



**SERVÍCIO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**



**Estrutura e metabolismo de galhas foliares induzidas por Hemiptera (Psyllidae) em  
*Pouteria ramiflora* (Mart). Radlk. (Sapotaceae)**

Tácito de Freitas Calácia  
Denis Coelho de Oliveira

**UBERLÂNDIA – MG**

**2016**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**



**Estrutura e metabolismo de galhas foliares induzidas por Hemiptera (Psyllidae) em  
*Pouteria ramiflora* (Mart). Radlk. (Sapotaceae)**

Aluno: Tácito de Freitas Calácio

Orientador: Dr. Denis Coelho de Oliveira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

**UBERLÂNDIA – MG**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C141e      Calácio, Tácito de Freitas, 1989  
2018      Estrutura e metabolismo de galhas foliares induzidas por Hemiptera  
(Psyllidae) em *Pouteria ramiflora* (Mart). Radlk. (Sapotaceae) / Tácito  
de Freitas Calácio. - 2018.  
97 f. : il.

Orientador: Denis Coelho de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.793>  
Inclui bibliografia.

1. Biologia vegetal - Teses. 2. Herbívoro - Teses. 3. Stress oxidativo  
- Teses. 4. Histoquímica - Teses. I. Oliveira, Denis Coelho de. II.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Vegetal. III. Título.

---

CDU: 581

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

BioVeg

Estrutura e metabolismo de galhas foliares induzidas por Hemiptera (Psyllidae) em  
*Pouteria ramiflora* (Mart). Radlk. (Sapotaceae).

Tácito de Freitas Calácio

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente (Orientador):

Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira – UFU.

Examinadores:

Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães – UFVJM.

Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias – UFMG.

Dissertação aprovada em 25/02/2016

UBERLÂNDIA – MG.

2016

## **Agradecimentos**

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela bolsa concedida, permitindo a viabilização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia – UFU, pela qualidade no ensino.

Ao Instituto de Ciências Biológicas – INBIO, pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – BIOVEG, pelo corpo docente que pude conhecer e trocar experiências, especialmente àqueles com os quais pude conviver em sala de aula e campo.

Ao professor que orientou este trabalho, Dr. Denis, pela paciência, profissionalismo e dedicação. Uma pessoa excepcional!

À Profa. Dra. Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira que, assim como Denis, participou efetivamente deste trabalho, sempre disposta a contribuir.

À Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias que sempre manteve abertas as portas do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG para a realização de procedimentos, e ao Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães por terem acolhido este trabalho e contribuído para melhorá-lo.

A todo pessoal do Grupo Galhas, em especial ao Bruno, por terem me orientado nos procedimentos laboratoriais em Belo Horizonte.

À Nívia, sempre se prontificando a ajudar.

Ao pessoal do LAFIVE (Laboratório de Fisiologia Vegetal), LAMOVI (Laboratório de Morfologia, Microscopia e Imagem) e LADEV (Laboratório de Anatomia e Desenvolvimento Vegetal), pelos bons momentos nesta etapa.

À minha esposa Graziela pela incrível paciência nesses dois anos.

Ao meu pai Vicente e mãe Claudelina que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos.

Aos meus irmãos Gustavo (Kássia e Letícia) e Milene (Luís Carlos, Ítalo, Valentina e Lorenzo).

Ao meu irmão parceiro Davi que sempre me estende a mão quando preciso.

Agradecimento especial ao meu “mano véio” Vinícius (Isabela e Francisco), por me acolher em sua casa enquanto estava em Belo Horizonte.

A todos que indireta ou diretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## **OBRIGADO!**

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO 1**

Tab. 1: Testes histoquímicos usados para detecção de compostos estruturais, metabólitos primários e secundários e espécies ativas de oxigênio. Todos os testes foram realizados com material recém-coletado de folhas não galhadas e galhas de *Pouteria ramiflora* .....53

Tab. 2: Histolocalização química em folhas não galhadas de *Pouteria ramiflora* e galhas de *Ceropsylla* sp. .....54

### **CAPÍTULO 2**

Tab. 1: Medições obtidas com o software ImageJ® para quantificar, através de análises histoquímicas, compostos fenólicos e espécies ativas de oxigênio. A porcentagem de área marcada foi avaliada em áreas pré-selecionadas de 0,016 mm<sup>2</sup>. Quanto maior o valor na escala de cinza menor a concentração da substância analisada. .....91

Tab. 2: Teor de pigmentos cloroplastídicos (clorofilas a, b e carotenoides) na folha não galhada e em galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. *Pouteria ramiflora*. Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam estatisticamente com  $P \geq 0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis ( $n = 20 \pm DP$ ). .....91

Tab. 3: Conteúdo hídrico relativo, nível de saturação hídrica, área foliar específica e massa foliar específica das folhas não galhadas e galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *Pouteria ramiflora*. Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam estatisticamente com  $P \geq 0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis ( $n = 60 \pm DP$ ). .....91

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Fig. 1: Aspecto geral da galha de *Pouteria ramiflora* induzida por *Ceropsylla* sp. A) Ramo de *Pouteria ramiflora* com folhas galhadas; estrutura intralaminar da galha no detalhe (barra: 0,5 mm); B) Ninfa de *Ceropsylla* sp., em seu terceiro instar, com o aparelho bucal (estilete) do inseto em evidência (seta); C) Projeção adaxial da galha com fissuras; D) Superfície abaxial da galha mostrando a secreção cerosa produzida no dorso do indutor. ....55

Fig. 2: Perfil anatômico e estrutural da folha não galhada de *Pouteria ramiflora*. A) Aspecto geral da nervura principal mostrando feixe vascular do tipo bicolateral; B) Representação esquemática da nervura central; C) Mesofilo com duas a três camadas de parênquima paliçádico e três a cinco de lacunoso, além de nervura de menor calibre, cutícula espessa pode ser observada na superfície adaxial da epiderme; D) Detalhe anatômico da nervura principal; E) Teste histoquímico com floroglucina acidificada mostrando ligninas no xilema e fibras do floema (seta); F) Detalhe de nervura secundária no mesofilo da folha não galhada indicando a presença de ligninas no xilema e fibras (seta); G) Teste histoquímico com vermelho de rutênio para pectinas na nervura principal da folha não galhada; seta indicando intensa reação no floema e colênquima (seta); H) Pectinas no mesofilo da folha não galhada; seta indicando intensa presença na parede periclinal interna da epiderme adaxial. Ad: epiderme adaxial; Co: colênquima; Fl: floema; Xi: xilema; Ns: nervura secundária; Ff: fibras do floema; Cx: Córtext; Cu: cutícula; Ab: epiderme abaxial; Pp: parênquima paliçádico; Pl: parênquima lacunoso .....56

Fig. 3: Aspecto anatômico e estrutural da galha foliar em *Pouteria ramiflora* induzidas por *Ceropsylla* sp. A) Anatomia da galha intralaminar mostrando a distribuição dos

tecidos em relação a câmara ninfal; B) Representação esquemática da galha; C) Detalhe do córtex da galha mostrando o alongamento celular anticlinal no córtex adaxial e lignificação no córtex abaxial; D) Detalhe do feixe vascular neoformado na galha ladeado pelo parênquima interfascicular; E) Córtext abaxial da galha mostrando feixes vasculares e células menores de forma irregular adjacentes a câmara ninfal; F) Teste histoquímico com floroglucina acidificada com reação positiva para ligninas no córtex abaxial da galha (seta) e feixes vasculares; G) Pectinas na galha, principalmente no floema (setas); H) Fissura suberizada que pode ocorrer na superfície da galha (seta). Ad: epiderme adaxial; Cad: córtex adaxial; Fv: feixe vascular; Cab: Córtext abaxial; Cn: Câmara ninfal; Ra: Região adjacente à câmara ninfal do córtex abaxial; Rl: Região lateral do córtex abaxial; Pi: Parênquima interfascicular. .....57

Fig. 4: Histoquímica de metabólitos primários em folhas de *Pouteria ramiflora*. A) Amido na região central da nervura principal (seta); B) Açúcares redutores no parênquima paliçádico da folha não galhada (seta); C) Proteínas no floema da nervura principal (seta); D) Gotículas de lipídios no mesofilo (seta), e na cutícula da folha não galhada .....58

Fig. 5: Histoquímica de metabólitos primários na galha foliar em *Pouteria ramiflora* induzidas por *Ceropsylla* sp. A) Amido na porção superior do córtex abaxial, especialmente próximos aos feixes vasculares adjacentes à câmara ninfal; B) Detalhe dos grãos de amido (seta); C) Gradiente centrífugo de açúcares redutores no córtex adaxial da galha; D) Detalhe do córtex da galha com açúcares redutores (seta); E) Gradiente centrífugo de proteínas no córtex da galha; F) Detalhe do feixe vascular na galha com intensa presença de proteínas (seta). G) Gradiente centrípeto de lipídios em relação aos

feixes vasculares na galha; H) Detalhe de feixe vascular na galha com intensa presença de lipídios (seta) .....	59
---	----

Fig.6: Histoquímica de metabólitos secundários, auxinas e EAO (espécies ativas de oxigênio) em folhas de <i>Pouteria ramiflora</i> . A) Proantocianidinas no mesofilo e floema da folha não galhada (seta); B) Alcaloides nas fibras da nervura principal da folha não galhada (seta); C) Auxinas na folha não galhada (seta); E) EAO na folha não galhada (seta); E) Compostos fenólicos no parênquima paliçádico da folha não galhada (seta) .....	60
--	----

Fig. 7: Histoquímica de metabólitos secundários, auxinas e EAO (espécies ativas de oxigênio) de galhas em <i>Pouteria ramiflora</i> induzidas por <i>Ceropsylla sp</i> A) Proantocianidinas na galha; B) Detalhe do córtex superior da galha contendo proantocianidinas (seta); C) Alcaloides na galha; D) Detalhe do córtex interfascicular da galha contendo alcaloides (seta); E) Auxinas na galha; F) Detalhe do córtex superior da galha contendo intensa presença de auxinas (seta) .....	61
---	----

Fig. 8: Histoquímica de fenólicos e EAO (espécies ativas de oxigênio) de galhas em <i>Pouteria ramiflora</i> induzidas por <i>Ceropsylla sp</i> . A) EAO na galha; setas indicam regiões com marcação mais intensa para EAO; B) Detalhe do córtex superior da galha indicando forte marcação nas paredes celulares; C) Compostos fenólicos na galha; D) Detalhe do córtex superior contendo compostos fenólicos .....	62
---	----

## CAPÍTULO 2

Fig. 1: Anatomia e histoquímica da galha de <i>Ceropsylla sp</i> . em <i>Pouteria ramiflora</i> em secções transversais. A) Corte-branco demonstrando o córtex da galha, evidenciando o	
---	--

desenvolvimento do parênquima clorofiliano (setas); B) Alta concentração de EAO no córtex adaxial da galha, principalmente nas paredes celulares das células dos feixes vasculares e parênquima; C) Detalhe da região lateral do córtex abaxial da galha com intensa lignificação (seta); D) Concentração de compostos fenólicos no córtex adaxial da galha. ....	92
---	----

Fig 2: Curva de indução de fluorescência demonstrado o efeito Kautsky na folha e galha,

no sistema *Ceropsylla* sp. – *Pouteria ramiflora*. O eixo horizontal (X) corresponde ao tempo (s) e o eixo vertical (Y) corresponde à intensidade da emissão de fluorescência ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Curvas verdes representam a fluorescência nos tecidos da galha e as vermelhas na folha não galhada.  $F_0$  é o momento de fluorescência inicial antes do primeiro pulso saturante, onde a galha exibe uma fluorescência mais intensa que a folha;  $F_m$  representa a fluorescência máxima dos tecidos, durante o primeiro pulso de luz saturante, onde a galha emite uma fluorescência ligeiramente menor;  $F_p$  representa o segundo pulso, onde a emissão de fluorescência de ambos os tecidos é próxima. Entre  $F_p$  e  $F_m-L_{ss}$  é ativada uma luz actinica, que promove a fase fotoquímica da fotossíntese. Durante este período, pulsos de luz saturante são emitidos ( $F_{m\_L1}$ ,  $F_{m\_L2}$ ,  $F_{m\_L3}$  e  $F_{m\_L4}$ ). Em  $F_{m\_Lss}$  é emitido um pulso de luz saturante e, sem sequência, uma luz no comprimento vermelho longo é emitida, deixando os centros de reação do fotossistema I abertos.  $F_{m\_D1}$ ,  $F_{m\_D2}$  e  $F_{m\_D3}$ , são emitidos pulsos de luz saturante, ao passo que a luz de comprimento vermelho longo continua ação.....93

Fig. 3: Aspecto geral da superfície adaxial da folha galhada no sistema *Ceropsylla* sp.-  
*Pouteria ramiflora*, perfil morfológico e emissão de fluorescência; os círculos serrilhados demarcam a região onde a galha ocorre. A) Superfície adaxial da folha com galha; B)

Fluorescência inicial indicando maior emissão pelo tecido galhado ( $F_0$ ); C) Fluorescência máxima demonstrando níveis semelhantes entre o tecido não galhado e tecido galhado ( $F_m$ ); D) Rendimento quântico potencial, onde se percebe que o tecido não galhado possui maior rendimento que a galha ( $QY_{max}$ ); E) Dissipação não fotoquímica durante o último pulso de luz saturante sob emissão da luz actínica, onde se percebe uma maior eficiência de dissipação de calor pelo tecido não galhado em relação ao galhado ( $NPQ_{Ln}$ ); F) Dissipação não fotoquímica durante pulso de luz saturante após o desligamento da luz actínica, onde se percebe uma maior eficiência de dissipação de calor pelo tecido não galhado em relação ao galhado ( $NPQ_{Lss}$ ) .....94

Fig. 4: Emissão de fluorescência dos tecidos não galhados e tecidos galhados no sistema *Ceropsylla* sp. – *Pouteria ramiflora*. A) Índice de vitalidade dos tecidos da folha galhada durante o último pulso de luz saturante sob emissão da luz actínica, demonstrando maior vigor do tecido não galhado em relação ao galhado ( $Rfd_{Ln}$ ); B) Índice de vitalidade dos tecidos da folha galhada durante o pulso de luz saturante no momento após a inativação da luz actínica, demonstrando maior vigor do tecido não galhado em relação ao galhado ( $Rfd_{Lss}$ ); C) Rendimento quântico efetivo no tecido não galhado e tecido galhado, indicando que os dois tecidos têm capacidade fotossintética ( $QY_{Ln}$ ); D) Rendimento quântico efetivo dos tecidos no momento após a inativação da luz actínica, demonstrando que não há diferenças significativas entre o tecido não galhado e galhado ( $QY_{Lss}$ ) .....95

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	17
<b>CAPÍTULO 1: Galhas foliares induzidas por <i>Ceropsylla</i> sp. (Hemiptera: Psyllidae)</b>	
em <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. (Sapotaceae): simplicidade estrutural <i>vs</i>	
complexidade histoquímica .....	21
<b>RESUMO</b> .....	22
<b>ABSTRACT</b> .....	23
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
Sistema galhador-planta hospedeira .....	26
Análises histoquímicas e anatômicas .....	26
<b>RESULTADOS</b> .....	27
Características gerais do sistema galhador – planta hospedeira .....	27
Perfil anatômico da folha não galhada e galha.....	28
Folha não galhada .....	28
Galha .....	28
Histoquímica de substâncias do metabolismo primário .....	29
Folha não galhada .....	29
Galha .....	29
Histoquímica de substâncias do metabolismo secundário.....	30
Folha não galhada .....	30
Galha .....	30
<b>DISCUSSÃO</b> .....	30
Alterações anatômicas induzidas pelo inseto galhador.....	31

<b>Estabelecimento do gradiente funcional .....</b>	33
<b>Histoquímica de metabólitos primários .....</b>	34
<b>Histoquímica de metabólitos secundários .....</b>	37
<b>CONCLUSÕES .....</b>	38
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	38
<b>CAPÍTULO 2: Relação entre o desempenho fotossintético e o estresse oxidativo em galhas induzidas por <i>Ceropsylla</i> sp. (Psyllidae) em <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. (Sapotaceae).....</b>	
<b>RESUMO .....</b>	63
<b>ABSTRACT .....</b>	64
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	66
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	68
<b>Área de estudo e coleta.....</b>	68
<b>Análises Histoquímicas .....</b>	69
<b>Dosagem de Pigmentos Fotossintéticos e Fluorescência da clorofila a.....</b>	69
<b>Conteúdo relativo de água (CRA), saturação hídrica (<math>\Delta H_{sat}</math>), área foliar específica (AFE) e massa foliar específica (MFE).....</b>	71
<b>RESULTADOS.....</b>	71
<b>Aspecto geral da galha .....</b>	71
<b>Análises Histoquímicas .....</b>	72
<b>Dosagem de Pigmentos Fotossintéticos e Fluorescência da clorofila a.....</b>	72
<b>Área e massa foliar específica (AFE e MFE), conteúdo hídrico relativo (CHR) e saturação hídrica (<math>\Delta H_{sat}</math>).....</b>	73
<b>DISCUSSÃO .....</b>	74
<b>Manutenção do equilíbrio redox .....</b>	74

<b>Alterações no aparato fotossintético .....</b>	76
<b>Estabelecimento da galha x manutenção do potencial fotossintético .....</b>	76
<b>Importância da manutenção da atividade fotossintética na galha .....</b>	78
<b>CONCLUSÕES .....</b>	79
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	80
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	96

## INTRODUÇÃO GERAL

Os tecidos vegetais estão sujeitos à ação de organismos externos capazes de desviar os processos naturais do desenvolvimento vegetal redefinindo-os em prol de seu sucesso, tecidos estes que adquirem novas funcionalidades (Rohfritsch & Shorthouse 1982). Insetos galhadores são capazes de manipular os tecidos da planta hospedeira levando ao desenvolvimento de galhas, órgãos vegetais neoformados (Mani 1964; Shorthouse *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2016). Este novo órgão, que apresenta tecidos com novas funcionalidades em relação aos tecidos da planta hospedeira (Oliveira & Isaias 2010a e b), quando induzidos por insetos formam a galha, uma estrutura geralmente simétrica com morfologia bem definida (Raman 2007). Insetos galhadores provocam uma série de modificações estruturais e fisiológicas nos tecidos da planta hospedeira (Mani 1964; Oliveira *et al.* 2016). Desta forma se instala um quadro de estresse, culminando na formação de uma estrutura que cresce a partir da hipertrofia celular e hiperplasia do tecido (Oliveira & Isaias 2010a).

O processo de estabelecimento e desenvolvimento da galha estimula a formação de um dreno de fotoassimilados em direção aos tecidos neoformados (Wingler & Roitsch 2008; Castro *et al.* 2012). Considerável parte dos metabólitos e nutrientes, antes normalmente alocados para formação de estruturas essenciais da planta hospedeira, são desviados para a galha, levando ao desenvolvimento de uma estrutura não essencial à custa das essenciais (Price *et al.* 1987). Desta maneira, o galhador manipula o metabolismo de compostos nutricionais, como carboidratos, proteínas e lipídios, bem como o acúmulo de substâncias de defesa, como compostos fenólicos (Oliveira & Isaias 2010b). A detecção e a histolocalização destes compostos químicos nos tecidos da galha são ferramentas importantes para compreensão do hábito alimentar do inseto galhador e dos mecanismos de defesa química utilizados na galha. (Oliveira *et al.* 2006; Oliveira & Isaias, 2010b).

Segundo Das & Roychoudhury (2014), a tolerância ao estresse oxidativo depende da produção de mecanismos antioxidantes. O estabelecimento da galha depende da habilidade do indutor de driblar as barreiras de defesas da planta hospedeira e equalizar o balanço redox provocado pelo estresse oxidativo que é gerado no tecido galhado (Oliveira *et al.* 2011a; Ferreira *et al.* 2015; Carneiro *et al.* 2014, 2015; Isaias *et al.* 2015). Atualmente muito se tem discutido sobre o papel crucial da geração do estresse oxidativo pelo galhador em orquestrar a cascata de eventos que culminam na formação da galha (Oliveira *et al.* 2010; Oliveira & Isaías 2010a e b; Oliveira *et al.* 2011a e b; Carneiro *et al.* 2014; Carneiro & Isaías 2015; Isaias *et al.* 2015). Entretanto discussões sobre os mecanismos utilizados pelas plantas para dissipar o excesso de estresse induzido pelos galhadores, podem vir a auxiliar na compreensão dos mecanismos que culminam no estabelecimento da galha.

Além de alterações estruturais, o estabelecimento do estresse oxidativo pode influenciar na conformação do sistema de membranas dos tilacoides nos cloroplastos, teores de pimentos fotossintetizantes e acúmulo de substâncias antioxidantes, bem como o desenvolvimento de mecanismos de dissipação de EAO (Isaias *et al.* 2014). Consequentes alterações nas taxas de fotossíntese do tecido galhado podem ocorrer devido à estas alterações no fotossistema II dos tecidos galhados (Oliveira *et al.* 2011). Junto a isso, é comum que se tenha uma saturação de CO<sub>2</sub> e deficiência de O<sub>2</sub> nestes tecidos, potencializando o estresse (Haiden *et al.* 2012; Pincebourde & Casas 2016). Segundo estes últimos, a manutenção da fotossíntese nas galhas pode ter um papel fundamental no controle da difusão destes gases e permitir a sobrevivência do inseto.

As galhas de *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae), aqui estudadas são induzidas por uma espécie não identificada do gênero *Ceropsylla* (Hemiptera-Psyllidae), que são reconhecidamente indutores de galhas em plantas vasculares (Burckhardt 2005) e são especializados em se alimentar por meio da sucção de fluidos em pontos específicos nas folhas

(Raman 1991; Raman *et al.* 1997). Estes galhadores são altamente especializados em sua planta hospedeira induzindo principalmente galhas foliares (Burckhardt 2005; Yang & Raman 2007), com diferentes morfotipos (Yang & Raman 2007). *P. ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae) é uma árvore frutífera comumente distribuída nas regiões de Cerrado, centro sul do Brasil e Amazônia (Santana *et al.* 2008; Condessa *et al.* 2013; Lorenzi 1992). Floresce entre agosto e outubro, e frutifica geralmente nas estações úmidas (novembro-fevereiro), possuindo a zoocoria como sua maior forma de dispersão (Lorenzi 1992; Dalponte & Lima 1999). É uma planta lactescente medindo entre 15 e 30 metros, com folhas simples glabras, medindo entre 7 e 12 centímetros de comprimento (Lorenzi 1992).

Estudos recentes abordando o desenvolvimento de galhas, o estabelecimento de gradientes histológicos e histoquímicos e sua relação com fotossíntese (Oliveira *et al.* 2011; Castro *et al.* 2012; Carneiro *et al.* 2014; Isaias *et al.* 2015) tem gerado importantes informações sobre as alterações causadas pela ação do inseto galhador nas plantas Neotropicais. Neste trabalho, pela primeira vez, se realizaram estudos sobre as alterações químicas e estruturais nas galhas foliares de *Ceropsylla* sp. induzidas em *Pouteria ramiflora*, bem como suas implicações na performance fotossintética dos tecidos e mecanismos de dissipação de estresse. Desta forma as seguintes hipóteses foram testadas:

1. Por ser induzida por um inseto sugador, espera-se que as galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *Pouteria ramiflora* seja estruturalmente simples e não estabeleça um gradiente estrutural e químico nos tecidos da galha.
2. O aumento do estresse oxidativo, causado pela presença do galhador, provocaria danos ao aparato fotoquímico e um desequilíbrio na eficiência quântica, com consequente decréscimo no qP e NPQ. Associados à presença de substâncias antioxidantes, os derivados fenólicos agiriam como um fator de dissipação de EAO.

## REFERÊNCIAS

- Burckhardt D. 2005. Biology, ecology, and evolution of gall-inducing psyllids (Hemiptera: Psylloidea). In: Raman A; Schaefer CW.; Withers TM. (eds) *Biology, ecology, and evolution of gall- inducing arthropods*. Science Publishers, New Hampshire, USA. Pp. 143–158.
- Carneiro RGS; Castro AC; Isaias RMS. 2014. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany* 92: 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.011>
- Carneiro RGS; Isaias RMS. 2015. Gradients of metabolite accumulation and redifferentiation of nutritive cells associated with vascular tissues in galls induced by sucking insects. *AoB Plants*, 7: 1-17. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv086>
- Condessa MB; Carvalho IAF; Santos BTA; Paula JE; Gomes SM; Silveira D; Simeoni LA. 2013. Efeito de extratos foliares de três espécies de *Pouteria* (Sapotaceae) sobre a germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. E *Lycopersicum esculentum* Mill. *Revista de Farmácia e Biologia* 9(3): 1-18.
- Castro CA; Leite GLD; Oliveira DC; Isaias RMS. 2012. Morphological Patterns of a Hymenopteran Gall on the Leaflets of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) *American Journal of Plant Sciences* 3: 921-929. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.37109>
- Dalponte JC; Lima ES. 1999. Disponibilidade de frutos e a dieta da *Pseudalopex vetulus* (Carnívora - Canidae) em um cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 326-332. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041999000500015>
- Das K; Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2(December): 1–13. <http://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

Ferreira, BG.; Carneiro, RGS.; Isaias, RMS. Multivesicular bodies differentiate exclusively in nutritive fast-dividing cells in *Marcetia taxifolia* galls. *Protoplasma*, 2015.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-015-0759-8>

Haiden SA; Hoffmann JH; Cramer MD. 2012. Benefits of photosynthesis for insects in galls. *Oecologia* 170: 987–997. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2365-1>

Isaias RMS; Oliveira DC; Moreira ASFP; Soares GLG; Carneiro RGS. 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1850(8): 1467-1660. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>

Lorenzi H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum 1: 368 p.

Mani MS. 1964. *Ecology of Plant Galls*, Dr. W. Junk Publishers, The Hague.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-6230-4>

Oliveira DC; Christiano JCS; Soares GLG Isaias RMS. 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev. Bras. Bot.* 29: 657–667.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000400015>

Oliveira DC; Isaias; RMS. 2010a. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *S. Afr. J. Bot.* 76: 239–248.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.011>

Oliveira DC; Isaias RMS; 2010b. Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* (Arg.) Muell (Apocynaceae). *Plant Sci.* 178: 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.002>

Oliveira DC; Magalhães TA; Carneiro RGS; Alvim MN Isaias RMS. 2010. Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established

cytological and histochemical patterns? *Protoplasma* 242(1-4): 81–93.

<https://doi.org/10.1007/s00709-010-0128-6>

Oliveira DC; Carneiro RGS; Magalhães TA; Isaias RMS. 2011a. Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma* 248: 829–837. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0258-x>

Oliveira DC; Isaias RMS; Moreira ASFP; Magalhães TA; Lemos Filho JP. 2011b. Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis? *Plant Science (Limerick)* 180: 489-495.

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.005>

Oliveira DC; Isaias RMS; Fernandes GW; Ferreira BG; Carneiro RGS; Fuzaro L. 2016. Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology* 84: 103-113.

<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.012>

Pincebourde S; Casas J. 2016. Hypoxia and hypercarbia in endophagous insects: Larval position in the plant gas exchange network is key. *Journal of Insect Physiology*. 84: 137-153. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.006>

Price PW; Fernandes GW; Waring GL. 1987. Adaptive nature of insect galls. *Environmental Entomology* 16: 15–24. <https://doi.org/10.1093/ee/16.1.15>

Raman A. 1991. Cecidogenesis of leaf galls on *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) induced by *Trioza jambolanae* Crawford (Homoptera: Psylloidea). *Journal of Natural History* 25(3): 653–663. <https://doi.org/10.1080/00222939100770421>

Raman A; Singh RN; Nadachowska AM. 1997. Biology and karyology of a cecidogenous psylloid, trioza *Fletcheri minor* (Homoptera: Psylloidea) and Morphogenesis of galls on the leaves of *Terminalia tomentosa* and *T. Arjuna* (Combretaceae). *Insecta matsumurana. Series entomology. New series* 53: 117-134.

Raman A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92(6): 748 – 757.

Rohfritsch O; Shorthouse D. 1982. Insect galls, in: Kahl G; Shell JS. (eds) *Molecular biology of plant tumors*. Academic Press, New York. Rosenthal. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394380-4.50011-6>

Santana DG; Ranal MA; Oliveira MC. 2008. Despolpamento reguladores de crescimento na emergência de plântulas de duas espécies do gênero *Pouteria*. II Simposio Internacional de Savanas Tropicais/IX Simpósio Nacional do Cerrado.

Shorthouse JD; Wool D; Raman A. 2005. Gall-inducing insects - Nature's most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology* 6(5): 407 – 411.  
<https://doi.org/10.1016/j.baae.2005.07.001>

Wingler A; Roitsch T. 2008. Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* 10: 50–62.  
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00086.x>

Yang MM; Raman A. 2007. Diversity, richness, and patterns of radiation among gall-inducing psyllids (Hemiptera: Psylloidea) in the orient and eastern Palearctic. *Oriental Insects* 41: 55–65. <https://doi.org/10.1080/00305316.2007.10417499>

**Galhas foliares induzidas por *Ceropsylla* sp. (Hemiptera: Psyllidae) em *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae): simplicidade estrutural vs. complexidade histoquímica**

Tácito de Freitas Calácio<sup>1</sup>, Denis Coelho de Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Instituto de Biologia. Laboratório de Anatomia e Desenvolvimento Vegetal, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, sala 28, CEP:38400902 - Uberlândia, MG – Brasil.*

*\*Autor para correspondência: denisoliveira@inbio.ufu.br.*

## RESUMO

Insetos manipulam os tecidos da planta hospedeira visando seu sucesso adaptativo. Dependendo do hábito alimentar destes insetos, as galhas podem apresentar tecidos mais ou menos complexos. Geralmente insetos sugadores induzem galhas estruturalmente simples e consequentemente, poucas alterações histoquímicas são observadas. *Ceropsylla* sp. (Hemiptera) induz galhas intralaminares nas folhas de *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae). A galha se forma principalmente através dos processos de hipertrofia celular e hiperplasia do tecido clorofílico da folha não galhada, além de neoformação de feixes vasculares. O tecido da galha pode ser espacialmente dividido em córtex adaxial e abaxial, entremeados por feixes vasculares. As laterais do córtex abaxial apresentam-se intensamente lignificadas. Embora estruturalmente simples, nota-se o estabelecimento de um gradiente centrífugo de açúcares redutores e a presença de amido ao redor dos feixes vasculares. Além disso, um gradiente centrífugo de fenólicos, auxinas e EAO (espécies ativas de oxigênio) foram observados no córtex adaxial. Estas moléculas estão associadas ao processo de alongamento celular observado no córtex da galha. Ainda, a presença de compostos secundários e o processo de lignificação seriam essenciais no controle do *burst* oxidativo no tecido da galha. Os processos de desenvolvimento do tecido galhado e morfologia da galha, demonstram ser um reflexo do perfil metabólico estabelecido zoneamento histoquímico no tecido galhado, induzido pelo galhador.

**Palavras – chave:** Herbivoria; morfogênese; gradiente histoquímico; estresse oxidativo, neoformação.

## ABSTRACT

Galling insects manipulate host plant tissues towards its adaptive success. However, depending on insect's taxa and feeding habits, gall structure may have different levels of tissue complexity. In general, sucking insects induce structurally simple gall, and consequently, few histochemical changes are also observed. *Ceropsylla* sp. (Hemiptera) induce intralaminar galls on leaves of *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae) and we hypothesized that this gall followed the simple structural and histochemical patterns proposed for sucking insects. Gall development occurs by processes of cell hypertrophy and hyperplasia from cells of chlorophyllous leaf tissue to form gall cortex. This cortex can be spatially divided into adaxial and abaxial, where there is neoformation of vascular bundles. In the abaxial gall cortex of gall there is intense lignification on both sides of nymphal chamber. Although structurally simple, gall tissue form a centrifugal gradient of reducing sugars, and starch granules were detected around the vascular bundles. In addition, centrifugal gradients of phenolics, auxins and ROS (reactive oxygen species) were observed in the adaxial cortex. These molecules are associated with the processes of cell elongation as observed in the gall cortex. Furthermore, the presence of phenolic compounds, proanthocyanidins, and lignified tissue, are important in the control of oxidative burst in gall tissues.

**Keywords:** Herbivory; morphogenesis; histochemical gradient; oxidative stress, neoformation.

## INTRODUÇÃO

Insetos galhadores representam a mais sofisticada guilda de herbívoros que alteram a morfogênese e a química de vários grupos de plantas hospedeiras (Mani 1964; Shorthouse & Rohfritsh 1992). Estas alterações ocorrem por meio de estímulos químicos e/ou mecânicos induzidos pelo inseto galhador (Hori 1992), culminando no desenvolvimento da galha (Shorthouse & Rohfritsh 1992). Diversas substâncias químicas têm sido propostas como gatilho inicial para formação destas estruturas, incluindo fitohormônios, aminoácidos e proteínas (Cornell 1983; Shorthouse & Rohfritsh 1992; Higton & Mabberly 1994; Bedetti *et al.* 2013). Este órgão vegetal neoformado (Shorthouse *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2016), apresenta diferentes padrões de arranjos estruturais e histoquímicos, em função das necessidades de defesa contra inimigos naturais, demanda nutricional do inseto galhador e proporciona um microambiente favorável para o desenvolvimento do inseto (Mani, 1964; Stone & Schönrogge 2003; Oliveira *et al.* 2006; Oliveira & Isaias 2010a; Vecchi *et al.* 2013).

A morfogênese da planta hospedeira é alterada por meio da rediferenciação do tecido da hospedeira em outro tecido especializado, demonstrando a habilidade do inseto galhador em manipular os processos metabólicos das células do tecido galhado (Oliveira *et al.* 2014a e b; Oliveira *et al.* 2016). Entretanto, dependendo do hábito alimentar do indutor, diferentes impactos são gerados, levando a rediferenciação (*sensu* Lev Yadun 2003) de tecidos especializados ou não. Em geral, galhas induzidas por Cecidomyiidae e Cynipidae são estruturalmente mais complexas apresentando tecidos especializados em proteção contra inimigos naturais e nutrição (Rohfritsh 1992; Stone & Schönrogge 2003). Galhas induzidas por insetos sugadores (Hemiptera) são, classicamente, consideradas estruturalmente simples (Mani 1964), embora galhas induzidas por *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera) em *Lonchocarpus muelhbergianus* (Fabaceae) demonstrem certo grau de complexidade (Oliveira *et al.* 2006; Isaias *et al.* 2011). A formação deste novo órgão vegetal é acompanhada de alterações químicas

nos tecidos da hospedeira (Bronner 1992). Estas substâncias químicas podem ser compartimentalizadas no tecido da galha e atuarem na defesa química contra inimigos naturais e na nutrição do inseto galhador (Bronner 1992; Oliveira *et al.* 2006). Sendo assim, o inseto galhador *Ceropsylla* sp. (Hemiptera: Psyllidae) possivelmente induz a formação de galhas estruturalmente simples em *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae) e que o impacto químico nos tecidos da galha reflita esta simplicidade estrutural.

Diferentes taxa de insetos galhadores são capazes de gerar um gradiente histoquímico durante o desenvolvimento de galhas (Mani 1964). Este gradiente é dependente do nível do estresse oxidativo causado pela ação alimentar do galhador (Oliveira *et al.* 2010; Oliveira & Isaias 2010a e b; Oliveira *et al.* 2011a). O hábito alimentar de insetos galhadores determina, muitas vezes, a necessidade de formação de um tecido nutritivo (Broner 1992). Desta forma, acredita-se que a atividade alimentar do inseto galhador pode ser o gatilho para geração do estresse e consequente desenvolvimento do gradiente histoquímico nos tecidos da galha (Price *et al.* 1987). O desenvolvimento da galha está relacionado com a formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) (Oliveira *et al.* 2010; Oliveira & Isaias 2011b, Isaias *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2016) que, concomitantemente ao acúmulo de compostos secundários, e substâncias reguladoras de crescimento (Bedetti *et al.* 2014; Carneiro *et al.* 2015), estabelecem e coordenam os eventos de rediferenciação celular.

Insetos sugadores, em geral, não acumulam substâncias de reserva no tecido da galha (Bronner 1992). Entretanto, recentes estudos na região Neotropical indicam que algumas espécies de insetos galhadores com hábito alimentar sugador podem induzir a formação de tecido de reserva (Oliveira *et al.* 2006; Oliveira & Isaias 2010b; Carneiro & Isaias 2015). Além do aporte de substâncias com potencial nutricional, o acúmulo de metabólitos secundários pode atuar como um mecanismo de proteção contra fatores bióticos e abióticos (Oliveira *et al.* 2006), quando localizado nos tecidos mais externos da galha (Stone & Schönrogge 2003).

Assim, como a maioria das interações entre insetos e plantas que leva a formação de gallhas, o sistema *Ceropsylla* sp. – *P. ramiflora* é extremamente específico. Desta forma, estudos de anatomia e histoquímica visam compreender os mecanismos que levam à formação galha e comportamento alimentar do galhador. Espera-se que a galha induzida por este inseto sugador seja estruturalmente simples e não estabeleça um gradiente estrutural e químico nos tecidos. Esta hipótese levantou com base nas seguintes questões: (I) As alterações celulares provocadas pelo inseto, levam à formação de um gradiente histológico nos tecido galhado em relação ao tecido não galhado (II) O estabelecimento de um novo perfil químico e estrutural nos tecidos galhados indica o desenvolvimento de novas funcionalidades nestes tecidos?

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Sistema galhador-planta hospedeira**

*Pouteria ramiflora* (Sapotaceae) é uma espécie frutífera, distribuída em áreas de cerrado (Dalponte & Lima 1999). É uma planta lactescente com altura entre 15 e 40 metros. Possui folhas simples, glabras, de tamanho e forma variáveis, possuindo entre 7 – 12 centímetros de comprimento (Lorenzi 1992). *Ceropsylla* sp. (Hemiptera: Psyllidae) induz galhas em folhas jovens de *P. ramiflora* durante o pico de brotação. As coletas foram realizadas na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó em Uberlândia (CCPIU), situada a 8 km oeste do perímetro urbano de Uberlândia, MG ( $18^{\circ}60'S$  –  $48^{\circ}O$ ), na região do Triângulo Mineiro, entre junho e dezembro de 2014. A reserva possui 127 ha, onde predomina a vegetação de cerrado sentido restrito (Lima *et al.* 1989), entre outros tipos fitofisionômicos.

### **Análises histoquímicas e anatômicas**

Para análises anatômicas, folhas completamente expandidas e galhas maduras foram coletadas e levadas ao laboratório. As amostras foram seccionadas à mão livre utilizando-se

navalhas descartáveis e coradas com azul de astra 0,5% e safranina 0,5% em solução aquosa (9:1) (Bukatsch 1972, modificado). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica (Johansen 1940) e montadas com verniz vitral (Paiva 2006). Amostras de material recém coletado foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 4,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) (Karnovsky 1965, modificado), desidratadas em série etílica e infiltradas em historesina (Leica®). As secções de 7 µm foram obtidos por meio de um micrótomo rotatório (Leica BIOCUT® 2035) e montados em lâminas histológicas. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (pH 4,6) (O'Brien & Feder 1965) durante 15 min e secas em estufa à 60°C.

Análises histoquímicas foram realizadas usando os seguintes reagentes: vermelho de Rutênio para detecção de pectinas, lugol para amido, reagente de Fehling para açúcares redutores, azul de mercúrio de bromofenol para proteínas, Sudan III para lipídios, Sulfato Ferroso para fenólicos, DMACA para proantocianidinas (derivados flavonoínicos), Draggendorf para alcaloides, Ehrlic para auxinas, Wiesner para ligninas e DAB para EAO. Os procedimentos histoquímicos estão descritos detalhadamente na Tab. 1. Para controle, foram utilizados cortes-branco para fim de comparação. Todas as lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico (Leica® DM500) com uma câmera acoplada (Leica® ICC50HD).

## RESULTADOS

### Características gerais do sistema galhador – planta hospedeira

As folhas de *P. ramiflora* hospedam galhas intralaminares (Fig. 1 A, detalhe) induzidas por uma espécie não identificada de *Ceropsylla* (Hemiptera: Psyllidae) (Fig. 1B). A galha madura é caracterizada por uma intumescência voltada para superfície adaxial da folha (Fig. 1C), uma abertura côncava voltada para a face abaxial (Fig. 1D). A galha permanece aberta

durante todo seu desenvolvimento e ciclo do inseto galhador. A câmara ninfal abriga somente um inseto galhador e nenhum parasitoide foi encontrado até o momento. O dorso do inseto galhador fica exposto na face abaxial da galha, sendo impregnado por uma substância aparentemente cerosa de coloração branca (Fig. 1D). O inseto induz alterações tanto estruturais quanto químicas nos tecidos da planta hospedeira para formar a galha.

### **Perfil anatômico do tecido não galhado e galha**

#### *Tecido não galhado*

A folha completamente expandida apresenta epiderme unisseriada onde se denota a cutícula (Fig. 2A – C). A nervura principal possui um feixe vascular bicolateral envolvido pelas fibras do floema (Fig. 2D e E). As nervuras de menor calibre também apresentam lignificação nas fibras (Fig. 2F). Colênquima é observado no córtex da nervura principal (Fig. 2G), o qual é permeado por ductos laticíferos (Fig. 2A). O mesofilo é dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliçádico e três a cinco de lacunoso (Fig. 2C e H).

#### *Galha*

Na galha nota-se a estratificação dos tecidos havendo hipertrofia celular, hiperplasia parenquimática e a neoformação de tecido vascular (Fig. 3A). O tecido galhado é dividido em três camadas de tecidos distintas: córtex adaxial, tecido vascular e córtex abaxial (Fig. 3B). Na primeira camada, o crescimento das células é predominantemente anticlinal com distribuição ligeiramente radial em direção à câmara ninfal (Fig. 3C) e, as paredes celulares são primordialmente primárias. Na segunda camada, há formação de feixes vasculares, circundados por parênquima interfascicular. Esta camada entremeia o córtex adaxial e abaxial da galha (Fig. 3B e D). No parênquima interfascicular as células apresentam um alongamento anticlinal relativamente menos acentuado que as células do córtex adaxial (Fig. 3D). Na terceira camada,

o córtex abaxial circunda a câmara ninfal e é formado por duas regiões também distintas (Fig. 3B e E). A região lateral do córtex abaxial possui células com alongamento anticlinal, e a região adjacente à câmara ninfal possui de três a cinco camadas de células menores e forma irregular. A região lateral do córtex abaxial é completamente lignificada (Fig. 3C e 3F), enquanto a região adjacente possui células de paredes primárias e finas (Figura 3G). A epiderme adaxial da galha frequentemente apresenta fissuras suberizadas que adentram ao córtex (Fig. 3H).

## **Histoquímica de substâncias do metabolismo primário**

### *Tecido não galhado*

Grãos de amido foram observados apenas no floema da nervura central (Fig. 4A). Açúcares redutores foram detectados principalmente na epiderme e no mesofilo (Fig. 4B). Proteínas foram amplamente encontradas no parênquima paliçádico e no floema da nervura principal (Fig. 4C). Lipídios foram detectados em todo o mesofilo da folha não galhada na forma de gotículas e na cutícula (Fig. 4D). Nos ductos laticíferos da folha não galhada também foram detectados lipídios.

### *Galha*

Nas galhas, grãos de amido formaram um gradiente centrípeto em direção aos feixes vasculares adjacentes a câmara ninfal, na porção superior do córtex abaxial (Fig. 5A e B). Nota-se a formação de um gradiente centrífugo de açúcares redutores na galha, substâncias estas detectadas principalmente no córtex adaxial e córtex abaxial adjacente à câmara ninfal (Fig. 5C e D). Proteínas foram observadas no apoplasto e simplasto das células do córtex adaxial e abaxial (Fig. 5E), e apresentaram intensa coloração nos feixes de floema (Fig. 5F). Na galha, lipídios foram detectados no córtex, formando um gradiente centrípeto em direção ao tecido vascular (Fig. 5G). Lipídios foram detectados também nos feixes de floema (Fig. 5H).

## **Histoquímica de substâncias do metabolismo secundário**

### *Tecido não galhado*

Proantocianidinas foram detectadas na epiderme, no parênquima clorofílico e no floema da folha não galhada (Fig. 6A). Alcaloides foram observados nos vacúolos das células do floema da folha não galhada (Fig. 6B). Auxinas foram detectadas nas células do mesofilo e no córtex adaxial da nervura principal (Fig. 6C). EAO foram detectadas em sítios semelhantes aos de auxinas: no parênquima paliçádico, epiderme, lacunoso, floema e paredes das células do córtex da nervura central (Fig. 6D). Compostos fenólicos foram detectados no mesofilo e no floema da folha não galhada (Fig. 6E).

### *Galha*

Proantocianidinas obtiveram intensa marcação na epiderme abaxial das galhas e nas células adjacentes à câmara ninfal (Fig. 7A). Estas substâncias também foram encontradas nas células do córtex adaxial (Fig. 7B). Alcaloides foram detectados nas células do parênquima interfascicular (Fig. 7C e D). Auxinas foram coradas abundantemente no córtex adaxial (Fig. 7E e F) e no córtex adjacente à câmara ninfal. EAO foram detectadas no floema, nas células que revestem a câmara ninfal (Fig. 8A), de forma intensa nas paredes celulares das células do córtex adaxial (Fig. 8B). Compostos fenólicos foram detectados em sítios semelhantes àqueles de auxinas e EAO, ou seja, principalmente no córtex adaxial (Fig. 8C e D).

## **DISCUSSÃO**

A rediferenciação celular (*sensu* Lev Yadun 2003) orquestrada pelo inseto galhador é um processo fundamental durante a morfogênese da galha (Oliveira & Isaias 2010a; Oliveira *et al.* 2016). Entretanto, este processo de rediferenciação pode não acontecer ou ser limitado a um tecido ou grupo de células. Esta limitação no processo de rediferenciação acontece, comumente,

em galhas induzidas por Hemiptera, consideradas estruturalmente simples quando comparadas àquelas induzidas por outros taxa de insetos, especialmente Diptera e Hymenoptera (Bronner 1992; Rohfritsch & Anthony 1992).

Curiosamente, no sistema *Ceropsylla* sp. (Hemiptera: Psyllidae) – *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae), além da hipertrofia celular e hiperplasia do mesofilo da folha não galhada, são observadas a neoformação de tecido vascular e lignificação das paredes das células do córtex abaxial. A neoformação deste tecido é importante, uma vez que estes insetos se nutrem diretamente pelo floema da planta hospedeira (Burckhardt 2005; Carneiro *et al.* 2013; Carneiro & Isaias, 2015). Apesar de ser induzida por um sugador, ser aberta e não possuir tecidos especializados em nutrição, a galha induzida em *P. ramiflora* exibe certa complexidade estrutural, apresentando tecidos lignificados e neoformação de tecido vascular. Nota-se a histolocalização de substâncias químicas sistematicamente distribuídas nos tecidos da galha. Esta compartimentalização e formação de gradiente histoquímico contrasta com a baixa complexidade estrutural da galha foliar induzida por *Ceropsylla* sp. em folhas de *P. ramiflora*.

### **Alterações anatômicas induzidas pelo inseto galhador**

A modificação do parênquima é uma resposta comum durante o desenvolvimento de galhas (Kraus *et al.* 2009; Arduin *et al.* 2005; Moura 2009; Oliveira & Isaias 2010a e b); Isaias *et al.* 2011; Carneiro *et al.* 2014; Isaias *et al.* 2014). No sistema *Ceropsylla* sp. – *P. ramiflora* a galha se forma principalmente pela hipertrofia das células do parênquima paliçádico, que se alongam anticlinalmente, dando origem ao córtex adaxial. O córtex abaxial, que também se alonga anticlinalmente, é originado a partir do parênquima lacunoso. O alongamento anticlinal das células do córtex adaxial, e em menor escala das células do córtex abaxial, é responsável pela forma intralaminar da galha foliar em *P. ramiflora*. Já é claro na literatura que a hipertrofia celular nos diferentes extratos de tecidos das galhas são fatores importantes que definem a

morfologia externa de cada morfotipo de galha (Oliveira & Isaias 2010a, Isaias *et al.* 2011; Magalhães *et al.* 2014; Carneiro *et al.* 2014; Isaias *et al.* 2014). O processo de alongamento celular, dentre outros aspectos, depende de alterações nas propriedades da parede celular, especialmente no grau de metil-esterificação das pectinas (Albersheim *et al.* 2011). Diferenças no grau de metil-esterificação das pectinas, bem como a disposição das microfibrilas de celulose têm sido reportadas na literatura como fundamentais para o processo de desenvolvimento de galhas (Formiga *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2014a; Carneiro & Isaias 2015). A dinâmica entre estas alterações nos padrões de desenvolvimento do tecido atua de maneira a estabelecer o morfotipo da galha.

O tecido vascular na galha localiza-se entre o córtex adaxial e abaxial, onde se destacam diversos feixes vasculares neoformados se interligam. Os feixes vasculares ficam próximos à câmara ninfal e voltados para a superfície ventral do inseto galhador. Esta característica anatômica da galha facilita a alimentação do inseto, uma vez que ele é sugador de floema. Também, a neoformação e distribuição de feixes vasculares supre a demanda hídrica do tecido da galha (Lalonde & Shorthsouse 1983; Dorchim *et al.* 2002; Castro *et al.* 2012). Esta demanda hídrica permite também o processo de alongamento celular durante o desenvolvimento da galha (Meyer & Boyer 1972; Marty 1999), além do aporte nutricional adequado para o metabolismo do (Bronner 1992; Isaias *et al.* 2011; Isaias *et al.* 2014; Carneiro & Isaias 2015).

A sustentação mecânica dos tecidos da galha é suportada pela lignificação das camadas de células laterais do córtex abaxial lateral da galha (Oliveira *et al.* 2006; Carneiro *et al.* 2014). Lignificação esta que provavelmente atua como defesa contra inimigos naturais (Stone & Schönrogge 2003; Oliveira *et al.* 2006) e mecanismo de dissipação de estresse (Isaias *et al.* 2015). O estresse pode ser abiótico ou biótico (Lee *et al.* 2007), e frequentemente ocorre nos mesmos locais onde há o acúmulo de EAO (espécies ativas de oxigênio), como o proposto por

Carneiro *et al.* (2014) para as galhas de *Nothotrioza myrtoidis* em *Pisidum myrtoides*. Assim, a lignificação seria dependente da produção de EAO local ou na camada de tecido adjacente, promovendo um eficiente mecanismo de dissipaçāo de estresse e, consequentemente, permitindo estabelecimento do inseto galhador (Isaias *et al.* 2015). Entretanto, nas galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora* o acúmulo de EAO, bem como fenólicos e proantocianidinas ocorre na região adjacente àquela na qual as paredes celulares se lignificam. A diferenciação destes tecidos lignificados, pode ser associada à defesa contra inimigos naturais (Stone & Schönrogge 2003). Contudo, acreditamos que neste sistema a lignificação não está relacionada à defesa contra inimigos naturais, uma vez que a galha é aberta.

### **Estabelecimento do gradiente funcional**

Ainda que seja pouca, a complexidade morfológica da galha de *Ceropsylla* sp. induzida em folhas de *P. ramiflora* não segue os padrões propostos por Bronner (1992) e Mani (1964) para galhas induzidas por insetos sugadores. A hipertrofia celular e a hiperplasia, do tecido são os principais processos observados, em galhas menos complexas. Segundo estes autores, nestes casos, não há grandes alterações nos tecidos da planta hospedeira, como a notória formação de tecidos de nutrição e de reserva, como observa-se em galhas de Cecidomyiidae e Cynipidae (e.g. Bronner 1992). Embora o inseto sugador *Ceropsylla* sp. modifique, estruturalmente, pouco os tecidos da hospedeira, nota-se a formação de um acentuado gradiente histoquímico. Estas substâncias do metabolismo primário e secundário detectadas evidenciam a habilidade do galhador em manipular o metabolismo da planta em virtude de seu estabelecimento e desenvolvimento. Isso garante um alto valor adaptativo da galha para o inseto (Price *et al.* 1987; Stone & Schönrogge 2003).

A formação de um gradiente estrutural e/ou químico é dependente do estabelecimento de um gradiente de estresse, formado pelo acúmulo de EAO nos tecidos da galha (Oliveira *et*

*al. 2016). Na galha induzida por Ceropsylla sp. em P. ramiflora o gradiente de estresse gerado pelas EAO é responsável pelo estabelecimento do gradiente histoquímico, como já observado por Carneiro *et al.* (2014) em galhas de insetos sugadores. De fato, o acúmulo de EAO (Isaias & Oliveira 2012; Oliveira *et al.* 2014b; Isaias *et al.* 2015), é o gatilho para que ocorra as alterações no metabolismo (Del Río & Puppo 2009) e a morfogênese desta estrutura (Isaias *et al.* 2014).*

De acordo com Bolwell *et al.* (2002), Torres *et al.* (2002) e Bindschedler *et al.* (2006), EAO são produzidos em ondas oxidativas (*bursts*) como resposta ao ataque de patógenos ou por eventos bioquímicos durante a maturação celular. Uma vez acumulados no tecido, exercem um papel adverso ao de substâncias antioxidantes (Mitler *et al.* 2004), estimulam a lignificação das paredes internas das células (Gottlieb *et al.* 1993), intensificam o estresse oxidativo no tecido (Schönrogge *et al.* 2000; Oliveira & Isaias, 2010b; Isaias *et al.* 2011) e podem atuar como sinalizadores em diversos processos celulares (Del Río & Puppo 2009). Para controlar os níveis de EAO e proteger as células das condições de estresse, as plantas utilizam enzimas dissipadoras (superóxido dismutases, catalases e peroxidases) e antioxidantes de baixa massa molecular como ascorbato, tocoferóis e compostos fenólicos (Blokhina *et al.* 2003). *Pouteria ramiflora* sofre um grande estresse oxidativo devido à formação da galha, que causa importantes modificações nos sistemas de tecidos da folha não galhada. O mecanismo de dissipação do estresse usado nos tecidos desta galha são a lignificação e o investimento no acúmulo de fenólicos. Ambos os processos são classicamente citados na literatura como controladores do excesso de EAO (Gottlieb 1993).

### **Histoquímica de metabólitos primários**

Insetos galhadores alteram o metabolismo da planta hospedeira de maneira a obterem alimentação de qualidade (Bronner 1992; Motta *et al.* 2005). No córtex interno, próximo à

câmara larval, geralmente há um aumento na concentração de substâncias nutricionais (Isaias *et al.* 2014), enquanto no córtex externo são detectados compostos secundários, relacionados à defesa. Nas galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora* o gradiente de substâncias do metabolismo primário ocorre principalmente em direção a câmara ninfal, com exceção dos açúcares redutores que apresentam um gradiente centrífugo em relação a câmara larval. No córtex abaxial da galha, especialmente nas laterais da câmara ninfal, não há acúmulo de metabólitos primários. A formação de um gradiente histoquímico já foi anteriormente reportada na literatura para galhas induzidas por diferentes taxa de insetos (Oliveira *et al.* 2006; Oliveira & Isaias 2010a e b; Oliveira *et al.* 2011a). Estes recursos disponíveis próximos à câmara ninfal, ou armazenados nos tecidos mais externos, seriam utilizados para a manutenção da maquinaria celular da galha (Oliveira *et al.* 2006).

A formação de um gradiente de amido está, geralmente, associada à formação de tecido de reserva em galhas induzidas por Diptera: Cecidomyiidae (Bronner 1992). Em galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora*, há acúmulo de amido no tecido adjacente superior à câmara ninfal e ao redor do tecido vascular da galha. Embora não seja comum, o acúmulo de amido em galhas induzidas por insetos sugadores já foi anteriormente reportado em galhas induzidas por *Euphalerus ostreoides* (Psyllidae) em *Lonchocarpus muehbergianus* (Fabaceae) (Oliveira *et al.* 2006), *Pseudophacopteron aspidospermi* (Psyllidae) em *Aspidosperma australe* (Apocynaceae) (Oliveira *et al.* 2010) e em três morfotipos de galhas em *Pistacia terebinthus* Álvarez *et al.* 2009). Grãos de amido constituem uma reserva insolúvel que deve ser quebrada em açúcares menores para serem então metabolizados (Koch 2004; Heldt & Piechulla 2010). Assim, enzimas como invertase e sacarose sintase catalisam a quebra deste polissacarídeo em monossacarídeos como glicose e frutose, disponibilizando – os para vários processos metabólicos (Koch 1996; Smeekens 2000; Kock & Zeng 2005). Dentre estes processos está a síntese de ácido abscísico, auxinas e citocininas, hormônios atrelados a

crescimentos atípicos em vegetais (Koch 2004). A presença de açúcares redutores concomitante ao amido indica alta atividade destas enzimas na galha intralaminar de em *P. ramiflora*. A atividade da sacarose sintase e invertase aumentam a disponibilidade de açúcares para a respiração (Roitsch & Gonzalez 2004) e consequentemente os níveis de proteínas (Sturm & Tang 1999; Sturm 1999).

Um fator potencial que pode influir no estabelecimento de galhas pode ser a concentração e fracionamento de proteínas nos tecidos das plantas hospedeiras. Detoni *et al.* (2011) sugeriram que as proteínas podem estar envolvidas com o grau de susceptibilidade de plantas ao ataque de insetos herbívoros. Proteínas geralmente são associadas com a formação de um tecido nutritivo e alto metabolismo celular da galha (Bronner 1992; Oliveira *et al.* 2010; Schorogge *et al.* 2000). O acúmulo de proteínas no sistema *Ceropsylla* sp.-*P. torta* parece estar relacionado ao estresse oxidativo provocado pelo galhador (Oliveira *et al.* 2010). De fato, Schörrogge *et al.* (2000) propuseram uma relação entre um proteínas e o estresse respiratório provocado pelo galhador. Resultados semelhantes foram encontrados para outros sistemas galhador-planta hospedeira nos Neotropicos (Oliveira *et al.* 2010; Oliveira & Isaias 2010a; b). Neste estudo, os sítios de síntese açúcares, proteínas e EAO são os mesmos, indicando alto metabolismo celular no córtex adaxial, distante da câmara ninfal.

A folha não galhada de *P. ramiflora* possui grande quantidade de ductos laticíferos, nos quais se detectou presença marcante de lipídios. Tais ductos são aparentemente suprimidos na galha. Lipídios se configuraram como importante reserva energética que não é prontamente utilizada pelos insetos galhadores, embora estejam relacionados com o metabolismo de nutrientes essenciais para o desenvolvimento e manutenção da galha (Buchanan *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2006; Moura *et al.* 2008; Oliveira & Isaias 2010b). Além disso são precursores de importantes componentes do metabolismo da planta (Buchanan *et al.* 2000). Segundo Bronner (1992), o acúmulo de lipídios na galha pode significar um resultado da hiponutrição

do tecido, e o acúmulo de amido, por sua vez, à hipernutrição. Entretanto, em galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora*, o acúmulo de lipídios pode simplesmente refletir o metabolismo intrínseco da planta hospedeira.

### **Histoquímica de metabólitos secundários**

Bedetti *et al.* (2013) mostraram que os sítios de hipertrofia celular e hiperplasia dos tecidos, em galhas foliares de *Piptadenia gonocantha*, estão associados a presença de auxinas, seus precursores imediatos, fenólicos e EAO. De acordo com estes autores, compostos fenólicos podem atuar em consonância com reguladores de crescimento, estabelecendo o padrão de desenvolvimento da galha. Altas concentrações de fenóis nos tecidos de galhas estão relacionadas com o alto índice de crescimento deste novo órgão (Abrahamson *et al.* 1991; Hori 1992). Em galhas induzidas em *Pistacia terebinthus* e *Lonchocarpus muehbergianus*, há formação de um gradiente de acúmulo de fenólicos, associado ao estresse gerado e à produção de EAO (Álvarez *et al.* 2009; Isaias *et al.* 2011). Ambos, fenólicos e EAO, estão associados a processos de divisão e expansão celular (Del Río & Puppo 2009; Bedetti *et al.* 2013). Em galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora*, há sobreposição de fenólicos, auxinas e EAO principalmente no córtex adaxial. Esta característica, evidencia o sítio com maior grau de hipertrofia detectado.

Compostos fenólicos estão associados ao processo de rediferenciação de feixes vasculares (Aloni *et al.* 2001; Lev Yadun 2003). Uma vez que *Ceropsylla* sp. possui hábito alimentar sugador, a diferenciação de feixes vasculares aumentaria o aporte de nutrientes para seu desenvolvimento. Compostos fenólicos são acumulados no córtex adaxial da galha, atuando, em conjunto com os alcaloides, na defesa química contra inimigos naturais (Cornell 1983; Hartley 1998). Outro grupo de compostos secundários detectados neste sistema, as proantocianidinas (flavonoides), exibe uma gama de funções como coordenação do transporte

de auxinas (Murphy *et al.* 2000; Peer & Murphy 2007), e controle de EAO (Buer *et al.* 2010). Assim como os fenólicos, as proantocianidinas podem atuar como sinalizadores para a escolha do sítio de oviposição na hospedeira e proteção contra raios ultravioleta, como proposto por Oliveira *et al.* (2006) no sistema *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera) – *L. muelhbergianus* (Fabaceae).

## CONCLUSÕES

O inseto galhador *Ceropsylla* sp. induz galhas foliares anatomicamente simples em *P. ramiflora*. A forma intralaminar desta galha se deve ao processo de alongamento celular anticlinal, principalmente do parênquima paliçádico da folha não galhada, que alonga anticlinalmente para formar o córtex adaxial da galha. Uma vez que o inseto é sugador, não há formação de tecido nutritivo ou de reserva na galha, porém nota-se a neoformação de tecido vascular que confere maior aporte nutricional ao galhador. Mesmo sendo considerada uma galha de baixa complexidade estrutural, foram observadas intensas alterações químicas no tecido. Neste sistema, pela primeira vez, foi observada a formação de um gradiente centrífugo de açúcares redutores. Fenólicos e flavonoides localizados nos tecidos da galha, em um gradiente centrífugo, podem atuar no mecanismo de dissipaçāo de EAO, assim como o processo de lignificação detectado nas laterais do córtex abaxial. Estas moléculas geradoras de estresse, junto com fenólicos e auxinas são responsáveis pelo alongamento das células no córtex da galha.

## REFERÊNCIAS

Abrahamson WG; McCrea KD; Whitwell AJ; Vernieri LA. 1991. The role of phenolics in goldenrod ball gall resistance and formation. *Biochemical Systematics And Ecology* 19(8): 615-622. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(91\)90077-D](https://doi.org/10.1016/0305-1978(91)90077-D)

- Albersheim P; Darvill A; Roberts K; Sederoff R; Staehelin A. 2011. Plant cell walls: from chemistry to biology. Garland Science, New York.
- Aloni R. 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 22–34. <https://doi.org/10.1007/s003440010001>
- Álvarez R; Encina A; Hidalgo NP. 2009. Histological aspects of three *Pistacia terebinthus* galls induced by three different aphids: *Paracletus cimiciformis*, *Forda marginata* and *Forda formicaria*. *Plant Science*. 176(2): 303-314.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.11.006>
- Arduin M; Fernandes GW; Kraus JE. 2005. Morphogenesis of galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) leaves. *Braz. J. Biol.* 65(4): 559-571. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842005000400002>
- Bedetti CS; Ferreira BG; Castro NM; Isaias RMS; 2013. The influence of parasitoidism on the anatomical and histochemical profiles of the host leaves in a galling Lepidoptera–*Bauhinia ungulata* system. *Revista Brasileira de Biociências* 11: 242-249.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074400>
- Bedetti CS; Modol, LV; Isaias RMS. 2014. The role of phenolics in the control of auxin in galls of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae: Mimosoideae). *Biochemical Systematics and Ecology* 55: 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.02.016>
- Blokhina O; Virolainen E; Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*. 91: 179-194.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Bindschedler LV; Dewdney J; Blee KA; Stone JM; Asai T; Plotnikov J; Bolwell, GP. 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen

- resistance. *Plant Journal* 47(6): 851-863. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02837.x>
- Bolwell GP; Bindschedler LV; Blee KA; Butt VS; Davies DR; Gardner SL; Gerrish C; Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53: 1367-76.
- Bronner R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse, J.D., Rohfritsch O. (Eds.), *Biology of Insect Induced Galls*. Oxford University Press, New York, pp. 118-140.
- Buchanan BB; Gruissem W; Jones RL. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville. American Society of Plant Physiologists. 1367p.
- Buer CS; Imin N; Djordevic MA; 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 98-111. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00905.x>
- Bukatsch F. 1972. Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.
- Burckhardt D. 2005. Biology, ecology, and evolution of gall-inducing psyllids (Hemiptera: Psylloidea). In: Raman, A., Schaefer C. W., & Withers T. M. (eds) *Biology, ecology, and evolution of gall- inducing arthropods*. Science Publishers, New Hampshire, USA, pp. 143–158.
- Carneiro RGS; Burckhardt D; Isaias RMS. 2013. Biology and systematics of gall- inducing triozids (Hemiptera: Psylloidea) associated with *Psidium* spp. (Myrtaceae). *Zootaxa* 3620(1): 129-146. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3620.1.6>
- Carneiro RGS; Castro AC; Isaias RMS. 2014. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany* 92: 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.011>

- Carneiro RGS; Isaias RMS. 2015. Gradients of metabolite accumulation and redifferentiation of nutritive cells associated with vascular tissues in galls induced by sucking insects. *AoB Plants* 7: 1-16. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv086>
- Castro AC; Oliveira DC; Moreira ASFP; Lemos Filho JP; Isaias RMS. 2012. Source sink relation- ship and photosynthesis in the horn-shaped gall and its host plant *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). *South African Journal of Botany*. 83: 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.08.007>
- Cornell HV. 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the cynipinae (Hymenoptera): why and how? *American Midland Naturalist* 110: 225-234. <https://doi.org/10.2307/2425263>
- Dalponte JC; Lima ES. 1999. Disponibilidade de frutos e a dieta da *Pseudalopex vetulus* (Carnívora - Canidae) em um cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 326-332. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041999000500015>
- Del Río LA; Puppo A. 2009. (eds). *Reactive oxygen species in plant signaling*. Springer, Berlin.
- Detoni ML; Vasconcelos EGV; Maia ACRG; Gusmão MAN; Isaias RMS; Soares GLG; Santos JC; Fernandes GW. 2011. Protein content and electrophoretic profile of insect galls on susceptible and resistant host plants of *Bauhinia brevipes* Vogel. (Fabaceae). *Australian Journal of Botany* 59: 509 -514. <https://doi.org/10.1071/BT11104>
- Dorchin N; Freidberg A; Aloni R. 2002. Morphogenesis of stem gall tissues induced by larvae of two cecidomyiid species (Diptera : Cecidomyiidae) on *Suaeda monoica* (Chenopodiaceae). *Canadian Journal of Botany* 80(11): 1141–1150. <https://doi.org/10.1139/b02-104>

- Feucht W; Schimid PPS; Christ E. 1986. Distribution of flavanols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *J. Plant Physiol.* 25: 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80237-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80237-1)
- Formiga AT; Oliveira DC; Ferreira BG; Magalhães; TA; Castro AC; Fernandes GW; Isaias RMS. 2013. The role of pectic composition of cell walls in the determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma* 250(4): 899-908. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0473-8>
- Gahan PB. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry. Academic Press, London.
- Gibson SI. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8(1): 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.11.003>
- Gottlieb OR; Kaplan MAC. 1993. Phytochemical evolution: the redox theory. *Nat. Prod. Lett.* 2: 171-176. <https://doi.org/10.1080/10575639308043804>
- Hartley, SE. 1998. The chemical composition of plant galls: Are level of nutrients and secondary compounds controlled by the gall former? *Oecologia* 113: 492-501. <https://doi.org/10.1007/s004420050401>
- Heldt HW; Piechulla B. 2011. Plant Biochemistry. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384986-1.00022-3>
- Higton RN, Mabberly DJ. 1994. A willow gall from the galler's point of view. In: Willian MAJ (ed) *Plant galls – organisms, interaction, populations*. Clarendon, Oxford, pp 301-312.
- Hori K. 1992. Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In: Shorthouse JD; Rohfritsch O (eds). *Biology of insect induced galls*. New York, NY, USA: Oxford University Press, 157-170.

- Isaias RMS; Oliveira DC; Carneiro RGS. 2011. Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany (Ottawa Print)* 89: 581-592. <https://doi.org/10.1139/b11-048>
- Isaias RMS; Oliveira DC. 2012. Gall phenotypes – product of plant cells defensive responses to the inducers attack. In: Mérillon JM, Ramawat KG (eds) *Plant defence: biological control, progress in biological control* 12: 273–290. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0_11)
- Isaias RMS; Oliveira DC; Carneiro RGS; Kraus JE. 2014. Developmental anatomy of galls in the Neotropics: arthropods stimuli versus host plant constraints. In: *Neotropical insect galls*. Santos & Fernandes Eds.
- Isaias RMS; Oliveira DC; Moreira ASFP; Soares GLG; Carneiro RGS. 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1850: 1509 – 1517.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>
- Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137–138.
- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.509>
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 235- 246.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>

- Koch KE; Zeng Y 2002. Molecular approaches to altered C partitioning: gene for sucrose metabolism. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127: 474-483.
- Kraus JE; Arduin M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR.
- Kraus JE. 2009. In: Tissot-Squalli ML (ed) Galhas: morfogênese, relações ecológicas e importância econômica. *Interações Ecológicas & Biodiversidade* Editora Injuí, Ijuí, pp 109-140.
- Lalonde RG; Shorthouse JD. 1982. Exit strategy of *Urophora cardui* (Diptera: Tephritidae) from its gall on Canada thistle. *Can. Entomol.* 114: 873-878.  
<https://doi.org/10.4039/Ent114873-9>
- Lee BR; Kim KY; Jung WJ; Avice JC; Ourry A; Kim TH. 2007. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1271-1279. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl280>
- Leopold AC; Plummer TH. 1961. Auxin-phenol complexes. *Plant Physiology* 36: 589-591.  
<https://doi.org/10.1104/pp.36.5.589>
- Lev Yadun S. 2003. Stem cells in plants are differentiated too. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 93-100
- Lima SC; Rosa R; Feltran Filho A. 1989. Mapeamento do uso do solo no município de Uberlândia-MG, através de imagens TM/LANDSAT. *Sociedade & Natureza* 1: 127-145.
- Lorenzi, H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa, 352p.
- Mani MS. 1964. The ecology of plant galls. The Hague: Junk, 640 pp.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-6230-4>
- Magalhães TA; Oliveira DC; Suzuki AYM; Isaias, RMS. 2014. Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae*

(Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Protoplasma* 251(4): 747-753.

<https://doi.org/10.1007/s00709-013-0574-z>

Marty F. 1999. Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587-600. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.587>

Meyer RF; Boyer JS. 1972. Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. *Planta* 108(1): 77-87.

<https://doi.org/10.1007/BF00386508>

Mazia D; Brewer PA; Alfert M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.* 104: 57-67.

<https://doi.org/10.2307/1538691>

Mittler R; Vanderauwera S; Gollery M; Van Breusegen F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 419-424.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>

Motta LB, Kraus JE, Salatino A, Salatino MLF. 2005. Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochem Syst Ecol* 33: 971-981.

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.02.004>

Moura MZD; Soares GLG; Isaias RMDS. 2009. Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina: Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 32(2): 271-282. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000200007>

Murphy A; Peer A; Taiz L. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-324. Nascimento, New York, 285p.

O'Brien TP; Feder N; McCully ME. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

Oliveira DC; Christiano JDGS; Soares GLG; Isaias RMS. 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador

*Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). Revista Brasileira de Botânica 29(4): 657-667. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000400015>

Oliveira DC; Magalhães TA; Carneiro RGS; Alvim MN Isaias RMS. 2010. Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma* 242(1-4): 81-93. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0128-6>

Oliveira DC; Isaias; RMS. 2010a. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *S. Afr. J. Bot.* 76: 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.011>

Oliveira DC, Isaias RMS. 2010b. Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Sci.* 178: 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.002>

Oliveira DC, Carneiro RGS, Magalhães TA, Isaias RMS. 2011a. Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma* 248: 829-837. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0258-x>

Oliveira DC; Isaias RMS; Moreira ASFP; Magalhães TA; Lemos Filho JP. 2011b. Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis? *Plant Science (Limerick)* 180: 489-495. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.005>

Oliveira DC; Magalhães TA; Ferreira BG; Teixeira CT; Formiga AT; Fernandes GW; Isaias RMDS. 2014a. Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall. *PloS One* 9(4): 1-8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094588>

Oliveira DC; Moreira ASFP; Isaias RMS. 2014b. Functional gradients in insect gall tissues: studies on neotropical host plants. In: Santos JC; Fernandes GW (eds.), Springer, 550pp.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-017-8783-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8783-3_3)

Oliveira DC; Isaias RMS; Fernandes GW; Ferreira BG; Carneiro RGS; Fuzaro L. 2016.

Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology* 84: 103-113.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.012>

Peer W; Murphy A. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* 12: 556-563. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.003>

Price PW; Fernandes GW; Waring GL. 1987. Adaptive nature of insect gall. *Environmental Entomology*. 16: 15-24. <https://doi.org/10.1093/ee/16.1.15>

Rohfritsch O; Anthony M. 1992. Strategies on gall induction by two groups of homopterans, in: Shorthouse JD; Rohfritsch O (Eds.), *Biology of Insect-induced Galls*, Oxford University Press, New York, pp. 102-117.

Roitsch T; González MC. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9(12): 606-613. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.10.009>

Rohfritsch, O. 1992. Patterns in Gall Development. In: Shorthouse, J.D., Rohfritsch, O. (Eds.), *Biology of Insect Induced Galls*. Oxford University Press, New York, pp. 118-140.

Rossetti S; Bonnatti PM. 2001. In situ histochemical monitoring of ozone and TMV induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiology Biochemistry*. 39: 433-442.  
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01250-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01250-5)

Sass JE. 1951. *Botanical microtechnique*. 3ed. Iowa: State Press.

- Schönrogge K; Harper L; JLichtenstein CP. 2000. The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera : Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant Cell and Environment* 23: 215-222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00543.x>
- Shorthouse JD; Rohfritsch O. 1992. *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, 285p.
- Shorthouse JD; Wool D; Raman A. 2005. Gall-inducing insects - Nature's most sophisticated herbivores. *Basic Appl. Ecol.* 6(5): 407-411. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2005.07.001>
- Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51(1): 49-81.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.49>
- Stone, GN; Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 512-522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Sturm A. 1999. Update on Biochemistry Invertases. Primary Structures, Functions , and Roles in: *Plant Development and Sucrose Partitioning*. *Plant Physiology* 121(September): 1-7.  
<http://doi.org/10.1104/pp.121.1.1>
- Sturm A; Tang, G. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning 4(10): 401-407.
- Svendsen AB; R Verpoorte. 1983. *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- Torres MA; Dangl JL; Jones JDG. 2002. *Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD* AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(1): 517-522.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.012452499>
- Vecchi C; Menezes NL; Oliveira DC; Ferreira BG; Isaias RMS. 2013. The redifferentiation of nutritive cells in galls induced by Lepidoptera on *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn.

reveals predefined patterns of plant development. *Protoplasma* 250(6): 1363-1368.

<http://doi.org/10.1007/s00709-013-0519-6>

Zentgraf U. 2007. Oxidative stress and leaf senescence, in: G. Susheng (Ed.), *Senescence Processes in Plants*, Blackwell Publishing Ltd., CRC Press, New York, pp. 69-86.

<https://doi.org/10.1002/9780470988855.ch4>

Tab. 1: Testes histoquímicos usados para detecção de compostos estruturais, metabólitos primários e secundários e espécies ativas de oxigênio. Todos os testes foram realizados com material recém-coletado de folhas não galhadas e galhas de *Pouteria ramiflora*.

Tab. 2: Histolocalização química em folhas não galhadas de *Pouteria ramiflora* e galhas de *Ceropsylla* sp.

Fig. 1: Aspecto geral da galha de *Pouteria ramiflora* induzida por *Ceropsylla* sp. A) Ramo de *Pouteria ramiflora* com folhas galhadas; estrutura intralaminar da galha no detalhe (barra: 0,5 mm); B) Ninfa de *Ceropsylla* sp., em seu terceiro instar, com o aparelho bucal (estilete) do inseto em evidência (seta); C) Projeção adaxial da galha com fissuras; D) Superfície abaxial da galha mostrando a secreção cerosa produzida no dorso do indutor.

Fig. 2: Perfil anatômico e estrutural da folha não galhada de *Pouteria ramiflora*. A) Aspecto geral da nervura principal mostrando feixe vascular do tipo bicolateral; B) Representação esquemática da nervura central; C) Mesofilo com duas a três camadas de parênquima paliçádico e três a cinco de lacunoso, além de nervura de menor calibre, cutícula espessa pode ser observada na superfície adaxial da epiderme; D) Detalhe anatômico da nervura principal; E) Teste histoquímico com floroglucina acidificada mostrando ligninas no xilema e fibras do floema (seta); F) Detalhe de nervura secundária no mesofilo da folha não galhada indicando a presença de ligninas no xilema e fibras (seta); G) Teste histoquímico com vermelho de rutênio para pectinas na nervura principal da folha não galhada; seta indicando intensa reação no floema e colênquima (seta); H) Pectinas no mesofilo da folha não galhada; seta indicando intensa presença na parede periclinal interna da epiderme adaxial. Ad: epiderme adaxial; Co:

colênquima; Fl: floema; Xi: xilema; Ns: nervura secundária; Ff: fibras do floema; Cx: Córtext; Cu: cutícula; Ab: epiderme abaxial; Pp: parênquima paliçádico; Pl: parênquima lacunoso.

Fig. 3: Aspecto anatômico e estrutural da galha foliar em *Pouteria ramiflora* induzidas por *Ceropsylla* sp. A) Anatomia da galha intralaminar mostrando a distribuição dos tecidos em relação a câmara ninfal; B) Representação esquemática da galha; C) Detalhe do córtex da galha mostrando o alongamento celular anticlinal no córtex adaxial e lignificação no córtex abaxial; D) Detalhe do feixe vascular neoformado na galha ladeado pelo parênquima interfascicular; E) Córtext abaxial da galha mostrando feixes vasculares e células menores de forma irregular adjacentes a câmara ninfal; F) Teste histoquímico com floroglucina acidificada com reação positiva para ligninas no córtex abaxial da galha (seta) e feixes vasculares; G) Pectinas na galha, principalmente no floema (setas); H) Fissura suberizada que pode ocorrer na superfície da galha (seta). Ad: epiderme adaxial; Cad: córtex adaxial; Fv: feixe vascular; Cab: Córtext abaxial; Cn: Câmara ninfal; Ra: Região adjacente à câmara ninfal dô córtex abaxial; Rl: Região lateral do córtex abaxial; Pi: Parênquima interfascicular.

Fig. 4: Histoquímica de metabólitos primários em folhas de *Pouteria ramiflora*. A) Amido na região central da nervura principal (seta); B) Açúcares redutores no parênquima paliçádico da folha não galhada (seta); C) Proteínas no floema da nervura principal (seta); D) Gotículas de lipídios no mesofilo (seta), e na cutícula da folha não galhada.

Fig. 5: Histoquímica de metabólitos primários na galha foliar em *Pouteria ramiflora* induzidas por *Ceropsylla* sp. A) Amido na porção superior do córtex abaxial, especialmente próximos aos feixes vasculares adjacentes à câmara ninfal; B) Detalhe dos grãos de amido (seta); C) Gradiente centrífugo de açúcares redutores no córtex adaxial da galha; D) Detalhe do córtex da

galha com açúcares redutores (seta); E) Gradiente centrífugo de proteínas no córtex da galha; F) Detalhe do feixe vascular na galha com intensa presença de proteínas (seta). G) Gradiente centrípeto de lipídios em relação aos feixes vasculares na galha; H) Detalhe de feixe vascular na galha com intensa presença de lipídios (seta).

Fig.6: Histoquímica de metabólitos secundários, auxinas e EAO (espécies ativas de oxigênio) em folhas de *Pouteria ramiflora*. A) Proantocianidinas no mesofilo e floema da folha não galhada (seta); B) Alcaloides nas fibras da nervura principal da folha não galhada (seta); C) Auxinas na folha não galhada (seta); E) EAO na folha não galhada (seta); E) Compostos fenólicos no parênquima paliçádico da folha não galhada (seta).

Fig. 7: Histoquímica de metabólitos secundários, auxinas e EAO (espécies ativas de oxigênio) de galhas em *Pouteria ramiflora* induzidas por *Ceropsylla* sp A) Proantocianidinas na galha; B) Detalhe do córtex superior da galha contendo proantocianidinas (seta); C) Alcaloides na galha; D) Detalhe do córtex interfascicular da galha contendo alcaloides (seta); E) Auxinas na galha; F) Detalhe do córtex superior da galha contendo intensa presença de auxinas (seta).

Fig. 8: Histoquímica de fenólicos e EAO (espécies ativas de oxigênio) de galhas em *Pouteria ramiflora* induzidas por *Ceropsylla* sp. A) EAO na galha; setas indicam regiões com marcação mais intensa para EAO; B) Detalhe do córtex superior da galha indicando forte marcação nas paredes celulares; C) Compostos fenólicos na galha; D) Detalhe do córtex superior contendo compostos fenólicos.

Tab. 1

Teste/Substância reagente	Procedimento	Referências
<i>Compostos estruturais</i>		
Reagente Wiesner – Ligninas.	Imersão das amostras em Floroglucinol a 2% em solução acidificada durante 5 minutos.	Johansen (1940)
Reagente Vermelho de Rutênio – Pectinas.	Imersão das amostras reagente durante 15 minutos.	Jensen (1965)
<i>Compostos primários e secundários</i>		
Reagente Lugol – Amido.	Imersão das amostras em Iodeto de potássio iodado a 1% durante 5 minutos.	Johansen (1940)
Reagente Fehling – Açúcares redutores.	Imersão das amostras em partes iguais de “A” (II sulfato cúprico a 6,93% m:v) e “B” (tartrato de sódio e potássio a 34,6% e hidróxido de sódio a 12% m:m:v) aquecidas até atingir a pré – ebulação.	Sass (1951)
Reagente Azul Mercúrio de Bromofenol – Proteínas.	Imersão das amostras em azul de bromofenol a 0,1% em uma solução saturada de cloreto de magnésio em álcool a 70% durante 15 minutos.	Mazia <i>et al.</i> (1953)
Reagente Sudan III – Lipídios.	Imersão das amostras em solução saturada de Sudan III em álcool a 70% durante 5 minutos.	Sass (1951)
Reagente Sulfato ferroso – Fenólicos totais.	Imersão das amostras em sulfato ferroso a 2% formalina a 10% Durante 10 minutos.	Gahan (1984)
Reagente DMACA – Proantocianidinas	Fixação das amostras em cafeína – benzoato de sódio por 5 minutos, e imersão em <i>p</i> – dimetilaminacinaldeído por 2 horas.	Feucht <i>et al.</i> (1986)
Reagente Dragendorff – Alcaloides.	Imersão das amostras no corante durante 15 minutos. Lavagem rápida em Nitrito de Sódio a 5%.	Svendsen & Verpoorte (1983)
Reagente Ehrlich – Auxinas.	Imersão das amostras em <i>p</i> – dimetilaminacinaldeído em 1 M de HCl;(w:v) durante 15 minutos.	Leopold & Plummer (1961)
<i>Espécies ativas de oxigênio (EAO)</i>		
Reagente DAB	Imersão das amostras em 3,3' diaminobenzidina durante 20 minutos no escuro em refrigeração. Lavagem rápida e montagem em água destilada.	Rossetti & Bonnatti (2001)

Tab. 2

Substâncias detectadas	Sítios de reação	
	Folha	Galha
Ligninas	Fibras do floema; xilema; colênquima (Fig. 2 E e F)  Nervura central; floema; colênquima; porção interna das epidermes; discretamente no parênquima lacunoso (Fig. 2G e H)	Gradiente homogêneo no córtex abaxial; xilema da galha (Fig. 3F)  Gradiente centrípeto (mais intenso no córtex superior); tecido vascular; tecido perivascular; floema próximo à câmara ninfal (Fig. 3G)
Pectinas		
Amido	Porção central da nervura central (Fig. 4A)	Gradiente centrípeto; parênquima perivascular e córtex inferior (Fig 5A e B)
Açúcares redutores	Epiderme e células adjacentes; parênquima paliçádico (Fig. 4B)	Gradiente centrífugo em direção à epiderme adaxial; Células adjacentes à câmara ninfal (Fig. 5C e D)
Proteínas	Floema; Parênquima paliçádico e lacunoso, sendo mais intenso no último (Fig. 4C)	Gradiente levemente centrífugo em direção à epiderme adaxial; floema dos feixes vasculares (Fig. 5E e F)
Lipídios	Parênquima paliçádico; laticíferos; cutícula. (Fig. 4D)	Gradiente centrípeto em direção ao tecido vascular e perivascular; floema dos feixes vasculares; cutículas (Fig. 5G e H)
Proantocianidinas	Floema; epidermes; parênquima paliçádico e discretamente no lacunoso (Fig. 6A)	Gradiente centrífugo no córtex adaxial em direção à epiderme adaxial; epiderme abaxial e células que reveste a câmara ninfal (Fig. 7A e B)
Alcaloides	Porção central da nervura central (Fig. 6B)	Parênquima perivascular; gradiente que se intensifica a partir da câmara ninfal em direção ao tecido vascular (Fig. 7C e D)
Auxinas	Parênquima paliçádico e lacunoso; epiderme (Fig. 6C)	Côrte adaxial; parênquima perivascular; células que revestem a câmara ninfal (Fig. 7E e F)
EAO	Floema; parênquima paliçádico e lacunoso; epidermes (Fig. 6D)	Côrte adaxial; epidermes; floema; floema adjacente à câmara ninfal (Fig. 8A e B)
Fenólicos totais	Floema; epidermes; parênquima paliçádico e discretamente no lacunoso (Fig. 4E)	Gradiente centrípeto no côrte adaxial em direção ao tecido vascular e perivascular, sendo mais intenso nestes últimos; camada de células que revestem a câmara ninfal (Fig. 8C e D)

Fig. 1

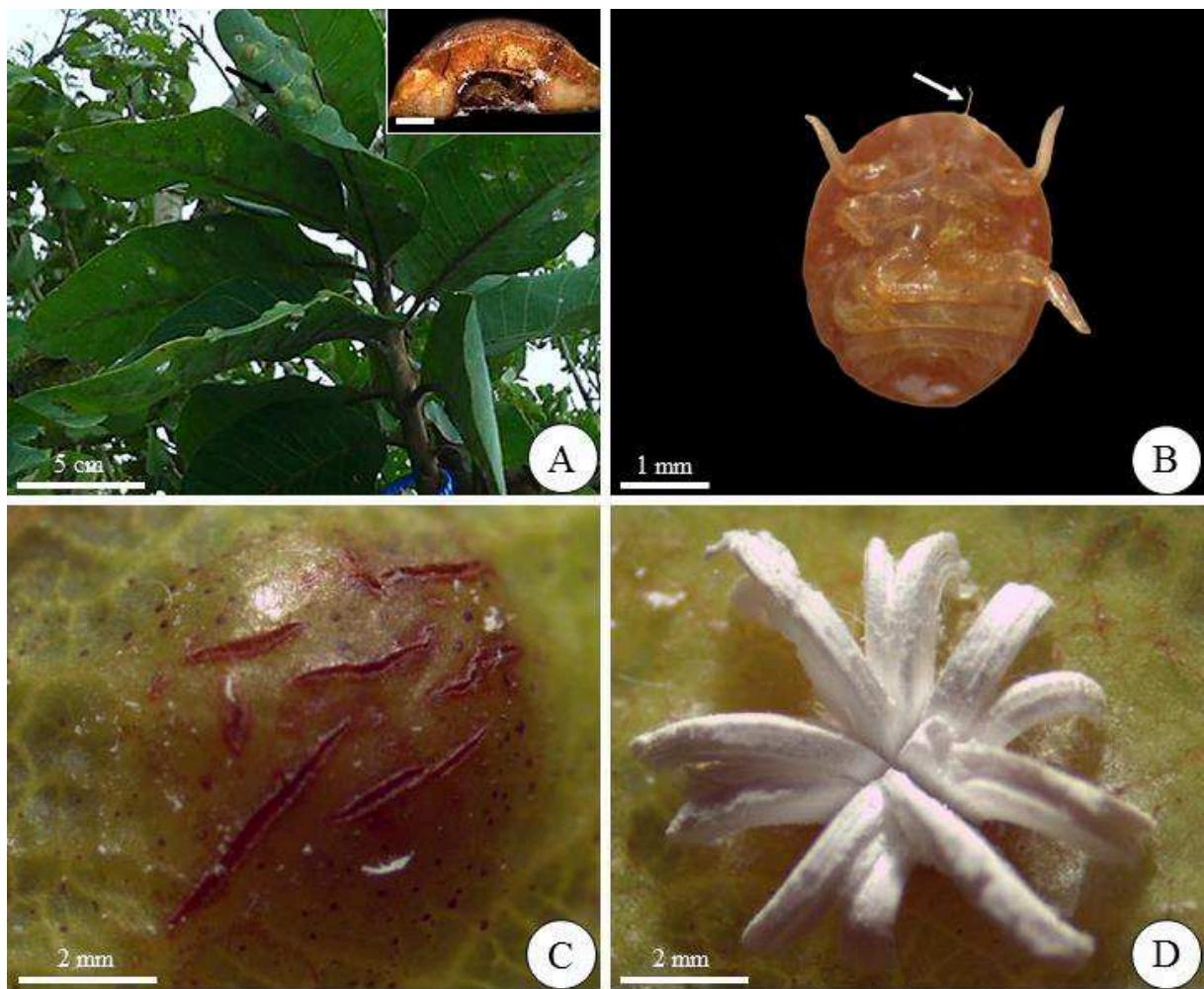


Fig. 2

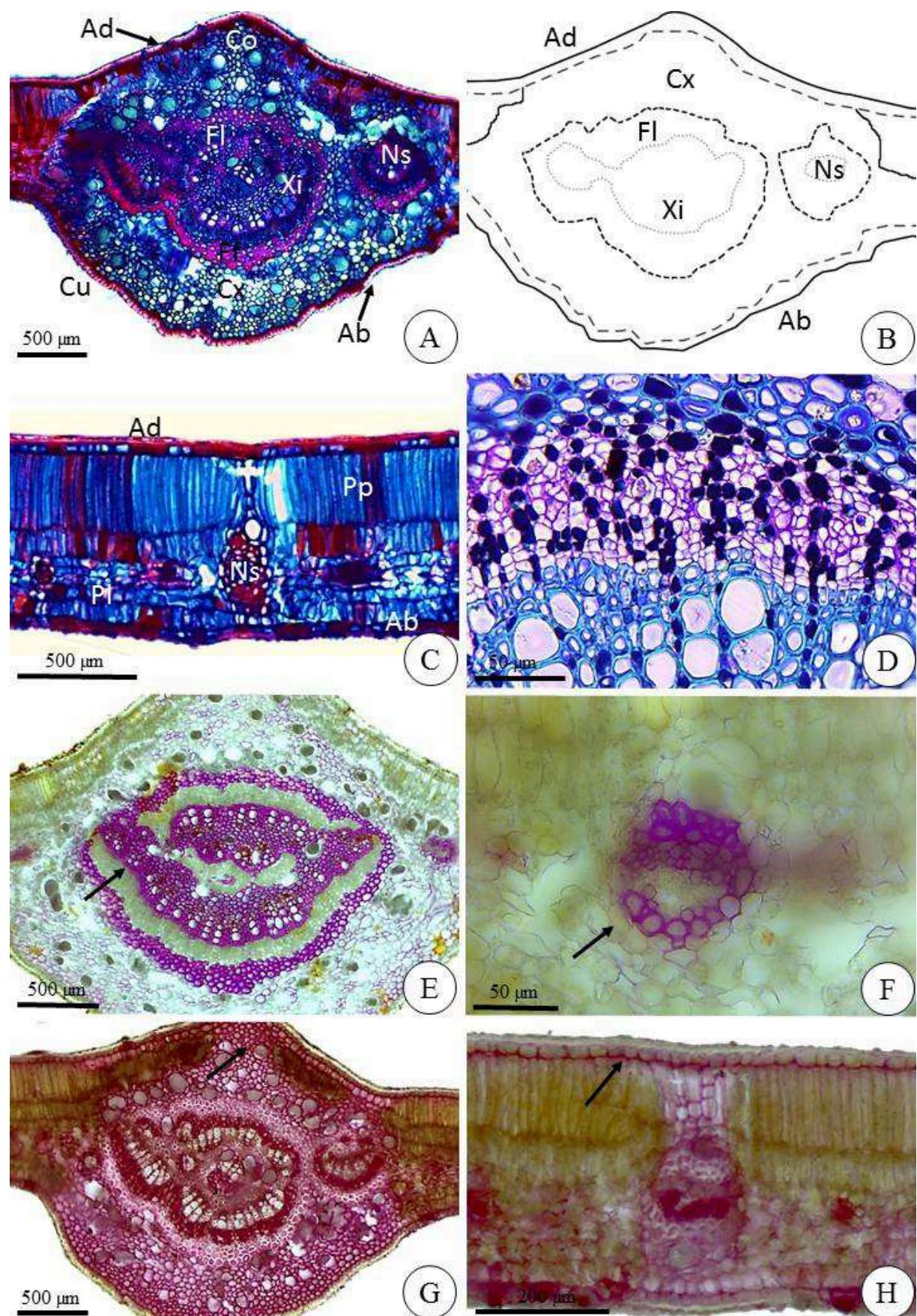


Fig. 3

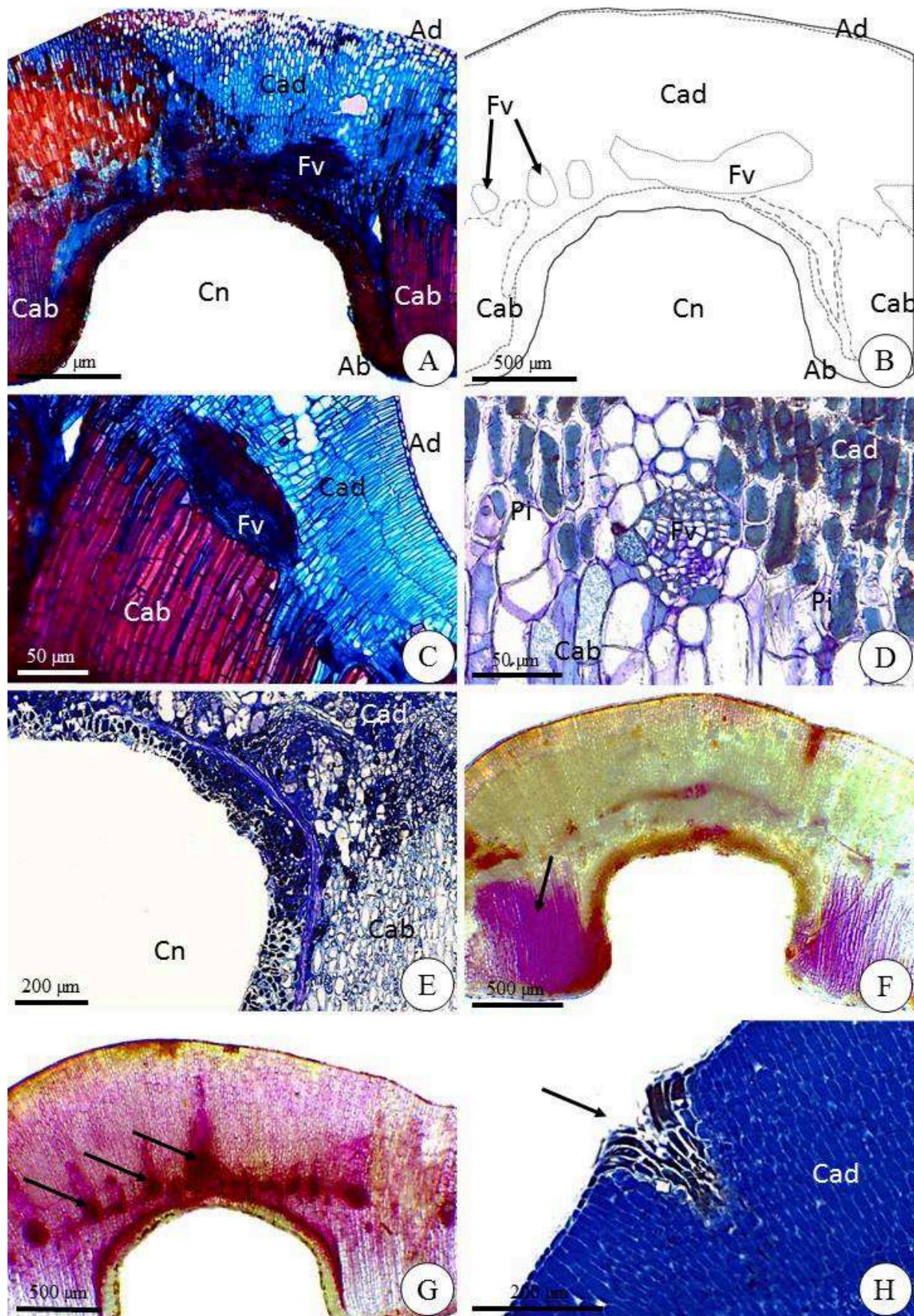


Fig. 4

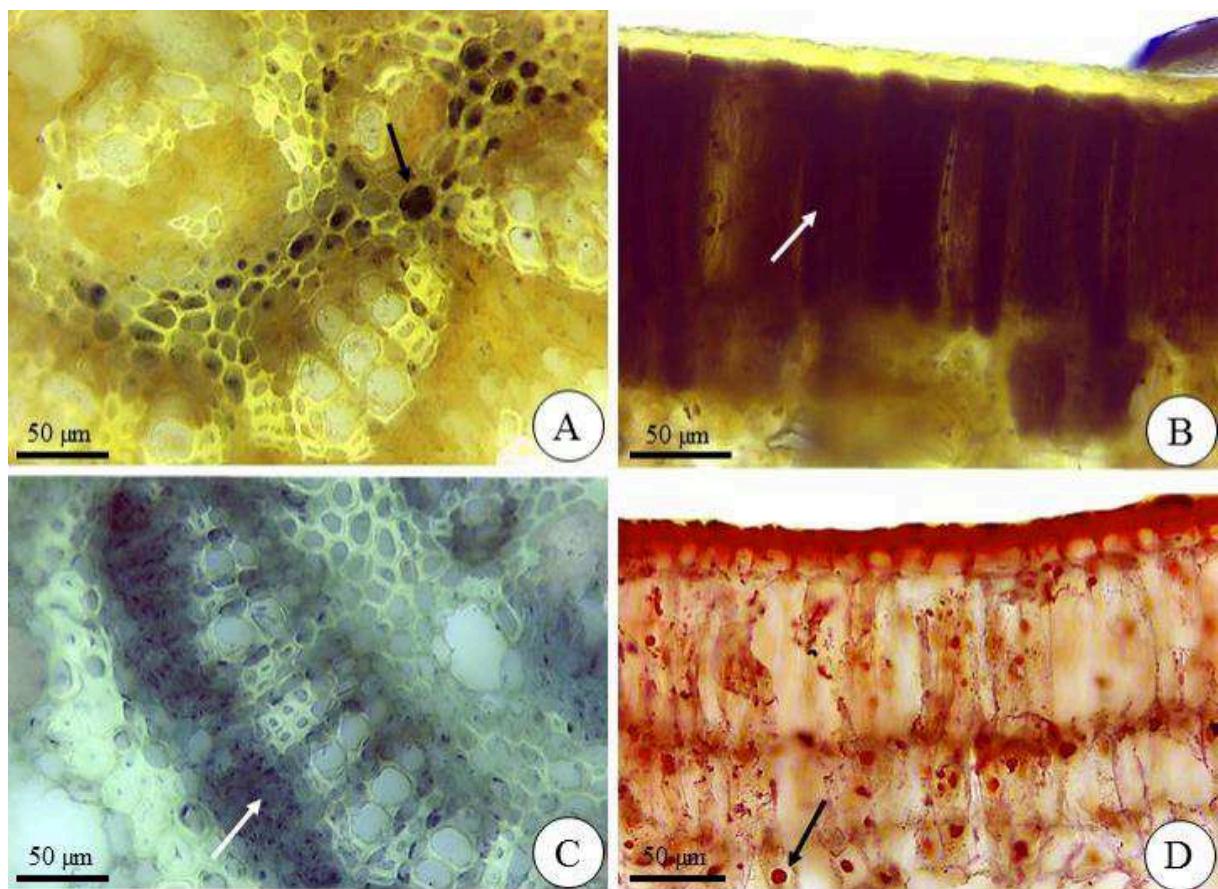


Fig. 5

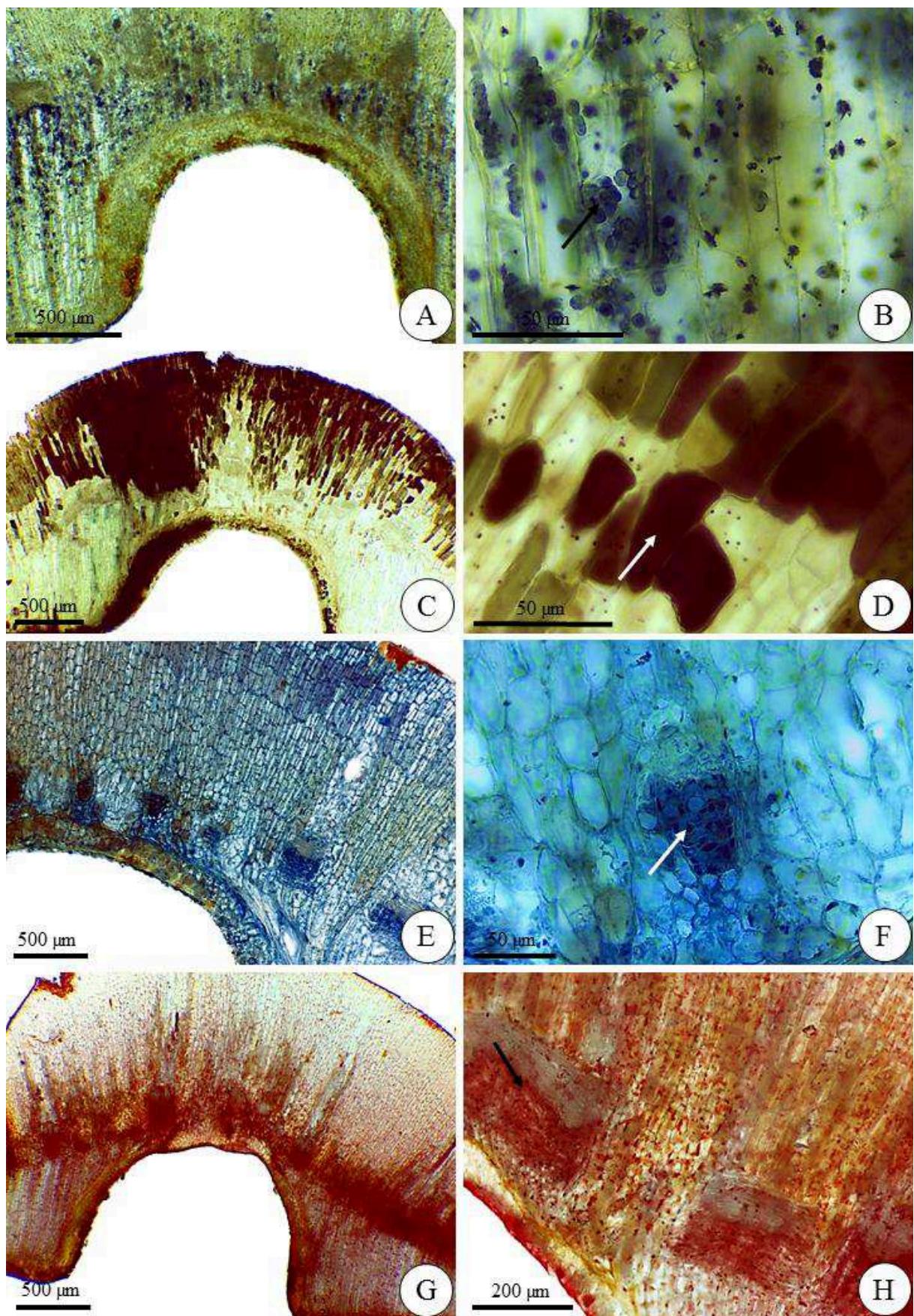


Fig. 6

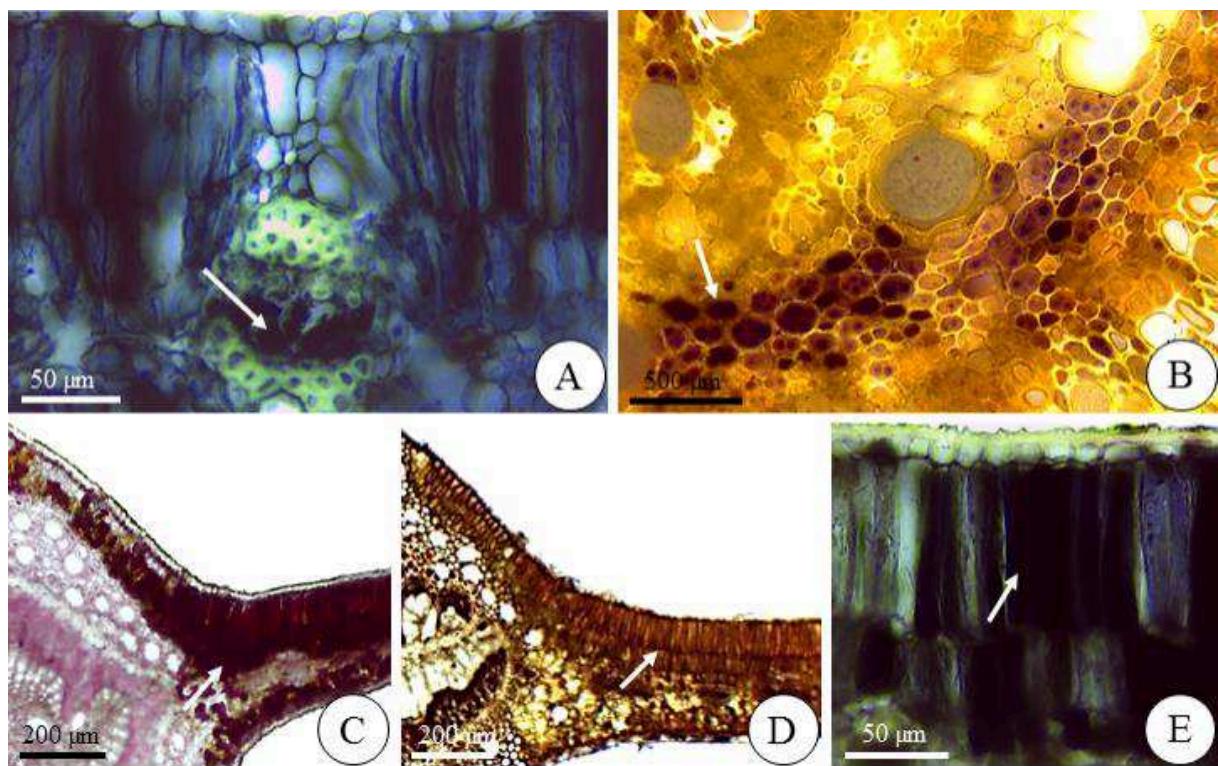


Fig. 7

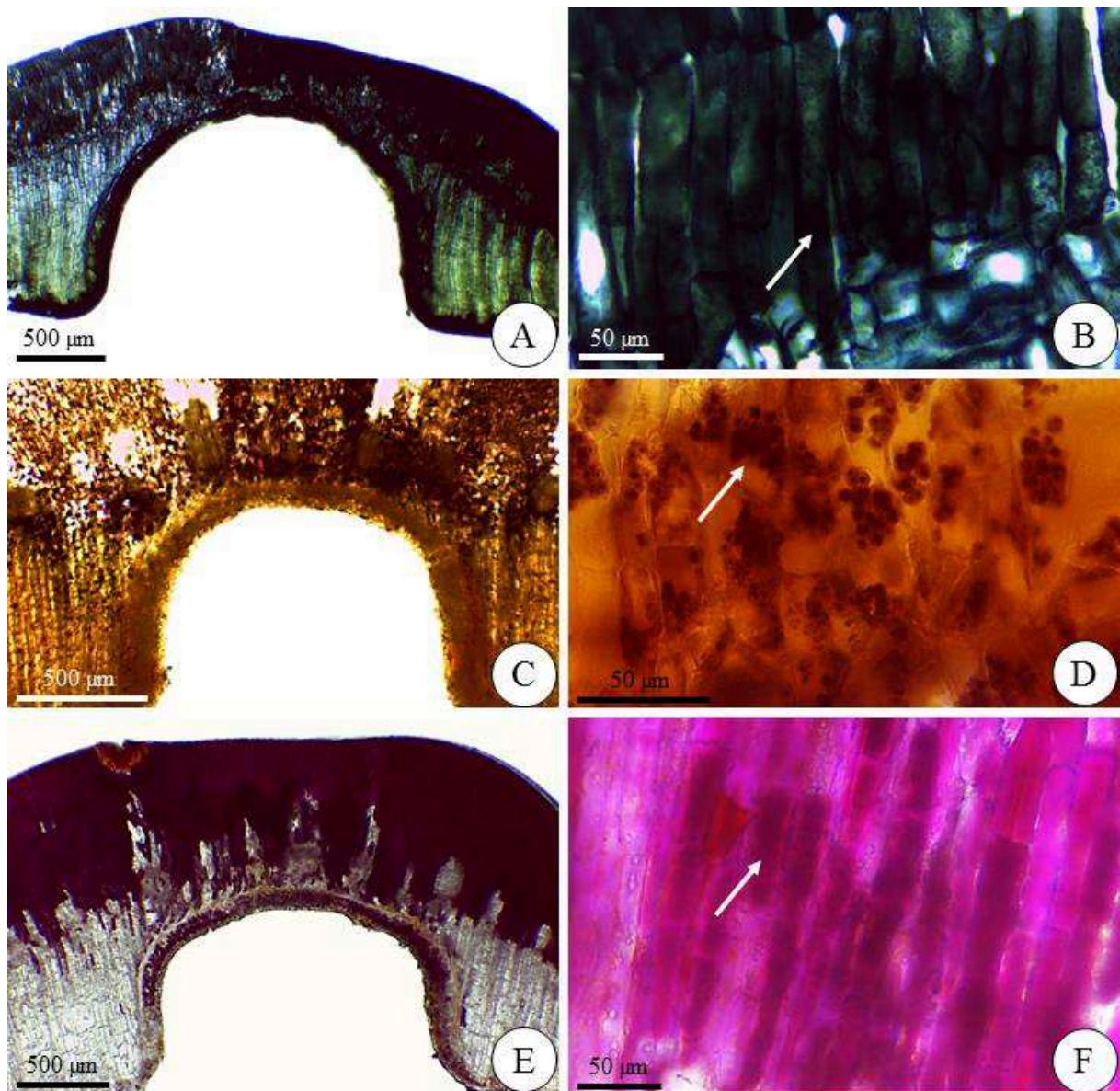
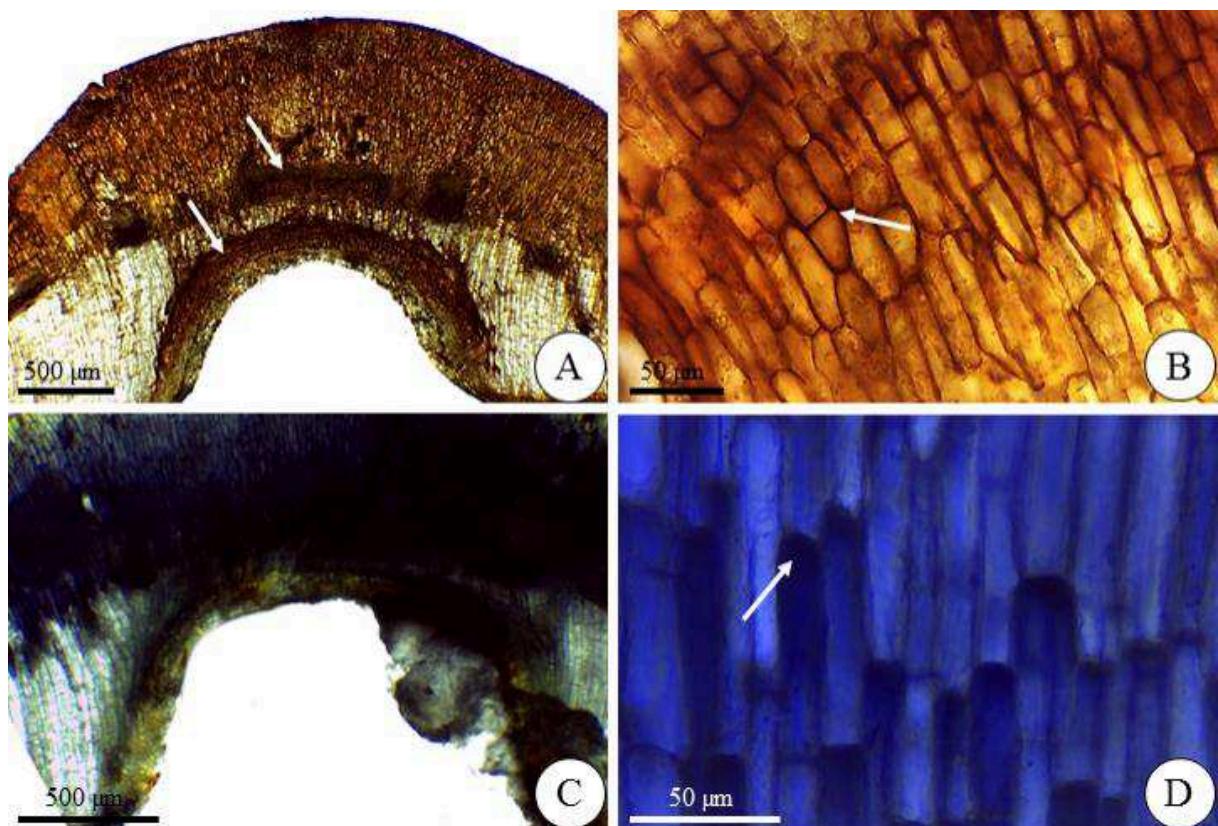


Fig. 8



**Relação entre o desempenho fotossintético e o estresse oxidativo em galhas induzidas por**

***Ceropsylla* sp. (Psyllidae) em *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae)**

Tácito de Freitas Calácio<sup>1</sup>, Denis Coelho de Oliveira<sup>1\*</sup> & Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Instituto de Biologia.*

*Laboratório de Anatomia e Desenvolvimento Vegetal, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, sala 28,*

*CEP:38400902 - Uberlândia, MG – Brasil.*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, Instituto de Biologia.*

*Laboratório de Fisiologia Vegetal, Rua Ceará s/n, Bloco 2D, sala 28, CEP:38400902 -*

*Uberlândia, MG – Brasil.*

*\*Autor para correspondência: denisoliveira@inbio.ufu.br.*

## RESUMO

O processo de indução e estabelecimento de galhas induz um alto estresse oxidativo nos tecidos da planta hospedeira. Este estresse é o gatilho para uma série de transformações estruturais e funcionais nos tecidos da galha. Também, o impacto causado pelo inseto galhador altera as taxas fotossintéticas dos tecidos, levando os tecidos galhados a desenvolverem diferentes mecanismos de dissipação de estresse para seu funcionamento. *Ceropsylla* sp. (Hemiptera: Psyllidae) induz galhas foliares intralaminares em *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae), estruturalmente pouco complexas, e histoquimicamente complexas, mantendo um pronunciado tecido clorofílico. A formação da galha compromete o desempenho fotossintético potencial e dificulta a dissipação de energia não fotoquímica, embora a capacidade fotossintética seja mantida. O acúmulo de fenólicos e a intensa lignificação nos tecidos galha configuram eficientes dissipadores do estresse oxidativo, ajustando o equilíbrio redox nos tecidos galhados. Uma vez mantida, a fotossíntese contribui para a oxigenação do tecido galhado e captura de gás carbônico, evitando a hipóxia e hipercarbia. A dinâmica entre estes processos são fundamentais para o estabelecimento desta interação.

**Palavras – chave:** Efeito Kautsky; espécies ativas de oxigênio; hipercarbia; hipóxia; fotossíntese.

## ABSTRACT

The processes of gall induction and establishment induces high oxidative stress in the host plant tissues. This stress is the initial trigger for a series of structural and functional transformations in gall tissues. In addition, the impact promoted by galling insect alters the photosynthetic rates, leading the gall tissues to develop different mechanisms of energy dissipation. *Cerospsylla* sp. (Hemiptera: Psyllidae) induces structurally simple galls on leaves of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae) that with a complex histochemical gradient and a pronounced area of chlorophyll tissue. Gall formation alters the photosynthetic performance and energy dissipation, but the photosynthetic capacity is maintained. The accumulation of phenolic compounds and intense cell wall lignification in gall tissue configure an efficient oxidative stress scavenging system, and consequently redox imbalance adjustment in gall tissues. Once maintained, photosynthesis contributes to oxygen diffusion in galled tissues and capture of carbon dioxide, avoiding hypoxia and hypercarbia. The dynamics between these processes are fundamental to the establishment of the host plant – gall interaction.

**Keywords:** Kautsky effect; oxygen reactive species; hypercarbia; hypoxia; photosynthesis.

## INTRODUÇÃO

Com grande habilidade em manipular o metabolismo da planta hospedeira, os insetos galhadores podem promover o desenvolvimento de tecidos complexos que fornecem alimentação especializada e de alta qualidade nutricional, proteção contra inimigos naturais e intempéries do ambiente (Price *et al.* 1987, Bronner 1992; Stone & Schönrogge 2003, Oliveira *et al.* 2016). A nova organização tecidual é produto de reações estruturais e químicas nos tecidos vegetais que levam a rediferenciação celular (*sensu* Lev Yadun 2003), e consequente à formação da galha (Oliveira *et al.* 2010). Estas alterações estruturais ocorrem de maneira concomitante às alterações funcionais no tecido galhado, embora, por exemplo, muitas galhas ainda mantenham similaridades com o tecido não galhado, tal como um tecido clorofílico típico com capacidade fotossintética (Oliveira *et al.* 2011a).

A manutenção da capacidade fotossintética em galhas, associada ao aumento do metabolismo celular e presença do inseto galhador, aumentam o estresse oxidativo nos tecidos (Oliveira & Isaias 2010, Oliveira *et al.* 2010 Isaias *et al.* 2015). O aumento do estresse gera um desequilíbrio no potencial redox dentro dos compartimentos celulares, simplasto e apoplasto da galha (Isaias *et al.* 2015). Este estresse pode ser avaliado através da detecção histoquímica de moléculas conhecidas como espécies ativas de oxigênio (EAO) que, em excesso, podem levar à morte do tecido atacado e ao fim da interação (Doke *et al.* 1996). O aumento na produção de EAO e consequente estresse oxidativo já foi anteriormente verificada em galhas induzidas em *Aspidosperma australe* (Oliveira & Isaias, 2010), *Aspidosperma spruceanum* (Oliveira *et al.* 2011a), *Lonchocarpus muehbergianus* (Isaias *et al.* 2011), *Psidium myrtoides* (Carneiro *et al.* 2014) e *Psidium cattleianum* (Carneiro & Isaias 2015). Neste trabalho, nós propomos investigar mecanismos de dissipação de EAO no sítio de desenvolvimento da galha, bem como a discussão sobre sua importância no metabolismo da galha.

O estresse gerado pelos insetos galhadores nos tecidos da hospedeira podem causar efeitos tanto positivos (Oliveira *et al.* 2011a), quanto negativos na atividade fotossintética na região da galha (Florentine *et al.* 2005; Castro *et al.* 2012). Os efeitos negativos ocorrem, muitas vezes, pelas alterações causadas na estrutura do tecido clorofílico e no teor de pigmentos fotossintéticos (Oliveira *et al.* 2011a). Estas alterações provocariam danos a fotoquímica da fotossíntese, que é avaliada através da fluorescência da clorofila (Baker & Oxborough 2004). A atividade fotoquímica da fotossíntese além de atuar na regulação do potencial redox nos tecidos da galha (Foyer 2005; Isaias *et al.* 2015), aumenta a disponibilidade e difusão de O<sub>2</sub> dentro do tecido da galha e na câmara larval, além de evitar a hipercarbia (Pincebourde & Casas 2015).

A fase fotoquímica da fotossíntese é dependente da absorção de luz, que excita as moléculas de clorofila a um estado de alta energia, permanecendo assim por vários nanossegundos (10<sup>-9</sup>s) até retornar ao estado basal (*e.g.* Papageorgiou & Govindjee 2004). Esta diferença de energia é usada para mover o aparato fotoquímico, *quenching fotoquímico* – qP, e o excesso pode ser dissipado como calor (*quenching não fotoquímico*, NPQ) ou reemitido na forma de fluorescência (Pavlović 2012). Estes três processos competem entre si, e o aumento de eficiência de um provoca o decréscimo da eficiência dos outros dois (Maxwell & Johnson 2000). Esta eficiência quântica pode ser avaliada pela variação da fluorescência da clorofila no PSII em cloroplastos, conhecido como efeito Kautsky (Kautsky & Hirsch 1931, Papageorgiou *et al.* 2007). A análise de fluorescência da clorofila se configura como uma excelente ferramenta para avaliar e quantificar o estresse oxidativo em plantas (Baker 2008), incluindo o estresse biótico gerado por insetos galhadores nos tecidos vegetais (Oliveira *et al.*, 2011a).

Neste estudo, a relação entre o *quenching* e a dissipação de estresse foi avaliada nas galhas foliares de *Pouteria ramiflora* Radlk. (Sapotaceae) induzidas por uma espécie não descrita de *Ceropsylla* (Hemiptera: Psyllidae), através da indução do efeito Kautsky e da

histolocalização de peróxido de hidrogênio e derivados fenólicos. Desta forma, o aumento do estresse oxidativo, causado por fatores bióticos, provocaria danos ao aparato fotoquímico e um desequilíbrio na eficiência quântica, com consequente decréscimo no qP e NPQ, que permitiriam então o estabelecimento da galha. O efeito Kaustky seria contrabalanceado pelo aumento de fenólicos no sítio da galha, para os quais se propõe um novo papel crucial auxiliando no desenvolvimento da galha. Com base na hipótese proposta, foram elaboradas as seguintes questões: I) Quais mecanismos antioxidantes são estabelecidos para que ocorra a dissipação do estresse na galha? II) Há diferença entre o rendimento fotossintético da galha e do tecido não galhado?

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Área de estudo e coleta**

Foram coletadas folhas completamente expandidas e com galhas maduras na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó (CCPIU), situada a 8 km a oeste do perímetro urbano de Uberlândia, MG ( $18^{\circ}60'S$  –  $48^{\circ}O$ ), na Região do Triângulo Mineiro, entre junho e dezembro de 2014. A reserva possui 127 ha, onde predomina a vegetação de cerrado sentido restrito (Lima *et al.* 1989), entre outros tipos fisionômicos. De acordo com o sistema de classificação de Köppen o clima da região é do tipo Cwa com duas estações bem definidas: uma seca (abril a setembro) e outra chuvosa (outubro a março) com as temperaturas médias mais baixas no período seco e as mais altas no verão (acima de  $35^{\circ}C$ ) (Alvares *et al.* 2013). As amostras foram levadas para o Laboratório de Anatomia e Desenvolvimento Vegetal (LADEV), da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

## **Análises Histoquímicas**

Para detecção de EAO (Espécies Ativas de Oxigênio), amostras de material recém-coletado foram seccionadas a mão livre com auxílio de lâmina descartável. As amostras foram incubadas em 3,3' diaminobenzidina (DAB) em solução tampão fosfato pH 7,4 de 1mg/ml durante 20 min, no escuro e à 4°C (Rosseti & Bonatti 2001). Posteriormente foram lavados e montados em tampão fosfato para observação em microscópio.

Para a detecção de compostos fenólicos e ligninas, cortes transversais da porção central da lâmina foliar e das galhas foram realizados à mão livre em material fresco e observados em microscópio óptico. Para a detecção de compostos fenólicos, os cortes foram imersos em Sulfato Ferroso 2% em formalina durante 15 minutos, lavados em água destilada e montados em lâmina histológica (Johansen 1940). Para detecção de ligninas as amostras foram imersas em Floroglucinol a 2% em solução acidificada durante 5 minutos e montados em lâminas histológicas (Johansen 1940). Todas as lâminas foram observadas e fotografadas por meio de um microscópio óptico Leica®DM500 acoplado à uma câmera digital ICC50HD.

A intensidade da coloração, em escalas de cinza, e consequentemente a estimativa das concentrações de EAO e fenólicos nos tecidos das galhas (n=4), foram realizadas no software ImageJ®, segundo proposto por Juszczak & Baier (2014) através das imagens digitais. A porcentagem de área marcada pelos reagentes foi avaliada em áreas pré-selecionadas de 0,016mm<sup>2</sup>. Quanto maior o valor em escala de cinza nestas áreas pré-selecionadas, menor a concentração da substância analisada.

## **Dosagem de Pigmentos Fotossintéticos e Fluorescência da clorofila a**

Folhas não galhadas (maduras e totalmente expandidas) e com galhas maduras foram coletadas, acondicionadas em caixa térmica com gelo e levadas imediatamente ao laboratório, onde foram processadas. Para dosagem dos teores de pigmentos fotossintéticos, cada amostra

foi composta por dois discos de aproximadamente 0,62cm<sup>2</sup> de tecido não galhado ou galha (n=20). As amostras foram pesadas em balança analítica (Sartorius®, Alemanha), imersas em vidros âmbar contendo 5ml de acetona a 80% e armazenadas em geladeira por 48 horas. Posteriormente, foram maceradas e centrifugadas durante 3 min a 3000 rpm. Em seguida as amostras foram submetidas ao espectrofotômetro para leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 470, 646 e 663 nm. Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides foram quantificados segundo Lichtenthaler & Wellburn (1983) e os resultados submetidos ao teste de Kruskal – Wallis (Jump®, Sas Institute).

Para avaliação da fluorescência da clorofila *a*, ramos com folhas galhadas e maduras foram armazenados em caixa de isopor com gelo e levados ao laboratório. As folhas (n=6) foram cobertas com papel alumínio durante 30 min para adaptação ao escuro. Dados da cinética de fluorescência transitória entre as fases de adaptação ao escuro e ao claro foram obtidos com o equipamento Handy FluorCam – PSI (Photon Systems Instruments, República Tcheca) e representados de acordo com Genty *et al.* (1989). A curva de Kautsky e seus parâmetros associados (mínima fluorescência adaptada ao escuro –  $F_0$ ; máxima fluorescência adaptada ao escuro –  $F_m$ ; rendimento quântico potencial  $-QY_{max}$ ; rendimento quântico efetivo durante a adaptação à luz -  $QY_{L_n}$ ; *quenching* não fotoquímico após adaptação à luz no *steady-state* -  $NPQ_{L_{ss}}$ ; *quenching* não fotoquímico durante a adaptação a luz -  $NPQ_{L_n}$ ; rendimento quântico efetivo no *steady-state* -  $QY_{L_{ss}}$ ; razão do declínio da fluorescência na luz –  $Rfd_{L_n}$ ; razão do declínio da fluorescência no *steady-state* –  $Rfd_{L_{ss}}$ ) foram obtidos com o auxílio do software Fluorcam7 (protocolo *Quenching*). Os resultados dados foram submetidos ao teste de Kruskal – Wallis (Jump®, Sas Institute).

## **Conteúdo relativo de água (CRA), saturação hídrica ( $\Delta H_{sat}$ ), área foliar específica (AFE) e massa foliar específica (MFE)**

Foram coletadas 20 amostras constituídas por três discos de tecido não galhado e três discos da galha (n=60), com diâmetro aproximado de 1,2 cm<sup>2</sup>. As amostras foram pesadas (massa fresca – MF) em balança analítica (Sartorius®, Alemanha) e imersas em água destilada por 48 horas. Decorrido este tempo, os discos foram novamente pesados para a obtenção da massa túrgida (MT) e levados à estufa (60 – 70°C) durante 48 horas para obtenção da massa seca (MS). A área foliar específica (AFE) foi determinada pela razão entre a área e a massa seca (cm<sup>2</sup>/g<sup>-1</sup>), enquanto a MFE (massa foliar específica) foi calculada pela razão entre a massa seca e a área foliar (g/cm<sup>2</sup>) (Turner 1981). Conteúdo hídrico relativo (CHR) e o déficit de saturação hídrica ( $\Delta H_{sat}$ ) foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Barrs & Weatherley (1962), onde  $CHR = \frac{(MF - MS)}{(MT - MS)} \times 100$  e o  $\Delta H_{sat} = \frac{(MT - MF)}{(MT - MS)} \times 100$ .

## **RESULTADOS**

### **Aspecto geral da galha**

As galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em folhas de *Pouteria ramiflora* possuem em média 6 mm de diâmetro por 3,2 mm de altura. Apresentam projeção côncava voltada para superfície adaxial do limbo foliar, podendo ou não conter fissuras na superfície adaxial da epiderme (ver capítulo 1). Na superfície abaxial, é observada uma凸exidade na qual o indutor se insere e forma a câmara ninfal. Esta é ocupada por um único inseto galhador com o dorso voltado para o ostíolo. Uma secreção de aspecto ceroso, produzida pelo galhador, é projetada para fora da galha. Nos tecidos da galha (ver capítulo 1) observa-se a presença de parênquima clorofílico, especialmente no córtex adaxial (Fig. 1A).

## Análises Histoquímicas

Espécies ativas de oxigênio (EAO) foram detectadas tanto no apoplasto quanto no simplasto das células dos parênquimas paliçádico e lacunoso, e na epiderme da folha não galhada. Nos feixes vasculares, a reação foi mais intensa no floema. Nas galhas, a reação para EAO foi mais intensa no córtex adaxial, floema (Fig. 1B) e no córtex abaxial adjacente à câmara ninfa. No córtex abaxial, onde ocorre intensa lignificação (Fig. 1C), a concentração de EAO é baixa (Tab. 1). Compostos fenólicos foram detectados no mesofilo das folhas não galhadas (Capítulo 1) e no córtex adaxial da galha (Fig. 1D). A concentração de compostos fenólicos mostrou resultados semelhantes àqueles observados para EAO. Ou seja, a maior intensidade de marcação ocorreu no córtex adaxial e no tecido vascular (Tab. 1).

## Dosagem de Pigmentos Fotossintéticos e Fluorescência da clorofila a

Enquanto na folha não galhada os teores totais de clorofilas e de carotenoides foram em média de  $124,6 \pm 36,7 \mu\text{g cm}^{-2}$  e  $29,9 \pm 11,0 \mu\text{g cm}^{-2}$  respectivamente, nas galhas estes valores foram de  $29,1 \pm 7,1 \mu\text{g cm}^{-2}$  e  $7,0 \pm 2,3 \mu\text{g cm}^{-2}$  em média (Tab. 2). Entretanto não houve diferenças significativas nas razões clorofilas a/b e carotenoides/clorofilas entre os tecidos analisados (Tab. 2).

Os resultados obtidos pela curva de Kautsky (Fig. 2) mostraram diferenças significativas entre o tecido não galhado e o da galha (Fig. 3A). A fluorescência inicial ( $F_0$ ) do tecido não galhado foi menor do que na galha (Fig. 2 e 3B), ao passo que a fluorescência máxima ( $F_m$ ) não apresentou diferenças estatísticas entre os tecidos (Fig. 2 e 3C), até o segundo pulso saturante (representado por  $F_p$  na figura 2). O pico de fluorescência durante o início do efeito Kautsky ( $F_p$ ) foi equivalente entre os dois tecidos (Fig. 2). Entretanto, a dissipação de energia, através do *quenching* não fotoquímico (NPQ), foi mais eficiente no tecido não galhado do que na galha. Isso pode ser observado pela sequência de pulsos sob a luz durante a indução do efeito

Kaustsky, que apresenta declínio mais acentuado na folha não galhada (Fig. 2). Estes dados são corroborados pela análise de imagem (Fig. 3E e F), onde o *quenching* não fotoquímico durante a adaptação à luz ( $NPQ_{Ln}$ ) e após a adaptação à luz no *steady-state* ( $NPQ_{Lss}$ ), foram significativamente maiores no tecido não galhado do que na galha. Diferente da galha, o  $NPQ$  no tecido não galhado foi mais eficiente, trazendo a curva de Kaustsky próxima do mesmo valor de  $F_0$  após o último pulso saturante no *steady-state* (Fig. 2). A razão do declínio da fluorescência na luz ( $Rfd_{Ln}$ ) e no *steady-state* ( $Rfd_{Lss}$ ) (Fig. 3F e 4A), valores empíricos utilizados para estimar a vitalidade dos tecidos, foi maior no tecido não galhado ( $1,72 \pm 0,69$ ;  $2,63 \pm 0,32$  respectivamente) do que nas galhas ( $0,52 \pm 0,11$ ;  $0,63 \pm 0,17$ ). O rendimento quântico efetivo ( $QY_{Lss}$ ) foi maior nos tecidos não galhados ( $0,8 \pm 0,01$ ; Fig. 4B), quando comparado aos tecidos da galha ( $0,7 \pm 0,02$ ; Fig. 4B). Entretanto, o rendimento quântico efetivo durante a adaptação à luz ( $QY_{Ln}$ ) e no *steady-state* ( $QY_{Lss}$ ) não apresentaram diferenças significativas entre os tecidos analisados (Fig. 4C e D).

#### **Área e massa foliar específica (AFE e MFE), conteúdo hídrico relativo (CHR) e saturação hídrica ( $\Delta H_{sat}$ )**

Não houve diferenças significativas entre o CHR da folha não galhada e da galha,  $72,46 \pm 7,1\%$  e  $69,1 \pm 7,1\%$  ( $P = 0,11$ ) respectivamente, bem como para o  $\Delta H_{sat}$ ,  $27,55 \pm 7,2\%$  na folha e  $30,9 \pm 11,6\%$  na galha ( $P = 0,11$ ). Por outro lado, os valores de MFE e AFE mostraram diferenças estatísticas entre os diferentes tecidos (Tab. 2). A AFE foi maior no tecido não galhado em relação ao tecido galhado ( $151,8 \pm 17,7$  e  $71,55 \pm 18,45$  respectivamente), em contrapartida, a MFE foi menor no tecido não galhado do que na galha ( $0,007 \pm 0,0008$  e  $0,015 \pm 0,003$ , respectivamente).

## DISCUSSÃO

O inseto galhador *Ceropsylla* sp. gera um alto estresse oxidativo nos tecidos foliares de *P. ramiflora*. Este estresse pode ser notado pelo aumento da produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), queda nas taxas de fotossíntese e perda da capacidade de dissipação de energia durante o efeito Kautsky. O estresse oxidativo gerado em resposta ao ataque de insetos galhadores já foi anteriormente reportado na literatura (Oliveira *et al.* 2014; Bedetti *et al.* 2014; Carneiro *et al.* 2014). Entretanto, os mecanismos pelos quais este estresse é dissipado em galhas que apresentam capacidade fotossintética foram, pela primeira vez, discutidos neste estudo. A análise da curva de Kautsky durante a indução da fluorescência da clorofila a, mostrou que o tecido não galhado apresenta maior eficiência na dissipação de energia comparada ao tecido galhado. Contudo, o acúmulo de fenólicos e a intensa lignificação dos tecidos na galha podem funcionar como um mecanismo secundário de dissipação de energia e consequente manutenção do equilíbrio redox. Também, a atividade fotossintética é importante para manter os níveis de oxigênio e gás carbônico nos tecidos da galha e na câmara ninfal.

### Manutenção do equilíbrio redox

A produção de EAO é advinda do fluxo de elétrons provenientes dos processos fotossintéticos e respiratórios (Foyer & Noctor, 2005). Segundo estes autores, estas moléculas podem ser dissipadas através de substâncias antioxidantes, que são responsáveis pela homeostase redox nas plantas. Devido ao aumento da respiração, à manutenção da fotossíntese e atividade do galhador, o fluxo de elétrons é intensificado nas galhas (Oliveira *et al.*, 2011a; 2014; Isaias *et al.* 2015). No sistema *Ceropsylla* sp.-*P. ramiflora* há um grande estresse oxidativo nos tecidos da galha, especialmente junto ao tecido clorofílico. Assim, o controle deste estresse é essencial para a manutenção da atividade fotossintética e para evitar uma resposta de defesa sistêmica dos tecidos da hospedeira contra o inseto. A resposta sistêmica do

tecido, decorrente do aumento na produção de EAO, pode inviabilizar o desenvolvimento da interação. Os mecanismos de dissipação podem ser atrelados à atividade enzimática antioxidant da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e tioredoxina peroxidase. Além destes complexos enzimáticos, o envolvimento do ácido ascórbico (ASA), glutationa, tocoferóis e carotenoides (Mittler 2002), assim como a lignificação dos tecidos próximos aos sítios de estresse e produção de compostos fenólicos, estão associados aos mecanismos de dissipação deste estresse (Apel & Hirt 2004).

A biossíntese de ligninas depende da geração de EAO, em um processo catalisado por peroxidases (Lewis & Yamamoto 1990; Boerjan *et al.* 2003; Apel & Hirt 2004), e ocorre em resposta ao estresse celular. Este processo é mediado por meio um complexo mecanismo de “*feedback-loop*” entre as EAO e Jasmonatos, um sinalizador químico de estresse (Denness *et al.* 2011). Além do mais, uma alta concentração de fenólicos nos mesmos sítios de EAO e Jasmonatos, pode estimular a produção da fenilalanina liases, enzimas que estimulam o metabolismo de fenilpropanoides, envolvidos na produção de ligninas (Kim *et al.* 2006). Assim, o intenso processo de lignificação nas células do córtex abaxial da galha de *P. ramiflora*, indica um eficiente mecanismo de sequestro de EAO e consequente dissipação de estresse, bem como o acúmulo de metabólitos secundários. A função primordial destes últimos, especialmente fenólicos, é proteger as células dos efeitos nocivos dos radicais livres, atuando como potentes antioxidantes (Gotlieb 1993, Aboul-Enein *et al.* 2007). Desta forma, em galhas, a função dos compostos fenólicos pode ser atrelada aos processos de dissipação e prevenção de estresse oxidativo (Akhtar *et al.* 2010, Dai & Mamper 2010, Isaias *et al.* 2015). O aumento da concentração de fenólicos e a lignificação dos tecidos em galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora*, atua na manutenção da homeostase dos tecidos e contribui para manter a atividade fotoquímica na galha.

## **Alterações no aparato fotossintético**

O decréscimo no conteúdo de pigmentos fotossintéticos nos tecidos das galhas tem sido relatado em várias galhas, tais como aquelas induzidas por Cecidomyiidae em *Copaifera langsdorffii* (Castro *et al.* 2012) e *Aspidosperma spruceanum* (Oliveira *et al.* 2011), e por Psylloidea em *Psidium myrtoides* (Carneiro *et al.* 2014) e em *Aspidosperma australe* (Oliveira *et al.* 2011). Segundo Castro *et al.* (2013) e Haiden *et al.* (2012), o déficit na taxa de fotossíntese pode ser consequência da redução da área do parênquima clorofílico durante a fase de crescimento e desenvolvimento da galha, ou suberização e lignificação das paredes celulares nas fases de maturação a senescência. No sistema *Ceropsylla* sp.-*P. ramiflora*, há um decréscimo no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, embora a razão entre estes permaneça inalterada em relação à folha não galhada. Isso é um indicativo de que não ocorre degradação dos pigmentos pelo aumento do estresse oxidativo, como proposto para *A. australe* (Oliveira *et al.* 2011a). O decréscimo no teor de pigmentos pode ser explicado, portanto, pelo aumento do número e tamanho das células, o que, de certa forma, proporciona a diluição dos pigmentos no tecido. O aumento na massa foliar específica (MFE) nos tecidos da galha corrobora esta hipótese. A presença de clorofila indica capacidade fotossintética do tecido da galha mesmo que este tecido esteja exposto ao alto estresse oxidativo induzido pelo galhador.

## **Estabelecimento da galha x manutenção do potencial fotossintético**

O tecido não galhado apresentou uma dissipação de energia mais eficiente durante o efeito Kautsky. Mantendo assim a taxa de rendimento quântico potencial superior à das galhas. O maior declínio nas taxas de fluorescência no tecido não galhado, demonstrado pelos valores de  $Rfd_{Ln}$  ( $1,72 \pm 0,69$ ) e  $Rfd_{Lss}$  ( $2,63 \pm 0,32$ ) indica maior vitalidade dos tecidos (Lichtenthaler & Miehè 1997). Estes valores empíricos mostram maior eficiência da atividade do Ciclo de Calvin Benson (Lichtenthaler *et al.* 1986), onde valores abaixo de 1 sugerem um

comprometimento no processo de fixação de CO<sub>2</sub> e consequente estresse (Haitz & Lichtenthaler, 1988). A redução da atividade do Ciclo de Calvin, nas galhas, pode ser consequência de alterações metabólicas (que interferem na produção de enzimas e intermediários do próprio ciclo) decorrentes da ação do inseto galhador.

Os baixos valores de rendimento quântico potencial na galha de *P. ramiflora* podem indicar fotoinibição do PSII (Lüttge 1998). Durante o processo de fotoinibição, as EAO (principalmente o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) danificam a proteína D1 do centro de reação dos PSII. Por sua vez, estas proteínas são degradadas ou removidas, resultando em uma baixa eficiência quântica capaz de prejudicar a produção de energia fotoquímica para o Ciclo de Calvin (Nishiyama & Murata 2014). O dano nos centros de reação do PSII também é evidenciado pelos baixos valores de F<sub>0</sub> observado nas galhas de *P. ramiflora*, assim como nas galhas induzidas por *Eugeniamyia dispar* (Diptera: Cecidomyiidae) nas folhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) (Isaias *et al.* 2015). A fluorescência inicial (F<sub>0</sub>) em tecidos adaptados ao escuro é variável e seu valor pode aumentar caso os centros de reação do PSII estejam comprometidos, ou se a transferência da energia de excitação do complexo antena para os centros de reação esteja prejudicada (Bolhàr – Nordenkampf *et al.* 1989). Sendo assim, os níveis mais altos de F<sub>0</sub> indicam comprometimento dos PSII nos tecidos das galhas de *P. ramiflora*.

Como consequência do aumento do estresse geralmente há um decréscimo no rendimento quântico efetivo (QY<sub>Ln</sub>), diminuindo o *quenching* fotoquímico (qP) e não fotoquímico NPQ no tecido não galhado (Lichtenthaler & Miehè 1997; Ruban, *et al.* 2004). Ambos qP e NPQ ajudam a minimizar a produção de <sup>3</sup>Chl\* (Clorofila tripleto). Esta molécula transfere energia para o O<sub>2</sub> gerando oxigênio singuleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>\*), uma EAO extremamente tóxica (Pavlović 2012), que é prontamente convertida na forma mais estável, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Bhattacharjee 2010; Wahid *et al.* 2014). Por meio de mecanismos que resultam em liberação de calor e fluorescência, as plantas conseguem, naturalmente, dissipar a energia não

usada na fase fotoquímica da fotossíntese (Baker & Oxborough 2004). Algumas galhas, como esta, têm grandes concentrações de compostos fenólicos que possuem como função primordial a proteção das células dos efeitos tóxicos de radicais livres (Gottlieb & Kaplan 1993). Além disso, estas substâncias podem constituir uma importante defesa química contra vários tipos de estresses abióticos (Akhtar *et al.* 2010; Heldt & Piechulla 2010), e são mecanismos eficientes para a proteção contra raios UV no tecido da galha (Price 1997).

### **Importância da manutenção da atividade fotossintética na galha**

O arranjo compacto dos tecidos, devido à hipertrofia celular e homogeneização durante o desenvolvimento da galha, contribui para evitar a perda de água (Kraus 2009; Castro *et al.* 2012; Heldt & Piechulla 2010). De fato, a galha mantém o CHR e saturação hídrica semelhantes àqueles encontrados no tecido não galhado. Por outro lado, o limitado espaço intercelular e manutenção dos níveis de água no tecido dificultam a difusão de gases, podendo levar a hipóxia e hipercarbia (Haiden *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2011b, Isaias *et al.* 2015). Haiden *et al.* (2012) reportaram que a fotossíntese ocorre até 2mm de profundidade nos tecidos das galhas de *Trichilogaster acaciaelongifoliae* induzidas em *Acacia longifolia*. Assim, quanto mais espessa a galha, mais profunda é a câmara larval, e quanto menor a disponibilidade de O<sub>2</sub>, mais intensa é a concentração de CO<sub>2</sub> nos tecidos.

A hipercarbia gerada pela respiração do inseto, pode fornecer substrato para a fotossíntese no tecido interno adjacente à câmara, já que este não está em contato com ar atmosférico (Haiden *et al.* 2012). Por outro lado, Zhou *et al.* (2000) constataram que a privação de O<sub>2</sub> pode limitar o metabolismo respiratório do inseto, ao passo que a enquanto a alta concentração de CO<sub>2</sub> é capaz de inibir a atividade de enzimas respiratórias resultando no declínio na produção de ATP. Alternativamente, o galhador *T. acaciaelongifoliae*, demonstrou grande habilidade em controlar seu metabolismo, de acordo com os níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

disponíveis na galha induzida em *A. longifolia*, aumentando ou diminuindo a respiração conforme lhe for necessário (Haiden *et al.* 2012).

O desenvolvimento da galha pode levar à formação de estômatos anômalos (Moura *et al.* 2008). Por outro lado, em alguns sistemas galhador – planta hospedeira em que há a ausência de estômatos, é comum que ocorram fissuras na epiderme que se adentram ao tecido, facilitando a difusão de gases (Pincebourde & Casas 2015). Tais fissuras foram observadas nas galhas de *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora* e podem auxiliar na difusão de gases. A capacidade fotoquímica é importante tanto para produção de carboidratos, utilizados para manutenção da estrutura e metabolismo da galha e/ou do galhador, quanto para produzir O<sub>2</sub>, viabilizando a respiração aeróbica (Oliveira *et al.* 2011, Castro *et al.* 2012, Isaias *et al.* 2015). O consumo de CO<sub>2</sub> no ciclo de Calvin durante a atividade fotossintética nos tecidos da galha evita a hipercarbia nos tecidos adjacentes e na câmara ninfal. Também, a atividade fotoquímica da fotossíntese nos tecidos da galha libera O<sub>2</sub>, responsável pela evitação da hipoxia no sistema *Ceropsylla* sp.-*P. ramiflora*.

## CONCLUSÕES

Mesmo com o alto estresse detectado nos tecidos da galha em *P. ramiflora*, as taxas fotossintéticas são mantidas graças aos mecanismos secundários de dissipação como: acúmulo de fenólicos e lignificação. A fotossíntese que ocorre nos tecidos galhados não é suficiente para suprir a demanda dos processos metabólicos e estruturais durante o desenvolvimento da galha. Entretanto, esta parece desempenhar um papel fundamental na manutenção do maquinário celular, bem como na prevenção da hipoxia e hipercarbia nos tecidos. A disponibilidade de O<sub>2</sub> e o controle na concentração de CO<sub>2</sub> são importantes para o metabolismo da galha e do inseto galhador.

## REFERÊNCIAS

- Aboul-Enein AM; El-Baz FK; El-Baroty GS; Youssef AM; Abd El-Baky HH. 2003. Antioxidant activity of algal extracts on lipid peroxidation. *J. Med. Sci.* 3: 87–98.  
<https://doi.org/10.3923/jms.2003.87.98>
- Agati G; Mazzinghi P; Lipucci di Paola M; Fusi F; Cecchi G. 1996. The F685/F730 Chlorophyll Fluorescence Ratio as Indicator of Chilling Stress in Plants. *Journal of Plant Physiology* 148(3-4): 384–390. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80270-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80270-7)
- Akhtar Y; Yang Y; Isman MB; Plettner E. Dialkoxy-benzene and dialkoxy- allylbenzene feeding and oviposition deterrents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*: potential insect behavior control agents. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010): 4983–4991.  
<https://doi.org/10.1021/jf9045123>
- Alvares CA; Stape JL; Sentelhas PC; Gonçalves JLM; Sparovek G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22(6): 711–728.  
<https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Apel K; Hirt H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373–399.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Baker NR; Oxborough K. 2004. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In: Papageorgiou G; Govindjee, eds. *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_3)
- Baker NR. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59(1): 89–113.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>

- Bedetti CS; Modolo LV; Isaias RMS. 2014. The role of phenolics in the control of auxin in gall of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae: Mimosoideae). *Biochemical Systematics and Ecology* 55: 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.02.016>
- Bhattacharjee S. 2010. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfi ed: Science Publishers, p.1-30.  
<https://doi.org/10.1201/9781439854082-2>
- Boerjan W; Ralph J; Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- Bolhar-Nordenkampf HR; Long SP; Baker NR; Oquist G; Schreiber U; Lechner EG. 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. *Functional Ecol.* 3:497–514.  
<https://doi.org/10.2307/2389624>
- Bronner R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of Cynipids and Cecidomyiids. In: Shorthouse JD; Rohfritsch O. (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp 118–140.
- Carneiro RGS; Castro AC; Isaias RMS. 2014. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany* 92: 97–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.011>
- Carneiro RGS; Isaias RMS. 2015. Gradients of metabolite accumulation and redifferentiation of nutritive cells associated with vascular tissues in galls induced by sucking insects. *AoB Plants* 7: 1-16. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv086>
- Castro CA; Leite GLD; Oliveira DC; Isaias RMS. 2012. Morphological Patterns of a Hymenopteran Gall on the Leaflets of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae). *American Journal of Plant Sciences* 3: 921-929. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.37109>

- Castro AC; Oliveira DC; Moreira ASFP; Isaias RMS. 2013. Synchronism between *Aspidosperma macrocarpon* Mart. (Apocynaceae) resources allocation and the establishment of gall inducer *Pseudophacopteron* sp. (Hemiptera: Psylloidea). *Revista de Biologia Tropical* 61(4): 1891–1900. <https://doi.org/10.15517/rbt.v61i4.12859>
- Dai J; Mumper RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352.  
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Denness L; McKenna JF; Segonzac C; Wormit A; Madhou P; Bennett M; Hamann T. 2011. Cell Wall Damage-Induced Lignin Biosynthesis Is Regulated by a Reactive Oxygen Species- and Jasmonic Acid-Dependent Process in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156(3): 1364–1374. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175737>
- Doke N; Miura Y; Sanches LM; Park HJ; Noritake T; Yoshioka H; Kawakita K. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense - a review. *Gene* 179: 45–51.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00423-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00423-4)
- Foyer CH. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
- Foyer CH; Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 29: 1056–107.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>
- Florentine SK; Raman A; Dhileepan K. 2005. Effects of Gall Induction by *Epiblema Strenuana* on Gas Exchange, Nutrients, and Energetics in *Parthenium Hysterophorus*. *Biocontrol* 50(5): 787–801. <https://doi.org/10.1007/s10526-004-5525-3>

Genty B; Briantais JM; Baker NR. 198). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. BBA - General Subjects 990(1): 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)

Gottlieb OR; Kaplan MAC. 1993. Phytochemical evolution: the redox theory. Nat. Prod. Lett. 2: 171–176. <https://doi.org/10.1080/10575639308043804>

Haiden SA; Hoffmann JH; Cramer MD. 2012. Benefits of photosynthesis for insects in galls. Oecologia 170: 987–997. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2365-1>

Haitz M; Lichenthaler HK. 1988. In: Applications of chlorophyll fluorescence. (ed.) Lichenthaler HK. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,. 249.

Heldt HW; Piechulla B. 2011. Plant biochemistry. Elsevier, London.

Isaias RMS; Oliveira DC; Carneiro RGS. 2011. Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera : Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehbergianus* (Fabaceae ). Botany 89: 581–592. <https://doi.org/10.1139/b11-048>

Isaias RMS; Oliveira DC; Moreira ASFP; Soares GLG; Carneiro RGS. 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1850: 1509 – 1517.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>

Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.

Juszczak I; Baier M. 2014. Quantification of superoxide and hydrogen peroxide in leaves. Methods in molecular biology 1166: 217 – 224.

Kautsky H; Hirsch A. 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften 19: 964-964. <https://doi.org/10.1007/BF01516164>

Kim HJ; Chen F; Wang X; Choi JH. 2006. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(19): 7263–7269. <https://doi.org/10.1021/jf060568c>

- Kraus JE. 2009. Galhas: morfogênese, relações ecológicas e importância econômica. In: Tissot-Squalli, ML (Ed.), *Interações Ecológicas & Biodiversidade*. Unijuí, Ijuí, pp. 109–140.
- Lev Yadun S. 2003. Stem cells in plants are differentia- ted too. *Current Topics in Plant Biology* 4: 93-102.
- Lewis NG; Yamamoto E. 1990. Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 455-96.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.002323>
- Lichtenthaler HK; Buschmann C; Rinderle U; Schmuck G. 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation and Environmental Biophysics* 25(4): 297–308. <http://doi.org/10.1007/BF01214643>
- Lichtenthaler HK; Miehè JA. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Sciece* 2(8): 316–320. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)89954-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)89954-2)
- Lichtenthaler HK; Wallburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591–592.  
<https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Lima SC; Rosa R; Feltran Filho A. 1989. Mapeamento do uso do solo no município de Uberlândia – MG, através de imagens TM/LANDSAT. *Rev. Sociedade e Natureza*. Uberlândia: EDUFU 1(2): 127-145.
- Lütte U; Haridasan M; Fernandes GW; Mattos EA; Trimbom P; Franco AC; Caldas LS; Ziegler H. 1998. Photosynthesis of mistletoes in relation to their hosts at various sites in tropical Brazil. *Trees* 12: 167–174. <https://doi.org/10.1007/s004680050136>
- Mani MS. *Ecology of Plant Galls*, Dr. W. Junk Publishers, The Hague, 1964.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-6230-4>

- Maxwell K; Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Moura MZD; Soares, GLG; Isaias RMS. 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf gallers in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Aust. J. Bot.* 56, 153–160. <https://doi.org/10.1071/BT07131>
- Nishiyama Y; Murata N. 2014. Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery. *Appl. Microbiol Biotechnol* 98: 8777-8796. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6020-0>
- Oliveira DC; Christiano JCS; Soares GLG Isaias RMS. 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev Bras Bot* 29: 657–667. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000400015>
- Oliveira DC; Magalhães TA; Carneiro RGS; Alvim MN; Isaias RMS. 2010. Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma* 242(1-4): 81–93. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0128-6>
- Oliveira DC; Isaias RMS; Moreira ASFP; Magalhães TA; Lemos-Filho JP. 2011a. Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis? *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology* 180(3): 489–95. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.005>
- Oliveira DC; Carneiro RGDS; Magalhães TA; Isaias RMS. 2011b. Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)-Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma* 248(4): 829–37. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0258-x>

Oliveira DC; Isaias RMS. 2010. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *South Afr. J. Bot.* 76: 239–248.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.011>

Oliveira DC; Moreira ASFP; Isaias RMS. 2014. Functional gradients in insect gall tissues: studies on neotropical host plants. In: Santos JC; Fernandes GW (eds.), Springer, 550pp.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-017-8783-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8783-3_3)

Oliveira DC; Isaias RMS; Fernandes GW; Ferreira BG; Carneiro RGS; Fuzaro L. 2016. Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology (in press)*  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.012>

Papageorgiou GC; Govindjee. 2004. (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 818pp.

Papageorgiou GC; Tsimilli-Michael M; Stamatakis K. 2007; *Photosynth. Res.* 94: 275-290.  
<https://doi.org/10.1007/s11120-007-9193-x>

Pavlovič A. 2012. The effect of electrical signals on photosynthesis and respiration, in: Volkov AG. (ed.) *Plant Physiology*, Bratislava, Slovakia. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29110-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29110-4_2)

Pincebourde S; Casas J. 2015. Hypoxia and hypercarbia in endophagous insects: Larval position in the plant gas exchange network is key. *Journal of Insect Physiology (in press)*  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.006>

Price PW. 1997. General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution* 31: 405-420. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1977.tb01021.x>

Price PW; Fernandes GW; Waring GL. 1987. Adaptative nature of insect galls. *Environmental Entomology* 16: 15–24. <https://doi.org/10.1093/ee/16.1.15>

Rossetti S; Bonnatti PM. 2001. In situ histochemical monitoring of ozone-and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiol Biochem* 39:433–442.

[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01250-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01250-5)

Stone GN, Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends. Ecol. Evol.* 18: 512–522. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)

Turner N. 1981. Chapter 3: Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status *Plant and Soil*, 58: 339–366. <https://doi.org/10.1159/000331745>

Wahid A; Farooq M; Siddique KHM. 2014. Implications of oxidative stress for crop growth and productivity. In: Pessarakli M. Ed. *Plant and crop physiology* 3rd edition. CRC Press. 967p. <https://doi.org/10.1201/b16675-32>

Zhou S, Criddle RS, Mitcham EJ 2000. Metabolic response of *Plantinota stultana* pupae to controlled atmospheres and its relation to insect mortality response. *Journal of Insect Physiology*. 46: 1375-1385. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00060-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00060-3)

Tab. 1: Medidas obtidas com o software ImageJ® para quantificar, através de análises histoquímicas, compostos fenólicos e espécies ativas de oxigênio. A porcentagem de área marcada foi avaliada em áreas pré-selecionadas de 0,016 mm<sup>2</sup>. Quanto maior o valor na escala de cinza menor a concentração da substância analisada.

Tab. 2: Teor de pigmentos cloroplastídicos (clorofitas a, b e carotenoides) na folha não galhada e em galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. *Pouteria ramiflora*. Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam estatisticamente com  $P \geq 0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis ( $n = 20 \pm DP$ ).

Tab. 3: Conteúdo hídrico relativo, nível de saturação hídrica, área foliar específica e massa foliar específica das folhas não galhadas e galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *Pouteria ramiflora*. Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam estatisticamente com  $P \geq 0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis ( $n = 60 \pm DP$ ).

Fig. 1: Anatomia e histoquímica da galha de *Ceropsylla* sp. em *Pouteria ramiflora* em secções transversais. A) Corte-branco demonstrando o córtex da galha, evidenciando o desenvolvimento do parênquima clorofiliano (setas); B) Alta concentração de EAO no córtex adaxial da galha, principalmente nas paredes celulares das células dos feixes vasculares e parênquima; C) Detalhe da região lateral do córtex abaxial da galha com intensa lignificação (seta); D) Concentração de compostos fenólicos no córtex adaxial da galha.

Fig 2: Curva de indução de fluorescência demonstrando o efeito Kautsky na folha e galha, no sistema *Ceropsylla* sp. – *Pouteria ramiflora*. O eixo horizontal (X) corresponde ao tempo (s) e o eixo vertical (Y) corresponde à intensidade da emissão de fluorescência ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Curvas verdes representam a fluorescência nos tecidos da galha e as vermelhas na folha não

galhada.  $F_0$  é o momento de fluorescência inicial antes do primeiro pulso saturante, onde a galha exibe uma fluorescência mais intensa que a folha;  $F_m$  representa a fluorescência máxima dos tecidos, durante o primeiro pulso de luz saturante, onde a galha emite uma fluorescência ligeiramente menor;  $F_p$  representa o segundo pulso, onde a emissão de fluorescência de ambos os tecidos é próxima. Entre  $F_p$  e  $F_m$  é ativada uma luz actinica, que promove a fase fotoquímica da fotossíntese. Durante este período, pulsos de luz saturante são emitidos ( $F_{m\_L1}$ ,  $F_{m\_L2}$ ,  $F_{m\_L3}$  e  $F_{m\_L4}$ ). Em  $F_{m\_Lss}$  é emitido um pulso de luz saturante e, sem sequência, uma luz no comprimento vermelho longo é emitida, deixando os centros de reação do fotossistema I abertos.  $F_{m\_D1}$ ,  $F_{m\_D2}$  e  $F_{m\_D3}$ , são emitidos pulsos de luz saturante, ao passo que a luz de comprimento vermelho longo continua açãoada.

Fig. 3: Aspecto geral da superfície adaxial da folha galhada no sistema *Ceropsylla* sp.-*Pouteria ramiflora*, perfil morfológico e emissão de fluorescência; os círculos serrilhados demarcam a região onde a galha ocorre. A) Superfície adaxial da folha com galha; B) Fluorescência inicial indicando maior emissão pelo tecido galhado ( $F_0$ ); C) Fluorescência máxima demonstrando níveis semelhantes entre o tecido não galhado e tecido galhado ( $F_m$ ); D) Rendimento quântico potencial, onde se percebe que o tecido não galhado possui maior rendimento que a galha ( $QY_{max}$ ); E) Dissipação não fotoquímica durante o último pulso de luz saturante sob emissão da luz actínica, onde se percebe uma maior eficiência de dissipação de calor pelo tecido não galhado em relação ao galhado ( $NPQ_{Ln}$ ); F) Dissipação não fotoquímica durante pulso de luz saturante após o desligamento da luz actínica, onde se percebe uma maior eficiência de dissipação de calor pelo tecido não galhado em relação ao galhado ( $NPQ_{Lss}$ ).

Fig. 4: Emissão de fluorescência dos tecidos não galhados e tecidos galhados no sistema *Ceropsylla* sp. – *Pouteria ramiflora*. A) Índice de vitalidade dos tecidos da folha galhada

durante o último pulso de luz saturante sob emissão da luz actínica, demonstrando maior vigor do tecido não galhado em relação ao galhado ( $Rfd_{Ln}$ ); B) Índice de vitalidade dos tecidos da folha galhada durante o pulso de luz saturante no momento após a inativação da luz actínica, demonstrando maior vigor do tecido não galhado em relação ao galhado ( $Rfd_{Lss}$ ); C) Rendimento quântico efetivo no tecido não galhado e tecido galhado, indicando que os dois tecidos têm capacidade fotossintética ( $QY_{Ln}$ ); D) Rendimento quântico efetivo dos tecidos no momento após a inativação da luz actínica, demonstrando que não há diferenças significativas entre o tecido não galhado e galhado ( $QY_{Lss}$ ).

Tab. 1

	Área marcada (%)		Média na escala de cinza		Tab. 2
	Fenólicos	EAO	Fenólicos	EAO	
Côrtez adaxial	97,69 ± 3,2	87,89 ± 16,31	62,92 ± 12,13	69,73 ± 14,51	
Côrtez abaxial (lateral)	23,23 ± 7,04	3,07 ± 1,75	200 ± 28,59	188,58 ± 30,09	
Côrtez abaxial (adjacente à câmara)	99,20 ± 1,27	96,77 ± 2,93	43 ± 17,85	49,24 ± 14,14	
Tecido vascular	95,94 ± 3,37	99,39 ± 1,22	75,09 ± 13,23	34,51 ± 13,37	

	Clorofilas totais		Carotenoides		Clor. a/b	Carot/clor.
	mg g <sup>-1</sup>	µg cm <sup>-2</sup>	mg g <sup>-1</sup>	µg cm <sup>-2</sup>		
Tecido não galhado	2,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	124,6 ± 36,7 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	29,9 ± 11,0 <sup>a</sup>	2,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,23 <sup>a</sup>
Galha	2,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	29,1 ± 7,1 <sup>b</sup>	0,49 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,0 ± 2,3 <sup>b</sup>	2,4 ± 1,8 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,25 <sup>a</sup>
<i>P</i>	0,0007	<0,0001	0,0068	<0,0001	0,076	0,914

Tab. 3

	CHR (%)	ΔHsat (%)	AFE (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	MFE (g cm <sup>-2</sup> )
Folha não galhada	72,46 ± 7,1 <sup>a</sup>	27,55 ± 7,2 <sup>a</sup>	151,8 ± 17,7 <sup>a</sup>	0,007 ± 0,0008 <sup>a</sup>
Galha	69,1 ± 7,1 <sup>a</sup>	30,9 ± 11,6 <sup>a</sup>	71,55 ± 18,45 <sup>b</sup>	0,015 ± 0,003 <sup>b</sup>
<i>P</i>	0,11	0,11	<0,0001	0,001

Fig. 1

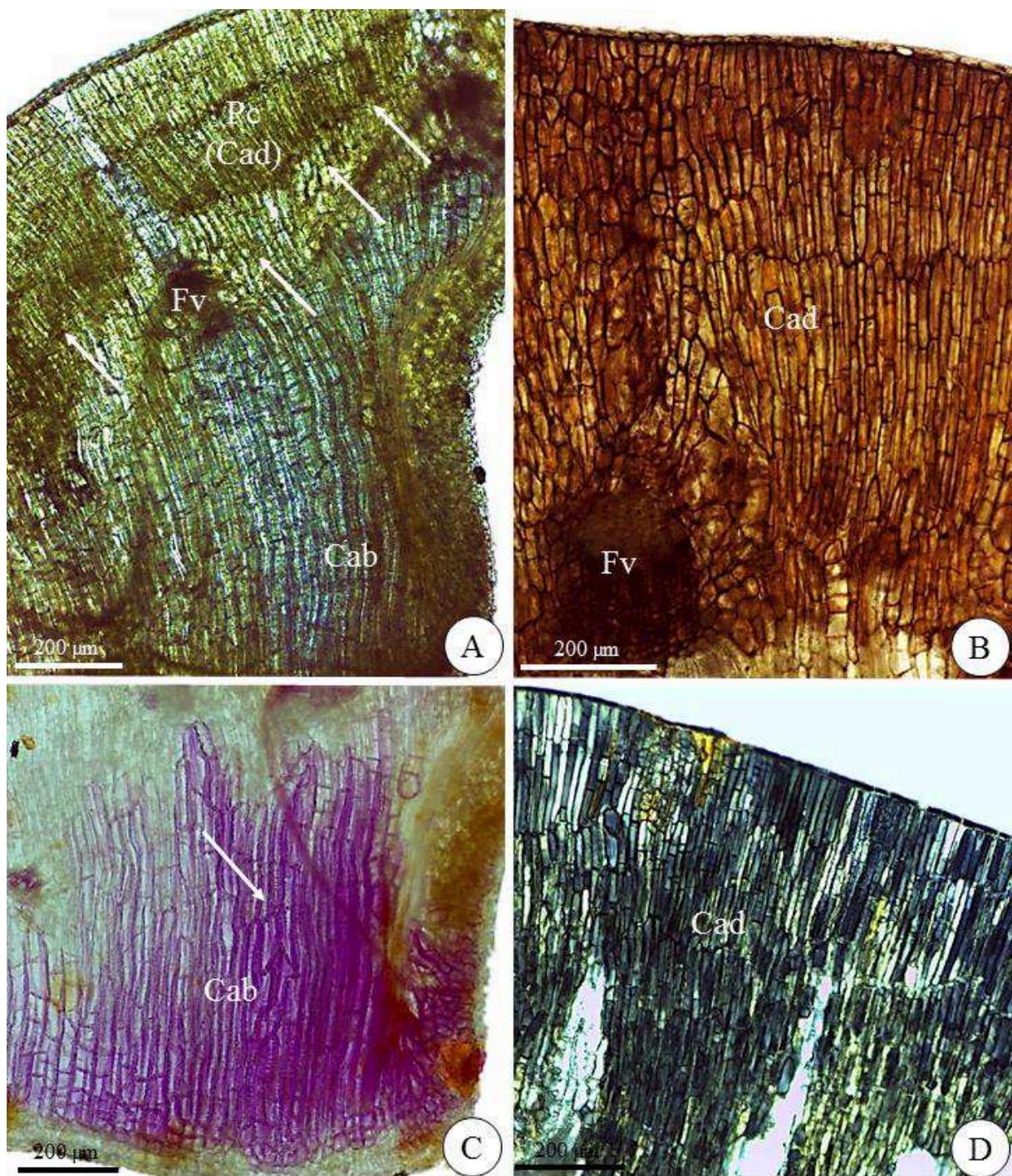


Fig. 2

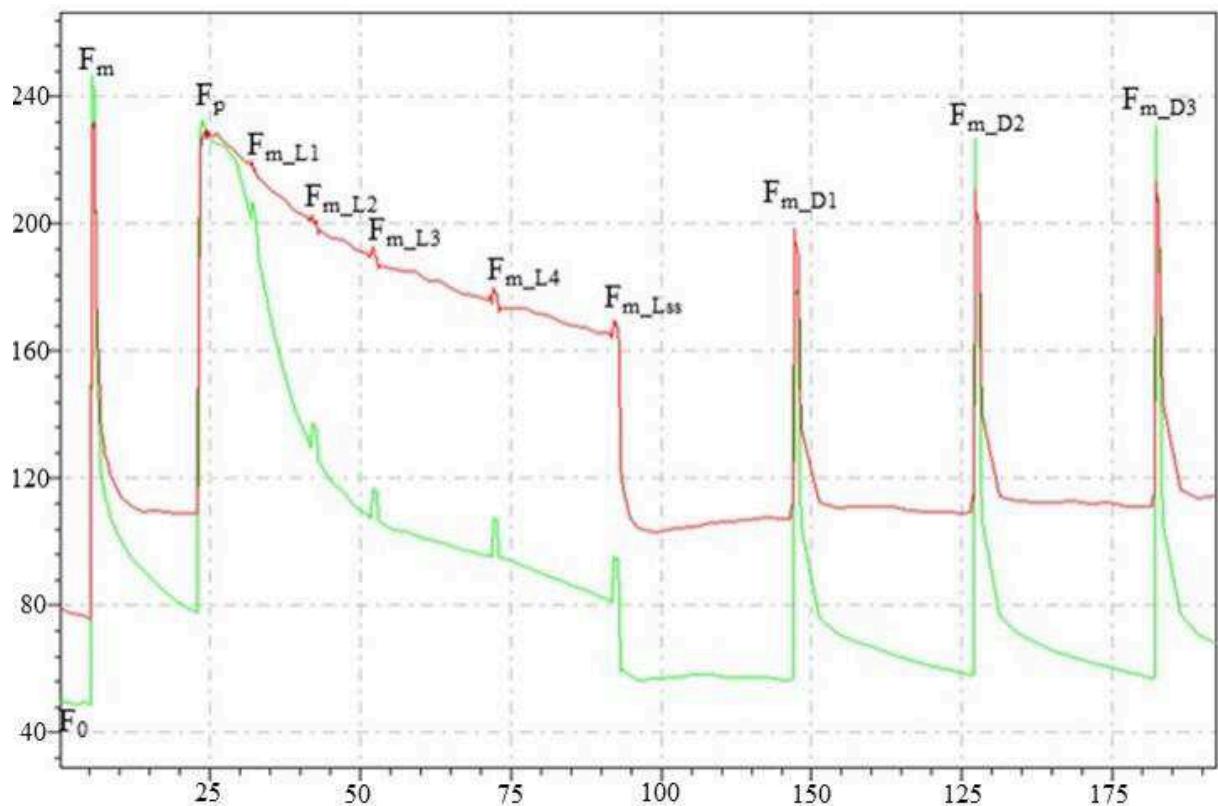


Fig. 3

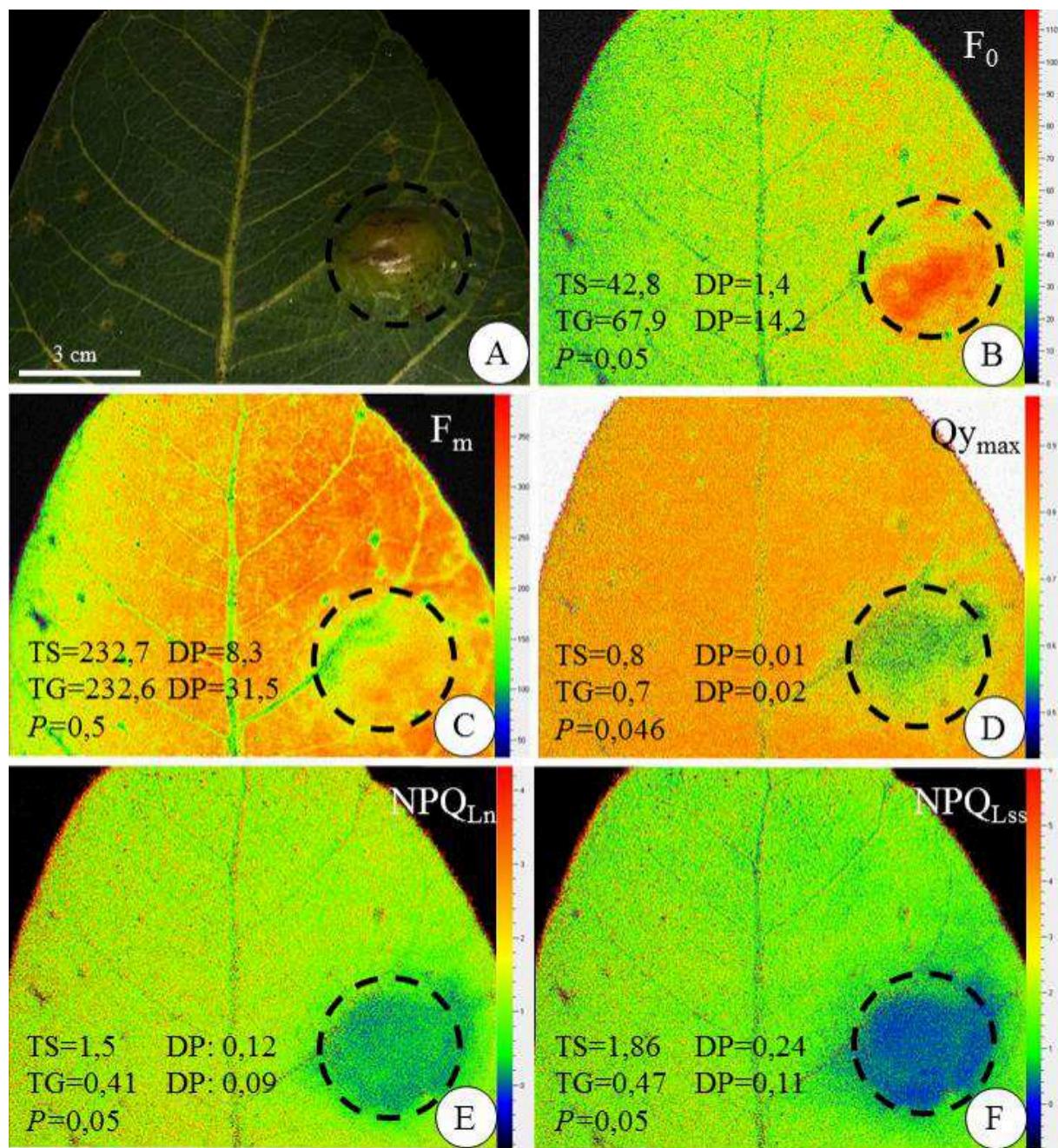
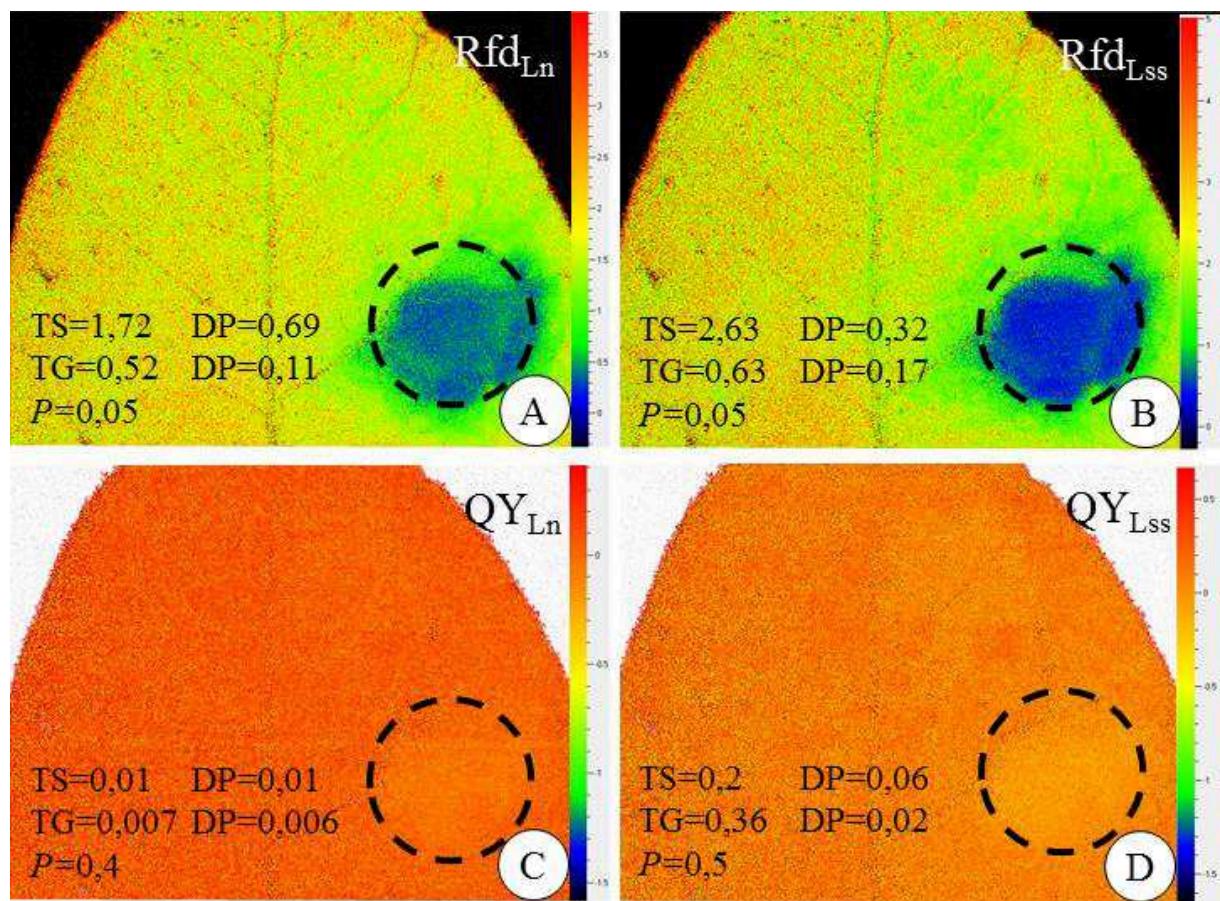


Fig. 4



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

As galhas induzidas por Hemiptera desenvolvem tecidos estruturalmente simples, entretanto, histoquimicamente estes tecidos podem se mostrar complexos. Nas galhas induzidas por *Ceropsylla* sp. em *P. ramiflora*, a formação de gradientes histoquímicos, claramente evidenciam o acúmulo de EAO e mecanismos de dissipação do estresse oxidativo. Além dos impactos químicos, observam-se alterações no rendimento fotossintético, provavelmente devido à degradação dos aparelhos fotossintéticos. Entretanto, ainda que haja um déficit fotoquímico, a galha ainda mantém a capacidade fotossintética do tecido, o que é essencial para a manutenção da mesma. O impacto resultante da indução das galhas, provocado pelo acúmulo de EAO e o restabelecimento da homeostase redox nos tecidos da galha, pode contribuir para estudos posteriores envolvendo galhas.

Como perspectivas, análises microquímicas podem consistir em ferramentas interessantes para se quantificar o acúmulo de substâncias nos tecidos da galha, e assim dimensionar o grau do estresse.

- Testes imunocitoquímicos de pectinas e celulose podem fornecer um melhor entendimento sobre os padrões de alongamento celular, e, consequentemente sobre a morfogênese do órgão neoformado.
- Estudos sobre o sincronismo entre a biologia do inseto e a fenologia da hospedeira concedem importantes informações acerca de estratégias reprodutivas do inseto, bem como o melhor entendimento do valor adaptativo para o galhador.
- A investigação da ação de enzimas pode auxiliar na compreensão dos processos metabólicos que acontecem nos tecidos galhados.
- Ensaios sobre o particionamento de carbono e nitrogênio entre as folhas e tecidos não galhados podem permitir uma avaliação sobre a translocação de metabólitos na hospedeira,

e assim fornecer informações sobre a relação fonte – dreno nos sistemas galhador – planta hospedeira.