

Fernanda Evangelista de Almeida

**INTEGRAÇÃO ENTRE A MORFOLOGIA FOLIAR E
MARCADORES MOLECULARES NA DETERMINAÇÃO DA
RESISTÊNCIA A *Leptocybe invasa* EM *Eucalyptus***

São Cristóvão-SE
Outubro-2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS APLICADAS – CCAA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA – DEA

**INTEGRAÇÃO ENTRE A MORFOLOGIA FOLIAR E MARCADORES
MOLECULARES NA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A *Leptocybe* invasora
EM *Eucalyptus***

**Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia Agrônômica – Universidade
Federal de Sergipe, como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheira Agrônoma.**

APROVADO em: 10 de outubro de 2023

ORIENTADO: Fernanda Evangelista de Almeida

**Prof. Dra. Renata Silva-Mann
(Orientadora)**

**Dra. Crislaine Costa Calazans
(Co-Orientadora)**

**Dra. Valdinete Vieira Nunes
(Banca examinadora)**

**Ma. Natali Aparecida Santana
(Banca examinadora)**

Dedico este trabalho à minha família. Aos meus pais Iolanda, Wilson e Rodrigo. As minhas avós Cleusa e Aparecida. Aos meus irmãos Lucas e Vinícius. Aos meus sobrinhos Gabriela, Vinicius e Sofia.

Agradecimentos

Gostaria de dedicar este trabalho especialmente à minha família, que sempre foi meu porto seguro, e que mesmo distante, me enviaram todo o suporte e boas energias necessárias, sempre me incentivando e acreditando em mim, mesmo quando eu não fazia o mesmo. Agradeço a todos os que continuam ao meu lado, assim como aqueles que infelizmente se foram e não conseguiram me acompanhar até o fim dessa jornada. Cada um de vocês tem um lugar especial em meu coração e sou grata pelo amor e apoio incondicional que sempre recebi.

À Universidade Federal de Sergipe, pela oportunidade de realizar o curso.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos os professores que me moldaram nessa jornada, em especial o corpo docente do DEA, que contribuíram para a minha formação acadêmica ao longo da graduação. Pela dedicação, disposição e ensinamentos, o meu reconhecido e carinhoso agradecimento. A dedicação e entusiasmo pelo ensino inspiraram-me a perseguir meus sonhos e sou grata por ter tido a oportunidade de aprender com vocês. Espero aplicar de forma responsável esses ensinamentos em minha jornada profissional e retribuir a dedicação e carinho que recebi. Em especial agradeço à professora Renata Silva Mann, pela orientação, por ter me acolhido, pela confiança, paciência e compreensão, apoio, sempre criando um ambiente confortável e pronta a ajudar. Sua dedicação e comprometimento com o ensino foram fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Sou grata por ter tido a oportunidade de aprender com você.

A minha co-orientadora, Crislaine Costa Calazans, nada do que eu disser será capaz de expressar o quão profundamente grata sou a você. Sua energia animada e seu amor por aprender e ensinar são contagiantes e inspiradores. Agradeço imensamente pela paciência, dedicação e disposição durante todo este período. Seus ensinamentos foram fundamentais para minha evolução pessoal e profissional. Além disso, sou grata pela sua amizade e por cada palavra de incentivo e conforto que me direcionou. Fico extremamente grata por ter tido a oportunidade de aprender tanto com você. Muito obrigada por tudo.

A toda equipe do GENAPLANT, que sempre foram muito receptivos e deram suporte sempre que precisei. Fazer parte dessa equipe foi fundamental para o sucesso desse processo e sou grata por ter conhecido cada um de vocês e por tudo que aprendi. Em especial, gostaria de agradecer à Suzana, que foi uma grande amiga e suporte em todo esse processo, seu companheirismo e apoio foram essenciais para eu chegar até aqui.

Agradeço aos amigos de longa data e também as amigas que conquistei durante a

graduação. Sou grata por ter vocês ao meu lado.

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, direta ou indireta, me ajudaram nessa trajetória. Seja com uma palavra de incentivo, um gesto de apoio, ou uma ajuda prática, cada contribuição foi valiosa para o meu crescimento pessoal e profissional. Mais uma vez, muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 <i>Eucalyptus</i>	9
2.2 <i>Leptocybe invasa</i> Fisher & La Salle 2004: bioecologia e danos em plantações de eucaliptos	9
2.3 Manejo integrado de pragas	11
2.4 Genótipos resistentes.....	13
2.5 Marcadores moleculares ISSR	14
2.6 Fenotipagem	15
2.7 Fenotipagem	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Material Vegetal.....	18
3.2 Genotipagem	20
3.2.1 Isolamento de DNA	20
3.2.2 Quantificação do DNA genômico.....	20
3.2.3 Amplificação de DNA	20
3.2.4 Análise de dados	21
3.3 Fenotipagem	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Genotipagem	24
4.1.1 Quantificação do DNA genômico.....	24
4.1.2 Similaridade genética.....	24
4.2. Fenotipagem	27
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Folhas de <i>Eucalyptus</i> spp. (vista abaxial). Os genótipos A (1404), B (1249), C (1250), D (0321) e E (5341) são resistentes a <i>Leptocybe invasa</i> (Fig. A-E). Os genótipos F (1277), G (1262) e H (1275) são suscetíveis a <i>Leptocybe invasa</i>	19
FIGURA 2. Padrões de bandas entre genótipos do Grupo <i>Eucalyptus</i> em resposta a <i>Leptocybe invasa</i> com base em dados cumulativos derivados da análise de ISSR: Suscetíveis e Resistentes	25
FIGURA 3. Dendrograma baseado na distância genética de jaccard, usando o programa <i>Genalex</i> , mostrando o agrupamento e distância das oito genótipos referentes à espécie <i>Eucalyptus</i> a partir dos dados gerados pelos sete marcadores microssatélites.....	26
FIGURA 4. Imagens capturadas pelo GroundEye® de um genótipo suscetível à <i>Leptocybe invasa</i> (Genótipo A) e um genótipo resistente (Genótipo B): imagem do verso da folha, imagem representando a textura e imagem representando a geometria....	27
FIGURA 5. Genótipos de <i>Eucalyptus</i> spp. apresentando respostas diversas ao ataque de <i>Leptocybe invasa</i> . A: Folha nova livre de galhas em um genótipo resistente. B: Galhas em uma folha nova de um genótipo suscetível. C: Galhas em ramos de um genótipo suscetível. D: Ramo de um genótipo resistente. E: Ramo de um genótipo suscetível	29
FIGURA 6. Biplot obtido pela combinação linear de variáveis relacionadas às variáveis fenotípicas de genótipos suscetíveis e resistentes de <i>Eucalyptus</i> spp.	33
FIGURA 7. Correlação entre as variáveis fenotípicas dos genótipos suscetíveis e resistentes de <i>Eucalyptus</i> spp.	30
FIGURA 8. Dendrograma empregando com base nas distâncias de Mahalanobis genótipos de <i>Eucalyptus</i> spp.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Classificação dos genótipos de <i>Eucalyptus</i> spp. com base em sua resposta à infestação por <i>Leptocybe invasa</i> classificados da seguinte forma: resistente; baixa suscetibilidade; média suscetibilidade e suscetibilidade muito alta.....	18
TABELA 2. Sequências de primers ISSR e temperatura de anelamento (Ta).....	21
TABELA 3. Análise de pureza do DNA de 8 genótipos de <i>Eucalyptus</i> spp.....	24

RESUMO

A presença da vespa-da-galha (*Leptocybe invasa* Fisher & La Salle, 2004; Hymenoptera: Eulophidae) no eucalipto é um grande desafio para a indústria florestal brasileira, causando perdas econômicas significativas. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar a relação genética e fenotípica em genótipos de *Eucalyptus* visando resistência à vespa-da-galha, utilizando marcadores ISSR e análise de imagem baseada nos danos causados pela vespa-da-galha. A diferenciação dos genótipos em resposta a vespa-da-galha foi realizada por meio de marcadores ISSR. Foram coletadas amostras de folhas jovens de um conjunto de 80 mudas de eucalipto, das quais 50 foram identificadas como resistentes e 30 como suscetíveis à infestação pela vespa-da-galha. Para identificar genótipos resistentes e suscetíveis com base nos danos provocados pela vespa-da-galha, utilizou-se o equipamento GroundEye® para capturar imagens de 60 folhas de seis genótipos, sendo três resistentes e dois suscetíveis e posterior análise de imagem. Os marcadores ISSR geraram fragmentos em quantidade adequada para distinguir os genótipos resistentes daqueles suscetíveis. A análise fenotípica demonstrou ser eficaz na distinção entre os genótipos suscetíveis e resistentes à vespa-da-galha. Os caracteres qualitativos e quantitativos mostraram diversidade entre os genótipos e poderão servir como base em estudos genéticos futuros de espécies eucalipto. Esses resultados contribuem para o manejo da vespa-da-galha em eucalipto e ressaltam a importância da abordagem integrativa da genotipagem e fenotipagem.

Palavras-chave: Análise de imagens, resistência, vespa-da-galha, ISSR.

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto é uma árvore de grande porte, nativa da Austrália, e amplamente cultivada em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, devido à sua alta produtividade, crescimento rápido e valor comercial, sendo um dos gêneros de maior importância na silvicultura (Ruber, 2018; Santarosa; Penteado Junior; Goular, 2014).

Devido sua facilidade em se adaptar a diferentes condições climáticas, o eucalipto pode ser plantado em todas as regiões do Brasil, se tornando o gênero mais predominante em projetos de reflorestamento no país (Ruber, 2018). Com a introdução da monocultura do eucalipto no país, um grande desafio para sua produção vem sendo as grandes perdas ocasionadas pelo ataque de insetos-praga, como é o caso da vespa-da-galha, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), que é considerada uma das pragas mais ameaçadoras para o eucalipto, causando danos severos nos plantios em todo o mundo (Silva *et al.*, 2014).

Visando reduzir o impacto causado pelo ataque desses insetos-praga diversas alternativas vêm sendo adotadas para o seu controle, sendo o uso de inseticidas uma delas (Corrêa; Salgado, 2011). Outra alternativa é o controle biológico, através da utilização de inimigos naturais da vespa-da-galha, visando controlar sua população (Huang *et al.*, 2018).

Além disso, práticas culturais, como a remoção de galhas e ramos infestados, também podem ser medidas eficazes para o controle da vespa-da-galha em plantações de eucalipto (Almeida *et al.*, 2013).

Estudos tem demonstrado que alguns genótipos de eucalipto são resistentes à vespa-da-galha como o *E. Tereticornis*, *E. Camaldulensis* e *E. pellita* (Yang *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2019). Desse modo, a resistência à praga é uma característica importante para a sobrevivência e produtividade de plantações de eucalipto.

A caracterização fenotípica aliada à análise molecular de genótipos de eucalipto resistentes à vespa-da-galha é uma estratégia importante para a identificação de características associadas à resistência, seleção de genótipos mais resistentes e desenvolvimento de marcadores moleculares para seleção assistida. Além disso, a caracterização molecular pode contribuir para a identificação de genes e vias metabólicas envolvidas na resistência aos insetos-praga, possibilitando o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes e sustentáveis (Dittrich-Schröder *et al.*, 2020).

A resistência aos insetos-praga é essencial para a produtividade e sobrevivência das

plantações de eucalipto, sendo necessária a seleção de genótipos resistentes, o controle biológico e o uso racional de inseticidas para garantir a saúde das plantas e o sucesso da produção (Silva *et al.*, 2021).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar a relação genética e fenotípica em genótipos de *Eucalyptus* visando resistência à vespa-da-galha *L. invasa* Fisher & La Salle, 2004 (Hymenoptera: Eulophidae), utilizando marcadores ISSR e análise de imagem baseada nos danos causados pela vespa-da-galha.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Eucalyptus*

O eucalipto é uma árvore perene de grande porte pertencente à família Myrtaceae e faz parte do gênero *Eucalyptus*, com mais de 600 denominações, incluindo espécies, variedades e híbridos (Silva, 2005). Embora seja originário da Austrália e Indonésia, o eucalipto é amplamente empregado em plantios florestais em todo o mundo devido à sua rápida taxa de crescimento e às diversas aplicações comerciais que oferece. Segundo Mora e Arriagada (2016), a espécie é cultivada em mais de vinte milhões de hectares em regiões tropicais e temperadas do mundo.

Além da produção de madeira, celulose e fonte de bioenergia, o cultivo do eucalipto surge como uma alternativa real para preservar a natureza, ajudando a reduzir o desmatamento de florestas nativas, melhorando a qualidade do solo, reduzindo a erosão e mitigando as mudanças climáticas e aumentando a produção de biomassa (Zheng *et al.*, 2014).

A indústria florestal de eucalipto é um setor estratégico para atender à demanda global por madeira, celulose e recursos energéticos renováveis. Essa demanda vem crescendo devido a fatores como o aumento do consumo de madeira em países como Índia, o Brasil e a China, o crescimento populacional, a exploração madeireira ilegal e a conversão de terras para agricultura (Calazans *et al.*, 2021). As potencialidades do eucalipto como fornecedor de matéria-prima de alta qualidade para diversas aplicações industriais estão bem estabelecidas, com os requisitos de qualidade da madeira necessários para tais usos amplamente definidos. As perspectivas de uma utilização intensiva da madeira de eucalipto são altamente promissoras, sustentadas pelo conhecimento acumulado em silvicultura e manejo de várias espécies do gênero, bem como pela sua maleabilidade e as respostas positivas ao melhoramento genético, tornando-o adequado para uma ampla gama de aplicações (Silva, 2005).

O aumento recente de pragas invasoras tem sido um desafio para a produtividade das plantações de eucalipto, principalmente em se tratando de vespas que formam galhas, como é o caso da vespa-da-galha, uma das pragas de insetos mais ameaçadoras em espécies não nativas de eucalipto utilizadas em plantações em todo o mundo (Dittrich-Schröder *et al.*, 2020).

2.2 *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle 2004: bioecologia e danos em plantações de eucaliptos

A ordem Hymenoptera, que inclui abelhas, vespas e formigas, é conhecida por sua diversidade em características reprodutivas, que podem afetar a capacidade de estabelecimento

desses insetos. No entanto, essa ordem também possui muitas espécies invasoras que podem causar danos ambientais e econômicos substanciais, preocupando agentes reguladores em diversos países (Queffelec *et al.*, 2021).

A vespa-da-galha é uma espécie invasora originária da Austrália, pertencente à família Eulophidae e considerada uma praga potencial para o eucalipto em todo o mundo. Com um comprimento de cerca de 1,1 a 1,4 mm, foi descoberta pela primeira vez no Oriente Médio em 2000 (Wilcken *et al.*, 2011) e posteriormente encontrada no Brasil em 2008, em diversas espécies e clones de Eucalipto, causando perdas significativas em todo o país (Costa *et al.*, 2008). Embora o gênero *Eucalyptus* tenha sido introduzido no Brasil no início do século XIX, a maior diversidade de espécies invasoras associadas ao eucalipto está concentrada na Europa, América do Norte e África (Hurley *et al.*, 2016).

A formação de galhas em folhas de eucalipto devido ao ataque da vespa-da-galha causa deformação de brotos terminais e folhas, resultando em abscisão mais rápida de folhas e ressecamento de brotos (Mendel *et al.*, 2004; Quang Thu; Dell; Burgess, 2009). No interior das galhas formadas pela vespa, são criadas câmaras individuais ou coletivas que fornecem nutrição e proteção aos seus indutores, além de protegê-los de flutuações microclimáticas e inimigos naturais (Stone *et al.*, 2002). No entanto, o desenvolvimento das larvas no interior das galhas gera hiperplasia nos tecidos da planta, causando interrupção do fluxo normal da seiva e prejudicando o crescimento e desenvolvimento da mesma (Doğanlar, 2005; Shorthouse; Wool; Raman, 2005).

O ataque dessas vespas afeta significativamente as plantações de eucalipto, causando grandes prejuízos econômicos. Segundo Lemes *et al.* (2017), os danos econômicos do ataque de vespa-da-galha em eucalipto podem variar de acordo com a intensidade do ataque e a espécie plantada. As mudas de viveiro e as plantações jovens são mais suscetíveis ao ataque da vespa. Em árvores com mais de dois anos de idade, o impacto é menor (Thu; Dell; Burgess, 2009). No entanto, é importante realizar o rastreamento de uma ampla variedade de espécies, clones e híbridos de eucalipto para avaliar sua resistência ou tolerância à vespa-da-galha, pois sem novos materiais, a indústria de plantação de eucalipto corre o risco de ter suas plantações inviáveis devido aos sérios danos causados pelo ataque da vespa (Thu; Dell; Burgess, 2009). Além dos danos diretos à produção de madeira, o ataque de vespa-da-galha em eucalipto também pode causar prejuízos indiretos, como o aumento nos custos de produção com a aplicação de defensivos agrícolas e o tempo gasto com o manejo da praga (Lemes *et al.*, 2017).

A ameaça representada pela vespa-da-galha destaca a importância do monitoramento de pragas invasoras e da busca por genótipos resistentes ou tolerantes em plantações de eucalipto. Dessa forma, o conhecimento sobre a distribuição e diversidade das vespas invasoras já existentes é imprescindível, assim como compreender os desafios relacionados às novas introduções, para adotar medidas efetivas e enfrentar essas ameaças (Dittrich-Schröder *et al.*, 2020).

A ação herbívora dos insetos desencadeia um complexo conjunto interativo de respostas moleculares e fisiológicas nas plantas de acordo com o tipo de dano causado pela alimentação dos insetos e os mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas, ao sofrerem um dano (Nabity; Zavala; Delucia, 2009). Dessa forma, compreender os mecanismos de resistência, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes contra esses insetos-praga (Calazans *et al.*, 2023).

2.3 Manejo integrado de pragas

As pragas representam uma ameaça significativa para a agricultura e a produção florestal, causando perdas substanciais na produtividade e qualidade dos produtos. A resistência de plantas a insetos-praga desempenha um papel fundamental na agricultura e na produção florestal, refletindo uma longa história de evolução compartilhada entre plantas e insetos herbívoros. A coevolução entre esses grupos resultou na notável capacidade das plantas em desenvolver mecanismos adaptativos e de defesa contra pragas, impulsionando a diversificação adaptativa de ambos (Ehrlich; Raven, 1964; Fürstenberg-Hägg; Zagrobelny; Bak, 2013).

O ataque de insetos, ou mesmo a percepção do ataque, desencadeia uma série complexa de respostas moleculares e fisiológicas relacionadas à defesa, ao mesmo tempo em que reduz a expressão de genes relacionados à fotossíntese, afetando a capacidade fotossintética e reduzindo seu rendimento e produtividade (Kessler; Baldwin, 2002; Nabity; Zavala; Delucia, 2009). Estudos ecofisiológicos contribuem para a compreensão sobre como as plantas respondem às alterações ambientais, incluindo o estresse provocado pela presença de insetos (Bale *et al.*, 2002).

Embora o controle desses agentes geralmente seja realizado através do uso de pesticidas, sua aplicação indiscriminada levanta preocupações ambientais econômicas, destacando a necessidade de adotar abordagens mais sustentáveis, como o manejo integrado de pragas (MIP), que engloba uma variedade de métodos de controle, incluindo o controle

biológico e práticas culturais, com o objetivo de promover a gestão sustentável das pragas (Calazans *et al.*, 2023). Dessa forma, o MIP tem como objetivo complementar, reduzir ou substituir o uso de pesticidas sintéticos, promovendo uma gestão coordenada e integrada de diferentes estratégias de controle (Pretty; Bharucha, 2015). Isso inclui o monitoramento regular de pragas e seus inimigos naturais, a definição de níveis de controle para orientar as decisões e uma ampla gama de abordagens que vão desde a gestão e substituição de produtos pesticidas até a reestruturação do agroecossistema (Morandi; Bettiol, 2009; Pretty; Bharucha, 2015), por meio da implantação de uma variedade de métodos de controle de pragas como, plantas resistentes, inseticidas seletivos aos inimigos naturais, medidas culturais, uso de parasitoides, predadores e patógenos (Libera, 2022).

Os pesticidas desempenham um papel fundamental no controle de insetos-praga, contribuindo significativamente para o aumento da produção de alimentos (Almeida *et al.*, 2017). Entretanto, seu uso indiscriminado pode causar danos ao meio ambiente e à saúde humana, através da contaminação de alimentos, água e produtos agrícolas, além de contribuir para o surgimento de resistência nos insetos (Lemes; Zanuncio, 2021; Sosa-Gómez; Silva, 2010; Chawla *et al.*, 2018; Loges *et al.*, 2004; Morandi; Bettiol, 2009). Dessa forma, é essencial buscar alternativas eficazes para o controle de insetos-praga (Loges *et al.*, 2004; Morandi; Bettiol, 2009).

Uma forma de controle mais sustentável é uso de parasitoides, como por exemplo, o *Aprostocetus causalis*, o *Quadrastichus mendeli*, o *Selitrichodes kryceri* e o *Selitrichodes neneri* (Calazans *et al.*, 2023). Além disso, outra forma de controle é através da seleção de genótipos resistentes a insetos, feita por meio de técnicas moleculares, como a análise de marcadores genéticos associados à resistência (Carneiro *et al.*, 2009). Isso permite a identificação de genes envolvidos na resistência, bem como a seleção de genótipos mais resistentes (Recchia, 2011). A caracterização fenotípica também pode ajudar a identificar características específicas das plantas resistentes, pela análise de danos causados na planta por meio da análise digital de imagens (Mutka; Bart, 2015)

A seleção de genótipos resistentes de eucalipto é uma estratégia importante para o controle da vespa-da-galha. Estudos têm mostrado que existem diferenças genéticas entre os genótipos de eucalipto em relação à resistência à praga (Spínola Filho, 2023). A identificação de genótipos resistentes pode levar à seleção de plantas com maior potencial de sobrevivência, podendo ser utilizada como ferramenta de seleção de plantas mais resistentes em programas de melhoramento genético. A seleção de genótipos resistentes ou menos suscetíveis tem o potencial de reduzir os danos causados pelo inseto galhador em eucalipto, uma vez que há variação na resistência entre espécies, procedências, genótipos e/ou variedades clonais (Zhang

et al., 2018).

2.4 Genótipos resistentes

No Brasil, a produtividade e qualidade da madeira dos plantios de Eucalipto experimentaram um notável aumento, graças à criação de híbridos interespecíficos dentro deste gênero, seguida da clonagem dos exemplares mais destacados das progênes resultantes desse processo.

No desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético, os cruzamentos controlados desempenham um papel crucial no incremento das características produtivas de espécies florestais (Carvalho Junior *et al.*, 2023). A propagação vegetativa tem se transformado em uma ferramenta crucial para aprimorar a competitividade das indústrias da área florestal, atingindo seu máximo potencial quando combinada com programas de melhoramento genético. Isso resulta na criação de florestas clonais com híbridos que apresentam maior produtividade e qualidade superior da madeira (Borges *et al.*, 2011).

Na produção comercial de híbridos, é crucial garantir a viabilidade econômica, fazendo com que a forma de reprodução da espécie desempenhe um papel fundamental, tornando a exploração da heterose viável apenas em algumas espécies (Borges, 2022). Os híbridos sintéticos, cultivados em testes de progênes e/ou parcelas de avaliação para seleção e clonagem, geram notáveis ganhos genéticos atribuídos aos efeitos da heterose e/ou à combinação vantajosa de características (Resende; Alves, 2021).

A obtenção de ganhos genéticos no melhoramento de espécies de Eucalipto é alcançada de maneira mais rápida e eficaz por meio da hibridação interespecífica (Assis, 2015).

A resistência a insetos é uma característica importante para a produção de eucalipto, e a seleção de genótipos resistentes pode ser uma estratégia eficaz para o manejo de pragas. Existem diferenças significativas na resistência a insetos entre diferentes espécies e híbridos de eucalipto (Rosado *et al.*, 2014), por exemplo, algumas espécies, como *Eucalyptus grandis*, são altamente suscetíveis a insetos, enquanto outras, como *Eucalyptus tereticornis*, são mais resistentes. O uso de marcadores moleculares ISSR e a caracterização fenotípica de folhas podem ser ferramentas importantes na identificação de genótipos resistentes à vespa-da-galha (Bellon, 2014; Lima *et al.*, 2015). Através da análise de características fenotípicas das folhas e da identificação de marcadores moleculares específicos, é possível identificar os genótipos que apresentam maior resistência à praga. A utilização de genótipos resistentes pode ser uma

alternativa promissora e sustentável para o controle desta praga em plantios de eucalipto.

2.5 Marcadores moleculares ISSR

A importância de conservar ou melhorar a qualidade do ambiente de cultivo, considerando as limitações ao crescimento das áreas agrícolas, associadas à busca por uma melhor qualidade de vida nas áreas rurais e urbanas, torna essencial a melhoria dos procedimentos associados à produção de plantas, que pode ser realizado por meio da utilização de tecnologias relevantes (Dantas, 2019). Uma maneira extremamente eficaz para identificação da variabilidade genética envolve a utilização de marcadores moleculares (Caixeta *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, vários marcadores moleculares têm sido utilizados para análises genéticas em plantas, permitindo a análise genética de características fenotípicas por meio de abordagens baseadas em DNA (Cappa *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Marcadores de DNA ligados a características agrônômicas importantes são valiosos para programas de melhoramento de culturas, permitindo aos melhoristas selecionar plantas com características desejáveis de maneira mais rápida e precisa, acelerando assim o processo de melhoramento genético (Reddy; Sarla; Siddiq, 2002).

A identificação de marcadores pode fornecer informações valiosas sobre o controle genético da resistência aos insetos nas espécies vegetais, já que há pouco conhecimento acerca dos *loci* genômicos relacionados à resposta das plantas às vespas da galha (Zhang *et al.*, 2018). Marcadores ISSR têm sido empregados para criar marcadores específicos de espécies, genes e características (Reddy; Sarla; Siddiq, 2002).

Os marcadores moleculares têm potencial para serem utilizados em estudos de diversidade genética, taxonomia e mapeamento gênico, além de auxiliarem no melhoramento de Eucalipto por meio de seleção assistida (Acuña, 2011). No entanto, os marcadores genéticos funcionais ainda são escassos em espécies florestais (Acuña, 2011).

A seleção assistida por marcadores (SAM), por exemplo, é uma abordagem que utiliza variações no DNA para rastrear e monitorar regiões específicas dos genomas durante o processo de melhoramento de plantas (Moose; Mumm, 2008). Isso se torna especialmente relevante quando se busca características complexas, como resistência a doenças e pragas (Furber; Tester, 2011).

A técnica *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR)-PCR é uma abordagem simples e

rápida que utiliza sequências de microssatélites como primers em uma reação em cadeia da polimerase, gerando marcadores multilocus altamente polimórficos. Os marcadores ISSR são úteis em estudos de diversidade genética, filogenia, marcação genética, mapeamento do genoma e biologia evolutiva, oferecendo uma visão geral detalhada da técnica e sua aplicação em genética e melhoramento de plantas em uma ampla gama de espécies cultivadas.

Uma das limitações do uso de marcadores ISSR é que eles se comportam como os alelos dominantes e heterozigotos, o que impossibilita a diferenciação entre indivíduos homozigotos e heterozigotos sem uma análise mais detalhada (Chen *et al.*, 1998).

A genotipagem é essencial para o planejamento de estratégias de melhoramento, fornecendo uma base científica para melhorar o manejo dos recursos genéticos em espécies de árvores florestais (Poltri *et al.*, 2003), sobretudo, pode contribuir para discriminar genótipos e identificar aqueles de interesse para serem utilizados em programas de melhoramento.

A genotipagem tem demandado consideráveis esforços na busca pela compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência de plantas ao ataque de insetos-praga. Contudo, a fenotipagem ainda enfrenta desafios nesse contexto. Essa etapa é de extrema importância para aumentar a eficiência na seleção nos programas de melhoramento.

As técnicas de melhoramento genético passaram por transformações significativas, com uma gama de tecnologias aprimorando a eficiência e os resultados nos programas de melhoramento de plantas. Porém, estas inovações ainda não foram amplamente adotadas (Tester; Langridge, 2010). Para melhorar a eficiência do melhoramento de plantas, a utilização de tecnologias fenotípicas confiáveis, automatizadas e de alto desempenho, tem sido empregadas na seleção genótipos de interesse (Zhao *et al.*, 2019).

2.6 Fenotipagem

O melhoramento de plantas tem uma longa história de integração das mais recentes inovações em biologia e genética para auxiliar o melhoramento das culturas (Moose; Mumm, 2008). Nos últimos anos, as tecnologias estão aprimorando a precisão e a velocidade das mensurações fenotípicas para uma melhor caracterização e compreensão das funções biológicas dos organismos em resposta às diversas condições ambientais (Santos; Yassitepe, 2014; Dhondt; Wuyts; Inzé, 2013). Com a crescente necessidade de enfrentar os desafios da agricultura global, como a produção de culturas de alto rendimento em climas em constante mudança, a fenotipagem de alto rendimento tornou-se uma abordagem promissora no melhoramento genético (Furbank; Tester, 2011).

Originada da palavra fenótipo, a fenotipagem consiste em avaliar e quantificar valores qualitativos ou quantitativos das características em estudo e relacioná-las ao desempenho de um genótipo em determinado ambiente (Dhondt; Wuyts; Inzé, 2013). Dessa forma, a fenotipagem de plantas desempenha um papel crucial na pesquisa agrícola e no melhoramento genético de culturas.

A fenotipagem das plantas visa coletar dados fenotípicos em grande escala em vários níveis de organização, compreendendo as relações entre genótipos, fatores ambientais e fenótipos (Houle; Govindaraju; Omholt, 2010). Esta abordagem se tornou viável devido aos avanços em tecnologias de fenotipagem de alto rendimento, que permitem a análise de grandes quantidades de dados de forma rápida e eficiente (Furbank; Tester, 2011).

À medida que a biologia se torna mais sistêmica, a importância da fenotipagem cresce, tornando essencial a criação de conjuntos de dados genéticos consistentes e acessíveis (Lu *et al.*, 2008). O estudo fenotípico sistêmico é decisivo para entender a função de milhares de genes anotados como desconhecidos, abrindo caminho para avanços na pesquisa agrícola e no melhoramento genético de plantas (Lu *et al.*, 2008). Portanto, a fenotipagem de plantas e as tecnologias associadas desempenham um papel vital na busca por culturas mais resistentes, produtivas e adaptadas ao cenário agrícola em constante evolução. Uma compreensão mais completa da conexão entre o genótipo e o fenótipo em plantas melhoraria a capacidade de converter o conhecimento das variantes genômicas em fenótipos de resistência desejados (Mutka; Bart, 2015).

A utilização de métodos de fenotipagem baseados em imagens tem o potencial de ampliar significativamente a capacidade de caracterizar os fenótipos dos ataques de plantas. Através da análise de imagem é possível identificar padrões espaciais de heterogeneidade, o que facilita a visualização de respostas localizadas, que podem ser difíceis de identificar utilizando outros métodos (Mutka; Bart, 2015).

O GroundEye®, desenvolvido pela empresa Tbit Tecnologia e Sistemas, é um equipamento composto por um sistema que inclui uma câmera para captura de imagens e um programa de análise. O equipamento é montado em uma esteira azul, na qual o objeto de análise é posicionado. Para a captura de imagens, é utilizada uma câmera fotográfica de alta resolução, e a análise das imagens aliado ao programa GE é realizada em tempo real, se destacando pelo seu potencial na avaliação da qualidade física e fisiológica de folhas (Ávila, 2017; Silva, 2022). Esse processo é realizado por meio da análise de imagens de alta resolução, permitindo a extração de informações consistentes relacionadas à cor, textura e

geometria das folhas.

Antes de iniciar a análise, é essencial que o usuário do equipamento estabeleça um padrão de segmentação de imagem. Esse procedimento desempenha um papel crucial no processamento de imagens, pois permite a distinção entre os objetos de interesse e o plano de fundo da imagem (Gonzalez; Woods, 2010). No caso do GroundEye®, esse processo é realizado por meio da calibração com base na diferença de cor, e o programa oferece três opções de modelos de cor: HSV, YCbCr e Cielab (Pinto *et al.*, 2019).

Os descritores de textura referem-se às características da superfície da folha, como contraste, dissimilaridade e homogeneidade (Santos, 2005). Dessa forma, os descritores de textura são parâmetros matemáticos que possibilitam a extração de informações sobre a aparência de uma superfície a partir de uma imagem digital. Os descritores de textura desempenham um papel importante na análise de imagens das folhas (Prado, 2018). Eles permitiram a quantificação objetiva das características visuais da superfície, sendo útil na detecção objetiva dos danos causados pelas vespas com base na análise das imagens. Além disso, esses descritores tornam possível a automação de processos de análise de imagem, economizando tempo e melhorando a precisão das análises realizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Para realização do experimento, foram utilizadas 150 mudas de eucalipto cedidas pela empresa Bracell Ltda/Copener Florestal. Após aproximadamente 12 meses, oitenta mudas foram transplantadas para recipientes de 20 L preenchidos com mistura de substrato de areia, pó de coco e esterco de cabra (3:1:1). Desse grupo foram coletadas amostras de folhas jovens para realização das análises de genotipagem e fenotipagem, sendo classificadas como resistentes e suscetíveis à vespa-da-galha com base na tabela de classificação fornecida em estudos anteriores, utilizando o índice de Fournier (1975) (Dantas, 2019; Dantas *et al.*, 2021) (Tabela 1).

TABELA 1 - Classificação dos genótipos de *Eucalyptus* spp. com base em sua resposta à infestação por *Leptocybe invasa* classificados da seguinte forma: resistente; baixa suscetibilidade; média suscetibilidade e suscetibilidade muito alta.

Genótipo	Nível	Parental Feminino	Parental Masculino	Origem
1404*	Resistente	<i>E.urophylla</i>	<i>Eucalyptus</i> spp.	11°35'56"S 38°36'39"W
1249*	Resistente	<i>E. grandis</i>	<i>E.urophylla</i>	12°45'47"S 38°20'34"W
1250*	Resistente	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	12°45'47"S 38°20'34"W
0321	Resistente	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	11°56'45"S 38°04'52"W
5341	Resistente	<i>Eucalyptus</i> spp.	<i>Eucalyptus</i> spp.	19°49'16"S 40°16'34"W
1277*	baixa suscetibilidade	<i>E. grandis</i>	<i>E. camaldulensis</i>	11°35'56"S 38°36'39"W
1262*	suscetibilidade média	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	12°45'47"S 38°20'34"W
1275*	baixa suscetibilidade	<i>E. camaldulensis</i>	<i>Eucalyptus</i> spp.	11°35'56"S 38°36'39"W

*Genótipos utilizados na análise fenotípica.

Para coleta do material genético foram utilizadas 80 mudas de eucalipto (Figura 1), sendo 50 plantas classificadas como resistentes e 30 plantas classificadas como suscetíveis a vespa-da-galha. Para a realização do experimento foram obtidas folhas jovens de mudas de cada um dos oito genótipos e armazenadas em um freezer com temperatura controlada de -20°C. As amostras foram analisadas usando marcadores ISSR.

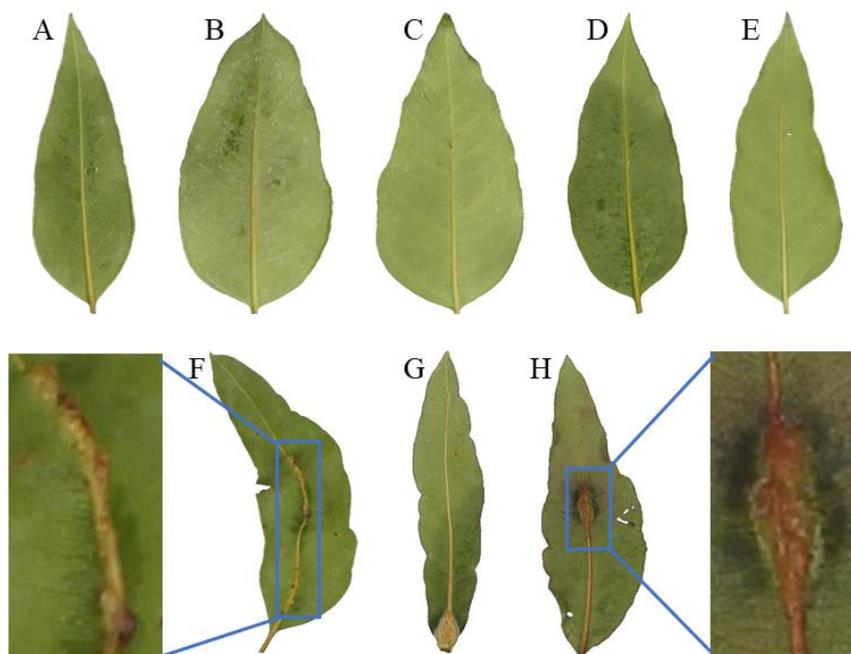


FIGURA 1. Folhas de *Eucalyptus* spp. (vista abaxial). Os genótipos A (1404), B (1249), C (1250), D (0321) e E (5341) são resistentes a *Leptocybe invasa* (Fig. A-E). Os genótipos F (1277), G (1262) e H (1275) são suscetíveis a *Leptocybe invasa*.

Para análise fenotípica foram coletadas 60 folhas das mudas de seis genótipos de eucalipto com um ano de idade, submetidas ao ataque de vespa-da-galha, e acondicionadas em sacos de papel, prensadas por 48 horas para obtenção de superfícies planas para captura de imagens unidimensionais. Destes, foram selecionados os seguintes genótipos como fontes de resistência a vespa-da-galha: 1404 (*E. urophylla* x *Eucalyptus* spp.), 1249 (*E. grandis* x *E. urophylla*), 1250 (*E. grandis* x *E. urophylla*). E os genótipos suscetíveis a esta vespa: 1277 (*E. grandis* x *E. camaldulensis*), 1262 (*E. grandis* x *E. urophylla*) e 1275 (*E. camaldulensis* x *Eucalyptus* spp.).

3.2 Genotipagem

3.2.1 Isolamento de DNA

A extração de DNA foi conduzida a partir de folhas jovens de cada genótipo, utilizando um método modificado com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Doyle; Doyle, 1987).

Cerca de 200 mg de tecido foliar foram triturados juntamente com 900 μL de tampão CTAB a 2% e 50 μL de β -mercaptoetanol a 0,2%. As amostras foram submetidas a aquecimento a 65°C por 30 minutos e posteriormente purificadas com adição de clorofórmio: álcool isoamílico. Após centrifugação, o DNA foi transferido para um novo tubo e precipitado com uma solução de álcool: acetato de amônio. O sedimento de DNA foi lavado, seco ao ar e reconstituído em etanol a 70%. Etapas adicionais de lavagem foram conduzidas com etanol, e o DNA foi finalmente solubilizado em tampão 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (Tris) - ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas através de espectrofotometria. O DNA resultante foi ressuspensão a uma concentração de 80 ng/ μL e armazenado a -20°C.

3.2.2 Quantificação do DNA genômico

A determinação da qualidade e concentração de DNA de cada amostra foi determinada usando um espectrofotômetro Epoch A leitura foi baseada na absorbância a 260 nm e 280 nm. Para isso, 1,6 μL do branco, que é o reagente utilizado para solubilizar a amostra, foi aplicado no primeiro poço, enquanto os demais poços receberam 1,6 μL da amostra de DNA dos oito genótipos avaliados para realizar a leitura das concentrações.

3.2.3 Amplificação de DNA

As amplificações da região alvo do molde de DNA foram realizadas utilizando Platus Taq DNA Polymerase. As reações de PCR incluíram 0,3 μL de Taq polimerase, 5 μL de tampão 10X com KCl, 2,5 μL de MgCl_2 , 0,5 μL de dNTPs, 2 μL de primers, 4 μL de DNA e 5,7 μL de H_2O .

O protocolo de amplificação do DNA consistiu de uma temperatura inicial de 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, temperatura indicada pelo primer a 43-64°C para marcadores ISSR (Tabela 2) por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 min. Uma extensão final foi realizada a 72°C por 10 min.

TABELA 2 - Sequências de primers ISSR e temperatura de anelamento (Ta).

Marcador ISSR		
Primers	Sequência	Ta°C
DAT	GAGAGAGAGAGAGARG	43°C
UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	47°C
Goofy	GTTGTGTGTGTGTGTGYG	48°C
UBC809	GTTGTGTGTGTGTGTGYG	48°C
Pat 1 – QF	GGTTCCATTGCTTACCGATT	60°C
Pat 1 – QR	CAAGTTTCGAGGAACAGC	60°C
Lxx22R	CAAGCAGGGGGTACTAACTTCGA	64°C
Cxx2	ACCCTGTGTTGTTTTCAACG	57°C
M2	GGGCAGAGAGAGAGAGAGAG	64°C
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	43°C
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	47°C

A presença de fragmentos amplificados foi confirmada por eletroforese em gel de agarose utilizando gel a 1,5%. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1% por 50 min a 100 V, 100 mA e 100 W. Safer dye® foi utilizado para coloração dos fragmentos, que foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador modelo L'PIX (Loccus Biotechnology).

3.2.4 Análise de dados

Para a avaliação dos géis, uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) foi construída com base na porcentagem de polimorfismo analisada. Para o processamento dos dados foi utilizado o programa estatístico GenAlEx (Smouse *et al.*, 2012). Os fragmentos que apresentaram coloração fraca e baixa definição foram excluídos.

As estimativas de dissimilaridades genéticas (d_{ij}) entre cada par de genótipos foram calculadas através do coeficiente de Jaccard, expresso como $d_{ij} = b + c / a + (b + c)$. As variáveis da expressão foram obtidas conforme demonstrado no esquema a seguir:

		Genótipo i	
		1	0
Genótipo j	1	a (1,1)	b (0,1)
	0	c (1,0)	

A representação simplificada das distâncias genéticas foi efetuada por meio de dendrograma obtido pelo método de Agrupamento aos Pares pela Média Aritmética Não Ponderada (UPGMA) utilizando os programas Free Tree (Pavlicek; Hrda; Flegr, 1999) para gerar a matriz e Tree View (Han; Zmasek, 2009) para gerar a imagem do dendrograma.

3.3 Fenotipagem

Foram capturadas imagens das 60 folhas coletadas para análise utilizando o equipamento GroundEye®. Essas folhas foram dispostas em grupos de 10 em uma bandeja de acrílico, permitindo a captura de imagens das superfícies abaxial e adaxial das folhas.

Após a captura das imagens, deve-se calibrar a cor de fundo no programa GE para proceder com as análises. A cor de fundo foi ajustada utilizando o modelo YCbCr, com valores de luminância variando de 0 a 1.0, valores de azul variando de 0.07 a 0.5 e valores de vermelho variando de -0.5 a 0.5. Após a calibração da cor de fundo, as imagens foram submetidas a análises adicionais. O equipamento capturou um total de 453 características geométricas e fenotípicas. As variáveis avaliadas foram: área, diâmetro, alongamento, perímetro, circularidade, cor e textura.

Em seguida, a caracterização fenotípica entre genótipos foi realizada por meio de características quantitativas e medida em termos da distância de Mahalanobis. Os agrupamentos hierárquicos foram obtidos por meio de dendrograma, utilizando média aritmética não ponderada (UPGMA) em pares ordenados utilizando o programa R (R Core Time, 2020), onde foram obtidas para as variáveis de área, deformação do contorno, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, irregularidade, perímetro, contraste, dissimilaridade e homogeneidade.

A fórmula para a distância de Mahalanobis é a seguinte:

$$D^2 = (x - \mu)^T * C^{-1} * (x - \mu)$$

Onde:

D^2 é a distância de Mahalanobis ao quadrado.

x é o vetor de dados de um ponto específico.

μ é o vetor de média da distribuição multivariada.

C^{-1} é a matriz inversa da matriz de covariância da distribuição multivariada.

A análise da contribuição das variáveis para a diferenciação entre os genótipos foi avaliada por meio da análise de componentes principais (PCA) usando o programa R (R core, 2020). Médias dos valores obtidos foram utilizadas na construção de uma matriz de correlação, a partir da qual os valores padronizados dos componentes principais (PC) foram calculados. Foram conduzidas análises de correlação para examinar as relações entre as variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genotipagem

As análises moleculares foram realizadas utilizando DNA de oito genótipos de Eucalipto, selecionados para este estudo, os resultados da quantificação podem ser conferidos na Tabela 3.

TABELA 3. Análise de pureza do DNA de 8 genótipos de *Eucalyptus* spp.

Amostra	[ng/uL]	260	280	260/280
		(nm)	(nm)	(nm)
1	431,2	0,43	0,23	1,85
2	448,6	0,45	0,32	1,43
3	419,9	0,42	0,38	1,09
4	726,7	0,73	0,41	1,79
5	864,6	0,86	0,56	1,55
6	2.801,4	2,81	1,30	2,15
7	2.018,1	2,02	0,91	2,22
8	1.642,1	1,64	0,75	2,19

É importante ressaltar que uma amostra de qualidade apresenta um total de DNA de no mínimo 200 ng e uma relação de 260/280 nm de 1,7 a 1,9, o que significa que há quase o dobro de DNA em relação às proteínas presentes. A presença de uma quantidade insuficiente de DNA e um excesso de proteínas pode levar a uma má amplificação do DNA, tornando a amostra inviável (Andrade, 2021). Dessa forma, é possível verificar que a pureza do DNA foi satisfatória para a realização da PCR permitindo distinguir e agrupá-los de acordo com sua similaridade.

4.1.1 Similaridade genética

Dos 11 primers ISSR testados, sete produziram uma amplificação satisfatória de fragmentos com tamanhos esperados após reações de PCR, mostrando bandas polimórficas claras e reprodutíveis de todos os oito genótipos. O gráfico mostra que os genótipos exibiram um nível significativamente alto de polimorfismo (Figura 2), com 94,74% de polimorfismo e média de 2,7 *loci* por primer.

Os genótipos examinados no estudo exibiram um nível significativamente alto de

polimorfismo, o que coincide com resultados encontrados em outros estudos para a espécie, sendo uma característica de extrema importância para programas de melhoramento (Souza *et al.*, 2010).

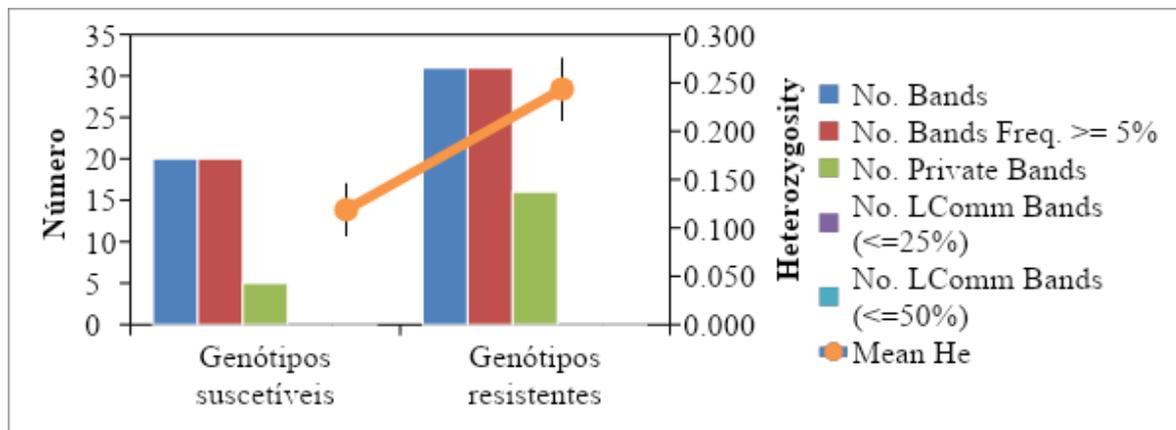


FIGURA 2. Padrões de bandas entre genótipos do Grupo *Eucalyptus* em resposta a *Leptocybe invasa* com base em dados cumulativos derivados da análise de ISSR: Suscetíveis e Resistentes.

A análise dos dados genéticos revelou padrões de bandas distintos para os genótipos estudados, distinguindo os suscetíveis dos resistentes. Em relação à quantidade de bandas, os genótipos suscetíveis apresentaram um total de 20 bandas, enquanto os genótipos resistentes exibiram 31 bandas.

Também foi analisada a presença de bandas privadas, que são exclusivas de cada grupo. Os genótipos suscetíveis demonstraram a presença de cinco bandas privadas, evidenciando a existência de marcadores genéticos específicos para este grupo. Por outro lado, os genótipos resistentes apresentaram um número maior de bandas privadas, totalizando 16. Essas bandas privadas contribuem para a diferenciação genética e singularidade de cada grupo, indicando diferenças genéticas específicas em regiões de DNA presentes em alguns genótipos, mas ausentes em outros. Estudos anteriores destacaram a relação entre diversidade genética e resistência a estresses (Abrinbana *et al.*, 2010)

Além disso, a análise considerou o grau de bandas compartilhadas, denominadas como bandas LComm, tanto dentro de cada grupo quanto entre eles. Neste caso, nem os genótipos suscetíveis, nem os resistentes apresentaram bandas que se enquadraram nas categorias de $\leq 25\%$ ou $\leq 50\%$ de LComm, sugerindo a presença de marcadores genéticos compartilhados limitados.

As distâncias genéticas entre cultivares de Eucalipto spp. foram estudadas pelos 7 primers mencionados (Tabela 2). A árvore de agrupamento genético, utilizando o programa UPGMA, dividiu os genótipos em 2 grupos distintos (Figura 3), com coeficiente de similaridade entre 0,13 e 0,60. O primeiro grupo principal é composto por cinco genótipos resistentes (1249, 5341, 1250, 0321 e 1404), com coeficiente de similaridade entre 0,14 e 0,57. Já o segundo grupo principal é composto por três genótipos

susceptíveis (1262, 1277 e 1275), com coeficiente de similaridade 0,18 e 0,50.

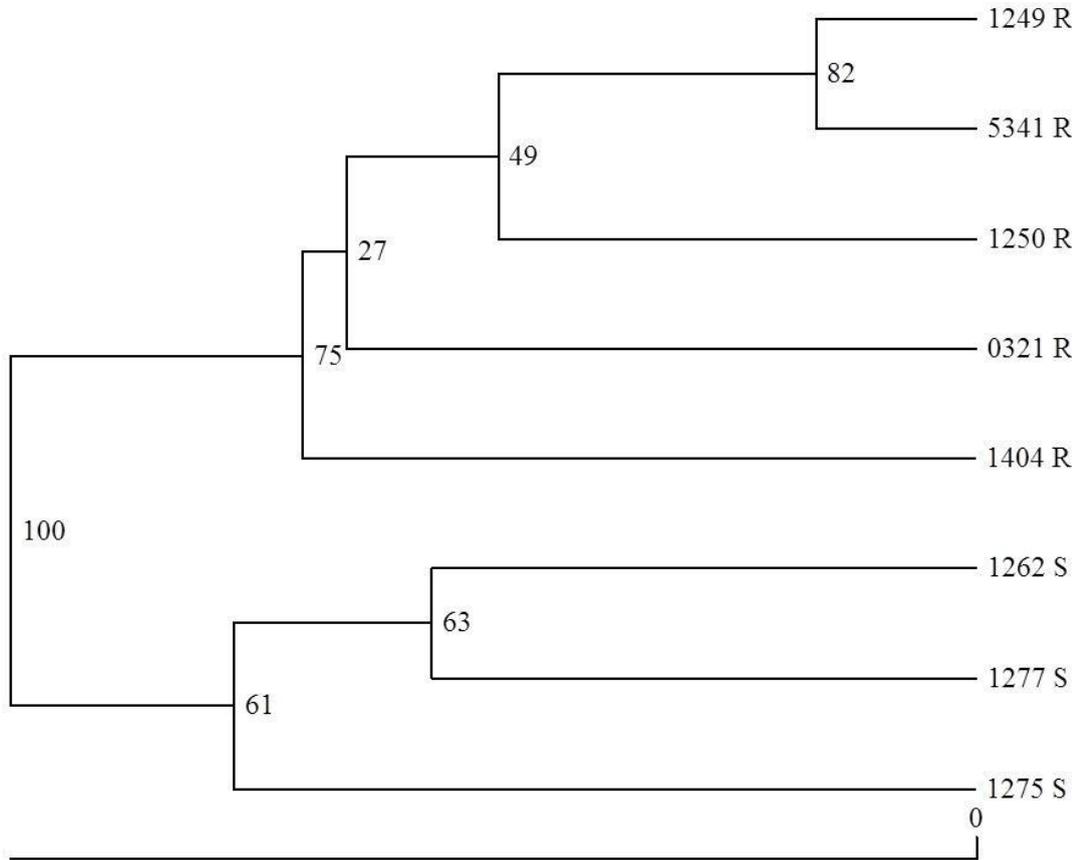


FIGURA 3. Dendrograma baseado na distância genética de jaccard, usando o programa Genalex, mostrando o agrupamento e distância das oito genótipos referentes à espécie *Eucalyptus* a partir dos dados gerados pelos sete marcadores microssatélites.

Os resultados da matriz obtida possibilitaram a identificação de dois grupos distintos de genótipos com relação à resistência à praga estudada. Observando o dendrograma é possível perceber que o grupo I foi formado majoritariamente pelos cinco genótipos resistentes e o Grupo II foi composto por três genótipos susceptíveis. Ao nível de espécie, o padrão de agrupamento demonstra a existência de dois grupos principais, um formado pelos genótipos resistentes, evidenciando que esses genótipos são os mais próximos geneticamente, e outro grupo formado pelos genótipos susceptíveis. Os resultados obtidos indicam que a formação desses grupos distintos sugere que existem diferenças significativas em termos de expressão gênica relacionadas à resistência ou suscetibilidade a esse patógeno.

Dentro do grupo dos resistentes os genótipos 1249 e 5341 foram os mais próximos geneticamente, enquanto que o genótipo 1404 apresentou uma distância significativa dos demais genótipos. No grupo de genótipos susceptíveis os genótipos 1262 e 1277 foram os

genótipos mais próximos, separando-se do genótipo 1275. A estruturação da variabilidade genética entre e dentro dos grupos indicam diferenças significativas em termos de expressão gênica relacionadas à resistência ou suscetibilidade a essa praga. Dessa forma, foi possível determinar a diversidade genética entre genótipos resistentes e susceptíveis de eucalipto.

4.2 Fenotipagem

Os resultados da análise de danos demonstraram diferenças significativas entre os genótipos avaliados. Em relação a variável textura, os genótipos resistentes não exibiram diferenças significativas com o ataque da vespa, mantendo uma textura mais uniforme, indicando uma superfície mais lisa e regular em comparação com os genótipos susceptíveis. Também foi possível observar que os genótipos resistentes mostraram uma área de lacuna menor, sugerindo uma estrutura foliar mais compacta. Em contrapartida, nos genótipos susceptíveis é possível observar um ataque mais severo que gerou em uma maior área de lacuna e deformações nas folhas, indicando uma superfície menos uniforme e mais irregular (Figura 4).

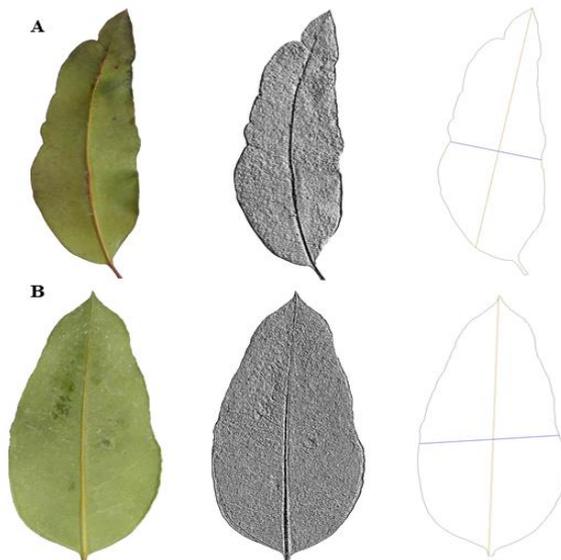


FIGURA 4. Imagens capturadas pelo GroundEye® de um genótipo suscetível à *Leptocybe invasa* (Genótipo A) e um genótipo resistente (Genótipo B): imagem do verso da folha, imagem representando a textura e imagem representando a geometria.

A análise da Figura 4 revela que as folhas das plantas afetadas pelas vespas apresentam graus variados de deformação, indicando a presença de galhas em diferentes áreas da folha. Estudos anteriores que relataram resultados parecidos em suas pesquisas (Mendel *et al.*, 2004; Wilcken *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). Os genótipos susceptíveis apresentaram maiores níveis

de deformação foliar quando infestados com vespas em comparação aos genótipos resistentes. Dentre os danos provocados por vespa-da-galha ao Eucalipto spp., a presença de pequenas galhas próximas à nervura central das folhas dos genótipos suscetíveis se destaca. Essas galhas representam um dos sintomas mais distintos da infestação por esse inseto e podem afetar significativamente o desenvolvimento e a saúde das árvores de Eucalipto suscetíveis. Além disso, o ataque de vespa-da-galha pode levar à descoloração e deformação das folhas, comprometendo a capacidade fotossintética das plantas e, conseqüentemente, a sua produtividade. Estes resultados destacam de maneira ainda mais evidente a susceptibilidade de certos genótipos aos danos causados pelas vespas, reforçando a importância de identificar e incorporar genótipos resistentes em programas de melhoramento genético e em estratégias de controle de pragas. A seleção e promoção de genótipos resistentes tornam-se essenciais para garantir a produtividade e a sustentabilidade das culturas, minimizando os impactos negativos das vespas, reforçando a qualidade das plantações.

Através da análise de imagem e da avaliação de dados estatísticos do sistema GroundEye®, foi possível observar que em relação à textura, as plantas suscetíveis exibem um maior grau de deformações nas folhas. Isso acontece devido ao fato de que as plantas suscetíveis apresentam os sintomas dos danos causados por pragas de forma mais evidente, a presença de lesões, manchas, buracos ou outros danos que podem levar a uma maior degradação da estrutura foliar. Na figura 4 também é possível observar que as plantas resistentes apresentaram uma textura mais uniforme e uma menor área de lacuna, o que indica que a estrutura foliar permanece mais íntegra e saudável. Isso pode ser explicado pela habilidade dos genótipos resistentes em limitar o desenvolvimento e a propagação das vespas. Esses resultados destacam a importância da análise de textura das folhas como uma ferramenta valiosa para identificar plantas suscetíveis e resistentes a pragas.

O ataque da vespa-da-galha desencadeia hiperplasia em árvores de Eucalipto até os 2 anos de idade, sendo que o dano por galhas ocorre principalmente nas nervuras das folhas, causando deformação dos brotos terminais e das folhas que resulta em uma abscisão mais rápida das folhas e no ressecamento dos brotos e o enrolamento das folhas ao longo das nervuras centrais, essas folhas enroladas exibem uma alta densidade de galhas, muitas vezes coalescentes, ao longo das nervuras centrais (Nyeko *et al.*, 2005; Thu; Dell, 2009). Uma forte infestação de vespas resulta em perda de vigor e retardo de crescimento em clones e mudas, que pode resultar na morte dos galhos (Thu; Dell, 2009). É possível observar que o dano aparente causado pelo ataque das vespas difere bastante entre os genótipos de Eucalipto

(Figura 1). Dos seis genótipos avaliados, três genótipos foram resistentes a vespa-da-galha e não apresentaram formação de galhas nem altas deformações das folhas. Por outro lado o impacto foi maior nos genótipos susceptíveis, todos os 3 genótipos foram severamente danificados, apresentando graus diferentes de deformação.

A deformação dos ramos, similar ao que foi observado por Dantas *et al.* (2021), indica uma infestação significativa pela vespa-da-galha na nervura central peciolada das folhas, nos pecíolos e nos ramos jovens. Tal infestação tem o potencial de perturbar a dominância apical e pode resultar em ramificação adicional ou aumento na brotação.

No que se refere à suscetibilidade a insetos indutores de galhas em florestas plantadas, o entendimento das respostas fenotípicas por parte dos hospedeiros permanece restrito, como destacado por Sarmento *et al.* (2021). A presença de ovos da vespa-da-galha nos tecidos vegetais desencadeia a formação de galhas, o enrolamento das folhas e o envelhecimento precoce delas, como ilustrado na Figura 5. Uma infestação severa pode resultar na morte de brotos, na queda de folhas, no crescimento atrofiado e no enfraquecimento das árvores, acarretando em perdas significativas nas plantações de eucalipto.

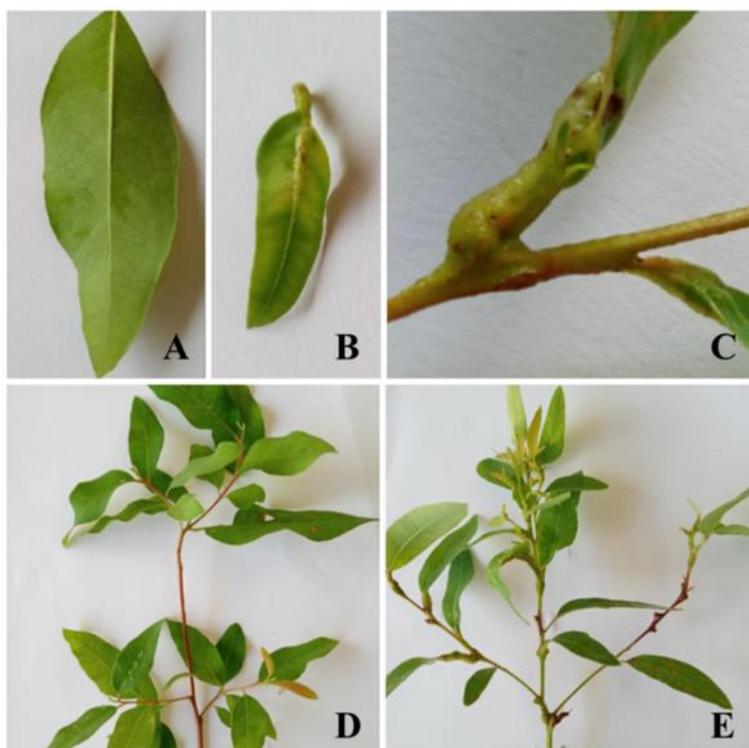


FIGURA 5. Genótipos de *Eucalyptus* spp. apresentando respostas diversas ao ataque de *Leptocybe invasa*. A: Folha nova livre de galhas em um genótipo resistente. B: Galhas em uma folha nova de um genótipo suscetível. C: Galhas em ramos de um genótipo suscetível. D: Ramo de um genótipo

resistente. E: Ramo de um genótipo suscetível.

As variáveis geométricas, especificamente a área e a área de lacuna, se destacaram como as mais significativas na explicação da variação estatística. Esse resultado corrobora as descobertas de estudos anteriores em eucalipto (Mendel *et al.*, 2004) que destacaram a correlação entre o tamanho das folhas e as alterações nos danos superficiais provocados pela oviposição. Essa correlação sugere uma atividade contínua da praga e a consequente degradação do tecido vegetal.

A Análise de Componentes Principais (PCA), apoiadas por testes estatísticos, identificaram variáveis que são mais significativas para diferenciar genótipos resistentes e suscetíveis à doença (Figura 6).

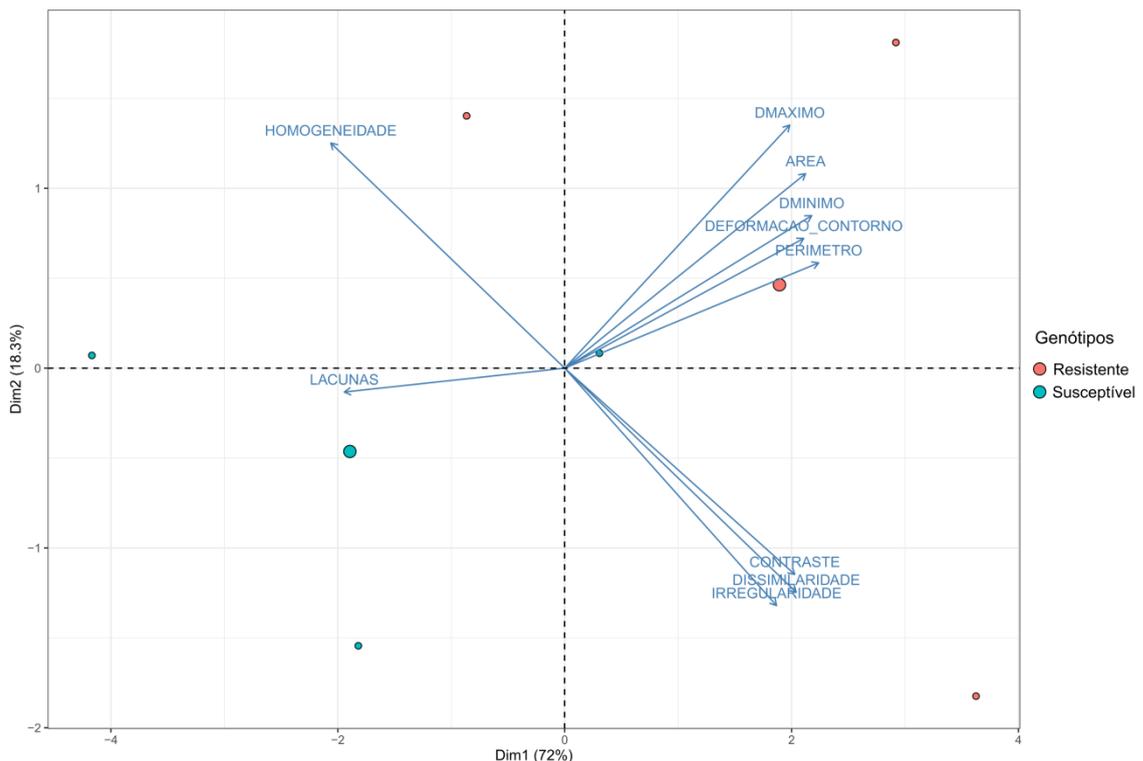


FIGURA 6. Biplot obtido pela combinação linear de variáveis relacionadas às variáveis fenotícofenotípicas de genótipos suscetíveis e resistentes de *Eucalyptus* spp.

A análise PCA reduz o número de parâmetros necessários para distinguir os genótipos, resumindo e destacando as características mais relevantes, responsáveis pela maior parcela da variabilidade geral. Além disso, ela permite visualizar agrupamentos que não poderiam emergir dos dados brutos. No presente estudo, foi realizada uma Análise de Componentes Principais com base na matriz de correlação para estimar a diferenciação entre genótipos, resultando em dois componentes principais que explicam 90,3% da variância total.

Os resultados da PCA indicam que a variável área foliar (71,0%), bem como a área de lacuna, são fatores importantes na diferenciação entre genótipos resistentes e suscetíveis à vespa-da-galha.

Analisando as figuras obtivemos os seguintes resultados para as variações: Área foliar (72,0%), área de lacunas (18,3%), deformação do contorno (5,0%), diâmetro máximo (3,9%) e diâmetro mínimo (0,8%) foram os componentes analisados. Ao analisar a Figura 6 observa-se que a variável Área foi o componente principal, explicando 72,0% da variação, indicando que esses atributos apresentam uma maior variação entre os genótipos e exercem um impacto mais significativo na distinção entre eles. A Área foliar e Área de lacunas juntas explicam 90,3% da variação encontrada. As cargas no eixo PC1 estão associadas à irregularidade, contraste e dissimilaridade. Essas variações acumulam os valores mais substanciais e desempenham um papel crucial na diferenciação dos genótipos. Já o segundo componente explica 20,3% da variação, apresentando uma homogeneidade como sendo a variável de maior influência no segundo eixo do PCA (PC2). A área, deformação do contorno, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e perímetro apresentam maior valor em ambos os eixos PC1 e PC2 abrangendo dois componentes. Os componentes restantes explicam menos variabilidade. Os resultados da PCA indicam que a variável Área foliar, bem como a área de lacunas, são fatores importantes na diferenciação entre genótipos resistentes e suscetíveis à vespa-da-galha.

Observou-se que as variáveis geométricas foram as mais relevantes, com destaque para Área e Área de lacunas, que correspondem a 89,3% dos dados estatísticos de variação, corroborando com um estudo anterior (Mendel *et al.*, 2004) que apresenta que as folhas atingiram seu tamanho máximo com pequenas alterações na morfologia superficial e aumento na largura das marcas da cortiça, causadas pela oviposição e indicando a continuação da atividade da praga degradando o tecido vegetal da planta.

Através do gráfico dos componentes principais (Figura 6), é possível visualizar que o segundo componente principal contribuiu para separar o genótipo 1262 por apresentar maior área de lacuna (12,9%). Além disso, de acordo as variáveis geométricas os genótipos 1249 e 1250 tiveram maior índice de área, e os genótipos 1277 e 1262 apresentaram menor área, por meio dessas duas variáveis é possível inferir que o dano causado pela vespa é menor nos genótipos resistentes.

Com relação à área, os genótipos resistentes apresentaram valores superiores aos suscetíveis, enquanto que a área de lacunas foi maior nos suscetíveis. A deformação também foi maior nas plantas suscetíveis.

A Figura 7 mostra a correlação (r) entre as variáveis fenotípicas dos genótipos suscetíveis e resistentes de Eucalipto.

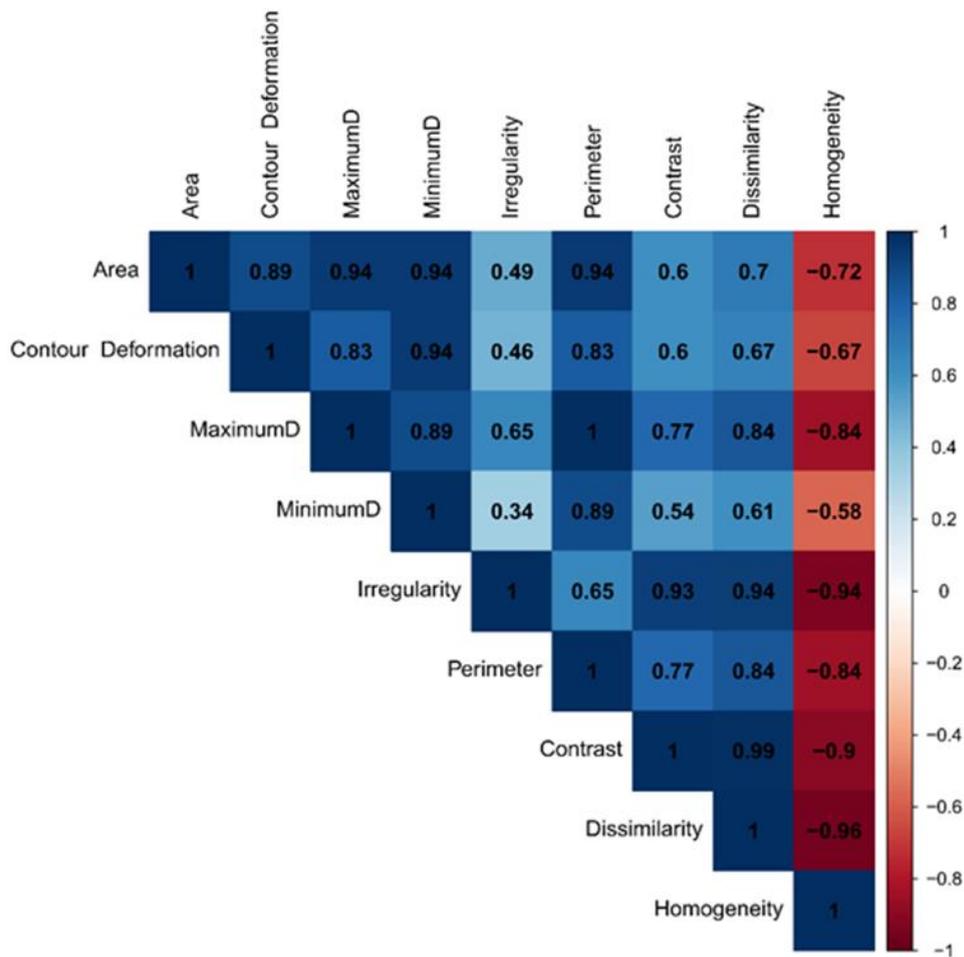


FIGURA 7. Correlação entre as variáveis fenotípicas dos genótipos suscetíveis e resistentes de *Eucalyptus* spp.

A área está positivamente correlacionada com a deformação do contorno ($r = 0,89$), diâmetro máximo ($r = 0,94$), diâmetro mínimo ($r = 0,94$) e perímetro ($r = 0,94$). Além disso, a área apresenta correlações positivas significativas com irregularidade ($r = 0,49$), contraste ($r = 0,6$) e dissimilaridade ($r = 0,7$). Portanto, esses parâmetros podem ser usados para prever uns aos outros. A homogeneidade, por outro lado, está negativamente correlacionada com todas as outras variáveis. Isso significa que, à medida que a homogeneidade aumenta, as outras variáveis diminuem.

O coeficiente de correlação pode fornecer uma visão mais completa sobre as características mais importantes na avaliação de genótipos. Essas características podem ser usadas para prever outras que são consideradas essenciais para a caracterização de genótipos, o que pode ajudar na seleção de genótipos com características desejadas.

Dessa forma, a análise fenotípica deve ser utilizada como um método preliminar para avaliação da diversidade genética em plantas. A partir de informações obtidas por uma caracterização fenotípica, é possível estimar parâmetros genéticos importantes para o melhoramento da cultura. A análise de componentes principais dos genótipos, aliada à análise de variância, pode ser uma ferramenta útil para complementar o estudo da resistência à vespa-da-galha (Martins *et al.*, 2007).

Segundo Meira *et al.* (2019), a correlação fenotípica envolve os efeitos tanto genéticos quanto ambientais, e a magnitude e a direção das correlações fornecem informações sobre o grau de associação entre as variáveis, indicando se uma característica muda em resposta a outra.

Diferente do estudo realizado por Dantas (2019), que classificou os genótipos com base em critérios subjetivos como resistente e baixa susceptibilidade, por meio das análises anatómicas e da composição química dos genótipos de eucalipto. Os resultados desta pesquisa empregaram uma abordagem quantitativa na análise dos dados que revelou a identificação de dois grupos distintos, demonstrando a eficácia desse método para a classificação dos genótipos com base em características objetivas e mensuráveis. Isso possibilitou a criação de um dendrograma (Figura 8), por meio de uma análise objetiva.

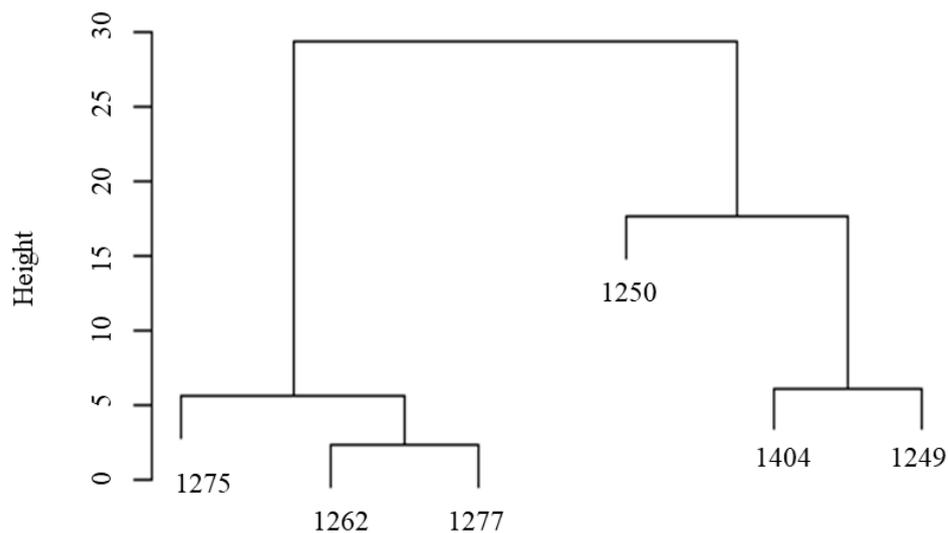


FIGURA 8. Dendrograma empregando com base nas distâncias de Mahalanobis genótipos de *Eucalyptus* spp.

A análise quantitativa revelou a identificação de dois grupos distintos: o grupo I, que consiste em três genótipos resistentes (1204, 1249 e 1250), e o grupo II, que consiste em três

genótipos susceptíveis (1262, 1275 e 1277). Observa-se que no grupo I os genótipos 1204 e 1249 apresentam maior similaridade entre si e diferença em relação ao genótipo 1250. Já no grupo II os genótipos 1277 e 1262 apresentam maior similaridade entre si e diferença em relação ao genótipo 1275. Esses resultados fornecem informações sobre as relações genéticas e padrões de agrupamento entre os genótipos.

Segundo Cruz, Ferreira e Pessoni (2021), as distâncias generalizadas de Mahalanobis podem ser usadas para quantificar a contribuição relativa dos caracteres para a diversidade genética. Dessa forma, uma análise baseada nas distâncias de Mahalanobis demonstra o potencial das características de dano como marcadores informativos para a seleção de genótipos. O agrupamento dos genótipos de eucalipto foi realizado com base no grau de dissimilaridade da genética entre os genótipos susceptíveis e resistentes, destacando características específicas de danos associados à sua resposta à praga. A norma de agrupamento sugere que esses genótipos compartilham características genéticas semelhantes relacionadas à sua suscetibilidade ou resistência.

A utilização da distância genética com base nos caracteres fenotípicos representa uma ferramenta complementar de significativa relevância nos programas de melhoramento genético de plantas, fornecendo informações valiosas para a caracterização, conservação e utilização dos recursos genéticos disponíveis (Sordi, 2010).

Em última análise, a combinação de métodos genéticos e fenotípicos oferece uma estratégia abrangente para a caracterização de genótipos de Eucalipto em resposta à vespa-da-galha. Essa abordagem não apenas aprofunda nossa compreensão da resistência do eucalipto a essa praga, mas também tem implicações práticas significativas na promoção da produção florestal sustentável e na preservação dos recursos genéticos dessa espécie.

5. CONCLUSÃO

A análise genética revelou dois grupos distintos de genótipos, com genótipos resistentes formando um grupo separado dos genótipos suscetíveis.

A identificação de genótipos resistentes à praga por meio de marcadores moleculares ISSR permite a seleção de plantas com maior potencial de sobrevivência na fase de mudas, que podem ser utilizadas em programas de melhoramento genético.

Os dados fenotípicos coletados neste estudo destacam que a área foliar e a área de lacunas são os principais fatores que diferenciam genótipos resistentes de suscetíveis à vespa-da-galha.

Esses resultados têm implicações importantes para programas de melhoramento genético, permitindo a seleção de genótipos com características desejadas de resistência à praga.

Para estudos subsequentes relacionados a esta espécie, é recomendável expandir a amostragem e incluir um maior número de marcadores moleculares nas análises genéticas, além de avaliar características fenotípicas em maior detalhe.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRINBANA, M.; MOZAFARI, J.; SHAMS-BAKHSH, M.; MEHRABI, R. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. **Plant Pathology**, v. 59, n. 5, p. 829-838, 2010.

ACUÑA, C. V. **Desarrollo de marcadores funcionales y evaluación de la diversidad genética en *Eucalyptus globulus* con énfasis en genes potencialmente involucrados en características de calidad de la madera**. Buenos Aires, 2011. - Tesis Doctoral (Doctoral en biología/agrobiotecnología) - Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, 2011.

ALMEIDA, A. C. DE S.; SILVA, C. L. T.; PAIVA, L. A. DE; ARAUJO, M. DA S.; JESUS, F. G. Antibiosis in Soybean Cultivars to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 100, n. 2, p. 334–338, 2017.

ALMEIDA, A. DOS S.; GIL, J. F. S.; ZEQUE, J. L.; ROSA, M. DA C. **Vespa-da-galha do Eucalypto *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) no Brasil**. 2013.

ANDRADE, C. J. **Diversidade de fungos associados a *Eucalyptus tereticornis* e *Bambusa vulgaris* da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade, Rio Claro, SP**. 2021. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Microbiologia Aplicada) - à Universidade Estadual Paulista (Unesp), São Paulo, 2021.

ASSIS, T. F. DE. **Melhoramento genético de *Eucalyptus*: desafios e perspectivas**. 2015.

ÁVILA, Maria Alice Bento. **Análise de imagem na avaliação do potencial fisiológico de sementes de soja**. 42 p. : il.2017 - Dissertação (Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia) - à Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

BALE, J. S.; MASTERS, G. J.; HODKINSON, I. D.; AWMACK, C.; BEZEMER, T. M.; BROWN, V. K.; WHITTAKER, J. B. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. **Global change biology**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2002.

BELLON, G. **Filogenia, variabilidade genética e caracterização de Passifloras silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência à doenças**. 2014. 151 f., il. Tese (Doutorado em Agronomia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

BORGES, H. DE S. **A heterose em plantas autógamas e alógamas, seus efeitos e utilização na produção agrícola**. 2022.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. D.; MELO, L. A. D.; ROSADO, A. M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, p. 425-434, 2011.

CAIXETA, R. P.; CARVALHO, D. DE; ROSADO, S. C. DA S.; TRUGILHO, P. F. Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore**, v. 27, n. 3, 2003.

- CALAZANS, C. C.; MANN, R.; SOUZA, J.; NUNES, V. V. Perspectivas tecnológicas para *Eucalyptus*: uma meta-análise. **International Symposium on Technological Innovation**, 2021. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/353946828>>.
- CALAZANS, C. C.; SOUZA, J. L.; NUNES, V. V.; SILVA-MANN, R. Innovating *Eucalyptus* resistance: A meta-analysis of gene associations for combatting *Leptocybe invasa*. **Research Square**, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2090222/v2>>.
- CAPPA, E. P.; KLÁPŠTĚ, J.; GARCIA, M. N.; VILLALBA, P. V.; MARCUCCI POLTRI, S. N. SSRs, SNPs and DArTs comparison on estimation of relatedness and genetic parameters' precision from a small half-sib sample population of *Eucalyptus grandis*. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 7, p. 97, 2016.
- CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H.; *et al.* **Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga**. , 2009.
- CARVALHO JUNIOR, C. R.; LEITE, J. A.; SANTOS, P. C. DA S.; *et al.* Técnicas de Cruzamentos de *Psidium cattleianum* Sabine para Utilização em Programas de Melhoramento Genético. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 27, n. 1, p. 64–69, 2023.
- CHAWLA, P.; KAUSHIK, R.; SHIVA SWARAJ, V. J.; KUMAR, N. Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 10, p. 292–307, 2018.
- CHEN, Y.; HAUSNER, G.; KENASCHUK, E.; *et al.* Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 1–2, p. 44–48, 1998.
- CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500–506, 2011.
- COSTA, V.; EVONEO; WILCKEN, C.; *et al.* *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil: New forest pest reaches the New World. **Revista de Agricultura**, v. 83, p. 136–139, 2008.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M., PESSONI, L. A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. **Visconde do Rio Branco: Suprema**, v. 620, 2011.
- DANTAS, José Oliveira. **Resposta de genótipos de Eucalyptus a vespa-da-galha Leptocybe invasa Fisher & La Salle, 2004 (Hymenoptera: Eulophidae)**. 2019. 69 f. Tese (Doutorado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2019.
- DANTAS, J. O., ARAGÃO, J. R. V., LISI, C. S., SILVA, E. C., DE ANCHIETA, R. L., & RIBEIRO, G. T. (2021). Oviposition of the gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: eulophidae) and morphological changes in *Eucalyptus* spp. genotypes susceptible. **Floresta**, 51(3), 668-676.
- DHONDT, S.; WUYTS, N.; INZÉ, D. Cell to whole-plant phenotyping: the best is yet to come. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 8, p. 428–439, 2013.

- DITTRICH-SCHRÖDER, G.; HURLEY, B. P.; WINGFIELD, M. J.; NAHRUNG, H. F.; SLIPPERS, B. Invasive gall-forming wasps that threaten non-native plantation-grown *Eucalyptus*: diversity and invasion patterns. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 22, n. 4, p. 285–297, 2020.
- DOĞANLAR, O. Occurrence of *Lectocybe invasa* Fisher & La Salle, 2004 (Hymenoptera: Chalcidoidea) on *Eucalyptus camaldulensis* in Turkey, with a description of the male sex. **Zoology in the Middle East**, v. 35, n. 1, p. 112–114, 2005.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L.. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, 1987.
- EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. **Evolution**, v. 18, n. 4, p. 586, 1964.
- FURBANK, R. T.; TESTER, M. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 12, p. 635–644, 2011.
- FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant Defense against Insect Herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10242–10297, 2013.
- GONÇALVES, C. I.; VILAS-BOAS, L.; BRANCO, M.; REZENDE, G. D.; VALENTE, C. Host susceptibility to *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) of *Eucalyptus* species. **Annals of Forest Science**, v. 76, n. 3, p. 63, 2019.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Processamento digital de imagem. **Pearson, ISBN-10: 8576054019**, v. 10, p. 11-27, 2010.
- HAN, M. V.; ZMASEK, C. M. phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. **BMC bioinformatics**, v. 10, p. 1-6, 2009.
- HOULE, D.; GOVINDARAJU, D. R.; OMHOLT, S. Phenomics: the next challenge. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 12, p. 855–866, 2010.
- HUANG, Z.-Y.; LI, J.; LU, W.; ZHENG, X.-L.; YANG, Z.-D. Parasitoids of the *Eucalyptus* gall wasp *Leptocybe* spp.: a global review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 30, p. 29983–29995, 2018.
- HURLEY, B. P.; GARNAS, J.; WINGFIELD, M. J.; *et al.* Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, v. 18, n. 4, p. 921–933, 2016.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 299–328, 2002.
- LEMES, P. G.; ZANUNCIO, J. C. Manejo integrado de pragas florestais. **Novo Manual de Pragas Florestais Brasileiras**, 2021.
- LEMES, P. G.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E.; LAWSON, S. A. Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy and integrated pest management in certified tropical plantations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1283–1295, 2017.

- LIBERA, D. S. D. **Controle biológico da cigarrinha e da lagarta-do-cartucho em híbridos de milho, com *Beauveria* spp.** 2022 – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - à Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2022.
- LIMA, E. N.; ARAUJO, M. E. B.; BERTINI, C. H. C. M.; MOURA, C. F. H.; HAWERROTH, M. C. Genetic diversity of clones of acerola assessed by ISSR molecular markers/Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 2, p. 174-181, 2015.
- LOGES, V.; LEMOS, M. A.; RESENDE, L. V.; *et al.* Resistência de cultivares e híbridos de cebola a tripes. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 222–225, 2004.
- Lu, Y.; Savage, L. J.; Ajjawi, I.; Imre, K. M.; Yoder, D. W.; Benning, C.; Last, R. L. New Connections across Pathways and Cellular Processes: Industrialized Mutant Screening Reveals Novel Associations between Diverse Phenotypes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 1482–1500, 2008.
- MARTINS, J. A. S.; JULIATTI, F. C.; SANTOS, V. A.; POLIZEL, A. C.; JULIATTI, F. C. Período latente e uso da análise de componentes principais para caracterizar a resistência parcial à ferrugem da soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 364-371, 2007.
- MUTKA, A. M.; BART, R. S. Image-based phenotyping of plant disease symptoms. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 734, 2015.
- MEIRA, A. L.; SANTANA, T. M., AMORIM, Y. F.; SILVA, J. O.; MIGUEL, D. L.; AMARAL, C. L. F. Parâmetros genéticos na seleção de feijão-caupi sob estresse hídrico em cultivo protegido. **Acta Iguazu**, v. 9, n. 2, p. 81-98.
- MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; FISHER, N.; LA SALLE, J. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. **Australian Journal of Entomology**, v. 43, n. 2, 2004.
- MOOSE, S. P.; MUMM, R. H. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. **Plant Physiology**, v. 147, n. 3, p. 969–977, 2008.
- MORA, F.; ARRIAGADA, O. A classification proposal for coefficients of variation in *Eucalyptus* experiments involving survival, growth and wood quality variables. **Bragantia**, v. 75, n. 3, 2016.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 7–14, 2009.
- NABITY, P. D.; ZAVALA, J. A.; DELUCIA, E. H. Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 655–663, 2009.
- NYEKO, P. The cause, incidence and severity of a new gall damage on *Eucalyptus* species at Oruchinga refugee settlement in Mbarara district, Uganda. **Uganda Journal of Agricultural Sciences**, v. 11, p. 47-50, 2005.

PAVLICEK A., HRDA S, FLEGR J.: FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. **Folia Biologica (Praha)** 45, 97-99, 1999.

PINTO, C. P. G.; ONGARATTO, S. Influence of abiotic factors on the resistance of plants to insects. **EntomoBrasilis**, v. 12, n. 1, p. 01–05, 2019.

POLTRI, S. N. M.; ZELENER, N.; TRAVERSO, J. R.; GELID, P.; HOPP, H. E. Selection of a seed orchard of *Eucalyptus dunnii* based on genetic diversity criteria calculated using molecular markers. **Tree Physiology**, v. 23, n. 9, p. 625–632, 2003.

PRADO, P. F. Estudo de descritores de texturas e cores para a classificação automática de imagens no contexto das ciências ambientais. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, 2018.

PRETTY, J.; BHARUCHA, Z. Integrated Pest Management for Sustainable Intensification of Agriculture in Asia and Africa. **Insects**, v. 6, n. 1, p. 152–182, 2015.

QUANG THU, P.; DELL, B.; ISOBEL BURGESS, T. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and young plantations in Vietnam. **ScienceAsia**, v. 35, n. 2, p. 113, 2009.

QUEFFELEC, J.; ALLISON, J. D.; GREEFF, J. M.; SLIPPERS, B. Influence of reproductive biology on establishment capacity in introduced Hymenoptera species. **Biological Invasions**, v. 23, n. 2, p. 387–406, 2021.

R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RECCHIA, G. H. **Identificação de genes diferencialmente expressos em feijoeiro envolvidos na resistência ao estresse hídrico**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. **Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding**. 2002.

RESENDE, M. D. V. ; ALVES, R. S.. **Genética: estratégias de melhoramento e métodos de seleção**. 2021.

ROSADO, J. L. O.; LOECK, A. E.; FREITAS, D. F.; *et al.* Preferência de corte de *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) e *Acromyrmex ambiguus* (Emery, 1887) (Hymenoptera: Formicidae) por diferentes espécies de eucaliptos em laboratório. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 869–875, 2014.

RAUBER, M. **Bioecologia de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) e ocorrência de parasitoides em *Eucalyptus* spp.(Myrtaceae)**. 2018 - Dissertação (Mestrado em Fitotecnia/ Concentração Sanidade Vegetal) - à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2018.

SANTAROSA, E.; PENTEADO JUNIOR, J. F.; GOULART, I. D. R. Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. 2014.

SANTOS, K. L. Bases genéticas de características de importância agrônômica em goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). 2005 - Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - à Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

SANTOS, T. T.; YASSITEPE, J. E. DE C. T. Fenotipagem de plantas em larga escala: um novo campo de aplicação para a visão computacional na agricultura. 2014.

SARMENTO, M. I.; PINTO, G.; ARAÚJO, W. L., SILVA, R. C.; LIMA, C. H. O.; SOARES, A. M.; SARMENTO, R. A. Differential development times of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) reveal differences in susceptibility between two *Eucalyptus* clones. **Pest Management Science**, v. 77, n. 2, p. 1042-1051, 2021.

SHORTHOUSE, J. D.; WOOL, D.; RAMAN, A. Gall-inducing insects – Nature’s most sophisticated herbivores. **Basic and Applied Ecology**, v. 6, n. 5, p. 407–411, 2005.

SILVA, J. DE C. Cresce presença do eucalipto no Brasil. **REMADE Revista da Madeira - EDIÇÃO Nº92**, out. 2005.

SILVA, L. H. , U. D.; M. B. L. , M. L. *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae): nova praga do Eucalipto no Brasil. **Enciclopedia biosfera**, 2014.

SILVA, M. Suzana O. Diversidade genética e caracterização de frutos e sementes de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.). 2022 - Relatório (Graduação em Agronomia) - à Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2022.

SILVA, R. DE C. Z.; SILVA, A. C. DA; CARVALHO, R. M.. Identification of cowpea genotypes resistant to fusarium wilt. **Revista Caatinga**, v. 34, n. 4, p. 957–964, 2021.

SORDI, D. D. **Parâmetros genéticos em populações de soja derivadas de cruzamentos simples e múltiplos, conduzidas por três diferentes métodos de avanço de gerações**. 2010 - Dissertação (Pós-Mestrado em Agronomia/ Genética e Melhoramento de Plantas) - à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 767–769, 2010.

SOUZA, H. G. D.; DORIA, K. M. A. B. V. S.; BASSETO, M. A.; ROSA, D. D.; FURTADO, E. L.; MARINO, C. L. Diversidade genética em populações-núcleo de *Eucalyptus grandis*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 32, p. 621-625, 2010.

SPÍNOLA FILHO, P. R. C. **Composição Química dos Óleos Essenciais de Genótipos de Eucalipto Resistentes e Suscetíveis a *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae)**. Diamantina , 2023 - Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2023.

STONE, G. N.; SCHÖNRÖGGE, K.; ATKINSON, R. J.; BELLIDO, D.; PUJADE-VILLAR, J. The Population Biology of Oak Gall Wasps (Hymenoptera: Cynipidae). **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 633–668, 2002.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. **Science**, 12. fev. 2010.

WILCKEN, C.; DIAS, T.; ZACHÉ, B.; *et al.* **Vespa-da-galha do Eucalipto (*Leptocybe invasa*) no Brasil**. 2011.

YANG, M.-M.; LIN, Y.-C.; WU, Y.; *et al.* Two new Aprostocetus species (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae), fortuitous parasitoids of invasive eulophid gall inducers (Tetrastichinae) on *Eucalyptus* and *Erythrina*. **Zootaxa**, v. 3846, n. 2, p. 261, 2014.

ZHANG, M.; ZHOU, C.; SONG, Z.; *et al.* The first identification of genomic loci in plants associated with resistance to galling insects: a case study in *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2319, 2018.

ZHAO, C.; ZHANG, Y.; DU, J.; GUO, X.; WEN, W.; GU, S.; FAN, J. Crop phenomics: current status and perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 714, 2019.

ZHENG, X. L.; LI, J.; YANG, Z. D.; *et al.* A Review of Invasive Biology, Prevalence and Management of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **African Entomology**, v. 22, n. 1, p. 68–79, 2014.