

**Preferencia de oviposición y resistencia de *Eucalyptus* spp. a la avispa agalladora del eucalipto, *Leptocybe invasa* Fischer & Lasalle
(Hymenoptera: Eulophidae).**

Trabajo final Ingeniería Forestal

Estudiante: Lucio David Arbiza Bello (CI: 4.883.278-0)

Tutora: MSc. Lic. Cs. Biol. Carolina Jorge

Co-Tutora: Msc. Ing. Agr. Patricia Basile

Tacuarembó

Uruguay

2024

PÁGINA DE APROBACIÓN

CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL NORESTE – SEDE TACUAREMBÓ

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba el Trabajo Final de Ingeniería Forestal

Título:

Preferencia de oviposición y resistencia de *Eucalyptus* spp. a la avispa agalladora del eucalipto, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae).

Autor:

Lucio David Arbiza Bello

Tutora:

MSc. Lic. Cs. Biol. Carolina Jorge

Co-tutora:

Msc. Ing. Agr. Patricia Basile

Puntaje: Diez

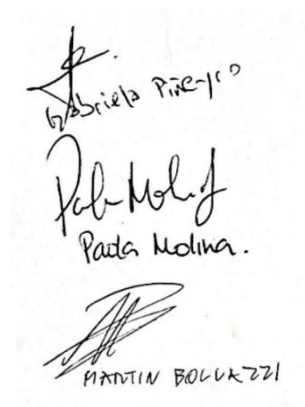
Tribunal:

Dra. Gabriela Piñeyro.

MSc Paola Molina

Dr. Martín Bollazzi

FECHA: 13/09/2024



Gabriela Piñeyro
Paola Molina
MARTIN BOLLAZZI

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar expresando mi agradecimiento a todas las personas y entidades que hicieron posible la culminación de esta tesis. Sin el respaldo y la colaboración de muchos, este proyecto no habría alcanzado su conclusión exitosa. Cada aporte, ya sea grande o pequeño, ha sido crucial para lograr los objetivos de esta investigación.

En primer lugar, deseo agradecer a mis orientadoras, Carolina Jorge y Patricia Basile, por su orientación experta, apoyo constante y paciencia a lo largo de todo el proceso. Su dedicación y compromiso han sido esenciales para la ejecución de este trabajo. También a Pablo González por su valiosa contribución en el ámbito estadístico, que enriqueció significativamente este estudio.

Extiendo mi gratitud a todos los docentes de la carrera de Ingeniería Forestal, quienes con su entrega y enseñanza han cimentado una base sólida de conocimientos, fundamental para el desarrollo de esta tesis.

A la institución educativa Centro Universitario de Tacuarembó, le debo el acceso a los recursos e infraestructura necesarios para llevar a cabo los trabajos y análisis correspondientes a esta investigación. Al proyecto INIA FPTA 368, que permitió la realización de los ensayos del trabajo final.

Una mención especial para mi familia por su apoyo incondicional, que ha sido una fuente constante de fortaleza y motivación. A mis padres, mis hermanos y mi pareja, por su comprensión y paciencia durante los momentos difíciles. Sin su respaldo, este logro no habría sido posible. A mis amigos, por su compañía y palabras de aliento en los momentos de duda. También agradezco a mis colegas y compañeros de estudio por su colaboración y apoyo académico.

Finalmente, mis agradecimientos a todas las personas que, aunque no mencionadas específicamente, han contribuido de alguna manera al éxito de este proyecto. Su presencia y apoyo han sido profundamente valorados.

RESUMEN

En las últimas décadas, Uruguay ha experimentado un aumento significativo en el transporte de productos y personas, así como en el área plantada con *Eucalyptus* de origen clonal (85%). Esto, sumado a que el país no cuenta con barreras geográficas, ha favorecido el ingreso de plagas forestales como la avispa agalladora del eucalipto, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae). Esta especie cuarentenaria fue detectada por primera vez en Uruguay en el año 2011, extendiéndose rápidamente por el país. Si bien no existe una metodología de manejo efectiva, se considera que el control biológico y la resistencia de plantas a insectos serían las más adecuadas. Teniendo en cuenta que las plantaciones forestales del país están constituidas mayoritariamente por clones de *E. grandis* y *E. dunnii*, es importante estudiar el comportamiento de estas especies frente al ataque de *L. invasa*. En este contexto el objetivo general del presente trabajo fue estudiar la preferencia de oviposición y susceptibilidad de *Eucalyptus* spp. al ataque de *L. invasa*. Para evaluar la preferencia de oviposición y susceptibilidad se realizó un test con chance de escoger (TCC) y un test en el que la plaga no tenía opción de escoger (TSC) en condiciones de semicampo (invernáculo) en la ciudad de Tacuarembó. Se evaluaron tres clones de *E. dunnii* (A, B y C) y tres clones de *E. grandis* (D, E y F), donde F es un genotipo conocido por ser muy susceptible a *L. invasa*. Se realizaron cortes anatómicos de hojas y tallos aplicando tinciones e histoquímica para estudiar la influencia de la anatomía en la susceptibilidad de los eucaliptos a la plaga. Todos los clones estudiados mostraron síntomas de ataque. Los clones D y E fueron los únicos que no formaron agallas. El clon F, desarrolló agallas en la nervadura central y el tallo, mientras que los clones A, B y C solo presentaron agallas en la nervadura central. En el TCC se observó que los clones de *E. dunnii* (A, B y C) fueron los más atacados. El clon C fue el más susceptible en ataque al pecíolo y rama o tallo. Respecto al TSC, el clon B fue significativamente más atacado en la mayoría de las variables evaluadas. El clon testigo F, mostró un mayor nivel de ataque en comparación con el TCC. Se observaron diferencias significativas en la preferencia de oviposición entre los clones. Los clones E y D (*E. grandis*) mostraron menor susceptibilidad en ambos tests. Si bien *E. grandis* y *E. dunnii* presentan algunas similitudes anatómicas, se pudieron observar diferencias en la composición y disposición de los diferentes tejidos entre los clones estudiados. Los clones más atacados presentaron diferencias a nivel de la epidermis y de la disposición de los haces vasculares en comparación con los clones menos afectados. En conclusión, se pudieron observar diferencias significativas en la preferencia de oviposición de *L. invasa* entre los clones estudiados y algunas evidencias de correlación anatómica que deberán ser confirmadas a futuro.

ABSTRACT

In the last decades, Uruguay has experienced a significant increase in the transportation of goods and people, as well as in the area planted with *Eucalyptus* clones (85%). Our country's geographical barriers absence have facilitated the income of forestry pests such as the eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae). This quarentenary pest was first detected in Uruguay in 2011 and has quickly spread throughout the country. Although there is no effective control methodology, biological control and plant resistance to insects are considered the most suitable approaches. Given that the country's forest plantations are predominantly composed by *E. grandis* and *E. dunnii* clones, it is important to study how these species respond to the *L. invasa* attacks. The main objective of this work was to study the oviposition preference and susceptibility of *Eucalyptus* spp. to *L. invasa*. To evaluate oviposition preference and susceptibility, a Choice Test (TCC) and a No-Choice Test (TSC) were conducted under semi-field (greenhouse) conditions in Tacuarembó city. Three *E. dunnii* (A, B, and C) clones and three *E. grandis* (D, E, and F) clones, with F being a genotype known to be highly susceptible to *L. invasa*, were assessed. Anatomical cross-sections of leaves and stems were performed using staining and histochemistry to study the influence of anatomy on the susceptibility of *Eucalyptus* to this pest. All studied clones exhibited symptoms of attack. Clones D and E were the only ones that did not form galls. The clone F developed galls on the central vein and stem, while clones A, B, and C only had galls on the central vein. In the TCC, the *E. dunnii* (A, B, and C) clones were the most attacked. The clone C being the most susceptible to attack on the petiole and stem. In the TSC, Clone B was significantly more attacked across most variables. The clone F (control) showed a higher level of attack compared to the TCC. Significant differences in oviposition preference among clones were observed. Clones E and D (*E. grandis*) showed lower susceptibility in both tests. While *E. grandis* and *E. dunnii* share some anatomical similarities, differences in composition and tissue arrangement among the studied clones were observed. The most attacked clones exhibited differences in epidermis and vascular bundle arrangement compared to the less affected clones. In conclusion, we observed significant differences in *L. invasa* oviposition preference among the studied clones, along with some anatomical correlations that should be confirmed in future studies.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Importancia de la forestación a nivel mundial.....	11
1.2 Importancia del sector forestal en el Uruguay	11
1.4 Insectos plaga de mayor importancia para el sector forestal uruguayo.	11
1.5 Características generales de <i>Leptocybe invasa</i>	12
1.5.1 Caracteres Diagnósticos de los adultos de la avispa agalladora del eucalipto.	12
1.5.2 Ciclo de vida y formación de las agallas.....	15
1.6 Efectos del ataque de <i>L. invasa</i> en la productividad del sector forestal.	17
1.7 Metodología de manejo de <i>L. invasa</i>	18
1.8 Resistencia de plantas a insectos y mecanismos de defensa de las plantas	19
1.9 Características Anatómicas e histoquímicas de las hojas del género <i>Eucalyptus</i>	20
1.10 Importancia de la evaluación anatómica e histoquímica asociada a los mecanismos de defensa de las plantas al ataque de insectos fitófagos.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo general:.....	22
2.2 Objetivos específicos:	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Ubicación de los experimentos:	23
3.2 Procedimientos generales utilizados en los ensayos:	24
3.2.1 Acondicionamiento de las plantas:.....	24
3.2.2 Obtención de las hembras de <i>L. invasa</i>	24
3.3 Metodología de estudio de susceptibilidad de <i>Eucalyptus</i> spp. frente al ataque de la avispa agalladora del eucalipto	26
3.3.1 Test de susceptibilidad con chance de escoger (TCC).	26
3.3.2 Test de susceptibilidad sin chance de escoger (TSC).....	28
3.4 Análisis de los datos:	29
3.4.1 Test de susceptibilidad con chance de escoger (TCC).	30
3.4.2 Test de susceptibilidad sin chance de escoger (TSC).....	30
3.5 Evaluar la presencia de mecanismos morfológicos asociados con la resistencia de los eucaliptos a <i>L. invasa</i>	30
3.5.1 Cortes anatómicos.....	31

3.5.2	Espesor de la epidermis.....	31
3.5.3	Proceso de diafanizado.....	32
3.5.4	Levantamiento de epidermis y caracterización de estomas.	33
4.	RESULTADOS	34
4.1	Estudio de susceptibilidad de <i>Eucalyptus</i> spp. frente al ataque de la avispa agalladora del eucalipto.	34
4.1.1	Experimento 1. Test de susceptibilidad con chance de escoger (TCC).	34
4.1.2	Experimento 2. Test de susceptibilidad sin chance de escoger (TSC).....	36
4.2	Evaluar la presencia de mecanismos morfológicos asociados con la resistencia de los eucaliptos a <i>L. invasa</i>	38
4.2.1	Levantamiento de epidermis y caracterización de estomas.	38
4.2.2	Espesor de la epidermis.....	39
4.2.3	Anatomía.....	40
5.	DISCUSIÓN	49
5.1	Susceptibilidad de <i>E. dunnii</i> y <i>E. grandis</i> al ataque de <i>L. invasa</i>	49
5.2	Evaluar la presencia de mecanismos morfológicos asociados con la resistencia de los eucaliptos a <i>L. invasa</i>	49
6.	CONCLUSIONES	52
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la forestación a nivel mundial

La forestación es una de las principales actividades generadoras de divisas a nivel mundial. Existen diferencias en las características de las plantaciones forestales entre los hemisferios. Mientras que el hemisferio norte se caracteriza por el uso mayoritario de especies y manejo de bosques nativos, en el hemisferio sur se suelen utilizar especies exóticas siendo los géneros *Eucalyptus* L'Hér (Myrtaceae) y *Pinus* Linneo (Pinaceae) los más importantes [1].

1.2 Importancia del sector forestal en el Uruguay

El sector foresto-maderero es considerado en la actualidad una de las principales actividades productivas del Uruguay, ocupando los primeros lugares a nivel de exportaciones [2], [3]. En el año 2021 la superficie de plantaciones forestales se aproximó al 1.1 millones de hectáreas siendo los géneros exóticos *Eucalyptus* (85.5%) y *Pinus* (13.7 %) los de mayor importancia [4]. Las plantaciones comerciales de *Eucalyptus* spp. en nuestro país se caracterizan por el uso de material de origen clonal y en menor proporción de origen seminal, siendo las especies *Eucalyptus dunnii* Maiden y *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden, las que ocupan la mayor superficie [4]. El principal destino de la madera en Uruguay es para la producción de pulpa de celulosa, seguida de la aserrada y debobinada [2], [3].

1.3 Principales factores que pueden afectar la productividad forestal.

Al igual que otros cultivos, las plantaciones forestales pueden verse afectadas por factores bióticos (insectos, enfermedades, malezas), como por factores abióticos (condiciones climáticas extremas, temperatura, luz, disponibilidad de agua, salinidad, pH y fertilidad del suelo). Estos generan estrés en las plantas y en consecuencia pérdidas en la productividad o incluso pueden ocasionar su muerte [5]. Los insectos y los microorganismos son considerados los principales agentes bióticos que afectan los bosques de producción [6].

1.4 Insectos plaga de mayor importancia para el sector forestal uruguayo.

Las hormigas cortadoras representan la principal amenaza dentro de los insectos plagas que pueden afectar las plantaciones forestales en Uruguay [7]. Por ello, es inviable realizar una plantación sin realizar un control previo, utilizando insecticidas granulados en base a cáscara de naranja y Fipronil [7]. Sin embargo, en los últimos años el ingreso de especies de insectos plaga exóticas se ha incrementado exponencialmente, condicionando la producción forestal del país [8].

Los insectos agalladores como *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle, 2004 (Hymenoptera: Eulophidae), la avispa agalladora del eucalipto, son uno de los principales problemas para la producción de *Eucalyptus* spp. a nivel de vivero y campo [9], [10]. Este gremio de insectos genera alteraciones de los órganos de las plantas ocasionando una indiferenciación del tejido próximo al estado inmaduro (en este caso las larvas) que está desarrollándose dentro del órgano afectado [9]. Los cuáles producen modificación del tamaño, forma (hipertrofia) y número de células (hiperplasia), culminando con la formación de estructuras anormales en las plantas llamadas agallas [11].

1.5 Características generales de *Leptocybe invasa*.

1.5.1 Caracteres diagnósticos de los adultos de la avispa agalladora del eucalipto.

L. invasa es una especie de microhimenóptero, perteneciente a la familia Eulophidae, subfamilia Tetrastichinae. Si bien cuando fue descrita se consideraba una especie constituida sólo por hembras (uniparental) [12], en el año 2005 se describió al macho [13]. Por lo que actualmente se la considera una especie biparental (presencia de ambos sexos), a pesar de que los machos son escasos [13].

Los caracteres diagnósticos descritos a continuación fueron realizados en base a la descripción original de la especie realizada por [12], [14], para las hembras y de [13] para el macho.

- **Hembra**

Se caracteriza por tener un tamaño de 1.1-1.4 mm. Presenta una coloración castaño oscuro en la cabeza, tórax, coxas medias y posteriores con brillo metálico azul verdoso; el abdomen es castaño oscuro alternado con bandas más claras (Fig. 1 A-B). Las coxas anteriores, trocánter, fémur, tibia y primeros tarsitos son de color amarillo pálido, tarsitos apicales de color castaño (Fig. 2 A-B). El escapo de las antenas es amarillo pálido en la base oscureciéndose hacia el ápice, el funículo y la clava pueden ser de color castaño a castaño claro y ambos presentan tres segmentos. (Fig. 2 C). Las alas son hialinas con las nervaduras de color castaño claro (Fig. 2 D). El abdomen presenta un aspecto globoso (Fig. 1 A).

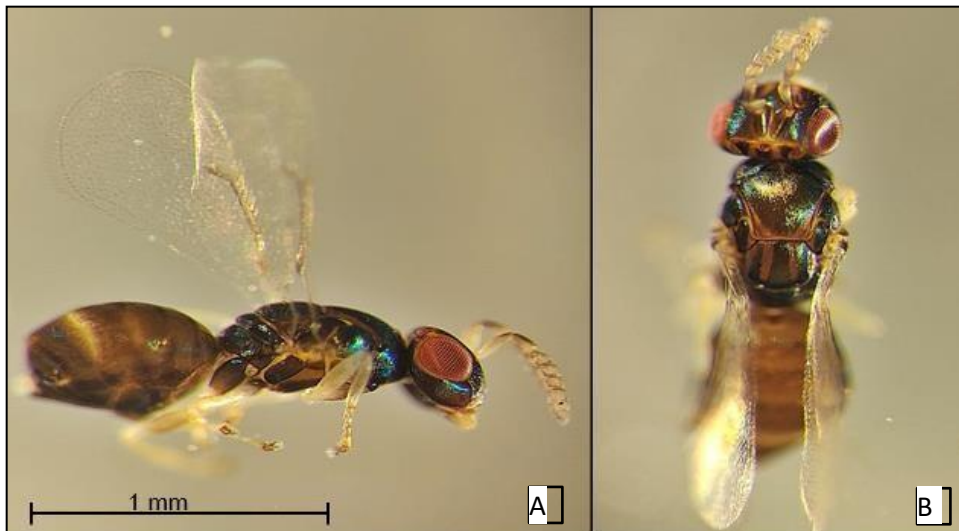


Figura 1. Aspecto y coloración de las hembras de *L. invasa*: **A.** vista lateral, **B.** vista dorsal.



Figura 2. Coloración de las patas, alas y antenas de las hembras de *L. invasa*. **A.** Antena. **B.** Alarhialina, nervaduras castaño claro. **C.** Coxas medias y posteriores.

- Macho

Es de menor tamaño que la hembra, presenta una longitud de 0.8-1.2 mm. Su coloración es similar a la hembra, excepto por lo siguiente: cabeza y mesosoma castaño oscuro con un brillo metálico azul-verdoso más intenso que en el metasoma en vista dorsal (Fig. 3 A-B). Las patas son de color amarillo pálido, excepto las coxas media y posterior tienen un brillo metálico. El funículo presenta cuatro segmentos en lugar de tres, con abundantes setas largas y clava de tres segmentos. El escapo es amarillo pálido oscureciéndose dorsalmente en el ápice; el pedicelo es amarillo pálido, oscuro dorsalmente en su base; el funículo y la clava son de color castaño claro (Fig. 3 C). Hábdomen a diferencia de las hembras es alargado terminado en punta dejando expuesto el aedeago (Fig. 3 A).



Figura 3. A-B. Coloración del macho de *L. invasa* **A.** En vista lateral. **B.** En vista dorsal y **C.** Antena con funículo de cuatro segmentos y abundantes setas largas.

1.5.2 Ciclo de vida y formación de las agallas.

Leptocybe invasa es una especie fitófaga galícola, es decir que induce la formación de agallas en tejidos vegetales de sus hospederos [11], [15]. Se reproduce principalmente por partenogénesis telítoca, en la cual la descendencia generada son hembras y raramente se observan machos, por lo que secundariamente podría darse la reproducción sexual [10]. Las hembras son proovigénicas (sus huevos están maduros) y al momento de emerger de la agalla puede comenzar a oviponer [16]. Estas insertan el ovipositor preferentemente en ambos lados de la nervadura central, en los pecíolos y/o en los tallos en crecimiento [12], [17].

El primer síntoma observado son las cicatrices de oviposición, donde comienza a verse tejido más oscuro ocasionado por la inserción del ovipositor (Fig. 4). Posteriormente las larvas eclosionan de los huevos, comienzan a liberar compuestos químicos similares a hormonas de crecimiento de las plantas, que generan una respuesta al ataque en los diferentes tejidos afectados [18].



Figura 4. Marcas de oviposición de *L. invasa* en brotes, nervadura central y pecíolo de *Eucalyptus grandis*.

Estudios realizados por [12] en Israel, propusieron que *L. invasa* presenta cinco etapas de desarrollo de los estados inmaduros dentro de las agallas (Fig. 5). Las mismas fueron definidas en base a los cambios morfológicos y de coloración en los tejidos afectados externamente, los que

se correlacionan con el ciclo biológico de la avispa en su interior.

Etapa 1: entre una a dos semanas posterior a la oviposición se comienza a ver los primeros síntomas de formación de las agallas, en caso de que el genotipo sea susceptible (Fig. 5 A), las cuales van aumentando de tamaño pasando a la Etapa 2 (Fig. 5 B). Luego de un período de tiempo las agallas cambian de color verde a rosa adquiriendo una apariencia esférica a medida que la avispa va desarrollándose internamente (Etapa 3) (Fig. 5 C). El estado de madurez final de las agallas (Etapa 4) se caracteriza generalmente, por el cambio del color de las mismas a rosa oscuro (Fig. 5 D) [12]. En la etapa 5, se visualiza un orificio pequeño creado por el adulto para abandonar la agalla (Fig. 5 E.).

Algunos autores plantean que la clasificación propuesta por [12] no siempre es aplicable, debido a que en la etapa 5 (presencia de orificios de emergencia) puede ser observada en agallas con una coloración verdosa, castaña clara o bien rosa intenso dependiendo, entre otras cosas, de la especie o genotipo de eucalipto atacada [13].

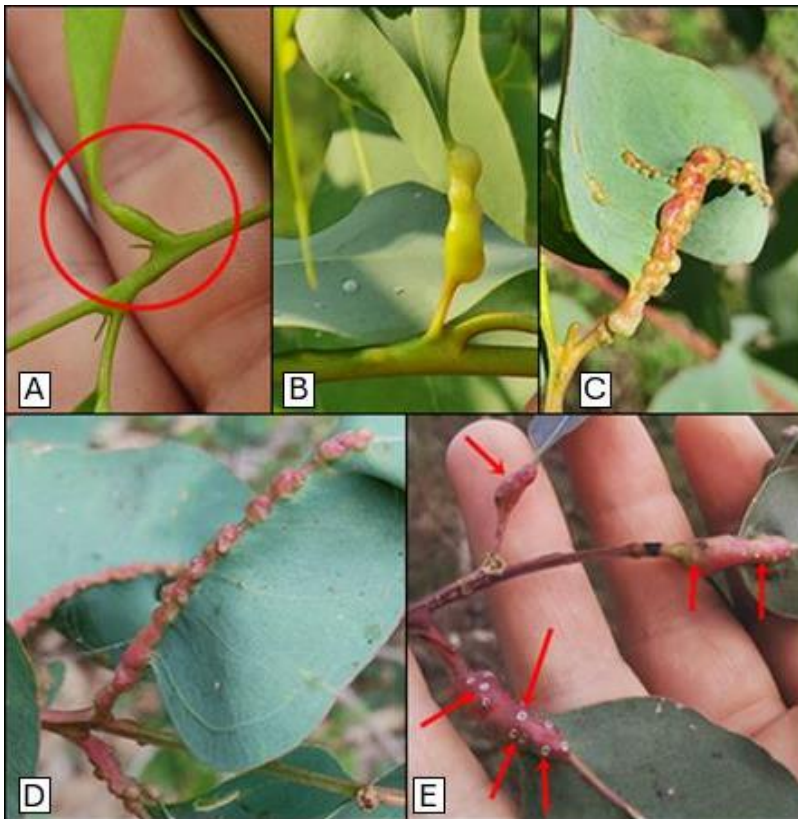


Figura 5. Secuencia de formación de las agallas de *L. invasa*. A. Etapa 1: Formación inicial, coloración verde brillante. B. Etapa 2: aumento del tamaño, se visualiza la forma esférica característica, el color cambia de verde a rosado perdiendo el brillo. C. Etapa 3: Comienza a quedar de color rojo oscuro e ingresa en la etapa final de madurez larval. D. Etapa 4: Agallas maduras, color rojo oscuro a bordó. E. Etapa 5: Orificios de emergencia de adultos.

El desarrollo de las avispas transcurre en el interior de las agallas donde las larvas se alimentan de tejido vegetal hasta alcanzar el estado de pupa, el ciclo termina con la emergencia del adulto. La duración del ciclo biológico de *L. invasa* es variable, dependiendo principalmente de las condiciones climáticas del ambiente en el cual se están desarrollando. Los factores que más influyen son la temperatura, fotoperíodo, además del genotipo de la especie de *Eucalyptus* spp. atacada [17], [10]. En zonas templadas el ciclo puede completarse en un período de 4 a 5 meses con 2 a 3 generaciones solapadas [12], [17], en climas tropicales puede durar apenas 45 días con hasta 8 generaciones anuales [19].

En algunos genotipos *L. invasa* no consigue inducir la formación de agallas, pero genera otras alteraciones fisiológicas como superbrotación (formación anormal de varios brotes en el área axilar o el meristema apical) (Fig. 6 A) o pérdida de dominancia apical (Fig. 6 B) [9]. También puede ocasionar la muerte de los brotes en formación (Fig. 6 C) [10], [11]. Esto se ve reflejado directamente sobre el crecimiento de los hospederos afectados [13].

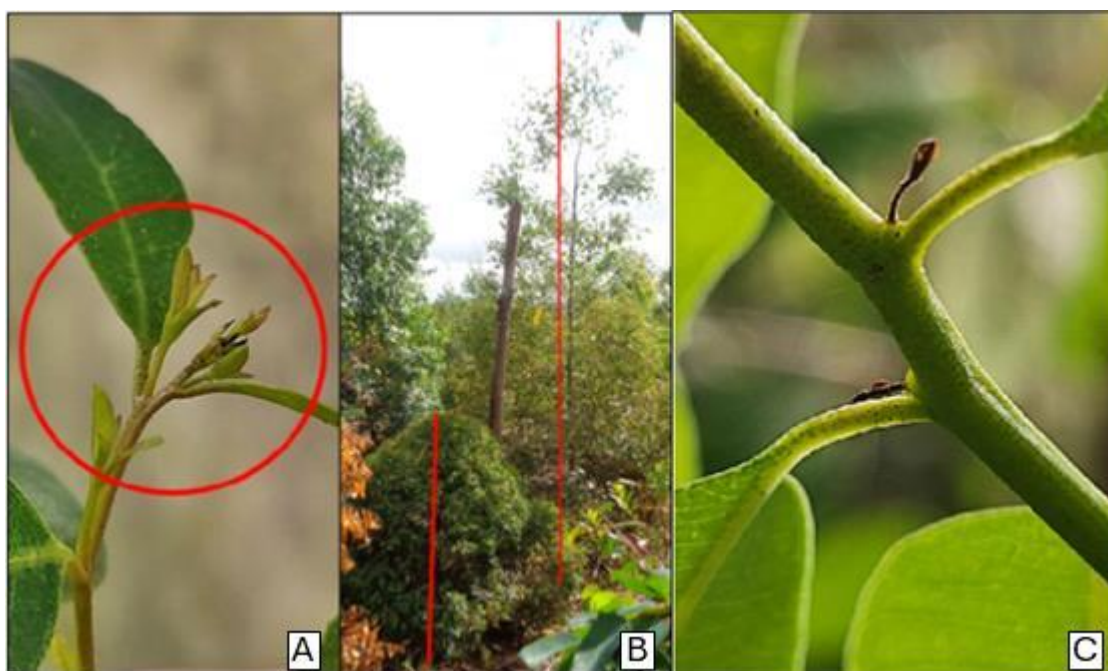


Figura 6. Síntomas del ataque de *L. invasa*. **A.** Superbrotación. **B.** Pérdida de dominancia apical en *E. saligna* (Jorge, 2016), **C.** Brotes en formación muertos.

1.6 Efectos del ataque de *L. invasa* en la productividad del sector forestal.

La avispa agalladora del eucalipto es un insecto plaga que tiene la capacidad de atacar y desarrollarse únicamente en especies del género *Eucalyptus*, considerándola una especie moderadamente oligófaga [20]. Dentro de las especies de *Eucalyptus* susceptibles a *L. invasa* se

destacan: *Eucalyptus botryoides* Sm, *Eucalyptus bridgesiana* (Ebr), *Eucalyptus camaldulensis*; Dehnh., 1832, *Eucalyptus deanei* (Roundleaf Gum), *Eucalyptus globulus*; Labill., 1800, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus nitens*; H. Deane & Maiden, *Eucalyptus robusta*; Sm. 1795, *Eucalyptus saligna*; Sm, *Eucalyptus tereticornis* Sm. y *Eucalyptus viminalis* Labill. 1806, y algunos híbridos [12], [13], [17], [18].

El ataque de *L. invasa* induce la formación de agallas en la nervadura central y/o pecíolo de las hojas, ramas y fuste en árboles jóvenes de *Eucalyptus* spp. dependiendo de la susceptibilidad del material genético atacado [12], [21]. La presencia de múltiples agallas determina que las hojas se enrollen, y en ataques intensos puede ocurrir la defoliación por el bloqueo de los haces vasculares, o bien que los brotes tiernos colapsen y mueran y/o generando superbrotación (Fig. 6) [9], [10] y [12].

El daño de esta plaga se ve reflejado directamente en el desarrollo de los *Eucalyptus* spp., debido a que *L. invasa* tiene preferencia por atacar plantines, árboles jóvenes o brotes nuevos en árboles adultos de *Eucalyptus* spp., [9], [22]. Como fuera mencionado, el ataque de *L. invasa* genera efectos negativos directos que se reflejan en el crecimiento y/o topología de la planta atacada y en consecuencia pérdidas económicas de importancia [10], [15], [22]. Las agallas pueden bloquear en las ramas el flujo de savia y provocar la muerte de ápices, además de inducir un estrés adicional en la planta [10]. Lo que conlleva a un debilitamiento y retraso en el crecimiento de los árboles generando pérdidas en la productividad, hasta la muerte de plantas jóvenes en casos de genotipos muy susceptibles al ataque de la plaga [9], [12], [21], [22], [23].

1.7 Metodología de manejo de *L. invasa*.

Hasta el momento no se cuenta con una metodología que sea efectiva para el manejo de *L. invasa*. Sin embargo, se han explorado el control cultural, el control químico, el control biológico y la resistencia de plantas a insectos, [17], [20], [21], [24], [25]. A nivel de vivero el descarte de plantines con agallas, podas en el jardín clonal suelen ser utilizadas con frecuencia [9].

El uso de control químico ha dado resultados divergentes tanto en ensayos con insecticidas de contacto (piretroides) y de sistémicos (neonicotinoides) [21], [25]. Algunos autores recomiendan el uso de neonicotinoides como una medida de prevención antes de llevar los plantines a campo y/o curativa (antes de formación de la agalla) [26], [25], [27]. Podría ser aplicable en vivero [9], pero en campo debido a la logística, costos económicos y ambientales lo torna un método poco recomendable [21].

Hasta el momento el uso de genotipos resistentes y el control biológico son las principales alternativas para el manejo de la avispa agalladora del eucalipto, con la ventaja de poder ser utilizados tanto en vivero como en campo [9], [21], [24], [20] y [28].

El control biológico clásico es uno de los dos métodos más comunes de utilizar en el manejo de insectos plaga a nivel forestal [24]. En el caso de *L. invasa* el uso de los parasitoides de larva y/o pre-pupa *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle, 2012 y *Quadrastichus mendelli* Kim & La Salle, 2008 (Hymenoptera: Eulophidae) son los más utilizados [24], [29], [30], [31].

La resistencia de plantas a insectos consiste en utilizar especies o genotipos que no sean preferidos o que, si son atacados, presenten cierta tolerancia al ataque de la plaga de interés [5], [32]. Teniendo en cuenta que la mayor parte de las plantaciones de *Eucalyptus* son homogéneas debido al uso de material clonal de una o pocas especies, es importante conocer cómo va a responder ese genotipo a la presencia de un determinado insecto plaga antes de ser llevado a campo [17].

1.8 Resistencia de plantas a insectos y mecanismos de defensa de las plantas

Los insectos agalladores presentan una fuerte interacción con sus hospederos, debido a que deben controlar los mecanismos de defensa de las plantas [33], [34]. Estudios de susceptibilidad de eucaliptos a *L. invasa* se han realizado en varios países como Sudáfrica [18], Argentina [35], Brasil [36], China [37], India [38], Italia [39], Taiwán [40], Uganda y Kenia [41], entre otros.

Determinar la presencia de genotipos de *Eucalyptus spp.* resistentes o tolerantes al ataque de *L. invasa* es una buena metodología a ser estudiada para el manejo de esta plaga. Sin embargo, la selección de materiales resistentes a nivel forestal ha sido más estudiado en nuestro país para patógenos [42]. Se han realizado algunos ensayos con picosuctores de interés forestal, enfocados en seleccionar el mejor material para ser utilizado en crías en laboratorio, pero no con fines de manejo [43], [44].

A lo largo de la interacción entre las plantas y los insectos herbívoros han surgido diversos mecanismos de las plantas para evitar ser predados y de los insectos para evitar los efectos negativos de estas al defenderse [34]. Dentro de los mecanismos de defensa de las plantas se pueden diferenciar aquellos que son constitutivos (que siempre están presentes) y los que son inducidos (se manifiestan frente a la interacción con herbívoros o patógenos) [45].

Las defensas constitutivas están relacionadas son de tipo mecánico como presencia de tricomas, espinas, tejidos de protección químico o producción de sustancias tóxicas, repelentes y/o que alteren la fisiología del insecto [34]. Por otra parte, los mecanismos de defensa inducidos más comunes son la producción de metabolitos secundarios tóxicos que pueden afectar el desarrollo de los insectos, evitar su alimentación, y ocasionar la muerte de los mismos [46]. Estas sustancias tóxicas se diferencian en tres grupos principales que son los compuestos nitrogenados, los fenoles y los terpenos [47].

Los fenoles como los taninos están comúnmente asociados con las respuestas de las plantas frente al ataque de insectos [34]. Los taninos se unen a las proteínas haciendo que sea más difícil de ser degradadas por el sistema digestivo de los insectos. Los compuestos nitrogenados como los alcaloides y los glucósidos cianogénicos son producidos por las plantas para evitar la herbivoría [48]. Los terpenos son el grupo más diverso de metabolitos secundarios de las plantas, algunos de ellos actúan inhibiendo la alimentación de los insectos, otros son tóxicos pudiendo ocasionar su muerte [47].

Contar con mecanismos de defensa constantemente suele ser muy costoso para las plantas por lo que muchas especies prefieren invertir en su crecimiento y reaccionar frente a la interacción con los herbívoros, siendo los inducidos los más comunes [49].

Para identificar y estudiar estos mecanismos de defensa en las plantas, se utilizan diversas metodologías que permiten observar estructuras en las hojas como tricomas, cristales, entre otros. Entre estas metodologías, el diafanizado se destaca por su capacidad para transparentar los tejidos blandos, facilitando la visualización de estructuras anatómicas con mayor facilidad previamente a teñirlas y sin dañar la pared celular [50]. Esta técnica, combinada con transcortes foliares y tinciones específicas, permite identificar y caracterizar las estructuras de defensa mecánica que están asociadas con la resistencia o susceptibilidad al ataque de insectos, [49], [51]. De esta manera, el uso de técnicas histológicas complementa la comprensión de cómo las plantas se defienden mediante una combinación de mecanismos físicos y químicos.

1.9 Características Anatómicas e histoquímicas de las hojas del género *Eucalyptus*

La caracterización anatómica e histoquímica de los órganos de las plantas es importante no solo para conocer la morfología y disposición de los tejidos, de compuestos químicos de interés, así como para la identificación de especies [52]. Se han realizado varios estudios enfocados en determinar la estructura anatómica foliar de diferentes especies de *Eucalyptus* de interés comercial y/o medicinal, [52], [53], [54].

La anatomía foliar de *E. grandis* se caracteriza por presentar la epidermis uniestrata, cuyas células se diferencian por su forma de tipo tubular a redondo o papilosas, dependiendo de la región de la epidermis [55]. Los haces vasculares están posicionados en la región media de la nervadura central, presentan una forma de arco plano en corte transversal. Los mismos se encuentran rodeados en ambas caras por una gran proporción de colénquima, siendo la cara abaxial la que presenta un mayor espesor [56].

La epidermis de las hojas de *E. dunnii* también es uniestrata, pero presenta una capa de cera por encima de la misma de mayor espesor que en *E. grandis* [56]. En esta especie el haz vascular ocupa la mayor proporción de la nervadura central y el área de colénquima asociada al mismo es menor que en *E. grandis* [57], [56]. A su vez se observan dos pequeños haces vasculares en la cara adaxial y fibras de esclerénquima entre ellos [56].

El género *Eucalyptus* se caracteriza por la producción de compuestos secundarios con aromas y propiedades farmacológicas, como aceites esenciales, resinas y compuestos fenólicos [58]. Los compuestos fenólicos están presentes en el mesófilo y en el parénquima empalizada, así como en ambas caras de la epidermis, juegan un papel crucial en la defensa y en las propiedades medicinales de los eucaliptos [55].

Las hojas de eucalipto contienen compuestos lipídicos como cutina y ceras, que forman parte de la cutícula. Esta cutícula puede variar en estructura y espesor entre diferentes especies de *Eucalyptus*; por ejemplo, la cutícula de *E. globulus* es aproximadamente el doble de gruesa que la de *E. camaldulensis* [59]. Además, presentan aceites esenciales que incluyen una variedad de lípidos volátiles, entre los cuales se encuentra el eucaliptol (también conocido como 1,8-cineol) [cita]. Este aceite se encuentra en las glándulas secretoras y es responsable de las propiedades aromáticas y medicinales del eucalipto [60].

La caracterización histoquímica del género *Eucalyptus* no solo presenta importancia farmacológica y comercial, sino que también ha generado interés en entender cómo las plantas producen o modifican estos compuestos en respuesta a interacción con herbívoros y patógenos [61].

1.10 Importancia de la evaluación anatómica e histoquímica asociada a los mecanismos de defensa de las plantas al ataque de insectos fitófagos.

El ataque de *L. invasa*, al igual que otros insectos agalladores, desencadena una serie de reacciones que alteran la actividad metabólica de la planta reflejándose a nivel anatómico y/o histoquímico [62]. En los genotipos susceptibles las células y tejidos del órgano atacado se ven modificadas induciendo la formación de agallas [21]. Además de los cambios a nivel celular, la síntesis y las concentraciones de compuestos secundarios como los taninos se ven modificados [63]. Los taninos y otros compuestos secundarios son producidos por las plantas como mecanismos de defensa frente al ataque de insectos y patógenos o ante un estrés abiótico [47].

La interacción entre los insectos agalladores y sus hospederos es muy compleja debido a que éstos tienen que evitar los mecanismos de defensa de las plantas y modificar sus órganos y tejidos para su propio beneficio [64]. Las larvas de *L. invasa* secretan sustancias similares a fitohormonas que alteran el crecimiento celular del órgano atacado, creando condiciones favorables para su desarrollo y la formación de agallas [64], [60].

Hasta el momento, no se conoce qué procesos fisiológicos están siendo alterados en los eucaliptos por acción de las larvas de *L. invasa* y cuáles pueden colaborar en la resistencia al ataque de la plaga [13]. Por tanto, conocer si existen características anatómicas y/o histoquímicas de los eucaliptos que aportan resistencia frente al ataque de *L. invasa* es importante para un manejo adecuado de las plantaciones.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Estudiar la susceptibilidad de diferentes genotipos de *E. grandis* y *E. dunnii*. al ataque de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) y analizar mecanismos de defensa frente a la plaga.

2.2 Objetivos específicos:

1. Estudio de la susceptibilidad de *Eucalyptus grandis* y *E. dunnii* al ataque de la avispa agalladora del eucalipto
2. Evaluar la presencia de mecanismos morfológicos asociados con la resistencia de *E. grandis* y *E. dunnii* a *L. invasa*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de los experimentos:

El trasplante de los plantines, el procesamiento de las muestras con agallas, el acondicionamiento de las mismas y la colecta diaria de individuos, fueron realizados en el laboratorio de Manejo integrado de insectos forestales (LabMIIF), de la sede Tacuarembó del CENUR Noreste de la Udelar.

Los experimentos para evaluar la susceptibilidad de diferentes clones de eucaliptos al ataque de *L. invasa* en condiciones de semicampo, se desarrollaron en el macrotúnel del LabMIIF ubicado en la ciudad de Tacuarembó, Uruguay (Fig. 7). La preparación de las muestras para los cortes anatómicos y las evaluaciones histoquímicas se realizaron en el laboratorio de Biología vegetal de la sede Tacuarembó del CENUR Noreste, Udelar.

El período de realización de los ensayos, contemplando instalación, acondicionamiento, evaluaciones y análisis estadístico, abarcó todo el año 2023. Las inoculaciones se realizaron en febrero del 2023 y las evaluaciones durante el período febrero a Julio del año 2023 tanto para el test con chance de escoger (TCC), como para el test sin chance de escoger (TSC).



Figura 7. Área de realización de los ensayos. Fuente Google earth (2024).

3.2 Procedimientos generales utilizados en los ensayos:

3.2.1 Acondicionamiento de las plantas:

Se utilizaron plantines de origen clonal de las especies *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunnii*. Se evaluaron seis clones en total, tres correspondientes a *E. dunnii* (clon A, clon B, clon C) y tres de *E. grandis* (clon D, clon E, clon F), siendo el clon F el testigo de los ensayos (susceptible a *L. invasa*). Para disminuir la variabilidad en ambos experimentos se utilizaron plantines que presentaban una altura aproximada de 30 a 40 cm (altura promedio con la que se envían los plantines al campo). Los materiales genéticos utilizados fueron proporcionados por dos empresas forestales presentes en el país.

Debido a que los plantines son producidos y transportados en tubetes biodegradables (ellepot), debieron ser trasplantados a macetas de nylon de 2 litros para evitar que se estresen e interfirieran en el estudio. En ambos ensayos se utilizó el mismo sustrato constituido por: 20% carbonilla, 60% humus de lombriz y 20% turba.

Los plantines fueron mantenidos en un invernadero (macrotúnel) bajo condiciones de riego automático secuenciado 15 minutos, tres veces al día a las 7 AM, 1 PM y 6 PM, desde febrero hasta abril del 2023, luego se bajó a dos riegos diarios a las 7 AM y 1 PM. En cada riego se aplicaron 30 ml de agua por plantin.

Se realizaron monitoreos y control de hormigas cortadoras dentro y en zonas aledañas al macrotúnel. Se realizaron recorridos en busca de caminos forrajeros o presencia de hormigueros y se colocó hormiguicida granulado a base de Fipronil.

3.2.2 Obtención de las hembras de *L. invasa*:

Para contar con una gran cantidad de individuos vivos de la plaga se realizaron colectas de ramas de eucaliptos con agallas maduras. Las colectas provinieron de rebrotes de eucaliptos colorados altamente susceptibles de una plantación ubicada en la localidad de Rincón de Giloca, Tacuarembó. Esto fue realizado para disminuir la variabilidad genética entre los individuos de *L. invasa* a ser utilizados en los ensayos.

Luego las muestras colectadas fueron trasladadas al laboratorio donde se procesaron para obtener la emergencia de los adultos. Se realizaron dos procedimientos para la obtención de los individuos adultos:

A) Las ramas colectadas se colocaron en jarros con agua, formando una especie de florero, para mantenerlas viables por un tiempo mayor. Luego se pusieron dentro de jaulas herméticas de madera, vidrio y voile para evitar la fuga de los ejemplares que emerjan y facilitar

su recolección sin dañarlos (Fig. 8 A). Las jaulas estuvieron en el labMIIF bajo condiciones de fotoperíodo 12:12 y temperatura 24 °C para acelerar el proceso de emergencia [15]

B) Parte del material traído de campo se procesó cortando el tejido vegetal de las hojas y ramas que no contenía agallas para evitar exceso de humedad asociada a la transpiración, debido a que las muestras con agallas se colocaron en bolsas con cierre hermético. Las mismas se colocaron en una cámara ambiental bajo condiciones de fotoperíodo 12:12, con intensidad lumínica de 45 $\mu\text{mol/s}$ y temperatura 24 °C para acelerar el proceso de emergencia. [15]. (Fig. 8 B).

En ambos procedimientos las muestras fueron revisadas diariamente para extraer los adultos vivos. En el caso de las bolsas se realizó el secado de las mismas con papel toalla para evitar el exceso de humedad y la formación de hongos.



Figura 8. Procedimientos para la obtención de adultos de *L. invasa*. **A.** Jaula con un florero de ramas con agallas maduras. **B.** Cámara climática con muestras procesadas en bolsas herméticas.

Para evitar un efecto de la edad de las avispas, las mismas fueron utilizadas el mismo día de la emergencia. Para ello, se revisaron diariamente las muestras y se realizó el sexado de los mismos colocando las hembras en frascos con miel y los machos en frascos con alcohol al 70% para su conservación.

3.3 Metodología de estudio de susceptibilidad de *Eucalyptus* spp. frente al ataque de la avispa agalladora del eucalipto

3.3.1 Test de susceptibilidad con chance de escoger (TCC).

El objetivo de este ensayo fue evaluar la preferencia de oviposición de *L. invasa* frente a los distintos materiales genéticos de *E. grandis* (clones E, D y F) y *E. dunnii* (clones A, B y C) estudiados.

El diseño experimental consistió en 6 tratamientos en 16 bloques, donde cada clon fue considerado un tratamiento y al bloque como repetición, totalizando 96 plantines. Se realizaron 15 repeticiones más un bloque testigo en el que no se liberaron avispas. El mismo consistió en colocar en una jaula los seis clones dispuestos a la misma distancia de un punto central y se liberaron 20 hembras de la plaga, en dos instancias de 10 avispas con una semana entre ellas para simular una reinfestación natural. Posteriormente se observaron cuáles materiales fueron los más atacados.

El ensayo fue realizado en condiciones de semicampo, en un invernáculo con riego automático. En el mismo se instalaron jaulas cilíndricas de 1.4 m de diámetro y 0.90 m de altura, con estructura de bambú apoyados en dos círculos de alambre, cubiertos por un forro de voile blanco con un cierre vertical para poder abrir y cerrar la jaula (Fig. 9 A-B). Los plantines fueron regados manualmente los primeros días del ensayo después de la liberación de las avispas. Esto fue realizado, para evitar la interferencia del riego por aspersión en la sobrevivencia y oviposición de la plaga, debido a su pequeño tamaño (1.1-1.4 mm). Para el riego manual se aplicó la misma cantidad de agua que hubieran recibido en el riego automático.

Cada bloque estuvo integrado por una planta de cada clon, colocados de forma equidistante del punto de liberación de las avispas (punto central) y distribuidos aleatoriamente en la circunferencia del fondo de la jaula. Con ello se intentó que la plaga tuviese las mismas posibilidades de ir a cualquiera de los plantines (Fig. 9 C). Cada maceta se marcó con un código de identificación correspondiente a cada clon para facilitar las evaluaciones posteriores (Fig. 9 D). El trabajo final estuvo enmarcado dentro de un proyecto de investigación (FPTA 368) en el que se evaluaron 12 clones más el testigo, por ello es que en la figura 9 se observa un mayor número de plantas

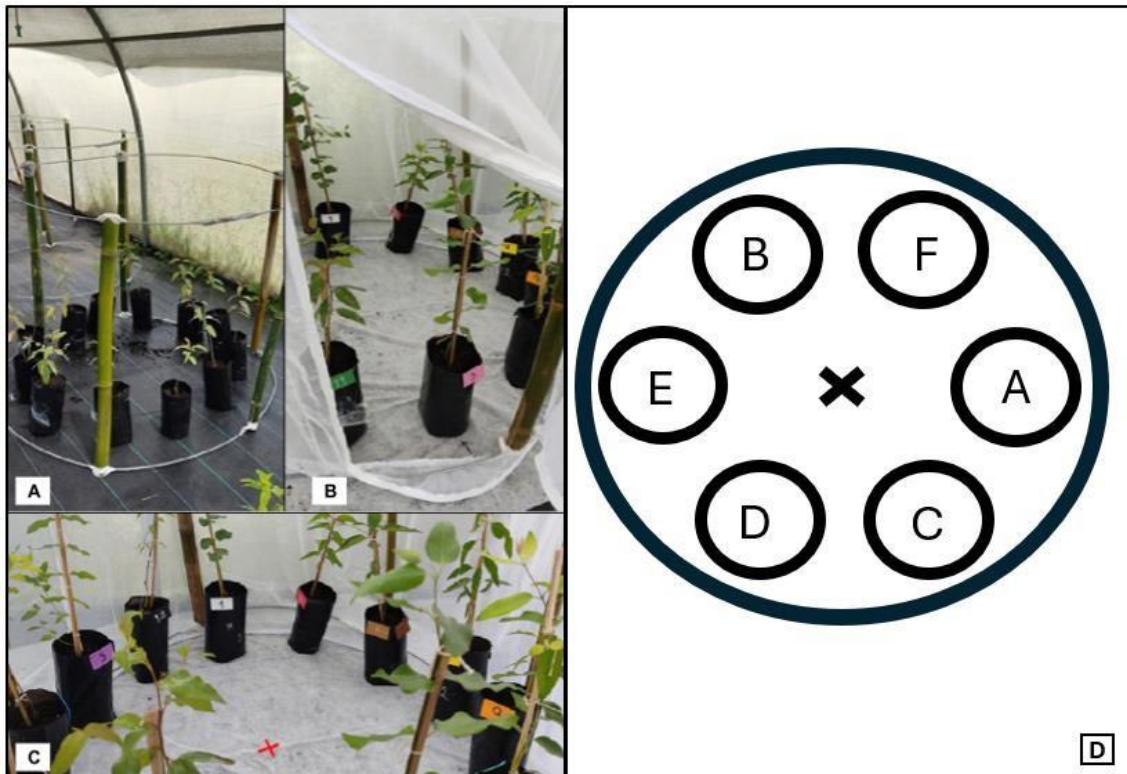


Figura 9. Ensayo del test con chance de escoger. **A.** Jaulas cilíndricas, **B.** Jaulas cubiertas por un saco de voile blanco. **C.** Macetas con los códigos de identificación de cada clon, la cruz roja indica el punto de liberación de las avispas. **D.** **Ejemplo** de distribución a azar de clones dentro una jaula.

Las avispas vivas recolectadas en el laboratorio se colocaron en frascos de plástico con tapa de 50 ml con miel y fueron llevadas al macrotúnel para realizar las inoculaciones de los plantines (Fig.10).

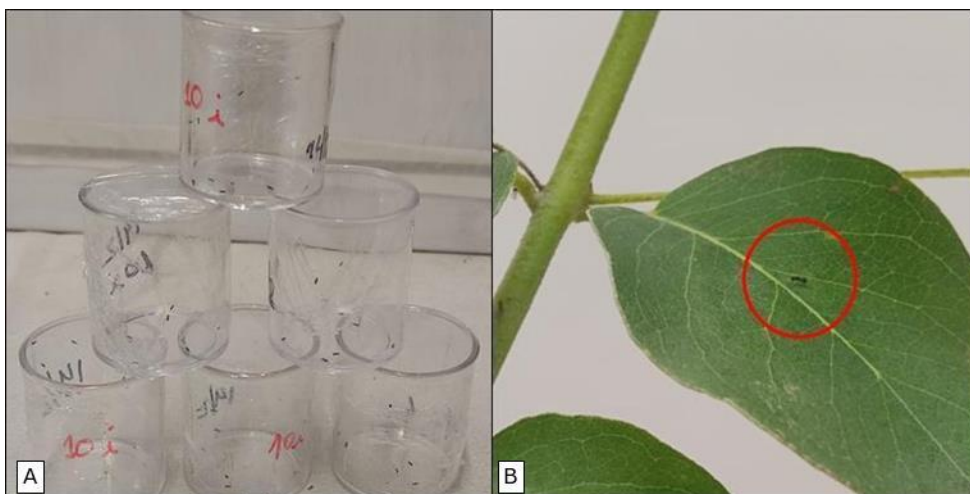


Figura 10. **A.** Avispas vivas recolectadas en frascos de 20 ml. **B.** Liberación de *L. invasa* en las jaulas.

Se realizó un test para evaluar la longevidad de *L. invasa* en el laboratorio manteniendo las avispas capturadas vivas sin alimento (miel). Para ello se colocó una hembra de la plaga por tubo de ensayo, sin miel y cerrado con film. Se realizaron 10 repeticiones y los mismos fueron colocados en una cámara climática con fotoperíodo 12:12 y 24 °C según [12], siendo revisados diariamente. El máximo de sobrevivencia de las avispas sin alimentación fue de 3 días similar a lo obtenido por [12], [15].

Con este dato se procedió a mantener las avispas en las jaulas durante 96 horas (4 días) para asegurar que las mismas logran depositar sus huevos y que no quede ninguna viva antes de retirar el saco de voile. El mismo fue quitado luego de las dos inoculaciones y se dejó la estructura de bambú y metal separando cada bloque.

La primera evaluación se realizó a los 20 días después de la inoculación, en la cual se contabilizó el número de hojas con marcas de oviposición en: nervadura central (Nc), pecíolo (P), nervadura central y pecíolo a la vez (Nc/P), brotes (Br) y tallo. Además, se registró el número de hojas totales, cantidad de brotes secos y se midió la altura de los plantines. También se realizaron observaciones respecto al estado sanitario y aspecto general de los plantines.

En total se realizaron tres evaluaciones con 30 a 40 días de diferencia entre cada una, registrando los mismos datos que en la primera evaluación. Dado que algunos clones formaron agallas, se decidió culminar con el seguimiento a los 150 días post inoculación, dado que es un tiempo superior a la duración del ciclo de la avispa en climas templados (120 días) según [12] y [15].

3.3.2 Test de susceptibilidad sin chance de escoger (TSC).

El objetivo de este ensayo fue evaluar el comportamiento de la plaga cuando se la enfrenta a un solo clon como opción de oviposición. De esta manera se genera una presión sobre las avispas, dado que no se les da la opción de seleccionar el material preferido. Con este tipo de test se obtiene información más certera acerca del nivel de susceptibilidad real de cada material estudiado. Los clones fueron los mismos que los utilizados en el TCC: clones A, B y C (*E. dunnii*); D, E y F (*E. grandis*).

Cada clon fue evaluado individualmente, se utilizaron 10 plantas por clon, las cuales fueron colocadas aisladas en una jaula de madera, vidrio y tela de tipo voile en condiciones de laboratorio (Fig. 11 A). En cada jaula se liberaron 3 hembras de *L. invasa* con 24 horas de emergencia y se cerraron colocando cinta de papel en los bordes de la puerta para evitar su escape (Fig. 11 B). Las mismas estuvieron activas durante 96 horas y se comenzaron las evaluaciones a partir de ese momento (Fig. 11 C). El procedimiento del registro, evaluación y el análisis de datos fue el mismo utilizado para el TCC. Las evaluaciones se realizaron en el período de febrero a julio.

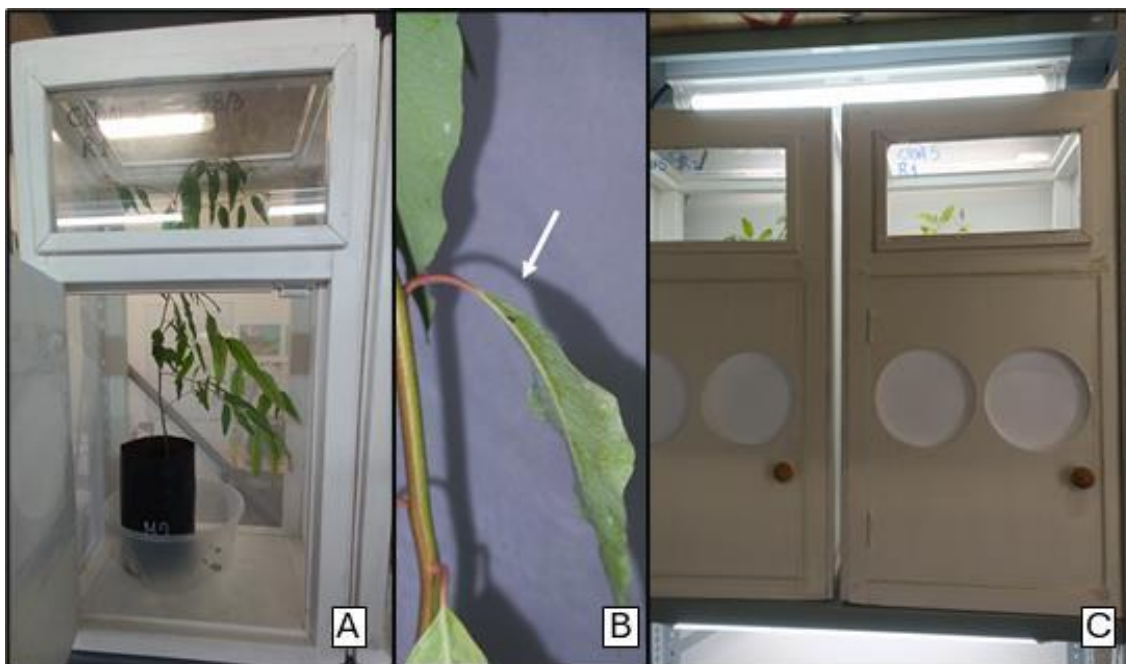


Figura 11. Jaulas utilizadas en el test sin chance de escoger. **A.** Colocación de una planta por jaula, **B.** Liberación de las avispas. **C.** Mantenimiento de las avispas en las jaulas para promover la oviposición.

3.4 Análisis de los datos:

Se llevaron a cabo tres evaluaciones de los síntomas y del daño a lo largo la duración de los ensayos. En cada evaluación se calculó el porcentaje de ataque total, el porcentaje de hojas atacadas y las frecuencias de ataque en los órganos de las plantas para cada clon. (Tabla 1 y Tabla 2). Además, se registró la formación de agallas y la presencia de otros síntomas como superbrotación, brotes muertos o pérdida de dominancia apical.

Para estudiar el comportamiento de los datos, se realizó la estadística descriptiva, análisis de medidas, test de normalidad y homogeneidad de los datos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los datos obtenidos en la primera evaluación.

3.4.1 Test de susceptibilidad con chance de escoger (TCC).

Se realizó el test de Shappiro Wilck para testear la normalidad de los datos. El test de Levene fue utilizado para verificar la heterogeneidad de las varianzas. Como los datos no presentaron una distribución normal, se utilizó la transformación $\log(n + 1)$ para ajustarlos a un modelo normal. Para evaluar si existieron diferencias entre los clones para cada variable, se utilizó un modelo mixto de regresión binomial negativa con bloques y repeticiones.

Los clones fueron considerados como tratamientos y a los síntomas de ataque (cicatriz o agalla) en nervadura central (Nc), Pecíolo (P), presencia de ambos en una misma hoja (P/Nc), rama (R), tallo (T), brotes (Br) y brotes secos (Br. secos); como las variables de respuesta. El test de Tuckey se realizó para comparar el efecto de los clones (tratamientos) sobre las variables de respuesta (Nc, P, P/Nc, R o T, Br., Br. secos) y se obtuvo el ranking para la comparación de medias a partir del test de rangos múltiples (LSD). Posteriormente se realizaron los gráficos correspondientes.

3.4.2 Test de susceptibilidad sin chance de escoger (TSC).

Los datos fueron analizados a través de un modelo de regresión binomial negativa. Se realizaron el test de Shappiro Wilck para testear la normalidad de los datos, y el test de Levene para verificar si los datos presentaban heterogeneidad de la varianza. Debido a que los datos no fueron normales ni homogéneos se realizó la transformación $\log(n + 1)$. El test de Tuckey se realizó para comparar el efecto de los clones (tratamientos) sobre las variables de respuesta (Nc, P, P/Nc, R o T, Br., Br. secos).

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos en el TCC y en TSC, se realizaron utilizando el software R studio versión 4.4.0.

3.5 Evaluar la presencia de mecanismos morfológicos asociados con la resistencia de los eucaliptos a *L. invasa*.

La caracterización anatómica e histoquímica de las hojas sanas de los clones estudiados se realizó mediante transcortes foliares y su posterior tinción con diferentes reactivos, diafanizado de hojas y levantamiento de epidermis.

3.5.1 Cortes anatómicos.

La preparación de las muestras para los cortes se realizó siguiendo los procedimientos propuestos por [65] a partir de hojas frescas de los clones de eucaliptos estudiados, utilizando cera odontológica como soporte. Para ello, se utilizó un micrótopo de rotación (marca SLEE modelo CUT 5062), obteniendo cortes de entre 35 a 40 μm de espesor. Posteriormente se separó la cera odontológica del tejido vegetal y se procedió a su tinción. Se emplearon tres tinciones, Safranina-Astra blue para la caracterización anatómica; Cloruro férrico (FeCl_3) y Sudán IV para la histoquímica.

La tinción de las muestras con Safranina-Astra blue se realizó según [45], la cual permite observar la estructura anatómica de los tejidos. La safranina tiñe las paredes secundarias de las células, que adquieren una coloración rojiza a fucsia. El resto de los tejidos se muestran de color azul por la tinción de la pared celular primaria con el Astra blue. El cloruro férrico permite observar la presencia de taninos, que se tiñen de color verde oscuro a negro. El Sudán IV detecta la presencia de lípidos, que adquieren una coloración rojiza [51].

Por último, se realizó la observación de los preparados en un microscopio óptico Nikon Eclipse E200 con cámara incorporada, mediante la cual se tomaron fotografías de las estructuras de interés para contar con un registro gráfico de las mismas.

3.5.2 Espesor de la epidermis.

La medición del espesor de la epidermis se realizó a partir de las imágenes obtenidas en el microscopio de los cortes anatómicos a nivel de la nervadura central. Dicha zona fue seleccionada debido a que es el sitio de preferencia de las hembras de *L. invasa* para ovipositar. Para ello, se utilizó el programa “Micrometrics SE Premium 4”.

Debido a que el espesor de la epidermis puede diferir a lo largo de la nervadura central, se tomaron 5 medidas para cada hoja, y luego se calculó la media (Fig. 12). A partir de las medias de espesor para cada clon, se realizó un análisis de varianzas (ANOVA), con comparación de medias mediante el Test de Tukey, utilizando el software R studio versión 4.4.0.

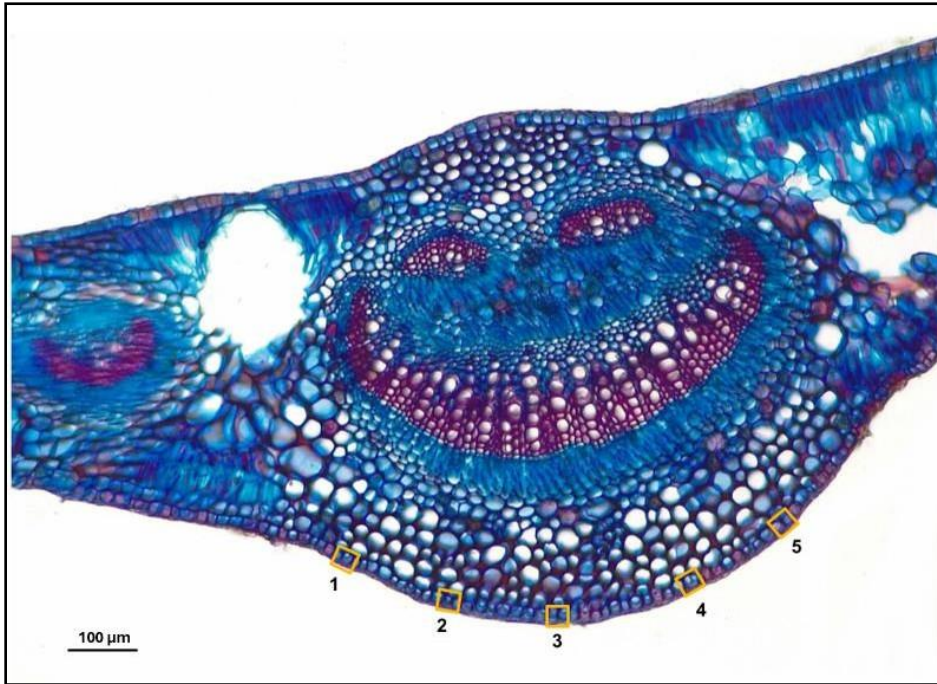


Figura 12. Mediciones de espesor de epidermis en nervadura central para el clon B, de *E. dunnii*.

3.5.3 Proceso de diafanizado.

Para realizar el diafanizado se siguió el procedimiento propuesto por [45], el cual consistió en colocar dos hojas sanas de cada clon de *Eucalyptus* spp. estudiado en placas de Petri con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5 %. Luego, se hizo el seguimiento de la clarificación de los tejidos hasta los 21 días, momento en el que las hojas alcanzaron el nivel de adecuado (Fig. 13 A-C). Posteriormente se realizaron dos enjuagues de las hojas con agua destilada para eliminar los restos de hidróxido de sodio.

Para alcanzar el nivel de transparencia deseado se procedió a colocar las hojas en placas de Petri con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 50 %, durante una hora (Fig. 13 D). Posteriormente se realizó un nuevo enjuague con agua destilada para extraer el hipoclorito de sodio y evitar que precipite al realizar la tinción. Para la coloración de los tejidos se colocaron las hojas transparentadas en placas de Petri con una solución de agua destilada y safranina (Fig. 13 E).

El proceso de diafanizado culminó con la colocación de las hojas en un portaobjetos para dejar escurrir el exceso de agua. Posteriormente se le agregó una gota de agua-glicerina 1:1 en la parte superior para favorecer la adhesión del cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas transparente para su posterior conservación.

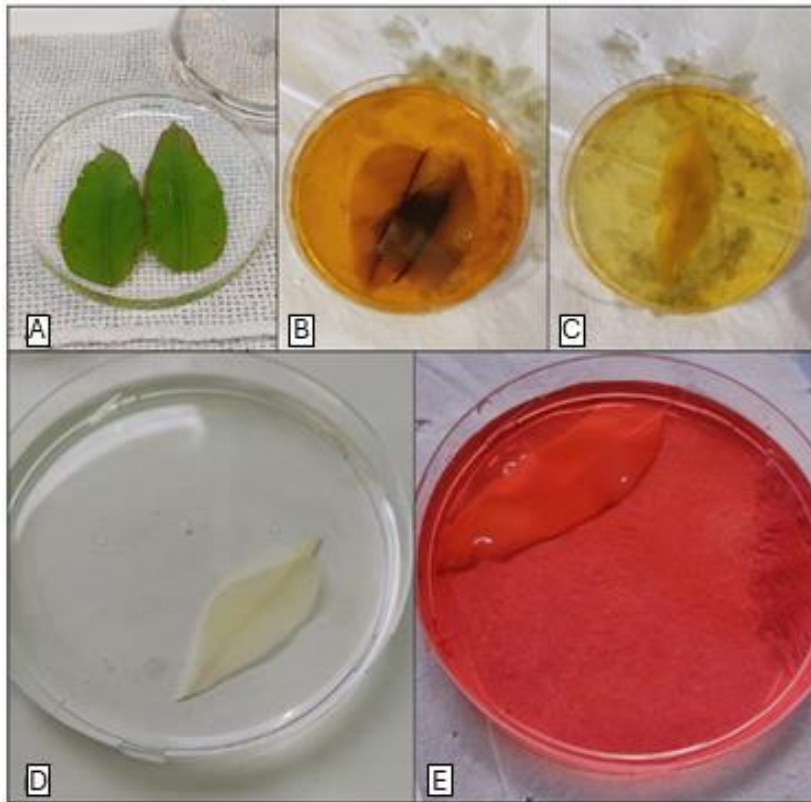


Figura 13. Proceso de diafanizado. **A.** Etapa inicial. **B.** Transición del proceso. **C.** Finalización. **D.** Hoja transparentada en hipoclorito de sodio. **E.** Tinción de muestra en solución de agua destilada y safranina.

3.5.4 Levantamiento de epidermis y caracterización de estomas.

La caracterización morfológica se realizó a partir de la observación en microscopio óptico de los levantados de epidermis. El procedimiento consistió en recortar 1 cm² de cada hoja y aplicar una película de esmalte de uñas transparente. Después de secar, se extrajo el esmalte con el molde de la epidermis utilizando cinta adhesiva. Las muestras se fijaron en portaobjetos, se rotuló para identificar los clones correspondientes y se observaron al microscopio. Se tomaron fotografías a escala para comparar los estomas entre los clones de ambas especies. Además, se midieron 10 células guardas para estimar el espesor promedio.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de susceptibilidad de *Eucalyptus* spp. frente al ataque de la avispa agalladora del eucalipto.

4.1.1 Experimento 1. Test de susceptibilidad con chance de escoger (TCC).

Los tres clones de *E. dunnii* (A, B y C) y los de *E. grandis* (D, E y F) evaluados mostraron síntomas de ataque de la plaga, solamente los clones D y E no formaron agallas (Fig. 14). Sin embargo, a pesar de la formación de agallas en ningún caso se llegó a completar el ciclo biológico de la plaga.

El clon F, considerado como altamente susceptible (testigo), no registró el porcentaje más alto de ataque como era esperado, pero fue el único que desarrolló agallas tanto en nervadura central como en tallo. Los clones de *E. dunnii* (A, B y C) sólo formaron agallas en la nervadura central.

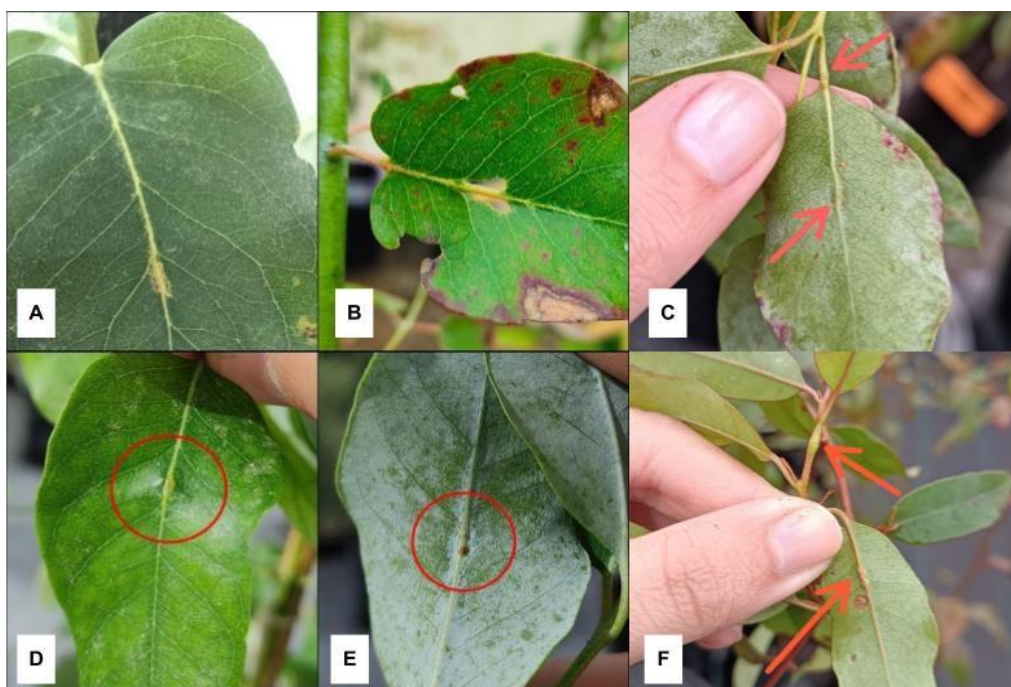


Figura 14. Síntomas de ataque de *L. invasa*. **A.** y **B.** Agalla en formación en nervadura central del clon A. **C.** Agallas en formación en pecíolo y nervadura central del clon C. **D.** Agalla en formación en la nervadura central del clon B. **E.** Cicatrización en la nervadura central del clon B. **F.** Formación de agallas en tallo y nervadura central del clon F.

Se observaron diferencias significativas en las medias ajustadas de las variables pecíolo, rama o tallo y brotes, asociadas al ataque de *L. invasa* para los clones estudiados (Fig. 15).

El Clon C mostró el valor más alto (1.8) para la variable número de hojas atacadas en el pecíolo (\log de $(n+1)$), seguido por los clones A (0.78), B (0.53) y D (0.46), sin diferencias estadísticamente significativas entre estos últimos. Estos resultados indican que el Clon C tiene un efecto significativamente mayor en la variable de respuesta en comparación con los otros clones evaluados, mientras que los Clones E y F mostraron las respuestas más bajas. (Fig. 15 A). En relación al número de ataques en rama o tallo (\log $(n+1)$), se observaron diferencias significativas. El Clon C mostró el valor más alto para las medias ajustadas (0.91), seguido por el Clon A (0.63) y el Clon B (0.41). Por otro lado, los Clones F (0.26), E (0.22) y D (0.05) presentaron respuestas más bajas (Fig. 15 C).

En cuanto a la variable número de brotes atacados (\log $(n+1)$), todos los clones presentaron diferencias significativas entre las medias ajustadas. El clon F (testigo) fue el que presentó la media más alta respecto a los demás (1.43). El clon C fue el siguiente con una media ajustada de 0.79. Además, se observaron diferencias significativas entre los Clones A (0.61), B (0.47), D (0.29) y E (0.22) (Figura 15. E.).

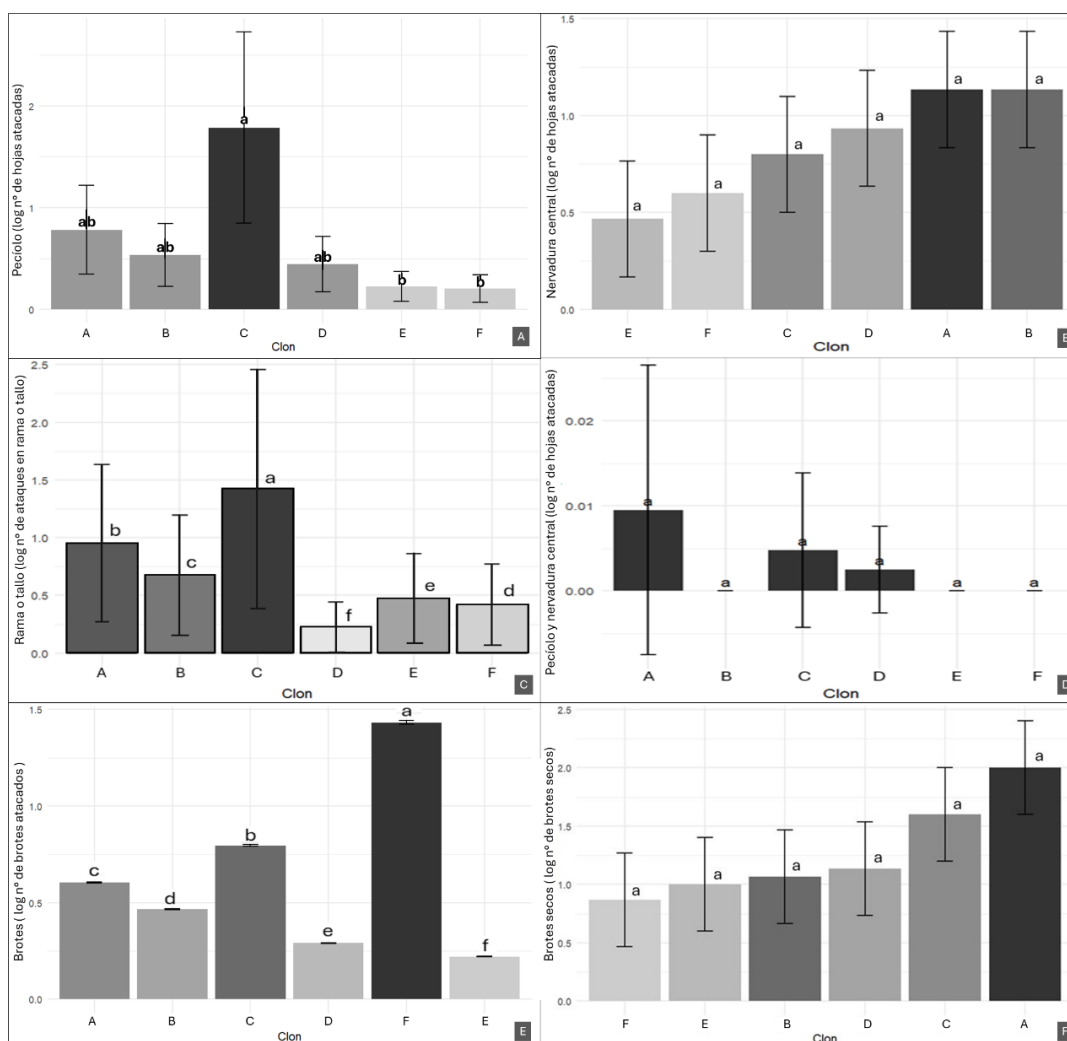


Figura 15. Análisis estadístico para el \log $(n+1)$ de las variables en TCC. **A.** Ataques en Pecíolo. **B.** ataques en Nervadura central. **C.** Ataques en Rama o Tallo. **D.** Ataques en Nervadura central y Pecíolo. **E.** Ataques en Brotes. **F.** Brotes secos.

4.1.2 Experimento 2. Test de susceptibilidad sin chance de escoger (TSC).

Todos los clones exhibieron síntomas de ataque de *L. invasa*, y en los clones B, C y F se observó la formación de agallas. Sin embargo, la plaga no completó el ciclo de vida en dichos clones. Además de las cicatrices de oviposición y la presencia de agallas, se observaron otros síntomas de ataque como superbrotación y muerte de brotes jóvenes (Fig. 16).

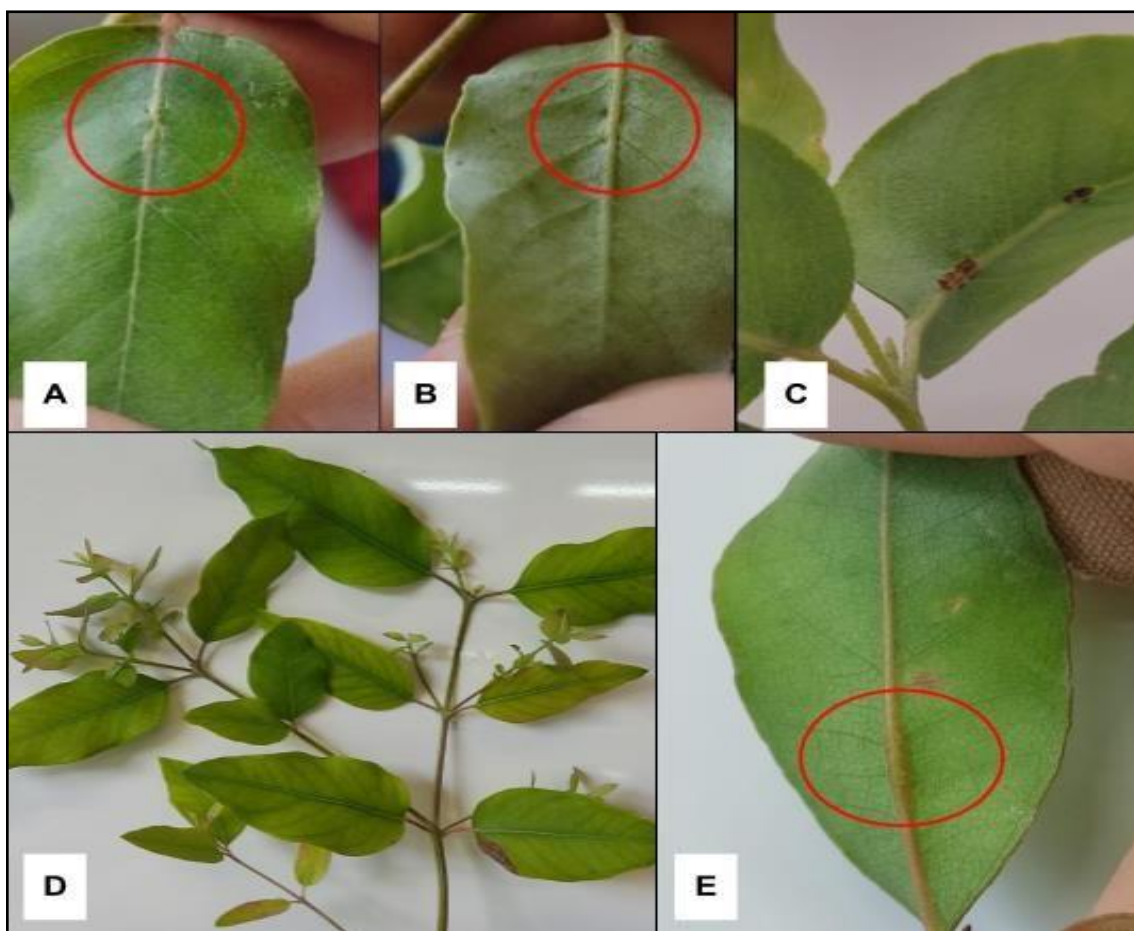


Figura 16. Síntomas de daño de *L. invasa* observados en el test de susceptibilidad sin chance. **A.** Agalla en formación en cara adaxial del clon B. **B.** Agalla en formación en cara abaxial del clon B. **C.** Cicatrización en la nervadura central del clon C. **D.** Superbrotación en clon C. **E.** Agalla en formación en nervadura central en clon F.

El clon B presentó diferencias estadísticamente significativas de los otros clones en la comparación de medias de ataque a nivel del pecíolo y de brotes atacados usando las variables transformadas con el log (n+1) (Fig. 17 A, F). Si bien, fue el más atacado a nivel de rama o tallo (log (n+1)) y de Nc/P (log n+1) y el menos atacado a nivel de nervadura central (log (n+1)), no presentó sustento estadístico (Fig. 17 B-D).

Finalmente, la variable brotes secos (log (n+1)) fue la que presentó la mayor variabilidad entre los clones, donde el clon C mostró la respuesta más alta y el clon A la más baja (Fig. 17 F). El clon B fue uno de los más afectados con las medias más altas de ataque en la mayoría de las variables (log n+1).

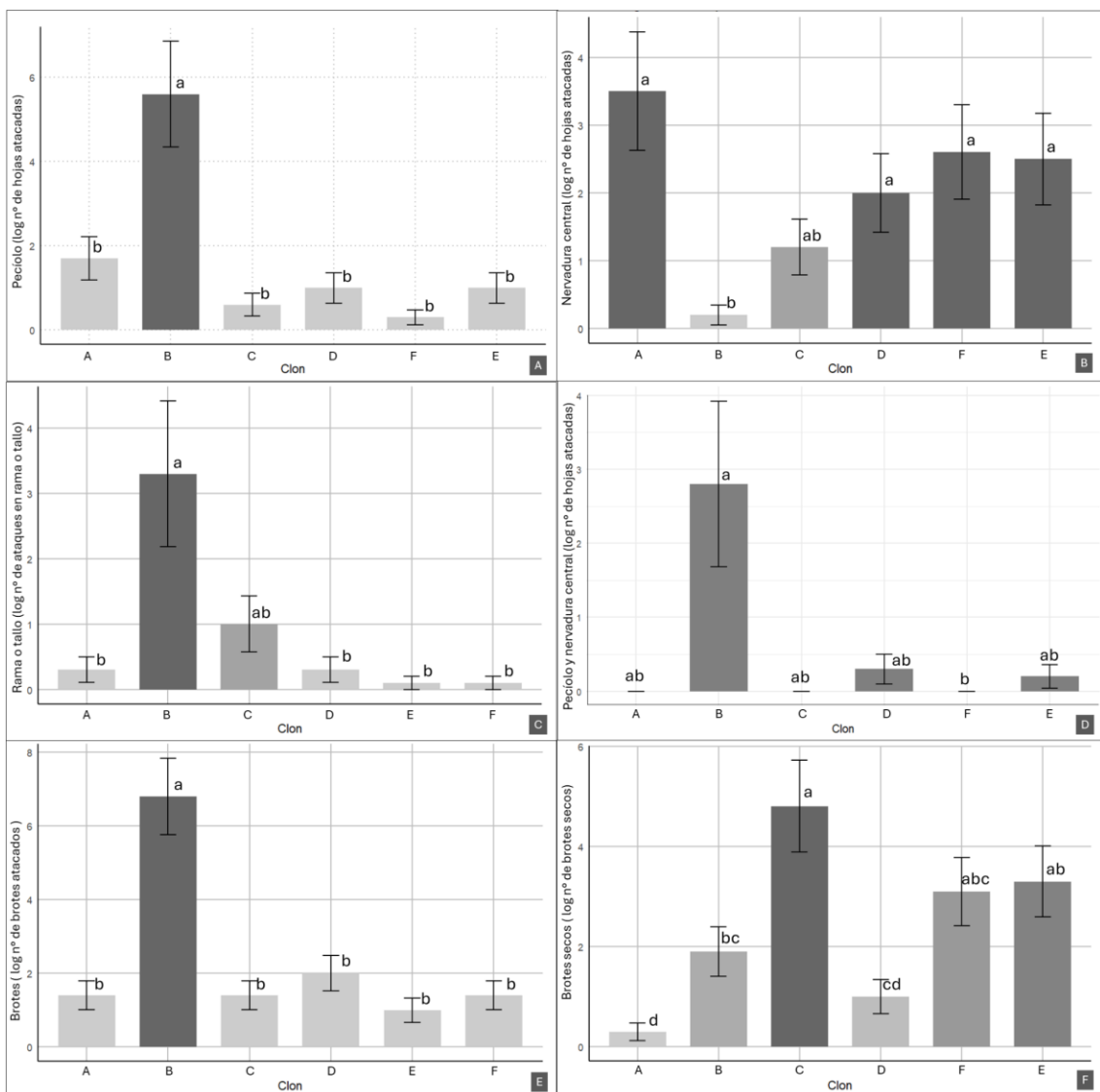


Figura 17. Análisis estadístico para el log (n+1) de las variables estudiadas en TSC. **A.** Pecíolo. **B.** Nervadura central. **C.** Rama o Tallo. **D.** Nervadura central y Pecíolo. **E.** Brotes. **F.** Brotes secos.

4.2 Evaluar la presencia de mecanismos morfológicos asociados con la resistencia de los eucaliptos a *L. invasa*.

4.2.1 Levantamiento de epidermis y caracterización de estomas.

Todos los clones evaluados presentaron hojas anfiestomáticas (Fig. 18). Se pudo observar que del lado abaxial se encuentra una mayor proporción de estomas que del lado adaxial.

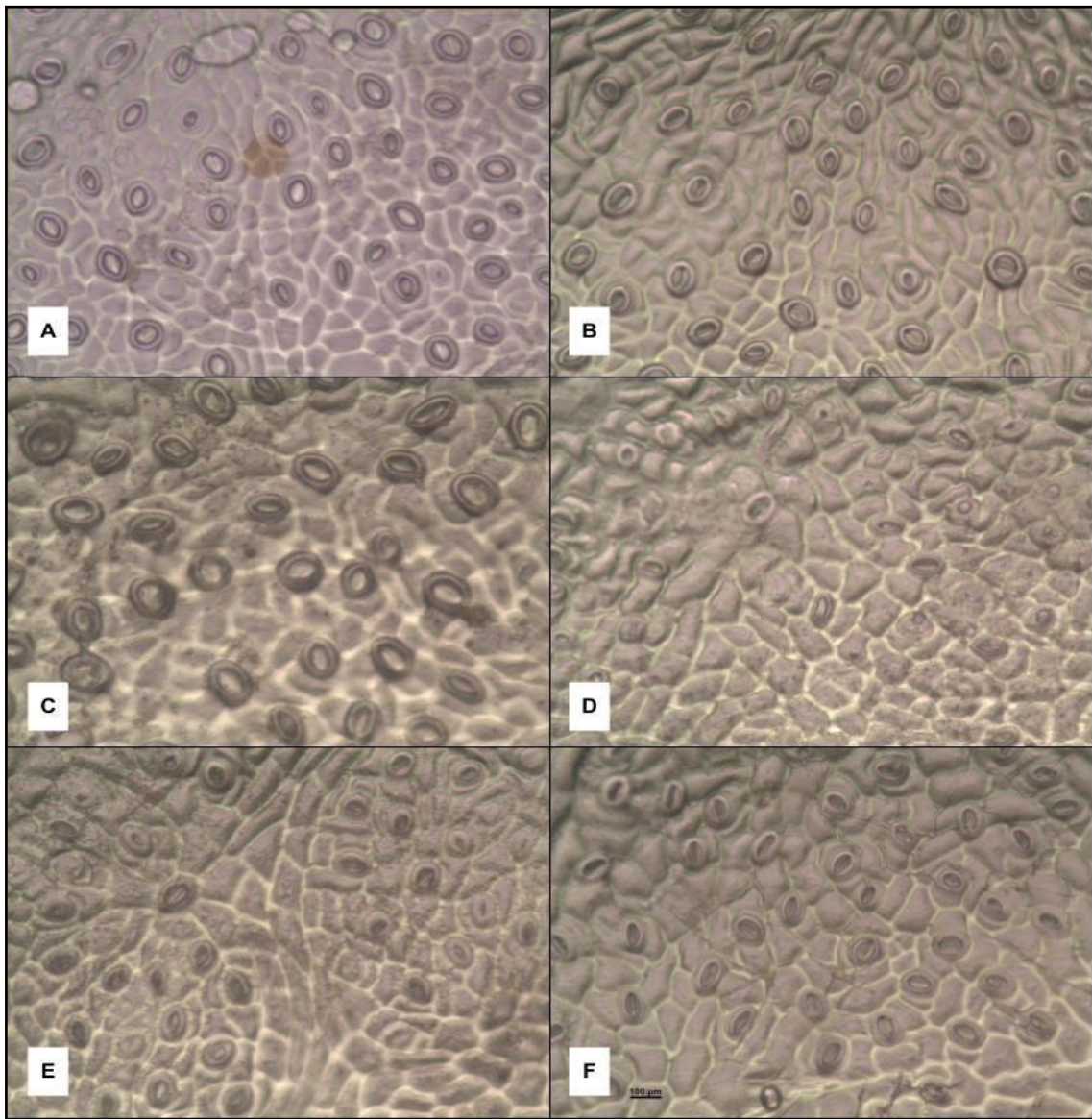


Figura 18. Imágenes de los preparados de estomas en vista abaxial de los clones estudiados. **A.** Clon A. **B.** clon B. **C.** clon C. **D.** Clon D. **E.** Clon E. **F.** Clon F.

Con respecto a la morfología de los estomas, mientras que los de *E. dunnii* presentan una forma circular-elíptica, los de *E. grandis* son predominantemente elípticos. Ambas especies presentan el tipo de estomas anomocíticos, en los que no se diferencian células acompañantes (Fig. 19).

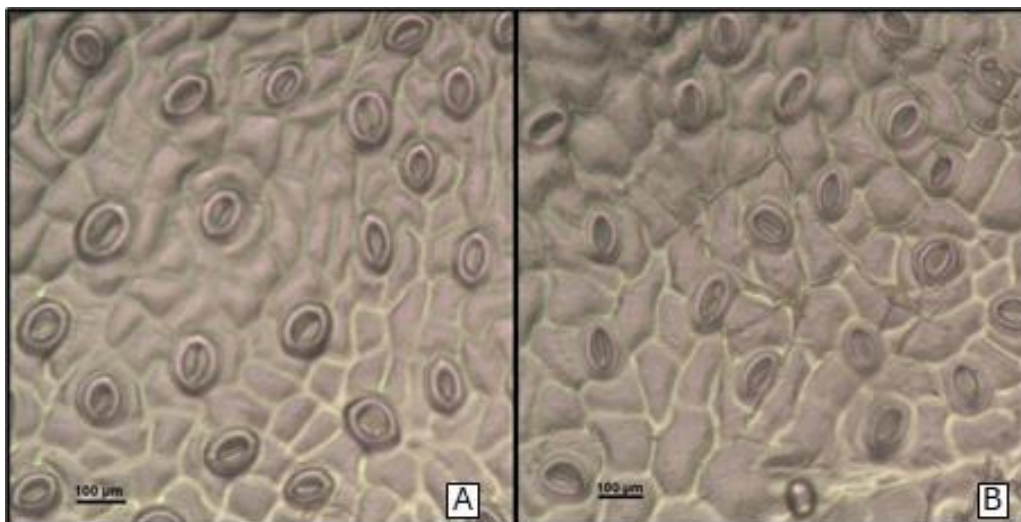


Figura 19. Comparación morfológica de estomas. **A.** *E. dunnii*. **B.** *E. grandis*.

4.2.2 Espesor de la epidermis

La Tabla 1 muestra el resultado del modelo anova realizado para la comparación de medias del espesor de epidermis entre los diferentes clones. Se observaron diferencias significativas entre el clon E que presenta el mayor espesor (30,498 µm) y el clon C (18,254 µm) con el menor espesor. Los clones A, B, D y F no presentaron diferencias significativas entre sí y tampoco con el clon E.

Tabla 1. Medidas del espesor de la epidermis.

Clon	Media (µm)
E (<i>E. grandis</i>)	30,498 a
D (<i>E. grandis</i>)	28,743 ab
F (<i>E. grandis</i>)	28,046 ab
B (<i>E. dunnii</i>)	25,394 ab
A (<i>E. dunnii</i>)	22,456 ab
C (<i>E. dunnii</i>)	18,254 c

4.2.3 Anatomía

Transcortes de hojas sanas

Las diferencias principales entre las especies observadas se reflejan en la forma y el tamaño de las hojas. Mientras que *E. grandis* presenta hojas en una relación largo-ancho de 2.4 a 3.7 y dimensiones de 14.4 a 21 cm, *E. dunnii* tiene hojas más estrechas, con una relación largo-ancho de 1.3 a 3.86 y dimensiones de 16 a 24 cm. La morfología de *E. grandis* es falciforme, similar a hoz o lanceolada, mientras que *E. dunnii* tiene forma falcada que se caracteriza por ser curvada y estrecha hacia la punta.

Ambas especies presentan la epidermis superior e inferior uniestrata con espesores de 28 a 30.5 μm para *E. grandis* y 18.2 a 25.4 μm para *E. dunnii* respectivamente. En *E. dunnii* la epidermis (E), se encuentra cubierta por una cutícula gruesa. Por debajo de ella, se ubica el colénquima (Co) en ambas caras, interrumpido en el centro. Continuando hacia el haz vascular, se encuentran fibras esclerenquimatosas (Fi) que se unen al floema en ambos lados. Se pueden apreciar células taníferas y cavidades secretoras en las cercanías de la epidermis (Cs) (Fig. 20). El mesófilo es dorsiventral y se compone de parénquima en empalizada (Pem) y parénquima clorofiliano esponjoso (Pes). La vena media se encuentra formada por un haz bicoloral abierto (Hv1), que presenta forma de arco amplio. Donde el floema (F) está localizado hacia el lado abaxial y adaxial del haz y el xilema (X) ubicado en medio de los dos estratos de floema. (Fig 20).

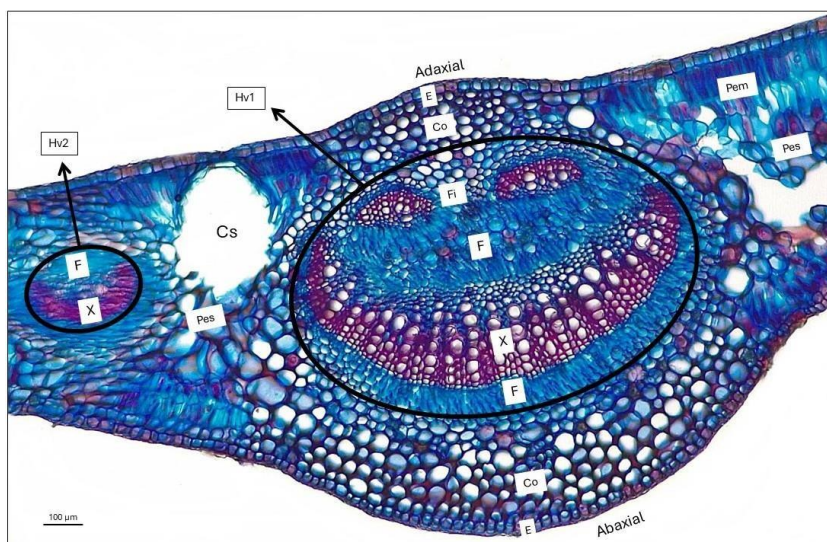


Figura 20. Nervadura central de *E. dunnii* en sección transversal con tinción Safranina-Astra blue (10x). E: epidermis; Fi: fibras; F: floema; Pem: parénquima en empalizada; Cs: cavidad secretora; Pes: parénquima esponjoso; Co: Colénquima; Hv1: haz vascular primario; Hv2: haz vascular secundario; X: xilema.

A partir de la (Fig. 21) se describen las estructuras anatómicas para los seis clones evaluados. El mesófilo se dispuso de manera dorsiventral en todos los clones evaluados, mientras que el colénquima mostró variaciones en la disposición de sus estratos celulares. En el haz, los clones A, C y D exhibieron un mínimo de 7 estratos de células, mientras que, en el envés, el clon C mostró un mínimo de 7 estratos de células el cual fue el más bajo en comparación con los demás (Tabla 2). El número máximo de células en el haz fue registrado en el clon B con 12 estratos celulares, mientras que, en el envés, el máximo estrato fue observado en los clones A, E y F con 13 estratos de células.

La distribución del esclerénquima también varió entre los clones, desde una presencia mínima en los clones B y F hasta una abundante concentración alrededor el haz vascular. Respecto al sistema vascular, todos los clones exhibieron un sistema biclateral con la presencia de haces secundarios. Además, se detectaron canales resiníferos, aunque los clones B y E mostraron una presencia mínima de los mismos. También, se observaron drusas en las hojas de todos los clones evaluados.

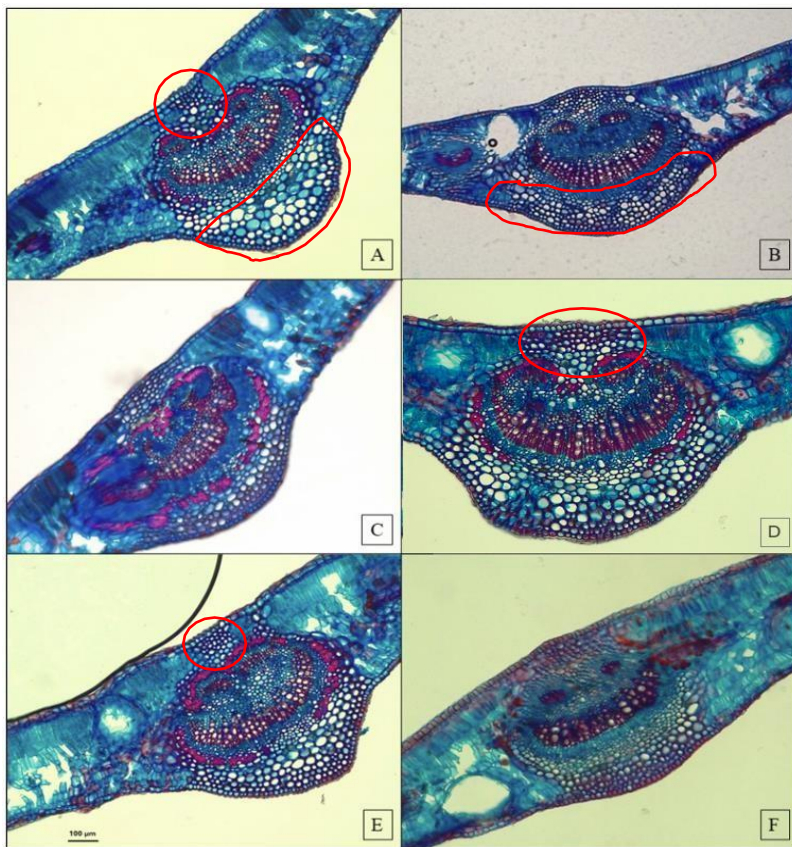


Figura 21. Transcortes de hojas de los clones estudiados a nivel de la nervadura central con tinción Safranina-Astra blue para la caracterización anatómica. **A-C.** clones de *E. dunnii*, **D-F.** clones de *E. grandis*. **A.** clon A, **B.** clon B, **C.** clon C, **D.** clon D, **E.** clon E y **F.** clon F.

Tabla 2. Descripción anatómica de las hojas sanas de los diferentes clones estudiados. Co: colénquima, E: epidermis, Pem: parénquima en empalizada.

Clon	Canales resiníferos	Drusas	Colénquima	Esclerénquima	Sistema vascular	Mesófilo
A	Presencia	Presente en: Pem, Co y E	Si (haz: 7 estratos células, envés: 13 estratos de células)	Abundante rodeando haz vascular	Bicolateral Presencia haces secundarios	Dorsiventral
B	Poca presencia	Presente en: Pem, Co y E	Si (haz: 12 estratos de células, envés: 10 estratos de células)	Poca presencia	Bicolateral Presencia haces secundarios	Dorsiventral
C	Presencia	Presente en: Pem, Co y E	Si (haz: 7 estratos de células, envés: 7 estratos de células)	Abundante rodeando haz vascular	Bicolateral Presencia haces secundarios	Dorsiventral
D	Presencia	Presente en: Pem, Co y E	Si (haz: 7 estratos de células, envés: 12 estratos de de células)	Abundante rodeando haz vascular	Bicolateral Presencia haces secundarios	Dorsiventral
E	Poca presencia	Presente en: Pem, Co y E	Si (haz: 9 estratos de células, envés: 13 estratos de células)	Abundante rodeando haz vascular	Bicolateral Presencia haces secundarios	Dorsiventral
F	Presencia	Presente en: Pem, Co y E	Si (haz: 9 estratos de células, envés: 13 estratos de células)	Poca presencia	Bicolateral Presencia haces secundarios	Dorsiventral

En los transcortes de hojas sanas teñidos con el reactivo Sudán IV se observaron diferencias en la distribución de lípidos para todos los clones evaluados (Fig. 22). También se observaron diferencias en el espesor de la epidermis entre las caras adaxial y abaxial de las hojas, así como entre los diferentes clones.

El clon A presentó la mayor cantidad de estratos de células teñidas en la epidermis de la cara adaxial al igual que el clon F (Fig. 22 A y F). Los clones B y E, mostraron que el número de estratos de células teñidas en la epidermis fue similar en ambas caras de la hoja (Fig. 22 E). El clon C tiene una cutícula más delgada, con una menor cantidad de estratos de células teñidas.

En los tres clones de *E. dunnii* (A, B, C) y el clon E (*E. grandis*), las células del parénquima no se teñieron indicando ausencia (Fig. 22 C). Los clones D y F presentaron cavidades secretoras (reactivas a Sudán IV) distribuidas por el mesófilo en ambas caras de las hojas, especialmente debajo de la epidermis.

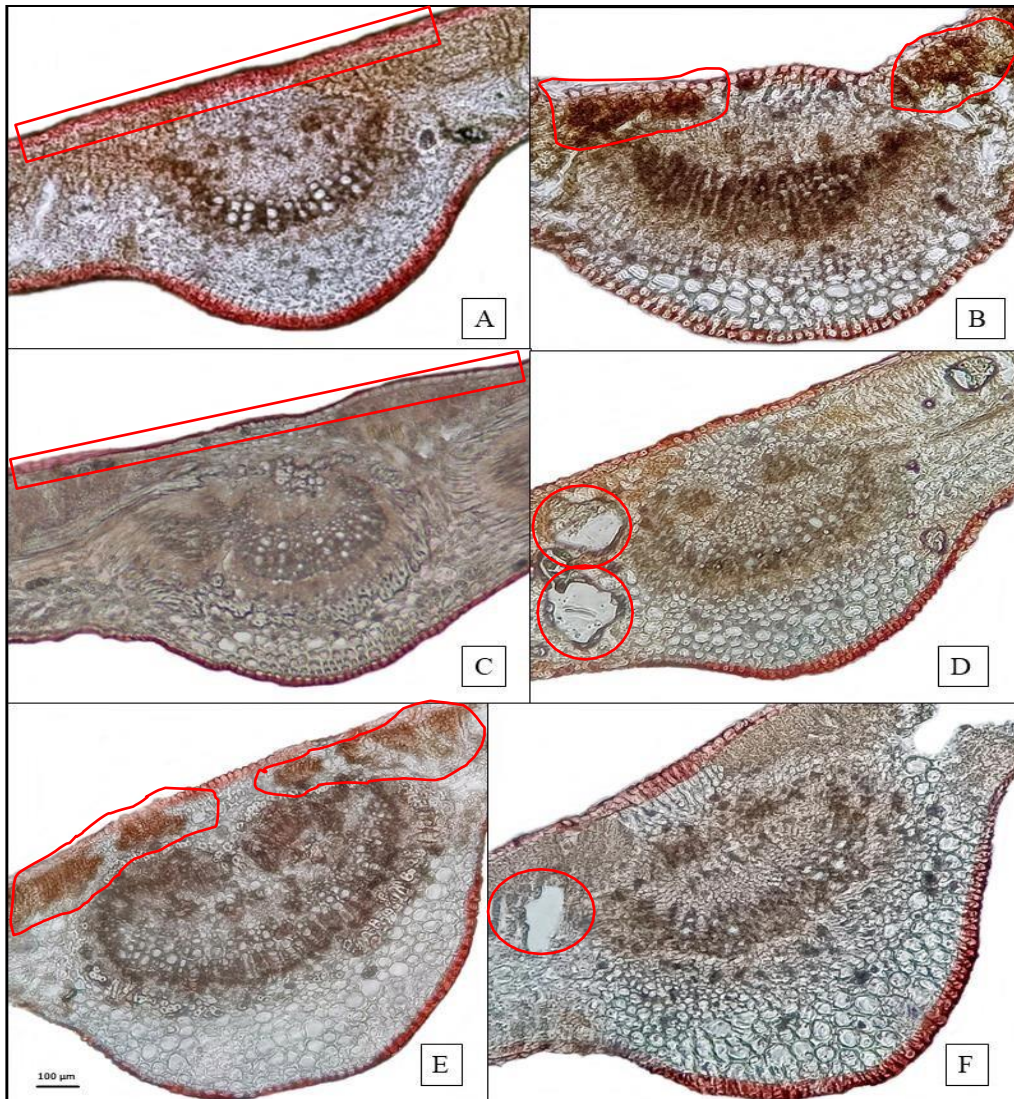


Figura 22. Transcortes de hojas de los clones de *E. dunnii* (A-C) y de *E. grandis* (D-F) a nivel de la nervadura central con tinción Sudán IV. A. Clon A, B. Clon B, C. Clon C, D. Clon D, E. Clon E y F. Clon F.

Respecto a la tinción con cloruro férrico, las células del parénquima en empalizada (Pem) y los haces vasculares de todos los clones reaccionaron al cloruro férrico indicando la presencia de compuestos fenólicos (Fig. 23). Esta coloración varía en tamaño y ubicación entre los clones. Por ejemplo, los clones C y D mostraron mayores estratos de células teñidas en la zona parenquimática (Fig. 23 C, D) en comparación con los clones A y B (Fig. 23 A, B).

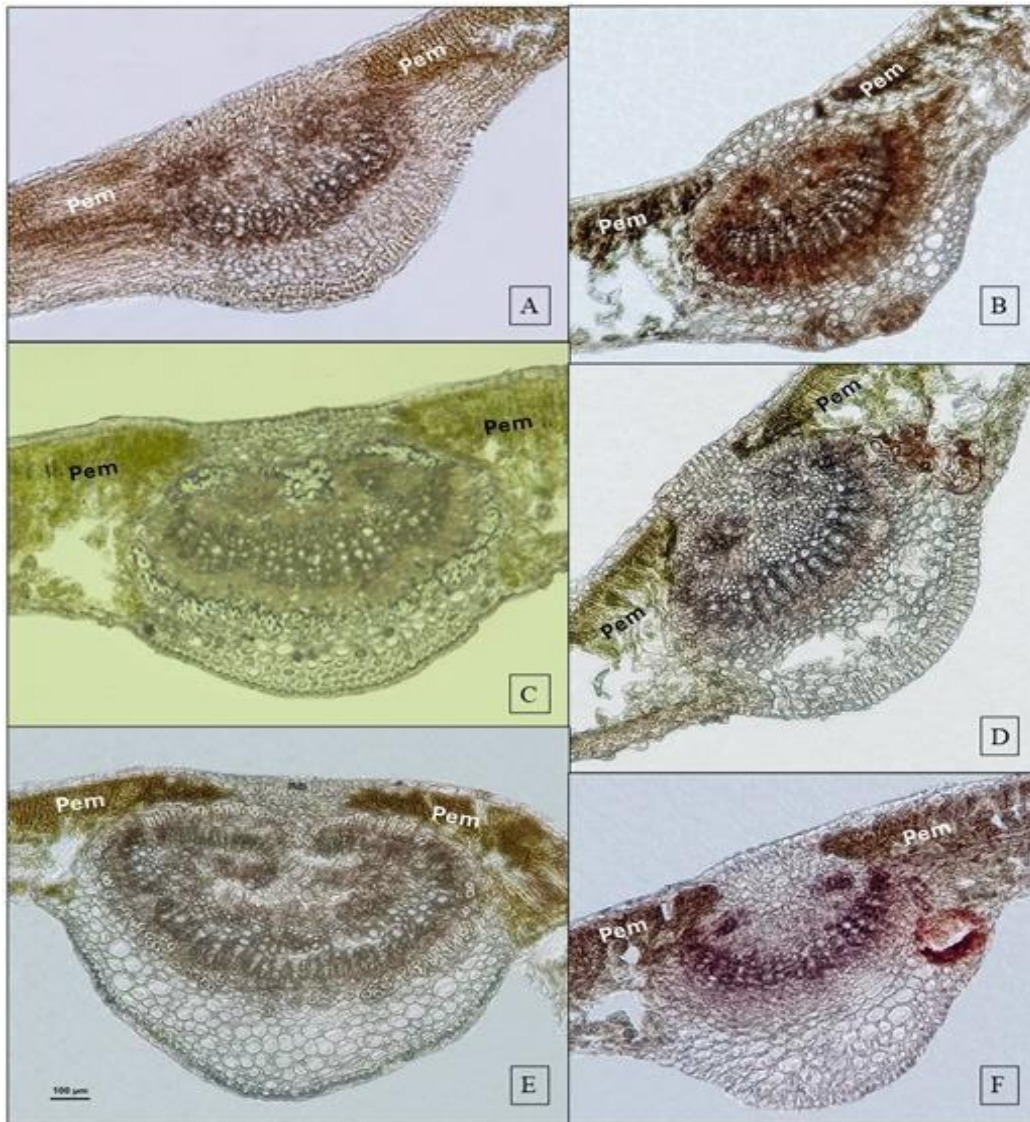


Figura 23. Transcortes de hojas de los clones de *E. dunnii* (A-C) y de *E. grandis* (D-F) a nivel de la nervadura central con tinción de cloruro férrico. **A.** Clon A, **B.** Clon B, **C.** Clon C, **D.** Clon D, **E.** Clon E y **F.** Clon F. Pem: parénquima en empalizada.

Como resultado del proceso de diafanizado de las hojas se pudo detectar la presencia de cristales en forma de drusas y prismas en la nervadura central y secundarias en todos los clones testeados (Fig. 24).

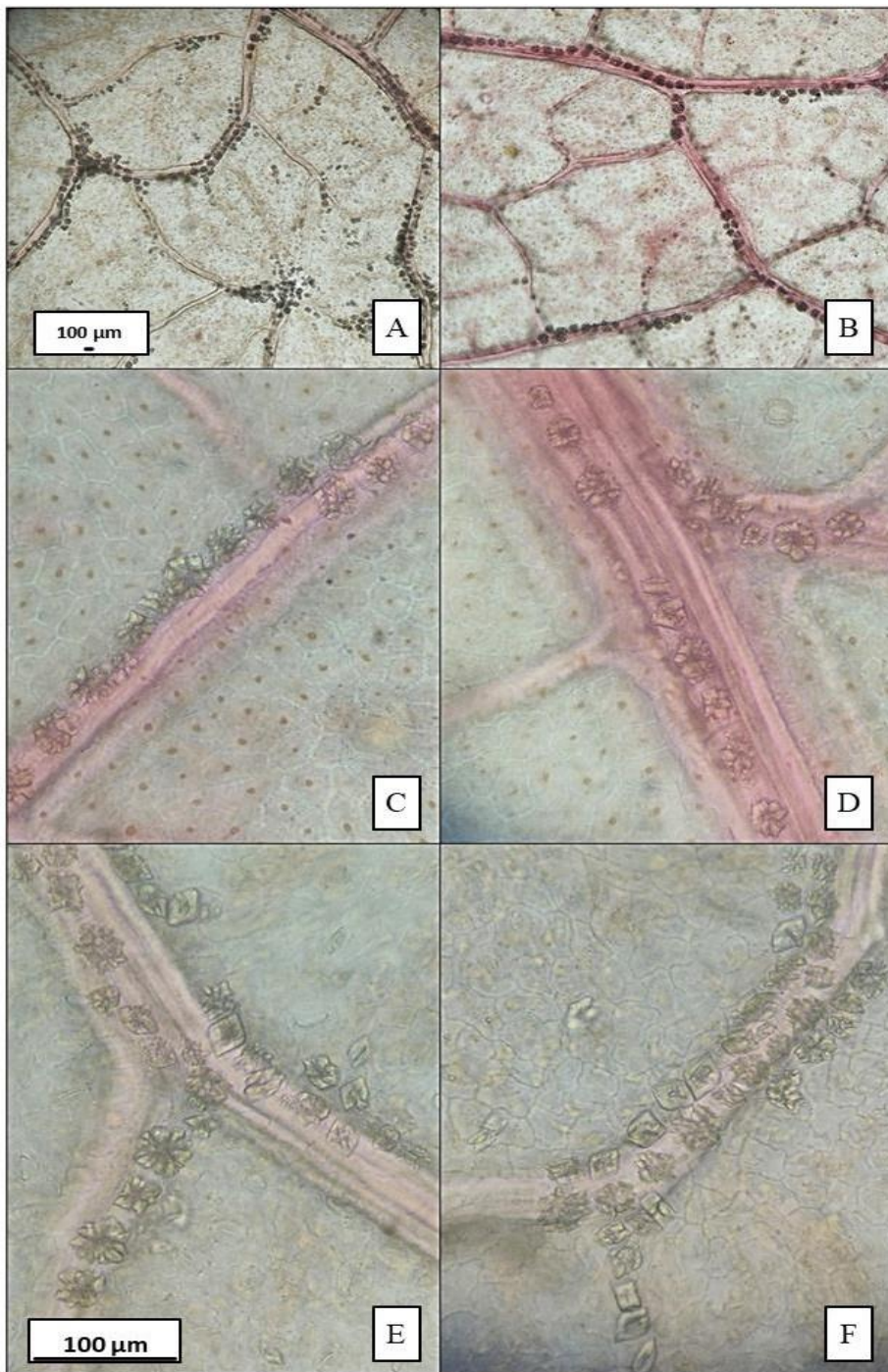


Figura 24. Presencia de cristales de las láminas obtenidas del proceso de diafanizado. **A** y **B** en nervaduras secundarias; **C**, **D**, **E** y **F** en nervadura central **A**. y **B**. vista en (4x), **C**., **D**., **E**. y **F**. vista en (40x).

Transcortes de hojas y tallos con agallas

Se realizaron cortes transversales de agallas de *L. invasa* ubicadas en la nervadura central de hoja y tallo del clon testigo F (*E. grandis*) (Figs. 25-26). En el corte transversal de la nervadura central se diferencian las 4 capas que forman el interior de la agalla: tejido nutricional, tejido esclerificado, tejido tanífero y tejido cristalífero. Se distinguió claramente el tejido tanífero (T) que se tiñó intensamente (color más oscuro) debido a la presencia de compuestos fenólicos. También fueron evidentes los cristales prismáticos en el tejido cristalífero (C) de la misma (Fig. 25 C.).

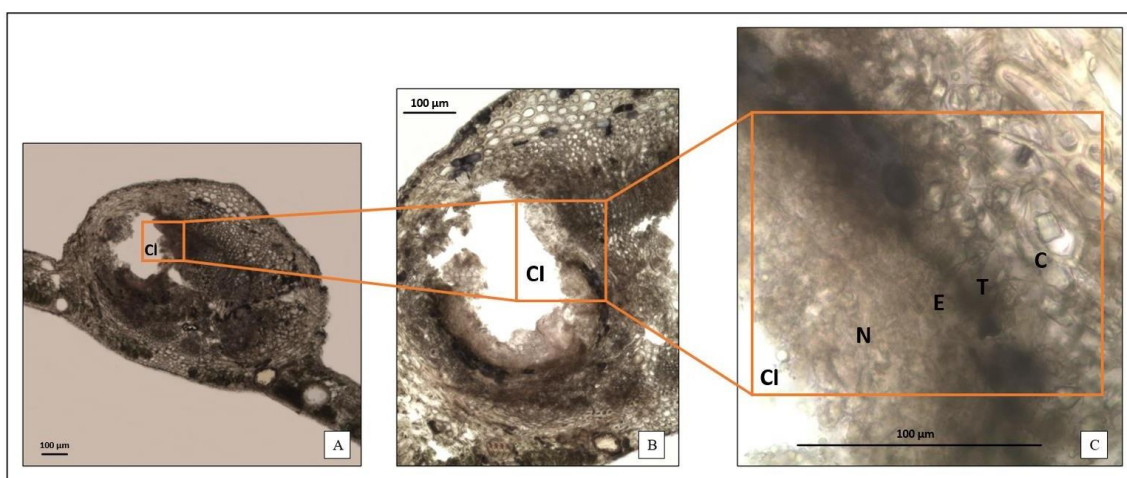


Figura 25. Transcortes de agalla en nervadura central del clon F (testigo), con tinción de cloruroférico. **A.** Vista en (4x). En **B** y **C** se muestra una ampliación de la pared de la agalla. **B.** Vista en (10x). **C.** Vista en (40x). Cl: cámara larval; N: tejido nutricional; E: tejido esclerificado; T: tejidotanífero; C: tejido cristalífero.

En el corte de agallas formadas en el tallo del clon F se pudieron identificar dos cámaras larvales (Cl) y la alteración en los tejidos de conducción (xilema (X) y floema (F)) (Fig. 26). Además, se observó una obstrucción del parénquima (P) y la epidermis (E) superior ocasionados por la formación de las agallas.

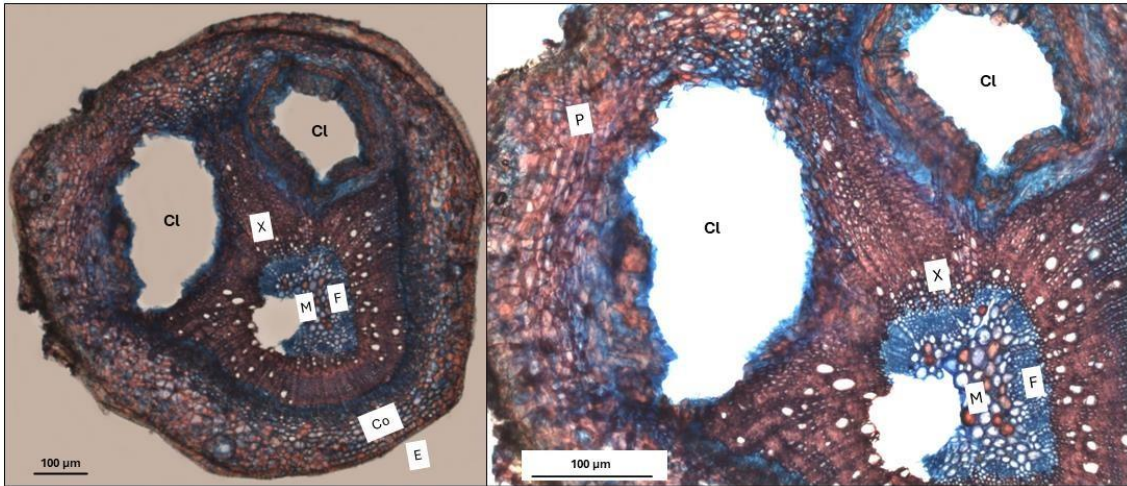


Figura 26. Transcortes de agalla en el tallo del clon F (testigo), con tinción Safranina-Astra blue. Imagen izquierda: 4 x, imagen derecha: 10 x. P: parénquima; X: xilema; F: floema; Cl: cámara larval; Co: colénquima; E: epidermis; M: médula.

El impacto de la inserción del ovipositor de la plaga fue más significativo de lo que se podría pensar inicialmente. Al realizar el corte transversal de la nervadura central en una hoja con cicatriz de oviposición, se evidenció el deterioro de tejidos debajo de la epidermis (Fig. 27). Se observaron alteraciones en el colénquima (Co) y en los haces vasculares del floema (F) y del xilema (X) (Fig. 27). En la zona de la inserción del ovipositor, se observó un área de tejido dañado (Td), con una reducción parcial de los tejidos, acompañado por la presencia de células muertas (Fig. 27).

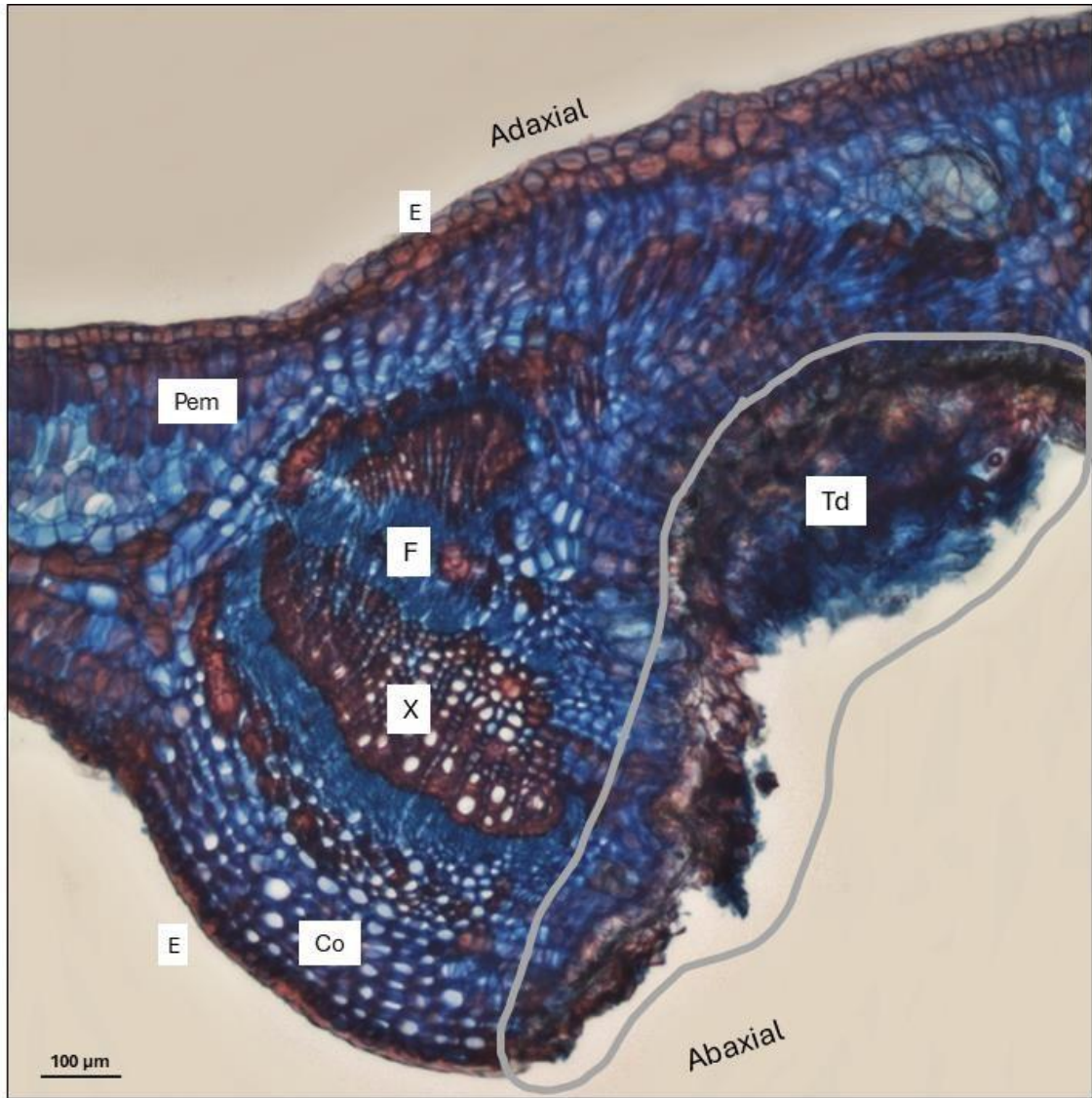


Figura 27. Transcorte de nervadura central con tinción Safranina-Astra blue, con cicatriz de oviposición de *L. invasa* en 10 x. E: epidermis; Pem: parénquima en empalizada; F: floema; X: xilema; Co: colénquima; Td: tejido dañado.

5. DISCUSIÓN

5.1 Susceptibilidad de *E. dunnii* y *E. grandis* al ataque de *L. invasa*.

En el presente estudio se observaron diferencias en las respuestas entre las dos especies de *Eucalyptus* testeadas y a nivel intraespecífico, con relación al ataque de *L. invasa*. Estos resultados coinciden con artículos publicados a nivel internacional que aplicaron test de susceptibilidad con chance de escoger (TCC) para evaluar la resistencia de los eucaliptos a *L. invasa* [20], [35], [38], [53]. Los mencionados trabajos han demostrado que existen variaciones significativas del nivel de resistencia de las especies de eucaliptos a dicha plaga.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los clones de *E. dunnii* fueron más preferidos (atacados) por la plaga que los de *E. grandis*. En Argentina [35], observaron un comportamiento similar, en que los clones de *E. dunnii* fueron más afectados que los de *E. grandis*. En contraste, investigaciones realizadas en Sudáfrica encontraron que los clones de *E. grandis* eran más susceptibles al ataque de *L. invasa* que los de *E. dunnii* [20]. Otros estudios muestran que *E. grandis* es particularmente vulnerable a la plaga, seguido por *E. camaldulensis* y *E. saligna* [66]. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las defensas naturales de los genotipos evaluados a *L. invasa* y/o a las condiciones ambientales presentes en cada país [38], [39].

El clon F (*E. grandis*), conocido por su alta susceptibilidad a la plaga, mostró un contraste significativo entre el test con chance de escoger (TCC) y el test sin chance (TSC). Mientras que en el TCC fue uno de los menos afectados, en el TSC estuvo entre los más atacados. Esto podría estar indicando la capacidad de adaptación de *L. invasa* a nuevos materiales cuando tiene otras opciones para escoger. Todos los estudios publicados sobre la susceptibilidad de los *Eucalyptus* spp. a *Leptocybe invasa* han sido realizados aplicando ensayos con chance de escoger (TCC) ([18], [35], [36], [38], [39]), [67]. En base a las diferencias obtenidas frente al ataque al realizar el TSC respecto del TCC, se evidencia que el TCC no refleja adecuadamente el comportamiento de los genotipos considerados resistentes cuando estos son la única opción disponible para la plaga. Por tanto, es crucial llevar a cabo también ensayos sin chance de escoger (TSC) para evaluar la verdadera resistencia bajo condiciones de alta presión de ataque de la plaga.

5.2 Evaluar la presencia de mecanismos morfológicos asociados con la resistencia de los eucaliptos a *L. invasa*.

Se observó que anatómicamente *E. grandis* y *E. dunnii*, presentan similitudes, como también lo menciona [68], lo que dificulta la tarea de encontrar diferencias entre los distintos clones evaluados. Sin embargo, se pudieron encontrar diferencias que se podrían correlacionar con la susceptibilidad o resistencia al ataque de los eucaliptos a *L. invasa*.

Hasta el momento no se han realizado estudios enfocados en relacionar las características anatómicas de los eucaliptos y su capacidad de resistencia al ataque de *L. invasa*. Teniendo en cuenta que la epidermis es el primer tejido que la avispa debe atravesar para depositar sus huevos [63], es importante estudiar si existe relación entre el espesor de la epidermis y la susceptibilidad al ataque. En este estudio, se observó una posible relación condicional entre el espesor de la epidermis y el nivel de ataque de la plaga. La tendencia observada muestra que a medida que la epidermis se vuelve más delgada, aumenta la probabilidad de sufrir ataque. Este patrón fue evidente en el clon C (*E. dunnii*), que mostró el mayor nivel de ataque y la epidermis más delgada, en comparación con los demás clones. Por lo contrario, el clon E (*E. grandis*) presentó el menor nivel de ataque y una epidermis significativamente más gruesa en comparación con el clon C.

Una parte fundamental de la epidermis es la cutícula, la cual puede presentarse en el género de manera plana, reticular o papilada, según se menciona en [52], [56]. En este estudio, no se realizó un análisis morfológico detallado de la cutícula, aunque esta característica podría ser considerada en investigaciones futuras, especialmente con la posible función de defensa constitutiva en especies como *E. grandis* y *E. dunnii*.

Respecto al estudio histoquímico realizado en los cortes transversales de las hojas para los diferentes clones, se observó una reacción positiva al reactivo cloruro férrico en todos los casos, lo cual indica la presencia de compuestos fenólicos. Aunque no se detectaron diferencias en los tejidos que se tiñeron, se observó variabilidad en el número de estratos de células teñidas entre los diferentes clones. Específicamente los clones C (*E. dunnii*) y D (*E. grandis*) mostraron mayor área de coloración en la zona parenquimática, aunque no se pudo verificar una relación con una menor susceptibilidad al ataque. Sería relevante estudiar la concentración de los compuestos fenólicos detectados en la tinción de los clones, dado que según [69], la concentración de fenoles aumenta como respuesta al estrés oxidativo generado por *L. invasa*.

La tinción realizada con Sudán IV reveló la presencia de lípidos en forma de cera epicuticular en todos los clones. Se detectaron diferencias en cuanto al espesor de las células teñidas comparando las caras adaxial y abaxial entre los clones testeados. El clon A (*E. dunnii*) exhibió el mayor número de células teñidas en la epidermis de la cara adaxial de la hoja. Por otro lado, tanto en el clon B como en el E no se evidenciaron diferencias en el número de estratos de células teñidas con el reactivo Sudán IV en la epidermis superior e inferior. El clon C (*E. dunnii*) presentó un menor número de estratos teñidos, sin observarse tinción en el parénquima como en los casos anteriores. Los clones D (*E. grandis*) y F (*E. grandis*) presentaron cavidades secretoras distribuidas por el mesófilo, especialmente debajo de la epidermis en ambas caras de las hojas.

En relación con el espesor de la epidermis, se podría esperar que una epidermis más delgada facilite el acceso de los insectos agalladores a los tejidos internos de la planta [70]. En

este estudio, se observaron variaciones en el grosor de la epidermis tanto entre clones de una misma especie como entre diferentes especies. Los clones B y C de *Eucalyptus dunnii* presentaron los espesores de epidermis más bajos, lo cual se correlaciona positivamente con un mayor ataque de la plaga en estos clones.

Sin embargo, el espesor de la epidermis no es el único factor determinante. También se evaluó la presencia de lípidos mediante tinciones con Sudan IV. Se encontró que los clones B y C mostraron una menor respuesta a la tinción en comparación con otros clones evaluados. Esto es consistente con estudios previos, que sugieren que una menor presencia de lípidos en el mesófilo podría favorecer el ataque de herbívoros [53], [71].

En cuanto a la presencia de cristales, se observaron, tanto en forma de prismas como de drusas, en las hojas de todos los ejemplares analizados. Esto coincide con la descripción de monocristales y drusas que rodean la vena media y se encuentran en el mesófilo según [57]. Debido a que no se llevó a cabo un análisis comparativo de la cantidad de cristales entre los diferentes clones evaluados, sino que solamente se constató presencia o ausencia, no se puede afirmar si estos cristales representan una defensa constitutiva de los genotipos frente a la plaga.

Acerca de la anatomía externa de las agallas, no se llegaron a comprobar en el ensayo las cinco etapas de formación descritas por [12], debido a que no se completó el ciclo de la avispa en ninguno de los materiales testeados. En lo que respecta a la estructura interna de las agallas a pesar de que no se haya completado el ciclo, se pudieron obtener cortes anatómicos que coinciden con [63] en sus diferentes componentes y estratos. Por otra parte, la abscisión de hojas que se constató en los ensayos puede tratarse de un método de respuesta de los plantines al ataque. Además, se observaron tejidos necróticos localizados alrededor de los sitios de oviposición que también podrían ser considerados como una respuesta de la planta al ataque [72].

6. CONCLUSIONES

Basado en los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que los clones evaluados de *E. dunnii* (A, B y C) mostraron una mayor susceptibilidad al ataque de *L. invasa* en comparación con los clones de *E. grandis*. Estos clones de *E. dunnii* mostraron síntomas significativos de ataque, como la formación de agallas en la nervadura central. En contraste, los clones de *E. grandis* (D y E) fueron menos afectados al no desarrollar agallas. Se obtuvieron diferencias entre los test realizados para el análisis de medias ajustadas de ataque. Mientras que en el TCC el clon C de *E. dunnii* mostró la mayor susceptibilidad en términos de ataques en pecíolo y rama o tallo, en el TSC el clon B fue el más afectado en casi todas las variables. Estas diferencias en la respuesta de los clones al ataque de la plaga subrayan la necesidad de identificar genotipos de *Eucalyptus* spp. que sean resistentes o tolerantes a *L. invasa* para un manejo efectivo.

Además, el análisis anatómico e histoquímico reveló características potenciales en los *E. dunnii* y *E. grandis*, que podrían conferir resistencia o tolerancia al ataque de la avispa agalladora del eucalipto. Se destaca la importancia de estas características en la capacidad de los árboles para defenderse contra la plaga. En conjunto, estos hallazgos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones orientadas a desarrollar estrategias de manejo que puedan mitigar los impactos de *L. invasa*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, *El estado de los bosques del mundo: los bosques, la biodiversidad y las personas*. Roma: FAO, 2020. Consultado: Enero 20, 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.4060/ca8642es>
- [2]. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Anuario Estadístico Agropecuario 2021. Consultado: Oct. 7, 2022. [En línea]. Disponible <tps://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuario-2021>
- [3]. SPF. Sociedad de Productores Forestales del Uruguay, “Uruguay forestal: principales cifras del sector,” *SPF*, 2022. [En línea]. Disponible: <https://spf.com.uy/uruguay-forestal/> [Acceso: Feb. 2, 2023].
- [4]. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General Forestal, Cartografía Nacional Forestal 2021. Montevideo: MGAP, 2021. Consultado: Enero 20, 2022. [En línea]. Disponible:<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/cartografia-nacional-forestal-2021>.
- [5] W. M. Ciesla, *Forest entomology: a global perspective*. Nueva Jersey: Wiley-Blackwell, 2011.
- [6]. M. J. Wingfield, B. Slippers, B. P. Hurley, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield y J. Roux, “Eucalypt pests and diseases: growing threats to plantation productivity,” *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, vol. 70, no. 2, pp. 139-144, 2008.
- [7]. M. Bollazzi, *Hormigas cortadoras de hojas Acromyrmex spp: Reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales*. [Cartilla]. Montevideo: INIA; Facultad de Agronomía (Uruguay), 2014.
- [8]. G. Martínez. Biological control of forest pests in Uruguay, en *Forest Pest and Disease Management in Latin America: modern perspectives in natural forests and exotic - plantations*. S. Estay, Ed., 2020, pp: 7-30. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-35143-4>.
- [9]. C. Jorge y P. Molina, “Early detection and symptoms of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle, 2004 (Hymenoptera: Eulophidae) in *Eucalyptus* (Myrtaceae) nurseries,” *Bol. Soc.Zool. Uruguay*, vol. 29, no. 2, pp. 132-140, 2020.
- [10]. C. Jorge, L. Pérez y L. Arbiza, “Ficha zoológica: *Leptocybe invasa* Fischer & La Salle, 2004 (Insecta, Hymenoptera, Eulophidae),” *Noticias de la SZU*, vol. 55, pp. 30-32, 2022. [En línea]. Disponible: https://szu.org.uy/assets/noticias/noticias_szu_15_55.pdf
- [11]. O. Rohfritsch y J. D. Shorthouse, “Insect galls,” en *Molecular biology of plant tumors*, G. Kahl y J. S. Schell, Eds. Nueva York: Academic, 1982, pp. 131–152.

- [12]. Z. Mendel, A. Protasov, N. Fisher y J. La Salle, "Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*," *Australian Journal of Entomology*, vol. 43, no. 2, pp. 101-113, 2004.
- [13]. O. Doğanlar, Occurrence of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle, 2004 (Hymenoptera: Chalcidoidea on *Eucalyptus camaldulensis* in Turkey, with a description of the male sex, *Zoology in the Middle East*, 35:1, 112-114. 2005
- [15]. D. A. Aquino, E.N. Botto, M.S. Loíacono, P. Pathauer, "Avispa de la agalla del eucalipto", *Leptocybe invasa* Fischer & Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae), en Argentina." *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 37.2: 159-164. 2011.
- [16]. V. Costa, A. E. Bertilo Filho, C. F. Wilcken, J. L. Stape, J. Lasalle, D. Teixeira. *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* Fischer & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil: new forest pest reaches the New World. *Rev. Agric.*, 83 (2): 136-139. 2008.
- [17]. C. Jorge, G. Martinez, D. Gomez y M. Bollazzi, "First record of the eucalypt gall-wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) from Uruguay," *Bosque*, vol. 37, no. 3, pp.631-636, 2016.
- [18]. FABI (Forestry and Agricultural Biotechnology Institute) TPCP (Tree Protection Co-operative Programm). 2005. Pest Alert. Blue gum chalcid. *Tree Protection News*, 10:13. Consultado: Octubre 25, 2023. [En línea]. Disponible: http://www.fabinet.up.ac.za/tpcpweb/newsletters/TPCP_Newsletter_Nov_2005.pdf.
- [19]. B. Sangtongpraow, K. Charemsorn, S. Siripatanadilok. Longevity, fecundity and development time of *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) in Kanchanaburi Province, Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science* 44, 155–163. 2011.
- [20]. G. Dittrich-Schröder, M. J. Wingfield, B.P. Hurley y B. Slippers, "Diversity in *Eucalyptus* susceptibility to the gall-forming wasp *Leptocybe invasa*," *Agricultural and Forest Entomology*., vol. 14, no. 4, pp. 419-427, Noviembre, 2012.
- [21]. C. Jorge, "Ecología de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) e seus parasitoides e simbioses em *Eucalyptus*," Tesis de doctorado, Universidade Estadual Paulista, San Pablo, Brasil, 2019.
- [22]. G. Csóka, G. N. Stone y G. Melika, "Non-native gall-inducing insects on forest trees: a global review," *Biol Invasions*, vol. 19, no. 11, pp. 3161–3181, 2017, doi 10.1007/s10530-017-1466-5
- [23]. Forest pest species profile. FAO, 2007. Consultado: Octubre 15, 2023. [En línea].Disponible: www.fao.org/forestry/webview/media?mediaId=13569&langId=1).
- [24]. M. Kenis, B. P. Hurley, F. Colombari, S. Lawson, J. Sun, C. Wilcken, R. Weeks y S. Sathyapala, "Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests," *FAO Forestry Paper*, vol. 182, 2019. [En línea]. Disponible: <https://www.fao.org/3/ca3677en/ca3677en.pdf>

- [25]. I., Cegatta y C., Villegas, “Eficiência de dois inseticidas sistêmicos no controle de *Leptocybe invasa* em mudas de *Eucalyptus camaldulensis*”, *Rev. Inst. Flor.*, vol. 25, no. 2, pp. 215-221, Dic, 2013.
- [26]. M.V. Massson, “Dinâmica populacional e manejo de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) em plantações de eucalipto,” Tesis de Doctorado, Universidade Estadual Paulista, San Pablo, Brasil, 2015.
- [27]. S. O., Ramos, “Efecto de insecticidas sobre la formación y desarrollo de las agallas de *Leptocybe invasa* en eucaliptos,” *FAVE. Secc. Cienc. Agrar.*, vol. 14, no. 2, pp. 14: 1-7, Diciembre, 2015.
- [28]. G., Martinez, C., Jorge, P., Escudero, J. Martínez-Haedo, M. de los Santos y R. Scoz, “Hacia un programa de control biológico de la avispa agalladora del eucalipto,” *Revista INIA*, vol. 56, no. 1, pp. 75-78, 2019.
- [29]. G. Dittrich-Schröder, M. Harney, S. Nesar, T. Joffe, S. Bush, B. P. Hurley, M. J. Wingfield y B. Slippers, “Biology and host preference of *Selitrichodes neseri*: a potential biological control agent of the *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa*,” *Biological Control*, vol. 78, pp. 33-41, 2014
- [30] Z. Mendel, A. Protasov, J. La Salle, D. Blumberg y M. Branco, “Classical biological control of two *Eucalyptus* gall wasps; main outcome and conclusions,” *Biological Control*, vol. 105, pp. 66-78, 2017.
- [31] N. H. Le, H. F. Nahrung, M. Griffiths y S. A. Lawson, “Invasive *Leptocybe* spp. and their natural enemies: Global movement of an insect fauna on eucalypts,” *Biological Control*, vol. 125, pp. 7-14, Octubre, 2018, doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.06.004.
- [32] I.A.S. Gibson, J. Burley y M. R. Speight, “The adoption of agricultural practices for the development of heritable resistance to pests and pathogens in forest crops,” en *Resistencia to diseases and pests in forest trees. Proceedings of the Third International Workshop on the Genetics of Host-Parasite Interactions in Forestry*, Wageningen, the Netherlands, 14- 21 September 1980, H. M. Heybroek, B. R. Stephan y K. von Weissenberg, Eds. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1980, pp. 9-21.
- [33] R. J. Marquis, “The selective impact of herbivores,” en *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics*, R. S. Fritz y E. L. Simms, Eds. Chicago: University of Chicago, pp. 301-325. 1992.
- [34] R. J. Marquis, “Uma abordagem geral das defesas das plantas contra a ação dos herbívoros,” en *Ecologia das interações Plantas-Animais: uma abordagem ecológico- evolutiva*, K. Del-Claro y H. M. Torezan-Silingardi, Eds. Rio de Janeiro: Technical Books, pp. 53-66. 2012.
- [35] E. R. Eskiviski, M. E. Schapovaloff, D. M. Dummel, M. M. Fernandez, F. L. Aguirre, “Susceptibility of *Eucalyptus* species and hybrids to the gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) in northern Misiones, Argentina,” *Forest Systems*, vol. 27, no. 1, Abril, 2018.
- [36] J. C. Guerreiro, E. M. Del Quiqui, A. H. M. De Oliveira, J. P. Maciel, M.W. Dileli, P. J. Ferreira-Filho, “Susceptibility of *Eucalyptus* spp. (Myrtales: Myrtaceae) and Clones to *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) in Paraná, Brazil,” *Fla Entomol*, vol. 98, no. 2, pp. 787-789,

2015, doi.org/10.1653/024.098.0260

[37] J. Luo, R. Arnold, W. Lu y Y. Lin, "Genetic variation in *Eucalyptus camaldulensis* and *E. tereticornis* for early growth and susceptibility to the gall wasp *Leptocybe invasa* in China," *Euphytica*, vol. 196, pp. 397-411, 2014.

[38] A. Kumar, K. S. Sangha y D. S. Dhillon, "Screening of 19 genotypes of *Eucalyptus* spp. against gall wasp (*Leptocybe invasa*) in North-western India," *Journal of Forest Research*, vol. 26, no. 2, pp. 355-359, Abril, 2015.

[39] R. Petro, S. S. Madoffe, S. Iddi y W. A. Mugasha, "Impact of *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* infestation on growth and biomass production of *Eucalyptus grandis* and *E. saligna* seedlings in Tanzania," *International Journal of Pest Management*, vol. 61, no. 3, pp. 220-227, 2015.

[40] Y. L. Lin, T. P. Chang y G. S. Tung, "Susceptibility tests of various *Eucalyptus* host species to *Leptocybe invasa* in Taiwan," *Taiwan Journal of Forest Science*, vol. 29, pp. 65-71, 2014.

[41] P. Nyeko, K. E. Mutitu, B. O. Otieno, G. N. Ngae y R. K. Day, "Variations in *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) population intensity and infestation on *Eucalyptus* germplasms in Uganda and Kenya," *International Journal of Pest Management*, vol. 56, no. 2, pp. 137-144, 2010.

[42] C. A. Pérez, O. Bentancur, D. Fros, S. Simeto y N. Altier, "Resistencia genética a las enfermedades: de la utopía a la realidad," *INIA Serie Actividades de Difusión*, 629, pp. 57-66, 2010.

[43] G. Martínez, L. López, G. Cantero, A. González y M. Dicke, "Life-story analysis of *Thaumastocoris peregrinus* in a newly designed mass rearing strategy," *Bulletin of Insectology*, vol. 67, no. 2, pp. 199-205, 2014.

[44] G. Martínez, M. V. Finozzi, G. Cantero, R. Soler, M. Dicke y A. González, "Oviposition preference but not adult feeding preference matches with offspring performance in the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*," *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 163, no. 1, pp. 101-111, Abril, 2017.

[45] G. Camarena-Gutiérrez, Señales en la interacción planta insecto. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, vol. 15, no. 1., pp. 81-85, 2009.

[46] E. Corrêa-Costa, M. Dávila, E. B. Cantarelli. *Entomologia Florestal*. 3era. Ed. Editora UFSC, 256 pp, 2014.

[47] L. Taiz y E. Ziegler. *Fisiología Vegetal*. Vol 2. Editora Publicaciones de la Universitat Jaume L. 656 pp, 2006.

- [48] G., Rosenthal y M., Berenbaum. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. 1992.
- [49] J. A. Zabala, Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos. *CienciaHoy*, vol. 20, no. 117, pp. 53-59, Junio-Julio, 2010.
- [50] D. Sandoval, J Téllez, A. García, G. Rivera, S. Moreno, F. Moreno, Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo: revisión de la literatura. *Univ Med*. 57(4): 488-501. 2016. doi: [http:// dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed57-4.tddd](http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed57-4.tddd)
- [51] G.G. Castellaro, N.F. Squella, R.T. Ullrich, C.F. León, S.A. Raggi, Some microhistological techniques utilized in the determination of the botanical composition of herbivore diets. *Agricultura Técnica (Chile)* 67(1):86-93. 2007.
- [52]. C.C. Saulle, V. Raman, A.V.G. Oliveira, B.H.L. de Noronha Sales Maia, E.K. Meneghetti, T.B. Flores, P.V. Farago, I.A. Khan, J.M. Budel. Anatomy and volatile oil chemistry of *Eucalyptus saligna* cultivated in South Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 28, num. 2, pp. 125-134, 2018. Consultado: Noviembre 18, 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.001>.
- [53]. P. Guzmán, V. Fernández, J. Graça, V. Cabral, N. Kayali, M. Khayet, L. Gil. Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidized cell wall region. *Frontiers in Plant Science*, vol. 5, 2014. Consultado: Noviembre 20, 2023. [En línea]. Disponible: DOI=10.3389/fpls.2014.00481
- [54]. C. García, G. Montero, M.A. Coronado. Valorization of *Eucalyptus* leaves by essential oil extraction as an added value product in Mexico. *Waste Biomass Valor*, vol. 8, pp. 1187–1197. 2017. Consultado: Noviembre 20, 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9695-x>
- [55]. L. D. Tuffi Santos, L. Iarema, M. Thadeo, F.A. Ferreira, R.M.S.A. Meira. Características da epiderme foliar de eucalipto e seu envolvimento com a tolerância ao glyphosate. *Planta Daninha*, v. 24, n. 3, p. 513-520, 2006.
- [56]. I.P. Migacz, P.A. Raeski, V.P. de Almeida, V. Raman, S. Nisgoski, G.I.B. de Muniz, P.V. Farago, I.A. Khan, J.M. Bude. Comparative leaf morpho-anatomy of six species of *Eucalyptus* cultivated in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28, pp. 273–281, 2018.
- [57]. L.D.T. Santos, M. Thadeo, L. Iarema, R.M.S. Alves-Meira, F.A. Ferreira. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.32, n.4, p.769-779, 2008
- [58] C. R. Metcalfe. *Anatomy of the dicotyledons*. V. III. Clarendon Press, Oxford. 1987.
- [59] P. Guzmán, V. Fernández, J. Graça, V. Cabral, Kayali, N., M. Khayet, L. Gil. Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidized cell wall region. 2014.

- [60] S., Kumar, & G. K., Babu. Essential oils of Eucalyptus species: A review of their chemical composition, biological properties, and potential applications. *Journal of Essential Oil Research*, 29(3), 233-249. 2017.
- [61] R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis. Natural products (Secondary metabolites). In Buchanan, B. B; Gruissem, W; Jones, R.L. eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. 2000.
- [62] J. Stone, G. Schonrogge. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution*. 2003.
- [63] A. González y S. M. Solis, "Anatomy and morphogenesis of galls produced by *Leptocybe invasa* in plants of *Eucalyptus*," *Bol. Soc. Argent. Bot.*, vol. 50, no. 2, pp. 141-151, 2015.
- [64] A. Raman. "Insect–plant interactions: the gall factor." *All flesh is grass: Plant-animal interrelationships*: 119-146. 2011.
- [65] M. I. Mercado y G. I. Ponessa. Nuevo soporte para obtención de cortes de material vegetal con micrótopo rotativo. *Dominguezia*, vol. 37, no. 1, pp. 29-35, 2021.
- [66] C., Chilima, H., Jenya, D., Moyo, G., Meke. Comparison of the Susceptibility of Six Eucalyptus Tree Species to *Leptocybe Invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) Attack in a Forest Nursery in Zomba District. 2017.
- [67] P. Nyeko, E. K. Mutitu, R. K. Day. *Eucalyptus* infestation by *Leptocybe invasa* in Uganda. *African Journal of Ecology*, 47(3), 299-307. 2009.
- [68] T. B. Flores, C. A. Alvares, V. C. Souza, J. L. Stape. *Eucalyptus no Brasil: Zoneamento climático e guia para identificação*. IPEF, Piracicaba, São Paul. 2016.
- [69] A., Fatih, K., Yüksel. Gall wasps change the biochemical composition of Eucalyptus leaves. General Directorate of Forestry, Mersin University 2024.
- [70] G., Fernandes, M. A, Carneiro, I., Rosy. *Gall-Inducing Insects*. 2012.
- [71] A. R., War, M. G., Paulraj, T., Ahmad, A. A., Buhroo, B., Hussain, S., Ignacimuthu, H.C., Sharma. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav*. 2012.
- [72] B. A., Otieno, J. P., Salminen. Steinbauer M.J. Resistance of subspecies of *Eucalyptus camaldulensis* to galling by *Leptocybe invasa*: Could quinic acid derivatives be responsible for leaf abscission and reduced galling?. University of Turku, Turku, Finland. 2021.