E) não diferiram significativamente entre os clones, quanto ao tempo de duração ($F_{1,7}=2,7391$, $P=0,1419$, para pré-pupa, Figura 3I; $F_{1,7}=2,7391$, $P=0,1419$, para pupa, Figura 3J). A fase de pré-pupa durou cerca de $9,22 \pm 1,03$ e $9,20 \pm 1,00$ dias, enquanto de pupa foi de $11,00 \pm 0,93$ e $11,00 \pm 0,90$ dias, nos clones susceptível e tolerante, respectivamente.

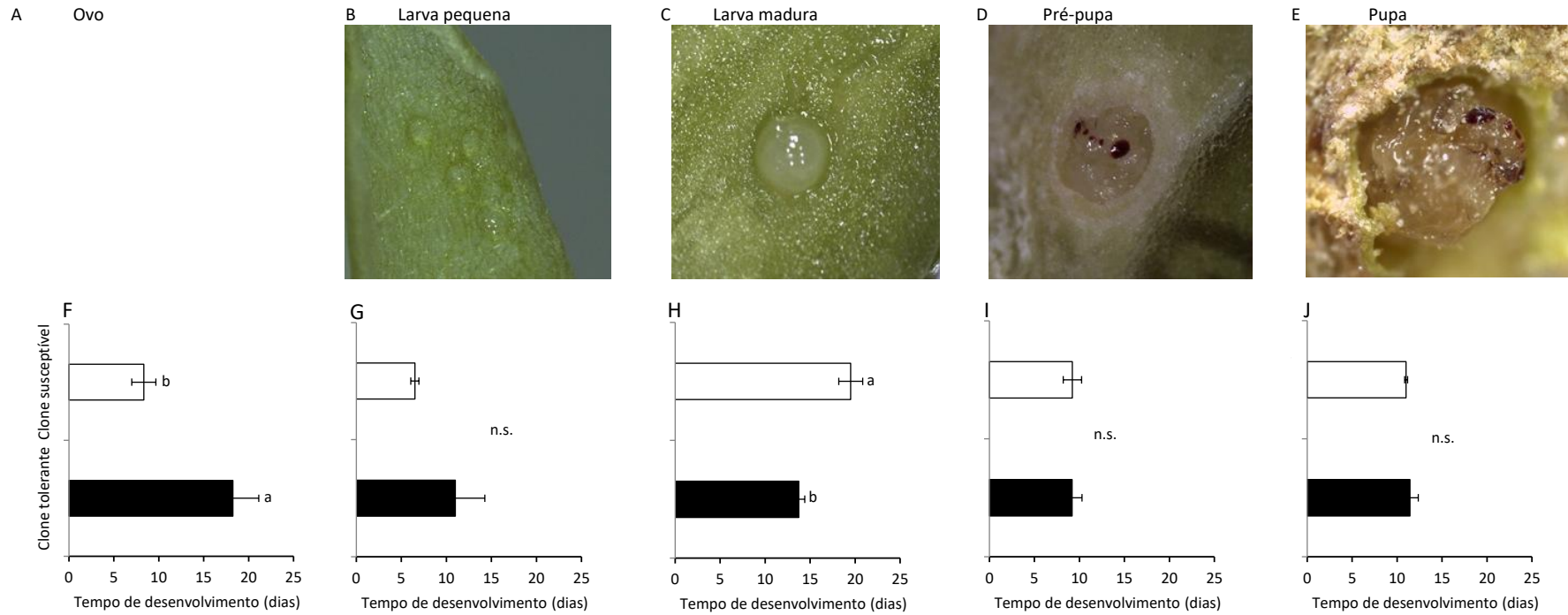


Figura 3. Diferentes estádios de desenvolvimento de *L. invasa* durante seu ciclo de vida: (A) ovo, (B) larva pequena, (C) larva madura, (D) pré-pupa, (E) pupa. Tempo de duração (dias) de cada estágio de desenvolvimento de *L. invasa* em dois clones de *Eucalyptus*: The stages of development of the wasp were: (F) ovo, (G) larva pequena, (H) larva madura, (I) pré-pupa, (J) pupa. Clone de *Eucalyptus* susceptível (□) e tolerante (■) à *L. invasa*. As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

Respostas morfológicas externas dos hospedeiros durante o desenvolvimento da galha e emergência do inseto

As vespas ovipositaram em todas as plantas em ambos os tratamentos (Figura 4A). Enquanto no clone susceptível todas as plantas desenvolveram galhas, no tolerante apenas 62,5% desenvolveram as mesmas (Figura 4B). No clone susceptível, 87,5% das plantas inicialmente ovipositadas por *L. invasa* apresentaram orifícios de emergência, enquanto no tolerante, as mesmas 62,5% do resultado anterior (Figura 4C).

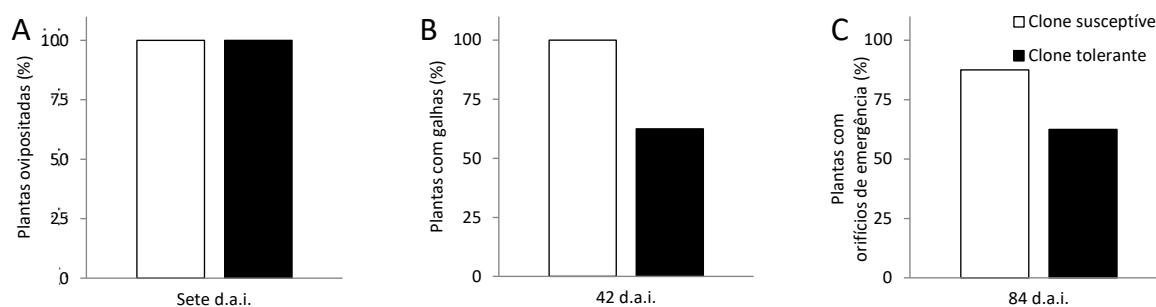


Figura 4. (A) Plantas ovipositadas por *L. invasa*, sete d.a.i.; (B) Plantas com galhas, 42 d.a.i.; (C) Plantas com orifícios de emergência, 84 d.a.i., de dois clones de *Eucalyptus* (susceptível (□) e tolerante (■) à *L. invasa*) infestados com *L. invasa*.

O número de folhas ovipositadas contabilizadas, no clone susceptível, foi significativamente semelhante aos um e sete d.a.i.. Entretanto, esses resultados foram significativamente maiores do que o obtido aos 14 d.a.i.. Que, por sua vez, foi maior do que o obtido aos 21 d.a.i. para esse mesmo clone ($F_{3,28} = 40,93$, $P < 0,0001$; Figura 5A). No clone tolerante, o número de folhas ovipositadas aos um e sete d.a.i. foram significativamente iguais e maiores do que aos 14 e 21 d.a.i.. Sendo que, esses dois últimos também foram significativamente iguais entre si ($F_{3,26} = 28,91$, $P < 0,0001$; Figura 5B). Após os 21 dias, esse parâmetro não foi mais contabilizado em ambos os clones, pois todas as folhas e entrenós já estavam com galhas em desenvolvimento. As médias do número de folhas ovipositadas por planta ao um, sete, 14 e 21 d.a.i. foram, no clone susceptível, $26,4 \pm 2,2$, $30,0 \pm 1,7$, $14,9 \pm 0,7$, $6,4 \pm 1,3$ e, no tolerante, $33,6 \pm 2,6$, $33,9 \pm 1,7$, $18,1 \pm 1,6$, $13,3 \pm 0,6$, respectivamente. Apesar de não haver diferença estatística significativa entre um e sete d.a.i., a avaliação aos sete dias no clone susceptível permitiu a contabilização de um número maior de folhas ovipositadas, possivelmente, devido a melhor visualização desse parâmetro nesta data do que ao um d.a.i. nesse mesmo clone. Levando este fato em

consideração, a comparação entre os clones foi realizada aos sete d.a.i., demonstrando que não houve diferença significativa entre os clones quanto a esse parâmetro ($t=-1,5265$, $gl=14$, $P=0,1492$).

A visualização do local de oviposição pela vespa-da-galha-do-eucalipto nos entrenós dos clones estudados não foi possível aos um e sete d.a.i., nas observações em campo. A determinação do número médio de entrenós ovipositados por planta ocorreu aos 14 e 21 d.a.i., em ambos os clones estudados. Sendo que, não houve diferença significativa no número de entrenós ovipositados aos 14 e 21 d.a.i., tanto no híbrido susceptível ($F_{1,14}=1,84$, $P<0,1962$; Figura 5C), quanto no híbrido tolerante ($F_{1,12}=1,59$, $P<0,2315$; Figura 5D). Aos 28, 35 e 42 d.a.i., todas as folhas e entrenós já estavam com as galhas em desenvolvimento e não foram mais contabilizados esses dois parâmetros em ambos os clones. As médias do número de entrenós ovipositados por planta aos 14 e 21 d.a.i. foram $1,0\pm 0,4$, $0,4\pm 0,2$, no clone susceptível, e $0,7\pm 0,3$, $0,3\pm 0,2$, no tolerante, respectivamente. Os clones não diferiram significativamente quanto ao número médio de entrenós ovipositados aos 14 d.a.i. ($t=0,5432$, $gl=13$, $P=0,5962$).

O número médio de galhas desenvolvidas nas folhas por planta do clone susceptível se manteve constante em todos os períodos avaliados (i.e. 14, 21, 28, 35 e 42 d.a.i.; $F_{4,35}=0,0036$, $P=0,9999$; Figura 5E). Também não houve diferença quanto a esse parâmetro para o híbrido tolerante, entre todos os períodos avaliados (i.e. 14, 21, 28, 35 e 42 d.a.i.; $F_{4,30}=1,6861$, $P=0,1792$; Figura 5F). As médias foram $6,4\pm 1,1$, $6,4\pm 1,1$, $6,4\pm 1,1$, $6,5\pm 1,1$ e $6,5\pm 1,1$, para o susceptível, e $0,7\pm 0,2$, $2,7\pm 0,7$, $2,6\pm 0,7$, $1,9\pm 0,5$ e $1,9\pm 0,5$, para o tolerante, respectivamente. Assim, para evitar a sobreposição de datas com o parâmetro anterior e não utilizar uma data muito próxima à emergência, a comparação entre os clones foi realizada aos 35 d.a.i.. Houve diferença significativa quanto ao número médio de galhas desenvolvidas nas folhas por planta, entre os dois clones, aos 35 d.a.i. ($t=3,4706$, $gl=13$, $P=0,0041$).

A presença de galhas no entrenó foi verificada somente no híbrido susceptível. A visualização e contagem das mesmas ocorreram aos 28, 35 e 42 d.a.i., sendo que as médias desses períodos não diferiram entre si ($F=0,76$, $gl=2,21$, $P=0,4816$; Figura 5G). As médias foram $0,1\pm 0,1$, $0,4\pm 0,2$, $0,4\pm 0,2$, respectivamente.

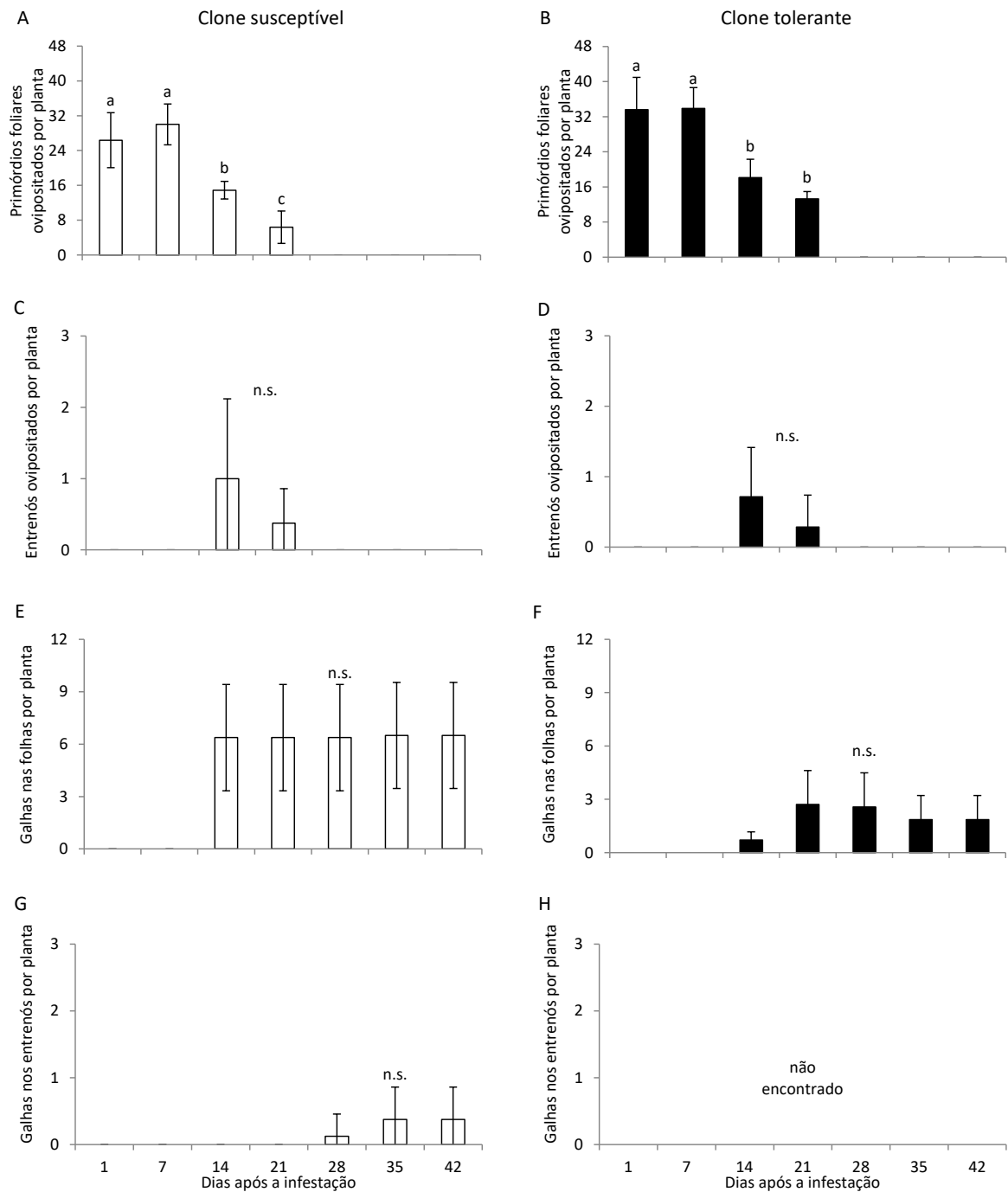


Figura 5. Número de folhas (A,B) e entrenós (C,D) ovipositados por *L. invasa*, por planta, em quatro diferentes tempos após a infestação (i.e., aos 1, 7, 14, e 21 dias); Número de galhas nas folhas (E,F) e de galhas nos entrenós (G,H) em cinco diferentes tempos após a infestação (i.e., aos 14, 21, 28, 35, e 42 dias), em dois clones de *Eucalyptus* (susceptível (□) e tolerante (■) à *L. invasa*). As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

As galhas do clone susceptível aumentaram no sentido do comprimento até próximo à emergência ($F_{4,200}=4,3072$, $P=0,0023$; Figura 6A), aos 42 d.a.i.. Enquanto que, as galhas do clone tolerante mantiveram o mesmo comprimento desde os catorze dias após a infestação até o último período avaliado ($F_{4,24}=0,1781$, $P=0,9475$; Figura 6B), 52 d.a.i.. As médias do comprimento da galha de *L. invasa* formadas na nervura central de folhas do clone susceptível foram $9,19\pm 0,63$ mm, $11,20\pm 0,74$ mm, $11,62\pm 0,73$ mm, $12,55\pm 0,76$ mm e $13,18\pm 0,77$ mm, aos 14, 28, 35, 42 e 52 d.a.i., respectivamente. Enquanto que, as médias no clone tolerante nesses mesmos períodos foram $5,23\pm 0,83$ mm, $5,28\pm 0,37$ mm, $4,81\pm 0,24$ mm, $4,97\pm 0,30$ mm e $5,20\pm 0,37$ mm, respectivamente. A comparação entre as médias de comprimento das galhas dos clones avaliados foi realizada aos 42 d.a.i., devido esse período de avaliação ser o período no qual as galhas do clone susceptível obtiveram seu tamanho máximo dentre os períodos avaliados antes do início da emergência. As médias de comprimento da galha foram diferentes entre os clones avaliados aos 42 d.a.i. ($t=3,8571$, $gl=42$, $P<0,0003$).

A média da largura da nervura central das folhas aos zero d.a.i. (folhas sadias de plantas não infestadas; Figura 6C) foram significativamente iguais entre os clones susceptível e tolerante ($F_{4,4}=0,3778$, $P=0,3686$; Figuras 6C,6D), sendo $1,19\pm 0,03$ mm e $1,20\pm 0,04$ mm, respectivamente. As galhas formadas nas folhas do clone susceptível aumentam substancialmente em largura já nos primeiros 14 d.a.i., quando comparada com a largura da nervura central das folhas aos zero d.a.i.. Esse aumento se estabiliza por volta dos 35 d.a.i., período em que atingem a maior largura, não diferindo a média da largura deste período dos períodos subsequentes avaliados ($F_{5,204}=10,7507$, $P<0,0001$; Figura 6C). As galhas do clone tolerante mantêm a largura significativamente igual à largura aos zero d.a.i., durante todos os períodos avaliados ($F_{5,55}=0,3278$, $P=0,8940$; Figura 6D). A média da largura da galha induzida por *L. invasa* na nervura central de folhas aos 14, 28, 35, 42 e 52 d.a.i. foram $3,02\pm 0,14$ mm, $3,56\pm 0,14$ mm, $3,72\pm 0,14$ mm, $3,63\pm 0,13$ mm e $3,65\pm 0,13$ mm, para o clone susceptível, e $1,17\pm 0,14$ mm, $1,03\pm 0,15$ mm, $1,24\pm 0,18$ mm, $1,26\pm 0,18$ mm e $1,30\pm 0,13$ mm, para o clone tolerante, respectivamente. A comparação da largura da galha entre os clones avaliados aos 42 d.a.i. mostra diferença significativa entre as médias obtidas ($t=9,4616$, $gl=49$, $P<0,0001$). O período 42 d.a.i. foi escolhido para ser realizada a comparação entre os clones, para manter o mesmo período utilizado para testar as médias

de comprimento. Já que, não houve diferença entre os períodos de 35 e 42 d.a.i. para o clone susceptível, quanto a esse parâmetro (Figura 6C).

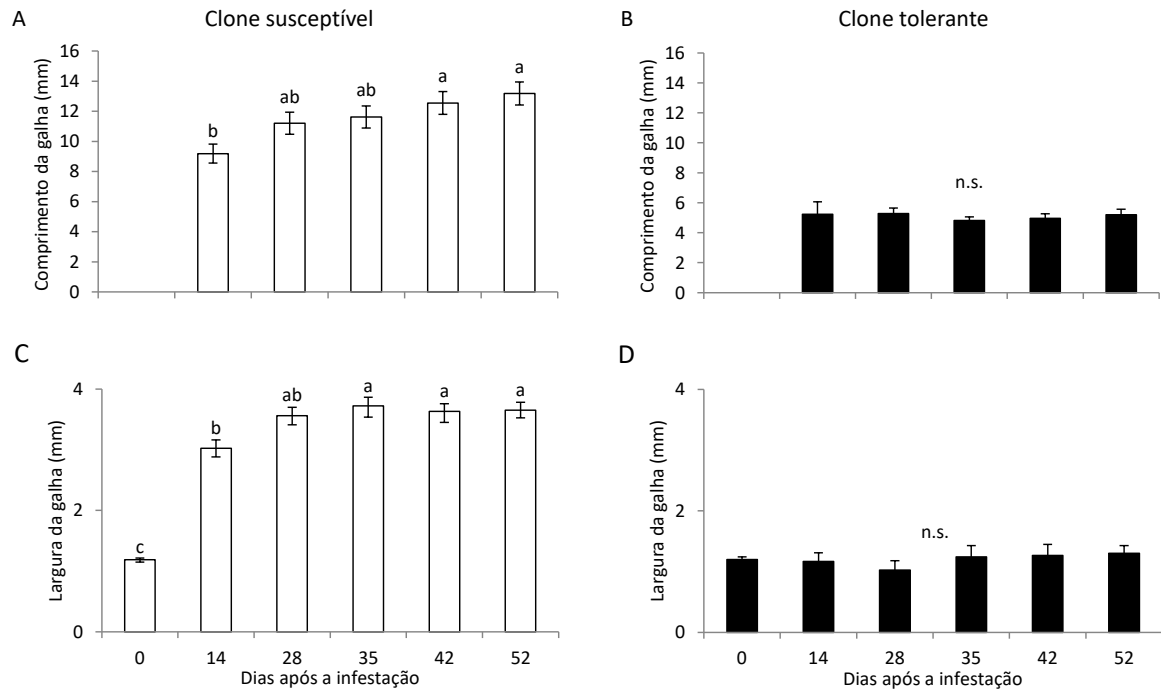


Figura 6. Comprimento (A,B) e largura (C,D) de galhas induzidas por *L. invasa* em dois clones de *Eucalyptus* (susceptível (□) e tolerante (■) à *L. invasa*), em cinco diferentes tempos após a infestação (i.e., 14, 28, 35, 42, e 52 dias). As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo.

O número total de orifícios de emergência no clone susceptível foi significativamente maior do que no clone tolerante ($t=3,8520$, $gl=14$, $P=0,0018$; Figura7). A média do número de orifícios de emergência por planta no clone susceptível foi de $39,1 \pm 9,2$ e no tolerante, $1,1 \pm 0,4$.

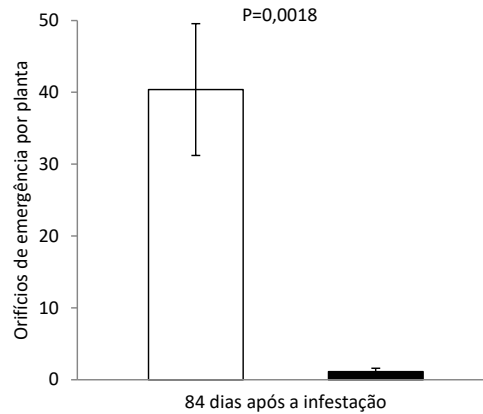


Figura 7. Número de orifícios de emergência por planta, provocados por *L. invasa* em folhas e entrenós de dois clones de *Eucalyptus* (susceptível (□) e tolerante (■) à *L. invasa*). A contagem foi diária, durante o intervalo de 39 dias (do 45º ao 84º dia após a infestação), totalizando um ciclo de desenvolvimento do inseto. As barras correspondem à média \pm erro-padrão.

Discussão

As diferenças do tempo de duração dos estádios de desenvolvimento que antecedem, tanto o aparecimento da galha propriamente dita (Figuras 2A, 2B), bem como, a eclosão da vespa (Figura 3F), revelam um diferencial de tempo de resposta entre os dois clones de *Eucalyptus* estudados. Portanto, esses parâmetros temporais servem para demonstrar diferenças de susceptibilidade desses clones à *L. invasa*. Além disso, um estágio de desenvolvimento da galha ainda não reportado na literatura foi identificado em ambos os clones (Figuras 1A, 1B). Se os mecanismos de defesa da planta tolerante atuassem mais fortemente na fase de entumescimento da galha, o número de galhas no início do desenvolvimento das mesmas teria que ser semelhante entre os clones avaliados. Porém, a quantidade (Figuras 5E, 5F, 5G, 5H) e tamanho (Figura 6) de galhas é menor no clone tolerante quando comparado ao susceptível, desde o início do entumescimento das mesmas. Como *L. invasa* teve sucesso na oviposição em ambos os clones (Figuras 4A, 5A, 5B, 5C, 5D), esses resultados indicam que a partir do momento da oviposição, a planta com características de resistência à *L. invasa* atua diretamente no indivíduo que foi ovipositado em seu tecido, para que ele não se desenvolva. Além disso, o tempo de duração dos estádios iniciais de desenvolvimento da galha foi mais curto no clone susceptível do que no tolerante (Figuras 2A, 2B). O mesmo atraso também foi observado no estágio inicial de ovo de *L. invasa* no clone tolerante quando comparado ao clone susceptível (Figura 3F). Entretanto, para os indivíduos de vespas que escaparam da defesa da planta tolerante, o atraso ocorrido nos estádios iniciais foi compensado durante o terceiro estágio de desenvolvimento da galha e do inseto (Figuras 2C, 3H, respectivamente). De maneira tal que, o tempo total de desenvolvimento do inseto não difere significativamente entre os clones estudados (Figura 2E). Esse tempo está altamente correlacionado com a temperatura ambiental, de acordo com experimentos já realizados em temperatura controlada (Zhu et al. 2015) em clones de *E. urophylla* × *E. camaldulensis* infestados com *L. invasa*. A duração do intervalo que compreende a infestação até a emergência das vespas sugere, pelo menos, cerca de sete gerações em um único ano (365/52,39 ou 365/51,55 dias) nas condições ambientais aqui utilizadas, independentemente do clone. Apesar de esse tempo ter sido significativamente igual entre os clones, o intervalo da duração da emergência em números absolutos no clone susceptível é quatro vezes maior

do que no tolerante (39 e 9 dias, respectivamente). Portanto, o período de emergência de *L. invasa* em um hospedeiro susceptível pode se prolongar, pelo menos, até próximo à emergência da segunda geração. Enquanto que, em um hospedeiro menos susceptível, esse período fica limitado ao tempo mínimo de desenvolvimento necessário para o ovo se tornar um inseto adulto. Isso sugere que o clone tolerante deve continuar produzindo defesas ao longo de todo o ciclo do inseto, pois, tão logo os insetos que estão nas plantas tolerantes conseguem atingir a maturidade, eles emergem das galhas, enquanto que aqueles insetos que estão nas plantas susceptíveis vão saindo mais lentamente. Esse comportamento da emergência no híbrido susceptível explica porque ocorre a presença de adultos ao longo de todo ano, em locais com menos gerações anuais devido aos ciclos estacionais, mas com genótipos de *Eucalyptus* susceptíveis à *L. invasa* (Nyeko et al. 2010). Por outro lado, a emergência de insetos galhadores já foi relacionada a mudanças climáticas (Xi et al. 2016) e até à fenologia das plantas hospedeiras (Yukawa 2000). Entretanto, ainda não existem estudos aprofundados sobre a relação da emergência com os mecanismos de defesa dos hospedeiros. Além disso, também foi observado que a infestação das plantas ocorrida durante um período de 24 horas foi suficiente para aumentar o tamanho populacional inicial das vespas em 20 vezes no clone susceptível e, essa mesma população inicial, foi reduzida quase pela metade no clone tolerante (Figura 7).

Concluindo, a diferença de susceptibilidade entre os clones estudados não pode ser visualizada, como esperávamos, nas diferenças entre a ocorrência de determinados estádios de desenvolvimento das galhas, densidade de oviposição ou no tempo total de duração do ciclo de vida do inseto. Essa diferença foi encontrada, particularmente, no tempo de desenvolvimento dos estádios que precedem a formação da galha propriamente dita, bem como, que precedem a eclosão do inseto, na quantidade de plantas com galhas e orifícios de emergência, na quantidade de galhas por planta, seja nas folhas ou nos entrenós, no comprimento e largura das galhas e na quantidade de orifícios de emergência por planta (ou seja, quantidade de indivíduos que conseguem completar o ciclo de vida). Esse resultado é consequência dos mecanismos de interação entre o inseto e a planta, os quais ocorrem, como apontado acima, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimento da galha e do inseto. Embora essa interação possa se estender até a emergência deste. Portanto, investigações dos mecanismos de defesa de *Eucalyptus* contra *L. invasa* também

devem ser realizadas tão logo ocorra a oviposição de plantas infestadas com a vespa, ou, em outras palavras, antes mesmo do início do entumescimento da galha.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (Projeto: 204521/2014-9).

Referências

- Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63, 3523–3543. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>
- Correia, B., Pintó-Marijuan, M., Castro, B.B., Brossa, R., López-Carbonell, M., Pinto, G., 2014. Hormonal dynamics during recovery from drought in two *Eucalyptus globulus* genotypes: From root to leaf. *Plant Physiology and Biochemistry* 82, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.05.016>
- Dittrich-Schröder, G., Wingfield, M.J., Hurley, B.P., Slippers, B., 2012. Diversity in *Eucalyptus* susceptibility to the gall-forming wasp *Leptocybe invasa*. *Agricultural and Forest Entomology* 14, 419–427. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2012.00583.x>
- Durand, N., Rodrigues, J. C., Mateus, E., Boavida, C., Branco, M., 2011. Susceptibility variation in *Eucalyptus* spp. in relation to *Leptocybe invasa* and *Ophelimus maskelli* (Hymenoptera: Eulophidae), two invasive gall wasps occurring in Portugal. *Silva Lusitana* n° especial, 19–31.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2012. *Leptocybe invasa*: blue gum chalcid Hymenoptera: Eulophidae. Forest pest species profiles August 2012. Disponível em <http://www.fao.org/forestry/13569-05912e0e2fe9054c3ed4904ae597e3310.pdf>
- Gonçalves, J.L. de M., Alvares, C.A., Higa, A.R., Silva, L.D., Alfenas, A.C., Stahl, J., Ferraz, S.F. de B., Lima, W. de P., Brancalion, P.H.S., Hubner, A., Bouillet, J.-P.D., Laclau, J.-P., 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, A.M., Solís, S.M., 2015. Anatomía y morfogénesis de las agallas producidas por *Leptocybe invasa* en plantas de *Eucalyptus*. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 2 50, 141–151.
- Isaias, R. M. S., Oliveira, D. C., Carneiro, R. G. S., Kraus, J. E., 2014. Developmental anatomy of galls in the Neotropics: arthropods stimuli versus host plant constraints. In *Neotropical Insect Galls* (eds. Fernandes, G. W., Santos, J. C.). 15-34 (Springer & Business Media, Dordrecht).

- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Moreira, A.S.F.P., Soares, G.L.G., Carneiro, R.G.S., 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850, 1509–1517. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>
- Li, X.Q., Liu, Y.Z., Guo, W.F., Solanki, M.K., Yang, Z.D., Xiang, Y., Ma, Z.C., Wen, Y.G., 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>
- Luo, J., Arnold, R., Lu, W., Lin, Y., 2014. Genetic variation in *Eucalyptus camaldulensis* and *E. tereticornis* for early growth and susceptibility to the gall wasp *Leptocybe invasa* in China. *Euphytica* 196, 397–411. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1042-8>
- Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N., La Salle, J., 2004. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. *Australian Journal of Entomology* 43, 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2003.00393.x>
- Nadel, R., Slippers, B., 2011. *Leptocybe invasa*, the blue gum chalcid wasp. Information Sheet ICFR. Disponível em <http://www.forestry.co.za/uploads/File/home/notices/2011/ICFR%20IS01-2011gallwasp.pdf>
- Nyeko, P., Mutitu, E.K., Day, R.K., 2007. Farmers' knowledge, perceptions and management of the gall-forming wasp, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), on *Eucalyptus* species in Uganda. *International Journal of Pest Management* 53, 111–119. <https://doi.org/10.1080/09670870601185230>
- Nyeko, P., Mutitu, K.E., Otieno, B.O., Ngae, G.N., Day, R.K., 2010. Variations in *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) population intensity and infestation on eucalyptus germplasms in Uganda and Kenya. *International Journal of Pest Management* 56, 137–144. <https://doi.org/10.1080/09670870903248835>
- Oates, C.N., Külheim, C., Myburg, A.A., Slippers, B., Naidoo, S., 2015. The Transcriptome and Terpene Profile of *Eucalyptus grandis* Reveals Mechanisms of Defense Against the Insect Pest, *Leptocybe invasa*. *Plant and Cell Physiology* 56, 1418–1428. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv064>
- Rocha, S., Branco, M., Boas, L.V., Almeida, M.H., Protasov, A., Mendel, Z., 2013. Gall induction may benefit host plant: a case of a gall wasp and eucalyptus tree. *Tree Physiology* 33, 388–397. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt009>
- Stone, G.N., Schönrogge, K., 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 512–522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Thu, P. Q., Dell, B., Burgess, T. I., 2009. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and young plantations in Vietnam. *Science Asia* 35, 113–117. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2009.35.11>
- Tong, Y.-G., Ding, X.-X., Zhang, K.-C., Yang, X., Huang, W., 2016. Effect of the Gall

- Wasp *Leptocybe invasa* on Hydraulic Architecture in *Eucalyptus camaldulensis* Plants. *Frontiers in Plant Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00130>
- Wilcken, C. F., Berti Filho, E., 2008. Vespa-da-galha-do-eucalipto (*Leptocybe invasa*) (Hymenoptera: Eulophidae): nova praga de florestas de eucalipto no Brasil. Disponível em <http://www.ipef.br/protecao/alerta-leptocybe.invasa.pdf>
- Wiley, J., Skelley, P. A., 2008. A *Eucalyptus* pest, *Leptocybe invasa* Fisher and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae), genus and species new to Florida and North America. Disponível em https://www.freshfromflorida.com/content/download/68487/1614796/Pest_Alert_-_Leptocybe_invasa,_Blue_Gum_Chalcid.pdf
- Xi, X., Li, D., Peng, Y., Eisenhauer, N., Sun, S., 2016. Experimental warming and precipitation interactively modulate the mortality rate and timing of spring emergence of a gallmaking Tephritid fly. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep32284>
- Yukawa, J., 2000. Synchronization of galls with host plant phenology. *Population Ecology* 42, 105–113. <https://doi.org/10.1007/PL00011989>
- Zhang, M., Zhou, C., Song, Z., Weng, Q., Li, M., Ji, H., Mo, X., Huang, H., Lu, W., Luo, J., Li, F., Gan, S., 2018. The first identification of genomic loci in plants associated with resistance to galling insects: a case study in *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20780-9>
- Zhu, F., Ren, S., Qiu, B., Huang, Z., Peng, Z., 2012. The Abundance and Population Dynamics of *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) Galls on *Eucalyptus* spp. in China. *Journal of Integrative Agriculture* 11, 2116–2123. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60470-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60470-5)
- Zhu, F., Ren, S., Qiu, B., Wu, J., 2015. Effect of temperature on life table parameters of *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae): Effect of temperature on *Leptocybe invasa*. *Austral Entomology* 54, 71–78. <https://doi.org/10.1111/aen.12094>

CAPÍTULO 3. Contrastando mecanismos de respostas de *Eucalyptus* durante ataque por *Leptocybe invasa*: o papel dos hormônios

Maíra Ignacio Sarmiento, Glória Pinto, Marciane Cristina Dotto, Pablo Henrique Nunes Carvalho, Wagner Luiz Araújo, Auxiliadora Oliveira Martins, Amadeu M.V.M. Soares, Renato Almeida Sarmiento

Resumo

Os mecanismos de respostas de defesa de plantas à insetos galhadores, bem como, de crescimento e desenvolvimento de galhas induzidas por insetos em plantas ainda são pouco conhecidos. Este estudo objetivou entender quais mecanismos, a nível bioquímico/fisiológico e hormonal, são acionados como resposta de defesa de plantas de eucaliptos atacadas pelo inseto galhador *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) nas principais fases de desenvolvimento da galha e do inseto (pré-galha/ ovo, galha/ larva e galha em pré-emergência/ pupa, respectivamente). Bem como, auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na indução/ formação de galhas por insetos galhadores parasitas de plantas. Para tanto, dois clones de *Eucalyptus* com diferentes graus de susceptibilidade (susceptível e tolerante à praga) e o inseto galhador foram utilizados. Os tratamentos foram clone susceptível infestado, clone tolerante infestado, clone susceptível controle e clone tolerante controle. Em três diferentes tempos de desenvolvimento da galha/ vespa, verificou-se os efeitos dos fatores clone (susceptível e tolerante), vespa (plantas controle e plantas infestadas) e a interação de ambos. Para tanto, foram utilizados parâmetros relacionados ao crescimento da planta, fotossíntese, estresse oxidativo, defesa antioxidante e hormônios. Na fase de pré-galha, a defesa à *L. invasa* foi relacionada com a diminuição do crescimento da planta, aumento da atividade da CAT e da quantidade de ABA, maior conteúdo de clorofila a e quantidade de AS. Em contrapartida, o aumento do C_i , do AJ e do ABA, bem como, a manutenção dos parâmetros de crescimento, e a maior atividade da SOD e maiores quantidades de AJ, MeJa e Z, foram relacionadas à indução da galha. Na fase de galha, a defesa foi relacionada ao aumento da SOD e do MeJa, e à diminuição das AA e açúcares solúveis totais. Também, maior taxa de assimilação de CO_2 , atividade da CAT e conteúdo de MDA. Enquanto a formação da galha foi relacionada com a diminuição de AJ nessa fase. Apesar de AJ ainda estar presente em

grande quantidade, assim como, Z, no genótipo susceptível. Na fase de pré-emergência, a defesa foi pautada no aumento da condutância e da transpiração, e diminuição do Ci, do conteúdo de MDA e da quantidade de AA, bem como maior quantidade de ABA. A formação das galhas teve relação com o aumento da prolina, dos açúcares solúveis totais, de Z e MeJa. Bem como, maior quantidade de AJ, MeJa, ACC e Z.

Introdução

A maioria dos insetos galhadores de plantas são parasitas em, pelo menos, uma fase dos seus ciclos de vida. Durante a fase parasítica, eles vivem dentro do hospedeiro (Stone e Schönrogge 2003). Portanto, eles precisam ter a capacidade de suprimir as respostas de defesa da planta hospedeira (Giron et al. 2016, Oates et al. 2016), sejam elas constitutivas ou induzidas (Kant et al. 2015). Isso porque o parasita irá se desenvolver e se alimentar dentro da planta hospedeira. Necessitando assim, criar mecanismos para que a planta supra as suas necessidades de abrigo e alimento. Nesse processo de interação planta-parasita, são produzidas diversas substâncias, tanto por parte da planta hospedeira, quanto por parte do inseto galhador, respectivamente (Tooker e Helms 2014, Isaias et al. 2015, Giron et al. 2016, Oates et al. 2016, Borges 2018).

A defesa das plantas ao ataque de qualquer herbívoro está pautada na sinalização e síntese de compostos de defesa. Ao primeiro instante do ataque, as estruturas mecânicas e compostos químicos presentes constitutivamente na planta são responsáveis pela defesa. Quase instantaneamente, a planta envia sinais químicos para acionar a defesa induzida pelo herbívoro. A resposta de defesa induzida deverá ser mais direcionada ao tipo de agressor, quando comparada com a constitutiva (Kant et al. 2015). As substâncias químicas responsáveis pela sinalização da defesa são, principalmente, fitohormônios. Dentre os fitohormônios mais estudados como sinalizadores de defesa de plantas estão ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e etileno (ET), cujo precursor é o ácido aminociclopropanocarboxílico (ACC) (Kant et al. 2015). Nos estudos de galhas induzidas por insetos, AJ e AS já foram relatados como mediadores dessa defesa (Tooker e Helms 2014). Por outro lado, o sucesso do inseto galhador depende da supressão de defesa da planta e estímulo para o crescimento e desenvolvimento da galha, cujos precursores também são fitohormônios. Auxinas (AA), giberelina (GA) e citocininas estão entre esses hormônios (Tooker e Helms 2014, Jiang et al. 2018). Outro hormônio, com papel ainda controverso nesta interação, é o ácido abscísico (ABA) (Tooker e Helms 2014). Entretanto, a determinação de qual (is) hormônio (s) está (ão) envolvido (s) na indução ou supressão da defesa da planta não é simples e direta. Sabe-se que pode haver ainda o efeito “*crosstalk*” entre AJ e AS, podendo resultar em efeitos antagônicos na indução desses

hormônios entre essas vias sinalizadoras (Thaler et al. 2012), também entre ABA e GA, ou ABA e zeatina (Z), por exemplo (Tooker e DeMoraes 2011, Erb et al. 2012).

Além dos fitohormônios, existem outros sinalizadores de defesa, tais como, as espécies reativas de oxigênio (ERO) (Baxter et al. 2014). Mas como as ERO são tóxicas para as plantas, estas produzem enzimas que participam da maquinaria para desintoxicação, tais como, a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) (Halliwell 1974, Petkau 1975). Por outro lado, essas enzimas podem ser inibidas durante as respostas de defesa da planta, já que as ERO também têm efeito tóxico direto sobre herbívoros (Kant et al. 2015). As ERO podem causar peroxidação lipídica nas membranas celulares de plantas e animais (Halliwell 2006). Como o malondialdeído (MDA) é um produto final secundário formado durante a autooxidação e degradação enzimática dos ácidos graxos poliinsaturados nas células, ele é utilizado para estimar a peroxidação lipídica (Sinnhuber et al. 1958). Além do mais, as ERO podem desempenhar papéis distintos na interação planta e inseto galhador. Elas tanto são relacionadas com a resposta de defesa das plantas, seja como desencadeadoras da resposta de defesa sistêmica (Baxter et al. 2014, Zebelo e Maffei 2015) ou como toxinas com efeito direto contra os herbívoros (Kant et al. 2015), como são, também, relacionadas com a reprogramação das células do tecido vegetal que serão responsáveis pela formação da galha (Isaias et al. 2015). Além do MDA, a prolina também é utilizada como indicador de tolerância a estresses bióticos e abióticos (Khedr et al. 2003, Verbruggen e Hermans 2008). A prolina é um aminoácido derivado do glutamato ou da ornitina e contribui para o equilíbrio do potencial osmótico da célula. Esse aminoácido também tem sido relacionado a tecidos em rápida divisão celular (Verbruggen e Hermans 2008, Lehmann et al. 2010).

As respostas de defesa da planta tem um custo, assim como, a manutenção pela planta dos indivíduos galhadores que conseguem se desenvolver. Isso porque, durante o ataque do inseto, os compostos do metabolismo primário da planta que seriam utilizados para o seu crescimento e reprodução são translocados para o metabolismo secundário para a produção dos compostos de defesa (Kant et al. 2015). Além disso, havendo sucesso do galhador, a galha passa a ser dreno dos metabólitos primários, tais como, açúcares, aminoácidos e lipídeos, e secundários, vitaminas, entre outros, consumidos pelo inseto, também em detrimento do crescimento e reprodução da planta (McCrea et al. 1985). Os insetos galhadores podem modificar as taxas fotossintéticas (Larson 1998), o balanço

nutricional (Giron et al. 2016) e até os compostos de defesa (Borges et al. 2018) do hospedeiro em seu próprio benefício. Os cientistas questionam-se como insetos são capazes de induzir o crescimento e desenvolvimento de galhas em plantas (Stone e Schönrogge 2003, Hall et al. 2017). Por outro lado, com o surgimento de insetos galhadores que obtiveram o status de praga causando prejuízos econômicos em culturas, tais como, *Eucalyptus* (Mendel et al. 2004), aparece outra pergunta não menos intrigante: Como as plantas se defendem de insetos que têm a capacidade de manipular a maquinaria genética dessas mesmas plantas em seu próprio benefício?

O estudo das respostas de defesa de plantas a insetos galhadores é complexo. Os mecanismos de respostas de defesa de plantas à tais insetos ainda são pouco conhecidos. Este estudo teve, como principal objetivo, entender quais mecanismos, a nível bioquímico/fisiológico e hormonal, são acionados como resposta de defesa de plantas atacadas por um inseto galhador. Por fim, auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na indução/formação de galhas por insetos galhadores parasitas de plantas.

Material e métodos

Para este estudo, como plantas hospedeiras, foram selecionados dois clones híbridos de *Eucalyptus tereticornis* Sm. × *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., com diferente origem seminal. A seleção foi realizada com base na experiência das empresas Braxcel Florestal S.A e S&D Florestal Viveiro. Um clone (VS 058) é altamente susceptível à *L. invasa* (denominado daqui por diante como susceptível) e, o outro (VS 062), é menos susceptível (denominado daqui por diante como tolerante). Como inseto galhador foi utilizada a vespa-da-galha-do-eucalipto (*Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae)).

Obtenção das plantas hospedeiras

Todas as mudas dos clones de *Eucalyptus* utilizadas no experimento foram doadas pelo viveiro S&D Florestal Viveiro, localizado no Município de Martinho Campos, Estado de Minas Gerais, Brasil. Mudanças produzidas por estaquia e com seis meses de idade foram transplantadas de tubetes contendo palha de arroz carbonizada e fibra de coco para vasos de 3,8 L. Nesses vasos, foi utilizado substrato comercial Bioflora® (Empresa Bioflora Substratos Agrícolas, Município de Prata, Estado de Minas Gerais, Brasil) misturado a

palha de arroz carbonizada (7,5:3), 5,6g de adubo granulado 05-25-15, adicionado de Ca (4%), S (2%) e Zn (0,2%), bem como, 250 mL (4g/L) de hidrogel (copolímero poliacrílico de potássio poliacrilamida) hidratado Forth® (Empresa TECNUTRI do Brasil, Município de Tietê, Estado de São Paulo, Brasil). As mudas foram irrigadas diariamente durante todo o período do experimento para evitar estresse hídrico e adubadas quinzenalmente com a mesma quantidade e tipo do adubo supracitado para o plantio. Imediatamente após serem transplantadas, metade das mudas foram colocadas dentro de uma gaiola (2,95m x 2,45m x 5,92m - altura x comprimento x largura) revestida com organza, em casa de vegetação coberta com sombrite 50% de luz. A outra metade foi colocada em outra gaiola (distante 500 m da anterior), com as mesmas condições ambientais. Essas mudas foram mantidas para aclimação por um período de 45 dias até o início dos experimentos.

Criação do inseto galhador

A criação de *L. invasa* foi iniciada através de mudas do clone susceptível parasitadas pela microvespa e doadas pela empresa Braxcel Florestal S.A. Essas mudas foram colocadas dentro de uma gaiola (2,77m x 2,83m x 2,70m - altura x comprimento x largura) revestida com organza, em casa de vegetação coberta com sombrite 50%, denominada a partir de agora de gaiola de criação, juntamente com mudas sadias desse mesmo clone para serem ovipositadas. Exemplares da microvespa retirados da criação foram enviados ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken do Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAUNESP), que confirmou a identificação.

Delineamento Experimental

Durante o período dos experimentos, todas as plantas foram mantidas em temperatura média diária de 27,4°C ($T_{\text{máx}}$ 35,8°C e $T_{\text{mín}}$ 20,2°C) e umidade relativa do ar média de 61,0% (U.R._{máx} 86,6% e U.R._{mín} 33,9%).

Na gaiola de plantas infestadas, foram colocadas 24 mudas do clone susceptível e 24 mudas do clone tolerante. Essas mudas foram infestadas com a vespa-da-galha-do-eucalipto e desinfestadas após vinte e quatro horas. Esse curto período de infestação, foi utilizado para minimizar efeitos advindos de sobreposição de estádios de desenvolvimento da galha/ inseto em uma mesma planta. Seis ápices de ramos de cada muda (144 ápices

para cada clone) foram envolvidos com uma sacola de organza contendo um microtubo de centrifugação fechado com duas vespas fêmeas coletadas da criação. Após lacrar cada sacola com elástico, os tubos foram abertos para que as vespas pudessem sair para ovipositar. Para garantir a sobrevivência das vespas pelo período supracitado, cada tubo foi umedecido com água destilada. No momento da desinfestação, foi confirmada a sobrevivência e atividade de cada par de vespa utilizado por planta. Após, as vespas foram sacrificadas manualmente antes que a sacola fosse aberta. Em seguida, uma lupa de mão foi utilizada para confirmar a presença da injúria provocada pelo ovipositor da vespa em todas as plantas avaliadas.

Na gaiola de plantas controle, outras 48 mudas (24 de cada clone) foram mantidas nas mesmas condições das anteriores e serviram de controle. Essas mudas também tiveram os ápices de ramos envolvidos com a sacola de organza (seis ápices de ramos para cada muda), porém, foram deixadas livres de vespas.

Assim, foram obtidos quatro tratamentos: clone susceptível infestado, clone tolerante infestado, clone susceptível controle e clone tolerante controle. As coletas de dados e amostras foram realizadas em três diferentes tempos de desenvolvimento da galha/vespa, respectivamente: pré-galha, correspondente ao estágio de anel amarronzado para o desenvolvimento da galha e de ovo para o desenvolvimento do inseto, quatro dias após a infestação (d.a.i.); galha, correspondendo ao estágio de galha esverdeada/ larva, 26 d.a.i.; pré-emergência, correspondendo ao estágio de galha avermelhada/ pupa, 43 d.a.i. (de acordo com resultados do Capítulo 2; Figuras 1,2,3).

Morfologia da Planta

Os parâmetros morfológicos utilizados foram incremento da altura da planta (ΔH) e incremento do diâmetro do caule ao nível do solo (ΔDS). H foi medida através de uma régua graduada em milímetros. DS foi medido por um paquímetro manual Insize® com exatidão $\pm 0,05\text{mm}$ (fabricado pela Insize do Brasil Imp. Exp. Com. Ltda., localizada no Município de Belenzinho, São Paulo, Brasil). Para cada planta, foi calculado o incremento de crescimento (altura, diâmetro) através da subtração da medida retirada em cada tempo da avaliação (pré-galha, galha ou pré-emergência) pela medida retirada no dia da infestação. Os parâmetros de crescimento estão apresentados como média de seis plantas

por tratamento. Para acompanhar o crescimento, essas plantas foram mantidas intactas (sem coleta de amostras) até o final do experimento.

Outras seis plantas de cada tratamento foram utilizadas em cada tempo de avaliação (pré-galha, galha ou pré-emergência), totalizando 18 plantas por tratamento. Essas mesmas seis plantas de cada tratamento serviram para coletar todos os dados e amostras em cada avaliação e foram descartadas em seguida. Nessas plantas foram realizadas a coleta dos dados de trocas gasosas foliares e das amostras para as análises de clorofilas e carotenóides, açúcares solúveis, atividade de CAT e SOD, peroxidação lipídica, prolina e hormônios.

Medida de trocas gasosas foliares

A taxa de assimilação foliar líquida de CO₂ (A), a condutância estomática (g_s), a concentração de CO₂ intercelular (C_i) e a transpiração (E) foram obtidas pelo sistema de medição de trocas gasosas LI-6400 XT (Li-COR, Lincoln, NE). As seguintes condições foram mantidas dentro da câmara: fluxo de ar 400 μmol.s⁻¹, temperatura do bloco 28 °C, concentração de CO₂ ambiente de 380 μl.l⁻¹, umidade relativa do ar 40-60%, intensidade de luz 1500 μmol.m⁻².s⁻¹. A intensidade de luz foi determinada após a análise dos dados de saturação de intensidade luminosa: 2000, 1800, 1500, 1200, 1000, 800, 500, 250, 100, 50, 25, 0 μmol.m⁻².s⁻¹. As medidas foram realizadas após a estabilização dos dados (cerca de 5 min). Foi utilizada a primeira folha completamente expandida de plantas controle equivalentes a folhas sem galhas de plantas infestadas. A escolha de folhas sem galhas para plantas infestadas se deu para que fossem obtidos dados que pudessem dar uma ideia das trocas gasosas que ocorreram em toda a planta, e não somente no local das galhas. Os parâmetros de trocas gasosas estão apresentados como média de seis plantas por tratamento.

Análises bioquímicas e hormonais

Na fase de pré-galha, as amostras consistiram de ápices de ramos com primórdios foliares. Esses ápices foram cortados acima da primeira folha totalmente expandida. Sendo que, nas plantas infestadas, foram utilizados apenas ápices de ramos com primórdios foliares ovipositados. Nas fases de galha e pré-emergência, as amostras consistiram de limbos foliares, incluindo a nervura e sem os pecíolos. Sendo que, nas plantas infestadas

foram utilizadas folhas com galhas. Os ápices dos ramos e as folhas coletadas das plantas controle foram equivalentes (em idade e posição) aos coletados das plantas infestadas. Todas as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras destinadas para as análises de clorofilas e carotenóides foram armazenadas em freezer -20°C; para açúcares solúveis, atividade de CAT e SOD, peroxidação lipídica e prolina foram armazenadas em freezer -80°C; e, para hormônios, foram liofilizadas e armazenadas no vácuo. A liofilização foi realizada por 72 horas, na temperatura e pressão aproximadas de -52,5°C e 182 mmHg, respectivamente (Liofilizador LJJ04, JJ Científica Comercial, São Carlos, SP, Brasil).

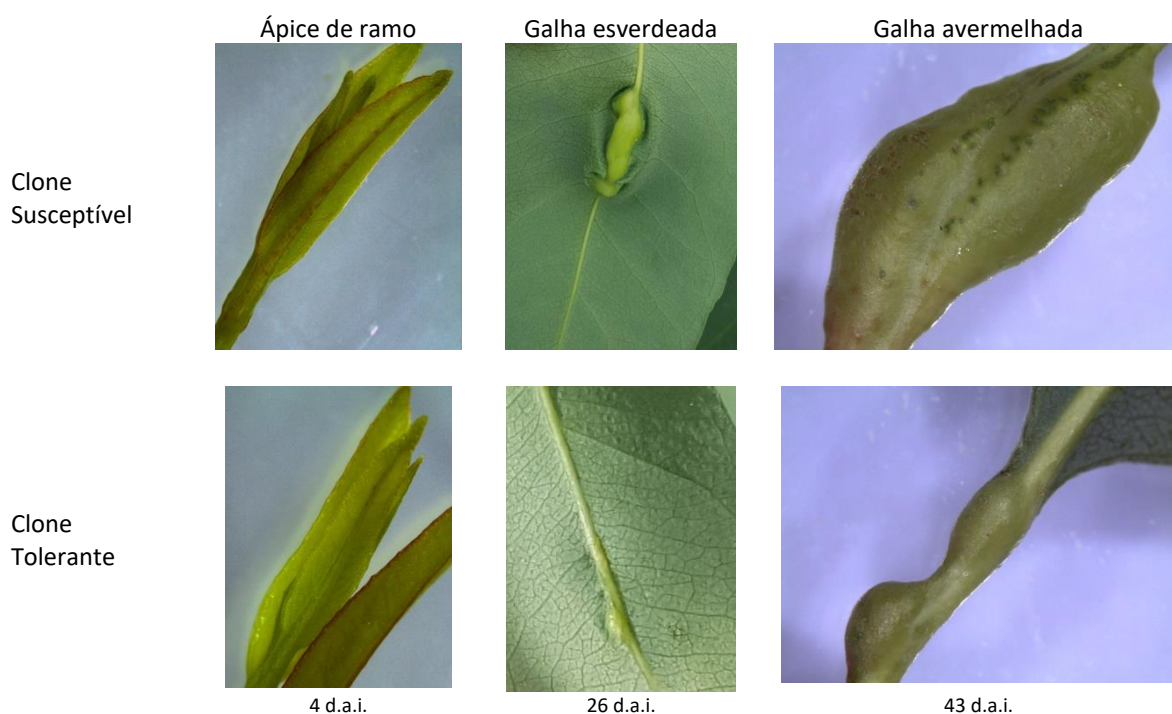


Figura 1. Ápice de ramos aos 4 dias após a infestação (d.a.i.) por *L. invasa* e folhas com galhas aos 26 e 43 d.a.i., em dois clones de *Eucalyptus*, um susceptível e outro tolerante a essa vespa.

Quantificação de clorofilas e carotenóides

Aproximadamente 25 mg de tecido foliar por amostra foi triturado com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido. Os pigmentos foram extraídos em 1 ml, por amostra, do tampão acetona/Tris 50 mM (80:20) (v/v) e pH 7,8. Após 30 s em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, na rotação de 10732 g, por 5 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para novos tubos de centrifugação. Acrescentou-se 0,5 ml do mesmo tampão de extração em cada amostra, que, após 30 s em vórtex, foram novamente centrifugadas

com as mesmas especificações utilizadas acima. O sobrenadante foi retirado e transferido para novos tubos de centrifugação. Em seguida, o tampão de extração foi acrescentado novamente para obtenção de um volume final de 2 ml. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 s. Todas as etapas foram realizadas no escuro e com gelo. As leituras foram realizadas nas absorvâncias de 663, 537, 647 e 470 nm (Espectro UV 380G, Ind. e Com. Eletro-Eletronica Gehaka Ltda., São Paulo-SP, Brasil). O conteúdo de pigmentos foi expresso em micromoles por grama de massa fresca ($\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) (Sims e Gamon 2002). Foram utilizadas seis repetições biológicas por tratamento.

Quantificação de açúcares solúveis

Aproximadamente 50 mg de tecido foliar, por amostra, foram misturados a 10 ml de etanol 80% (v/v) e incubados em banho maria, a 80 °C, por uma hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, na rotação de 10.732 g, por 10 min. 100 μl do sobrenadante foi retirado de cada amostra e misturado a 1,5 ml de antrona (0,04 g de antrona + 1 ml de água destilada + 20 ml de ácido sulfúrico concentrado) em gelo. Subsequentemente, as amostras foram incubadas em banho maria a 100 °C, por 10 min. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo por 10 min. As leituras foram realizadas em 625 nm. O conteúdo de açúcares solúveis totais (AST) foi obtido através de uma curva de D-glicose (1,25-0 mg/ ml) (Irigoyen et al. 1992). Foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento.

Quantificação da atividade de CAT e SOD

Extração da proteína: aproximadamente 200 mg de tecido foliar congelado e 100 mg de polivinilpirrolidona (PVP), por amostra, foram triturados com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido. Ao material triturado, foi acrescentado 1,5 ml do tampão de extração fosfato de potássio 100 mM + ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM + ácido ascórbico 10 mM + água miliQ. As amostras foram centrifugadas a 4 °C, na rotação de 13.000 g, por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de centrifugação e estocados em freezer -20 °C até a quantificação da atividade de cada enzima (adaptado de Kar e Mishra 1976). Foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento.

Quantificação da atividade da CAT: Para cada amostra, misturou-se 1.950 µl do tampão fosfato de potássio 100 mM + 150 µl do tampão de extração + 750 µl da solução H₂O₂ 50 mM + 150 µl do extrato enzimático. Para o branco, misturou-se 1.950 µl do tampão de fosfato de potássio 100 mM + 300 µl do tampão de extração + 750 µl da solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 50 mM. Iniciou-se a leitura no instante que foi colocado o extrato enzimático. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo, a 240 nm, a cada 15 s, durante 180 s (Espectro UV 380G, Ind. e Com. Eletro-Eletronica Gehaka Ltda., São Paulo-SP, Brasil) (adaptado de Kar e Mishra 1976).

Quantificação da atividade da SOD: Para cada amostra, misturou-se 2.000 µl do tampão fosfato de potássio 100 mM + 50 µl de extrato enzimático + 250 µl de cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT) + 200 µl de EDTA + 250 µl de metionina + 250 µl de riboflavina. Para o branco da amostra, utilizou-se a mesma solução preparada para a amostra, porém, mantida no escuro. Para o branco da solução, misturou-se 2.050 µl do tampão fosfato de potássio 100 mM + 250 µl de NBT + 200 µl de EDTA + 250 µl de metionina + 250 µl de riboflavina. Antes da leitura, cada amostra e branco da solução permaneceram por 10 min na luz, em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo, a 560 nm (Espectro UV 380G, Ind. e Com. Eletro-Eletronica Gehaka Ltda., São Paulo-SP, Brasil) (adaptado de Sun e Oberley 1988).

Quantificação da Peroxidação lipídica

Aproximadamente 80 mg de tecido foliar, por amostra, foram triturados com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido. Ao material triturado, foi acrescentado 1.250 µl do tampão 0,1% ácido tricloroacético (TCA) (m/v), por amostra. Após 30 s no vórtex, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, na rotação de 10.732 g, por 5 min. 250 µl do sobrenadante, por amostra, foram transferidos para novos tubos de centrifugação, onde acrescentou-se 1 ml da solução 20% TCA + 0,01% de hidroxitolueno butílico (BHT) + 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) (denominada daqui por diante de “solução +TBA”). Outra alíquota de 250 µl do sobrenadante, por amostra, foi transferida para novos tubos de centrifugação, onde acrescentou-se 1 ml da solução 20% TCA + 0,01% BHT (denominada daqui por diante de “solução -TBA”). As amostras foram agitadas em vórtex por 30 s. Na sequência, foram incubadas em banho maria, a 95 °C, por 30 min (Banho Maria de bocas microprocessado, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil).

Imediatamente, foram resfriadas em gelo por aproximadamente 10 min. As leituras foram efetuadas em 600, 532 e 440 nm para ambas as soluções (“solução +TBA” e “solução -TBA”). A quantidade de MDA equivalente foi expressa em milimoles por grama de MF (mmol.g^{-1} MF) (Hodges et al. 1999). Foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento.

Quantificação de Prolina

Aproximadamente 100 mg de tecido foliar congelado, por amostra, foram triturados com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido. Ao material triturado, acrescentou-se 1,5 ml do tampão 3,0% ácido sulfossalicílico (m/v) por amostra. Após 30 s no vórtex, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, na rotação de 10.732 g, por 5 min. 100 μl , para cada amostra, foi transferido para um tubo falcon de 15 ml, onde adicionou-se 2 ml de niidrina ácida e 2 ml de ácido acético glacial. Após 30 s em vórtex, as amostras foram incubadas em banho maria, a 100 °C, por uma hora. Em seguida, as amostras foram imediatamente imersas em gelo por aproximadamente 10 min. Ao final, acrescentou-se 2 ml de tolueno à solução de reação, agitou-se vigorosamente os tubos e deixou-se em temperatura ambiente por 30 min até a separação de duas fases. Os sobrenadantes foram transferidos para cubetas e as leituras realizadas em 520 nm. A concentração de prolina foi determinada através de uma curva usando L-prolina (250-0 $\mu\text{g/ ml}$) (Bates et al. 1973). Foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento.

Quantificação hormonal

Os hormônios ácido abscísico (ABA), ácido aminociclopropanocarboxílico (ACC), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), auxinas (AA), metil jasmonato (MeJa) e zeatina (Z) foram quantificados de acordo com Forcat et al. (2008). Aproximadamente 110 mg de tecido foliar liofilizado foi triturado com esferas de tungstênio (3 mm) (Moinho vibratório, MM 400, Retsch, Haan, Alemanha), a 25 Hz/ s, durante 3 min. Ao material triturado, foi acrescentado 400 μl da solução de extração 20% metanol: 79% isopropanol: 1% ácido acético glacial (v/v/v) grau LC-MS. Além do tampão, foram colocados os respectivos hormônios deuterados como padrão interno e com concentrações conhecidas de modo a corrigir variações e perdas durante a extração. Para cada tratamento, foi feito um controle de extração sem material vegetal (branco). Cada amostra foi vortexada durante 20

s, por quatro vezes, com intervalos de 2 min no gelo. Após, as amostras foram sonicadas por 10 min. Imediatamente, foram transferidas para o gelo e permaneceram por 30 min. Novamente, as amostras foram sonicadas por 10 min. Em seguida, foram centrifugadas a 4 °C, na rotação de 13.000 g, por 10 min (Microcentrífuga refrigerada, SelectSpin R, Select Bioproducts, Edison, Nova Jersey, Estados Unidos da América). 350 µl do sobrenadante, por amostra, foram transferidos para novos tubos de centrifugação, acondicionados em freezer -20 °C e reservados. Ao pellet restante, foi acrescentada a mesma alíquota do tampão de extração supracitado e repetidos os mesmos passos seguintes até uma nova centrifugação. Após, esse sobrenadante foi retirado e adicionado ao primeiro que estava reservado. Finalmente, as amostras foram novamente centrifugadas a 4 °C, na rotação de 20.000 g, por 5 min. Em seguida, 700 µl do sobrenadante, por amostra, foram transferidos para tubos vials. As amostras foram filtradas (Captiva Econofilter, PVDF membrane, 13 mm de diâmetro, 0,2 µm o tamanho do poro, Código do fabricante 5190-5261, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Estados Unidos da América) e 300 µl de cada amostra foram transferidos para novos vials. 5 µl de cada amostra foram injetados no sistema HPLC - MS/MS (Cromatógrafo líquido, Agilent 1200 Infinity Series, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América acoplado ao Espectrofotômetro de Massa tipo Quadrupolo Triplo (QqQ), 6430, Agilent Technologies, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América). A separação da cromatografia foi realizada em uma coluna (Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm, 2,1x50mm, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América) e, na sequência, por uma coluna guarda (Zorbax SB-C18, 1,8 µm, Agilent Technologies). Os solventes utilizados foram: (A) ácido acético em água 0,02% e (B) ácido acético em acetonitrila 0,02% em um gradiente de tempo/%B: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. A taxa de fluxo dos solventes foi 0,3 ml/ min em uma temperatura de coluna de 30 °C. O método de ionização usado no espectrofotômetro de massa foi ESI (Electrospray Ionization) seguindo essas condições: temperatura do gás de 300 °C, taxa de fluxo de nitrogênio de 10 l/ min, pressão de nebulização 35 psi e voltagem da capilaridade de 4000 V. O equipamento foi operado no modo MRM (multiple reaction monitoring). A massa do precursor íon/ fragmento estabelecido foi monitorada pelo teste de fragmentação de cada molécula: Z (220/136), ACC (102, 1/56,2), ABA (263/153), AA (176/130), AS (137/93), AJ (209/59). Z, AA e ACC foram escaneados no modo positivo, enquanto, ABA, AS e AJ

no modo negativo. A curva de calibração (0.1ng a 200ng), usando os respectivos padrões de cada hormônio, foi gerada para determinar a quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no software “MassHunter Workstation” para obter as áreas de pico para cada hormônio nas amostras e os resultados foram expressos em ng/g de MF. Para cada hormônio, foram utilizadas cinco repetições biológicas por tratamento.

Análises estatísticas

Primeiramente, foi realizada uma análise fatorial para verificar os efeitos dos fatores clone (susceptível e tolerante), vespa (plantas controle e plantas infestadas) e a interação de ambos através da Análise de Variância (ANOVA) para cada fator considerado. Essas análises foram realizadas separadamente em cada tempo de avaliação. Quando aplicável, foi realizado um teste de comparações múltiplas (Teste Tukey), com nível de significância de 0,05.

Resultados

Na fase de pré-galha (4 d.a.i.), houve diferença significativa no fator clone (plantas susceptíveis × plantas tolerantes) quanto aos parâmetros ΔH , ΔDS , clorofila a, SOD, AS, AJ, MeJa e Z. No fator vespa (plantas controle × plantas infestadas), houve diferença para C_i , CAT, AJ e ABA. Já na interação entre esses dois fatores, os parâmetros que obtiveram diferença estatística significativa foram C_i , CAT e AS (Tabela 1).

Na fase de galha (26 d.a.i.), houve diferença significativa no fator clone para ΔDS , A, CAT, MDA, AJ e Z. No fator vespa, houve diferença para clorofila a, AST, SOD, AJ, MeJa e AA. Na interação entre clone e vespa, houve diferença significativa nos parâmetros AJ e AA (Tabela 1).

Na fase de pré-emergência (43 d.a.i.), o clone influenciou nas diferenças encontradas para g_s , E, prolina, AJ, MeJa, ACC, Z e ABA. A vespa influenciou no g_s , C_i , E, MDA, prolina, AJ, MeJa, Z, AA e ABA. A interação entre esses fatores resultou em diferença significativa para ΔH , g_s , C_i , E, clorofila b, AST, prolina e Z (Tabela 1).

CAPÍTULO 3. Contrastando mecanismos de respostas de *Eucalyptus* à *Leptocybe invasa*

Tabela 1. Análise Fatorial resumida para parâmetros obtidos em dois clones de *Eucalyptus* (susceptível e tolerante à *L. invasa*), de plantas controle e infestadas com a vespa (em três estádios de desenvolvimento da galha: pré-galha, galha e pré-emergência). Incremento em altura (ΔH), em diâmetro (ΔDS), taxa de assimilação de CO_2 foliar (A), condutância estomática (g_s), carbono intercelular C_i , transpiração (E), concentrações de clorofila a (clor a), de clorofila b (clor b) e de carotenóides (carot), quantidade de açúcares solúveis totais (AST), atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD), conteúdo de malondialdeído (MDA) e de prolina, quantidade de ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ), metil jasmonato (MeJa), ácido aminociclopropanocarboxílico (ACC), zeatina (Z), auxinas (AA) e ácido abscísico (ABA). Fator de variação (F.V.), graus de liberdade (g.l.), valor de F para cada fonte de variação (F), significância (Sig.). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, n.s. não significativo.

Parâmetro	F.V.	pré-galha			galha			pré-emergência		
		g.l.	F	Sig.	g.l.	F	Sig.	g.l.	F	Sig.
ΔH	Clone	1	5,646	*	1	0,402	n.s.	1	0,037	n.s.
	Vespa	1	1,698	n.s.	1	1,434	n.s.	1	0,132	n.s.
	Interação	1	0,993	n.s.	1	0,005	n.s.	1	4,664	*
	Erro	20			20			20		
ΔDS	Clone	1	7,424	*	1	4,848	*	1	1,000	n.s.
	Vespa	1	3,788	n.s.	1	2,727	n.s.	1	0,040	n.s.
	Interação	1	1,364	n.s.	1	0,303	n.s.	1	0,040	n.s.
	Erro	20			20			20		
A	Clone	1	0,000	n.s.	1	7,679	*	1	0,162	n.s.
	Vespa	1	0,081	n.s.	1	2,184	n.s.	1	0,162	n.s.
	Interação	1	0,000	n.s.	1	1,672	n.s.	1	3,051	n.s.
	Erro	20			20			20		
g_s	Clone	1	0,385	n.s.	1	0,263	n.s.	1	8,455	**
	Vespa	1	3,462	n.s.	1	2,368	n.s.	1	19,227	***
	Interação	1	0,385	n.s.	1	2,368	n.s.	1	16,125	***
	Erro	20			20			20		
C_i	Clone	1	0,145	n.s.	1	2,865	n.s.	1	1,046	n.s.
	Vespa	1	6,184	*	1	3,371	n.s.	1	13,199	**
	Interação	1	5,314	*	1	0,741	n.s.	1	4,629	*
	Erro	20			20			20		
E	Clone	1	1,214	n.s.	1	1,441	n.s.	1	10,175	**
	Vespa	1	0,049	n.s.	1	3,243	n.s.	1	7,430	*
	Interação	1	0,437	n.s.	1	0,090	n.s.	1	6,028	*
	Erro	20			20			20		
Clor a	Clone	1	11,250	**	1	1,800	n.s.	1	0,00	n.s.
	Vespa	1	1,250	n.s.	1	5,000	*	1	1,11	n.s.
	Interação	1	1,250	n.s.	1	0,200	n.s.	1	1,11	n.s.
	Erro	20			20			20		
Clor b	Clone	1	0,385	n.s.	1	3,46	n.s.	1	0,00	n.s.
	Vespa	1	0,385	n.s.	1	0,38	n.s.	1	0,91	n.s.
	Interação	1	3,462	n.s.	1	0,38	n.s.	1	8,18	**
	Erro	20			20			20		
Carot	Clone	1	0,769	n.s.	1	1,00	n.s.	1	0,67	n.s.
	Vespa	1	0,000	n.s.	1	1,00	n.s.	1	0,67	n.s.
	Interação	1	0,000	n.s.	1	1,00	n.s.	1	0,00	n.s.
	Erro	20			20			20		

CAPÍTULO 3. Contrastando mecanismos de respostas de *Eucalyptus* à *Leptocybe invasa*

Tabela 1. Continuação

Parâmetro	F.V.	pré-galha			galha			pré-emergência		
		g.l.	F	Sig.	g.l.	F	Sig.	g.l.	F	Sig.
AST	Clone	1	0,71	n.s.	1	0,63	n.s.	1	0,39	n.s.
	Vespa	1	0,38	n.s.	1	13,78	**	1	0,27	n.s.
	Interação	1	0,99	n.s.	1	0,58	n.s.	1	18,53	***
	Erro	12			12			12		
CAT	Clone	1	10,10	**	1	5,61	*	1	0,56	n.s.
	Vespa	1	15,79	**	1	0,50	n.s.	1	2,73	n.s.
	Interação	1	7,74	*	1	2,75	n.s.	1	0,56	n.s.
	Erro	12			12			12		
SOD	Clone	1	9,58	**	1	3,94	n.s.	1	0,31	n.s.
	Vespa	1	1,30	n.s.	1	6,82	*	1	3,40	n.s.
	Interação	1	0,66	n.s.	1	0,53	n.s.	1	0,31	n.s.
	Erro	12			12			12		
MDA	Clone	1	0,05	n.s.	1	11,63	**	1	0,47	n.s.
	Vespa	1	1,18	n.s.	1	2,04	n.s.	1	4,87	*
	Interação	1	1,38	n.s.	1	1,44	n.s.	1	1,69	n.s.
	Erro	12			12			12		
Prolina	Clone	1	0,07	n.s.	1	2,46	n.s.	1	22,49	***
	Vespa	1	0,03	n.s.	1	0,37	n.s.	1	15,33	**
	Interação	1	3,13	n.s.	1	1,09	n.s.	1	5,08	*
	Erro	12			12			12		
AS	Clone	1	29,39	***	1	1,09	n.s.	1	2,07	n.s.
	Vespa	1	0,52	n.s.	1	3,79	n.s.	1	0,25	n.s.
	Interação	1	4,63	*	1	2,61	n.s.	1	2,88	n.s.
	Erro	16			16			16		
AJ	Clone	1	7,51	*	1	46,20	***	1	13,54	*
	Vespa	1	7,44	*	1	7,21	*	1	5,58	*
	Interação	1	1,62	n.s.	1	12,82	**	1	0,03	n.s.
	Erro	16			16			16		
MeJa	Clone	1	11,76	**	1	2,07	n.s.	1	11,30	**
	Vespa	1	0,34	n.s.	1	5,16	*	1	7,36	*
	Interação	1	0,66	n.s.	1	2,78	n.s.	1	2,44	n.s.
	Erro	16			16			16		
ACC	Clone	1	0,01	n.s.	1	0,03	n.s.	1	4,50	*
	Vespa	1	1,33	n.s.	1	0,03	n.s.	1	0,18	n.s.
	Interação	1	0,01	n.s.	1	0,03	n.s.	1	1,62	n.s.
	Erro	16			16			16		
Z	Clone	1	68,33	***	1	415,56	***	1	438,74	***
	Vespa	1	0,30	n.s.	1	1,05	n.s.	1	12,65	**
	Interação	1	0,00	n.s.	1	3,30	n.s.	1	5,12	*
	Erro	16			16			16		
AA	Clone	1	0,47	n.s.	1	0,56	n.s.	1	0,16	n.s.
	Vespa	1	0,66	n.s.	1	14,10	**	1	7,80	*
	Interação	1	1,12	n.s.	1	11,42	**	1	0,16	n.s.
	Erro	16			16			16		
ABA	Clone	1	2,43	n.s.	1	4,01	n.s.	1	8,08	*
	Vespa	1	23,78	***	1	3,50	n.s.	1	21,83	***
	Interação	1	1,85	n.s.	1	0,66	n.s.	1	0,06	n.s.
	Erro	16			16			16		

Pré-galha (4 d.a.i.)

A vespa aumentou significativamente o C_i nas plantas infestadas quando comparadas às controle ($F_{1,20}=6,184$, $P=0,0218$). Este resultado está relacionado, principalmente, ao aumento significativo do C_i nas plantas susceptíveis infestadas, com relação ao seu controle ($F_{1,20}=11,482$, $P=0,0029$), pois as tolerantes infestadas se mantêm iguais ao seu respectivo controle ($F_{1,20}=0,016$, $P=0,8992$).

Dentro do fator clone, verificou-se que o clone tolerante infestado teve o crescimento em diâmetro menor do que seu próprio controle ($F_{1,20}=4,848$, $P=0,0396$). Enquanto o clone susceptível teve seu crescimento em ΔH ($F_{1,20}=0,047$, $P=0,8306$) e ΔDS ($F_{1,20}=0,303$, $P=0,5881$) significativamente igual ao seu controle. Além disso, o clone susceptível infestado cresce mais em ΔH ($F_{1,20}=5,687$, $P=0,0271$) e ΔDS ($F_{1,20}=7,576$, $P=0,0123$) do que o tolerante infestado neste período. Também foi encontrado que o clone tolerante obteve maior conteúdo de clorofila a do que o clone susceptível ($F_{1,20}=11,250$, $P=0,0032$). Especialmente porque o clone tolerante controle apresentou maior conteúdo de clorofila a do que o clone susceptível controle ($F_{1,20}=10,000$, $P=0,0049$).

Na interação entre os fatores clone e vespa, C_i foi significativamente maior no tratamento plantas susceptíveis infestadas, quando comparado com plantas susceptíveis controle. Enquanto os tratamentos do clone tolerante, controle e infestadas, não diferiram entre si ou dos tratamentos do clone susceptível ($F_{3,28}=9,7998$, $P=0,0001$; Figura 1E). Os parâmetros incremento em altura, em diâmetro, taxa de assimilação de CO_2 foliar, condutância estomática, transpiração, clorofila a, clorofila b, carotenóides e açúcares solúveis totais não apresentaram diferença estatística significativa nesse período para a interação clone e vespa (Figuras 1A, B, C, D, F, G, H, I, J, respectivamente; Tabela 1).

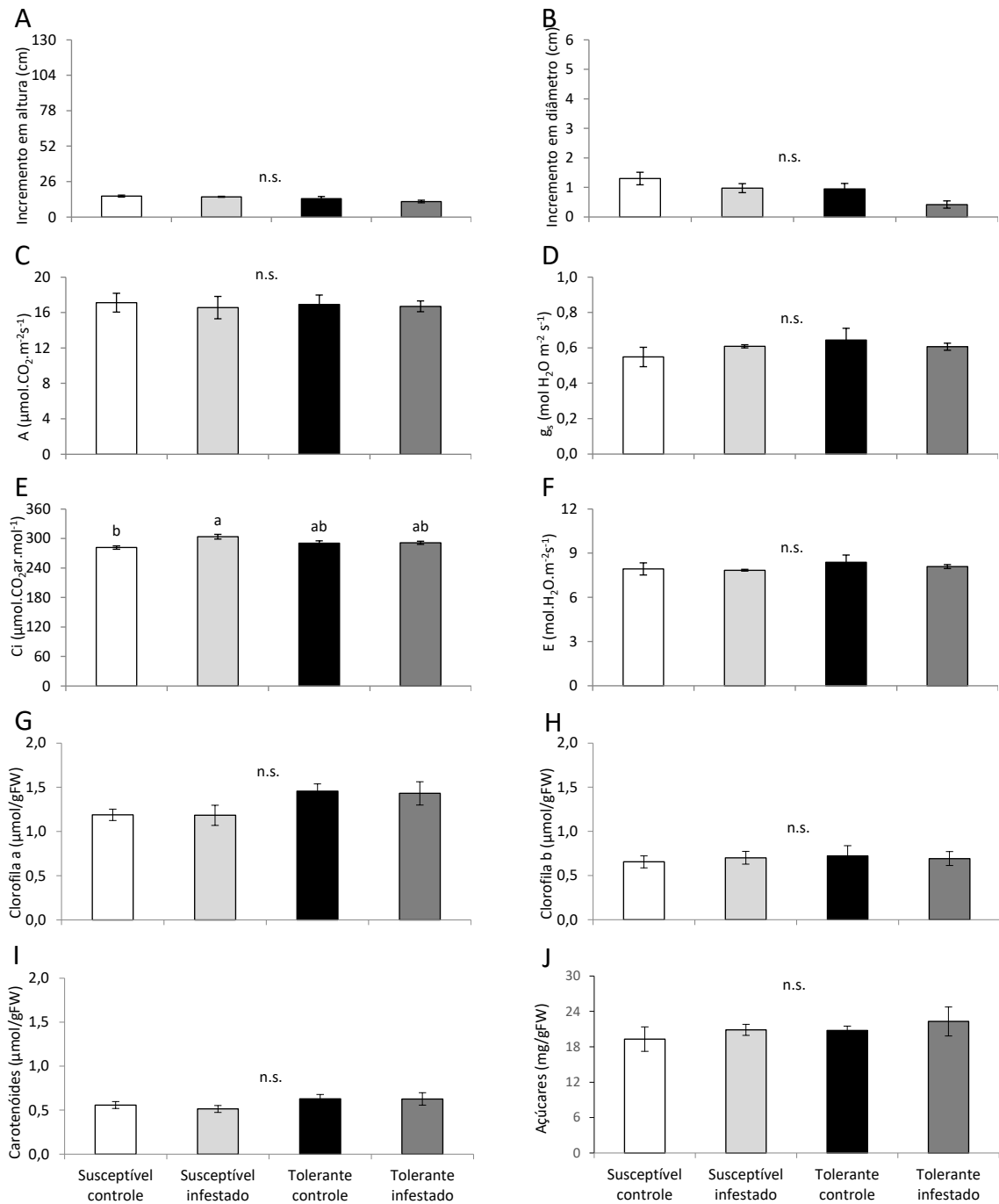


Figura 1. Parâmetros obtidos em dois clones de *Eucalyptus* (susceptível e tolerante à *L. invasa*), de plantas controle e infestadas com a vespa, **quatro dias após a infestação**; incremento em altura (A) e em diâmetro (B), taxa de assimilação de CO_2 foliar=A (C), condutância estomática= g_s (D), CO_2 intercelular= C_i (E), transpiração=E (F), concentrações de clorofila a (G), de clorofila b (H), de carotenóides (I) e quantidade de açúcares solúveis totais (J). As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo na interação entre os fatores clone e infestação (ver Tabela 1).

As plantas infestadas com a vespa tiveram menor atividade da CAT do que as plantas controle ($F_{1,12}=15,789$, $P=0,0018$; Tabela 1). Sendo que, a atividade da CAT foi maior no clone tolerante do que no susceptível ($F_{1,12}=10,105$, $P=0,0079$; Tabela 1). Especialmente porque o clone tolerante controle apresentou maior atividade da CAT do que esse mesmo clone infestado ($F_{1,12}=22,816$, $P=0,0005$). Esse resultado também foi encontrado na comparação clone tolerante controle e susceptível controle, respectivamente ($F_{1,12}=17,763$, $P=0,0012$). Por outro lado, o clone susceptível tem a atividade da SOD maior do que o clone tolerante ($F_{1,12}=7,646$, $P=0,0171$; Tabela 1). Mas, não há diferença quanto à atividade da SOD dentro do clone susceptível ($F_{1,12}=0,053$, $P=0,8216$) ou do tolerante ($F_{1,12}=1,912$, $P=0,1920$), quando a comparação foi realizada entre seus tratamentos controle e infestado. O clone tolerante teve conteúdo quase duas vezes maior de AS do que o susceptível ($F_{1,16}=29,390$, $P=0,0001$; Tabela 1). Sendo que, esse mesmo resultado foi encontrado na comparação entre tolerante e susceptível, tanto controles ($F_{1,16}=5,346$, $P=0,0344$), quanto infestados ($F_{1,16}=28,674$, $P=0,0001$). O clone susceptível teve conteúdo maior de AJ do que o tolerante ($F_{1,16}=7,509$, $P=0,0145$; Tabela 1). Também, as plantas infestadas apresentaram maior conteúdo de AJ do que as controle ($F_{1,16}=7,443$, $P=0,0149$; Tabela 1). As plantas susceptíveis infestadas tiveram quantidade de AJ maior do que as susceptíveis controle ($F_{1,16}=8,008$, $P=0,0121$), enquanto as tolerante infestadas e controle não diferiram entre si ($F_{1,16}=1,057$, $P=0,3191$). MeJa, assim como AJ, também foi encontrado em maior quantidade no clone susceptível do que no tolerante ($F_{1,16}=11,756$, $P=0,0034$; Tabela 1). Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade desse hormônio na comparação entre os tratamentos controle e infestado dentro do clone susceptível ($F_{1,16}=0,972$, $P=0,3388$) ou do tolerante ($F_{1,16}=0,026$, $P=0,8736$). ABA apresentou maior quantidade em plantas infestadas quando comparado com plantas não infestadas em todas as combinações, ou seja, tanto na comparação conjunta dos fatores clone e vespa ($F_{1,16}=23,776$, $P=0,0002$; Tabela 1), quanto na comparação dentro do clone susceptível ($F_{1,16}=19,444$, $P=0,0004$) ou dentro do clone tolerante ($F_{1,16}=6,181$, $P=0,0243$). A quantidade de Z encontrada no clone susceptível foi quase seis vezes maior do que a encontrada no tolerante ($F=68,335$, $P\leq 0,0001$; Tabela 1). Sendo que, não houve diferença significativa quando a comparação foi realizada entre os tratamentos controle e infestado, dentro de cada clone, susceptível ($F_{1,16}=0,177$, $P=0,6797$) e tolerante ($F_{1,16}=0,127$, $P=0,7261$).

Na interação, a atividade da CAT foi significativamente menor nos tratamentos clone susceptível controle e infestado e clone tolerante infestado quando comparado ao tratamento clone tolerante controle ($F_{3,12}=11,8086$, $P=0,0007$; Figura 2A). A quantidade de AS encontrada em plantas tolerantes infestadas foi significativamente maior do que a encontrada em plantas susceptíveis infestadas por *L. invasa*. Entretanto, não houve diferença significativa entre as plantas tolerantes controle e infestadas ou entre as plantas susceptíveis controle e infestadas. ($F_{3,16}=11,5104$, $P=0,0003$; Figura 2E). SOD, MDA, prolina, AJ, MeJa, ACC, Z, AA e ABA não apresentaram diferença significativa na interação clone e vespa (Figuras 2B, C, D, F, G, H, I, J, K, respectivamente; Tabela 1) para esse período.

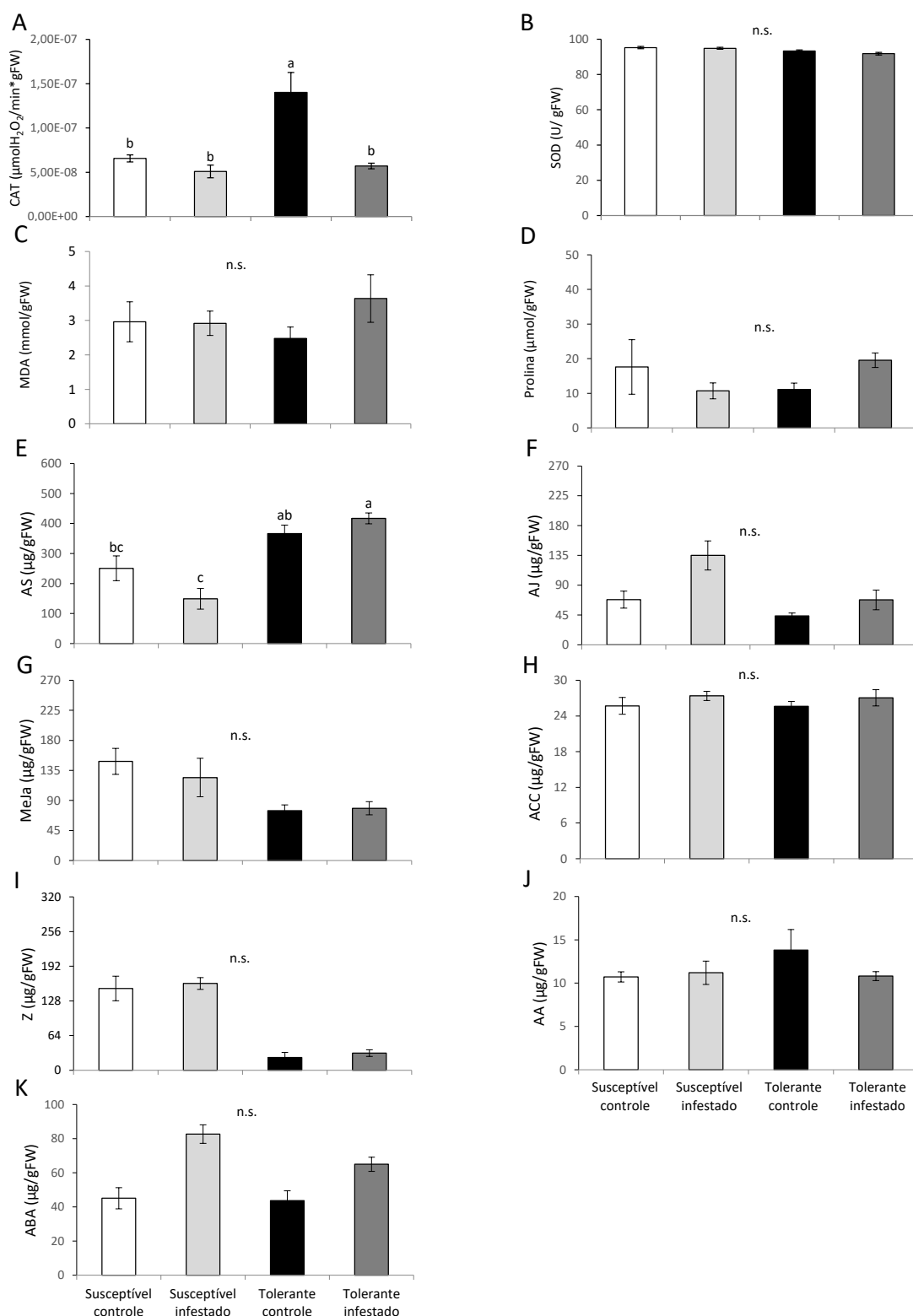


Figura 2. Parâmetros obtidos em amostras de folhas de dois clones de *Eucalyptus* (susceptível e tolerante à *L. invasa*), de plantas controle e infestadas com a vespa, **quatro dias após a infestação**; atividade da CAT (A) e da SOD (B), conteúdo de MDA (C) e prolina (D), quantidade de AS (E), de AJ (F), de MeJa (G) de ACC (H), de Z (I), de AA (J) e ABA (K). As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo na interação entre os fatores clone e infestação (ver Tabela 1).

Galha (26 d.a.i.)

As plantas infestadas obtiveram maior conteúdo de clorofila a do que as controle ($F_{1,20}=5,000$, $P=0,0369$; Tabela 1). Por outro lado, as plantas infestadas tiveram a quantidade de açúcares solúveis totais menor do que as controle ($F_{1,12}=13,776$, $P=0,0030$; Tabela 1), especialmente porque o clone tolerante infestado apresentou quantidade desses açúcares menor do que o controle ($F_{1,12}=10,012$, $P=0,0082$).

O clone susceptível teve o incremento em diâmetro maior do que o tolerante nesse período ($F_{1,20}=4,848$, $P=0,096$; Tabela 1). Por outro lado, a taxa de assimilação de CO₂ foliar foi maior no clone tolerante do que no susceptível ($F_{1,20}=7,679$, $P=0,0118$; Tabela 1).

Na interação, os parâmetros incremento em altura, em diâmetro, taxa de assimilação de CO₂ foliar, condutância estomática, CO₂ intercelular, transpiração, clorofila a, clorofila b, carotenóides e açúcares solúveis totais não apresentaram diferença estatística significativa nesse período (Figuras 3A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, respectivamente; Tabela 1).

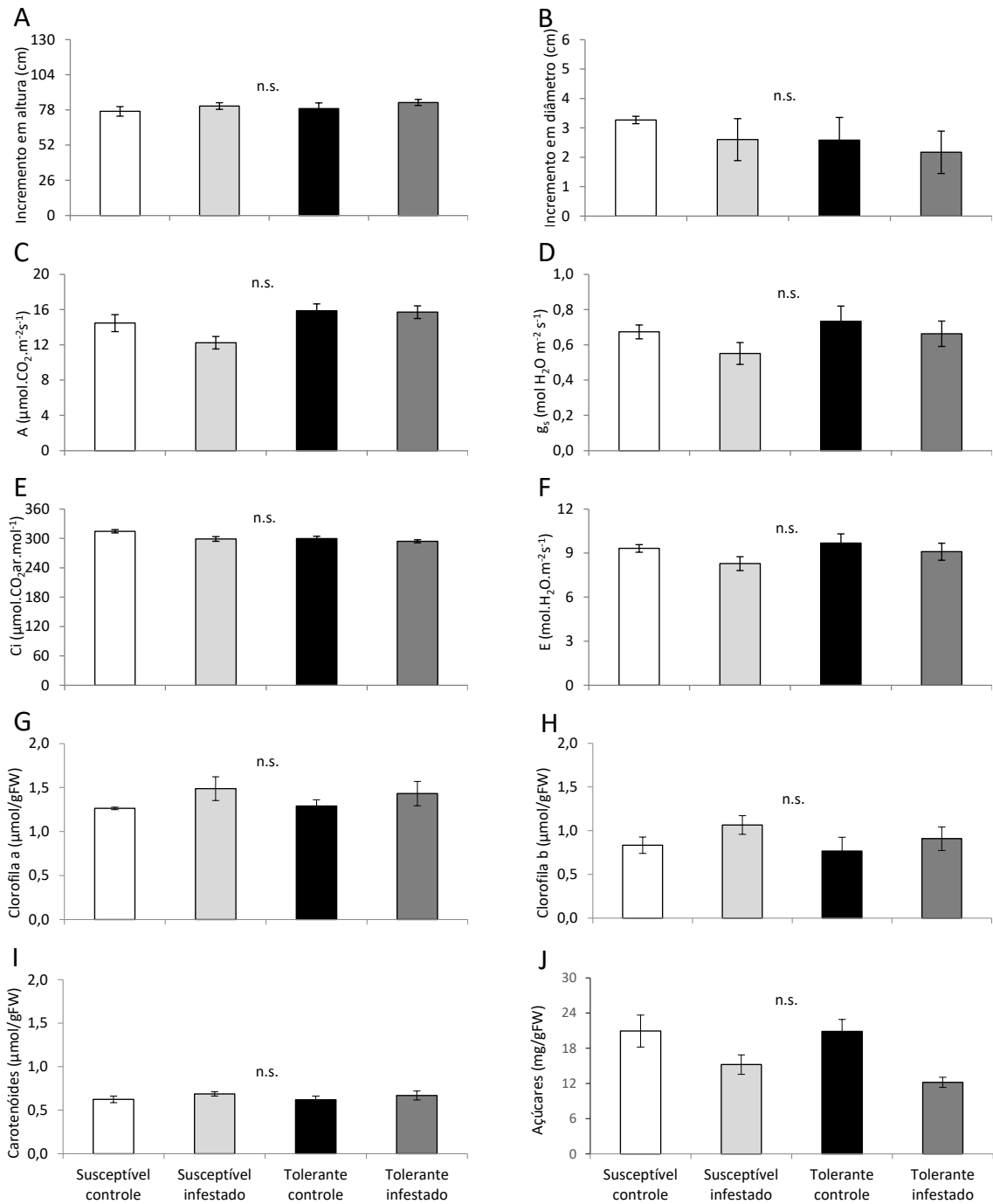


Figura 3. Parâmetros obtidos em dois clones de *Eucalyptus* (susceptível e tolerante à *L. invasa*), de plantas controle e infestadas com a vespa, **26 dias após a infestação**; incremento em altura (A) e em diâmetro (B), taxa de assimilação de CO₂ foliar=A (C), condutância estomática=g_s (D), CO₂ intercelular=C_i (E), transpiração=E (F), concentrações de clorofila a (G), de clorofila b (H), de carotenóides (I) e quantidade de açúcares solúveis totais (J). As barras correspondem à média ± erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo na interação entre os fatores clone e infestação (ver Tabela 1).

Plantas infestadas tiveram maior atividade de SOD ($F=6,818$, $P=0,0228$; Tabela 1) e MeJa ($F=5,161$, $P=0,0373$; Tabela 1) quando comparadas às plantas controle, nesse período. Ambos, SOD ($F=5,585$, $P=0,0358$) e MeJa ($F=7,760$, $P=0,0132$) foram maiores no clone tolerante infestado quando comparado ao tolerante controle, respectivamente. Entretanto, as plantas infestadas apresentaram quantidade menor de AJ ($F_{1,16}=7,213$, $P=0,0162$, Tabela 1) e de AA ($F_{1,16}=14,097$, $P=0,0017$, Tabela 1) do que as plantas controle. Com relação ao AJ, ao contrário do resultado anterior, o clone susceptível infestado teve menor quantidade desse hormônio do que o seu controle ($F_{1,16}=19,636$, $P=0,0004$). Enquanto que, o clone tolerante infestado manteve a quantidade igual de AJ com relação ao seu controle ($F_{1,16}=0,401$, $P=0,5357$). Já para AA, foi o clone tolerante infestado que apresentou menor quantidade desse hormônio quando comparado ao seu controle ($F_{1,16}=25,445$, $P=0,0001$). Enquanto que, não houve diferença entre os tratamentos infestados e controle para o susceptível ($F_{1,16}=0,070$, $P=0,7940$).

O clone tolerante teve a atividade da CAT ($F_{1,12}=5,607$, $P=0,0355$; Tabela 1) e o conteúdo de MDA ($F_{1,12}=11,626$, $P=0,0052$; Tabela 1) maiores do que o clone susceptível. Ambos os resultados estão relacionados, principalmente, à maior atividade da CAT ($F_{1,12}=8,103$, $P=0,0147$) e maior conteúdo de MDA ($F_{1,12}=10,634$, $P=0,0068$) no clone tolerante infestado do que no susceptível infestado. Aqui, também AJ está em maior quantidade no clone susceptível do que no clone tolerante ($F_{1,16}=46,202$, $P\leq 0,0001$, Tabela 1). Z apresentou sete vezes maior quantidade nas plantas susceptíveis do que nas tolerantes ($F=415,556$, $P\leq 0,0001$; Tabela 1).

Na interação, o ácido jasmônico apresentou maior quantidade significativa no tratamento clone susceptível controle quando comparado com os outros três tratamentos. O segundo em maior quantidade desse hormônio foi o clone susceptível infestado, seguido pelo clone tolerante controle. Enquanto que o tratamento clone tolerante infestado não diferiu entre esses dois últimos ($F_{3,16}=22,2294$, $P=5,9695$; Figura 4F). A quantidade de auxinas no tratamento clone tolerante controle foi significativamente maior do que quando comparado com os tratamentos susceptível e tolerante infestados. O tratamento susceptível controle, por sua vez, não diferiu significativamente desses três ($F_{3,16}=7,4831$, $P=0,0024$; Figura 4J).

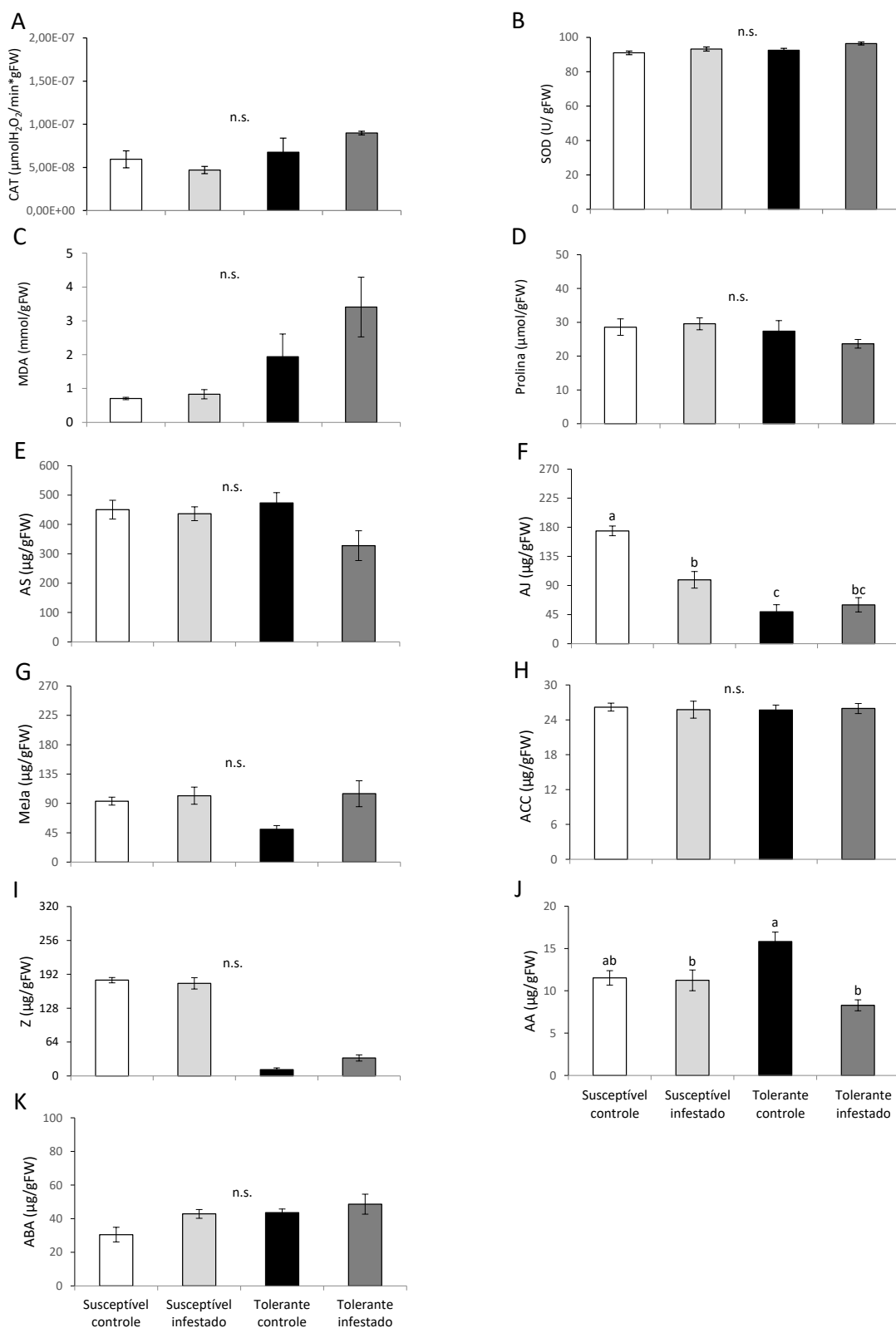


Figura 4. Parâmetros obtidos em amostras de folhas de dois clones de *Eucalyptus* (susceptível e tolerante à *L. invasa*), de plantas controle e infestadas com a vespa, **26 dias após a infestação**; atividade da CAT (A) e da SOD (B), conteúdo de MDA (C) e prolina (D), quantidade de AS (E), de AJ (F), de MeJa (G) de ACC (H), de Z (I), de AA (J) e ABA (K). As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo na interação entre os fatores clone e infestação (ver Tabela 1).

Pré-emergência (43 d.a.i.)

A condutância estomática ($F=19,227$, $P=0,0007$, Tabela 1), a transpiração ($F_{1,20}=7,430$, $P=0,0130$, Tabela 1) e o conteúdo de prolina ($F_{1,20}=15,330$, $P=0,0021$, Tabela 1) foram significativamente maiores nas plantas infestadas do que nas controle. Sendo que, para g_s ($F=35,283$, $P\leq 0,0001$) e E ($F=13,422$, $P=0,0015$), foi o tratamento tolerante infestado que obteve maiores valores do que o tratamento controle do mesmo clone. Já com relação à prolina, o tratamento susceptível infestado é que obteve maior valor do que o susceptível controle ($F=19,032$, $P=0,0009$). Ao contrário, C_i ($F_{1,20}=13,199$, $P=0,0017$, Tabela 1) e MDA ($F_{1,20}=4,870$, $P=0,0475$, Tabela 1) foram significativamente menores nas plantas infestadas do que nas plantas controle. Em ambos, C_i ($F=16,731$, $P=0,0006$) e MDA ($F=6,153$, $P=0,0289$), os valores para o clone tolerante infestado foram menores do que para o clone tolerante controle.

Complementando os resultados acima, g_s ($F=8,455$, $P=0,0087$, Tabela 1) e E ($F=10,175$, $P=0,0046$, Tabela 1) foram maiores no clone tolerante do que no susceptível. Sendo que, o tratamento clone tolerante infestado teve maiores resultados do que o susceptível infestado, tanto para g_s ($F=23,967$, $P=0,0001$), quanto para E ($F=15,934$, $P=0,0007$). Enquanto a prolina, foi maior no susceptível do que no tolerante ($F=22,488$, $P=0,0005$, Tabela 1). Principalmente, porque o conteúdo de prolina no susceptível infestado foi maior do que no tolerante infestado ($F=24,474$, $P=0,0003$).

Na interação entre vespa e clone, g_s ($F_{3,28}=27,9046$, $P<0,0001$; Figura 5D) e E ($F_{3,28}=14,9455$, $P<0,0001$; Figura 5F) foram significativamente maiores nas plantas tolerantes infestadas quando comparadas a todas as outras. Enquanto o carbono intercelular foi significativamente maior nas plantas tolerantes controle quando comparadas com as susceptíveis e tolerantes infestadas. Já as plantas susceptíveis controle, não diferiram dessas três ($F_{3,28}=11,6536$, $P<0,0001$; Figura 5E). As plantas infestadas do clone susceptível apresentaram quantidade maior de açúcares solúveis totais em suas folhas quando comparadas com as plantas controle desse mesmo clone. Por outro lado, a quantidade de açúcares encontrada nas plantas do clone tolerante controle foram significativamente iguais às plantas infestadas de ambos, tolerante e susceptível. Sendo que, o tratamento clone tolerante infestado não diferiu dos outros três tratamentos ($F_{3,12}=6,3974$, $P=0,0078$; Figura 5J). Tanto o parâmetro ΔH , quanto clorofila b apresentaram resultado significativo para a interação entre clone e vespa (Tabela 1).

Entretanto, o teste Tukey a 5% de probabilidade não diferenciou os tratamentos para esses dois parâmetros, respectivamente ($F_{3,20}=1,6316$, $P=0,2137$; Figura 5A e $F_{3,20}=2,4901$, $P=0,0897$; Figura 5H).

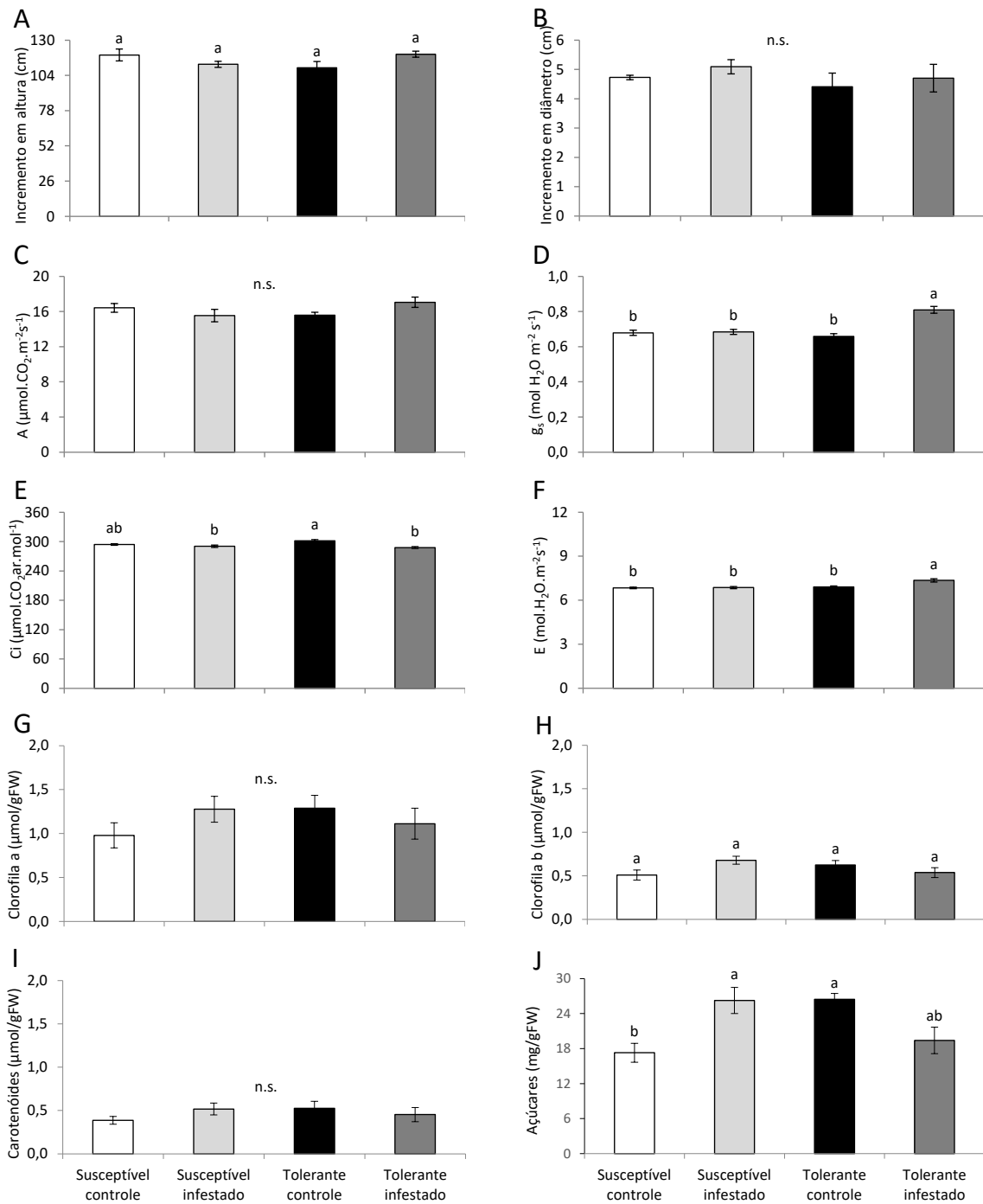


Figura 5. Parâmetros obtidos em dois clones de *Eucalyptus* (susceptível e tolerante à *L. invasa*), de plantas controle e infestadas com a vespa, **43 dias após a infestação**; incremento em altura (A) e em diâmetro (B), taxa de assimilação de CO_2 foliar=A (C), condutância estomática= g_s (D), CO_2 intercelular= C_i (E), transpiração=E (F), concentrações de clorofila a (G), de clorofila b (H), de carotenóides (I) e quantidade de açúcares solúveis totais (J). As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo na interação entre os fatores clone e infestação (ver Tabela 1).

As plantas infestadas apresentaram quantidades maiores de AJ ($F_{1,16}=5,579$, $P=0,0312$, Tabela 1), Z ($F_{1,16}=12,652$, $P=0,0026$, Tabela 1) e ABA ($F_{1,16}=21,831$, $P=0,0003$, Tabela 1) do que as plantas controle. AJ foi significativamente igual quando a comparação plantas infestadas e controle foi realizada separadamente em cada clone, susceptível ($F_{1,16}=3,192$, $P=0,0930$) e tolerante ($F_{1,16}=2,414$, $P=0,1398$), respectivamente. Z ocorreu em maior quantidade nas plantas susceptíveis infestadas do que nas susceptíveis controle ($F_{1,16}=16,938$, $P=0,0008$). ABA teve quantidade maior nas plantas infestadas quando comparadas com as controle, em ambos os clones, susceptível ($F_{1,16}=12,070$, $P=0,0031$) e tolerante ($F_{1,16}=9,819$, $P=0,0064$), respectivamente. Por outro lado, MeJa ($F_{1,16}=7,356$, $P=0,0154$, Tabela 1) e AA ($F_{1,16}=7,801$, $P=0,0130$, Tabela 1) apresentaram maiores quantidades nas plantas controle do que nas infestadas. Sendo que, enquanto o clone susceptível obteve maior quantidade de MeJa nas suas plantas controle do que nas infestadas ($F_{1,16}=9,131$, $P=0,0081$), o clone tolerante não apresentou diferença significativa nesse hormônio entre seus tratamentos ($F_{1,16}=0,662$, $P=0,4277$). AA foi maior no tratamento clone tolerante controle do que no clone tolerante infestado ($F_{1,16}=5,095$, $P=0,0383$).

O clone susceptível teve maiores quantidades dos hormônios AJ ($F_{1,16}=13,544$, $P=0,0020$, Tabela 1), MeJa ($F_{1,16}=11,301$, $P=0,0040$, Tabela 1), ACC ($F_{1,16}=4,500$, $P=0,0499$, Tabela 1) e Z ($F_{1,16}=438,743$, $P\leq 0,0001$, Tabela 1) do que o clone tolerante. O clone tolerante teve maior quantidade de ABA ($F_{1,16}=8,077$, $P=0,0118$, Tabela 1) do que o susceptível.

Na interação, as plantas do clone susceptível infestado apresentaram maior quantidade de prolina do que todos os demais tratamentos ($F_{3,12}=14,2997$, $P=0,0003$; Figura 6D). A quantidade de zeatina foi maior no tratamento susceptível infestado, seguido pelo susceptível controle e, por fim, pelos dois tolerantes que não diferiram entre si ($F_{3,16}=152,2521$, $P<0,0001$; Figura 6I).

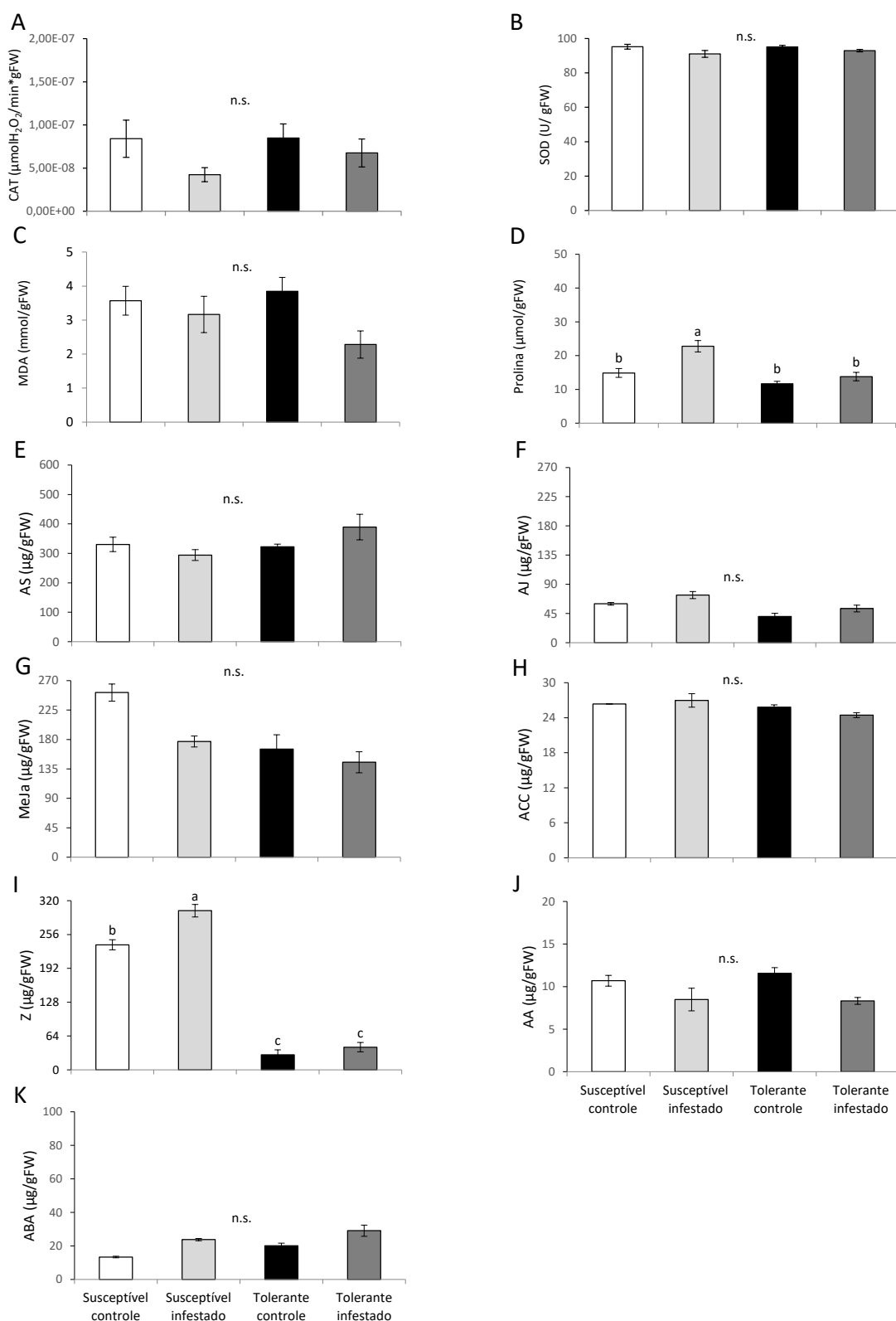


Figura 6. Parâmetros obtidos em amostras de folhas de dois clones de *Eucalyptus* (susceptível e tolerante à *L. invasa*), de plantas controle e infestadas com a vespa, **43 dias após a infestação**; atividade da CAT (A) e da SOD (B), conteúdo de MDA (C) e prolina (D), quantidade de AS (E), de AJ (F), de MeJa (G) de ACC (H), de Z (I), de AA (J) e ABA (K). As barras correspondem à média \pm erro-padrão. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos. n.s. não significativo na interação entre os fatores clone e infestação (ver Tabela 1).

Discussão

Resumidamente, na fase de pré-galha (4 d.a.i.), a defesa à *L. invasa* foi relacionada com a diminuição do crescimento da planta e aumento, tanto da atividade da CAT, quanto da quantidade de ABA. Além disso, maior conteúdo de clorofila a e AS no genótipo com características de resistência também foram relacionados à defesa. Em contrapartida, o aumento do C_i , do AJ e do ABA, bem como, a manutenção dos parâmetros de crescimento, e a existência de maior atividade da SOD e maiores quantidades de AJ, MeJa e Z, foram relacionadas à indução da galha. Na fase de galha (26 d.a.i.), a defesa foi relacionada ao aumento da SOD e do MeJa, e à diminuição das AA e açúcares solúveis totais. A maior taxa de assimilação de CO_2 , maior atividade da CAT e maior conteúdo de MDA também estiveram presentes. Enquanto a formação da galha foi relacionada com a diminuição de AJ nessa fase. Apesar do clone susceptível ainda ter apresentado maiores quantidades de AJ e Z. Na fase de pré-emergência (43 d.a.i.), a defesa foi pautada no aumento da condutância e da transpiração, e diminuição do C_i , do conteúdo de MDA e da quantidade de AA. Quantidade maior de ABA também foi relacionada à defesa nesse período. Por sua vez, a formação das galhas teve relação com o aumento da prolina, dos açúcares solúveis totais, de Z e MeJa. Sendo que, maiores quantidades de AJ, MeJa, ACC e Z também foram encontradas no genótipo susceptível.

Apesar dos parâmetros fotossintéticos permanecerem iguais entre plantas infestadas e controle do clone tolerante, houve uma diminuição do seu crescimento. Por outro lado, o aumento de C_i em folhas com galhas, como foi demonstrado para o clone susceptível, já tinha sido relatado anteriormente (Larson et al. 1998). Esses mesmos autores relacionaram esse aumento com o acúmulo ativo de nutrientes induzidos por insetos galhadores, relatado por outros autores (Bagatto e Shorthouse 1994). No período de galha, foi possível verificar que o clone tolerante tem A maior do que o clone susceptível, o que não foi observado nos outros períodos. Já no período próximo à emergência da vespa, o clone tolerante infestado recuperou seu crescimento, pois este não diferiu do seu controle, aumentou g_s e E e, diminuiu C_i .

A menor quantidade de açúcares solúveis totais nas plantas tolerantes infestadas quando comparadas ao seu próprio controle na fase de galha, pode ser advinda de uma resposta de defesa da planta. Já que, nesta fase, a vespa está crescendo, necessitando,

assim, de mais alimento (Mendel et al. 2004). Por outro lado, a maior quantidade de açúcares solúveis totais no clone susceptível infestado do que no controle do mesmo genótipo, na fase de pré-emergência, pode indicar uma resposta de supressão de defesa. Pois, nessa fase, muitas galhas ainda estão com vespas em estágio de larva, para esse clone (Capítulo 2). Outros autores também encontraram maior quantidade de açúcares solúveis totais em galhas induzidas por um mosquito galhador em *Litsea acuminata* (Huang et al. 2015).

A menor atividade da CAT no clone tolerante infestado quando comparado ao seu respectivo controle na fase de pré-galha pode ter sido uma reação de defesa, já que durante a defesa, pode haver inibição da atividade dessa enzima (Kant et al. 2015). Não ocorreu diferença entre os tratamentos limpo e infestado para o clone susceptível como relatado em estudo anterior (Chang et al. 2012) para essa enzima em todos os períodos avaliados. Entretanto, esses mesmos autores encontraram uma atividade maior da CAT em clones de eucaliptos resistentes quando comparados com clones susceptíveis, assim como, encontrado por nós na fase de galha. Por outro lado, a semelhança para as demais comparações neste trabalho, tanto para CAT, quanto para SOD, pode ser devido ao tempo escolhido para coleta do material (menor tempo foi de 4 d.a.i.). Como as ERO estão entre as primeiras respostas de defesa da planta após a indução (Zebelo e Maffei 2015), possivelmente esse tempo foi demasiado longo para essa análise. Possivelmente, para diminuir o dano causado pelas ERO, as plantas tolerantes também apresentaram maior quantidade de MDA com relação a susceptível. Curiosamente, a quantidade de prolina só aumentou no clone susceptível, e, na fase de pré-emergência. Nesse período, as galhas do clone susceptível estão em seu maior tamanho e as vespas são encontradas nas fases de larva, pré-pupa e pupa (ver Capítulo 2). Portanto, esse resultado tanto pode estar relacionado com uma tentativa da planta de diminuir os danos causados no potencial hídrico da folha, como com a indução pela vespa de aminoácidos livres para sua alimentação. As vespas podem induzir o aumento da quantidade de aminoácidos livres, tais como o que já foi relatado para outro inseto galhador (Huang et al. 2015). Apesar de nossos dados não suportarem essa explicação, eles sugerem que esse aumento esteja mais relacionado à alimentação da vespa do que a uma resposta de defesa da planta.

Os resultados demonstram que o ácido salicílico desempenha o principal papel de sinalizador de defesa para *L. invasa* em eucalipto. Trabalhos anteriores com insetos

galhadores já apontavam para esse papel do AS (Ollerstam e Larsson 2003, Tooker e Hanks 2006). Esse hormônio já foi relacionado a respostas de defesa a herbívoros que se alimentam do floema de plantas (Kaloshian e Walling 2005). O fato de serem células parenquimáticas associadas ao floema que produzem a galha de *L. invasa* (Gonzalez e Solís 2015) pode estar relacionado com esse resultado. Também foi possível verificar que a importância do AS está nos primeiros dias após a oviposição, como sugerem resultados de estudos morfológicos prévios (ver Capítulo 2). Ao contrário do que sugere estudos prévios (Oates et al. 2015), nossos resultados confirmam que a principal resposta de defesa à *L. invasa* ocorre durante os estádios de desenvolvimento que precedem o aparecimento da galha (ver Capítulo 2). Mesmo porque, em plantas resistentes ou tolerantes, apesar da oviposição da vespa, a galha não se desenvolve (ver Capítulo 2, Oates et al. 2015). Apesar do AJ ser mais correlacionado como um hormônio sinalizador de defesa contra artrópodes herbívoros (Howe e Jander 2008), na interação aqui estudada, este hormônio pode ter papel na susceptibilidade. Pois, em todos os momentos testados, as quantidades de AJ e/ou MeJa foram sempre maiores no clone susceptível (parasitado ou não) do que no clone tolerante. Uma explicação possível é o efeito *crosstalk* que pode ocorrer entre AS e AJ (Thaler et al. 2012). Oates et al. (2015) já haviam encontrado genes altamente expressos, relacionados à via metabólica de AJ em genótipo de *E. grandis* × *E. camaldulensis* susceptível à *L. invasa*. Curiosamente, Z, que já foi considerado como um hormônio relacionado com galhas em desenvolvimento (Li et al. 2017), apareceu em destaque tanto nas plantas controle, quanto nas infestadas do clone susceptível aqui estudado. Isso mostra que esse hormônio deve estar constitutivamente presente na planta susceptível estudada e, poderia ser utilizado como um indicador de susceptibilidade, neste caso. Somente foi observado resultado que indica indução de Z em plantas infestadas, em galhas próximas da emergência, ao contrário dos resultados encontrados por Li et al. (2017). Trabalhos anteriores já relataram a possibilidade do próprio inseto galhador sintetizar citocininas (Yamaguchi et al. 2012). Já foi relatado aumento das AA em folhas com galhas de *L. invasa* em desenvolvimento, tanto em material susceptível, quanto em resistente (Oates et al. 2015, Li et al. 2017). Uma possível explicação para essas diferenças encontradas neste trabalho comparado a outros trabalhos realizados, com relação à Z e AA, seria a uniformidade de fases de desenvolvimento de galhas nas mesmas plantas, no nosso estudo, o que diminui o efeito de resposta de defesa sistêmica (VanDoorn et al. 2011) provocada

pela sobreposição de diferentes fases de desenvolvimento da galha e da vespa. Por outro lado, a menor quantidade de AA encontrada no clone tolerante infestado quando comparado ao controle, pode ser uma resposta de defesa da planta, que pode estar deslocando os compostos destinados ao crescimento para a defesa. O aumento de ABA em plantas parasitadas por galhadores tem três explicações distintas: A primeira seria como resposta de defesa da planta ao estresse provocado pela indução do galhador (Tooker e DeMoraes 2011, Erb et al. 2012). A segunda seria a indução pelo galhador, para benefício próprio, com o intuito de manter as galhas hidratadas para que as larvas não se desidratem (Tooker e DeMoraes 2011). E, a terceira, como estímulo para o crescimento da galha (Tooker e Helms 2014). No nosso trabalho, confirmamos que a quantidade de ABA aumenta após a indução da vespa. Entretanto, quando a vespa está em fase de larva, não há diferença entre os tratamentos para este hormônio. Isso demonstra que o aumento desse hormônio encontrado nesta fase de desenvolvimento da vespa em trabalho anterior (Li et al. 2017) pode ser devido a interferência de respostas sistêmicas (novas induções).

Em termos gerais, foi possível comprovar que em cada um dos três períodos avaliados, pré-galha, galha e pré-emergência, houveram combinações diferentes de parâmetros significativamente relacionados a cada um dos fatores testados, vespa, clone e/ou a interação entre ambos. Assim, estudos de defesa de plantas a insetos galhadores devem considerar o estágio de desenvolvimento em que a galha se encontra, bem como, o grau de susceptibilidade do hospedeiro.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (Projeto: 204521/2014-9).

Referências

- Bagatto, G., Shorthouse, J.D., 1994. Seasonal acquisition of mineral nutrients by a chalcid gall on lowbush blueberry. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 73, 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01839.x>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39, 205–207.

- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65, 1229–1240. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
- Borges, R.M., 2018. The Galling Truth: Limited Knowledge of Gall-Associated Volatiles in Multitrophic Interactions. *Frontiers in Plant Science* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01139>
- Chang, R.L., Arnold, R.J., Zhou, X.D., 2012. Association between enzyme activity levels in *Eucalyptus* clones and their susceptibility to the gall wasp, *Leptocybe invasa*, in South China. *Journal of Tropical Forest Science* 24, 256–264.
- Erb, M., Meldau, S., Howe, G.A., 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science* 17, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.003>
- Forcat, S., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., Grant, M.R., 2008. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. *Plant Methods* 4, 16. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-16>
- Giron, D., Huguet, E., Stone, G.N., Body, M., 2016. Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *Journal of Insect Physiology* 84, 70–89. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.009>
- Gonzalez, A.M., Solís, S.M., 2015. Anatomía y morfogénesis de las agallas producidas por *Leptocybe invasa* en plantas de *Eucalyptus*. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 2 50, 141–151.
- Hall, C.R., Carroll, A.R., Kitching, R.L., 2017. A meta-analysis of the effects of galling insects on host plant secondary metabolites. *Arthropod-Plant Interactions* 11, 463–473. <https://doi.org/10.1007/s11829-016-9486-0>
- Halliwell, B., 1974. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytologist* 73, 1075–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1974.tb02137.x>
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Howe, G.A., Jander, G., 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59, 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>
- Huang, M.-Y., Huang, W.-D., Chou, H.-M., Chen, C.-C., Chen, P.-J., Chang, Y.-T., Yang, C.-M., 2015. Structural, biochemical, and physiological characterization of photosynthesis in leaf-derived cup-shaped galls on *Litsea acuminata*. *BMC Plant Biology* 15, 61. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0446-0>
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., Sánchez Díaz, M., 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago*

- sativa) plants. *Physiologia Plantarum* 84, 55–60.
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Moreira, A.S.F.P., Soares, G.L.G., Carneiro, R.G.S., 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850, 1509–1517. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>
- Jiang, Y., Veromann-Jürgenson, L.-L., Ye, J., Niinemets, Ü., 2018. Oak gall wasp infections of *Quercus robur* leaves lead to profound modifications in foliage photosynthetic and volatile emission characteristics. *Plant, Cell & Environment* 41, 160–175. <https://doi.org/10.1111/pce.13050>
- Kaloshian, I., Walling, L.L., 2005. Hemipterans as Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 491–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135944>
- Kant, M.R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B.C.J., Villarroel, C.A., Ataíde, L.M.S., Dermauw, W., Glas, J.J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R.C., Sabelis, M.W., Alba, J.M., 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>
- Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *PLANT PHYSIOLOGY* 57, 315–319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Khedr, A.H.A., 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 54, 2553–2562. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
- Larson, K.C., 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia* 115, 161–166. <https://doi.org/10.1007/s004420050503>
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39, 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>
- Li, X.Q., Liu, Y.Z., Guo, W.F., Solanki, M.K., Yang, Z.D., Xiang, Y., Ma, Z.C., Wen, Y.G., 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>
- McCrea, K.D., Abrahamson, W.G., Weis, A.E., 1985. Goldenrod Ball Gall Effects on *Solidago altissima*: 14C Translocation and Growth. *Ecology* 66, 1902–1907. <https://doi.org/10.2307/2937386>
- Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N., La Salle, J., 2004. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. *Australian Journal of Entomology* 43, 101–113. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2003.00393.x>
- Oates, C., Denby, K., Myburg, A., 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>
- Oates, C.N., Külheim, C., Myburg, A.A., Slippers, B., Naidoo, S., 2015. The Transcriptome and Terpene Profile of *Eucalyptus grandis* Reveals Mechanisms of Defense Against the Insect Pest, *Leptocybe invasa*. *Plant and Cell Physiology* 56, 1418–1428. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv064>
- Ollerstam O., Larsson S., 2003. Salicylic acid mediates resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *Journal of Chemical Ecology* 29: 163-174.
- Petkau, A., Chelack, W.S., Pleskach, S.D., Meeker, B.E., Brady, C.M., 1975. Radioprotection of mice by superoxide dismutase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 65, 886–893. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(75\)80468-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(75)80468-2)
- Sims, D.A., Gamon, J.A., 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81, 337–354. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00010-X)
- Sinnhuber, R.O., Yu, T. C., Yu, Te Chang, 1958. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Journal of Food Science* 23, 626–634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1958.tb17614.x>
- Stone, G.N., Schönrogge, K., 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 512–522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34, 497.
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K., 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Tooker, J.F., De Moraes, C.M., 2011. Feeding by a gall-inducing caterpillar species alters levels of indole-3-acetic and abscisic acid in *Solidago altissima* (Asteraceae) stems. *Arthropod-Plant Interactions* 5, 115–124. <https://doi.org/10.1007/s11829-010-9120-5>
- Tooker, J.F., Hanks, L.M., 2006. Tritrophic Interactions and Reproductive Fitness of the Prairie Perennial *Silphium laciniatum* Gillette (Asteraceae). *Environmental Entomology* 35, 537–545. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-35.2.537>
- Tooker, J.F., Helms, A.M., 2014. Phytohormone Dynamics Associated with Gall Insects, and their Potential Role in the Evolution of the Gall-Inducing Habit. *Journal of Chemical Ecology* 40, 742–753. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0457-6>
- VanDoorn, A., Bonaventure, G., Schmidt, D.D., Baldwin, I.T., 2011. Regulation of jasmonate metabolism and activation of systemic signaling in *Solanum nigrum*: COI1 and JAR4 play overlapping yet distinct roles. *New Phytologist* 190, 640–652. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03622.x>
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>

- Yamaguchi, H., Tanaka, H., Hasegawa, M., Tokuda, M., Asami, T., Suzuki, Y., 2012. Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytologist* 196, 586–595. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04264.x>
- Zebelo, S.A., Maffei, M.E., 2015. Role of early signalling events in plant-insect interactions. *Journal of Experimental Botany* 66, 435–448. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru480>

CAPÍTULO 4. Etileno como modulador da resistência em clones de eucalipto com respostas diferenciais de susceptibilidade à *Leptocybe invasa*

Maíra Ignacio Sarmiento, Glória Pinto, Marciane Cristina Dotto, Pablo Henrique Nunes Carvalho, Ismael de Oliveira Pinto, Wagner Luiz Araújo, Auxiliadora Oliveira Martins, Amadeu M. V. M. Soares, Renato Almeida Sarmiento

Resumo

Estudos que demonstram as respostas hormonais de plantas induzidas poucas horas após a infestação da planta por um inseto galhador ainda são escassos. O objetivo desse trabalho foi investigar a resposta de defesa inicial (após um dia de infestação) de dois clones de eucalipto com respostas diferenciais de susceptibilidade à *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), através do perfil hormonal. As plantas hospedeiras consistiram de dois clones híbridos de *Eucalyptus tereticornis* Sm. e *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, com diferente origem seminal. Um clone é altamente susceptível à *L. invasa* (denominado daqui por diante como susceptível) e, o outro é menos susceptível (tolerante). Os tratamentos foram: clone susceptível controle, clone susceptível infestado, clone tolerante controle, clone tolerante infestado. Após um dia de infestação, realizou-se a coleta de dados e amostras para obter as trocas gasosas foliares, conteúdo relativo em água da folha e os hormônios ácido abscísico, ácido aminociclopropanocarboxílico (precursor do etileno), ácido jasmônico, ácido salicílico, auxinas, metil jasmonato e zeatina. O etileno é o principal hormônio de defesa do eucalipto contra *L. invasa* nas primeiras horas após a infestação. Enquanto que, o ácido jasmônico está relacionado à susceptibilidade de *Eucalyptus* à *L. invasa*.

Introdução

A defesa de plantas contra artrópodes herbívoros é o resultado de uma combinação entre defesa constitutiva e induzida. Enquanto a defesa constitutiva está constantemente presente na planta, a defesa induzida pode ser acionada após a planta ser atacada por um determinado herbívoro (Baldwin e Preston 1999). Exemplos de defesa constitutiva são barreiras mecânicas, tais como, tricomas (Eisner et al. 1998, Glas et al. 2012), cutícula cerosa (Eigenbrode e Shelton 1990), folhas coriáceas com paredes celulares lignificadas (Choong 1996) e substâncias fitoquímicas tóxicas que permanecem com concentrações similares antes e depois do ataque de um herbívoro à uma planta (Wittstock e Gershenson 2002). As defesas induzidas de plantas podem ser diretas ou indiretas. A planta que reconhece o agente agressor direciona seus mecanismos de defesa para atuarem diretamente contra aquele agressor. O reforço das barreiras físicas, tais como, o aumento de tricomas pela indução (Traw e Dawson 2002) ou o aumento nas concentrações de compostos fitoquímicos tóxicos aos herbívoros, tais como, nicotina no tabaco (Steppuhn et al. 2004), glucosinolatos em *Arabidopsis* (Thatcher et al. 2005, Grubb e Abel 2006), inibidores de protease (Chen et al. 2005) e emissão de terpenóides em tricomas glandulares (van Schie et al. 2007) em tomateiro são exemplos desse tipo de defesa. As plantas também podem se defender indiretamente, por meio da produção de compostos químicos voláteis que atraem inimigos naturais dos herbívoros (Sabelis et al. 2001). Esse tipo de defesa já foi demonstrado para, por exemplo, plantas de *Nicotiana attenuata* (Kessler e Baldwin 2001), *Arabidopsis* (van Poecke et al. 2001) e tomateiro (Kant et al. 2004). O ataque de herbívoros ou patógenos às plantas induz o acúmulo de fitohormônios responsáveis pela regulação dessas defesas. Os principais reguladores das defesas induzidas de plantas são reconhecidamente o ácido jasmônico (AJ) (Howe e Jander 2008) e o ácido salicílico (AS) (Kaloshian e Walling 2005). Entretanto, outros fitohormônios também podem ser produzidos durante o ataque de herbívoros e/ou patógenos, tais como, ácido abscísico (ABA), auxinas (AA), brassinosteróides, citocininas (CKs), etileno e giberelinas (Pieterse et al. 2012, Berens et al. 2017).

A maneira e o momento em que a planta irá acionar seus mecanismos de defesas serão determinados pela interação entre esses fitohormônios (Kant et al. 2015). Pois são esses fitohormônios os responsáveis pela ativação de genes que resultam 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). Uma planta atacada por um herbívoro ou patógeno pode acionar, como resposta de defesa, uma das duas rotas metabólicas principais: a rota dependente de AJ ou a dependente de AS (Broekgaarden et al. 2015, Kant et al. 2015, Berens et al. 2017). O ácido jasmônico é reconhecidamente um hormônio relacionado às respostas de defesa contra artrópodes (Howe e Jander 2008). Já AS está relacionado com as respostas de defesa contra herbívoros que se alimentam do floema (Kaloshian e Walling 2005). A combinação etileno e AJ está associada a respostas de defesa contra patógenos necrotróficos. Estes destroem as células do hospedeiro para se alimentarem do seu conteúdo. As plantas geralmente os repelem através da produção de compostos antimicrobianos (Glazebrook 2005). A combinação etileno e AS está relacionada com as respostas de defesa contra patógenos biotróficos. Estes estabelecem uma relação duradoura com as células vivas dos hospedeiros e se alimentam dos nutrientes produzidos por essas células. Nesse caso, as plantas geralmente se defendem através da morte programada de suas próprias células (Glazebrook 2005). Além dessas combinações, existe o ácido abscísico que pode modular defesas dependentes de ácido jasmônico e etileno, mas, também, suprimir respostas de defesa dependentes de AS (Ton et al. 2009, Cao et al. 2011).

Insetos galhadores de plantas são artrópodes herbívoros (Stone e Schönrogge 2003), apesar disso, sua relação com o hospedeiro é tão íntima que alguns já foram comparados com patógenos (Kaloshian e Walling 2005). Esses insetos são capazes de induzir a planta hospedeira a produzir galhas em seus próprios tecidos (Stone e Schönrogge 2003). A indução de galhas por insetos já foi relacionada aos hormônios CKs, GA e AA (Tooker e Helms 2014, Jiang et al. 2018), inclusive por *L. invasa* em eucalipto (Li et al. 2017). Enquanto que, a defesa de plantas à insetos galhadores já foi relacionada ao AS (Tooker e Helms 2014), inclusive por *L. invasa* em eucalipto (ver Capítulo 3). ABA e AJ estão relacionados tanto com a defesa (Oates et al. 2015), quanto com o desenvolvimento de galhas (Oates et al. 2015, ver Capítulo 3). Todos esses estudos analisaram tecidos de galhas induzidas por insetos em plantas. Porém, estudos de morfologia externa do desenvolvimento de galha induzida por *L. invasa* em eucalipto

mostram que plantas tolerantes não desenvolvem galhas nos locais ovipositados (ver Capítulo 2). Isso sugere que essas plantas devem acionar algum mecanismo que impede a indução de galhas nas primeiras horas após a infestação. Estudos que demonstram as respostas hormonais de plantas induzidas poucas horas após a infestação da planta por um herbívoro ou patógeno ainda são escassos. Kant et al. (2004) demonstram que é possível verificar a resposta de defesa direta de plantas de tomate contra um ácaro herbívoro após um dia de infestação, enquanto a resposta de defesa indireta ocorre somente a partir do terceiro dia de infestação.

O objetivo desse trabalho foi investigar a resposta de defesa inicial (após um dia de infestação) de dois clones de eucalipto com respostas diferenciais de susceptibilidade à *L. invasa*, através do perfil hormonal.

Material e Métodos

Obtenção das plantas hospedeiras e criação do inseto galhador

As plantas hospedeiras consistiram de dois híbridos do cruzamento entre *Eucalyptus tereticornis* Sm. e *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, de diferente origem seminal. Um clone (VS 058) é altamente susceptível à *L. invasa* (denominado daqui por diante como susceptível) e, o outro (VS 062), é menos susceptível (denominado daqui por diante como tolerante). Ambos os clones tem as matrizes genotipadas e foram produzidos por estaquia. As mudas foram doadas pelo viveiro S&D Florestal Viveiro, localizado no Município de Martinho Campos, Estado de Minas Gerais, Brasil. Mudas de seis meses de idade foram transplantadas de tubetes contendo substrato comercial Bioflora® (Empresa Bioflora Substratos Agrícolas, Município de Prata, Estado de Minas Gerais, Brasil) para vasos de 3,8 L. Nesses vasos foi utilizado o mesmo substrato acrescentado de 5,6g de adubo granulado 05-25-15, adicionado de Ca (4%), S (2%) e Zn (0,2%), bem como, 250 mL (4g/L) de hidrogel (copolímero poliacrílico de potássio poliacrilamida) hidratado Forth® (Empresa TECNUTRI do Brasil, Município de Tietê, Estado de São Paulo, Brasil). Essas mudas foram irrigadas diariamente para evitar estresse hídrico e adubadas quinzenalmente com a mesma quantidade e tipo do adubo supracitado para o plantio. As mudas foram utilizadas quando atingiram a altura média de $78,9 \pm 7,9$ cm ($F_{3,20}=1,7513$,

P=0,1889), o diâmetro médio de $6,5 \pm 0,9$ ($F_{3,20}=0,4973$, $P=0,6883$) e o número de ramos médio de $3,8 \pm 1,8$ ($F_{3,20}=0,5454$, $P=0,6569$).

A criação da vespa-da-galha-do-eucalipto, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), foi iniciada no Laboratório de Ecologia Funcional e Aplicada (UFT) através de mudas do clone susceptível parasitadas pela microvespa e doadas pela empresa Braxcel Florestal S.A. Essas mudas foram colocadas dentro de uma gaiola (2,8m x 5,2m x 3,0m - altura x comprimento x largura) revestida com organza, em casa de vegetação coberta com plástico transparente, denominada a partir de agora de gaiola de criação, juntamente com mudas sadias desse mesmo clone para serem ovipositadas. Exemplares da microvespa retirados da criação foram enviados ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken do Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAUNESP), que confirmou a identificação.

Delineamento Experimental

Seis mudas de eucalipto de cada clone foram colocadas dentro da gaiola de criação das vespas por um período de um dia (vinte e quatro horas). Outras 12 mudas (metade de cada clone) foram deixadas livres de vespas para servir de controle (plantas não infestadas). Os tratamentos foram: clone susceptível controle, clone susceptível infestado, clone tolerante controle, clone tolerante infestado. Após o período supracitado, foi confirmada a oviposição (através da observação da injúria provocada pelo ovipositor, com o auxílio de lupa de mão) em todas as plantas infestadas e seguiu-se a coleta dos dados e amostras conforme explicado abaixo:

Trocas gasosas foliares: utilizando o sistema de medição de trocas gasosas LI-6400 XT (Li-COR, Lincoln, NE) foram determinadas a taxa de assimilação foliar líquida de CO₂ (A), a condutância estomática (g_s), a concentração de CO₂ intercelular (C_i) e a transpiração (E). As seguintes condições foram mantidas dentro da câmara: fluxo de ar 360 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura do bloco 33 °C, concentração de CO₂ ambiente de 400 $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$, umidade relativa do ar 40-55%, intensidade de luz 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A intensidade de luz foi determinada após a análise dos dados de saturação de intensidade luminosa: 2000, 1800, 1500, 1200, 1000, 800, 500, 250, 100, 50, 25, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. As medidas foram realizadas após a estabilização dos dados (cerca de 2 min). Cada repetição consistiu da primeira folha totalmente expandida de um total de seis plantas por tratamento. As folhas de plantas

controle foram equivalentes às folhas não ovipositadas de plantas infestadas, de cada clone. A escolha de folhas não ovipositadas para plantas infestadas permitiu avaliar as trocas gasosas que ocorrem em toda a planta e não somente no local da oviposição.

Conteúdo relativo em água: Utilizou-se o primórdio foliar imediatamente anterior à primeira folha totalmente expandida. Para os tratamentos das plantas infestadas, foram utilizados primórdios foliares ovipositados. Cada repetição consistiu de 4 discos foliares (16 mm de diâmetro) por planta e seis plantas por tratamento (Barrs e Weatherley 1962).

Quantificação de hormônios

Os hormônios ácido abscísico (ABA), ácido aminociclopropanocarboxílico (ACC: precursor do etileno), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), auxinas (AA), metil jasmonato (MeJa) e zeatina (Z) foram quantificados de acordo com Forcat et al. (2008). Cada repetição (amostra) consistiu de três ápices de ramos por planta e cinco plantas por tratamento, totalizando cinco repetições biológicas. Para os tratamentos das plantas infestadas, foram utilizados ápices de ramos com primórdios foliares ovipositados. Os ápices foram cortados acima da primeira folha totalmente expandida. Em seguida, foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram liofilizadas e hermeticamente estocadas até o momento da extração. Aproximadamente 110 mg de tecido foliar liofilizado foi triturado com esferas de tungstênio (3 mm) (Moinho vibratório, MM 400, Retsch, Haan, Alemanha), a 25 Hz/ s, durante 3 min. Ao material triturado, foi acrescentado 400 µl da solução de extração 20% metanol: 79% isopropanol: 1% ácido acético glacial (v/v/v) grau LC-MS. Além do tampão, foram colocados os respectivos hormônios deuterados como padrão interno e com concentrações conhecidas de modo a corrigir variações e perdas durante a extração. Para cada tratamento, foi feito um controle de extração sem material vegetal (branco). Cada amostra foi vortexada durante 20 s, por quatro vezes, com intervalos de 2 min no gelo. Após, as amostras foram sonicadas por 10 min. Imediatamente, foram transferidas para o gelo e permaneceram por 30 min. Novamente, as amostras foram sonicadas por 10 min. Em seguida, foram centrifugadas a 4 °C, na rotação de 13000 g, por 10 min (Microcentrífuga refrigerada, SelectSpin R, Select Bioproducts, Edison, Nova Jersey, Estados Unidos da América). 350 µl do sobrenadante, por amostra, foram transferidos para novos tubos de centrifugação, acondicionados em freezer -20 °C e reservados. Ao pellet restante, foi acrescentada a mesma alíquota do tampão de extração supracitado e repetidos os mesmos passos seguintes até uma nova

centrifugação. Após, esse sobrenadante foi retirado e adicionado ao primeiro que estava reservado. Finalmente, as amostras foram novamente centrifugadas a 4 °C, na rotação de 20.000 g, por 5 min. Em seguida, 700 µl do sobrenadante, por amostra, foram transferidos para tubos vials. As amostras foram filtradas (Captiva Econofilter, PVDF membrane, 13 mm de diâmetro, 0,2 µm o tamanho do poro, Código do fabricante 5190-5261, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Estados Unidos da América) e 300 µl de cada amostra foram transferidos para novos vials. 5 µl de cada amostra foram injetados no sistema HPLC - MS/MS (Cromatógrafo líquido, Agilent 1200 Infinity Series, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América acoplado ao Espectrofotômetro de Massa tipo Quadrupolo Triplo (QqQ), 6430, Agilent Technologies, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América). A separação da cromatografia foi realizada em uma coluna (Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm, 2,1x50mm, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos da América) e, na sequência, por uma coluna guarda (Zorbax SB-C18, 1,8 µm, Agilent Technologies). Os solventes utilizados foram: (A) ácido acético em água 0,02% e (B) ácido acético em acetonitrila 0,02% em um gradiente de tempo/%B: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. A taxa de fluxo dos solventes foi 0,3 ml/ min em uma temperatura de coluna de 30 °C. O método de ionização usado no espectrofotômetro de massa foi ESI (Electrospray Ionization) seguindo essas condições: temperatura do gás de 300 °C, taxa de fluxo de nitrogênio de 10 l/ min, pressão de nebulização 35 psi e voltagem da capilaridade de 4000 V. O equipamento foi operado no modo MRM (multiple reaction monitoring). A massa do precursor íon/ fragmento estabelecido foi monitorada pelo teste de fragmentação de cada molécula: Z (220/136), ACC (102, 1/56,2), ABA (263/153), AA (176/130), AS (137/93), AJ (209/59). Z, AA e ACC foram escaneados no modo positivo, enquanto, ABA, SA e AJ no modo negativo. A curva de calibração (0.1ng a 200ng), usando os respectivos padrões de cada hormônio, foi gerada para determinar a quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no software “MassHunter Workstation” para obter as áreas de pico para cada hormônio nas amostras e os resultados foram expressos em ng/g de matéria fresca (MF).

Análises estatísticas

Primeiramente, foi realizada uma análise fatorial através da Análise de Variância (ANOVA) para verificar os efeitos dos fatores clone (susceptível e tolerante), infestação (plantas controle e plantas infestadas) e a interação de ambos. Quando aplicável, foi realizado um teste de comparações múltiplas (Teste Tukey), com nível de significância de 0,05.

Resultados

Trocas gasosas foliares

Os resultados referentes às trocas gasosas foliares demonstraram que A ($F_{1,20}=18,020$, $P=0,0004$; Figura 1B), g_s ($F_{1,20}=16,344$, $P=0,0006$; Figura 1D) e E ($F_{1,20}=22,517$, $P=0,0001$; Figura 1F) foram significativamente maiores no clone tolerante infestado do que no tolerante controle. Enquanto que, A ($F_{1,20}=4,391$, $P=0,0491$; Figura 1A) foi maior, g_s ($F_{1,20}=2,234$, $P=0,1506$; Figura 1C) e E ($F_{1,20}=1,142$, $P=0,2979$; Figura 1E) foram significativamente iguais, quando comparados os clones susceptível infestado com o controle, respectivamente. C_i não diferiu significativamente entre os tratamentos infestado e controle nos clones susceptível ($F_{1,20}=0,205$, $P=0,6555$; Figura 1G) e tolerante ($F_{1,20}=0,132$, $P=0,7207$; Figura 1H). Mas foi significativamente maior no clone susceptível do que no tolerante ($F_{1,20}=5,042$, $P=0,0362$).

Na interação, A ($F_{3,20}=2,310$, $P=0,1442$), g_s ($F_{3,20}=3,246$, $P=0,0867$) e C_i ($F_{3,20}=0,333$, $P=0,5706$) não diferiram significativamente entre os tratamentos. A transpiração no clone tolerante infestado foi significativamente maior do que o clone tolerante controle e igual aos tratamentos do clone susceptível, controle e infestado ($F_{3,20}=6,758$, $P=0,0171$).

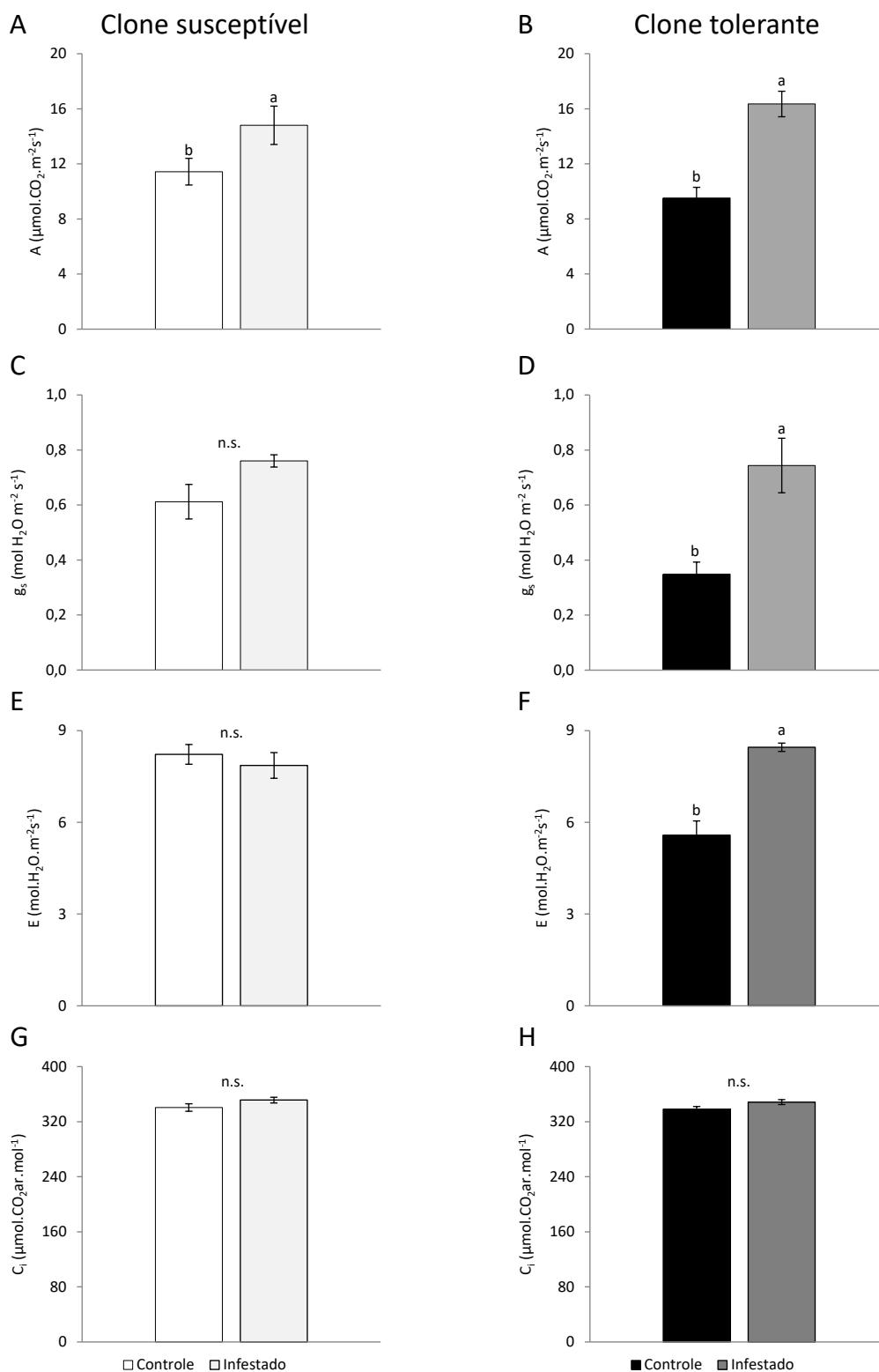


Figura 1. Média de A (A,B), g_s (C,D), E (E,F) e C_i (G,H) em amostras de primórdios foliares de dois clones de *Eucalyptus*, susceptível (A,C,E,G) e tolerante (B,D,F,H) à *L. invasa*. A coleta foi realizada após um período de um dia de infestação. As barras correspondem à média \pm erro padrão de seis repetições biológicas. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos ($P \leq 0,05$). n.s. não significativo.

Conteúdo relativo em água

O conteúdo relativo em água dos primórdios foliares teve diferença significativa na interação infestação e clone. Sendo que, este foi significativamente maior no clone susceptível infestado do que no susceptível controle e no tolerante infestado. O tolerante limpo não diferiu entre todos os tratamentos ($F_{3,20}=7,402$, $P=0,0132$; Figura 2). Os fatores clone ($F_{1,20}=2,043$, $P=0,1683$) e infestação ($F_{1,20}=3,728$, $P=0,0678$), separadamente, não influenciaram esse parâmetro significativamente.

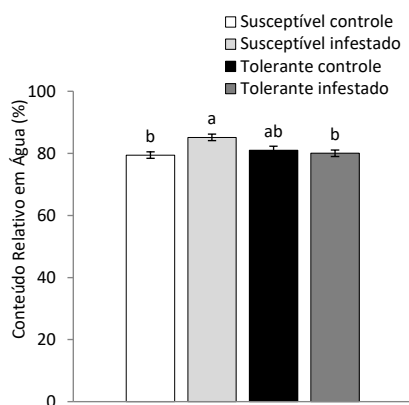


Figura 2. Média do conteúdo relativo em água em amostras de primórdios foliares de dois clones de *Eucalyptus*, susceptível e tolerante à *L. invasa*. A coleta foi realizada após um período de um dia de infestação. Os tratamentos foram: clone susceptível controle (SC), clone susceptível infestado (SI), clone tolerante controle (TC) e clone tolerante infestado (TI). As barras correspondem à média \pm erro padrão de seis repetições biológicas. Diferentes letras significam diferença entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Quantificação de hormônios

A quantidade do precursor do etileno (ACC) no clone tolerante infestado foi mais do que o dobro da encontrada no tratamento controle do mesmo genótipo ($F_{1,16}=11,329$, $P=0,0039$; Figura 3B) e, aproximadamente, quatro vezes maior do que a obtida para o clone susceptível infestado ($F_{1,16}=17,405$, $P=0,0007$; Figuras 3A,B). Enquanto a quantidade de ACC no clone susceptível infestado foi significativamente igual ao susceptível controle ($F_{1,16}=0,620$, $P=0,4426$; Figura 3A). A quantidade de AS não diferiu significativamente nos fatores testados, infestação ($F_{1,16}=0,413$, $P=0,5296$) e clone ($F_{1,16}=4,361$, $P=0,0531$). Semelhantemente, não houve diferença significativa entre as quantidades de AS quando comparados os tratamentos controle e infestado dentro de cada genótipo, susceptível ($F_{1,16}=1,107$, $P=0,3085$; Figura 3C) ou tolerante ($F_{1,16}=0,020$, $P=0,8879$; Figura 3D). O tratamento susceptível infestado apresentou quantidades de AJ significativamente maiores do que o tratamento susceptível controle ($F_{1,16}=16,401$,

P=0,0009; Figura 3E). Já o tratamento tolerante infestado não diferiu significativamente do seu controle ($F_{1,16}=2,501$, $P=0,1333$; Figura 3F). Não houve diferença significativa entre as quantidades de MeJa, quando comparados os tratamentos controle e infestado dentro de cada genótipo, susceptível ($F_{1,16}=0,190$, $P=0,6689$; Figura 3G) ou tolerante ($F_{1,16}=3,973$, $P=0,0636$; Figura 3H). Entretanto, o clone susceptível apresentou mais que o dobro da quantidade de MeJa com relação ao clone tolerante ($F_{1,16}=45,968$, $P<0,0001$). Esse resultado foi semelhante quando a comparação foi realizada tanto entre as plantas controle dos dois clones ($F_{1,16}=36,103$, $P<0,0001$), quanto entre as infestadas dos dois clones ($F_{1,16}=12,815$, $P=0,0025$).

Não houve diferença significativa na interação clone×infestação para ACC ($F_{3,16}=3,325$, $P=0,0870$), AS ($F_{3,16}=0,714$, $P=0,4105$), AJ ($F_{3,16}=3,046$, $P=0,1001$) e MeJa ($F_{3,16}=2,949$, $P=0,1052$).

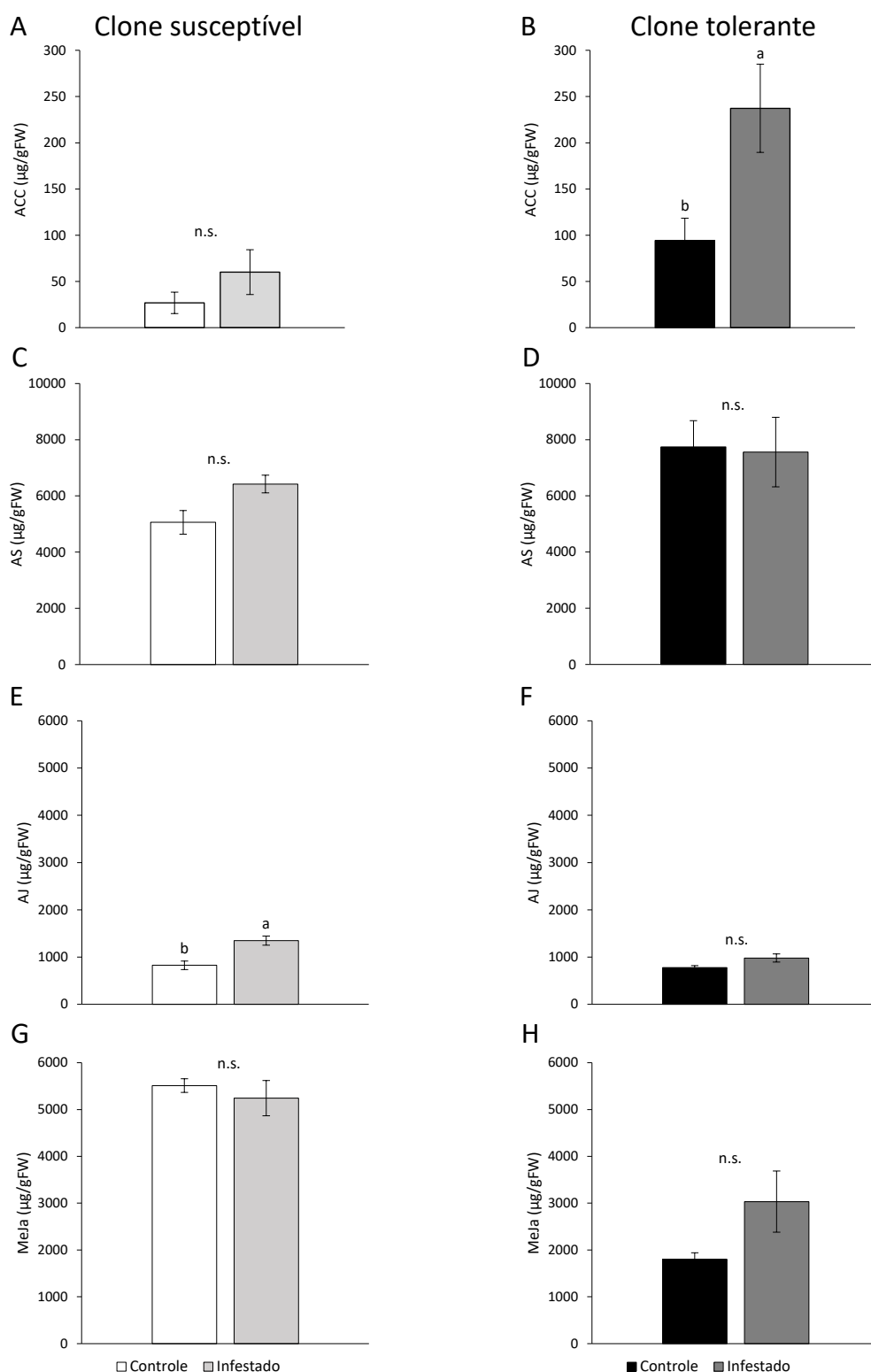


Figura 3. Quantidade de ACC (A,B), AS (C,D), AJ (E,F) e MeJa (G,H) em amostras de primórdios foliares de plantas controle (não infestadas) e infestadas por *L. invasa*. As amostras foram coletadas de dois clones de *Eucalyptus*, susceptível (A, C, E, G) e tolerante à vespa (B, D, F, H), respectivamente. A coleta foi realizada após o período de um dia de infestação. As barras correspondem à média \pm erro padrão de cinco repetições biológicas. Diferentes letras significa diferença entre os tratamentos ($P \leq 0,05$). n.s. não significativo.

A quantidade de Z foi significativamente maior no clone susceptível quando comparado ao clone tolerante ($F_{1,16}=6,905$, $P=0,0183$). Também foi maior nas plantas infestadas do que nas plantas controle ($F_{1,16}=4,854$, $P=0,0426$). Entretanto, não houveram diferenças significativas para os tratamentos controle e infestado, dentro de cada clone, susceptível ($F_{1,16}=1,159$, $P=0,2977$; Figura 4A) e tolerante ($F_{1,16}=4,158$, $P=0,0583$; Figura 4B). As quantidades de AA foram significativamente iguais nos fatores clone ($F_{1,16}=3,672$, $P=0,0734$) e vespa ($F_{1,16}=0,471$, $P=0,4374$; Figuras 4C,D). Os resultados também foram significativamente iguais para ABA nos fatores clone ($F_{1,16}=0,173$, $P=0,6831$) e infestação ($F_{1,16}=1,126$, $P=0,8646$; Figuras 4E,F).

Na interação, não houveram diferenças significativas para Z ($F_{3,16}=0,463$, $P=0,5057$), AA ($F_{3,16}=0,634$, $P=0,4374$) e ABA ($F_{3,16}=0,030$, $P=0,8646$).

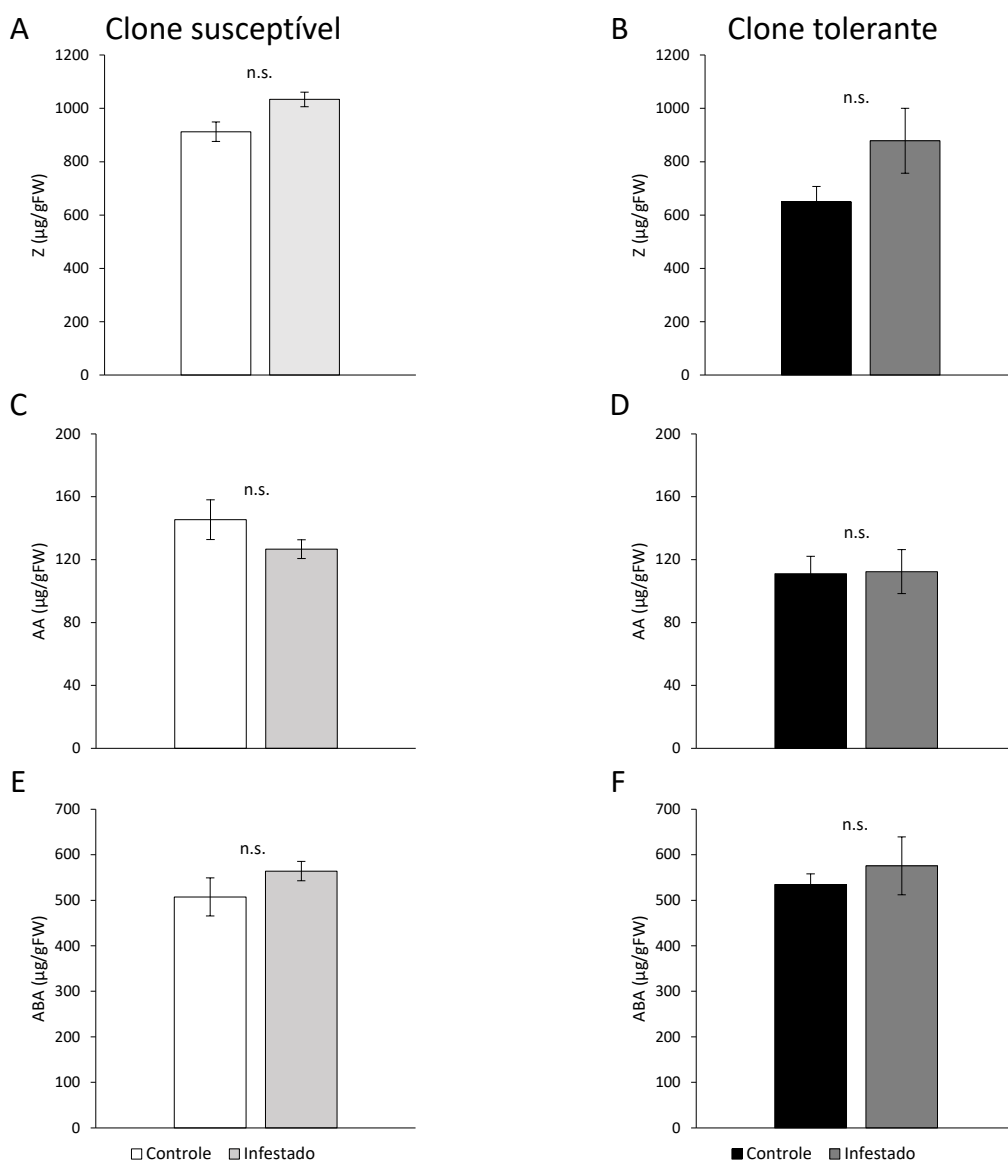


Figura 4. Quantidade de Z (A,B), AA (C,D) e ABA (E,F) em amostras de primórdios foliares de dois clones de *Eucalyptus*, susceptível (A,C) e tolerante (B,D) à *L. invasa*, respectivamente. A coleta foi realizada após um período de um dia de infestação. As barras correspondem à média \pm erro padrão de cinco repetições biológicas ($P \leq 0,05$). n.s. não significativo.

Discussão

O etileno, cujo precursor direto é o ACC, é o principal hormônio de defesa do eucalipto contra *L. invasa* nas primeiras horas após a infestação. Esse hormônio também é responsável pela modulação da defesa de plantas contra outros herbívoros e patógenos. Porém, os resultados dessa modulação dependem da sua interação com outros hormônios, tais como AJ, AS e ABA (Broekgaarden et al. 2015). No caso da *L. invasa*, foi observado no Capítulo 3 que, aos 4 dias após a infestação (fase de pré-galha), o AS tem importante papel na defesa de eucalipto contra essa vespa. Portanto, a defesa de eucalipto contra *L. invasa* se assemelha muito mais à defesa de uma planta contra um patógeno biotrófico do que contra um inseto herbívoro, que se alimenta diretamente do tecido da planta (Broekgaarden et al. 2015, Kant et al. 2015). A planta, assim como ocorre com um esporo, por exemplo, precisa se livrar rapidamente do ovo da vespa inserido em seus tecidos. Assim, é de se esperar que a morte programada das células da planta ao redor do ovo depositado, como ocorre com patógenos biotróficos pela interação de etileno e AS (Glazebrook 2005), seja a primeira resposta de defesa contra um inseto galhador. Já que os insetos galhadores, assim como os patógenos biotróficos, se utilizam das células vivas das plantas (Stone e Schönrogge 2003, Glazebrook 2005).

O AJ, por sua vez, desempenha papel na susceptibilidade à *L. invasa* do clone de eucalipto susceptível aqui estudado, como já observado anteriormente (ver Capítulo 3). Entretanto, aqui não observamos um efeito “crosstalk” antagônico entre AJ e AS, como observado aos 4 dias após a infestação com o mesmo genótipo susceptível (ver Capítulo 3). Já que, o aumento de AJ não ocorreu concomitante a uma diminuição de AS. Isso pode indicar que AJ é induzido pela vespa e pode estar havendo uma supressão da defesa relacionada à rota do AS por *L. invasa*, através da indução da rota relacionada ao AJ, como já comprovado para *Arabidopsis* atacada por lagarta (Verhage et al. 2011). Alternativamente, a indução positiva de AJ pode estar relacionada com o crescimento e desenvolvimento da galha, como já sugerido por outros autores (Oates et al. 2015). As altas quantidades de MeJa encontradas no genótipo susceptível parece ser produzida constitutivamente, pois em trabalho anterior, esse volátil também foi encontrado em altas concentrações no tratamento susceptível controle. E, por outro lado, não foi encontrado nessa mesma quantidade no tratamento tolerante controle (ver Capítulo 3).

Interessantemente, o ABA, que também é considerado um hormônio modulador das respostas de defesa dependentes de etileno e AJ (Finkelstein et al. 2013), permaneceu em quantidades significativamente iguais entre todos os tratamentos. Esse resultado colabora com a ideia de que o AJ não aumenta como resposta de defesa da planta susceptível, mas como uma resposta induzida pela vespa. O período de um dia de infestação não foi suficiente para detectar diferenças nas quantidades de Z ou AA. Nesse período, a vespa ainda não eclodiu do ovo, o que deve ocorrer por volta de $8,33 \pm 1,35$ e $18,25 \pm 2,88$ dias após a oviposição, nos clones susceptível e tolerante, respectivamente (ver Capítulo 2). Porém, esses hormônios já foram relacionados com o desenvolvimento e crescimento de galhas para essa vespa (Oates et al. 2015, Li et al. 2017) e outras espécies de insetos galhadores (Tooker e Helms 2014). Portanto, os resultados sugerem que o estágio de larva de *L. invasa* é que deve ser responsável pela indução e/ou produção desses hormônios relacionados ao crescimento e desenvolvimento de galhas. Pois já foi demonstrado que uma mosca (*Pontania* sp.) indutora de galha em um salgueiro arbustivo (*Salix japonica* Thunb.) sintetiza AA a partir de triptofano e, possivelmente, também é capaz de sintetizar CKs (Yamaguchi et al. 2012). Entretanto, foi possível verificar novamente, que as plantas susceptíveis controle apresentam maiores quantidades de Z do que as plantas tolerantes controle. Assim como, o que foi encontrado no Capítulo 3.

O clone tolerante infestado aumentou todos os parâmetros relacionados às trocas gasosas foliares. Esse aumento pode estar relacionado ao reconhecimento do agressor por este genótipo, que precisa produzir maiores quantidades de substâncias de defesa neste período, em detrimento do seu próprio crescimento (ver Capítulo 3). O clone susceptível aumenta somente a taxa de assimilação de CO₂. Esse aumento, nesse período, pode estar relacionado à indução do aumento do C_i que ocorre nas próximas etapas de desenvolvimento da galha e do inseto (ver Capítulo 3). Que por sua vez, pode estar relacionado ao acúmulo ativo de nutrientes induzidos por insetos galhadores (Bagatto e Shorthouse 1994).

As respostas hormonais iniciais ao ataque por *L. invasa* nos clones estudados estão relacionadas com a indução da vespa, caso do ACC, no clone tolerante, e do AJ, no clone susceptível, e características constitutivas do hospedeiro susceptível, especialmente com relação aos hormônios MeJa e Z. Por outro lado, não foram encontradas diferenças na interação entre os fatores infestação e clone para hormônios. Diferentemente do que foi

encontrado no Capítulo 3, em todos os tempos de desenvolvimento da galha e da vespa (pré-galha/ovo, galha/larva e pré-emergência/pupa) testados. Onde foram encontrados parâmetros hormonais significativamente relacionados existe essa interação.

Em resumo, podemos concluir que o etileno é um importante modulador da resistência de *Eucalyptus* à *L. invasa* nas primeiras horas após a oviposição. Enquanto que, o AJ está relacionado à susceptibilidade de *Eucalyptus* à *L. invasa* nesse mesmo período.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (Projeto: 204521/2014-9).

Referências

- Bagatto, G., Shorthouse, J.D., 1994. Seasonal acquisition of mineral nutrients by a chalcid gall on lowbush blueberry. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 73, 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01839.x>
- Baldwin, I.T., Preston, C.A., 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208, 137–145. <https://doi.org/10.1007/s004250050543>
- Barrs, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15, 413–428.
- Berens, M.L., Berry, H.M., Mine, A., Argueso, C.T., Tsuda, K., 2017. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* 55, 401–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035544>
- Broekgaarden, C., Caarls, L., Vos, I.A., Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., 2015. Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiology* pp.01020.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01020>
- Cao, F.Y., Yoshioka, K., Desveaux, D., 2011. The roles of ABA in plant–pathogen interactions. *Journal of Plant Research* 124, 489–499. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0409-y>
- Chen, H., Wilkerson, C.G., Kuchar, J.A., Phinney, B.S., Howe, G.A., 2005. From The Cover: Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 19237–19242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509026102>
- Choong, M.F., 1996. What Makes a Leaf Tough and How This Affects the Pattern of *Castanopsis fissa* Leaf Consumption by Caterpillars. *Functional Ecology* 10, 668.

<https://doi.org/10.2307/2390178>

- Eigenbrode, S.D., Shelton, A.M., 1990. Behavior of Neonate Diamondback Moth Larvae (Lepidoptera: Plutellidae) on Glossy-Leafed Resistant Brassica oleracea L. Environmental Entomology 19, 1566–1571. <https://doi.org/10.1093/ee/19.5.1566>
- Eisner, T., Eisner, M., Hoebeker, E.R., 1998. When defense backfires: Detrimental effect of a plant's protective trichomes on an insect beneficial to the plant. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 4410–4414. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4410>
- Finkelstein, R., 2013. Abscisic Acid Synthesis and Response. The Arabidopsis Book 11, e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Forcat, S., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., Grant, M.R., 2008. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. Plant Methods 4, 16. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-16>
- Glas, J., Schimmel, B., Alba, J., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R., Kant, M., 2012. Plant Glandular Trichomes as Targets for Breeding or Engineering of Resistance to Herbivores. International Journal of Molecular Sciences 13, 17077–17103. <https://doi.org/10.3390/ijms131217077>
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. Annual Review of Phytopathology 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Grubb, C.D., Abel, S., 2006. Glucosinolate metabolism and its control. Trends in Plant Science 11, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.006>
- Howe, G.A., Jander, G., 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. Annual Review of Plant Biology 59, 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>
- Jiang, Y., Veromann-Jürgenson, L.-L., Ye, J., Niinemets, Ü., 2018. Oak gall wasp infections of *Quercus robur* leaves lead to profound modifications in foliage photosynthetic and volatile emission characteristics. Plant, Cell & Environment 41, 160–175. <https://doi.org/10.1111/pce.13050>
- Kaloshian, I., Walling, L.L., 2005. Hemipterans as Plant Pathogens. Annual Review of Phytopathology 43, 491–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135944>
- Kant, M.R., Ament, K., Sabelis, M.W., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2004. Differential Timing of Spider Mite-Induced Direct and Indirect Defenses in Tomato Plants. Plant Physiology 135, 483–495. <https://doi.org/10.1104/pp.103.038315>
- Kant, M.R., Jonckheere, W., Knegt, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B.C.J., Villarroel, C.A., Ataíde, L.M.S., Dermauw, W., Glas, J.J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R.C., Sabelis, M.W., Alba, J.M., 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>
- Kessler, A., Baldwin, I.T., 2001. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* 291, 2141–2144. <https://doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>
- Li, X.Q., Liu, Y.Z., Guo, W.F., Solanki, M.K., Yang, Z.D., Xiang, Y., Ma, Z.C., Wen, Y.G., 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>
- Oates, C.N., Külheim, C., Myburg, A.A., Slippers, B., Naidoo, S., 2015. The Transcriptome and Terpene Profile of *Eucalyptus grandis* Reveals Mechanisms of Defense Against the Insect Pest, *Leptocybe invasa*. *Plant and Cell Physiology* 56, 1418–1428. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv064>
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 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>
- Van Poecke, R.M.P., Posthumus, M.A., Dicke, M., 2001. Herbivore-Induced Volatile Production by *Arabidopsis thaliana* Leads to Attraction of the Parasitoid *Cotesia rubecula*: Chemical, Behavioral, and Gene-Expression Analysis. *Journal of Chemical Ecology* 27, 1911–1928. <https://doi.org/10.1023/A:1012213116515>
- Sabelis, M.W., 2001. ECOLOGY: Enhanced: The Enemy of My Enemy Is My Ally. *Science* 291, 2104–2105. <https://doi.org/10.1126/science.1059939>
- van Schie, C.C.N., Haring, M.A., Schuurink, R.C., 2007. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Molecular Biology* 64, 251–263. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9149-8>
- Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., Baldwin, I.T., 2004. Nicotine's Defensive Function in Nature. *PLoS Biology* 2, e217. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020217>
- Stone, G.N., Schönrogge, K., 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 512–522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P., Singh, K.B., 2005. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32, 1. <https://doi.org/10.1071/FP04135>
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* 14, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>

- Tooker, J.F., Helms, A.M., 2014. Phytohormone Dynamics Associated with Gall Insects, and their Potential Role in the Evolution of the Gall-Inducing Habit. *Journal of Chemical Ecology* 40, 742–753. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0457-6>
- Traw, B.M., Dawson, T.E., 2002. Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. *Oecologia* 131, 526–532. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0924-6>
- Verhage, A., 2011. Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Frontiers in Plant Science* 2. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00047>
- Wittstock, U., Gershenzon, J., 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 300–307. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00264-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00264-9)
- Yamaguchi, H., Tanaka, H., Hasegawa, M., Tokuda, M., Asami, T., Suzuki, Y., 2012. Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytologist* 196, 586–595. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04264.x>

CAPÍTULO 5. Discussão Geral

Este trabalho demonstrou que a resposta de defesa de uma planta a um inseto galhador está pautada em uma combinação de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e hormonais, que se sucedem e se modificam ao longo de todo o período de desenvolvimento da galha (da oviposição até a emergência). Essa resposta é dependente do fator genótipo, do fator inseto galhador e da interação entre ambos. O resultado dessas interações nos diferentes genótipos de plantas hospedeiras pode ser percebido através de diferenças temporais de desenvolvimento da galha e de desenvolvimento do inseto.

No Capítulo 2, foi demonstrado que *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) induz resposta diferencial em dois clones de *Eucalyptus* de um mesmo cruzamento e diferente origem seminal, ainda no início de desenvolvimento da galha e, por consequência, na emergência do parasita. Também foi mostrado que existe entre esses clones um diferencial de tempo de resposta nos estádios que antecedem o aparecimento da galha e eclosão do inseto. Além desses resultados, foi identificado um estágio de desenvolvimento da galha ainda não relatado na literatura, presente em ambos os hospedeiros da vespa-da-galha-do-eucalipto avaliados.

Ainda neste capítulo, foi mostrado que a diferença de susceptibilidade entre os clones estudados não pôde ser visualizada nas diferenças entre a ocorrência de determinados estádios de desenvolvimento das galhas, densidade de oviposição ou no tempo total de duração do ciclo de vida do inseto, como era esperado. Essa diferença foi encontrada, particularmente, no tempo de desenvolvimento dos estádios que precedem a formação da galha propriamente dita, bem como, que precedem a eclosão do inseto, na quantidade de plantas com galhas e orifícios de emergência, na quantidade de galhas por planta, seja nas folhas ou nos entrenós, no comprimento e largura das galhas e na quantidade de orifícios de emergência por planta (ou seja, quantidade de indivíduos que conseguem completar o ciclo de vida). Esses parâmetros são a consequência de mecanismos de interação entre o inseto e a planta, que ocorrem, como foi apontado, nos estádios iniciais de desenvolvimento da galha e do inseto, mas que podem se estender até a emergência do inseto. As vespas colocadas para a infestação aumentaram a população inicial em, pelo menos, vinte vezes no clone susceptível, enquanto no clone tolerante a população inicial reduz quase pela metade. No clone susceptível, a emergência do conjunto de plantas infestadas dura, pelo menos, 39 dias, enquanto no

clone tolerante, esse período não ultrapassa 9 dias. O período de emergência de *L. invasa* em um hospedeiro susceptível pode se prolongar, pelo menos, até próximo à emergência da segunda geração. Enquanto que, em um hospedeiro com características de resistência, esse período fica limitado ao tempo mínimo de desenvolvimento necessário para o ovo se tornar um inseto adulto. O comportamento da emergência de insetos galhadores é relacionado, em alguns trabalhos, com as mudanças climáticas (Xi et al. 2016) e até com a fenologia do hospedeiro (Yukawa 2000), mas ainda não há estudos aprofundados sobre a relação da emergência com os mecanismos de defesa do hospedeiro.

No capítulo 3, foi demonstrado que o ácido salicílico (AS) desempenha o principal papel de sinalizador de defesa para *L. invasa* em eucalipto. Trabalhos anteriores com insetos galhadores já apontavam para esse papel do AS (Ollerstam e Larsson 2003, Tooker e Hanks 2006). Também foi possível verificar que a importância do AS está nos primeiros dias após a oviposição, como sugeriram resultados de estudos morfológicos do Capítulo 2. Ao contrário do que sugeriram estudos prévios (Oates et al. 2015), os resultados deste trabalho confirmam que a principal resposta de defesa à *L. invasa* ocorre durante os estádios de desenvolvimento que precedem o aparecimento da galha. Mesmo porque, em plantas resistentes ou tolerantes, apesar da oviposição da vespa, a galha não se desenvolve (Capítulo 2, Oates et al. 2015). Apesar do ácido jasmônico (AJ) ser mais correlacionado como um hormônio sinalizador de defesa contra artrópodes herbívoros (Howe e Jander 2008), na interação aqui estudada, este hormônio pode ter papel na susceptibilidade. Uma explicação possível é o efeito “*crosstalk*” que pode ocorrer entre AS e AJ (Thaler et al. 2012). Oates et al. (2015) já haviam encontrado genes altamente expressos, relacionados à rota metabólica de AJ (“*up-regulated JA metabolic genes*”) em genótipo de *E. grandis* × *E. camaldulensis* susceptível à *L. invasa*. Curiosamente, zeatina (Z), que já foi considerado como um hormônio relacionado com galhas em desenvolvimento (Li et al. 2017), apareceu em destaque tanto nas plantas controle, quanto nas infestadas do clone susceptível aqui estudado. Isso mostra que esse hormônio deve estar constitutivamente presente na planta susceptível estudada e, poderia ser utilizado como um indicador de susceptibilidade, neste caso. Somente foi observado resultado que indica indução de Z em plantas infestadas, em galhas próximas da emergência, ao contrário dos resultados encontrados por Li et al. (2017). Trabalhos anteriores já relataram a possibilidade do próprio inseto galhador sintetizar citocininas (Yamaguchi et al. 2012).

Resumidamente, na fase inicial de desenvolvimento da galha, a defesa de *Eucalyptus* contra *L. invasa* foi relacionada com a diminuição do crescimento da planta e inibição da atividade da catalase (CAT). A diminuição do crescimento indica que a planta tolerante desloca a produção de compostos de crescimento do metabolismo primário para o metabolismo secundário, responsável pela produção dos compostos de defesa. Enquanto a inibição da CAT pode ocorrer como uma resposta de defesa da planta, permitindo um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são tóxicas para herbívoros e também podem ter papel na sinalização da defesa (Kant et al. 2015). Pois as ERO estão entre as primeiras respostas de defesa da planta após a indução (Zebelo e Maffei 2015). O aumento da quantidade de ABA, também pode estar relacionado à tolerância ao estresse, neste caso. Além de maior quantidade de AS, como já citado anteriormente, e de conteúdo de clorofila a. A indução da galha nesta fase, por outro lado, foi relacionada ao aumento do C_i , do AJ e do ABA, bem como, a manutenção dos parâmetros de crescimento, e a existência de maior atividade da SOD e maiores quantidades de AJ, MeJa e Z. O aumento de C_i já foi relatado em galhas induzidas por insetos em plantas (Larson 1998) e pode estar relacionado com o acúmulo ativo de nutrientes induzidos por insetos galhadores (Bagatto e Shorthouse 1994). Na fase de galha, a defesa foi relacionada ao aumento da SOD e do MeJa, e à diminuição das AA e açúcares solúveis totais. A maior taxa de assimilação de CO_2 , maior atividade da CAT e maior conteúdo de MDA também estiveram presentes. Nesta fase, poucas galhas com poucos indivíduos conseguiram se manter no clone tolerante (Capítulo 2). Ainda assim, maiores atividades de SOD e CAT indicam a existência de estresse oxidativo provocado por essas galhas (Isaias et al. 2015). A atividade maior da CAT em clones de eucaliptos resistentes quando comparados com clones susceptíveis já foi relatada em trabalho anterior (Chang et al. 2012). A planta, por sua vez, aciona a resposta de defesa indireta através do aumento de MeJa. A diminuição das AA tanto pode ser uma resposta de defesa da planta, que pode estar deslocando os compostos destinados ao crescimento para a defesa, quanto pode estar limitando o crescimento das galhas. Sendo mais provável a última hipótese, já que, a planta tolerante passa a recuperar seu crescimento nesse período. De alguma forma, a planta também diminui o fornecimento de energia às galhas, por meio de açúcares. Enquanto a formação da galha foi relacionada com a diminuição de AJ nessa fase. Apesar do clone susceptível ainda ter apresentado maiores quantidades de AJ e Z do que o tolerante. Na fase que antecede a emergência do inseto, a defesa foi pautada no aumento da condutância e da

transpiração, e diminuição do Ci, do conteúdo de MDA e da quantidade de AA. Quantidade maior de ABA também foi relacionada à defesa nesse período. Por sua vez, a formação das galhas teve relação com o aumento da prolina, dos açúcares solúveis totais, de Z e MeJa. Sendo que, maiores quantidades de AJ, MeJa, ACC e Z também foram encontradas no genótipo susceptível neste momento. A prolina tanto pode estar relacionada com a manutenção do equilíbrio osmótico, que é modificado pelo estresse oxidativo provocado pelas galhas (Isaias et al. 2015, 2018), como pode ser uma fonte de aminoácido induzida pelo inseto para sua alimentação. As vespas podem induzir o aumento da quantidade de aminoácidos livres, tais como o que já foi relatado para outro inseto galhador (Huang et al. 2015). Apesar de nossos dados não suportarem essa explicação, eles sugerem que esse aumento esteja mais relacionado à alimentação da vespa do que a uma resposta de defesa da planta. Assim como, a indução de açúcares no clone susceptível. Outros autores também encontraram maior quantidade de açúcares solúveis totais em galhas induzidas por um mosquito galhador em *Litsea acuminata* (Huang et al. 2015). AJ e MeJa foram encontrados em grandes quantidades em todas as fases de desenvolvimento da galha no clone susceptível e, por esse motivo, devem estar relacionados aos mecanismos de supressão de defesa por parte do inseto galhador. Já Z, que também ocorreu em grandes quantidades em todas as fases estudadas no clone susceptível, deve estar relacionado ao crescimento e desenvolvimento da galha. Ao contrário de AA, que não teve diferença significativa para o clone susceptível estudado. Entretanto, já foi relatado aumento das AA em folhas com galhas de *L. invasa* em desenvolvimento, tanto em material susceptível, quanto em resistente (Oates et al. 2015, Li et al. 2017). Uma possível explicação para essas diferenças com relação à Z e AA, seria a uniformidade de fases de desenvolvimento de galhas nas mesmas plantas neste estudo, o que diminui o efeito de resposta de defesa sistêmica (VanDoorn et al. 2011) provocada pela sobreposição de diferentes fases de desenvolvimento da galha e da vespa em uma mesma planta. O aumento de ABA em plantas parasitadas por galhadores tem três explicações distintas: A primeira seria como resposta de defesa da planta ao estresse provocado pela indução do galhador (Tooker e DeMoraes 2011a, Erb et al. 2012). A segunda seria a indução pelo galhador, para benefício próprio, com o intuito de manter as galhas hidratadas para que as larvas não se desidratem (Tooker e DeMoraes 2011b). E, a terceira, como estímulo para o crescimento da galha (Tooker e Helms 2014). Neste trabalho, foi confirmado que a quantidade de ABA aumenta após a indução da vespa. Entretanto, quando a vespa está em fase de larva, não há diferença

entre os tratamentos para este hormônio. Isso demonstra que o aumento desse hormônio encontrado nesta fase de desenvolvimento da vespa em trabalho anterior (Li et al. 2017) pode ser muito mais devido a interferência de respostas sistêmicas (novas induções).

Possivelmente, para diminuir o dano causado pelas ERO, as plantas tolerantes também apresentaram maior quantidade de MDA com relação a susceptível. Porém, esse tempo de coleta deve ter sido demasiado longo para essa análise. Curiosamente, a quantidade de Pro só aumenta no clone susceptível, e, aos 44 d.a.i.. Nesse período, as galhas do clone susceptível estão em seu maior tamanho e as vespas são encontradas nas fases de larva, pré-pupa e pupa. Portanto, esse resultado tanto pode estar relacionado com uma tentativa da planta de diminuir os danos causados no potencial hídrico da folha, como com a indução pela vespa de aminoácidos livres para sua alimentação.

No Capítulo 4, demonstramos que a resposta inicial de defesa de eucalipto contra *L. invasa* é modulada pelo etileno, cujo precursor direto é o ácido aminociclopropanocarboxílico (ACC). O etileno também é responsável pela modulação da defesa de plantas contra outros herbívoros e patógenos. Porém, os resultados dessa modulação dependem da sua interação com outros hormônios, tais como AJ, AS e ABA (Broekgaarden et al. 2015). No caso da *L. invasa*, observamos anteriormente (Capítulo 3) que, aos 4 dias após a infestação, o AS tem importante papel na defesa de eucalipto contra essa vespa. Portanto, a defesa de eucalipto contra *L. invasa* se assemelha muito mais à defesa de uma planta contra um patógeno biotrófico do que contra um inseto herbívoro, que se alimenta diretamente do tecido da planta (Broekgaarden et al. 2015, Kant et al. 2015). A planta, assim como ocorre com um esporo, por exemplo, precisa se livrar rapidamente do ovo da vespa inserido em seus tecidos. Assim, é de se esperar que a morte programada das células da planta ao redor do ovo depositado, como ocorre com patógenos biotróficos pela interação de etileno e AS (Glazebrook 2005), seja a primeira resposta de defesa contra um inseto galhador. Já que os insetos galhadores, assim como os patógenos biotróficos, se utilizam das células vivas das plantas (Stone e Schönrogge 2003, Glazebrook 2005).

O AJ, por sua vez, desempenha papel na susceptibilidade à *L. invasa* do clone de eucalipto susceptível aqui estudado, como já observado anteriormente (Capítulo 3). Possivelmente, a indução positiva de AJ pode estar relacionada com o crescimento e desenvolvimento da galha, como já sugerido por outros autores (Oates et al. 2015). As altas quantidades de MeJa encontradas no genótipo susceptível parece ser produzida constitutivamente, pois em trabalho anterior, esse volátil também foi encontrado em

altas concentrações no tratamento susceptível controle. E, por outro lado, não foi encontrado nessa mesma quantidade no tratamento tolerante controle (Capítulo 3).

Interessantemente, o ABA, que também é considerado um hormônio modulador das respostas de defesa dependentes de etileno e AJ (Finkelstein et al. 2013), permaneceu em quantidades iguais entre todos os tratamentos. Esse resultado colabora com a ideia de que o AJ não aumenta como resposta de defesa da planta susceptível, mas como uma resposta de susceptibilidade. O período de um dia de infestação não foi suficiente para detectar diferenças nas quantidades de Z ou AA nas plantas infestadas. Nesse período, a vespa ainda não eclodiu do ovo, o que deve ocorrer por volta $8,33 \pm 1,35$ e $18,25 \pm 2,88$ dias após a oviposição, nos clones susceptível e tolerante, respectivamente (Capítulo 2). Entretanto, foi possível verificar novamente, que as plantas susceptíveis controle apresentam maiores quantidades de Z do que as plantas tolerantes controle. Apesar desse resultado, esses hormônios já foram relacionados com o desenvolvimento e crescimento de galhas para essa (Oates et al. 2015, Li et al. 2017, ver Capítulo 3) e outras espécies de insetos galhadores (Tooker e Helms 2014). Portanto, os resultados sugerem que o estágio de larva de *L. invasa* é que deve ser responsável pela indução e/ou produção desses hormônios relacionados ao crescimento e desenvolvimento de galhas. Pois já foi demonstrado que uma mosca (*Pontania* sp.) indutora de galha em um salgueiro arbustivo (*Salix japonica* Thunb.) sintetiza AA a partir de triptofano e, possivelmente, também é capaz de sintetizar CKs (Yamaguchi et al. 2012).

A planta precisa reconhecer corretamente o seu oponente para que a sua defesa seja efetiva contra determinado agressor. Após o reconhecimento, um conjunto de respostas de defesa é acionado para combater esse agressor. Assim, as plantas são capazes de diferenciar um inseto herbívoro e um patógeno, por exemplo (Dangl e Jones 2001, Howe e Jander 2008, Pieterse et al. 2012, Kant et al. 2015, Berens et al. 2017). Diferentemente de outros insetos herbívoros, os insetos galhadores não se alimentam diretamente dos tecidos da planta. Eles colocam seus ovos dentro dos tecidos e manipulam o hospedeiro para estimular o crescimento e desenvolvimento de um novo “órgão”, denominado de galha (Stone e Schönrogge 2003). Essa habilidade do inseto galhador é muito parecida com o que fazem os patógenos biotróficos (Glazebrook 2005). Tal qual um patógeno biotrófico, um inseto galhador precisa da planta viva para completar seu ciclo de vida. Ambos possuem a capacidade de induzir a produção de substâncias produzidas pela planta em seu próprio benefício. E permanecem vivos

dentro dos tecidos da planta. Portanto, faz sentido que as respostas de defesa das plantas a um inseto galhador, sejam muito semelhantes àquelas utilizadas contra patógenos biotróficos.

Referências

- Bagatto, G., Shorthouse, J.D., 1994. Seasonal acquisition of mineral nutrients by a chalcid gall on lowbush blueberry. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 73, 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01839.x>
- Berens, M.L., Berry, H.M., Mine, A., Argueso, C.T., Tsuda, K., 2017. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* 55, 401–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035544>
- Broekgaarden, C., Caarls, L., Vos, I.A., Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., 2015. Ethylene: traffic controller on hormonal crossroads to defense. *Plant Physiology* pp.01020.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01020>
- Chang, R.L., Arnold, R.J., Zhou, X.D., 2012. Association between enzyme activity levels in Eucalyptus clones and their susceptibility to the gall wasp, *Leptocybe invasa*, in South China. *Journal of Tropical Forest Science* 24, 256–264.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- Erb, M., Meldau, S., Howe, G.A., 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science* 17, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.003>
- Finkelstein, R., 2013. Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book* 11, e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Howe, G.A., Jander, G., 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59, 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>
- Huang, M.-Y., Huang, W.-D., Chou, H.-M., Chen, C.-C., Chen, P.-J., Chang, Y.-T., Yang, C.-M., 2015. Structural, biochemical, and physiological characterization of photosynthesis in leaf-derived cup-shaped galls on *Litsea acuminata*. *BMC Plant Biology* 15, 61. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0446-0>
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Moreira, A.S.F.P., Soares, G.L.G., Carneiro, R.G.S., 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850, 1509–1517. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>
- Isaias, R.M. dos S., Ferreira, B.G., Alvarenga, D.R. de, Barbosa, L.R., Salminen, J.-P.,

- Steinbauer, M.J., 2018. Functional compartmentalisation of nutrients and phenolics in the tissues of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae): Nutrients and phenolics in *Leptocybe invasa* galls. *Austral Entomology* 57, 238–246. <https://doi.org/10.1111/aen.12336>
- Kant, M.R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B.C.J., Villarreal, C.A., Ataíde, L.M.S., Dermauw, W., Glas, J.J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R.C., Sabelis, M.W., Alba, J.M., 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>
- Larson, K.C., 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia* 115, 161–166. <https://doi.org/10.1007/s004420050503>
- Li, X.Q., Liu, Y.Z., Guo, W.F., Solanki, M.K., Yang, Z.D., Xiang, Y., Ma, Z.C., Wen, Y.G., 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>
- Oates, C.N., Külheim, C., Myburg, A.A., Slippers, B., Naidoo, S., 2015. The Transcriptome and Terpene Profile of *Eucalyptus grandis* Reveals Mechanisms of Defense Against the Insect Pest, *Leptocybe invasa*. *Plant and Cell Physiology* 56, 1418–1428. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv064>
- Ollerstam O., Larsson S., 2003. Salicylic acid mediates resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. *Journal of Chemical Ecology* 29: 163-174.
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.M., 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>
- Stone, G.N., Schönrogge, K., 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 512–522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K., 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Tooker, J.F., De Moraes, C.M., 2011a. Feeding by a gall-inducing caterpillar species alters levels of indole-3-acetic and abscisic acid in *Solidago altissima* (Asteraceae) stems. *Arthropod-Plant Interactions* 5, 115–124. <https://doi.org/10.1007/s11829-010-9120-5>
- Tooker, J.F., De Moraes, C.M., 2011b. Feeding by Hessian Fly (*Mayetiola destructor* [Say]) Larvae on Wheat Increases Levels of Fatty Acids and Indole-3-Acetic Acid but not Hormones Involved in Plant-Defense Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 30, 158–165. <https://doi.org/10.1007/s00344-010-9177-5>
- Tooker, J.F., Hanks, L.M., 2006. Tritrophic Interactions and Reproductive Fitness of the

- Prairie Perennial *Silphium laciniatum* Gillette (Asteraceae). *Environmental Entomology* 35, 537–545. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-35.2.537>
- Tooker, J.F., Helms, A.M., 2014. Phytohormone Dynamics Associated with Gall Insects, and their Potential Role in the Evolution of the Gall-Inducing Habit. *Journal of Chemical Ecology* 40, 742–753. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0457-6>
- VanDoorn, A., Bonaventure, G., Schmidt, D.D., Baldwin, I.T., 2011. Regulation of jasmonate metabolism and activation of systemic signaling in *Solanum nigrum*: COI1 and JAR4 play overlapping yet distinct roles. *New Phytologist* 190, 640–652. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03622.x>
- Xi, X., Li, D., Peng, Y., Eisenhauer, N., Sun, S., 2016. Experimental warming and precipitation interactively modulate the mortality rate and timing of spring emergence of a gallmaking Tephritid fly. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep32284>
- Yamaguchi, H., Tanaka, H., Hasegawa, M., Tokuda, M., Asami, T., Suzuki, Y., 2012. Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytologist* 196, 586–595. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04264.x>
- Yukawa, J., 2000. Synchronization of gallers with host plant phenology. *Population Ecology* 42, 105–113. <https://doi.org/10.1007/PL00011989>
- Zebelo, S.A., Maffei, M.E., 2015. Role of early signalling events in plant-insect interactions. *Journal of Experimental Botany* 66, 435–448. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru480>