

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E  
MUCURI - UFVJM**

**MARCELE DOS SANTOS FERREIRA**

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL INDUZIDA POR *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera:  
Thaumastocoridae) EM *Eucalyptus* spp.**

**DIAMANTINA - MG  
2013**

**MARCELE DOS SANTOS FERREIRA**

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL INDUZIDA POR *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera:  
Thaumastocoridae) EM *Eucalyptus* spp.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, área de concentração em Manejo Florestal e Silvicultura, para a obtenção do título de “Mestre”.**

**Orientador: Dr. Marcelo Luiz de Laia**

**DIAMANTINA - MG**

**2013**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

F383s	<p>Ferreira, Marcele dos Santos</p> <p>Seleção de genótipos e análise da expressão gênica diferencial induzida por <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (Hemiptera: Thaumastocoridae) em <i>Eucalyptus</i> spp. / Marcele dos Santos Ferreira. – Diamantina: UFVJM, 2013. 43 p. : il.</p> <p>Orientador: Marcelo Luiz de Laia</p> <p>Dissertação (Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Percevejo bronzeado. 2. Biblioteca de cDNA. 3. Genômica funcional. 4. mRNA. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD 591.6</b></p>
-------	--

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**MARCELE DOS SANTOS FERREIRA**

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA  
DIFERENCIAL INDUZIDA POR *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera:  
Thaumastocoridae) EM *Eucalyptus* spp.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, área de concentração em Manejo Florestal e Silvicultura, para a obtenção do título de “Mestre”.**

APROVADA EM 25/09/2013

Dr. Leonardo Rodrigues Barbosa – Embrapa Florestas

Prof. Dr. Sebastião Lourenço de Assis Júnior - UFVJM

Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia – UFVJM  
Presidente

**DIAMANTINA - MG  
2013**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo.

Aos meus pais e à minha irmã pelo apoio dado em todos os momentos.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal.

À Janaína, por toda a colaboração.

Ao professor Marcelo, pela orientação e confiança.

À Diamantina, por ter me acolhido e se tornado a meu lar nestes quase 7 anos.

À Gerdau S/A.

À Embrapa Florestas.

À UFVJM e a Capes, por concederem minha bolsa.

À Fapemig e ao CNPq, pelo auxílio financeiro ao projeto.

Por fim, agradeço à todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos,  
ele provavelmente leva a lugar nenhum.”

Frank Clark

## RESUMO

FERREIRA, Marcele dos Santos. **Seleção de genótipos e análise da expressão gênica diferencial induzida por *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em *Eucalyptus* spp.** 2013. 43 p.

O gênero *Eucalyptus* engloba centenas de espécies conhecidas e de elevado interesse comercial. Este gênero florestal é altamente responsável pelo abastecimento da cadeia produtiva da madeira no Brasil. Diversos aspectos podem afetar negativamente a produtividade dos plantios, como, por exemplo, a ocorrência de pragas e doenças. O percevejo bronzeado Carpintero e Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae) é uma praga exótica, nova no Brasil. Uma estratégia para diminuir os efeitos negativos dos insetos-praga é selecionar materiais genéticos resistentes. O isolamento e a identificação de genes envolvidos no processo de resistência podem ser usados na obtenção de indivíduos com características desejáveis. O presente trabalho teve por objetivos a avaliação de materiais genéticos de *Eucalyptus* spp. quanto à injúria ocasionada pelo percevejo bronzeado e a construção, a partir de materiais contrastantes, de bibliotecas subtrativas de cDNA. A escolha dos genótipos baseou-se em metodologias distintas, conduzidas em laboratório, sala climatizada e em casa de vegetação. Foram estudados 27 clones híbridos. Os genótipos C03 e C17 foram escolhidos e, juntamente com mudas de *E. camaldulensis*, submetidos ao ataque de *T. peregrinus*. A partir das amostras de RNA mensageiro foi possível construir duas bibliotecas subtrativas: uma com genes diferencialmente expressos entre o clone C03 e o *E. camaldulensis* e outra a partir do clone C17 e o *E. camaldulensis*.

**Palavras-chave:** Percevejo bronzeado, biblioteca de cDNA, genômica funcional, mRNA

## ABSTRACT

FERREIRA, Marcele dos Santos. **Genotypic selection and analysis of differential gene expression induced by *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera:Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* spp.** 2013. 43 p.

The genus *Eucalyptus* encompasses hundreds of known species with high commercial interest. This forest genus is largely responsible for the supply of the wood production chain in Brazil. Several aspects can negatively affect the plantation productivity, for example the occurrence of pests and diseases. The bronze bug Carpintero e Dellapé, 2006 (Hemiptera:Thaumastocoridae) is a new exotic pest in Brazil. A strategy to reduce the negative effects of the insect pests is to select genetic material with resistance. The isolation and identification of resistance genes can be used in order to obtain individuals with desirable characteristics. The present study aimed to evaluate genetic materials of *Eucalyptus* spp. under the attack of *Thaumastocoris peregrinus* and make cDNA libraries from contrasting materials. The choice of genotypes relied on different methodologies conducted in laboratory, climate-controlled room and greenhouse. There were studied 27 hybrid clones. The genotypes C03 and C17, were selected along with *E. camaldulensis* seedlings and subjected to the attack of *T. peregrinus*. Two genomic subtractive libraries were made from the total RNA samples, one containing the differentially expressed genes between C03 and *E. camaldulensis*, and another from C17 and *E. camaldulensis*.

**Keywords:** Bronze bug, cDNA library, functional genomics, mRNA.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i> .....	10
2.2 O percevejo bronzeado ( <i>Thaumastocoris peregrinus</i> ) .....	11
2.3 Expressão gênica e a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA .....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Fonte do material vegetal .....	17
3.2 Coleta/Obtenção dos insetos.....	17
3.3 Avaliações de genótipos de <i>Eucalyptus</i> spp. sob ataque de <i>T. peregrinus</i> .....	18
3.3.1 Avaliação da sobrevivência .....	18
3.3.2 Avaliação da sintomatologia.....	19
3.3.3 Avaliação do período ninfal.....	20
3.4 Construção das bibliotecas de cDNA.....	20
3.4.1 Aclimação, infestação e coleta dos materiais pré-selecionados .....	20
3.4.2 Extração do RNA total .....	21
3.4.3 Tratamento do RNA Total com DNase I.....	22
3.4.4 Purificação do RNA total .....	22
3.4.5 Síntese da primeira fita.....	23
3.4.6 Síntese da segunda fita .....	23
3.4.7 Clivagem com a enzima Rsa I .....	24
3.4.8 Ligação dos adaptadores.....	25
3.4.8.1 Preparo do tester (cDNA 1) e do driver (cDNA 2) .....	25
3.4.8.2 Ligação do cDNA tester aos adaptadores.....	25
3.4.9 Primeira hibridização .....	26
3.4.10 Segunda hibridização.....	26
3.4.11 Amplificação por PCR .....	27
3.4.12 Clonagem dos fragmentos .....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Avaliações de genótipos de <i>Eucalyptus</i> spp. sob ataque de <i>T. peregrinus</i> .....	30
4.1.1 Avaliação da sobrevivência .....	30
4.1.2 Avaliação da sintomatologia.....	31
4.1.3 Avaliação do período ninfal.....	31
4.2 Construção das bibliotecas de cDNA.....	33
5 CONCLUSÕES .....	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus*, originário do continente Oceania, pertence à família Myrtaceae e engloba centenas de espécies, muitas de relevante interesse comercial. É responsável pela maior parte do abastecimento da cadeia produtiva da madeira no Brasil e dentre seus diversos usos, pode-se citar a produção de celulose, papel, MDF, aglomerados, madeira serrada, mourões, postes, carvão vegetal, lenha industrial, dentre outros. Dos 6 milhões de hectares de área plantada em 2012, 70% correspondem à áreas com o gênero *Eucalyptus*. Em âmbito regional, pouco mais de 70% das áreas plantadas concentram-se nas regiões sul e sudeste do país (ABRAF, 2013).

O estado de Minas Gerais, em 2012, apresentou uma área plantada de eucalipto equivalente à 1.438.971 hectares. Segundo Vale (2004), o estado é o maior consumidor de matéria-prima florestal no país, principalmente devido a expressiva presença de indústrias de siderurgia à carvão vegetal e de produção de celulose e papel.

Diversos aspectos podem afetar negativamente a produtividade dos plantios de eucalipto, como a ocorrência de pragas e doenças. O percevejo bronzeado (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera:Thaumastocoridae) (CARPINTERO E DELLAPÉ, 2006) é uma praga exótica, originária da Austrália e relativamente nova nos plantios brasileiros. O *T. peregrinus* teve sua presença detectada pela primeira vez no Brasil em 2008, no estado do Rio Grande do Sul (WILCKEN *et al.*, 2010), e logo se tornou uma séria ameaça devido à sua capacidade de adaptação, rápida dispersão e por causar danos de intensidade variada à diversas espécies do gênero.

O percevejo apresenta o corpo achatado, com comprimento de aproximadamente 3 mm. Possui placas mandibulares na cabeça e o macho apresenta assimetria na genitália, permitindo distingui-lo da fêmea (WILCKEN, 2008). Os ovos, geralmente, são postos de forma agrupada na folha e apresentam uma coloração negra com leve depressão central. Os sintomas ocasionados na planta pelo ataque do percevejo bronzeado consistem, inicialmente, no prateamento foliar. Com o avanço e intensificação do ataque, ocorre o secamento e queda das folhas, podendo levar à morte da árvore.

A presença do inseto nos plantios de eucalipto se torna cada vez mais preocupante, devido ao efeito danoso que este pode ocasionar na produtividade das florestas. Na busca por minimizar os efeitos negativos causados pelo inseto, é essencial a definição de métodos de controle eficazes, sendo os mais promissores aqueles relacionados ao controle biológico e a seleção de materiais geneticamente resistentes.

A fim de compreender os mecanismos envolvidos no processo de resistência, é relevante a realização de análises em nível genético, por meio do isolamento e identificação de genes. Para o gênero *Eucalyptus*, assim como outros gêneros de interesse comercial, é importante conhecer os genes expressos em condições de estresse, sejam esses estresses bióticos (ataque de pragas ou patógenos) ou abióticos (seca, geadas). Por meio de análises genéticas em indivíduos resistentes e suscetíveis à determinada situação, pode-se determinar gene(s) que esteja(m) envolvido(s) no processo de resistência e, conseqüentemente, obter indivíduos de alto valor genético.

Uma das formas de obtenção desses genes expressos é por meio da construção de bibliotecas de cDNA. A partir dessas, é possível sequenciar apenas as regiões gênicas de interesse, por meio da utilização de células ou tecidos que contenham o RNA expresso durante a situação de estresse à qual o indivíduo está submetido. Os fragmentos de cDNA obtidos são sequenciados, o que permite identificar os genes expressos no momento da extração do RNA (PROSDOSCIMI *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, inferir quanto aos mecanismos genéticos envolvidos na resistência ao estresse avaliado.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar materiais genéticos de *Eucalyptus* spp. quanto à injúria ocasionada pelo percevejo bronzeado e construir, a partir de materiais contrastantes, bibliotecas subtrativas de cDNA que, possivelmente, contenham genes responsáveis pela resposta diferencial da planta ao ataque da praga.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* (Myrtales: Myrtaceae) é de grande importância econômica em diversos países. Possui cerca de 600 espécies já identificadas, muitas de elevado interesse comercial. Destas, apenas duas não são originárias da Austrália (*E. urophylla*, proveniente da Indonésia e *E. deglupta*, presente na Indonésia e em Papúa Nova Guiné) (FONSECA *et al.*, 2010). Abrange espécies de árvores adaptadas à diversos sítios e tipos de sistemas de manejo. Nenhum outro gênero apresentou uma propagação mundial tão intensa quanto o *Eucalyptus*, o qual pode ser encontrado em grande parte das regiões tropicais e temperadas (ELDRIDGE, 1994). Além dessas características favoráveis, o eucalipto se tornou um gênero altamente plantado (Figura 1) por apresentar rápido crescimento, com idade de colheita situada entre 5 e 7 anos, podendo variar de acordo com o objetivo de uso da madeira. Apresenta um bom desempenho até mesmo em solos de baixa fertilidade e um bom crescimento em espaçamentos reduzidos. Em geral, as árvores apresentam o tronco reto e alto, favorecendo o uso múltiplo da madeira, além de possuir boa capacidade de rebrota, entre outros (MOURA E GUIMARÃES, 2003).



**Figura 1:** Plantio de *Eucalyptus* sp. em Minas Gerais. Plantas em estágio inicial de rebrota, a frente, e plantas em estágio próximo à colheita, ao fundo.

Entre os cerca de 90 países que o utilizam em seus plantios comerciais, ressalta-se a África do Sul, China, Índia, Itália, Argentina, Chile, países Árabes, Israel e Brasil (MOURA

E GUIMARÃES, 2003). Dentre as principais espécies do gênero *Eucalyptus* utilizadas em nível mundial, podem-se citar: *E. benthamii*, *E. brassiana*, *E. camaldulensis*, *E. cloeziana*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. nitens*, *E. pellita*, *E. pilularis*, *E. pyrocarpa*, *E. saligna*, *E. smithii*, *E. tereticornis*, *E. urophylla* e *E. viminalis*. (FONSECA *et al.*, 2010).

No Brasil, o gênero *Eucalyptus* foi introduzido em 1868 (MOURA E GUIMARÃES, 2003) e, atualmente, os plantios florestais abastecem diversos setores industriais ligados à cadeia produtiva da madeira, como celulose e papel, painéis de madeira industrializada, processamento mecânico, madeira tratada, siderurgia a carvão vegetal e energia. O consumo brasileiro de toras de madeira de eucalipto em 2012 ultrapassou 130 milhões de m<sup>3</sup>. (ABRAF, 2013).

No ano de 2012, a área ocupada por plantios de *Eucalyptus* no país alcançou 5.102.030 hectares, tal fato configurou um aumento de 4,5% em relação ao ano anterior. Mais da metade dos plantios do gênero estão localizados na região sudeste do país (53%) e os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Paraná detém 83,6% desses plantios (ABRAF, 2013).

Por ser um gênero comercial, a ocorrência de pragas e doenças no *Eucalyptus* acarreta certa preocupação, tanto em condições de viveiro, quanto em plantios já estabelecidos. Pragas exóticas nos plantios têm levado à mortalidade de árvores em diversos países e à redução significativa da produtividade, fato que ocasiona elevada perda econômica. Dentre as principais pragas invasoras do gênero, grande importância é dada ao psilídeo-de-concha, a vespa-da-galha e ao percevejo bronzeado (IPEF, 2012).

## 2.2. O percevejo bronzeado (*Thaumastocoris peregrinus*)

*Thaumastocoris peregrinus* Carpintero e Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), popularmente conhecido como percevejo bronzeado (“bonze bug”) é um inseto de origem australiana (BARBOSA *et al.*, 2010; NADEL E NOACK, 2012). A subfamília Thaumastocorinae, à qual pertence, apresenta-se distribuída por toda a Austrália (com uma única espécie conhecida na Índia) e possui como hospedeiras, preferencialmente, plantas dicotiledôneas (NOACK *et al.*, 2009).

O inseto possui coloração marrom-claro brilhante com algumas áreas de cor mais escura e a antena apresenta quatro segmentos, sendo o segmento apical escuro (CARPINTERO E DELLAPÉ, 2006). Tem o corpo pequeno (2-3 mm) e achatado. Quanto ao hábito alimentar, é fitófago e se alimenta da seiva da planta (NADEL E NOACK, 2012;

WILCKEN *et al.*, 2010). Os ovos são redondo-achatados e possuem coloração preto brilhante com uma leve depressão central (SOLIMAN *et al.*, 2012). Podem ser encontrados de forma dispersa nas folhas e ramos, mas tipicamente são colocados de forma agrupada (Figura 2), com as posturas se assemelhando à manchas negras nas folhas (JACOBS E NESER, 2005). As ninfas possuem olhos avermelhados e cinco estádios. O tempo de duração do período ninfal e a longevidade do indivíduo adulto podem variar de acordo com o material genético atacado (SOLIMAN *et al.*, 2012). Em média, o indivíduo apresenta um ciclo de vida relativamente curto (35 dias) e a fêmea pode produzir até 60 ovos (JACOBS E NESER, 2005).



**Figura 2:** *Eucalyptus* sp. infestado por *Thaumastocoris peregrinus*. Presença de adultos, ninfas e ovos agrupados na face abaxial da folha.

Há alguns anos, *T. peregrinus* se estabeleceu como um inseto-praga, sendo encontrado atacando diversas espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* localizadas na região metropolitana de Sydney e em cidades na região de New South Wales – Austrália (NOACK *et al.*, 2009). Dentre as espécies do gênero, duas se destacaram pela intensidade com a qual foram atacadas pelo percevejo, *Eucalyptus scoparia* e *E. nicholii* (NOACK E ROSE, 2007).

O percevejo bronzeado é uma praga com alto potencial de adaptação, uma vez que consegue se estabelecer em locais que apresentam condições climáticas distintas. Por ser uma praga exótica sem inimigo natural pré-estabelecido, o inseto se disseminou de forma rápida e

intensa em nível mundial, apresentando ampla distribuição geográfica. No Brasil, a primeira informação de sua presença em árvores do gênero *Eucalyptus* ocorreu no ano de 2008 no município de São Francisco de Assis (RS), onde foi visto atacando clones híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*. Posteriormente, foi encontrado em outros municípios, também, do Rio Grande do Sul, além de municípios dos estados de Minas Gerais (2008), Espírito Santo (2009), Rio de Janeiro (2009), Paraná (2009), Mato Grosso do Sul (2009) e São Paulo (2009) (WILCKEN *et al.*, 2010).

Em São Paulo, o inseto foi visualizado atacando árvores de eucalipto em diversas situações e níveis de intensidade, se mostrando presente tanto em plantas isoladas quanto em plantios homogêneos, variando quanto à sintomatologia desde à ausência de sintomas até a ocorrência de sintomas graves, característicos de infestações intensas (WILCKEN *et al.*, 2010). Ainda no ano de 2009 foi constatada a presença do inseto no estado de Santa Catarina, sendo inicialmente encontrado no município de Chapecó em brotações e plantas adultas de *E. camaldulensis* e em plantios de *E. grandis*. Ademais, se mostrou presente em outras cidades do estado, atacando, além das espécies citadas anteriormente, árvores de *E. tereticornis* (SAVARIS *et al.*, 2011). Recentemente, foi registrada sua ocorrência no estado de Goiás (2011), atacando árvores de *E. camaldulensis* e *E. urophylla* (PEREIRA *et al.*, 2013).

*Thaumastocoris peregrinus* também é encontrado em diversos outros países, podendo citar sua ocorrência na África do Sul (2003) atacando indivíduos de *E. camaldulensis*, híbridos de *E. camaldulensis* x *E. grandis*, *E. nicholii*, dentre outras, apresentando variados graus de infestação de acordo com a espécie em estudo (JACOBS E NESER, 2005). Na ocasião do registro, o percevejo foi erroneamente identificado como *T. australicus*. Este fato foi corrigido posteriormente (CARPINTERO e DELLAPÉ, 2006) ao constatar que se tratava de *T. peregrinus*. Outros países, como a Argentina (CARPINTERO e DELLAPÉ, 2006), Uruguai (MARTÍNEZ e BIANCHI, 2010), Chile (IDE *et al.*, 2011), Itália (LAUDONIA e SASSO, 2012) e Nova Zelândia (SOPOW *et al.*, 2012), também apresentaram ocorrência do percevejo bronzeado em seu território.

O percevejo bronzeado ocasiona uma sintomatologia característica nas plantas atacadas, a qual é constituída inicialmente pelo prateamento foliar (em decorrência da clorose da folha), seguida do bronzeamento foliar. Caso a infestação seja intensa, esses sintomas se agravam, levando ao secamento e queda das folhas, podendo culminar na morte da árvore (JACOBS E NESER, 2005; WILCKEN *et al.*, 2010; SOLIMAN *et al.*, 2012). Quanto ao ataque, este ocorre preferencialmente em folhas completamente expandidas (NADEL E NOACK, 2012) e os sintomas podem ser visualizados por toda a copa à medida em que a

infestação progride (JACOBS E NESER, 2005). Ao se alimentar da planta, o percevejo excreta uma substância denominada “honeydew”, cuja presença na superfície foliar auxilia na detecção de materiais mais e menos atrativos ao inseto (BARBOSA *et al.*, 2012). O honeydew é rico em açúcares e se torna um problema adicional para a planta atacada, visto que pode atrair várias espécies de insetos prejudiciais a mesma. Além disso, o honeydew pode favorecer o desenvolvimento de fungos, formando a fumagina, que recobre a planta e afeta os processos fotossintéticos e de respiração foliar (LAZZARI E CARVALHO, 2009).

Até o momento, não se tem um método estabelecido para controlar o avanço da praga, porém, estudos estão sendo realizados tendo em vista a seleção de genótipos resistentes e de possíveis inimigos naturais do percevejo bronzeado. Jacobs e Nesar (2005) em um estudo preliminar da presença do percevejo bronzeado na África do Sul, classificaram diversas espécies quanto à intensidade do dano ocasionado. Dentre as mais de 15 espécies avaliadas, *E. camaldulensis*, *E. nicholii*, *E. scoparia* e *E. tereticornis* sofreram danos elevados. Por outro lado, espécies como *E. myrocoris*, *E. ovata*, *E. pilularis*, *E. robusta* e *E. sideroxylon* não apresentaram danos visíveis. Soliman *et al.* (2012) realizou um trabalho onde avaliou o comportamento biológico do percevejo bronzeado em espécies e híbridos de eucalipto distintos, permitindo a detecção de materiais mais favoráveis ao desenvolvimento e reprodução do inseto (*E. urophylla* e *E. grandis*).

Quanto ao controle biológico, alguns estudos estão sendo realizados com indivíduos entomófagos e entomopatógenos. Souza *et al.* (2012) constatou a presença de *Supputius cincticeps* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae), predando indivíduos de *T. peregrinus* em eucaliptos no estado de Santa Catarina. Testes foram realizados em laboratório para avaliar a predação do inseto sobre as ninfas do percevejo bronzeado e este se mostrou passível de uso para o controle da praga. Além deste, o parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) se mostra promissor, uma vez que tem como hospedeiro o *Thaumastocoris peregrinus* (LIN, 2007). No mês de agosto de 2012 foi realizada uma liberação do parasitoide em plantio florestal infestado pela praga. Algumas semanas após esse procedimento, foram coletadas amostras para verificação e foi possível observar a emergência do parasitoide, o qual se mostrou capaz de completar seu ciclo biológico nas condições de campo, passo importante para o estabelecimento do inimigo natural (IPEF, 2012).

Em outra ocasião, foi observada a ocorrência do fungo *Beauveria bassiana* colonizando ninfas do percevejo no estado do Rio Grande do Sul (ALFENAS *et al.*, 2009). Lorencetti (2013) estudou o potencial de isolados de *B. bassiana* e *Isaria* sp. no controle do inseto, concluindo que ambos são patogênicos ao *T. peregrinus*, tendo a mortalidade variado



entre 37 e 80,1% para o primeiro e sendo de 87% para o segundo, decorridos 10 dias da aplicação.

Apesar de não ser muito indicado devido aos custos, possíveis impactos ao meio ambiente e os entraves acarretados aos processos de certificação florestal, o controle químico também teve sua eficácia testada quanto à capacidade de controlar o *Thaumastocoris peregrinus*. Noack *et al.* (2009) realizou testes em árvores de *Eucalyptus scoparia* localizadas nas áreas urbanas de Sydney, por meio da aplicação de doses de imidacloprid. O inseticida sistêmico se mostrou eficaz para o controle do inseto, proporcionando significativa redução das populações do percevejo bronzeado nas árvores tratadas em comparação com as não tratadas.

### **2.3. Expressão gênica e a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA**

As plantas apresentam diversos mecanismos envolvidos na reação aos estresses bióticos e abióticos. A resposta do organismo aos estresses bióticos (pragas e doenças) está sujeita à compatibilidade ou incompatibilidade resultante da interação patógeno x hospedeiro, ou seja, se o patógeno é virulento e a planta é suscetível ou se o patógeno é avirulento e a planta é resistente (CHEN *et al.* 2002).

As plantas sob estresse emitem respostas que envolvem a ativação coordenada de genes defensivos em uma mesma célula. Esses genes, quando ativados, podem ser responsáveis pela codificação de enzimas, proteínas ou produtos estruturais. Esses produtos da expressão gênica podem ser divididos em três classes: genes que modificam a matriz celular, por meio de alteração na parede celular; genes que codificam proteínas com atividade antimicrobiana ou que catalisam a síntese de antibióticos e genes que codificam proteínas relacionadas a mecanismos de defesa (patogênese) (FREITAS E LAUXEN, 2003).

A identificação de genes envolvidos no processo de defesa do organismo pode ser feita por meio da análise da expressão gênica, a qual permite determinar genes que estão ativos na planta quando submetida ao estresse. Na análise dos organismos eucariotos, comumente opta-se pelo sequenciamento apenas das regiões gênicas, a partir de informações provenientes do RNA mensageiro. Diante dessas informações obtidas do mRNA, é feita a construção de bibliotecas subtrativas de cDNA (SSH – Suppression Subtractive Hybridization library) (PROSDOCIMI *et al.* 2002). Os fragmentos de cDNA são então clonados em vetores plasmidiais (Figura 5) e posteriormente sequenciados. As sequências originadas (ESTs – Expressed Sequence Tags) consistem em fragmentos dos genes que foram expressos no

momento da extração de RNA do organismo em estudo. Assim, os genes que conferem a resistência podem ser identificados.

Os métodos baseados na análise de fragmentos de cDNA amplificados e via sequenciamento são definidos como métodos abertos, uma vez que não é necessário conhecimento prévio quanto ao genes em estudo (CALSA JUNIOR *et al.*, 2004). Em espécies florestais, a produção de bibliotecas subtrativas já foi utilizada para a análise de genes envolvidos na formação da madeira de *Eucalyptus* (PAUX *et al.*, 2004), assim como para a identificação de genes diferencialmente expressos em *Pinus* inoculado com o nematóide-da-madeira (*Bursaphelenchus xylophilus*) (SANTOS e VASCONCELOS, 2012). A técnica também foi utilizada no estudo de genes envolvidos na formação do xilema em *Pinus taeda* (ALLONA *et al.*, 1998), na detecção de genes induzidos no início da calogênese adventícia em *Pinus pinea* (ALONSO *et al.*, 2007), identificação de genes expressos durante a formação do xilema em *Eucalyptus* (FOUCART *et al.*, 2006), determinação de genes envolvidos na regulação da simbiose entre *Eucalyptus globulus* e *Pisolithus tinctorius* (VOIBLET *et al.*, 2001), entre outros.

A identificação dos genes envolvidos no processo de resistência é interessante não apenas para se conhecer o funcionamento metabólico e os mecanismos ativos no indivíduo durante a situação de estresse, mas, também, quando se objetiva a manipulação gênica para o desenvolvimento de organismos resistentes à situações prejudiciais. Uma vez identificado, um gene pode ser isolado do genoma, sequenciado e posteriormente estudado para determinar sua função específica (FITZGERALD-HAYES E REICHSMAN, 2010).

No que se refere à obtenção de organismos resistentes ao ataque de pragas, diversos avanços ocorreram nos últimos anos, sobretudo devido ao aprimoramento das técnicas biotecnológicas. Plantas modificadas geneticamente para manifestarem resistência ao ataque de insetos, são resultado dos avanços das técnicas em engenharia genética e biotecnologia. Essas duas áreas, quando combinadas, originam uma estratégia adicional e proveitosa ao manejo integrado de pragas (MIP) (MARTINELLI E OMOTO, 2005).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

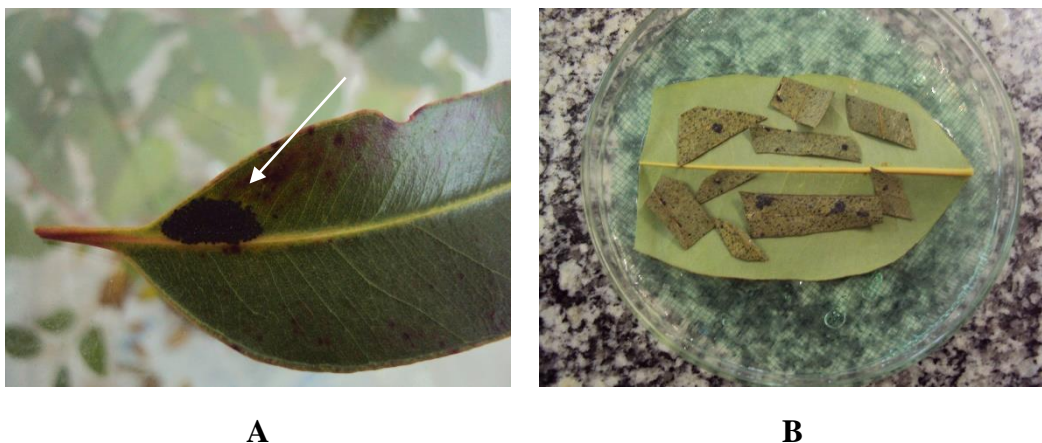
#### 3.1. Fonte do material vegetal

As mudas de *Eucalyptus camaldulensis* utilizadas nos experimentos foram obtidas por propagação seminal, realizada no Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF), pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal e localizado no Campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) – Diamantina/MG. Os vinte e sete clones híbridos de *Eucalyptus* spp. utilizados foram cedidos pela empresa Gerdau S/A.

#### 3.2. Coleta/Obtenção dos insetos

As posturas e os insetos adultos utilizados foram coletados em árvores de *Eucalyptus* spp. infestadas e localizadas no Campus JK da UFVJM. Ainda, algumas posturas e indivíduos adultos foram fornecidos pelo Laboratório de Entomologia da Embrapa Florestas, localizada no município de Colombo/PR.

Para a obtenção das ninfas, as folhas com ovos foram removidas das árvores e transportadas ao laboratório, onde foram lavadas em água corrente. Fez-se o recorte das posturas e estas foram mantidas sobre uma folha saudável de eucalipto (Figura 3), em placas de Petri contendo uma camada de gel agrícola coberto por voil, até o momento da eclosão. As placas foram mantidas em BOD sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo equivalente à 12hL/12hE.



**Figura 3:** Obtenção das ninfas. (A) Folha com posturas de *T. peregrinus*; (B) Placa de petri contendo uma folha de eucalipto, com posturas recortadas.

### 3.3. Avaliações de genótipos de *Eucalyptus* spp. sob ataque de *T. peregrinus*

No processo de construção das bibliotecas de cDNA foram utilizados materiais genéticos que apresentaram diferentes respostas à injúria ocasionada pelo percevejo. Para a escolha dos materiais, foram utilizadas as seguintes metodologias:

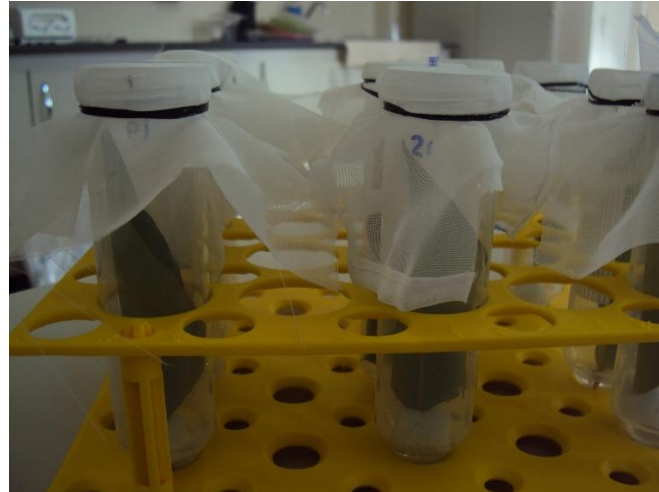
#### 3.3.1. Avaliação da sobrevivência

Inicialmente, foram utilizadas placas de Petri com um diâmetro de 90 mm esterilizadas. Em cada placa foram adicionadas 2 folhas de papel filtro recobertas por voil, umedecido com água destilada esterilizada, a fim de manter a turgescência foliar. Foram realizadas 3 repetições para os clones avaliados (1 ao 10) e em cada placa foi mantida uma folha saudável de cada um dos clones, a qual foi infestada com 10 ninfas recém-eclodidas. As placas foram mantidas em BOD sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12hL/12hE (Figura 4). A troca das folhas ocorreu sempre que necessário. Foi avaliada a sobrevivência dos insetos até o momento em que o número de indivíduos fosse nulo.



**Figura 4:** Sobrevivência em placas de petri. (A) Ninfa recém-eclodida de *Thaumastocoris peregrinus*, utilizada no experimento; (B) Placas de petri contendo adultos de percevejo bronzeado, armazenadas em BOD.

Posteriormente, a avaliação da sobrevivência dos indivíduos foi realizada em tubos confeccionados em material plástico transparente (tubos Falcon), com capacidade volumétrica equivalente à 50 ml. Em cada tubo foram mantidos dois indivíduos adultos do percevejo bronzeado e uma folha do clone avaliado. A base da folha foi presa à uma espuma e mantida na água, os tubos foram vedados com voil para manter a aeração (Figura 5). O material foi armazenado em BOD sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12hL/12hE. A troca das folhas ocorreu sempre que necessário.



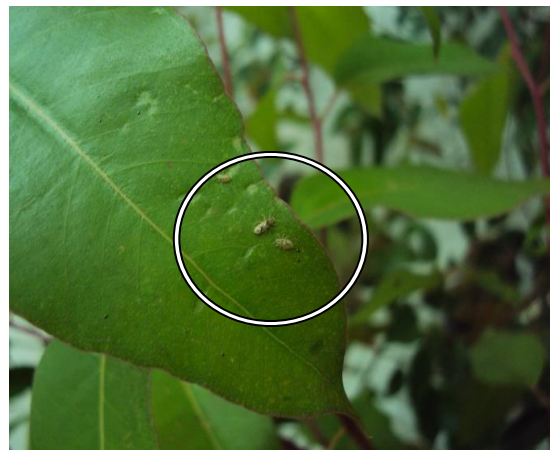
**Figura 5:** Tubos plásticos vedados com voil, contendo uma folha do clone e dois indivíduos de *T. peregrinus*.

### 3.3.2. Avaliação da sintomatologia

A fim de avaliar a ocorrência de sintomas típicos do ataque do percevejo bronzeado, duas mudas sadias de cada um dos 27 clones foram transferidas para uma sala climatizada, localizada no CIPEF, totalizando 54 mudas. Indivíduos adultos e ninfas de *Thaumastocoris peregrinus* foram coletados e transferidos para todas as mudas. A sala foi mantida sob temperatura controlada equivalente à 23 °C e fotoperíodo de 12hL/12hE (Figura 6). Foi avaliado o aparecimento dos sintomas típicos nos clones atacados.



**A**



**B**

**Figura 6:** Avaliação da sintomatologia em sala climatizada. (A) Mudanças dispostas em bandejas; (B) Indivíduos de *T. peregrinus*.

### 3.3.3. Avaliação do período ninfal

Três mudas de cada um dos 27 clones híbridos foram transferidas para casa de vegetação e distribuídas aleatoriamente. Foram colocadas duas gaiolas em cada muda e 10 ninfas recém-eclodidas por gaiola (Figura 7). As gaiolas foram confeccionadas em material plástico transparente fechado nas extremidades com uma espuma e continham um orifício na lateral coberto com voil para manter a aeração. O desenvolvimento das ninfas foi acompanhado até o aparecimento do indivíduo adulto, permitindo a verificação do período ninfal.



**Figura 7:** Muda de *Eucalyptus* sp. com folha individualizada na gaiola e já infestada com as ninfas do percevejo bronzeado.

## 3.4. Construção das bibliotecas de cDNA

### 3.4.1. Aclimação, infestação e coleta dos materiais pré-selecionados

Foram utilizadas três mudas de cada um dos clones escolhidos (C03 e C17) e três mudas de *E. camaldulensis*, as quais foram transferidas para uma sala climatizada (23 °C; 12hL/12hE). Foi escolhida uma folha saudável de cada uma das mudas correspondentes aos materiais genéticos testados. Estas folhas foram individualizadas em gaiolas plásticas (Figura 8) idênticas às utilizadas no procedimento 3.3.3. Cada folha foi infestada com 10 indivíduos adultos de *T. peregrinus*. As mudas foram mantidas sob condições de ataque por um período equivalente a 48 h. Após esse período, foi feita a remoção das folhas e os percevejos foram retirados. As folhas foram dispostas em sacos plásticos devidamente identificados e imediatamente congeladas em caixa contendo nitrogênio líquido. Ao final do procedimento de

coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório de genética e biotecnologia florestal, onde foram armazenadas em Ultra freezer (-80°C) até o momento do uso.



**Figura 8:** Folha no interior da gaiola, antes da infestação pelo percevejo.

### 3.4.2. Extração do RNA total

As amostras coletadas dos materiais C03, C17 e *E. camaldulensis* foram submetidas ao processo de isolamento do RNA total por meio do uso do reagente de extração PureLink® Plant RNA Reagent (Life Technologies) de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante para isolamento em pequena escala ( $\leq 0,1\text{g}$ ).

Para tal, foi feita a trituração do material com graau e pistilo de porcelana, livres de RNase, sob nitrogênio líquido. A amostra triturada foi transferida para um tubo de 1,5 ml, em polipropileno, livre de RNase, resfriado com N<sub>2</sub> líquido, o qual foi adicionado de 500  $\mu\text{l}$  do reagente de extração (resfriado a 4 °C) e agitado até ressuspender a amostra. O tubo foi mantido em temperatura ambiente por 5 minutos na posição horizontal e, após esse período, submetido à centrifugação a 12.000  $\times\text{g}$  por 2 minutos. O sobrenadante formado foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml, adicionado de 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M e homogeneizado. Foram adicionados 300  $\mu\text{l}$  de clorofórmio ao tubo e a homogeneização foi feita por meio de seguidas inversões. A amostra foi centrifugada à 12.000  $\times\text{g}$  por 10 minutos a temperatura de 4 °C. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml ao qual foi acrescentado um volume de 2-propanol. A amostra foi misturada por agitação do tubo e deixada em temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida, foi submetida à centrifugação (12.000  $\times\text{g}$ ;

10 minutos; 4 °C). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao tubo 1.000 µl de etanol 75%. O material foi submetido à uma nova centrifugação (12.000 xg; 1 minuto; temperatura ambiente). O sobrenadante foi novamente descartado e uma nova centrifugação foi realizada para coletar o líquido residual, o qual foi removido com o auxílio de uma pipeta. Por fim, foram adicionados 30 µl de água livre de RNase (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen) à amostra para a completa dissolução do pélete. As amostras foram armazenadas em Ultra freezer (-80 °C).

Todos os materiais utilizados foram tratados para eliminação de enzimas RNases. As vidrarias foram esterilizadas em estufa à 150 °C por 4 horas, os utensílios de plástico foram autoclavados e as bancadas e demais materiais foram limpos com solução SDS 0,5% ou solução RNase-OFF (Takara). Luvas descartáveis foram utilizadas durante o manuseio das amostras e os reagentes necessários foram preparados com solução de diethylpirocarbonato (DEPC) a 0,1%.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro LambdaBio (PerkinElmer). A integridade das amostras extraídas foi averiguada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em tampão TAE 1X. A captação da imagem foi feita em transiluminador UV (L-PIX. Loccus Biotecnologia).

#### **3.4.3. Tratamento do RNA Total com DNase I**

As amostras de RNA total foram submetidas à tratamento com a enzima DNase I (Thermo Scientific), conforme procedimentos sugeridos pelo fabricante, objetivando a eliminação do DNA genômico presente nas preparações.

#### **3.4.4. Purificação do RNA total**

Para obtenção do mRNA, as amostras de RNA total foram purificadas com o uso do conjunto de reagentes do kit NucleoTrap® mRNA (Macherey-Nagel), conforme procedimentos fornecidos pelo fabricante dos reagentes.

O material filtrado, contendo o RNA mensageiro, foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em tampão TAE 1X. A captação da imagem foi feita em transiluminador UV (L-PIX. Loccus Biotecnologia). As amostras purificadas foram armazenadas à -80 °C.



### 3.4.5. Síntese da primeira fita

O preparo das bibliotecas de cDNA, desde a síntese da primeira fita até a etapa de amplificação por PCR, foi realizado por meio da utilização do conjunto de reagentes PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech), seguindo as instruções do fabricante.

Em tubos de 0,6 ml (um para cada material genético avaliado) foram adicionados 3 µl do RNA purificado (item 3.6) e 1 µl do cDNA Synthesis primer. As amostras foram misturadas, centrifugadas e incubadas a 70°C por 2 minutos, sendo em seguida resfriadas em gelo por 2 minutos. Após breve centrifugação, os seguintes reagentes foram adicionados a cada tubo:

- 2 µl do tampão da enzima (5X First-Strand Buffer),
- 1 µl de dNTP Mix,
- 1 µl de água estéril,
- 1 µl de DTT,
- 1 µl da enzima SMARTScribe Reverse Transcriptase.

O conteúdo dos tubos foi cuidadosamente misturado, brevemente centrifugado e as amostras incubadas a 42°C por 1,5 horas. Os tubos foram mantidos no gelo e imediatamente procedeu-se com as etapas para a síntese da segunda fita.

### 3.4.6. Síntese da segunda fita

Os seguintes reagentes foram adicionados aos tubos de 0,6 ml contendo 10 µl da reação de síntese da primeira fita:

- 48,4 µl de água estéril,
- 16 µl de tampão da enzima (5X Second-Strand Buffer),
- 1,6 µl dNTP Mix (10mM),
- 4 µl de 20X Second-Strand Enzyme Cocktail.

O conteúdo do tubo foi homogeneizado, brevemente centrifugado e, em seguida, foi incubado por 2 horas a 16 °C no termociclador. Foram adicionados 2 µl da enzima T4 DNA Polimerase ao tubo, após homogeneização, o material foi incubado à 16 °C por 30 minutos e foram acrescentados 4 µl do 20X EDTA/Glycogen Mix para finalizar a síntese da segunda

fita. Foram adicionados 100 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) aos tubos, os reagentes foram homogeneizados em agitador e as amostras centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente para separar as fases. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de 0,6 ml adicionado de 100 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O conteúdo foi misturado no vortex e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante novamente coletado e transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 40 µl de NH<sub>4</sub>OAc e 300 µl de etanol 95%. Os tubos foram submetidos a centrifugação por 20 minutos a 140000 rpm em temperatura ambiente. Foi feito o descarte do sobrenadante e o pélete foi adicionado de 500 µl de etanol 80%. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi novamente descartado. O pélete foi seco ao ar durante 10 minutos para eliminar resíduos de etanol e, em seguida, foi dissolvido em 50 µl de água estéril.

#### **3.4.7. Clivagem com a enzima Rsa I**

Foram adicionados os seguintes reagentes em cada tubo:

- 43,5 µl do cDNA dupla fita,
- 5 µl do tampão da Rsa I (10X Rsa I Restriction Buffer)
- 1,5 µl da Rsa I (10U/µl)

Os reagentes foram misturados, brevemente centrifugados, incubados a 37°C por 1,5 h em termociclador e adicionados de 2,5 µl de EDTA/Glycogen Mix para finalizar a reação. Foram adicionados 50 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) aos tubos, os reagentes foram homogeneizados no vortex e as amostras centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente para separar as fases. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de 0,6 ml adicionado de 50 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), o conteúdo foi misturado no agitador e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante novamente coletado e transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 25 µl de NH<sub>4</sub>OAc e 187,5 µl de etanol 95%. Os tubos tiveram o conteúdo misturado no vortex e, em seguida, foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Foi feito o descarte do sobrenadante e 200 µl de etanol 80% foram adicionados ao pélete, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi seco ao ar durante

10 minutos para eliminar resíduos de etanol e, em seguida, foi dissolvido em 5,5 µl de água estéril.

### 3.4.8. Ligação dos adaptadores

A ligação realizada foi do tipo “Forward Subtraction”, esse procedimento permite enriquecer sequências diferencialmente expressas presentes na amostra de RNA 1 (cDNA 1, tester) mas não presentes na amostra de RNA 2 (cDNA 2, driver), fornecendo ao final um cDNA subtraído contendo sequências específicas da amostra 1.

#### 3.4.8.1. Preparo do tester (cDNA 1) e do driver (cDNA 2)

Em um novo tubo de 0,6 ml foi feita a diluição de 1 µl do cDNA tester digerido com a Rsa I, por meio da adição de 5 µl de água estéril.

#### 3.4.8.2. Ligação do cDNA tester aos adaptadores

Em um tubo de 0,6 ml foi preparado um “Master Mix”, por meio da adição dos seguintes reagentes (quantidade por amostra):

- 3 µl de água estéril,
- 2 µl de tampão da DNA Ligase (5X Ligation Buffer),
- 1 µl da enzima T4 DNA Ligase.

Em dois novos tubos de 0,6 ml foram adicionados os seguintes reagentes em ordem:

**Tabela 1:** Reagentes e respectivas quantidades, utilizados no procedimento de ligação dos adaptadores 1 e 2R ao cDNA tester

Reagente	Tester 1 - 1	Tester 1 - 2
cDNA tester diluído	2 µl	2 µl
Adaptador 1	2 µl	–
Adaptador 2R	–	2 µl
Master Mix	6 µl	6 µl
<b>Volume final</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

Os reagentes foram completamente misturados com a pipeta.

Em outro tubo de 0,6 ml foram adicionados 2 µl do tester 1-1 e 2 µl do tester 1-2. O material foi submetido à breve centrifugação e incubado à 16 °C em período “overnight”. Foi

adicionado 1  $\mu$ l de EDTA/Glycogen Mix para parar a reação. As amostras foram aquecidas à 72 °C por 5 minutos para inativar a DNA Ligase e brevemente centrifugados, ao final, obteve-se o cDNA tester não subtraído. Em um tubo de 1,5 ml foi adicionado 1  $\mu$ l do tester não subtraído, diluído em 1 ml de água estéril. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

### 3.4.9. Primeira hibridização

Em um novo tubo de 0,2 ml foram adicionados os seguintes reagentes:

**Tabela 2:** Reagentes e quantidades utilizados para o procedimento de hibridização

<b>Reagente</b>	<b>Tester 1 - 1</b>	<b>Tester 1 - 2</b>
Driver digerido com a Rsa I	1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l
Tester ligado ao adaptador 1	1,5 $\mu$ l	–
Tester ligado ao adaptador 2R	–	1,5 $\mu$ l
Tampão de hibridização (4X)	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
<b>Volume final</b>	<b>4 <math>\mu</math>l</b>	<b>4 <math>\mu</math>l</b>

Os reagentes foram misturados, brevemente centrifugados e cobertos com 50  $\mu$ l de óleo mineral. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e incubadas a 98 °C pelo tempo de 1,5 minutos e a 68 °C por um período de 8 horas.

### 3.4.10. Segunda hibridização

Em um novo tubo de 0,2 ml o driver foi preparado por meio da adição dos seguintes reagentes:

- 1  $\mu$ l de cDNA driver,
- 1  $\mu$ l de 4X Hibridization buffer,
- 2  $\mu$ l de água estéril.

Dessa mistura, 1  $\mu$ l foi transferido para um novo tubo de 0,2 ml, incubado a 98 °C por 1,5 minutos e, em seguida, o tubo foi retirado do termociclador. Com o auxílio de uma pipeta de 20  $\mu$ l o conteúdo da amostra tester 1-2 foi totalmente removido, foi criado um espaço de ar na ponteira, seguido da coleta da amostra driver. O conteúdo da ponteira foi imediatamente transferido para o tubo contendo o cDNA tester 1-1, misturado com a pipeta e a reação foi incubada a 68 °C por um período “overnight”. Foram adicionados 200  $\mu$ l do tampão de diluição à amostra, a qual foi aquecida a 68 °C por 7 minutos e armazenada a -20 °C.

### 3.4.11. Amplificação por PCR

Primeiramente foi coletado 1  $\mu$ l do cDNA subtraído e transferido para um novo tubo. Foi preparado um Master Mix no qual foram adicionados os seguintes reagentes em ordem:

- 19,6  $\mu$ l de água estéril,
- 2,5  $\mu$ l do tampão de reação da PCR,
- 0,5  $\mu$ l do dNTP Mix,
- 1  $\mu$ l de PCR Primer 1,
- 0,5  $\mu$ l do Advantage cDNA Polymerase Mix.

Os reagentes foram misturados e o tubo brevemente centrifugado. O Master Mix foi adicionado à amostra de cDNA. As amostras foram incubadas a 75 °C por 5 minutos e a 94 °C por 25 segundos. Em seguida, foi iniciado o ciclo de temperaturas:

- 94 °C por 10 segundos, 66 °C por 30 segundos, 72 °C por 1,5 minutos (27X).

Do tubo utilizado na primeira PCR, foram retirados 3  $\mu$ l e diluídos em 27  $\mu$ l de água estéril. Em outro tubo, foram aliqüotados 1  $\mu$ l da diluição anterior. Para a segunda reação de PCR foi preparado o seguinte Master Mix:

- 18,5  $\mu$ l de água estéril,
- 2,5  $\mu$ l de 10X PCR reaction buffer,
- 1,0  $\mu$ l de Nested PCR primer 1,
- 1,0  $\mu$ l de Nested PCR primer 2R,
- 0,5  $\mu$ l de dNTP Mix,
- 0,5  $\mu$ l de 50X Advantage cDNA Polymerase Mix

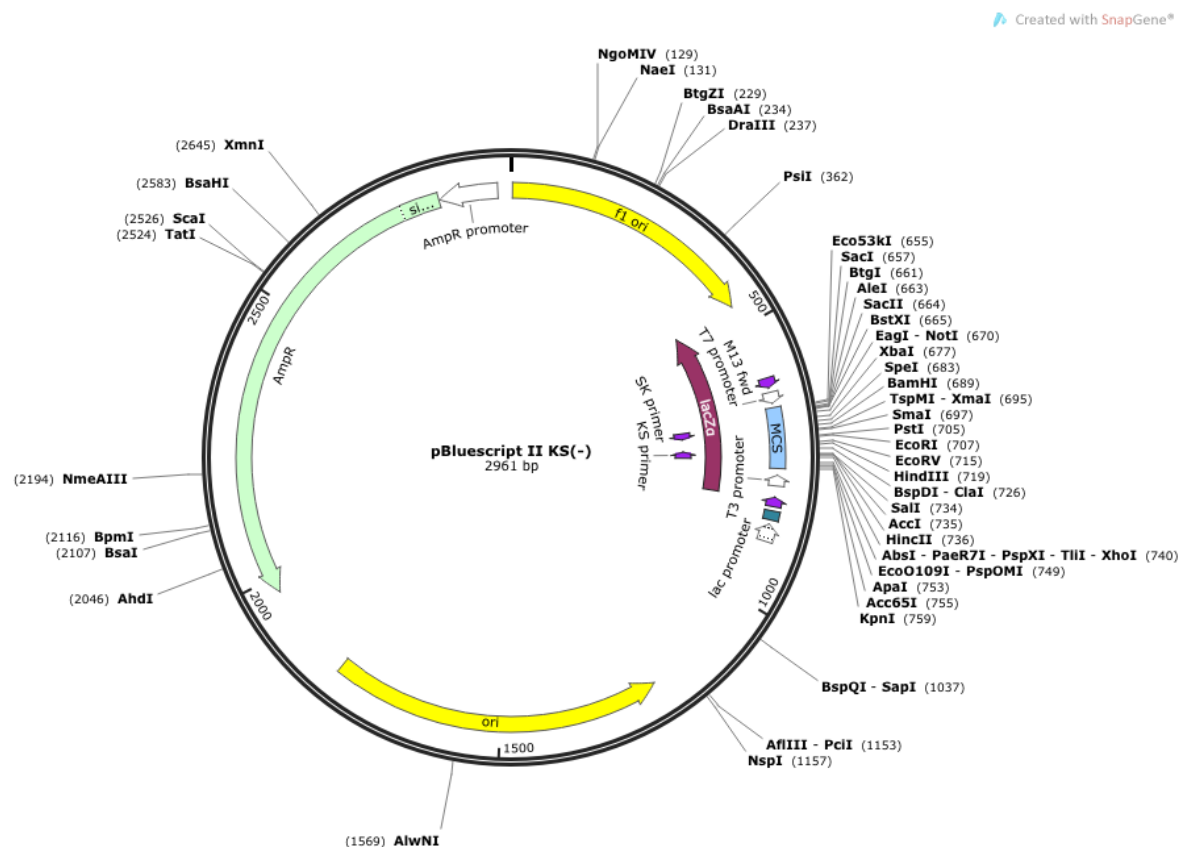
O material foi homogeneizado e brevemente centrifugado. No tubo contendo 1  $\mu$ l da diluição da PCR primária, foram adicionados 24  $\mu$ l do Master Mix. Procedeu-se imediatamente com os seguintes ciclos de temperatura:

- 94 °C por 10 segundos, 68 °C por 30 segundos, 72 °C por 1,5 minutos (12X)

A amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, em tampão TAE 1X. A captação da imagem foi feita em transiluminador UV (L-PIX. Loccus Biotecnologia). Os tubos foram armazenados a -20 °C.

### 3.4.12. Clonagem dos fragmentos

Para o procedimento de ligação dos fragmentos diferencialmente expressos de cDNA referentes aos clones 03 e 17 (tester) e o *E. camaldulensis* (driver) foi utilizado o vetor de clonagem pBluescript II KS (-) (Figura 9). Esse vetor permite a seleção de indivíduos recombinantes por meio da coloração azul/branca das colônias em meio contendo IPTG e X-Gal. Também permite selecionar, em meio com adição do antibiótico ampicilina, apenas as células que receberam o plasmídeo. O pBluescript II KS (-) foi extraído de células de *E. coli* JM109 por meio do método de lise alcalina para extração de DNA plasmidial.



**Figura 9:** Vetor de clonagem pBluescript II KS (-)

Para realizar o procedimento de ligação dos transcritos diferencialmente expressos ao pBluescript II KS (-) foi feita a clivagem do plasmídeo com a enzima EcoRV (Eco32I – Thermo Scientific). Em seguida, partes equimolares de DNA do vetor e de cDNA das

bibliotecas foram misturados em um tubo de polipropileno de 1,5 ml e adicionado a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific), conforme procedimentos recomendados pelo fabricante da enzima.

Após o procedimento de ligação, os plasmídeos foram inseridos em células de *E. coli* (DH10 $\beta$ ) por meio de eletroporação conforme recomendações de Sambrook e Russell (2001).

Tubos de microcentrífuga (1,5 ml) contendo 40  $\mu$ l de células eletrocompetentes, previamente preparadas, foram retirados do Ultrafreezer (-80 °C) e mantidos no gelo até descongelarem. Uma vez descongeladas, foram adicionados à cada tubo 2  $\mu$ l do plasmídeo correspondente, obtido após o processo de ligação. O conteúdo dos tubos foi misturado cuidadosamente com a pipeta e imediatamente transferido para cubetas de eletroporação (BioRad; 0,1 cm). As cubetas foram individualmente inseridas no eletroporador (Eppendorf), onde foram submetidas a uma voltagem equivalente à 1700 volts.

Ao término do processo, o conteúdo foi totalmente removido e transferido para um tubo falcon contendo 1 ml de meio SOC (980  $\mu$ l de SOB (20 g de tripton, 5 g de extrato de levedura, 0,6 g de NaCl; 0,2 g de KCl e água destilada q.s.p 1 l); 10  $\mu$ l de Mg<sup>2+</sup> 2 M; 10  $\mu$ l de glicose 2 M). Os tubos foram mantidos sob agitação à 37 °C por 1 h. As células foram plaqueadas em meio de cultura LB (10 g/L de tripton; 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 15 g/L de ágar) contendo 20  $\mu$ l de ampicilina/placa, e, para a identificação das células recombinantes, foram adicionados 40  $\mu$ l de IPTG/placa e 40  $\mu$ l de X-Gal/placa. Foram inoculados 20  $\mu$ l ou 40  $\mu$ l das células no meio e, em seguida, as placas foram vedadas e mantidas na estufa (37 °C) por um período de 16 – 20 h (overnight).

Decorrido o período de multiplicação, as placas foram retiradas da estufa para a seleção branco/azul das colônias recombinantes (brancas) que contém os fragmentos de cDNA previamente isolados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliações de genótipos de *Eucalyptus* spp. sob ataque de *T. peregrinus*

#### 4.1.1. Avaliação da sobrevivência

Considerando os experimentos realizados em laboratório, os percevejos (adultos e ninfas) sobreviveram por um intervalo curto de tempo sob as condições à que foram submetidos. As ninfas mantidas em placas de Petri apresentaram variação de 1 a 6 dias para o tempo de sobrevivência, havendo 100% de mortalidade ao final desse período. A alta mortalidade de ninfas do percevejo bronzeado, em condições de laboratório, também foi observada por Noack e Rose (2007) que, ao realizarem investigações biológicas do gênero *Thaumastocoris* (desenvolvimento ninfal, longevidade e potencial reprodutivo) atestaram as dificuldades de criação dos indivíduos em ambiente de laboratório. No estudo em questão, além de ter sido encontrada uma baixa percentagem de eclosão das ninfas (40%), a mortalidade das ninfas de 1º instar foi elevada (72%), com a ocorrência de mortes, em menor percentagem, nos estádios subsequentes.

Quanto aos indivíduos adultos, mantidos em tubos plásticos, o tempo de sobrevivência variou de 1 a 11 dias, apresentando 100% de mortalidade ao final desse período. Uma vez que, em média, o período de vida do indivíduo adulto é de cerca de 35 dias (JACOBS E NESER, 2005), os motivos para a não sobrevivência do inseto devem ser investigados, visto que diversos fatores ecológicos (temperatura, umidade, luz) exercem influência neste parâmetro. A longevidade do indivíduo adulto em laboratório pode ser muito variável, de acordo com as condições do experimento. Noack e Rose (2007) encontraram uma longevidade média para *T. peregrinus* machos, de  $16 \pm 16$  dias, com variação elevada no tempo de sobrevivência dos indivíduos (2-38 dias). Soliman *et al.* (2012), ao estudar o comportamento biológico de *T. peregrinus* em espécies e híbridos de *Eucalyptus* observou uma variação de 4 à 78 dias para a longevidade média dos indivíduos adultos.

Devido à alta mortalidade observada e a necessidade de ajustes nos procedimentos anteriores, a avaliação de sobrevivência não foi uma variável utilizada na escolha dos indivíduos a serem analisados geneticamente. Para tal, foram realizadas avaliações de sintomatologia e de duração do período ninfal.

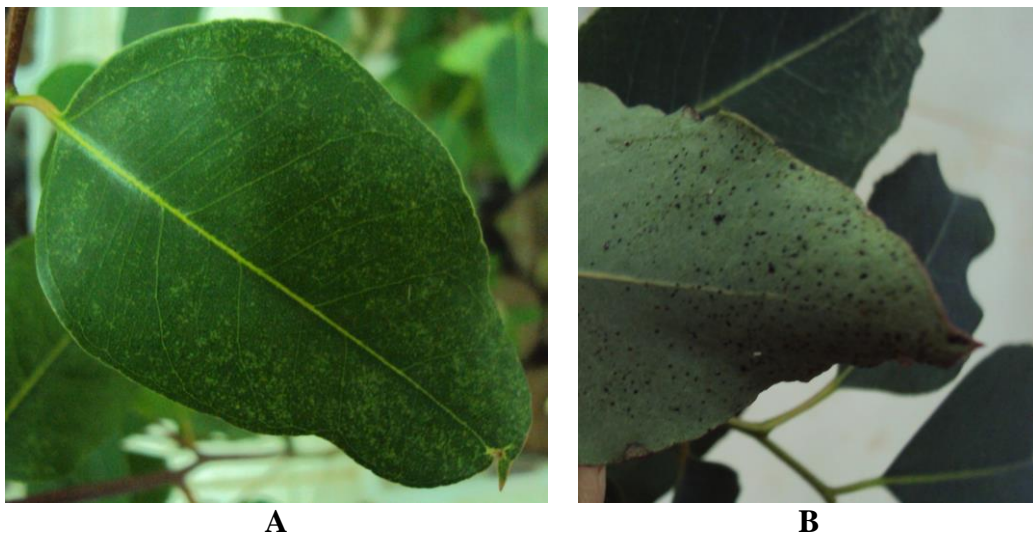


#### 4.1.2. Avaliação da sintomatologia

Ao final das avaliações de sintomatologia na sala climatizada, foi constatada a ocorrência de sintomas típicos do ataque do percevejo (prateamento foliar) em 12 dos 27 clones avaliados. Os clones com sintomas foram: 02, 05, 07, 10, 12, 14, 16, 19, 21, 23, 25 e 27. Os indivíduos de percevejo bronzeado demonstraram propensão ao ataque de materiais genéticos específicos, sendo alguns mais intensamente atacados (maior área atacada) do que outros (clones 02 e 25).

A preferência de *T. peregrinus* por determinadas espécies e/ou híbridos de *Eucalyptus* é um fato já conhecido. Jacobs e Neser (2005), classificaram diversas espécies de *Eucalyptus* quanto à presença de ovos/exúvias, insetos vivos e a intensidade de ataque. Enquanto algumas árvores de *E. camaldulensis* atacadas pela praga já se apresentavam amareladas, árvores de *E. viminalis*, com localização próxima à árvores atacadas, apresentavam apenas alguns poucos insetos, sem a ocorrência de sintomas.

O prateamento foliar foi o sintoma mais comum, servindo como referência para a distinção dos clones mais e menos afetados (Figura 10). Ademais, foi observada a presença de gotículas de honeydew, indicativo adicional da ocorrência de alimentação por *T. peregrinus*.



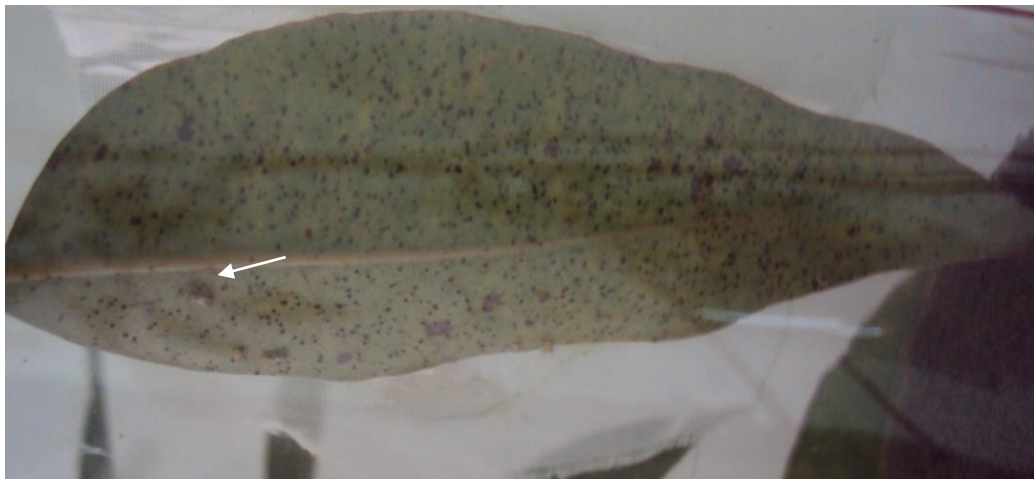
**Figura 10:** Sintomatologia em clones de *Eucalyptus* spp. em sala climatizada. (A) Sintomas de prateamento foliar; (B) Gotículas de honeydew.

#### 4.1.3. Avaliação do período ninfal

Em observações realizadas na casa de vegetação após a infestação das folhas dos clones, a presença do indivíduo adulto de *T. peregrinus* foi constatada em dois materiais genéticos distintos (clones 17 e 18). Tal fato pode ser considerado um indício de

suscetibilidade ao inseto, Nadel e Noack (2012) afirmam que, são considerados eucaliptos suscetíveis ao ataque do percevejo aqueles que abrigam todos os seus estágios de vida, ninfas, adultos e ovos. O período ninfal referente ao clone 17 foi equivalente a 24 dias, já o período ninfal observado no clone 18 foi de 28 dias. Em espécies e híbridos de *Eucalyptus* esse período é variável, podendo, em condições experimentais distintas, ter duração entre 14 e 20 dias (SOLIMAN *et al.*, 2012), entre 20 e 22 dias (NOACK E ROSE, 2007) e entre 14-19 dias (BARDDAL *et al.*, 2010).

As folhas de ambos os clones se mostraram intensamente atacadas (Figura 11), apresentando sintomas de prateamento foliar e alta quantidade de honeydew. Nas demais mudas dos clones avaliados, não foi constatada a presença de ninfas em estágio inicial e/ou avançado de desenvolvimento e/ou de indivíduos adultos do percevejo.

**A****B**

**Figura 11:** Folhas dos clones 17 (A) e 18 (B) após a confirmação da presença do indivíduo adulto de *T. peregrinus*.

Diversos fatores ecológicos influenciam no desenvolvimento e no potencial de sobrevivência de insetos, havendo, por exemplo, faixas de temperatura e umidade ótimas que podem variar para cada indivíduo. A umidade observada nos experimentos de laboratório e nas gaiolas mantidas na casa de vegetação pode ter sido excessiva e, possivelmente, ter gerado um microclima desfavorável ao *T. peregrinus*. Quando a faixa de umidade é desfavorável ao inseto em estudo, este pode sofrer alterações negativas em sua biologia, ocasionando diminuição da longevidade e da fecundidade, menor velocidade de desenvolvimento e alta mortalidade dos indivíduos (SILVEIRA NETO *et al.*, 1976).

Com base nas avaliações realizadas, o material genético C17 foi escolhido por ser o clone no qual o percevejo bronzeado apresentou menor duração do período ninfal. O clone C03 foi escolhido por não expressar injúrias em consequência do ataque do percevejo, quando nas mesmas condições que outros clones visivelmente afetados. Portanto, para o passo seguinte, o clone C03 foi considerado um padrão de resistência e o clone C17 foi considerado um padrão de suscetibilidade.

#### **4.2. Construção das bibliotecas de cDNA**

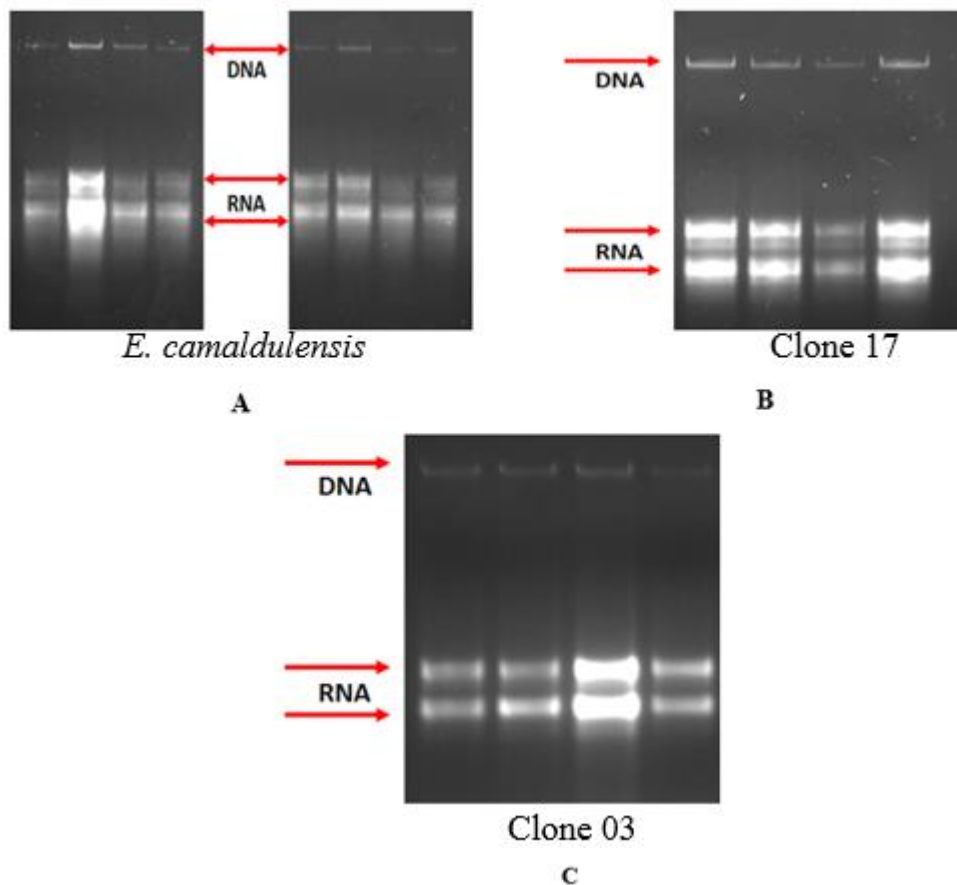
Foram extraídas com sucesso 40 amostras de RNA total dos clones C03, C17 e *E. camaldulensis*. Destas, 16 foram extraídas das mudas de *E. camaldulensis*, 14 das mudas referentes ao clone C17 e 10 das mudas do clone C03. A quantidade de amostras obtidas de cada material genético variou em função da concentração dos RNAs extraídos, sendo o processo de extração realizado até a obtenção de uma quantidade elevada de RNA total, para dar prosseguimento às etapas de purificação ou tratamento com DNase I.

A concentração de RNA total, quantificada em espectrofotômetro Lambda Bio (PerkinElmer), gerou resultados variando de 72 ng/ $\mu$ L à 1576 ng/ $\mu$ L para as amostras. Em média, o valor obtido foi equivalente à 752,7 ng/ $\mu$ L. O material extraído a partir do clone C03 apresentou maior média quanto à concentração das amostras (1.096 ng/ $\mu$ L), com valores oscilando entre 236 ng/ $\mu$ L e 1516 ng/ $\mu$ L. As concentrações das amostras obtidas de *E. camaldulensis* e C17 exibiram valores médios correspondentes à 503,6 ng/ $\mu$ L e 792,3 ng/ $\mu$ L, variando de 72 à 1.562 ng/ $\mu$ L e de 144 à 1.576 ng/ $\mu$ L para os materiais genéticos, respectivamente.

Ademais, foi feita a quantificação das razões de absorbância A260/A280 e A260/A230, a fim de verificar a ocorrência de contaminantes (proteínas, sais, polissacarídeos e/ou outros contaminantes orgânicos) nas amostras (Tabela 3). As razões de absorbância

A260/A280 e A260/A230, apresentaram, em média, valores iguais à 1,52 e 0,95, respectivamente. Esses valores oscilaram de 1,08 à 1,9 para a razão A260/A280 e de 0,39 à 1,82 para a razão A260/A230.

O controle de qualidade do RNA total é essencial quando se pretende utilizar as amostras em processos subsequentes, como, por exemplo, na construção de bibliotecas de cDNA. Análises quantitativas (razões de absorbância A260/A280 e A260/A230) e qualitativas (presença de bandas bem definidas de rRNA) são necessárias para inferir quanto a qualidade do material testado. A integridade do RNA extraído dos materiais genéticos C03, C17 e *E. camaldulensis* foi constatada por meio de observação das imagens do gel de agarose 1%, capturadas em transiluminador UV. Em todas as amostras, as bandas de RNA ribossomal (28S e 18S, com maior e menor peso molecular, respectivamente) foram visíveis e bem definidas. Também foi perceptível a presença de DNA genômico, o qual foi visível mediante a formação de uma banda fina e de alto peso molecular (Figura 12).



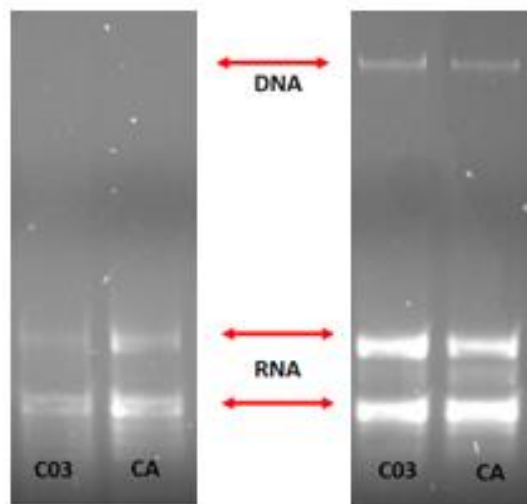
**Figura 12:** Amostras em gel de agarose/EtBr 1% em tampão TAE 1X captadas por transiluminador UV, apresentando duas bandas referentes ao rRNA e uma banda referente ao DNA genômico. Bandas mais intensas indicam maior concentração de rRNA/DNA genômico. (A) *E. camaldulensis*; (B) Clone C17; (C) Clone C03.

**Tabela 3:** Quantificação das 40 amostras de RNA total. Valores aferidos de concentração e das relações A260/A280 e A260/A230. Mgen = material genético; EC = *E. camaldulensis*; C17 = clone 17; 03 = clone 03

<b>Quantificação do RNA Total</b>					
<b>MGen</b>	<b>Identificação da amostra</b>	<b>Concentração (ng/μl)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>	
EC	1	1252	1,34	0,64	
EC	2	468	1,46	0,47	
EC	3	72	1,29	0,62	
EC	4	1024	1,53	0,89	
EC	5	436	1,51	0,70	
EC	6	300	1,60	1,15	
EC	7	592	1,54	1,01	
EC	8	672	1,45	0,82	
EC	9	332	1,43	0,87	
EC	10	504	1,70	1,15	
EC	11	296	1,51	0,94	
EC	12	412	1,34	0,64	
EC	13	328	1,44	0,85	
EC	14	296	1,35	0,77	
EC	15	777	1,54	1,04	
EC	16	296	1,45	0,94	
C17	17	1248	1,90	1,83	
C17	18	1376	1,88	1,70	
C17	19	1204	1,75	1,28	
C17	20	536	1,76	1,49	
C17	21	584	1,72	1,43	
C17	22	144	1,44	1,29	
C17	23	600	1,60	1,23	
C17	24	832	1,68	1,28	
C17	25	700	1,79	1,31	
C17	26	1100	1,83	1,30	
C17	27	404	1,71	1,04	
C17	28	336	1,65	1,04	
C17	29	1576	1,87	1,40	
C17	30	452	1,66	1,12	
C03	31	1516	1,17	0,46	
C03	32	596	1,55	0,93	
C03	33	1236	1,08	0,39	
C03	34	1112	1,26	0,51	
C03	35	1272	1,23	0,53	
C03	36	236	1,18	0,42	
C03	37	1420	1,59	0,81	
C03	38	1188	1,29	0,50	
C03	39	1064	1,45	0,64	
C03	40	1320	1,44	0,67	

O tratamento das amostras com a enzima DNase I, (Figura 13) se mostrou eficiente, uma vez que possibilitou a remoção de todo o DNA genômico presente nas amostras. Nos estudos de expressão gênica, é de grande valia a eliminação completa de qualquer DNA cromossômico do material extraído, uma vez que, a não eliminação deste pode levar à ocorrência de falsos-positivos (BIRTIC e KRANNER, 2006). De acordo com Dash (2012) uma única cópia de DNA cromossômico contaminante na amostra é suficiente para gerar falsos-positivos em estudos que envolvem cDNA e expressão gênica.

Para a realização do tratamento com a DNase I, foram utilizadas amostras com maior concentração de RNA, selecionadas de acordo com a quantificação realizada no espectrofotômetro, em conjunto com as imagens obtidas do gel de agarose 1%. Essas amostras foram escolhidas por garantia, uma vez que perdas em quantidade (concentração) e qualidade (degradação) do material podem ocorrer ao longo das manipulações nos procedimentos subsequentes.

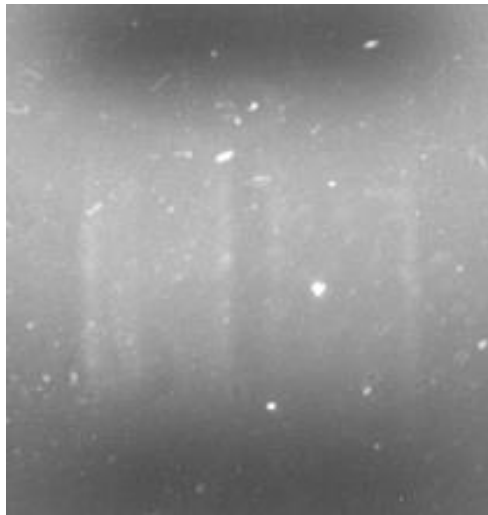


**Figura 13:** Visualização das amostras por eletroforese em gel de agarose/EtBr a 1% em tampão TAE 1X antes (esq.) e após (dir.) o tratamento destas com a enzima DNase I. Setas indicam presença/ausência do DNA genômico e as bandas de rRNA. CA = *E. camaldulensis*; C03 = Clone C03.

Foi observada uma diminuição da quantidade do RNA presente nas amostras tratadas (esq.) em comparação com as amostras não tratadas (dir.). Isto pode ter ocorrido pois, como mencionado anteriormente, a cada manipulação das amostras, estas se tornam sujeitas à perdas em quantidade e/ou em qualidade.

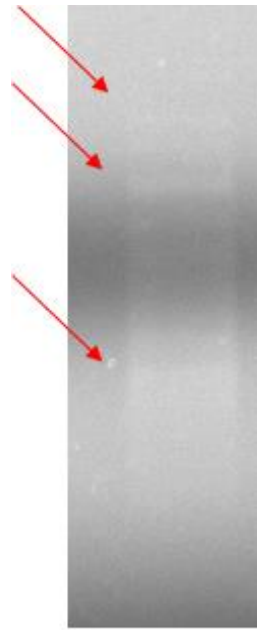
O procedimento de purificação do RNA total, o qual é baseado na retenção do RNA mensageiro por meio da chamada cauda Poly-A, presente em praticamente todas as moléculas de mRNA (FITZGERALD-HAYES E REICHSMAN, 2010), foi realizado com êxito. Após a

purificação, foi visualizado o rastro de RNA no gel de agarose 1%, sem bandas visíveis de DNA genômico ou de RNA ribossômico (Figura 14). O rastro observado apresenta baixa intensidade luminosa, indicando razoável quantidade de mRNA em relação ao RNA total extraído. Isto ocorre devido a quantidade de RNA mensageiro presente em uma célula, geralmente, é de 1 à 5% do RNA total extraído, enquanto que, apenas o RNA ribossomal constitui cerca de 80 – 85% do RNA celular total (SAMBROOK E RUSSELL, 2001).



**Figura 14:** Visualização das amostras por eletroforese em gel de agarose/EtBr 1% em tampão TAE 1X após o procedimento de purificação para a obtenção do mRNA. Clone C17 e *E. camaldulensis*, respectivamente.

Por meio da ação das enzimas transcriptase reversa e DNA polimerase, foi obtido o DNA fita dupla a partir do mRNA. Os procedimentos subsequentes de hibridização subtrativa supressiva (SSH - *Suppression Subtractive Hybridization*) permitiram a obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos entre os clones selecionados (tester) e o *E. camaldulensis* (driver) (Figura 15). A amostra subtraída é visível no gel mediante a presença de um borrão com algumas bandas distintas.



**Figura 15:** Visualização do cDNA subtraído de *E. camaldulensis* e C17 por eletroforese em gel de agarose/EtBr 2%, em tampão TAE 1X, ao final do processo de hibridização subtrativa supressiva (SSH).

Foi realizada a construção de uma biblioteca subtrativa de cDNA a partir do clone C17 em contraste com o *E. camaldulensis*. Outra biblioteca foi obtida a partir do contraste entre o clone C03 e o *E. camaldulensis*.

Para a etapa seguinte (identificação dos transcritos) faz-se necessário o sequenciamento das bibliotecas obtidas, porém, antes de sequenciá-las, os procedimentos de clonagem e transformação em células competentes devem ser executados. Com o objetivo de testar a metodologia das etapas de clonagem e sequenciamento, procedeu-se a ligação em vetor de clonagem, seguida da transformação em células eletrocompetentes DH10 $\beta$ . No entanto, não foram obtidas células recombinantes. Possivelmente a adequação dessa metodologia demandaria tempo elevado, à vista disso, os fragmentos diferencialmente expressos serão novamente clonados e posteriormente sequenciados, após o término da dissertação.



## CONCLUSÕES

Os procedimentos para avaliação do percevejo bronzeado em condições de laboratório carecem de ajustes metodológicos.

Os materiais genéticos de eucalipto apresentam variação quanto à ocorrência de injúrias devido ao ataque do percevejo bronzeado.

A duração do período ninfal do percevejo se mostra variável em clones de *Eucalyptus* spp.

A construção de bibliotecas de cDNA a partir de materiais contrastantes permitiu a obtenção de genes diferencialmente expressos. O posterior sequenciamento das bibliotecas permitirá inferir quanto à funcionalidade destes genes e se os mesmos são responsáveis pela expressão de algum nível de resistência ao ataque de *T. peregrinus*, nos materiais genéticos estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, Acelino C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500 p.
- ALLONA, Isabel. et al. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.95, p.9693–9698, agosto/1998.
- ALONSO, Pablo. et al. Identification of genes differentially expressed during adventitious shoot induction in *Pinus pinea* cotyledons by subtractive hybridization and quantitative PCR. **Tree Physiology**, v.27, p. 1721–1730, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF 2013: ano base 2012**. Brasília: ABRAF, 2013, 148p.
- BARBOSA, Leonardo R. et al. Registro de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) no estado do Paraná. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 30, n. 61, p.75-77, jan./abr. 2010.
- BARBOSA, Leonardo. et al. Efeito de *Eucalyptus* spp. e da superfície foliar na excreção de honeydew e sobrevivência de adultos do percevejo bronzeado. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2012. 3 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 307).
- BARDDAL, Helyn Priscila O. et al. Sobrevivência de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) criados em ramos de *Eucalyptus grandis*. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 23, 2010, Natal.
- BIRTIC, S.; KRANNER, I. Isolation of high-quality from polyphenol- polysaccharide and lipid-rich seeds. **Phytochemical Analysis**, v.17, n.3, p.144-148, 2006.
- CALSA JUNIOR, Tercilio; BENEDITO, Vagner Augusto; FIGUEIRA, Antonio Vargas de Oliveira. Análise Serial da Expressão Gênica. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 88-100, jul./dez. 2004.
- CARPINTERO, Diego Leonardo; DELLAPÉ, Pablo Matías. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, n. 1228, p. 61-68, 2006.
- CHEN, Wenqiong. et al. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 14, p. 559-574, mar. 2002.
- DASH, Prasanta K. High quality RNA isolation from polyphenol-, polysaccharide and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*). **3 Biotech**, n.3, p.109-114, 2012.
- ELDRIDGE, Ken. et al. **Eucalypt: domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, 1994. 288 p.

FITZGERALD-HAYES, Molly; REICHSMAN, Frieda. **DNA and Biotechnology**. 3. ed. New York: Elsevier, 2010. 390p.

FONSECA, Sebastião M. et al. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2010. 200p.

FOUCART, Camille. et al. Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, n. 170, p.739–752, 2006.

FREITAS, Loreta B.; LAUXEN, Mozart S. Mecanismos de defesa contra o estresse em plantas. In: FREITAS, Loreta B.; BERED, Fernanda. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. p. 149-161.

IDE, Sandra M. et al. Detección de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) asociado a *Eucalyptus* spp. en Chile. **Bosque**, Valdivia, v. 32, n. 3, p. 309-313, 2011.

IPEF NOTÍCIAS. São Paulo: Editora Riopedrense, n. 217, set./out. 2012.

JACOBS, D.H; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees. **South African Journal of Science**, v. 101, p. 233-236, maio/jun. 2005

LAUDONIA, Stefania; SASSO, Raffaele. The bronze bug, *Thaumastocoris peregrines*: a new insect recorded in Italy, damaging to *Eucalyptus* trees. **Bulletin of Insectology**, v. 65, n. 1, p. 89-93, 2012.

LAZZARI, Sonia M.N.; CARVALHO, Regina C.Z. Sugadores de seiva (Aphidoidea). In: PANIZZI, Antônio R.; PARRA, José R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos**: Base para o manejo integrado de pragas. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 767-836.

LIN, Nai-Quan; HUBER, Jonh T.; SALLE, Jonh La. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Zootaxa**, n. 1596, p. 1–111, 2007.

LORENCETTI, Grasielle Adriane Toscan. Efeito de fungos entomopatgênicos e produtos naturais sobre *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) e indução de resistência em plantas. Pato Branco, PR, 2013. 70 p.

MARTINELLI, Samuel; OMOTO, Celso. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. **Biociência Ciência e Desenvolvimento**, v. 34, p. 67-77, jan./jun. 2005.

MARTÍNEZ, Gonzalo; BIANCHI, Marta. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Agrociencia**, v.14, n.1, p.15-18, 2010.

MOURA, Vicente Pongitory G.; GUIMARÃES, Daniel P. Produção de mudas de Eucaliptus para o estabelecimento de plantios florestais. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos**, 2003. 9 p. (Embrapa CENARGEN, DF. Comunicado Técnico, 85).

Nadel, Ryan L.; Noack, Ann E. "Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy". **International Journal of Pest Management**, v. 58, n. 3, p. 257-266, jul./set. 2012.

NOACK, Ann E.; ROSE, Harley A. Life-history of *Thaumastocoris peregrinus* and *Thaumastocoris* sp. in the laboratory with some observations on behaviour. **General and Applied Entomology**, v. 36, p. 27-33. 2007

NOACK, Ann. E. et al. Efficacy of Imidacloprid in the Control of *Thaumastocoris peregrinus* on *Eucalyptus scoparia* in Sydney, Australia. **Arboriculture & Urban Forestry**. v. 35, n. 4, p. 192–196, 2009.

PAUX, Etienne. et al. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 263-280. 2004.

PEREIRA, Jaqueline M. et al. Ocorrência de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: *Thaumastocoridae*) no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.2, fev. 2013.

PROSDOCIMI, Francisco. et al. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 29, p. 12–25, nov. 2002.

SAMBROOK, Joseph; RUSSEL, David W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3.ed. v 3. CSH Press:New York, 2001.

SANTOS, Carla S.S.; VASCONCELOS, Marta W. Identification of genes differentially expressed in *Pinus pinaster* and *Pinus pinea* after infection with the pine wood nematode. **European Journal of Plant Pathology**, p. 407- 418, 2012.

SAVARIS, Marcoandre. et al. Primeiro registro de *Thaumastocoris peregrinus* para o estado de Santa Catarina, e novas áreas de ocorrência para o Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n. 11, p. 1874-1876, nov. 2011.

SILVEIRA NETO, Sinval. et al. **Manual de ecologia dos insetos**. 1. ed. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1976. 419 p.

SOLIMAN, Everton P. et al. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different eucalyptus species and hybrids. **Phytoparasitica**, v. 40, p. 223-230, 2012.

SOPOW, Stephanie; George, Sherly; Ward, Nicholas. Bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*: a new *Eucalyptus* pest in New Zealand. **Surveillance**, v.39, p. 43-46, 2012.

SOUZA, Gabriely K. et al. First record of a native heteropteran preying on the introduced *Eucalyptus* pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera:Thaumastocoridae), in Brazil. **Florida Entomologist**, v.95, n.2, p.517-520, junho/2012.

VALE, Rodrigo Silva. **Agrossilvicultura com eucalipto como alternativa para o desenvolvimento sustentável da Zona da Mata de Minas Gerais**. Viçosa, MG, 2004. 101 p.

VOIBLET, Catherine. et al. Identification of symbiosis-regulated gene in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **Plant Journal**, v.25, n.2 p.181-191, 2001.

WILCKEN, C.F. Percevejo bronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras. **IPEF Programa de proteção florestal - PROTEF/IPEF**. Botucatu, SP, set. 2008.

Wilcken, Carlos F. et al. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n.2, p. 201-205. 2010.