

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL – PPGBV

HIRAM MARINHO FALCÃO

**ECOFISIOLOGIA DE CULTIVARES DE *Opuntia ficus-indica* MILL (CACTACEAE)
DE TOLERÂNCIA CONTRASTANTE À COCHONILHA-DO-CARMIM *Dactylopius
opuntiae***

RECIFE

2012

HIRAM MARINHO FALCÃO

**ECOFISIOLOGIA DE CULTIVARES DE *Opuntia ficus-indica* MILL (CACTACEAE)
DE TOLERÂNCIA CONTRASTANTE À COCHONILHA-DO-CARMIM *Dactylopius
opuntiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos

RECIFE

2012

Catálogo na fonte
Elaine Cristina
CRB 1728

Falcão, Hiram Marinho

Ecofisiologia de cultivares de *Opuntia ficus-indica* MILL (Cactaceae) de tolerância contrastante à Cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae* / Hiram Marinho Falcão– Recife: O Autor, 2012.

75 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Mauro Guida dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

1. *Opuntia ficus-indica* 2. Ecofisiologia vegetal 3. Biologia molecular II.
Título

583.56 CDD (22.ed.) UFPE/CCB- 2012- 190

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, no dia 27 de Fevereiro de 2012 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Mauro Guida dos Santos
(Orientador- Departamento de Botânica - UFPE)

Prof. Dr. Everardo V.S.B Sampaio
(Examinador Externo – Departamento de Energia Nuclear - UFPE)

Prof. Dr. Tercílio Calsa Junior
(Examinador Externo – Departamento Genética - UFPE)

RECIFE

UFPE

*Dedico esta dissertação à minha esposa
Juliana, pelo amor e companheirismo
principalmente nos momentos mais
difíceis de dúvida e insegurança, e à
nossa amada filha Maria Clara.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante presença e bondade em todos os momentos de minha vida.

Ao fundamental incentivo e suporte do meu orientador Prof. Mauro Guida dos Santos, que me guiou com paciência e solicitude durante todo o projeto.

À minha mãe e aos meus demais familiares que sempre me apoiaram.

A todos os alunos e amigos que fazem o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal: Marciel, Karla, Rebeca, Frosi, Bruno, João, Sílvia Santos, Bety, Rodrigo, Milena, Laura, Lígia, Sílvia Caroline, Mariana, Camila, Claudjane. Obrigado pela ajuda e companheirismo.

Aos professores Jarcilene Cortez, Marcelo Pompelli e Antônio Fernando pelas valiosas contribuições nos momentos de dúvidas.

À Valesca Pandolfi pelas fundamentais orientações que possibilitaram a conclusão deste trabalho.

A João Pacífico Bezerra Neto, pelo auxílio em bioinformática.

À Prof^a Márcia Vanusa da Silva e à Dra. Adália Mergulhão pelos ensinamentos em Biologia Molecular.

À Dra. Deise Passos e Larissa Borges pelo suporte e valiosos conselhos.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE.

A todo o pessoal do Laboratório GENOMA do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) por ceder a infra-estrutura para execução de etapas importantes deste projeto.

A todos os técnicos e pesquisadores da Estação Experimental de Arcoverde, em especial do Dr. Djalma Cordeiro dos Santos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

A CAPES, pelo apoio financeiro durante esses 24 meses de curso.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Genótipos de *Opuntia ficus-indica*. IPA Clone-20, F-08 e Orelha de Elefante Mexicana, respectivamente.....51
- Figura 2 - Teor de cera epicuticular nos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$52
- Figura 3 - Teor de Açúcares solúveis, Aminoácidos e Proteínas dos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$53
- Figura 4 - Teor de pigmentos fotossintetizantes nos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$54
- Figura 5 - Acúmulo de acidez noturna e atividade de PEP Carboxilase nos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$55
- Figura 6 - Fotografia da eletroforese dos produtos da PCR obtidos dos cDNAs dos genótipos IPA (T1); OEM (T2) e F-08 (T3) de *Opuntia ficus-indica*. O fragmento marcado em vermelho foi o selecionado para seqüenciamento.....56
- Figura 7 - Análise da ORF do segmento de 415 nucleotídeos amplificado de *Opuntia ficus-indica*. Os retângulos em azul correspondem a região codificante no frame +1, separadas entre si por 58 nucleotídeos. Os números correspondem às posições das bases.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados meteorológicos do município de Arcoverde durante o período de coletas...48

Tabela 2 - Produtividade média dos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).....48

Tabela 3 - Resultados da interação via BLASTx e BLASTp, da sequência isolada e sequenciada de *Opuntia ficus-indica*, no banco de proteínas (nr) do NCBI, considerando-se, no mínimo, $e\text{-value} \leq e^{-05}$ 49

LISTA DE ABREVIATIVAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de Carbono
CAM	Metabolismo Ácido das Crassuláceas
PEPC	Fosfoenolpiruvato Carboxilase
NDT	Nutrientes Digestivos Totais
Rubisco	Ribulose 1,5 – bifosfato carboxilase/oxigenase
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
RNA _m	RNA mensageiro
PCR	Polymerase Chain Reaction
DDRT-PCR	Differential Display – Polymerase Chain Reaction
AA	Aminoácidos
AS	Açúcares Solúveis
PRT	Proteínas
Chl a	Clorofila a
Chl b	Clorofila b
Chl Total	Clorofila Total
PVP	Polyvinil Pyrrolidona
DTE	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
MDH	Malato Desidrogenase
NADH	Nicatinamida Adenina Dinucleotídeo
MS	Massa Seca
MF	Massa Fresca
EP	Erro Padrão
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	7
1. APRESENTAÇÃO.....	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1 Palma Forrageira	11
2.2 Cochonilha-do-carmim (<i>Dactylopius opuntiae</i>)	11
2.3 Ecofisiologia da Palma Forrageira	12
2.4 Estresse Biótico	14
2.5 Variedades Resistentes	15
2.6 Biologia Molecular	15
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	17
MANUSCRITO	22
Capa	23
Resumo	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Resultados	31
Discussão	34
Agradecimentos	41
Referências Bibliográficas	41
CONCLUSÕES	58
RESUMO	59
ABSTRACT	61
ANEXO	63

1. APRESENTAÇÃO

Como a maioria dos organismos vivos, as plantas estão expostas a uma série de fatores abióticos como temperatura, água, luminosidade e disponibilidade de nutrientes. Além disso, elas também têm que interagir com vários estresses bióticos como herbívoros ou patógenos, que em ataques severos reduzem a produtividade causando sérios prejuízos à economia. Por este motivo, os efeitos do estresse biótico em plantas no estágio reprodutivo são bem documentados, sendo ainda poucos os trabalhos que atestem esses efeitos na fase vegetativa (SCHMIDT, 2009; MULLER et al., 2009).

Uma grande quantidade de informações está disponível sobre os genes e as rotas de sinalização envolvidas nas respostas das plantas quando submetidas a situações de estresse (TURNER et al., 2002; FUJITA et al., 2006). Alterações no metabolismo primário, na síntese de compostos relacionados à defesa, e na regulação da expressão de genes que coordenam o processo fotossintético têm sido estudadas em plantas como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana attenuata* (WIESE et al., 2007).

Para combater os efeitos do estresse biótico, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa. Durante o estresse biótico ocorre a ativação de um estado de defesa que pode levar a uma resistência adquirida da planta ao estresse. Essa resistência adquirida espalha-se sistemicamente por toda a planta, sinalizando respostas ao estresse em outros órgãos (SLAUGHTER et al., 2011). Culturas como tabaco, algodão e tomate apresentam respostas como síntese de metabólitos secundários, emissão de substâncias alelopáticas ou produção de nectários extraflorais, contra o ataque de organismos (ALBORN et al., 1996; WÄCKERS, 2001; HIRAYAMA & SHINOZAKI, 2010).

A contaminação biológica é o processo de introdução e adaptação de espécies que não fazem parte naturalmente de um determinado ecossistema e que, ao longo do tempo, naturalizam-se, alterando a função e o equilíbrio do ambiente (SANTANA & ENCINAS, 2008). Ao contrário de problemas ambientais que amenizam ao longo do tempo, a introdução de espécies pode causar problemas à longo prazo, como a chegada de pragas e doenças que causam desequilíbrios no funcionamento do ecossistema (WESTBROOKS, 1998).

A palma forrageira é uma importante cultura nas regiões semi-áridas do Nordeste do Brasil (SANTOS et al., 2001). Foi introduzida no Brasil no século XIX para produção de carmim, um corante natural de alto valor de mercado, produzido por uma espécie de cochonilha, também introduzida, conhecida como cochonilha-do-carmim *Dactylopius*

opuntiae (Hemiptera). Os danos causados pela cochonilha são tão expressivos que em certas regiões não se encontra mais palma forrageira (CAVALCANTI et al., 2001). Além disso, os danos da cochonilha já podem ser observados em espécies nativas da Caatinga, como *Cereus jamacaru*, *Melocactus zenhtiner*, *Tacinga inamoema*, *Tacinga palmadora*, entre outras cactáceas e bromeliáceas (CHIACCHIO, 2008).

Em função da relevância desta praga para a cultura da palma forrageira no semi-árido, pesquisas multidisciplinares vêm sendo desenvolvidas a fim de manter a população do inseto-praga em níveis abaixo da densidade em que acarreta danos à produção agropecuária e ao meio ambiente. Nas últimas décadas, muitos trabalhos abordando aspectos fisiológicos da palma forrageira têm sido realizados. No entanto, o foco de tais publicações recai sobre efeitos do estresse abiótico, como elevação de concentração de CO₂, déficit hídrico e altas temperaturas entre outros (ISRAEL & NOBEL, 1994; DRENNAN & NOBEL, 1998; HERRERA, 2009). Os efeitos do ataque da cochonilha-do-carmim na fisiologia da palma forrageira ainda são desconhecidos.

Deste modo, o presente trabalho pretende produzir novos conhecimentos acerca da ação do estresse biótico causado pela cochonilha-do-carmim sobre a fisiologia de genótipos de palma forrageira com diferentes níveis de resistência à praga.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Palma Forrageira

A palma forrageira é uma cactácea originária do México, e atualmente difundida por todo o mundo (SILVA et al., 2008). Sua chegada ao Brasil remonta ao século XIX, tendo sido introduzida para a produção de carmim de cochonilha (SIMÕES et al., 2005).

A palma, taxonomicamente, pertence à família Cactaceae, subfamília Opuntioideae, tribo Opuntiae, gênero *Opuntia* e possui vários subgêneros, entre eles *Opuntia* e *Nopalea*, representadas por espécies como: *Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cocchenillifera* Salm-Dyck (LÓPEZ, et al, 1988). Uma classificação mais recente é relatada por Scheinvar (2001), que afirmou que há quase 300 espécies do gênero *Opuntia*, distribuídas desde o Canadá até a Patagônia, no Chile e na Argentina.

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse econômico na cultura da palma forrageira em diversos sistemas agrícolas do mundo, principalmente nas zonas áridas e semi-áridas. No Nordeste brasileiro, a palma apresenta-se como importante fator da cadeia agroindustrial, promovendo emprego e renda e compondo a cadeia alimentar da região, pelo que representa o leite e seus derivados, tanto social como nutricionalmente (SEBRAE, 1999). Estima-se que o nordeste possua cerca de 500.000 hectares cultivados com palma forrageira, com pelo menos 100.000 hectares distribuídos em Pernambuco (SANTOS et al., 2001).

Em Pernambuco, a pecuária é uma das principais alternativas econômicas, principalmente nas zonas semi-áridas, representadas pelas mesorregiões do Agreste e Sertão (ALBUQUERQUE & SANTOS, 2005). A palma forrageira, especialmente as variedades *Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck, conhecidas respectivamente por palma Gigante ou Clone IPA 20 e Miúda ou Doce, constitui um dos suportes básicos à subsistência dos rebanhos. Esta importância baseia-se no eficiente uso da água, na adaptabilidade a solos pouco férteis, na sua alta produtividade e palatabilidade e sua excelente qualidade nutricional (BARBERA et al., 2001).

2.2 Cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*)

Vários são os fatores que limitam a produtividade da palma. Dentre eles, encontra-se a ocorrência de pragas e doenças. Entre as pragas, destaca-se a cochonilha-do-carmim *Dactylopius* sp., conhecida vulgarmente como “cochonilha de sangue”, principalmente nos Estados de Pernambuco e Paraíba (SANTOS & SANTOS, 2006).

As cochonilhas do gênero *Dactylopius* são pequenos insetos parasitos e fitófagos, que vivem como hospedeiros específicos das espécies de cactáceas, preferencialmente a *O. ficus-indica* (FLORES & TEKELENBURG, 2001). Apresentam-se formando colônias cobertas por uma camada de cera branca flocada, que abriga as formas biológicas do inseto.

As fêmeas adultas são sedentárias, ápteras, de aspecto ovalado, medindo cerca de 2,81 mm de comprimento por 1,87 mm de largura, de coloração marrom avermelhada em virtude da grande quantidade de ácido carmínico, corante vermelho natural de alta qualidade para o homem. Os machos adultos são totalmente diferentes das fêmeas; alados, medindo cerca de 2,2 a 4,8mm de comprimento e 1,3 a 1,5 mm de largura, semelhantes a pequenos dípteros com asas longas e delicadas. Não possuem aparelho bucal e vivem até 4 dias, quando podem fecundar várias fêmeas (LONGO & RAPISARDA, 2001).

Segundo observações de Warumby et al. (1998), o ciclo de vida de *Dactylopius* sp., em condições de laboratório em Pernambuco, é de 35 dias no período de verão e de 45 dias nas épocas mais frias do ano. O período de oviposição dura cerca de 15 dias e a duração das formas migrantes ou ninfas de primeiro instar é de 24 horas, período que corresponde à disseminação da praga no campo.

Seus danos caracterizam-se pela rápida disseminação das formas jovens nas plantas sadias que, mediante mecanismos de sucção, inoculam toxinas causando amarelecimento das raquetes (clorose), apodrecimento, tombamento e morte das plantas. É comum observar-se a associação com agentes patogênicos (fungos e bactérias), que agem sinergicamente com a praga, ocasionando podridões. Conforme Cavalcanti et al. (2001), em ataques mais severos e, se não forem adotadas medidas de controle, pode ocorrer rapidamente a morte das plantas e, conseqüentemente, a destruição do área cultivada.

2.3 Ecofisiologia da Palma Forrageira

A fisiologia da palma forrageira enquadra-se no processo fotossintético das plantas CAM (do inglês *Crassulacean Acid Metabolism*, Metabolismo Ácido das Crassuláceas), caracterizado pela abertura dos estômatos à noite, para a captação de CO₂, devido ao menor déficit de pressão de vapor (DPV), e o seu fechamento durante o dia, com o aumento da temperatura, para hidratação dos tecidos, ao contrário do que ocorre com plantas C3 e C4 que abrem seus estômatos para captação de CO₂ na presença de luz (CHIACCHIO & SANTOS, 2006).

O metabolismo CAM é um exemplo contundente de evolução convergente, que promove incremento na eficiência do uso da água por permitir que parte ou a totalidade da captação de

CO₂ seja realizada à noite (BORLAND et al., 2011). Pelo menos 343 gêneros em 35 famílias (6% das plantas superiores) possuem esse tipo de metabolismo fotossintético (SILVERA et al., 2010).

Durante o período noturno, com a abertura dos estômatos, o CO₂ é fixado pela enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC), formando oxaloacetato que é rapidamente convertido a malato e estocado no vacúolo ao longo da noite. Durante o dia, o malato é descarboxilado e o CO₂ liberado é introduzido pela Rubisco no Ciclo de Calvin (NOBEL, 1996).

A separação temporal da carboxilação dos ciclos C₃ e C₄, que define o metabolismo CAM, promove plasticidade por otimizar o ganho de carbono e o uso da água em resposta à mudanças nas condições ambientais, estendendo ou encurtando o período de captação do CO₂ ao longo do dia (DODD et al., 2002). A plasticidade do metabolismo CAM abre novas oportunidades para diversificação e especiação em plantas de regiões áridas e semi-áridas, ou em microclimas caracterizados pela disponibilidade irregular de água (SILVERA et al., 2005).

Segundo modelos climáticos, que mostram um aumento na frequência de secas nas próximas décadas, as plantas CAM como a palma forrageira, podem ter um papel importante no seqüestro de carbono e sustentabilidade da produção de biomassa (DAVIES et al., 2011).

A palma forrageira contém uma média de 90% de água, variando entre 76% em períodos secos e 95% nos períodos chuvosos (SANTOS et al., 2005). Diferentemente das plantas C₃ e C₄, que utilizam cerca de 1000 Kg e 500 Kg de água, respectivamente, para cada quilo de matéria seca formada, a palma chega a utilizar 50 Kg de água para cada quilo de matéria seca (ALVES et al., 2007). Esse eficiente uso da água se deve à quantidade relativa de transpiração diária, que em plantas C₄ é cerca de 2,9 vezes maior de que na palma, e cerca de 4,7 vezes em plantas C₃. Dessa forma, a conservação da água pelo intercâmbio gasoso na palma forrageira, mais a utilização da água armazenada nos cladódios suculentos, permitem a abertura noturna dos estômatos e a captação de CO₂ por um período mais prolongado em condições de seca (NOBEL, 2001).

A epiderme da palma forrageira é coberta por uma cutícula cerosa com espessura entre 10µ e 50µ (PIMIENTA et al., 1992). Devido a esta grossa cutícula, a palma forrageira é mais impermeável à água e, conseqüentemente, é mais resistente à seca. De fato algumas espécies de *Opuntia* podem reter água para suportar até três anos de seca (GIBSON & NOBEL, 1986).

A composição química da palma é variável conforme as diferenças existentes entre as espécies ou variedades e a fatores como precipitação, idade da planta, ordem dos artículos e tratos culturais (FERREIRA et al., 2003). Possui valores próximos aos das silagens de milho e sorgo, em relação à (NDT) Nutrientes Digestivos Totais (FARIAS et al., 1984). Os níveis de

carboidratos solúveis são considerados altos, chegando a alcançar 58% na palma miúda e 29% na palma gigante (SANTOS et al., 1997). Os teores de proteínas e fibras são baixas em relação às necessidades dos animais, no entanto, seu teor de minerais é elevado. A palma possui ainda alta taxa de digestão ruminal, promovendo maior taxa de passagem no rúmen, devido a rápida e extensa de degradação de sua matéria seca (BISPO et al., 2007).

2.4 Estresse Biótico

Por serem organismos sésseis, as plantas estão constantemente submetidas ao ataque por agentes bióticos, sejam eles herbívoros e/ou patógenos, que causam grandes impactos econômicos e ecológicos (PIMENTEL, 2002). Durante a fase vegetativa, muito do carbono fixado pela planta é investido na produção de metabólitos primários, alocados principalmente no incremento da biomassa, especialmente da raiz e folhas, e posteriormente é utilizado na produção de frutos e sementes na fase generativa (SCHIMDT et al., 2009).

Quando as plantas estão submetidas a estresse biótico, pode ocorrer um investimento maior de carbono na produção de metabólitos secundários relacionados à defesa, como compostos fenólicos ou terpenóides. Os efeitos do estresse biótico vêm sendo amplamente estudados em plantas de interesse agroindustrial como algodão e tabaco. No entanto, o foco desses trabalhos é relacionado a aspectos ecológicos e a mecanismos de defesa, sendo ainda pouco estudados os efeitos do estresse no crescimento vegetativo da planta ao longo do ataque (RÖSE et al, 2006; PLUSKOTA et al., 2007; STEPPHUN et al., 2008).

Durante o estresse, a planta deve balancear os custos relacionados à mecanismos de defesa e à manutenção celular, crescimento e reprodução (ZANGERL & BERENBAUM, 2003). Na presença do fator de estresse, uma cadeia de respostas é iniciada e ocorrem reprogramações gênica, hormonal e química, relacionadas à proteção da planta contra o ataque. Esse ajuste metabólico muitas vezes está associado à perda de performance e produtividade (ZAVALA & BALDWIN, 2004).

Além da realocação de recursos para processos de defesa, é observada diminuição da capacidade fotossintética nos tecidos foliares remanescentes, o que representa um “custo oculto” dos mecanismos de defesa (BILGIN et al., 2008; NABITY et al., 2009).

A relação entre queda na atividade fotossintética e estresse biótico está documentada em vários trabalhos (MACEDO et al., 2003; MAJOR & CONSTABEL, 2006; BOZSO et al., 2009). Analisando o transcriptoma da planta durante o ataque por agente biótico, verifica-se uma sub-expressão de genes relacionados à fotossíntese, como por exemplo, o silenciamento de genes que codificam proteínas centrais do processo fotossintético, a ribulose-1,5-bifosfato

carboxilase/oxigenase (Rubisco) e Rubisco ativase, em *Nicotiana attenuata* durante ataque por herbívoro (GIRI et al., 2006).

2.5 Variedades Resistentes

Nas últimas décadas, O Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) vem trabalhando no melhoramento genético e utilização de clones resistentes como forma de controle de *Dactylopius* sp. (ALBUQUERQUE & SANTOS, 2005). Atualmente o IPA conta com um banco de germoplasma com cerca de 438 clones de palma forrageira testados em competição em campo para maior produtividade e resistência à *Dactylopius* sp. Cinco clones mostraram-se altamente resistentes ao inseto: Miúda ou Doce, F-13, F-15, F-16 e Orelha de Elefante (SANTOS et al., 2006). Resultados semelhantes para “Miúda” foram observados por Gonçalves Neto et al. (2005), Falcão et al. (2006), Batista (2007) e Lopes (2007).

Estudos de resistência também foram realizados em plantas micropropagadas, assim como de sobrevivência e desenvolvimento de *Dactylopius* sp. em condições de laboratório por Silva et al. (2007a). Os clones utilizados neste trabalho foram: Gigante, Miúda, Orelha de Elefante Mexicana, F-263 e Algerian. Não houve estabelecimento do inseto nos clones “Miúda” e “Orelha de Elefante Mexicana”. Esses resultados foram repassados para produtores rurais de Pernambuco na forma de 33 Unidades Demonstrativas de 1000m². Em nenhuma das unidades ocorreu o estabelecimento e desenvolvimento da praga (SILVA et al., 2007b).

2.6 Biologia Molecular

O conjunto de RNAs que codificam informações expressas pela célula em um determinado momento é chamado de transcriptoma (NAKANISHI & NUREKI, 2005).

Com o advento da Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), uma maior gama de genes pode ser estudada de uma única vez, facilitando o trabalho e possibilitando estudos de genômica mais completos. Dentre tais estudos, a identificação de genes diferencialmente expressos apresenta-se como um método relevante, ainda que presumível, de conhecer a função gênica e os mecanismos moleculares relacionados à tolerância de plantas hospedeiras. Neste contexto, a técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* - DDRT-PCR (LIANG & PARDEE, 1992) é uma eficiente ferramenta de análise de expressão gênica, apresentando vantagens sobre o “*Northern blotting*”, tanto em sensibilidade como em número de ensaios, além de ser de fácil implementação e de menor custo (WILKINSON et al., 1995; BINNECK, 2004). Estudos de expressão gênica usando a técnica DDRT-PCR em palma forrageira foram realizados por

Pereira et al. (2008), onde cladódios da variedade IPA-Sertânia (IPA 200174), provenientes de cultura *in vitro*, foram infestadas por ninfas de *Dactylopius* sp. Aproximadamente 30 sequências foram identificadas como diferencialmente expressas, as quais foram relacionadas a processos como morte celular programada, resposta de hipersensibilidade e transdução de sinal, entre outras.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORN, H.T.; RÖSE, U.S.R. & McAUSLANE, H.J. Systemic induction of feeding deterrents in cotton plants by feeding of *Spodoptera spp* Larvae. **Journal of Chemical Ecology** **22**, p. 919-932, 1996.
- ALBUQUERQUE, S.G.; SANTOS, D.C. Palma forrageira. In: KIILL, L.H.P. and MENEZES, E.A. (Eds.). **Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o semi-árido**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 91-127, 2005.
- ALVES, R. N. et al. 2007. Produção de forragem pela palma após 19 anos sob diferentes intensidades de corte e espaçamentos. **Revista Caatinga**, v.20, n.4, p.38-44, 2007.
- BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E.P. Apresentação. In: Barbera, G.; Inglese, P.; Barrios, E.P. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE, p.s/n. (Estudo da FAO em Produção Vegetal, 132), 2001.
- BATISTA, J.L. et al. Resistant cactus pear to carmine cochineal (*Dactylopius opuntiae*) in Cariri Occidental Region, State of Paraíba, Brazil. n: VI International Congress on Cactus Pear and Cochineal. **Abstracts...** João Pessoa: SBF, 2007.
- BILGIN, D.D. et al. Elevated ozone alters soybean-virus interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **21**, p. 1297–1308, 2008.
- BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação - O papel da bioinformática em expansão. **Biotechnol. Ciênc. Des.** Janeiro/ Junho 32, p. 28-37, 2004.
- BISPO, S.V. et al. Palma forrageira em substituição ao feno de capim-elefante. Efeito sobre consumo, digestibilidade e características de fermentação ruminal em ovinos. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.6, p.1902-1909, 2007.
- BORLAND et al. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. **New Phytologist** **191**: p. 619–633, 2011.
- BOZSO, Z. et al. Transcriptome analysis of a bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology** **70**, p. 627–646, 2009.
- CAVALCANTI, V. A. L. B. et al. Controle das cochonilhas da palma forrageira. **Boletim IPA responde** nº 39. Recife, p. 1-2, 2001.
- CHACCHIO, A.S.M.; SANTOS, JR. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o Semi-árido baiano Francisco Paulo Brandão. **Bahia Agríc.**, v.7, n.3. p. 39-49, 2006.
- CHACCHIO, F.P.B. Incidência da cochonilha do carmim em palma forrageira. **Bahia Agríc.** **08** (2), 2008.
- DAVIES, S.C.; DOHLEMAN, F.G.; LONG, S.P. The global potential for Agave as a biofuel feedstock. **Global Change Biology Bioenergy** **3**, p. 68–78, 2011.

DODD, A.N. et al. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. **Journal of Experimental Botany** **53**, p. 1–12, 2002.

DRENNAN, P.M. & NOBEL, P.S. Root growth dependent on soil temperature for *Opuntia ficus-indica*: influence of air temperature and a doubled CO₂ concentration. **Functional Ecology** **12**, p. 959-964, 1998.

FALCÃO, H.M. et al. Resistência de cactácea forrageira a cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) em Pernambuco. In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia. **Anais...** Recife: SBE, p. 94, 2006.

FARIAS, I. et al. **Cultivo da palma forrageira em Pernambuco**. Recife: IPA, 6 p. (IPA Instruções Técnicas, 21), 1984.

FERREIRA, C. A.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, D. C.; Utilização de técnicas multivariadas na avaliação da divergência genética entre clones de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, 2003.

FLORES, V. & TEKELENBURG, A. Produção de corante Dacti (*Dactylopius coccus*). **Agroecologia, Cultivo e Utilizações da Palma Forrageira**. SEBRAE. João Pessoa, p. 169-186, 2001.

FUJITA, M. et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Curr Opin Plant Biol.** **9**, p. 436-442, 2006.

GIBSON, A.; NOBEL, P. **The cactus primer**. Cambridge, Harvard University Press. 1986.

GIRI, A.P. et al. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VII. Changes in the plant's proteome. **Plant Physiology** **142**, p. 1621–1641, 2006.

GONÇALVES NETO, A.C. et al. Micropropagação e caracterização molecular de clones de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm Dick) tolerantes à cochonilha (*Dactylopius sp.*). **Horticultura Brasileira**, Fortaleza, v. 23, n. 2, p. 643-644, 2005.

HERRERA, A. Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? **Annals of Botany** **103**, p. 645–653, 2009.

HIRAYAMA, T. & SHINOZAKI, T. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. **Plant J.** **61(6)**, p. 1041-52, 2010.

ISRAEL, A.A. & NOBEL, P.S. Activities of carboxylating enzymes in the CAM species *Opuntia ficus-indica* grown under current and elevated CO₂ concentrations. **Photosynthesis Research** **40**, p. 223-229, 1994.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science** **257**, p. 967-971, 1992.

- LONGO, S.; RAPISARDA, C. Pragas da palma forrageira. In: Barbera, G.; Inglese, P.; Barrios, E. P. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE p. 103-111, 2001.
- LOPES, E.B. et al. Pragas da palma. In: LOPES, E.B. (Ed.). **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semi-árido nordestino**. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, p. 34-40, 2007.
- LOPEZ, M. L., et al. Respuesta de la Brotación de Nopal de Verdura (*Opuntia ficus-indica*) Bajo el Sistema de Explotación Intensivo de Microtúnel, en Cuautitlan Izcalli. **Tesis profesional**. Universidad Nacional Autónoma de México, 1988.
- MACEDO, T.B. et al. Photosynthetic responses of soybean to soybean aphid (Homoptera: Aphididae) injury. **Journal of Economic Entomology** **96**, p. 188–193, 2003.
- MAJOR, I.T.; CONSTABEL, C.P. Molecular analysis of poplar defense against herbivory: comparison of wound- and insect elicitor-induced gene expression. **The New Phytologist** **172**, p. 617–635, 2006.
- MULLER, K. et al. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in PVYNTN-infected tobacco plants. **Biol. Chem.** **390**, p. 245–251, 2009.
- NABITY, P.D.; ZAVALA, J.A.; DeLUCIA, E.H. (2009) Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. **Annals of Botany** **103**, p. 655–663, 2009.
- NAKANISHI, K; NUREKI, O. Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. **Mol. Cells**, 19(2), p. 155-166, 2005.
- NOBEL, P. S. *Biologia Ambiental*. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE p. 36-48103-111, 2001.
- NOBEL, P.S. High productivity of certain agronomic CAM species. In: WINTER, K.; SMITH, J.A.C., eds. **Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, p. 255–265, 1996.
- PEREIRA, K.F.R. et al. Expressão gênica diferencial durante tolerância à cochonilha do carmim em palma forrageira. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54, Salvador, 2008. **Resumos...** Salvador: SBG, p. 328, 2008.
- PIMENTEL, D. **Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal and Microbe Species**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 384, 2002.
- PIMIENGA, B. E.; LOERA, Q.; LÓPEZ, A. Estudio anatómico comparativo em morfoespecies Del subgénero opuntia. **Actas III Congreso Internacional de Tuna y Cochinilla**. Santiago de Chile, p. 30-39, 1992.
- PLUSKOTA, W.E. et al. Jasmonates and its mimics differentially elicit systemic defence responses in *Nicotiana attenuata*. **Journal of Experimental Botany**, **58**, p. 4071-4082, 2007
- RÖSE, U.S.R.; LEWIS, J.; TUMLINSON, J.H. Extrafloral nectar from cotton (*Gossypium hirsutum*) as a food source for parasitic wasps. **Functional Ecology**, **20**, p. 67-74, 2006.

SANTANA, O.A. & ENCINAS, J.I. Levantamento das espécies exóticas arbóreas e seu impacto nas espécies nativas em áreas adjacentes a depósitos de resíduos domiciliares. **Biotemas** **21**, p. 29-38, 2008.

SANTOS, D.C. dos; FARIAS, I.; LIRA, M. DE A. A palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dick) em Pernambuco: cultivo e utilizações. Recife, IPA, (IPA-Documento 25) 23p, 1997.

SANTOS, D.C. dos, et al. Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, nº 1, p. 12-17, 2001.

SANTOS, D.C. dos & SANTOS, J.M. Resistência de cactácea forrageira a cochonilha do carmim *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21, 2006, Recife. **Anais...** Recife: SBE, p. 94, 2006.

SANTOS, D.C. dos et al. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha do carmim *Dactylopius* sp. em condições de campo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Resumos...** João Pessoa, Paraíba, Brasil. 2006.

SANTOS, M. V. F.; FERREIRA, M.A.; BATISTA, A.M.V. Valor nutritivo e utilização da palma forrageira na alimentação de ruminantes. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E V. S. B. (Eds.) **A palma no Nordeste do Brasil, conhecimento atual e novas perspectivas de uso**. 1. ed. Recife: Editora da UFPE, p. 143-162, 2005.

SCHEINVAR, L. Taxonomia das *Opuntias* utilizadas. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E. P. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. SEBRAE, p. 20-27, 2001.

SCHMIDT, L.; SCHURR, U.; RÖSE, U.S.R. Local and systemic effects of two herbivores with different feeding mechanisms on primary metabolism of cotton leaves. **Plant, Cell and Environment**, **32**, p. 893-903, 2009.

SEBRAE - Serviço de apoio às micro e pequenas empresas de Pernambuco (Recife, PE). **Projeto: Sistema agroindustrial do leite em Pernambuco**. Recife, 104p, 1999.

SILVA, A.M.A., et al. Efeito do espaçamento e forma de plantio sobre a palma forrageira *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck no semi-árido alagoano. In: V Congresso Nordestino de Produção Animal. **Anais...** Aracaju: Sociedade Nordestina de Produção Animal (CD-ROM), 178p, 2008.

SILVA, D.M.P. et al. Resistance of *Nopalea cochenillifera* to *Dactylopius opuntiae* in the state of Pernambuco private properties, Brazil. **Acta Horticulturae**, 2007a.

SILVA, D.M.P. et al. Resistance of in vitro grown forage cactus clones to *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera, Dactylopiidae). **Acta Horticulturae**, 2007b.

SILVERA et al. Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. **Functional Plant Biology** **37**, p. 995–1010, 2010.

- SILVERA, K.; SANTIAGO, L.S.; WINTER, K. Distribution of crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak and strong modes. **Functional Plant Biology** **32**, p. 397–407, 2005.
- SIMÕES, D. A.; SANTOS, D. C.; DIAS, F. M. Introdução da palma forrageira no Brasil. In: Menezes, R. S. C.; Simões, D. A.; Sampaio, E. V. S. B. (eds). **A Palma no Nordeste do Brasil** conhecimento atual e novas perspectivas de uso. 2ªed. Recife: ed universitária da UFPE. p.13-26, 2005
- SLAUGHTER, A. et al. Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. **Plant Physiol.** Doi: 10.1104/pp.111.191593, 2011.
- STEPHUN, A.; SCHUMAN, M.C.; BALDWIN, I.T. Silencing jasmonate signalling and jasmonate-mediated defences reveals different survival strategies between two *Nicotiana attenuata* accessions. **Molecular Ecology**, **17**, p. 3717-3732, 2008.
- TURNER, J.G.; ELLIS, C. & DEVOTO, A. The Jasmonate Signal Pathway. **Plant Cell** **14**, 153-164, 2002.
- WÄCKERS, F.L. et al. The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. **Annals of Botany** **87**, p. 365-370, 2001.
- WARUMBY, J. F. et al. Etologia de la cochinilla del carmim (*Dactylopius* spp.) (Homóptera; Dactylopiidae) em el Departamento Pernambuco – Brasil. Oaxaca, México. **Memorias...** Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales, p. 68, 1998.
- WESTBROOKS, R. Invasive plants: changing the landscape of America: fact book. **Federal Interagency Committee for the Management of Noxious and Exotic Weeds**, Washington USA, 107pp, 1998.
- WIESE, A. et al. Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. **New Phytologist**, **174**, p. 752-761, 2007.
- WILKINSON, J. et al. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. **Science** **270**, p. 1807–1809, 1995.
- ZANGERL, A.R.; BERENBAUM, M.R. Phenotype matching in wild parsnip and parsnip webworms: causes and consequences. **Evolution** **57**, p. 806–815, 2003.
- ZAVALA, J.A.; BALDWIN, I.T. Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. **BMC Ecology** **4**, p. 11, 2004.

MANUSCRITO

Ecofisiologia de três cultivares de *Opuntia ficus-indica* Mill (Cactaceae) de tolerância contrastante à cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae*

Hiram M. Falcão¹, Marciel T. Oliveira¹, Adália C. Mergulhão², Márcia V. Silva³, Mauro G. Santos^{1,*}

⁽¹⁾ Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-901, Brasil.

⁽²⁾ Laboratório GENOMA, Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife-PE 50761-000, Brasil.

⁽³⁾ Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE 50670-901, Brasil.

* E-mail do autor para correspondência: mauroguida@pq.cnpq.br; Telefone de contato do autor: +55 81 21268844; Fax: +55 81 21267803

Manuscrito enviando para o periódico “Scientia Horticulturae”

Abreviações

AA, aminoácidos; AS, açúcares solúveis; Chl, clorofila; DTE, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; EP, erro padrão; MDH, malato desidrogenase; MF, massa fresca; MS, massa seca; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilase; PRT, proteínas; PVP, polyvinyl pyrrolidona.

RESUMO

Três cultivares de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller com diferentes níveis de tolerância à cochonilha carmim, IPA-20 (Clone IPA - suscetível), F-08 (tolerante) e Orelha de Elefante Mexicana (OEM - resistente), foram cultivadas em condições de campo e avaliados quanto às suas respostas fisiológicas em condições sem infestação, infestação moderada e infestação severas. Análises da cera epicuticular, açúcares solúveis, aminoácidos livres, proteína total, conteúdo de clorofila, acidez noturna, atividade de PEP carboxilase e produção de biomassa foram realizadas. A cultivar IPA teve um conteúdo de cera 50% maior do que os outros, sem diferenças observadas entre as amostras em campo infestado e sem infestação. OEM teve o maior teor de açúcares solúveis quando comparado com as demais cultivares. A atividade da PEP carboxilase e o acúmulo de ácidos orgânicos foram menores em IPA em campo infestado e sem infestação. Os resultados sugerem que a cultivar resistente OEM apresenta uma resposta de defesa contra stress biótico, o que resulta em diminuição de 50% da produção de biomassa em comparação com F-08. A atividade de PEP carboxilase foi diretamente afetada pela infestação na cultivar IPA, o que reflete na menor produção de biomassa.

Palavras chaves: CAM, Estresse biótico, Palma Forrageira, Semi-Árido.

1 INTRODUÇÃO

2

3 Organismos vegetais estão constantemente expostos ao ataque de insetos e patógenos. Por
4 serem organismos sésseis, as plantas desenvolveram ao longo de sua evolução mecanismos de
5 defesa para enfrentar o estresse biótico, seja alterando a composição e propriedades de parede
6 celular, ou mesmo alterando seu metabolismo primário e secundário (Hopkins & Huner,
7 2004). Deste modo as plantas devem balancear os investimentos dos recursos entre defesas
8 químicas e manutenção dos processos essenciais ao desenvolvimento e reprodução (Berger et
9 al., 2007). Duas estratégias de interação entre plantas e agentes bióticos são possíveis:
10 tolerância e resistência (Oliver et al., 2009). Plantas resistentes apresentam mais fortemente
11 uma relação de interação tipo predador-presa e tendem a minimizar os danos causados pelo
12 inseto ou patógeno ao custo da perda de desempenho pelo investimento em defesas físicas,
13 como tricomas, e defesas químicas. Já as interações em plantas tolerantes são mutualísticas,
14 em que não há perda de performance da planta nem do agente biótico, possivelmente por um
15 crescimento compensatório de tecidos ou aumento na atividade fotossintética e biossíntese de
16 metabólitos (Leimu & Koricheva, 2006). Além de consequências econômicas, em culturas
17 largamente exploradas, o ataque de agentes bióticos pode ser encarado como um problema
18 ecológico, principalmente no caso de espécies introduzidas.

19 A palma forrageira *Opuntia ficus-indica* é uma planta originária do México, pertencente à
20 família Cactaceae e foi introduzida no nordeste brasileiro no século XIX (Simões et al., 2005).
21 Altamente adaptada às condições edafoclimáticas da Caatinga, que apresenta pluviosidade
22 média de 240-900 mm anual, esta espécie desempenha papel de destaque na cadeia
23 agroindustrial do semi-árido brasileiro, pois é o suporte básico dos rebanhos leiteiros da
24 região (Albuquerque & Santos, 2005). A partir da última década, a palma forrageira vem
25 sendo submetida a um ataque severo da cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae*

26 (Hemiptera), um inseto que também foi introduzido no Brasil, a princípio para produção de
27 corante carmim. Além disso, devido às altas taxas populacionais da cochonilha, espécies
28 nativas de cactáceas e bromeliáceas estão sendo atacadas pelo inseto, o que pode, a longo
29 prazo, ocasionar perda de biodiversidade (Chiacchio, 2008). Uma alternativa para a utilização
30 de defensivos químicos no combate à praga é a utilização de cultivares de palma resistentes e
31 tolerantes (Silva et al., 2007).

32 Atualmente várias cultivares de palma forrageira, testados em competição de campo para
33 maior produtividade e resistência, estão sendo utilizados para o combate à cochonilha com o
34 intuito de manter a população do inseto em níveis que não causem prejuízos às plantações
35 tanto de palma, como às espécies nativas. No entanto ainda são escassas informações de como
36 a cochonilha afeta a fisiologia da palma forrageira, e quais as modificações ocorrentes no
37 metabolismo da planta para suportar o impacto causado pela infestação.

38 As tecnologias genômicas têm promovido o entendimento de várias rotas metabólicas e de
39 localização cromossomal de genes de interesse e sua história evolutiva, no que diz respeito à
40 interações inseto-planta (Öktem et al., 2008). Neste contexto, a genômica funcional, através
41 da transcriptômica, proteômica e metabolômica, tem auxiliado na determinação da função
42 biológica desses genes e de seus produtos (Holtorf et al., 2002). Funções metabólicas e
43 morfológicas específicas de genes podem ser avaliadas pela comparação do perfil de RNA
44 mensageiro de diferentes genótipos, tecidos, estágios de desenvolvimento, crescimento e
45 condições ambientais. Além disso, a expressão de genes sob condições específicas permite a
46 comparação de seqüências promotoras e regulatórias dos processos de resposta ao estímulo
47 (Khun, 2001).

48 Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo analisar aspectos fisiológicos de
49 cultivares de palma forrageira sob condições de campo, com diferentes níveis de infestação

50 por cochonilha-do-carmim. Para isso foram avaliados variáveis do metabolismo primário e
51 fotossintético, e traçado o perfil de expressão gênica desses cultivares ao longo da infestação.

52

53 **MATERIAL E MÉTODOS**

54

55 **Material Vegetal e condições de crescimento**

56 O experimento foi conduzido no Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), localizado
57 no Município de Arcoverde (8° 25' 15" S, 37° 3' 41" W), na safra 2010-2011. Foram
58 utilizados três cultivares de palma forrageira, selecionados de acordo com seu nível de
59 resistência à cochonilha-do-carmim (Figura 01): IPA Clone-20 (IPA - susceptível), F-08 (F-
60 08 - tolerante) e Orelha de Elefante Mexicana (OEM - resistente). O campo foi implantado no
61 mês de Abril de 2010 e foram realizadas três coletas, uma em Setembro de 2010 quando o
62 campo não apresentava infestação por cochonilha, uma em Novembro de 2010 quando o
63 campo apresentava infestação moderada e outra em Março de 2011 com o campo altamente
64 infestado. Considerou-se o nível de infestação do campo de acordo com a infestação do
65 genótipo susceptível IPA Clone-20. Quando IPA Clone-20 apresentava até 50% da área do
66 cladódio infestada considerou-se o campo como moderadamente infestado, e com mais de
67 50% de área infestada, campo altamente infestado. Durante o período do experimento a
68 temperatura média do município de Arcoverde foi de 25°C e a pluviosidade total durante a
69 safra abril 2010 a junho 2011 foi 1195 mm (Tabela 1).

70

71 **Teor de cera epicuticular**

72 Para a análise de teor de cera foram coletados dez cladódios secundários intactos de cada
73 genótipo e sem infestação por cochonilha. Os cladódios foram cuidadosamente embalados em
74 papel e levados ao laboratório para a remoção e quantificação de cera. O método utilizado foi

75 o de Oliveira et al. (2003), utilizando três extrações sucessivas de 30 segundos com
76 diclorometano. O teor de cera foi calculado pela razão entre a quantidade de cera em
77 microgramas pela área do cladódio em cm², obtida pela fórmula $AC = LC \times CC \times 0,632$, onde
78 AC é área do cladódio, LC o comprimento do cladódio e CC o comprimento do cladódio
79 segundo Cortázar & Nobel (1991).

80

81 **Conteúdo de açúcares solúveis, aminoácidos livres totais, proteínas totais, pigmentos** 82 **fotossintéticos e produtividade**

83 Amostras de tecido do clorênquima de cinco cladódios secundários foram coletadas às 15
84 h, acondicionados em papel alumínio, congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer a -
85 20°C. A determinação do teor de carboidratos solúveis totais foi de acordo com Dubois et al.
86 (1956). O teor de aminoácidos foi segundo Moore & Stein (1948) utilizando o método da
87 ninhidrina. As proteínas solúveis foram analisadas segundo Bradford (1976) utilizando BSA
88 (albumina de soro bovina) como padrão. Para a avaliação do conteúdo de pigmentos
89 fotossintetizantes, foi usado o método de Lichthenthaler (1987). A produtividade das
90 cultivares foi realizada após um ano do plantio e os dados expressos em toneladas de matéria
91 verde e seca por hectare.

92

93 **Acidez Noturna Titulável**

94 Amostras foram coletadas de cinco cladódios secundários às 17 h (um pouco antes do pôr
95 do sol) e às 04 h (antes do nascer do sol), congeladas N₂ líquido e armazenadas em freezer a -
96 20°C. As amostras foram homogeneizadas em 10 mL de água deionizada e tituladas com
97 0,01N de NaOH até pH 7,4. O acúmulo de ácidos foi determinado pela fórmula: $\Delta H^+ = H^+_{\text{Noite}}$
98 $- H^+_{\text{Manhã}}$, segundo Weiss et al. (2010).

99

100 **Atividade de PEP Carboxilase**

101 Amostrs de tecido do clorênquima foram coletadas de cinco cladódios secundários às 22h,
102 congelados em N₂ líquido e armazenadas em freezer a -20°C. Foram realizadas duas coletas:
103 uma em Setembro de 2010, com campo sem infestação, e outra em Março de 2011, com
104 campo apresentando alta infestação. A extração da PEP Carboxilase seguiu o método de
105 Abdel-Latif (2008). Aproximadamente 200 mg de material foi macerado em almofariz
106 congelado em solução de extração [0.1M Tris-HCl (pH 7.8), 0.5mM EDTA, 1mM Mg₂SO₄ e
107 1mM DTE (preparado na hora)], contendo uma pitada rasa de polivinil pilorridona (PVP)
108 num. Após centrifugado por 30 minutos a 20.000 g a 4°C, o sobrenadante foi resgatadopara
109 análise da atividade enzimática. A atividade de PEP Carboxilase foi determinada em
110 espectrofotômetro segundo o método de Blanke et al. (1986), através oxidação do NADH na
111 presença da enzima Malato Desidrogenase (MDH) a 340nm. A solução da reação foi
112 composta por 50mM de tampão Tricine (pH 8,8), 10 units of MDH, 0,1mM NADH, 2,5mM
113 Mg₂SO₄ e 5mM de NaHCO₃ num volume total de 1mL. A reação foi iniciada pela adição de
114 2,2 mM de fosfoenolpiruvato e a taxa de oxidação do NADH medida por 1 minuto.

115

116 **Análise Molecular**

117 Aproximadamente 500 mg de tecido do clorênquima de cladódios secundários de cada
118 genótipo foram coletados três meses após a infestação com a cochonilha-do-carmim,
119 macerados em N₂ líquido e utilizados para extração do RNA total através do kit “*PureLink*
120 *Micro-to-Midi Total RNA Purification System*” (Invitrogen). O RNA foi convertido em cDNA
121 usando o kit “*Superscript III First-Strand Synthesis for RT-PCR*” (Invitrogen), com *primer*
122 *randômico (A2)*. . O cDNA gerado foi utilizado na reação de amplificação (PCR) utilizando o
123 *primer A2B2*. Os produtos amplificados pela reação de PCR foram submetidos à eletroforese
124 em gel de agarose a 1,8%, usando como padrão de peso molecular 1 Kb *DNA Ladder*

125 (Promega). O produto da PCR diferencialmente expresso (de interesse) foi isolado, purificado
126 com o Kit “GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare, USA) e inserido no
127 vetor pGEM, através do Kit “pGEM-T Easy vector System I” (Promega), como recomendado
128 pelo fabricante. A transformação foi realizada em MAX Efficiency® DH10B™ Competent
129 Cells – Invitrogen), por Choque Térmico. Após a multiplicação dos clones positivos, foi
130 realizada a seleção das colônias recombinantes a partir da diferenciação de sua cor na
131 presença do IPTG (isopropyl thiogalactoside) e X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-
132 galactopyranoside). As colônias confirmadas como recombinantes foram inoculadas
133 individualmente em meio LB suplementado com ampicilina 1,2 % (100 mg/ L), incubadas a
134 37°C, 320 rpm, por 22 h. A cultura foi submetida a extração do DNA plasmidial (Miniprep)
135 através do método de lise alcalina (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/public>).

136 A reação de sequenciamento foi usando 150 ng de DNA plasmidial, 0,7 µL de Big-dye
137 versão 3.1 (Applied Biosystems), *primer* T7 (3,2 pmoles) e 2 µL de tampão de
138 sequenciamento, completado para um volume final de água estéril para 10 µL. A eletroforese
139 em capilar foi realizada em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

140 As seqüências obtidas (Phred \geq 20) foram analisados via BioEdit 7 (HALL, 1999). Após a
141 retirado o segmento referente ao vetor (VecScreen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen>),
142 as sequencias foram alinhadas e montadas via Cap3 (referencia Cap3). Com o objetivo de
143 identificar proteínas similares ao fragmento sequenciado, as seqüências de nucleotídeos foram
144 confrontadas com as seqüências do banco de proteínas não redundantes (nr) do Centro
145 Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI- *National Center for Biotechnology*
146 *Information*) utilizando a ferramenta BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A
147 seqüência foi então traduzida no quadro de leitura indicado pelo BLASTx com o auxílio do
148 programa ORF-finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). Tais polipeptídios
149 preditos foram, submetidos à ferramenta BLASTp, para a identificação de proteínas

150 homólogas com função conhecida e, em paralelo, foi avaliada a integridade de seus domínios,
151 via ferramenta CD-search, vinculada ao algoritmo rpsBLAST.

152

153 **Análise Estatística**

154 O desenho experimental foi de blocos ao acaso, com 3 blocos contendo 16 repetições de
155 cada genótipo. Os dados foram analisados utilizando uma ANOVA One-Way para cada data
156 de coleta, e as médias comparadas pelo teste de Student Newman-Keul's a 5% de
157 probabilidade pelo programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

158

159 **RESULTADOS**

160

161 **Cera epicuticular**

162 No primeiro mês de coleta, sem infestação no campo, o genótipo IPA apresentou diferença
163 significativa no teor de cera ($p \leq 0,05$) em relação à F-08 e OEM, com 66% e 49% a mais de
164 cera que as anteriores respectivamente. No segundo mês de coleta, em campo altamente
165 infestado, todas as cultivares diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$). O genótipo IPA
166 novamente apresentou maior teor de cera, com 70% mais cera que F-08 e 32% mais que OEM
167 (Fig. 02).

168

169 **Conteúdo de açúcares solúveis, aminoácidos livres totais, proteínas totais, pigmentos** 170 **fitossintéticos e produtividade.**

171 No primeiro mês de coleta, em campo sem infestação, a cultivar OEM apresentou 52% e
172 77% mais carboidratos que IPA e F-08 respectivamente ($p \leq 0,05$) (Fig. 3A). No segundo mês
173 de coleta, com o campo apresentando infestação moderada, IPA e OEM apresentaram teor de
174 carboidratos 42% e 54% maior que F-08, respectivamente ($p \leq 0,05$). No terceiro mês de

175 coletas e sob infestação severa, todas as cultivares diferiram entre si ($p \leq 0,05$), com OEM
176 apresentando maior teor de carboidratos.

177 A cultivar F-08 apresentou 132% e 84% mais aminoácidos (Fig. 3B) que IPA e OEM,
178 respectivamente, em campo sem infestação ($p \leq 0,05$). Em campo moderadamente infestado
179 nenhuma das cultivares diferiu significativamente entre si ($p \geq 0,05$). No terceiro mês, em
180 campo com infestação severa, a cultivar F-08 apresentou menor teor de aminoácidos, com
181 38% menos que IPA e 33% menos que OEM ($p \leq 0,05$).

182 No primeiro mês de coleta (Fig. 3C), em campo sem infestação, IPA e OEM apresentaram
183 teor de proteínas solúveis 72% e 83% maior que F-08 respectivamente ($p \leq 0,05$). No segundo
184 mês de coleta, em campo moderadamente infestado, OEM apresentou 115% mais proteína
185 que F-08 ($p \leq 0,05$). No mesmo período, IPA não diferiu significativamente de nenhum das
186 demais cultivares ($p \geq 0,05$). Em campo apresentando infestação severa, nenhuma das
187 cultivares diferiu significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

188 Quanto ao conteúdo de clorofila a (Fig. 4A) OEM apresentou valor 50% e 28% maior que
189 IPA e F-08 respectivamente, em campo sem infestação ($p \leq 0,05$). No segundo mês de coleta,
190 com infestação moderada, IPA apresentou teor de clorofila a 31% maior que F-08 e 42%
191 maior que OEM ($p \leq 0,05$). Em campo com infestação severa, F-08 apresentou maior teor de
192 clorofila a, com 30% mais que OEM ($p \leq 0,05$). No mesmo período, IPA não diferiu das
193 demais cultivares ($p \geq 0,05$). Nenhuma das cultivares diferiu entre si ($p \geq 0,05$) no teor de
194 clorofila b no primeiro mês de coletas, em campo sem infestação (Fig. 4B). No segundo mês,
195 com infestação moderada, IPA apresentou 29 % e 45 % mais clorofila b que F-08 e OEM
196 respectivamente ($p \leq 0,05$). Em campo altamente infestado, OEM apresentou valor 32% e 40%
197 maior que IPA e F-08 respectivamente ($p \leq 0,05$).

198 Não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre as cultivares em campo sem infestação quanto ao
199 conteúdo de carotenoides (Fig. 4C). Em campo com infestação moderada, IPA diferiu de F-08

200 e OEM ($p \leq 0,05$), apresentando conteúdo de carotenóides 45% e 28% maior que as demais
201 respectivamente. No terceiro mês, em campo altamente infestado, nenhuma das cultivares
202 diferiu significativamente entre si ($p \geq 0,05$). A cultivar IPA diferiu das demais cultivares
203 apresentando 31% e 32% menos clorofilas totais que F-08 e OEM respectivamente ($p \leq 0,05$)
204 (Fig. 4D). No segundo mês, com infestação moderada, IPA apresentou conteúdo de clorofilas
205 totais 40% maior que F-08 e 38% maior que OEM ($p \leq 0,05$). No terceiro mês de coletas, com
206 alta infestação, não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre as cultivares.

207 O genótipo F-08 apresentou a maior produtividade tanto em massa verde como em massa
208 seca e diferiu das demais cultivares. A produtividade em massa verde de F-08 foi maior 73%
209 e 121% que IPA e OEM respectivamente (Tabela 02). Em termos de massa seca a
210 produtividade de F-08 foi maior que a de IPA 108% e que a de OEM 90%.

211

212 **Ácidos Orgânicos e Atividade Enzimática**

213 Em campo sem infestação (Fig. 5A), IPA e OEM apresentaram acúmulo de ácidos
214 orgânicos 72% e 83% maior que F-08 respectivamente ($p \leq 0,05$). Em condição de infestação
215 severa, todas as cultivares diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$), com o conteúdo de
216 OEM de ácidos orgânicos 90% maior que IPA e 42% maior que F-08.

217 Em campo sem infestação (Fig. 5B), IPA apresentou uma atividade enzimática 94% e
218 211% maior que F-08 e OEM respectivamente ($p \leq 0,05$), coleta realizada durante a estação
219 seca (Tabela 1). No segundo mês, com campo apresentando alta infestação, não houve
220 diferença significativa entre as cultivares ($p \geq 0,05$), coleta realizada durante a estação chuvosa.

221

222

223

224

225 **Análise Molecular**

226 Através do uso da técnica de DDRT-PCR foi possível identificar um produto da PCR
227 diferencialmente expresso no genótipo F-08 (Fig. 06) que, após clonagem e sequenciamento
228 da sequencia (cerca de 500pb), apresentou similaridade com proteínas hipotéticas de algumas
229 monocotiledôneas como milho, sorgo e arroz, além de uma “FK506-binding protein” de
230 *Ricinus* e milho - uma família de proteínas que exibem atividade de prolil isomerase
231 relacionada em termos de função com Ciclofilinas (Tabela 03). Através do *ORF-finder* foram
232 identificados duas regiões codificantes para o *frame +1* (Figura 07), ambas com similaridade
233 para as mesmas sequências nas interações através algoritmo BLASTp, alinhando em regiões
234 distintas, separados por cerca de 30 aminoácidos.

235 As espécies obtidas com melhores alinhamentos no BLASTx, repetiram-se no BLASTp
236 como os melhores *matches*. Apesar de apresentarem similaridade com proteínas já
237 identificadas em outras espécies, através da ferramenta *CD-search* não foi possível determinar
238 domínios funcionais íntegros, ou mesmo trechos destes na sequência do pepitídeo traduzido.
239 Aponta-se para o domínio “FKBP_C *super family*” como sendo o domínio funcional, pois
240 este está presente nas sequências obtidas como melhores interações no BLASTp (Tabela 03),
241 bem como é possível identificar as regiões de baixa complexidade presente nestas sequências.

242

243 **DISCUSSÃO**

244

245 A cera epicuticular (CE) constitui a interface primária entre a planta e o ambiente,
246 possuindo, desse modo, diversas funções ecológicas (Eigenbrode, 2004). Apesar de sua
247 principal função estar relacionada à redução da perda de água por evapotranspiração, a
248 importância da CE na interação inseto-planta já foi observada (Cervantes et al., 2002). Os
249 resultados demonstram que as variedades tolerantes e resistentes de palma forrageira

250 apresentam menor teor de cera. Resultados semelhantes foram encontrados por Rutledge et al.
251 (2003) em ervilha sob infestação por afídios em condições xerofíticas. Outro fator é que
252 plantas com um menor teor de cera favorecem a mobilidade de inimigos naturais de insetos. É
253 comum encontrar em campo infestado inimigos naturais da cochonilha-do-carmim, em
254 especial Coleopteros como *Zagreus bimaculosus* e *Coccidophilus citricola* predando
255 principalmente as formas caminhanter da praga (Lima et al., 2011). Em análises realizadas em
256 laboratório Chang et al. (2006) e Gentry & Barbosa (2006) observaram um aumento na ação
257 de predadores de diferentes ordens (Neuroptera, Coleoptera e Hemiptera), sob insetos-praga
258 em plantas que apresentavam menor teor de cera. Apesar da presença de predadores, a
259 utilização do controle biológico da cochonilha ainda não é eficiente, já que ainda não foram
260 identificados predadores que se alimentem das colônias adultas devido a dificuldade de
261 penetrar a cerosidade produzida pelo inseto. Segundo Žnidarčič (2008) alguns fatores como a
262 preferência de insetos por folhas com maior ou menor teor de cera, ou a relação entre teor de
263 cera e inimigos naturais devem ser observados para determinar o papel da CE na resistência
264 da planta à infestação por insetos. Por outro lado, um menor teor de CE deixa a planta mais
265 vulnerável à perda de água, o que reduz a tolerância ao déficit hídrico.

266 Herbivoria e ataque de patógenos podem afetar o balanço de carbono das plantas. A
267 intensa redução da área foliar causada por herbívoros de *Casearia nitida*, aumentou a
268 concentração de carboidratos solúveis nas folhas restantes (Boege, 2005), sugerindo um
269 aumento da taxa fotossintética das folhas que permaneceram, compensando a menor área
270 fotossintetizante total. Por outro lado, o ataque de afídios em couve reduziu o conteúdo foliar
271 de carboidratos em plantas sob intensa infestação (Khattab, 2007). De fato, se observarmos os
272 valores de carboidratos nas cultivares de palma analisados no presente trabalho, verificamos
273 que não houve uma alteração expressiva no balanço de carbono na cultivar susceptível IPA
274 (Fig. 3A). Resultados compatíveis foram encontrados por Gomez et al. (2006) em algodão sob

275 infestação por afídios. A diminuição do teor de carboidratos das cultivares tolerante (F-08) e
276 resistente (OEM) em campo moderadamente infestado e o subsequente aumento em campo
277 sob infestação severa pode estar relacionada às respostas de tolerância e/ou resistência ao
278 estresse biótico. Carboidratos são precursores de metabólitos secundários, como compostos
279 fenólicos que são os principais compostos que atuam em respostas de resistência. Segundo
280 Lattanzio (2009) compostos fenólicos podem ser acumulados na planta ou sintetizados *de*
281 *novo* em resposta ao estresse biótico. É possível que com o início da infestação, F-08 em
282 menor quantidade, e OEM tenham realocado carboidratos para produção de metabólitos
283 secundários e que com o estabelecimento da infestação na cultivar mais susceptível, o balanço
284 normal de carbono tenha se restabelecido. Como defesas químicas são custosas para a planta,
285 já que envolvem realocação de recursos, Purrington (2000) sugere que uma forma de diminuir
286 estes custos é sintetizar compostos de defesa apenas após algum dano inicial causado por
287 inseto ou patógeno. É provável que a cultivar tolerante F-08 apresente este comportamento,
288 visto que a infestação não se desenvolve a ponto de causar prejuízos à planta, o que reflete na
289 sua produtividade média de 16,21 ton.MS.ha⁻¹. Em contrapartida a cultivar resistente OEM
290 atinge produtividade média de 8,54 ton.MS.ha⁻¹, próximo dos 7,80 ton.MS.ha⁻¹ apresentados
291 por IPA, o que sugere um investimento constante desta cultivar em defesas químicas.

292 Assim como o balanço de carbono, o conteúdo de nitrogênio está intimamente relacionado
293 ao funcionamento de aparato fotossintético da planta. O nitrogênio foliar é utilizado na
294 formação dos aminoácidos, que se ligam originando proteínas solúveis como a Rubisco e
295 enzimas do ciclo de Calvin e da respiração. Também é importante componente da molécula
296 de clorofila na membrana dos tilacóides. Segundo Rai (2002) aminoácidos livres afetam o
297 transporte de íons através de membranas e a atividade de algumas enzimas, funcionam como
298 osmólitos e, como a prolina, eliminam espécies reativas de oxigênio. Além disso, são
299 precursores de metabólitos secundários relacionados à defesa, como alcalóides e

300 aleloquímicos, o que pode explicar o aumento no teor de aminoácidos livres em OEM no
301 início da infestação do campo por cochonilha-do-carmim (Fig. 3B). Schmidt et al. (2009)
302 observaram um aumento no conteúdo de nitrogênio foliar em algodão exposto a uma pequena
303 quantidade de ácaros. No entanto, em trabalhos posteriores, o mesmo autor não observou
304 diferença no conteúdo de nitrogênio em outras variedades de algodão infestadas com lagarta,
305 comportamento semelhante ao de IPA, que manteve seus níveis de aminoácidos e proteínas
306 constantes. A acentuada redução no conteúdo de aminoácidos apresentada por F-08 está de
307 acordo com resultados obtidos por Van Dam & Oomen (2008) em *Brassica oleracea* e
308 algodão tratados com jasmonatos, substâncias sinalizadoras de ataque biótico. É importante
309 observar a diminuição no teor de aminoácidos e aumento no teor de proteínas no genótipo F-
310 08, quando o campo apresentava alta infestação, sugerindo um investimento na produção de
311 proteínas possivelmente envolvidas na fotossíntese, como a Rubisco, ou relacionadas à
312 patogênese como quitinases ou peroxidases (De Wit, 2007).

313 Alterações na biossíntese de pigmentos nos cloroplastos é uma estratégia que permite a
314 adaptação das plantas a diferentes condições ambientais, inclusive de estresse biótico (Wang
315 et al., 2004). O aumento no teor de pigmentos na cultivar IPA no início da infestação por
316 cochonilha-do-carmim pode estar relacionado a uma reação de resposta ao inseto. Em
317 condições de estresse biótico a taxa de biossíntese de clorofilas tende a aumentar, atuando
318 como uma reação de defesa não-específica ao ataque, conferindo certa resistência ao
319 organismo da planta (Vasil'eva, 2003). No entanto, com o aumento da infestação há a
320 degradação dos pigmentos, possivelmente pela perda de área fotossintetizante da palma
321 resultante do estabelecimento e multiplicação das colônias de cochonilha. É interessante notar
322 a diminuição no teor de clorofilas na cultivar resistente OEM. Por apresentar uma maior área
323 de cladódio, a degradação de clorofila ao longo da infestação sugere uma resposta
324 fotoprotetora, já que menores teores de clorofila podem reduzir a absorção de luz prevenindo

325 os efeitos do estresse oxidativo e danos ao aparato fotossintético (Cao et al., 2006). Os
326 carotenóides atuam principalmente como pigmentos fotoprotetores, prevenindo a formação de
327 espécies reativas de oxigênio, tornando-se indispensáveis ao complexo antena (Standfuss et
328 al., 2005). Apesar disso, um aumento esperado no conteúdo de carotenóides não foi
329 observado.

330 A PEP Carboxilase é uma enzima chave no processo fotossintético da palma forrageira,
331 que apresenta metabolismo tipo CAM. Ela catalisa a β -carboxilação do fosfoenolpiruvato na
332 presença de bicarbonato (HCO_3^-) para produção de oxaloacetato e P_i , utilizando Mg^{2+} como
333 co-fator (O'Leary et al., 2011). O oxaloacetato formado é então rapidamente convertido em
334 malato e estocado no vacúolo, o que aumenta a acidez dos tecidos da planta durante a noite.
335 Durante o período luminoso, o malato é descarboxilado e o CO_2 é utilizado pela Rubisco no
336 Ciclo de Calvin para produção de triose fosfato. A regulação da atividade da PEP Carboxilase
337 é realizada em vários níveis, desde regulação alostérica à silenciamento da expressão gênica
338 (Bilgin et al., 2010). A redução na atividade da PEP Carboxilase e, conseqüentemente, do
339 acúmulo de ácidos orgânicos na cultivar IPA em campo sob infestação por cochonilha pode
340 estar relacionado a uma redução da expressão de genes relacionados à fotossíntese (Fig. 5B).
341 O ataque de insetos pode causar a redução nos níveis de RNA mensageiros que codificam
342 para a Rubisco ou para os componentes do complexo antena dos fotossistemas (Montesano et
343 al., 2004; Zou et al., 2005). Como não foi observada redução na produção de carboidratos em
344 IPA, o que sugere normalidade na atividade da Rubisco, é possível que a regulação da
345 expressão seja ao nível dos fotossistemas, que apresentaram grande redução no teor de
346 clorofilas em campo altamente infestado.

347 A diminuição da atividade enzimática também pode estar relacionada à perda da área
348 fotossintetizante da palma pelo estabelecimento e multiplicação da cochonilha. Apesar de
349 apresentar uma atividade de PEP Carboxilase menor, OEM acumulou mais ácidos orgânicos

350 que IPA (Fig. 5A). Segundo Drennan & Nobel (2000) a PEP Carboxilase também pode atuar
351 refixando o CO₂ liberado no processo respiratório na forma de malato. O malato tem sido
352 frequentemente relacionado como um importante substrato para a respiração nas plantas, e
353 uma significativa fração do piruvato que entra no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) é
354 proveniente das reações combinadas da PEP Carboxilase, MDH e Nicotinamida Adenina
355 Dinucleotídeo – Enzima Málica (NAD-ME). No entanto o piruvato proveniente da reação da
356 piruvato quinase citosólica (PKc) é o substrato mais importante no processo respiratório,
357 tendo a PEP Carboxilase uma função anaplerótica, para dar suporte à biossíntese e
358 assimilação de nitrogênio, principalmente em condições de estresse (Plaxton & Podest'a,
359 2006; Sweetlove et al., 2010). Apesar dos dados obtidos, existe uma dificuldade em avaliar a
360 ação da PEP Carboxilase, pois alterações na atividade da enzima pode ser resultado do
361 aumento ou redução da transcrição, tradução ou modificações pós-traducionais,
362 principalmente fosforilação, e de condições ambientais (Doubnerová, 2011).

363 As ciclofilinas constituem uma família de proteínas bastante abundante que, em plantas
364 superiores, executam diferentes tipos de processos fisiológicos, marcadamente relacionados à
365 respostas a diferentes fatores de estresse biótico e abiótico (Opiyo & Moriyama, 2009). De
366 acordo com sua localização subcelular, as ciclofilinas podem ser divididas em vários tipos,
367 como cloroplastídica, citoplasmática e mitocondrial. Pelo menos cinco tipos de ciclofilinas
368 citoplasmáticas foram identificados em *Arabidosis thaliana* indicando que proteínas deste tipo
369 possuem funções ainda mais diversas em plantas do que previamente imaginado (Chou &
370 Gasser, 1997).

371 Resultados da análise molecular (DDRT-PCR) apontam para uma diferença de expressão
372 de uma ciclofilina no genótipo tolerante a cochonilha (genótipo F-08). Estudos moleculares
373 com ciclofilinas em plantas indicam alterações no seu nível de expressão após algum tipo de
374 estresse. Godoy et al. (2000) verificaram a expressão de ciclofilinas em tomate em resposta à

375 exposição ao ácido salicílico e infecção bacteriana. Resultados semelhantes foram
376 encontrados por Chen et al. (2007) trabalhando com indução de expressão de ciclofilinas em
377 agrião (*Lepidium sativum*), após exposição por sal, ácido abscísico (ABA), peróxido de
378 hidrogênio (H₂O₂), altas temperaturas e infecção por fungo. Um aumento na expressão de
379 ciclofilinas também está relacionado à liberação do citocromo c, envolvido em processos de
380 morte celular programada, um tipo de resposta de hipersensibilidade causada pela interação
381 planta-patógeno (Hatsugai et al., 2004). Como os genótipos de palma analisados estavam
382 submetidos às mesmas condições abióticas, é possível que a expressão da ciclofilina em F-08
383 possa ter relação com a infestação pela cochonilha. No entanto, não é possível afirmar com
384 precisão que tipo de ciclofilina está sendo expressa, nem se ela tem relação direta com a
385 infestação sem uma análise mais pormenorizada. Apesar disso, novas análises envolvendo
386 *Northern blotting* ou PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) serão realizados
387 futuramente, para confirmação da expressão diferencial deste produto gênico.

388 Os resultados sugerem que a cultivar resistente OEM apresenta um mecanismo de defesa
389 contra infestação por cochonilha-do-carmim eficiente, possivelmente investindo a maior parte
390 de seus recursos no metabolismo secundário em detrimento de sua produtividade que se
391 equiparou ao da cultivar susceptível IPA. Com a perda de área fotossintetizante ou uma sub-
392 expressão de genes da fotossíntese, a atividade de PEP Carboxilase foi diretamente afetada
393 pela infestação em IPA, o que pode vir a reduzir a capacidade de carboxilação pela Rubisco e
394 a produção de ácidos orgânicos através de uma retroregulação do metabolismo. Apesar de
395 apresentar infestação, F-08 manteve sua performance quanto a produção de massa seca, uma
396 característica de espécies tolerantes, investindo na produção de proteínas, provavelmente
397 envolvidas na fotossíntese. É possível que a expressão de proteínas da família das ciclofilinas
398 seja induzida pela infestação da cochonilha em F-08.

399

400 **AGRADECIMENTOS**

401

402 Nossos sinceros agradecimentos ao Instituto Agrônomo de Pernambuco por ceder as
403 instalações da Estação Experimental de Arcoverde e as cultivares utilizados no presente
404 trabalho, ao pesquisador Dr. Djalma Cordeiro dos Santos pelo auxílio na logística de coleta de
405 dados

406

407 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

408

- 409 Abdel-Latif A. Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity of Wheat and Maize Seedlings
410 Subjected to Salt Stress. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2008; 2(1):
411 37-41.
- 412 Albuquerque SG, Santos DC. Palma forrageira. In: Kiill LHP, Menezes EA (Eds.). Espécies
413 vegetais exóticas com potencialidades para o semi-árido. Brasília: Embrapa Informação
414 Tecnológica 2005; p. 91-127.
- 415 Berger S, Sinha AK, Roitsch T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary
416 metabolism and plant-pathogen interactions. Journal of Experimental Botany 2007; 58:
417 4019-26.
- 418 Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough ST, Ort DR, DeLucia EH. Biotic stress globally
419 downregulates photosynthesis genes. Plant, Cell and Environment 2010; 33: 1597–613.
- 420 Blanke M, Notton B, Hucklesby D. Physical and kinetic properties of photosynthetic PEP
421 Carboxylase in developing apple fruit. Phytochem. 1986; 25: 601-6.
- 422 Boege K. Influence of plant ontogeny on compensation to leaf damage. American Journal of
423 Botany 2005; 92: 1632-40.

- 424 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
425 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:
426 248-54.
- 427 Cao K F, Guo YH, Cai ZQ. Photosynthesis and antioxidant enzyme activity in breadfruit,
428 jackfruit and mangosteen in southern Yunnan, China. *Journal Horticulturae Science*
429 *Biotechnology* 2006; 81(1): 168-72.
- 430 Cervantes D, Eigenbrode SD, Ding H, Bosque-Perez N. Oviposition preference of Hessian
431 fly, *Mayetiola destructor*, on winter wheats varying in surface waxes. *Journal of*
432 *Chemical Ecology* 2002; 28: 193–210.
- 433 Chang GC, Neufeld J, Eigenbrode SD, Chang GC. Leaf surface wax and plant morphology of
434 peas influence insect density. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2006; 119: 197-
435 205.
- 436 Chen AP, Wang GL, Qu ZL, Lu CX, Liu N, Wang F, et al. Ectopic expresiion of ThCYP1,a
437 stress-responsive cyclophilin gene from *Thellungiella halophila*,confers salt tolerance in
438 fission yeast and tobacco cells. *Plant Cell Rep.* 2007; 2: 237-45.
- 439 Chiacchio FPB. Incidência da cochonilha do carmim em palma forrageira. **Bahia Agríc.**
440 **2008; (2).**
- 441 Chou IT, Gasser CS. Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana*
442 and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Mol. Biol.* 1997; 35:
443 873-92.
- 444 Cortazar V, Nobel PS. Prediction and measurement of high annual productivity for *Opuntia*
445 *ficus-indica*. *Agricultural and Forest Meteorology* 1991; 56: 261-72.
- 446 De Wit PJ. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular*
447 *Life Science* 2007; 64(21): 2726-32.

- 448 Doubnerová V, Rišlava H. What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under
449 stress? *Plant Sci.* 2011; doi:10.1016/j.plantsci.2010.12.005.
- 450 Drennan PM, Nobel PS. Responses of CAM species to increasing atmospheric CO₂
451 concentrations. *Plant Cell Environ.* 2000; 23: 767–81.
- 452 Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for
453 determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 1956; 28: 350-6.
- 454 Eigenbrode SD. The effects of plant epicuticular waxy blooms on attachment and
455 effectiveness of predatory insects. *Arthropod Struct. Dev.* 2004; 33: 91–102.
- 456 Gentry GL, Barbosa P. Effects of leaf epicuticular wax on the movement, foraging behavior,
457 and attack efficacy of *Diaeretiella rapae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*
458 2006; 21: 115–22.
- 459 Godoy AV, Lazzaro AS, Casalongue CA, San Segundo B. Expression of a *Solanum*
460 *tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress
461 conditions. *Plant Sci.* 2000; 152: 123-34.
- 462 Gomez SK, Oosterhuis DM, Hendrix DL, Johnson DR, Steinkrauset DC. Diurnal pattern of
463 aphid feeding and its effect on cotton leaf physiology. *Environmental and Experimental*
464 *Botany* 2006; 55: 77-86.
- 465 Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, et al. A plant vacuolar
466 protease, VPE, mediates viruses-induced hypersensitive cell death. *Science* 2004; 305:
467 855–8
- 468 Holtorf H, Guitton MC, Reski R. Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* 2002; 89:
469 235-49.
- 470 Hopkins WG, Huner PA. *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons. Inc. USA,
471 2004, p. 479-481.

- 472 Khattab H. The Defense Mechanism of Cabbage Plant Against Phloem-Sucking Aphid
473 (*Brevicoryne brassicae* L.). Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2007;
474 1(1): 56-62.
- 475 Khun E. From library screening to microarray technology: Strategies to determine gene
476 expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. Annals of
477 Botany 2001; 87: 139-55.
- 478 Lattanzio V, Cardinali A, Ruta C, Fortunato IM, Lattanzio VMT, Linsalata V, Cicco N.
479 Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.)
480 shoot cultures under nutritional stress. Environmental and Experimental Botany 2009;
481 65: 54–62.
- 482 Leimu R, Koricheva J. A meta-analysis of tradeoffs between plant tolerance and resistance to
483 herbivores: combining the evidence from ecological and agricultural studies. Oikos,
484 2006; 112: 1-9.
- 485 Lichthenthaler HK. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes.
486 Methods in Enzymology 1987; 148: 331-82.
- 487 Lima MS, Silva DMP, Falcão HM, Ferreira WM, Silva LD, Paranhos BAJ. Predadores
488 associados à *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) em palma forrageira no
489 Estado de Pernambuco, Brasil. Rev. Chilena Ent. 2011; 36: 51-4.
- 490 Montesano M, Scheller HV, Wettstein R, Palva ET. Down-regulation of photosystem I by
491 *Erwinia carotovora* derived elicitors correlates with H₂O₂ accumulation in chloroplasts
492 of potato. Molecular Plant Pathology 2004; 5: 115–23.
- 493 Moore S, Stein WH. Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino
494 acids. The Journal of Biological Chemistry 1948; 176: 367-88.

- 495 Öktem, HA, Eydoğan, F, Selçuk F, Öz MT, Silva JAT, Yücel M. Revealing response of
496 plants to biotic and abiotic stresses with microarray technology. *Genes, Genomes and*
497 *Genomics*. Global Science Books 2008, p. 15-48.
- 498 O'Leary B, Park J, Plaxton WC. The remarkable diversity of plant PEPC
499 (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and
500 post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem. J.* 2011; 436: 15–34.
- 501 Oliveira AF, Meirelles ST, Salatino A. Epicuticular waxes from Caatinga and cerrado species
502 and their efficiency against water loss. *Ann Braz Acad Sci.* 2003; 75(4): 431-9.
- 503 Oliver TH, Leather SR, Cook JM. Tolerance traits and the stability of mutualism. *Oikos*,
504 2009; 118: 346-52.
- 505 Opiyo SO, Moriyama EN. Mining the Arabidopsis and rice genomes for cyclophilin protein
506 families, *Int. J. Bioinform. Res. Appl.* 2009; 3: 295-309.
- 507 Plaxton WC, Podest'a FE. The functional organization and control of plant respiration. *Crit.*
508 *Rev. Plant Sci.* 2006; 25: 159–98.
- 509 Purrington CB. Cost of resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000; 3: 305–8.
- 510 Rai VK. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 2002; 45:
511 481-7.
- 512 Rutledge CE, Robinson A, Eigenbrode SD. Effects of a simple plant morphological mutation
513 on the arthropod community and the impacts of predators on a principal insect
514 herbivore. *Oecologia* 2003; 135: 39–50.
- 515 Schmidt L, Scchurr U, Rose USR. Local and systemic effects of two herbivores with different
516 feeding mechanisms on primary metabolism of cotton leaves. *Plant, Cell and*
517 *Environment* 2009; 32: 893-903.
- 518 Silva, DMP, Houllou-Kido LM, Santos DC, Ferreira WM, Lima MS, Falcão HM, Tabosa FS,
519 et al. Resistance of *Nopalea cochenillifera* to *Dactylopius opuntiae* in the state of

- 520 Pernambuco private properties, Brazil. In: VI International Congress on Cactus Pear and
521 Cochineal 2007; Anais.
- 522 Simões DA, Santos DC, Dias FM. Introdução da palma forrageira no Brasil. In: Menezes
523 RSC, Simões DA, Sampaio, EVSB (eds). A Palma no Nordeste do Brasil conhecimento
524 atual e novas perspectivas de uso. 2ªed. Recife: Edt. Universitária da UFPE 2005, p.13-
525 26.
- 526 Standfuss J, Kühlbrandt W, Lamborghini M, Van Scheltinga ACT. Mechanisms of
527 photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at
528 2.5 Å resolution. EMBO J. 2005; 24: 919–28.
- 529 Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG. Not just a circle: flux
530 modes in the plant TCA cycle. Trends Plant Sci. 2010; 15: 462–70.
- 531 Van Dam NM, Oomen MWAT. Root and shoot jasmonic acid applications differentially
532 affect leaf chemistry and herbivore growth. Plant Signaling and Behavior 2008; 3: 91-8.
- 533 Vasil'eva IS, Vanyushkin SA, Zinov'eva SV, Udalova ZV, Bolychevtseva YV,
534 Paseshnichenko VA. Photosynthetic Pigments of Tomato Plants under Conditions of
535 Biotic Stress and Effects of Furostanol Glycosides. Prikladnaya Biokhimiya i
536 Mikrobiologiya 2003; 39(6): 689–96.
- 537 Wang T, Quisenberry X, Tomai N, Tomai V. Enzymatic chlorophyll degradation in wheat
538 near-isogenic lines elicited by cereal aphid (Homoptera: Aphididae) feeding. J. Econ.
539 Entomol. 2004; 97: 661-7.
- 540 Weiss I, Mizrahi Y, Raveh E. Effect of elevated CO₂ on vegetative and reproductive growth
541 characteristics of the CAM plants *Hylocereus undatus* and *Selenicereus megalanthus*.
542 Scientia Horticulturae 2010; 123(4): 531-6.

- 543 Žnirdarčič D, Valič N, Trdan S. Epicuticular wax content in the leaves of cabbage (*Brassica*
544 *oleracea* L. var. *capitata*) as a mechanical barrier against three insect pests. *Acta*
545 *agriculturae Slovenica* 2008; 91: 361–70.
- 546 Zou J, Rodrigues-Zas S, Aldea M, Li M, Zhu J, Gonzalez DO, et al. Expression profiling
547 soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid
548 HR-specific downregulation of photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*
549 2005; 18: 1161–74.

Tabela 01. Dados meteorológicos do município de Arcoverde durante o período de coletas.

Variáveis climáticas	Épocas de colheita		
	Setembro/2010	Novembro/2010	Março/2011
Pluviosidade (mm)	36,1	0	46,1
Temperatura Média (°C)	21,8	27,8	25,6
Umidade do ar (%)	75,5	42	62
Umidade do solo (%)	1,09	1,12	3,10

Tabela 02. Produtividade média dos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. MV (massa verde), MS (massa seca). Colheita realizada 14 meses após o plantio no município de Arcoverde.

Genótipos	t.MV.ha ⁻¹	t.MS.ha ⁻¹
IPA	112,41 b	7,80 b
F-08	194,87 a	16,21 a
OEM	88,22 b	8,54 b

Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si no teste de Student Newman-Keul's 5%.

Tabela 03. Resultados da interação via BLASTx e BLASTp, da sequência isolada e sequenciada de *Opuntia ficus-indica*, no banco de proteínas (nr) do NCBI, considerando-se, no mínimo, e-value $\leq e^{-05}$.

Acesso GenBank	e-value BLASTx/BLASTp	Id	Pos	Gaps	Frame	Espécie	Descrição	Domínio Conservado
ACG34411	4,00E-12/ 4,00E-24	31/37	35/37	0/37	1	<i>Zea mays</i>	uncharacterized protein	-
EES10880	6,00E-12/5,00E-17	31/37	35/37	0/37	1	<i>Sorghum bicolor</i>	hypothetical protein	FKBP_C super family
EEE61079	4,00E-07/3,00E-10	25/37	33/37	1/37	1	<i>Oryza sativa</i>	unnamed protein product	-
BAJ85650	4,00E-06/1,00E-10	24/37	32/37	1/37	1	<i>Hordeum vulgare</i>	predict protein	FKBP_C super family
EEF51514	4,00E-05/3,00E-06	21/38	33/38	1/37	1	<i>Ricinus communis</i>	FK506-binding protein	FKBP_C super family
ACG24189	5,00E-05/5,00E-06	24/38	28/38	2/38	1	<i>Zea mays</i>	FK506-binding protein	-

Figura 01. Cultivares de *Opuntia ficus-indica*. IPA Clone-20, F-08 e Orelha de Elefante Mexicana, respectivamente.

Figura 02. Teor de cera epicuticular nos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$

Figura 03. Teor de Açúcares solúveis, Aminoácidos e Proteínas dos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$

Figura 04. Teor de pigmentos fotossintetizantes nos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$

Figura 05. Acúmulo de acidez noturna e atividade de PEP Carboxilase nos genótipos de *Opuntia ficus-indica*. Barras \pm Erro padrão seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), $n=5$

Figura 06. Fotografia da eletroforese dos produtos da PCR obtidos dos cDNAs dos genótipos IPA (T1); OEM (T2) e F-08 (T3) de *Opuntia ficus-indica*. O fragmento marcado em vermelho foi o selecionado para seqüenciamento

Figura 07. Análise da ORF do segmento de 415 nucleotídeos amplificado de *Opuntia ficus-indica*. Os retângulos em azul correspondem a região codificante no frame +1, separadas entre si por 58 nucleotídeos. Os números correspondem às posições das bases



Fig. 01

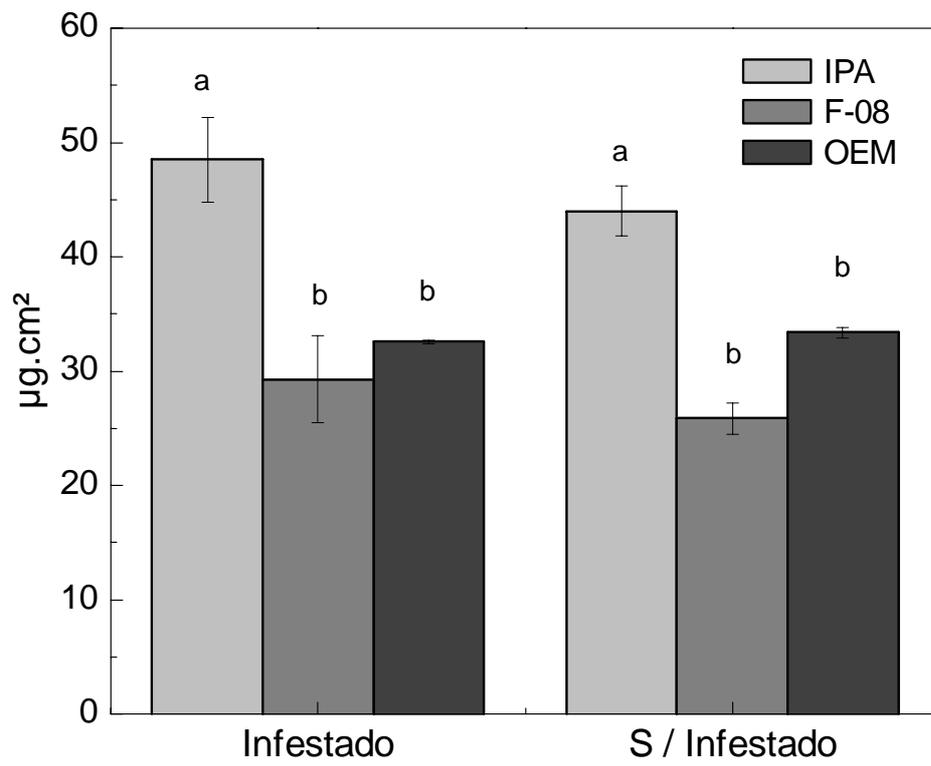


Fig. 02

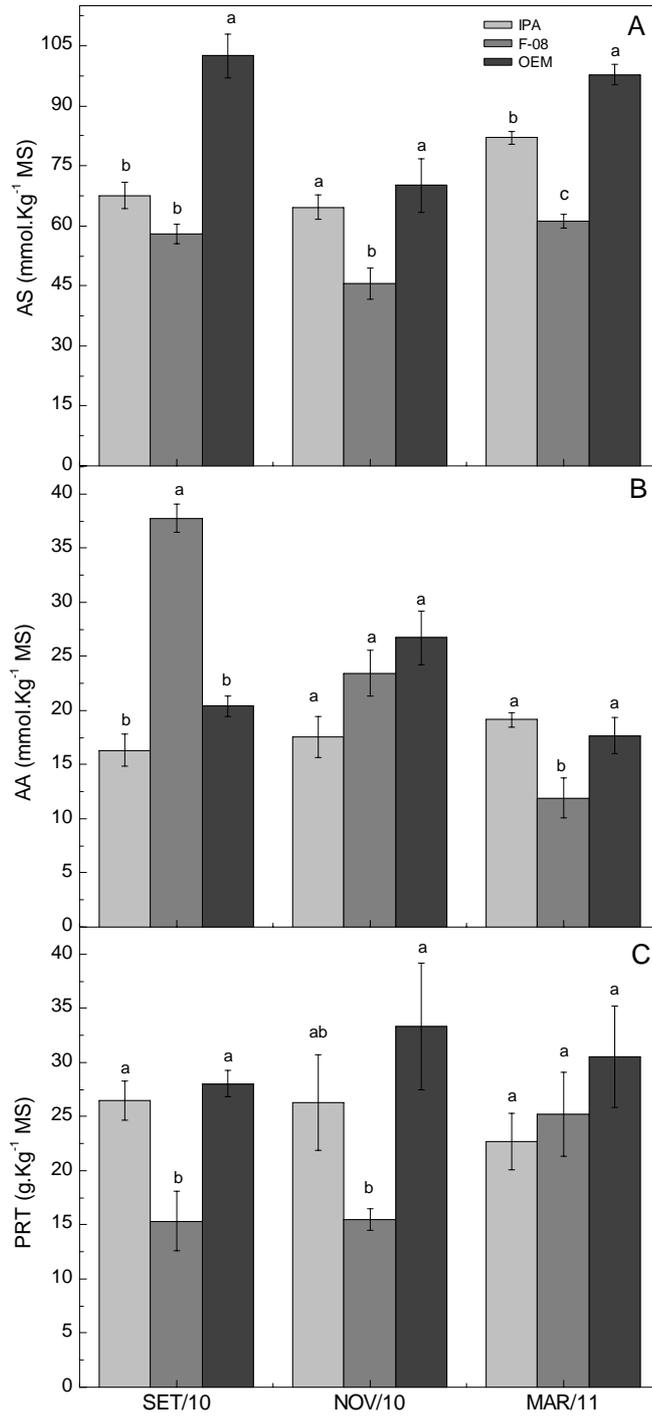


Fig. 03

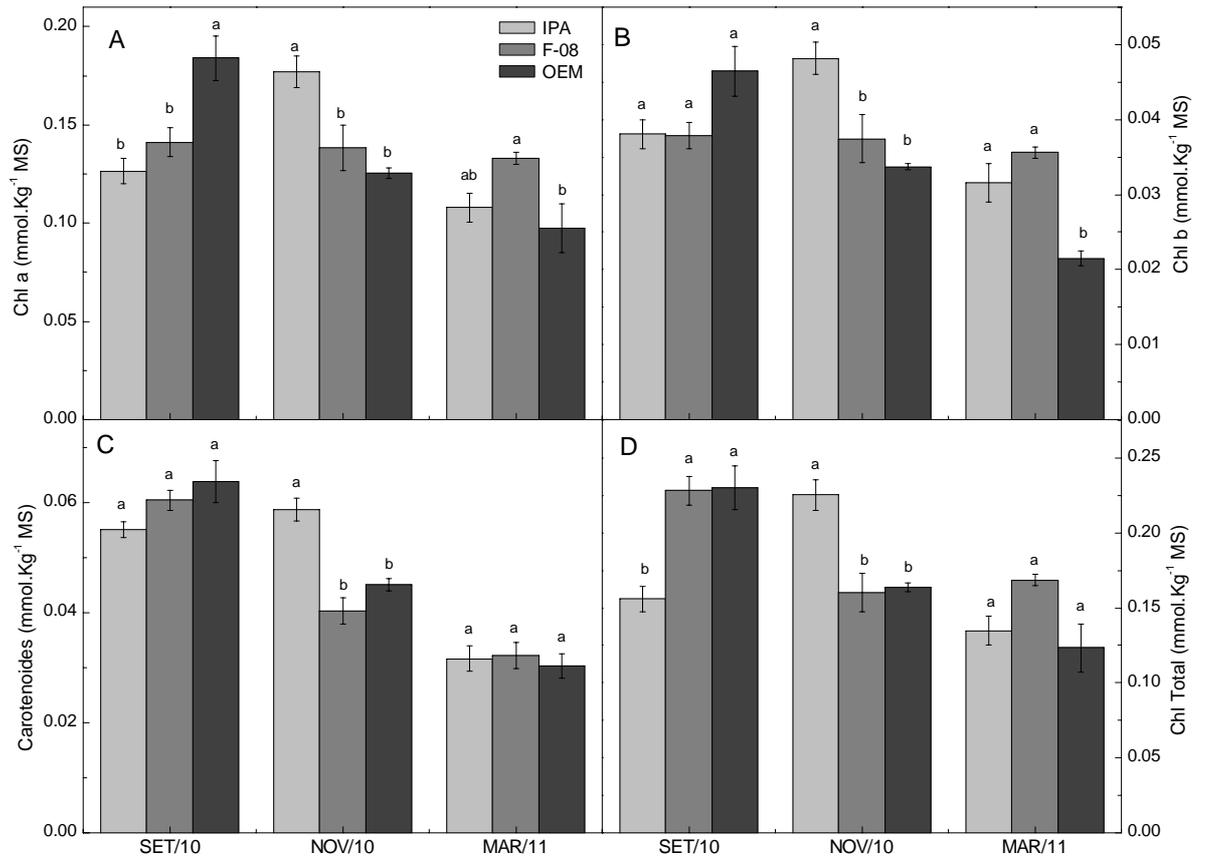


Fig. 04

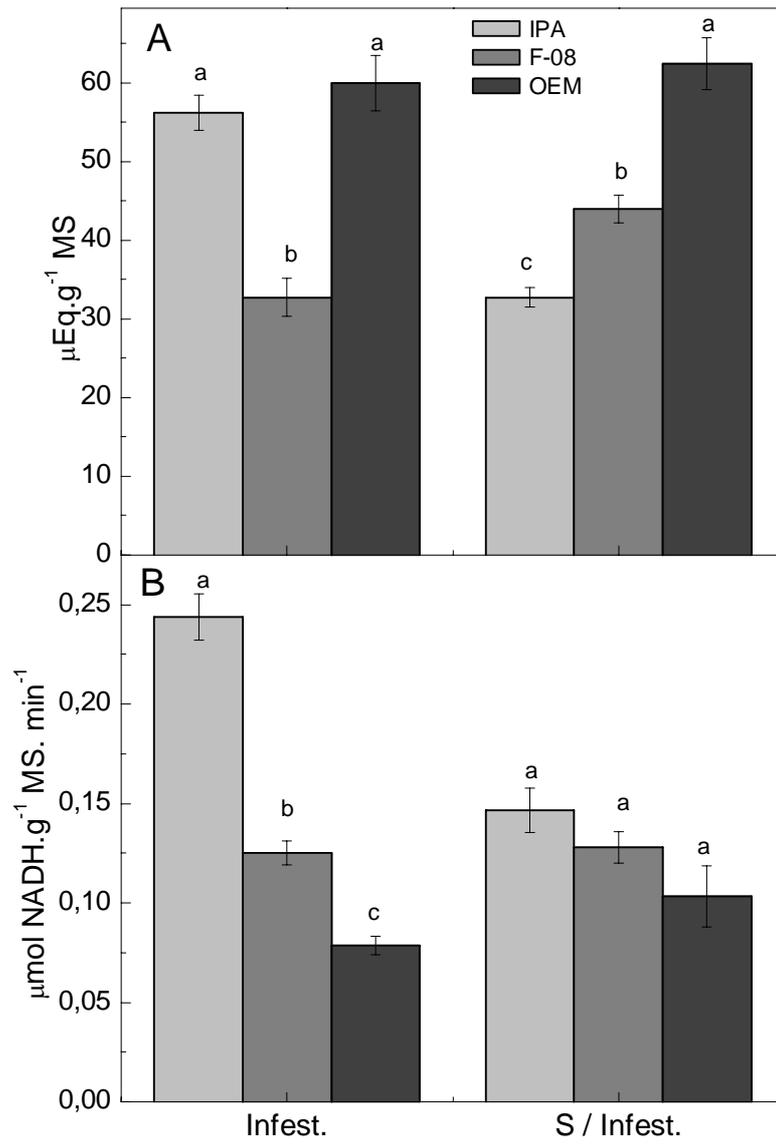


Fig. 05

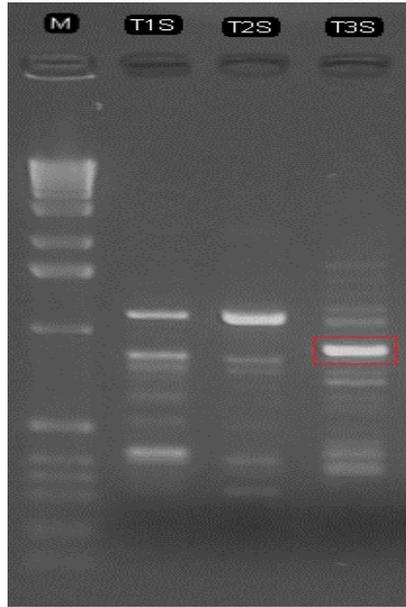


Fig.06

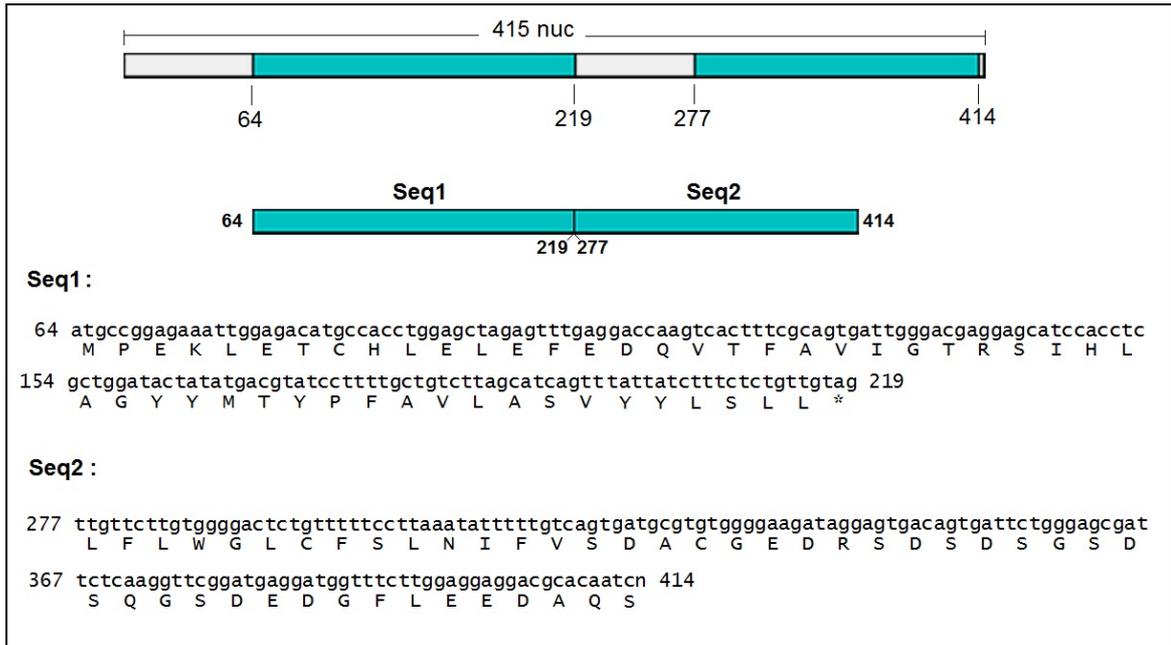


Fig. 07

CONCLUSÕES

- A atividade de PEP Carboxilase é diretamente afetada em IPA Clone-20, o que reflete na redução de acúmulo de ácidos orgânicos e produtividade.
- A cultivar resistente Orelha de Elefante Mexicana possivelmente investe uma maior quantidade de recursos na produção de compostos de defesa, visto que apresenta alto teor de carboidratos, precursores de metabólitos secundários, mas baixa produtividade.
- A tolerância de F-08 à cochonilha-do-carmim é verificada pela manutenção de sua performance, mesmo em campo altamente infestado, um comportamento associado à relações mutualísticas.
- A proteína relacionada às ciclofilinas, expressa pela cultivar F-08, pode estar associada à respostas de hipersensibilidade ao estresse biótico, sendo ainda necessários estudos mais específicos para uma avaliação mais concreta de sua expressão e funções.

RESUMO

Por serem organismos sésseis, os vegetais estão constantemente expostos à ação de agentes de estresse biótico e abiótico. No curso da evolução, mecanismos de defesa foram desenvolvidos pelas plantas a fim de combater os efeitos prejudiciais deste tipo de interação, seja investindo em metabólitos secundários, ou até na regulação de genes que codificam proteínas específicas durante o estresse. O presente trabalho avaliou os efeitos na fisiologia de cultivares de *Opuntia ficus-indica* durante infestação por cochonilha-do-carmim *Dactylopius opuntiae*. Três cultivares com diferentes níveis de tolerância ao inseto foram selecionados: IPA Clone-20 (susceptível), F-08 (tolerante) e Orelha de Elefante Mexicana (resistente). Foi avaliado o metabolismo primário dos genótipos, bem como teor de cera epicuticular, atividade de PEP Carboxilase, acúmulo de ácidos orgânicos e perfil de expressão em gel de agarose, ao longo da infestação. As coletas aconteceram entre Setembro de 2010 e Março de 2011, período em que as cultivares foram avaliadas em campo sadio, moderadamente infestado e altamente infestado. A cultivar IPA clone-20 apresentou teor de cera 70% maior nas coletas em campo com e sem infestação, em comparação com as demais cultivares. Orelha de Elefante Mexicana apresentou maior teor de carboidratos em todas as coletas. O teor de aminoácidos em F-08 caiu 132% durante a infestação, comportamento contrário ao teor de proteínas que aumentou 60%, não havendo diferenças marcantes nas demais cultivares. A cultivar Orelha de Elefante Mexicana apresentou queda mais acentuada nos teores de clorofilas *a*, *b*, e clorofilas totais em comparação com os demais. Todas as cultivares apresentaram decréscimo no teor de carotenóides ao longo da infestação. Houve redução de 60% na atividade de PEP Carboxilase em IPA Clone-20 quando comparada em campo sadio e infestado, bem como no acúmulo de ácidos orgânicos que caiu 54%. O perfil de expressão em gel de agarose mostrou uma banda diferencialmente expressa na cultivar F-08, que após seqüenciamento, mostrou similaridade com proteínas da família das ciclofilinas, relacionadas às respostas a estresse biótico ou abiótico. Os resultados sugerem que a cultivar Orelha de Elefante Mexicana investe na produção de compostos de defesa, pois apesar de apresentar altos teores de carboidratos, a produtividade em campo foi 100% menor que F-08 e semelhante à IPA Clone-20, a cultivar mais susceptível. A atividade de PEP Carboxilase em IPA Clone-20 foi diretamente afetada pela infestação por cochonilha-do-carmim, possivelmente pela perda de área fotossintetizante durante a infestação, refletindo no acúmulo de ácidos orgânicos, que pode reduzir a capacidade de carboxilação pela RUBISCO. A cultivar F-08 apresentou típica resposta de tolerância ao estresse, pois não houve perda de performance mesmo na presença do inseto.

Como todos os genótipos foram submetidos às mesmas condições abióticas em campo, é possível que a expressão de proteínas ciclofilinas em F-08 esteja relacionada à resposta de hipersensibilidade ao inseto.

Palavras-Chave: CAM, Estresse biótico, Palma forrageira.

ABSTRACT

Because they are sessile organisms, plants are constantly exposed to the action of agents of biotic and abiotic stress. In the course of evolution, defense mechanisms have been developed by plants to combat the harmful effects of this type of interaction, whether investing in secondary metabolites, or even in the regulation of genes that encode specific proteins during stress. The present study evaluated the effects on the physiology of *Opuntia ficus-indica* cultivars during by carmine cochineal *Dactylopius opuntiae* infestation. Three cultivars with different levels of tolerance to the insect have been selected: IPA Clone-20 (susceptible), F-08 (tolerant) and Orelha de Elefante Mexicana (resistant). There was assessed the primary metabolism, as well as epicuticular wax content, PEP Carboxylase activity, accumulation of organic acids and the expression profile in agarose gel, along the infestation. Sampling took place between September 2010 and March 2011, during which the cultivars were evaluated in the field healthy, moderately and highly infested. The cultivar IPA Clone-20 showed wax content 70% higher in samples with and without field infestation, compared with other cultivars. Orelha de Elefante Mexicana had higher carbohydrate content in all samples. The amino acids content in F- 08 fell 132% during the infestation, on the contrary to the protein content which increased 60%, with non-significant differences in other cultivars. The cultivar Orelha de Elefante Mexicana showed sharper drop in chlorophyll a, b and total chlorophyll content, in comparison with others. All cultivars showed a decrease in carotenoids content throughout the infestation. There was a 60% reduction in the activity of PEP Carboxylase in IPA-Clone 20 compared with healthy and infested field, as well as the accumulation of organic acids which fell 54%. The expression profile in agarose gel showed a band differentially expressed in the cultivar F-08, which after sequencing, showed similarity with the Cyclophilins protein family, related to answers to biotic and abiotic stresses. The results suggest that the cultivar Orelha de Elefante Mexicana invests in the production of defense compounds, because despite having high levels of carbohydrates, field productivity was 100% lower than F-08 and similar to IPA Clone-20, the more susceptible cultivar. The PEP Carboxylase activity was directly affected by the infestation of carmine cochineal in IPA Clone-20, possibly by the loss of photosynthetic area during the infestation, reflecting in the accumulation of organic acids, which may reduce the carboxylation capacity by RUBISCO. The F-08 cultivar showed typical response of stress tolerance, as there was no loss of fitness even in the presence of the insect. Since all cultivars were subjected to the same abiotic

factors in field, it is possible that the expression of cyclophilins in F-08 is related to hypersensitive response to the insect.

Key-Words: CAM, Biotic Stress, Prickly Pear.

ANEXO



TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0304-4238

DESCRIPTION

Introduction

Scientia Horticulturae is an international journal publishing research related to horticultural crops. Articles in the journal deal with open or protected production of vegetables, fruits, edible fungi and ornamentals under temperate, subtropical and tropical conditions. Papers in related areas (biochemistry, micropropagation, soil science, plant breeding, plant physiology, phytopathology, etc.) are considered, if they contain information of direct significance to horticulture. Papers on the technical aspects of horticulture (engineering, crop processing, storage, transport etc.) are accepted for publication only if they relate directly to the living product. In the case of plantation crops, those yielding a product that may be used fresh (e.g. tropical vegetables, citrus, bananas, and other fruits) will be considered, while those papers describing the processing of the product (e.g. rubber, tobacco, and quinine) will not. The scope of the journal includes all horticultural crops but does not include speciality crops such as, medicinal crops or forestry crops, such as bamboo.

Types of paper

1. Original full papers (regular papers)
2. Review articles (should cover a part of the subject of active current interest)
3. Short Communications
 - 3.1 Report of preliminary results of important research (pilot investigation: e.g. no duplications or with other restrictions)
 - 3.2 Newly developed methodology or modification of existing methodology, possibly description of first test.
 - 3.3 Results of the application of an earlier published research methodology on other crops or under different conditions (fact finding or recipes) that are nevertheless of interest to an international readership. Should include new scientific insight.
4. Book Reviews (included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old).

Original papers should report the results of original research and should be of international and not only regional interest. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Reviews should cover a part of the subject active current interest. They may be submitted or invited.

Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, etc.).

For consultation or suggestions please contact the Editors-in-Chief.

AUDIENCE

Horticulturists, Plant Breeders, Plant Physiologists.

IMPACT FACTOR

2011: 1.527 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 CAB Abstracts
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
 EMBiology
 Ecological Abstracts
 Elsevier BIOBASE
 GEOBASE
 PASCAL/CNRS
 Research Alert
 SCISEARCH
 Science Citation Index
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

J.P. Bower, 33361 Seventh Avenue, Mission, V2V 2E4, Canada
X.X. Deng, Natl. Key Lab. of Crop Genetic Improvement, HuaZhong Agricultural University, Shizhishan Street No. 1, 430070 Wuhan, Hubei, China
M.E. Kane, Dept. of Environmental Horticulture, University of Florida, P.O. Box 110675, Gainesville, FL 32611-0675, USA
T. Moriguchi, Natl. Inst. of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization, 305-8605 Tsukuba, Japan
D. Schwarz, Leibniz-Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Theodor-Echtermeyer-Weg 1, 14979 Grossbeeren, Germany

Founding Editor

S.J. Wellensiek,

Editorial Board Members

G.H. Barry, XLnT Citrus Company, Helderberg, Cape Town, South Africa
R.I. Cabrera, Texas A&M University, Dallas, TX, USA
G. Colla, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo, Italy
C. de Krelj, Research Floriculture & Glasshouse Vegetables, Hoofddorp, Netherlands
M. Dorais, Université Laval, Québec, Canada
G.C. Douglas, Teagasc Agriculture and Food Development Authority, Dublin 19, Ireland
R.L. Geneva, University of Kentucky, Lexington, KY, USA
A. Gunes, Ankara University, Ankara, Turkey
W. Guo, HuaZhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China
W.P. Hackett, University of California at Davis, Davis, CA, USA
V. Kesavan, Department of Agriculture Western Australia, Carnarvon, WA, Australia
C. Lovatt, University of California at Riverside, Riverside, CA, USA
A. Monteiro, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa Cedex, Portugal
P. Mooney, Sardi, Urrbrae, Adelaide, SA, Australia
R.E. Paull, University of Hawaii at Mānoa, Honolulu, HI, USA
F. Pilego Alfaro, Universidad de Málaga, Málaga, Spain
J.V. Possingham, Possum's Vineyard, Unley Park, SA, Australia
L. Rallo, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

M.S. Reid, University of California at Davis, Davis, CA, USA
D. Savvas, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
R.R. Sharma, IARI, New Delhi, India
D.W. Turner, University of Western Australia, Nedlands, WA, Australia
X. Wang, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China
G.E. Welbaum, Virginia Tech University, Blacksburg, VA, USA

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

1. Original full papers (Regular Papers)
2. Review articles should cover a part of the subject of active current interest.
3. Short Communications
 - 3.1 Report of preliminary results of important research (pilot investigation; e.g. no duplications or with other restrictions).
 - 3.2 Newly developed methodology or modification of existing methodology, possibly description of first test.
 - 3.3 Results of the application of an earlier published research methodology on other crops or under different conditions (fact finding or recipes) that are nevertheless of interest to an international readership.
4. Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Original papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. Reviews should cover a part of the subject active current interest. They may be submitted or invited.

Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, etc.).

For consultation or suggestions please contact the Editors-in-Chief.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Authorship of the paper (ICMJE)

Authorship should be limited to those who have made a significant contribution to the conception, design, execution, and interpretation of the reported study. All those who have made significant contributions should be listed as co-authors. Where there are others who have participated in certain substantive aspects of the research project, they should be acknowledged or listed as contributors.

The corresponding author should ensure that all appropriate co-authors and no inappropriate co-authors are included on the paper, and that all co-authors have seen and approved the final version of the paper and have agreed to its submission for publication.

For more information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/horti/>

Referees

Suggesting 5 reviewers is required for submission. Please note that only one suggested reviewer can be from your own country, and suggest four potential reviewers from different countries including full contact details and e-mail addresses. Note that the Editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Results and Discussion should be two separate sections.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should

submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>