



Universidade Federal de Uberlândia - MG

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Gradientes funcionais em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (HEMIPTERA) em *Aspidosperma tomentosum* Mart. (APOCYNACEAE): Composição da parede celular e metabólitos

Discente: Vitor Campana Martini (Pós-graduando UFU)

Docente: Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira (Orientadora UFU)



Universidade Federal de Uberlândia - MG

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Gradientes funcionais em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (HEMIPTERA) em *Aspidosperma tomentosum* Mart. (APOCYNACEAE): Composição da parede celular e metabólitos

Discente: Vitor Campana Martini (Pós-graduando UFU)

Docente: Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira (Orientadora UFU)


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

Gradientes funcionais em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (HEMIPTERA) em *Aspidosperma tomentosum* Mart. (APOCYNACEAE): Composição da parede celular e metabólitos

Vitor Campana Martini

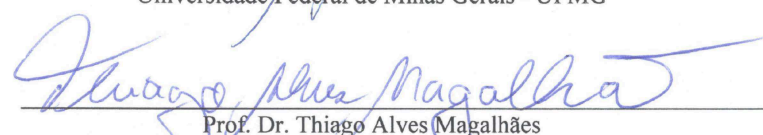
COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:


Prof.ª Dra. Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira - Orientadora
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Examinadores:


Prof.ª Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG


Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Dissertação aprovada em: 02 / 02 / 2017

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

M386g
2018 Martini, Vitor Campana, 1989
 Gradientes funcionais em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) em *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae): composição da parede celular e metabólitos / Vitor Campana Martini. - 2018.
 89 f. : il.

 Orientadora: Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.711>
 Inclui bibliografia.

 1. Botânica - Teses. 2. Hemíptera - Teses. 3. Histoquímica - Teses. 4. Fisiologia - Teses. I. Moreira, Ana Silvia Franco Pinheiro. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. III. Título.

CDU: 581

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro ao Projeto e pela bolsa de estudos, ao INBIO da UFU, e seus laboratório LADEVI e LAFIVE, pela estrutura disponibilizada. À todos os professores e estudantes que me ajudaram em qualquer parte, ou que eu pude trabalhar junto. À secretaria divulgando material, e me ajudando a cumprir os prazos. Agradeço também à banca por se disponibilizar a participar dessa avaliação.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
Introdução geral.....	3
Citologia e histoquímica da galha induzida por <i>Pseudophacopteron longicaudatum</i> (Hemiptera) em folhas de <i>Aspidosperma tomentosum</i> (Apocynaceae)	9
Introdução.....	10
Material e métodos	13
Resultados	14
Discussão.....	16
Conclusão	20
Variação na composição pécica da parede celular durante o desenvolvimento de galhas foliares em <i>Aspidosperma tomentosum</i> (Apocynaceae) induzida por <i>Pseudophacopteron longicaudatum</i> (Hemiptera)	35
Introdução.....	37
Material e métodos	39
Resultados	40
Discussão.....	42
Conclusão	44
Danos e performance fotossintética em galhas foliares induzidas por <i>Pseudophacopteron longicaudatum</i> (Hemiptera) em <i>Aspidosperma tomentosum</i> (Apocynaceae)	55
Introdução.....	57
Material e métodos	59
Resultados	61
Discussão.....	64
Conclusão	69
Considerações finais.....	81

Resumo

Insetos galhadores são capazes de manipular os tecidos da planta hospedeira formando galhas, estruturas consideradas órgãos vegetais neoformados. O estresse celular biótico causado pelo galhador envolve uma série de alterações na composição e conformação da parede, altera os padrões citológicos e histoquímicos da hospedeira, e por consequência confere alto valor adaptativo ao inseto. *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera: Psyllidae) induz galhas foliares em *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae), que exhibe processo de hiperplasia e hipertrofia desenvolvendo formato ovalado. Neste estudo, espera-se encontrar um gradiente citológico, histoquímico, e alterações do metabolismo fotossintético na galha, assim como já observado em outros sistemas neotropicais. Como resultado, foi observado que o impacto causado pelo inseto galhador durante o desenvolvimento da galha altera os padrões citológicos e histoquímicos da hospedeira, aumentando a atividade das células próximas à região de alimentação da ninfa, e acumulando substâncias na região adaxial da galha. A parede celular apresenta modificação principalmente na metilesterificação das HGAs, na galha as HGAs permanecem com alta metil-esterificação quando jovens, enquanto que nos tecidos não galhados foram encontradas HGAs de baixa metil-esterificação na fase jovem. Por fim, o desenvolvimento da galha também altera as atividades metabólicas, de forma que sua capacidade fotossintética se mostra debilitada. Com a fotossíntese debilitada e a formação de um parênquima por hiperplasia e hipertrofia, galha induzida por *P. longicaudatum* em *A. tomentosum* se configura como um dreno de fotoassimilados.

Palavras-chave: Galhas, Histoquímica, Citologia, Fotossíntese

Abstract

Galls insects are capable to alter plants tissues to a different future, and create a new organ called gall. The stress made by this biotic interaction involves a chain of modifications in the conformations and composition of the cell wall, changing citologic and histochemistry patterns from his host, what increase the adaptativa value of the insect. *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera: Psyllidae) induce gall in *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae), the development infested tissue start hypertrophy and hyperplasia, forming an oval gall, and, is expected to have citologic, histochemistry gradient, and a fotosynthetic change, as observed in others neotropical systems. The injure made by the gall insect during the gall development alters the citologic and histochemistry patterns from the host, boosting the cell activity close to ninfa feeding area. The photosynthetic yield seems to be weakened, and the cell wall presents HGAs high metylesterified. Although the photosyntesis is weakened and parenchyma is formed, *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera: Psyllidae) induced galls don't configure as a photoassimilated drain.

Keywords: Galls, Histochemistry, Citology, Photosynthesis

Introdução geral

O estresse biótico e abiótico pode causar mudanças no desenvolvimento vegetal. Como exemplo dessas mudanças geradas por fatores bióticos, temos a formação de galhas, resultado da interação geralmente entre um inseto galhador e uma planta hospedeira (Mani 1964). Tal interação causa inúmeras mudanças citológicas, bioquímicas e fisiológicas do órgão hospedeiro, que fornece ao galhador um ambiente protegido e favorável para o seu desenvolvimento (Castro *et al.* 2013).

A nova estrutura que forma a galha é mantida pelo estímulo constante do galhador (Mani 1964), seu hábito alimentar, fluidos da oviposição, e fitohormônios como ácido jasmônico, ácido salicílico, etileno, auxinas, citocininas, além de espécies reativas de oxigênio (ROS), são os gatilhos para o estabelecimento e a formação da galha (Hori 1992; Giron *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2016). Galhas induzidas por insetos causam uma rediferenciação para formação de tecidos com característica e funções típicas de um novo órgão (Raman 2007; Oliveira *et al.* 2010). A modificação ultraestrutural da célula, alterações químicas geram grande complexidade estrutural e histoquímica dos tecidos de uma galha, essas mudanças, em geral, dependem da *taxa* do inseto galhador, da forma da galha, e do hábito alimentar do inseto (Oliveira *et al.* 2016). A modificação estrutural envolve uma série de passos citológicos, dentre os quais as alterações na composição e conformação da parede celular são determinantes para a forma final da galha (Formiga *et al.* 2013; Carneiro *et al.* 2014a; Magalhaes *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2014). A nova organização e composição tecidual estabelece um novo balanço redox na galha (Isaias *et al.* 2015), podendo comprometer diretamente a fotossíntese do tecido galhado e sua movimentação de soluto.

A forma como os insetos se alimentam determina um novo gradiente histoquímico formado no tecido da hospedeira; Insetos galhadores com aparelhos bucais

mastigadores causam danos em diferentes direções e consomem rapidamente as células (Bedetti *et al.* 2013; Vecchi *et al.* 2013); insetos galhadores com hábito sugador (Hemiptera) se alimentam durante dias sem trocar de lugar, dando origem a diferentes morfotipos de galhas (Bronner 1992). Apesar da literatura discutir a não formação de tecido nutritivo em galhas de mastigadores (Bronner 1992), Ferreira & Isaias (2013) encontraram este tecido em galhas induzidas por Lepidoptera em *Marcetia taxifolia*. Do mesmo modo, em galhas de sugadores nas quais não é esperada a formação de um tecido nutritivo propriamente dito (Bronner 1992), foi encontrado acúmulo de metabólitos primários (Hartley 1998; Castro *et al.* 2012; Castro *et al.* 2013; Malenovsky *et al.* 2015; Carneiro & Isaias 2015).

Galhas induzidas por insetos têm como característica marcante hipertrofia e hiperplasia de todos os tecidos, modificando a parede celular vegetal (Formiga 2013). Esta é composta por celulose e por elementos não celulósicos, como as pectinas, as hemiceluloses e as proteínas (Willats *et al.* 2000), sendo as pectinas peças chave no desenvolvimento do tecido (Knox 1997). As pectinas são polissacarídeos, e um dos principais constituintes da parede. Seu grau de metil-esterificação determina o estado físico e conseqüentemente a funcionalidade da parede celular (Knox 1997; Albersheim *et al.* 1996; Wolf & Greiner 2012). A rápida expansão do tecido e das células causa uma variação no grau de metil-esterificação das pectinas (Formiga *et al.* 2013; Carneiro *et al.* 2014a; Carneiro *et al.* 2014b; Dheilly 2016).

Aspidosperma tomentosum Mart. (Apocynaceae) (peroba-do-campo) possui ampla distribuição no Cerrado e sofre indução de galha pelo *Pseudophacopteron longicaudatum* Mart. em suas folhas. Dentre as características importantes do hospedeiro destaca-se a presença de laticíferos, com seiva leitosa, glicosídeos cianogênicos, vários alcalóides e frequentemente iridóides (Judd *et al.* 2002). A

brotação foliar tem início em sincronia com a oviposição do galhador *P. longicaudatum* no mês de agosto com as chuvas. O desenvolvimento foliar da *A. tomentosum* começa com muitos tricomas tectores, epiderme uniestratificada e células isodiamétricas (Fuzaro 2015). Na fase madura, ocorre uma grande deposição de cutícula e duas camadas justapostas de parênquima paliádico na face adaxial da folha. Há formação de um parênquima lacunoso, com grandes espaços intercelulares, projetado para a face abaxial. O desenvolvimento da galha começa na face abaxial da folha jovem, quando os tecidos ainda estão se diferenciando. Ocorre uma hipertrofia e hiperplasia de todos os tecidos, e as células sofrem um intenso processo de alongamento e divisão no parênquima lacunoso formando o parênquima cortical da galha. A epiderme faz divisões anticlinais que permitem o fechamento da galha, e também diminui o número de tricomas. Em seu estágio final ela apresenta uma forma globular e verde, preenchida principalmente por parênquima cortical (Fuzaro 2015).

Considerando a formação da galha induzida por *P. longicaudatum* em folhas de *A. tomentosum*, junto com todas as alterações estruturais observadas, o presente trabalho propôs as seguintes perguntas; A ação do galhador *P. longicaudatum* (habito alimentar sugador) gera alto estresse oxidativo capaz de influenciar na formação de um gradiente citológico e histoquímico? Há a formação de um tecido nutritivo? Existe variação no grau de metil-esterificação das HGAs, e de outras proteínas de parede durante o desenvolvimento da galha? E qual seria o papel delas na estabilidade estrutural da galha? As alterações estruturais e o gradiente bioquímico podem comprometer diretamente a fotossíntese do tecido galhado e a movimentação de solutos?

Referências

Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ. 1996. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell

- walls of all higher plants. In: Visser J, Voragen AGJ (eds.) Pectins and Pectinases. Amsterdam, Elsevier Sciences B.V. p. 47-55.
- 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 unguolata* system. *Revista Brasileira de Biologia* 11: 242–249.
- 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*. New York, Oxford University Press. p. 118–140.
- 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: plv086.
- Carneiro RGS, Oliveira DC, Isaias RMS. 2014a. Developmental anatomy and immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium myrtoides* (Myrtaceae) towards the globoid galls of *Nothotrioza myrtoidis* (Triozidae) *Plant Cell Reports* 33: 2093–2106.
- Carneiro RGS, Castro AC, Isaias RMS. 2014b. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany* 92: 97–104.
- Castro CA, Leite GLD, Oliveira DC, Isaias RMS. 2012. Morphological patterns of a hymenopteran gall on the leaflets of *Caryocar brasiliensis* Camb. (Caryocaraceae). *American Journal of Plant Sciences* 3: 921-929.
- 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: 1891–1900.

- Dheilly E, Gall SL, Guillou M, Renou J, Bonnin E. 2016. Cell wall dynamics during apple development and storage involves hemicellulose modifications and related expressed genes. *BMC Plant Biology* 16:201.
- Ferreira B, Isaias RMS. 2013. Developmental stem anatomy and tissue redifferentiation induced by a galling lepidoptera on *Marcetia taxifolia* (melastomataceae). *Botany* 91: 753-760.
- 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: 899-908.
- Fuzaro L. 2015. Padrões de alongamento celular durante a ontogênese foliar e de galhas induzidas por *Pseudophacopteron* sp. em *Aspidosperma tomentosum* Mart. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Uberlândia.
- Giron D, Frago E, Glevarec G, Pieterse CMJ, Dicke M. 2013. Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional Ecology* 27: 599-609.
- Hartley SE. 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113: 492-501.
- Hori K. 1992. Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In Shorthouse JD & Rohfritsch O. (eds.) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, p:157-170.
- 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* 1850: 1509–1517.

- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Knox JP. 1997. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology* 171: 79–120.
- Mani MS. 1964. Ecology of plant galls. The Hague: Dr. W. Junk Publishers.
- 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: 747–753.
- Malenovský I, Burckhardt D, Queiroz DL, Isaias RMS, Oliveira DC. 2015. Descriptions of two new *Pseudophacopteron* species (Hemiptera: Psylloidea: Phacopteronidae) inducing galls on *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 55: 513-538.
- 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: 81–93.
- Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMS. 2014. Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall, *Plos One* 9: e94588.
- 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.

- Raman A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92: 748-757.
- 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: 1363-1368.
- Willats WGA, Limberg G, Buchholt HC, VanAlebeeck GJ, Benen J, Christensen TMIE, Visser J, Voragen A, Mikkelsen JD, Knox JP. 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defines oligossaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research* 327: 309–320.
- Wolf S, Greiner S. 2012. Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249: 169-175.

**Citologia e histoquímica da galha de *Pseudophacopteron longicaudatum*
(Hemiptera) em folhas de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)**

Vitor Campana Martini¹, Ana Silvia Franco Pinheiro Moreira², Letícia de Almeida

Gonçalves, Denis Coelho de Oliveira¹

¹ *Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Laboratório de Anatomia,
Desenvolvimento Vegetal e Interações;*

² *Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Laboratório de Fisiologia
Vegetal;*

² *Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de
Botânica*

Autor para correspondência: vitorcmartini@gmail.com

Resumo

Insetos galhadores são capazes de manipular os tecidos da planta hospedeira formando galhas, estruturas consideradas órgãos vegetais neoformados. O estresse biótico gerado pelo galhador altera os padrões citológicos e histoquímicos da hospedeira, e por consequência confere alto valor adaptativo ao inseto. *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera: Psyllidae) induz galhas foliares em *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae) e, embora esta família de inseto galhadores geralmente não induz a formação de tecido nutritivo, espera-se que haja um gradiente citológico e histoquímico na galha capaz de acumular substâncias nutritivas que serão utilizadas para manutenção da maquinaria celular, assim como já observado em outros sistemas neotropicais. Para verificar a presença deste gradiente, análises de microscopia eletrônica de transmissão e testes histoquímicos (amido, açúcares redutores, proteínas, lipídeos e espécies ativas de oxigênio) foram realizadas em tecidos jovens, maduros e senescentes de galhas e folhas não galhadas. Na galha jovem ocorre hipertrofia celular, com as células de paredes delgadas e sinuosas, além de poucos espaços intercelulares. Na galha madura ocorre aumento do número e tamanho dos corpos multivesiculares, fragmentação do vacúolo, cloroplastos com muitos plastoglóbulos e grãos de amido. Foi observado acúmulo de amido especialmente na galha madura, resultado que indica baixa atividade metabólica nesta fase. Proteínas, lipídeos e açúcares redutores foram detectados no tecido clorofiliano e estariam relacionados à manutenção da maquinaria celular da galha. As espécies ativas de oxigênio foram detectadas nas paredes celulares e no protoplasma de células mais externas do tecido não galhado e na epiderme interna da galha. Desta forma, o estresse gerado pela presença do inseto galhador altera os padrões citológicos e histoquímicos da hospedeira e nota-se a formação de um gradiente histoquímico em geral projetado para face adaxial da galha.

Palavra-chave: galhas foliares, espécies reativas de oxigênio, gradiente citológico, *Aspidosperma*.

Introdução

Durante o processo de evolução entre insetos e plantas, surgiu uma guilda extremamente especializada de herbívoros capaz de manipular os tecidos da planta hospedeira em seu benefício, formando um novo órgão vegetal, a galha (Mani 1964; Rohfritsch & Anthony 1992; Stern 1995; Shorthouse *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2016). O desenvolvimento desta nova estrutura é mantido pelo estímulo constante do inseto galhador (Mani 1964), como o hábito alimentar, fluidos da oviposição, fitohormônios como ácido jasmonato, ácido salicílico, etileno, auxinas, citocininas, e espécies ativas de oxigênio (EAO); gatilhos iniciais para a formação e estabelecimento da galha (Hori 1992; Giron 2013; Oliveira *et al.* 2015). O desenvolvimento de galhas induzidas por insetos apresenta características marcantes como hiperplasia do tecido e hipertrofia celular, desorganização ultraestrutural da célula, alterações químicas e, muitas vezes, rediferenciação para formação de tecidos com característica e funções típicas deste novo órgão (Raman 2007; Oliveira *et al.* 2010).

A complexidade estrutural e histoquímica dos tecidos de uma galha depende, em geral, do *taxa* do inseto galhador, da morfologia da galha, e do hábito alimentar do inseto (Oliveira *et al.* 2016). Guildas de insetos galhadores com aparelhos bucais mastigadores (Bedetti *et al.* 2013; Vecchi *et al.* 2013) causam estímulos em diferentes direções e consomem rapidamente as células, assim, a formação de um tecido nutritivo não é esperada (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992). Entretanto, a ocorrência deste tecido nutritivo foi reportada em galhas induzidas por mastigadores na região Neotropical (Ferreira & Isaias 2013). O tecido nutritivo apresenta duas áreas distintas uma mais externa que acumula amido e açúcares redutores, e outra mais interna que acumula lipídeos (Meyer 1987; Rohfritsch 1992; Bronner 1992; Oliveira *et al.* 2015). Insetos galhadores com hábito sugador (Hemiptera) se alimentam durante dias sem

trocar de lugar, se contrapondo ao rápido consumo das células por outros grupos. Nestas galhas os tecidos se desenvolvem e acumulam grande quantidade de fotoassimilados e, por isso, são caracterizadas como drenos (Hartley 1998; Castro *et al.* 2012). Galhas induzidas por insetos sugadores a princípio não desenvolvem tecido nutritivo propriamente dito (Bronner 1992). Análises histoquímicas mostram, por exemplo, o acúmulo de vários metabólitos primários em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) em *Aspidosperma macrocarpon* Mart. (Apocynaceae) (Castro *et al.* 2013). De fato, embora *P. longicaudatum* possua hábito alimentar sugador e não forme tecido nutritivo, espera-se que um alto estresse oxidativo seja estabelecido e consequentemente um gradiente citológico e histoquímico. Apesar de se esperar o acúmulo de substâncias nutritivas em direção à câmara ninfal, estas seriam utilizadas na manutenção da maquinaria celular.

Aspidosperma tomentosum Mart. (Apocynaceae) possui ampla distribuição no Cerrado. Dentre as características importantes da família destaca-se a presença de laticíferos com seiva leitosa, onde se encontram glicosídeos cianogênicos, alcalóides e frequentemente iridóides (Judd *et al.* 2002). A folha no início do desenvolvimento possui muitos tricomas tectores, protoderme uniestratificada e células isodiamétricas. Na fase madura, foi verificada uma grande deposição de cutícula e duas camadas justapostas de parênquima paliádico na fase adaxial, além de formação de um parênquima lacunoso com grandes espaços intercelulares na face abaxial. A indução da galha acontece depois da expansão foliar e queda dos tricomas, com a oviposição na parte abaxial da folha. O desenvolvimento da galha segue com grande divisão celular na região intralaminar da folha, diminuindo drasticamente os espaços intracelulares (Fuzaro 2015). Neste momento, nosso objetivo é avaliar quais as modificações

citológicos do estresse oxidativo gerado pelo galhador durante o desenvolvimento da galha e, se há formação de um gradiente citológico e histoquímico nos tecidos.

Material e métodos

A população de *Aspidosperma tomentosum* utilizada neste estudo localiza-se na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), situada a oeste do perímetro urbano de Uberlândia, MG (18°60'S – 48°O), na Região do Triângulo Mineiro. Todos os indivíduos marcados possuem galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera: Psyllidae). A reserva possui 127 ha onde predomina a vegetação de cerrado sentido restrito (Lima *et al.* 1989), entre outros tipos fisionômicos.

Análises citológicas em microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de tecido não galhado (TNG) e galhas, em diferentes estágios de desenvolvimento, foram coletadas e fixadas em Karnovsky 4% 0,1M (pH 7.2) por 24 horas (Karnovsky 1965, modificado para tampão fosfato) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.2). As amostras foram desidratadas em série de acetona e embebidas com resina Epon Embed-812 (Cotta-Pereira *et al.* 1976). Secções transversais ultrafinas foram contrastadas com acetato de urânio a 2% (20 min), lavadas duas vezes com água destilada, imersas em solução de citrato de chumbo 2% (6 min), e lavadas novamente duas vezes com água destilada. As análises da ultraestrutura foram realizadas usando microscópio eletrônico de transmissão (JEM 2100, Jeol, United States), equipado com espectrômetro dissipador de energia raio-x (Thermo Fisher Scientific Inc., United States).

Análises histoquímicas

Amostras de material recém-coletado, não galhado e galhas em diferentes estágios de desenvolvimento, foram submetidos a testes histoquímicos padronizados de acordo com a Tabela 1.

Resultados

Características gerais do sistema galhador-planta hospedeira

O inseto galhador *Pseudophacopteron longicaudatum* induz galhas na face abaxial de folhas jovens de *Aspidosperma tomentosum*, logo após o início da queda dos tricomas. A galha cresce e se desenvolve concomitantemente ao processo de desenvolvimento e maturação foliar. Em seu estágio de maturação apresenta protuberância para ambas as faces da folha (Figura 1A), com coloração verde, abertura voltada para face abaxial e abrigando apenas um indivíduo (Figura 1B).

Análises citológicas

Na folha não galhada jovem, duas regiões cito-histológicas são bem delimitadas, o parênquima paliçádico e o lacunoso (Figura 2A). As células do parênquima paliçádico possuem cloroplastos com sistema de membranas pouco desenvolvidos (Figura 2B). As células do parênquima lacunoso apresentam vacúolos maiores. Na folha madura, o vacúolo ocupa grande parte do volume das células do parênquima paliçádico, os cloroplastos assumem posição periférica e o seu sistema de membrana é bem desenvolvido, com plastoglóbulos associados (Figura 2C). Há ocorrência de muitas mitocôndrias, e dentro dos vacúolos são encontrados corpúsculos multivesiculares (Figura 2D).

Na galha jovem é possível observar a hipertrofia celular e a hiperplasia dos tecidos, as células mais distais à câmara ninfal são maiores, e nota-se um aumento do tamanho do vacúolo nas células do parênquima lacunoso que apresentam paredes celulares finas e sinuosas (Figura 3A). Em algumas regiões ocorre espessamento da parede (Figura 3D) e redução dos espaços intercelulares. O número de cloroplastos observados diminui, e estas organelas apresentam grande quantidade de plastoglôbulos (Figura 3B). Observa-se ainda muitas mitocôndrias associadas a estes cloroplastos (Figura 3B). É observado grande quantidade de corpos multivesiculares (Figura 3C). As células mais próximas à câmara ninfal têm seu vacúolo aparentemente fragmentado, e o protoplasma apresenta diferentes corpos multivesiculares (Figura 3D). O parênquima clorofiliano da galha possui menor número de cloroplastos, entretanto, são observados muitos plastoglôbulos e um desarranjo do sistema de membranas do tilacóide (Figura 3E). Amiloplastos, mitocôndria e peroxissomos também são observados. O tecido próximo ao sítio de alimentação do inseto possui poucos espaços intercelulares, com paredes sinuosas e sistema de membranas com aspecto deteriorado (Figura 3F).

Análises de Histoquímica

Uma síntese dos resultados das análises histoquímicas encontra-se na tabela 2 (Figura 4). No TNG, a parede celular e o protoplasma das células mais externas da nervura central mostram maior reação para EAO. Proteínas aparecem principalmente nas células do parênquima clorofiliano e nos feixes vasculares, especialmente no floema. Lipídios, evidenciados por sudan III, ocorrem por toda a região abaxial e adaxial da folha na cutícula, e também na nervura principal. Grãos de amido, foram evidenciados nas células próximas aos vasos do xilema presente na nervura principal.

Na galha, as espécies ativas de oxigênio (EAO) foram encontradas em todos os estágios de desenvolvimento de todos os tecidos. A parede celular é o principal sítio de

reação junto com os tecidos clorofilianos. Algumas células da epiderme adjacente à câmara ninfal também tiveram seu protoplasto marcado (Figura 5A). Grãos de amido foram detectados no ápice da câmara ninfal e nas regiões distais, congruentes com os feixes vasculares da galha jovem (Figura 5B). Na galha madura notou-se um gradiente de amido que diminui em direção a câmara ninfal (Figura 5C), desaparecendo na galha senescente. Os açúcares redutores foram detectados ao longo dos feixes vasculares na galha jovem e madura (Figura 5D). O teste com azul de bromofenol indicou presença de proteínas próximas à câmara ninfal da galha madura (Figura 6A), e congruente com os tecidos clorofilianos. Sua distribuição é bem intensa nas fases jovem e madura, entretanto, quando a galha está senescente a reação para proteínas se limita ao feixe vascular que corta o órgão (Figura 6B). Gotículas de lipídeo apresentaram distribuição centrífuga em direção à câmara ninfal e pelo parênquima na galha madura (Figura 6C). Durante a senescência, gotículas lipídicas se restringem ao tecido clorofiliano e cutícula (Figura 6D). Na galha madura, nota-se a formação de gradientes histoquímicos especialmente na região dos tecidos vasculares (Figura 4).

Discussão

P. longicaudatum altera o padrão citológico e histoquímico dos tecidos foliares sadios durante o desenvolvimento da galha em *A. tomentosum*. Entre os sintomas citológicos do estresse gerado pelo galhador destacam-se a formação de paredes finas e sinuosas, plastoglóbulos nos cloroplasto e corpos multivesiculares nas células da galha. Há formação de um gradiente de amido, açúcares redutores e proteínas na galha que está, em geral, relacionado a manutenção da maquinaria celular da galha.

Sintomas citológicos do estresse oxidativo gerado pelo inseto na galha

A presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), detectada através de testes histoquímicos, foi marcante em todos os tecidos da galha induzida por *P.*

longicaudatum em folhas de *A. tomentosum*, especialmente próximos à câmara ninfal. O estresse induzido pelo galhador é discutido na literatura como sendo o gatilho inicial para a indução e estabelecimento de um gradiente histoquímico e citológico na galha (Isaias *et al.* 2016; Oliveira *et al.* 2016). Assim, vários sintomas citológicos deste estresse oxidativo podem ser observados com destaque para a presença de plastoglóbulos nos cloroplastos de galhas intralaminares induzidas por Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* (Oliveira *et al.* 2011), em folhas de *Marcetia taxiflora* (Ferreira *et al.* 2015), e galhas induzidas por *P. longicaudatum* em *Aspidosperma australe* (Oliveira *et al.* 2011). Plastoglóbulos são corpúsculos acoplados ao sistema de membrana dos tilacóides que em geral acumulam carotenóides, terpenóides, tocoferol e plastoglobulinas (Austin *et al.* 2006). Estas substâncias antioxidantes atuam como mecanismo de reparo dos fotossistemas e evitam danos ao aparato fotossintético devido ao alto estresse oxidativo (Assada 2006; MØller *et al.* 2007). Em galhas, nota-se um aumento no número de plastoglóbulos devido ao estresse oxidativo gerado pelo galhador e, estes corpúsculos, seriam responsáveis pela dissipação do estresse e manutenção da atividade fotossintética das galhas (Oliveira *et al.* 2011). Nas galhas intralaminares de *A. tomentosum* há presença de estresse oxidativo (reação positiva ao DAB), resta saber se o aumento no número de plastoglóbulos é capaz de proteger os fotossistemas e, desta forma, manter a atividade fotossintética do tecido clorofiliano semelhante ao tecido não galhado.

Nas galhas foliares de *A. tomentosum*, além dos plastoglóbulos nos cloroplastos, destaca-se também a presença de corpúsculos multivesiculares (CMs). Estes corpúsculos também são relacionados ao estresse gerado pelo galhador durante o desenvolvimento da galha (Ferreira *et al.* 2015). Os corpos multivesiculares são organelas endossômicas esféricas contendo pequenas vesículas formadas por invaginação

interna da membrana (An *et al.* 2007). CMs já foram anteriormente detectados no tecido nutritivo de galhas induzidas por Lepidoptera em *Tibouchina pulchra* e *Marcetia taxiflora* (Vechi *et al.* 2013; Ferreira *et al.* 2015), e foram relacionados ao intenso metabolismo, divisões celulares e reciclagem de membranas no tecido nutritivo (Ferreira *et al.* 2015). Em folhas de cevada atacadas por fungos, a presença de corpúsculos multivesiculares contendo compostos fenólicos, peróxido de hidrogênio, e quando associados à parede celular seria um mecanismo de defesa da planta ao ataque de patógenos (An *et al.* 2006). Nas galhas foliares de *A. tomentosum*, também nota-se a presença de corpúsculos multivesiculares associados à parede celular, especialmente na galha madura, sendo considerada um dos sintomas citológicos do estresse gerado pelo inseto galhador.

Perfil citológico e histoquímico nos tecidos da galha

A morfologia e a citologia da galha induzida por *P. longicaudatum* em *A. tomentosum* é similar a outras galhas induzidas em *Aspidosperma*, especialmente aquelas induzidas por *P. aspidospermi* em *A. australe* (Oliveira & Isaias 2010; Oliveira *et al.* 2010). As paredes sinuosas, o maior número de plastoglóbulos e os sistemas de membranas deteriorando parecem características comuns a tecidos galhados (Oliveira *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2011; Isaias *et al.* 2011; Carneiro *et al.* 2014; Ferreira *et al.* 2015). As alterações citológicas foram bastante evidentes, separando duas regiões parenquimáticas distintas: células próximas à câmara ninfal com maior estresse e organelas; e células afastadas da câmara ninfal com vacúolo desenvolvido ocupando até 90% da área celular. A rediferenciação do parênquima lacunoso para formar a galha começa com um aumento considerável no tamanho das células e das divisões celulares. Estes processos de hipertrofia e hiperplasia tornam as paredes celulares delgadas e sinuosas, em especial nas células distais a câmara ninfal. Essa grande expansão celular

provoca a perda dos espaços intercelulares e dificulta as trocas gasosas nas camadas mais internas, levando a hipóxia no tecido (Castro *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2016).

O vacúolo é a principal organela que preenche as células originadas do parenquima lacunoso da galha jovem, assim, seu baixo metabolismo faz com que o tecido tenha e exigência reduzida consequentemente acumule amido; padrão diferente do encontrado por Oliveira & Isaias (2010) em galhas induzidas por *P. aspidospermi* em *A. australe*. O parênquima paliádico distal à câmara larval da galha permanece morfológicamente semelhante ao da folha sadia, indicando que a galha pode ter potencial fotossintético inalterado em relação à folha. Nas galhas, a manutenção da estrutura do cloroplasto seria essencial, mantendo a capacidade fotossintética e consequentemente a oxigenação dos tecidos compactos (Castro *et al.* 2012). Nas células próximas ao sítio de alimentação da ninfa os cloroplastos diminuíram de tamanho e em número, tiveram o sistema de membranas afetado, aumentando os plastoglobulos e diminuindo os arranjos dos grana (Oliveira *et al.* 2010; Isaias *et al.* 2015).

O sinergismo entre a ação de compostos fenólicos, reguladores do crescimento e espécies ativas de oxigênio é discutido como essencial ao estabelecimento da galha (Bedetti *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2016). As análises histoquímicas no sistema *P. longicaudatum* - *A. tomentosum* mostram um aumento na produção das EAO, que reagem principalmente na parede celular. Este estresse na parede pode liberar Ca^{2+} associados as pectinas e, consequentemente possibilitar a hipertrofia do tecido com o relaxamento da parede (Rohfritsch 1992; Olson & Varner 1993; Bell *et al.* 2009; Braidwood 2013) nas regiões mais distais da galha. Os tecidos não galhados e galhas apresentam sempre associados ao tecido clorofiliano proteínas e lipídeos, o que difere dos padrões encontrados em outros sistemas (Oliveira & Isaias 2010; Oliveira *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2011). A presença de proteínas no feixe vascular provavelmente se

dá pelo acúmulo de aminoácidos no floema, favorecendo a alimentação do galhador; enquanto a distribuição de proteínas no córtex da galha é proveniente de enzimas e proteínas associadas ao processo fotossintético. Os lipídeos formaram gotículas ao redor dos ductos secretores de látex e por todo o tecido não galhado e galhado, provavelmente um investimento intrínseco da planta (Demarco *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2010). O acúmulo de amido já era esperado como reportado por Oliveira & Isaias (2010), uma vez que as alterações citológicas deixaram as células do parenquima lacunoso quase que totalmente sem organelas e com baixa exigência metabólica. Os autores observaram enzimas ligadas ao metabolismo dos carboidratos que marcaram os feixes vasculares presentes no parênquima cortical das galhas jovens, como sendo precursores de amido (ver Figura 4C). O gradiente formado pelo amido difere de outros sistemas por apresentar-se mais distal da região de alimentação do galhador, enquanto a maioria dos estudos mostra uma maior distribuição na parte adaxial da folha e, em especial, próximas ao ápice da câmara ninfal.

Conclusão

O estresse gerado na região de indução da galha causa uma modificação citológica nítida. Essas mudanças, associadas à grande hipertrofia e hiperplasia do tecido, formam gradientes tanto citológicos quanto histoquímicos, evidenciando a presença de substâncias nutritivas próximas à câmara ninfa. Entretanto, esta região não caracteriza um tecido nutritivo propriamente dito. As células próximas à região de alimentação do galhador mostram sinais de intensa atividade fisiológica e estresse, com presença de corpus multivesiculares, cloroplastos com plastoglôbulos, sistema de membranas deteriorando e paredes sinuosas com espaços intercelulares, essas são características incomuns ao parênquima cortical da galha, possivelmente evidenciando a

preferência por um sítio de alimentação. O parênquima mais afastado da câmara ninfal é quase que totalmente preenchido pelo vacúolo e sem espaços intercelulares.

Referências

- Austin JR, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* 18: 1693-1703.
- An Q, Hückelhoven R, Kogel K, Van Bel AJE. 2006. Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular microbiology* 8: 1009-1019.
- Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391–396.
- 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 unguolata* system. *Revista Brasileira de Biologia* 11: 242–249.
- Bedetti CS, Modolo 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.
- Bell E, Takeda S, Dolan L. 2009. Reactive oxygen species in growth and developmental. In: Del Río LA, Puppo A (eds) *Reactive oxygen species in plant signalling*. Springer, New York. p: 43–54.
- Braidwood L, Breuer C, Sugimoto K. 2013. My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist* 201: 388–402.

- 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. p: 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.
- 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: plv086.
- Castro CA, Leite GLD, Oliveira DC, Isaias RMS. 2012. Morphological patterns of a hymenopteran gall on the leaflets of *Caryocar brasiliensis* Camb. (Caryocaraceae). *American Journal of Plant Sciences* 3: 921-929.
- 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: 1891–1900.
- Cotta-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic-related fibers. *Stain Technology* 51: 7–11.
- Demarco D, Kinoshita LS, Castro MM. 2006. Articulated anastomosing laticifers—new records for Apocynaceae. *Revista Brasileira de Botanica* 29: 133–144.
- Dreger-Jauffret F, Shorthouse JD. 1992. Diversity of gall-inducing insects and their galls, In: Shorthouse JD, Rohfritsch O. (eds). *Biology of insect induced galls*. Oxford University. Oxford. p: 8–33.
- Ferreira BG, Isaias RMS. 2013. Developmental stem anatomy and tissue redifferentiation induced by a galling Lepidoptera on *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Botany* 91: 752– 760.

- Ferreira BG, Carneiro RGS, Isaias RMS. 2015. Multivesicular bodies differentiate exclusively in nutritive fast-dividing cells in *Marcetia taxifolia* galls. *Protoplasma* 252: 1275-1283.
- Fuzaro L. 2015. Padrões de alongamento celular durante a ontogênese foliar e de galhas induzidas por *Pseudophacopteron* sp. em *Aspidosperma tomentosum* Mart. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Uberlândia UFU.
- Giron D, Frago E, Glevarec G, Pieterse CMJ, Dicke M. 2013. Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional Ecology* 27: 599-609.
- Hartley SE. 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113: 492-501.
- Hori K. 1992. Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In: Shorthouse JD & Rohfritsch O. (eds.) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, p:157-170.
- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS. 2011. Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* 89: 581–592.
- 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: 1509–1517.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Books, New York.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27: 137–138.
- 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.
- Mani MS. 1964. Ecology of plant galls. The Hague: Dr. W. Junk Publishers.
- Malenovský I, Burckhardt D, Queiroz DL, Isaias RMS, Oliveira DC. 2015. Descriptions of two new *Pseudophacopteron* species (Hemiptera: Psylloidea: Phacopteronidae) inducing galls on *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 55: 513-538.
- Meyer J. 1987. Plant galls and gall inducers. Gebrüder Bornträger, Berlin.
- Möller IM, Jensen PE, Hanson A. 2007. Oxidative modifications to cellular componentes in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459–481
- Olson PD, Varner JE. 1993. Hydrogen peroxide and lignification. *The Plant Journal* 4: 887–892
- Oliveira DC, Isaias RMS. 2010. Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Science* 178: 350-358.
- 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: 81–93.
- Oliveira DC, Carneiro RGS, Magalhães TA, Isaias RMS. 2011. Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) - Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma* 248: 829–837.

- 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.
- Raman A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92: 748-757.
- Rohfritsch O. 1992. Patterns in gall development. In: Shorthouse JD & Rohfritsch O. (eds). *Biology of insect-induced galls*, Oxford University Press, New York p: 60–86.
- 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 p: 102–117.
- Rossetti S, Bonatti PM. 2001. In situ histochemical monitoring of ozone- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 433–442.
- Stern LD. 1995. Phylogenetic evidence that aphids, rather than plants, determine gall morphology. Department of Ecology and Evolutionary Biology, Princeton University New Jersey. *Proceedings of Royal Society of London* 260: 85-90.
- Sass JE. 1951. *Botanical microtechnique*. 2nd. ed. Iowa State College Press, Ames, Iowa.
- Shorthouse JD, Wool D, Raman A. 2005. Gall-inducing insects – nature’s most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology* 6: 407–411.
- 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: 1363-1368.

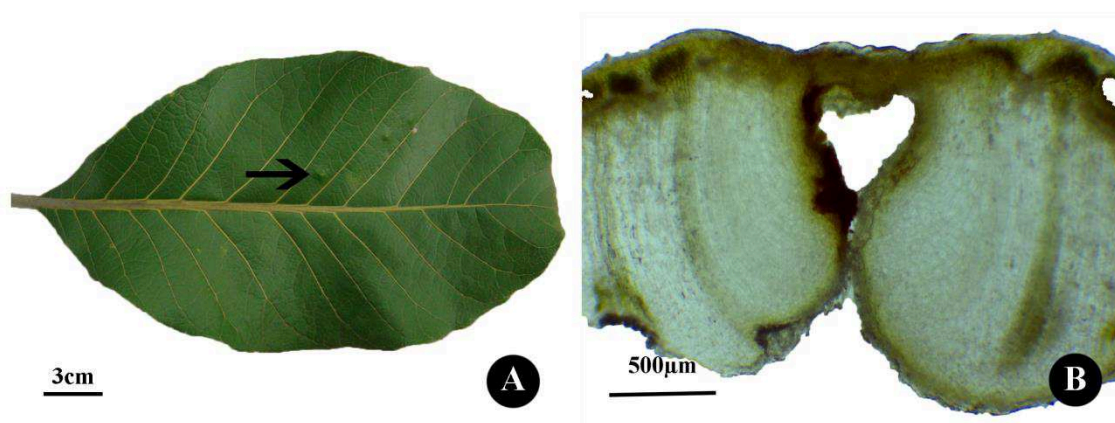


Figura 1 – Sistema *Aspidosperma tomentosum* - *Pseudophacopteron longicaudatum*.
(A) Folha com galha (seta) projetada para face adaxial. (B) Corte longitudinal da galha com detalhe da câmara ninfal.

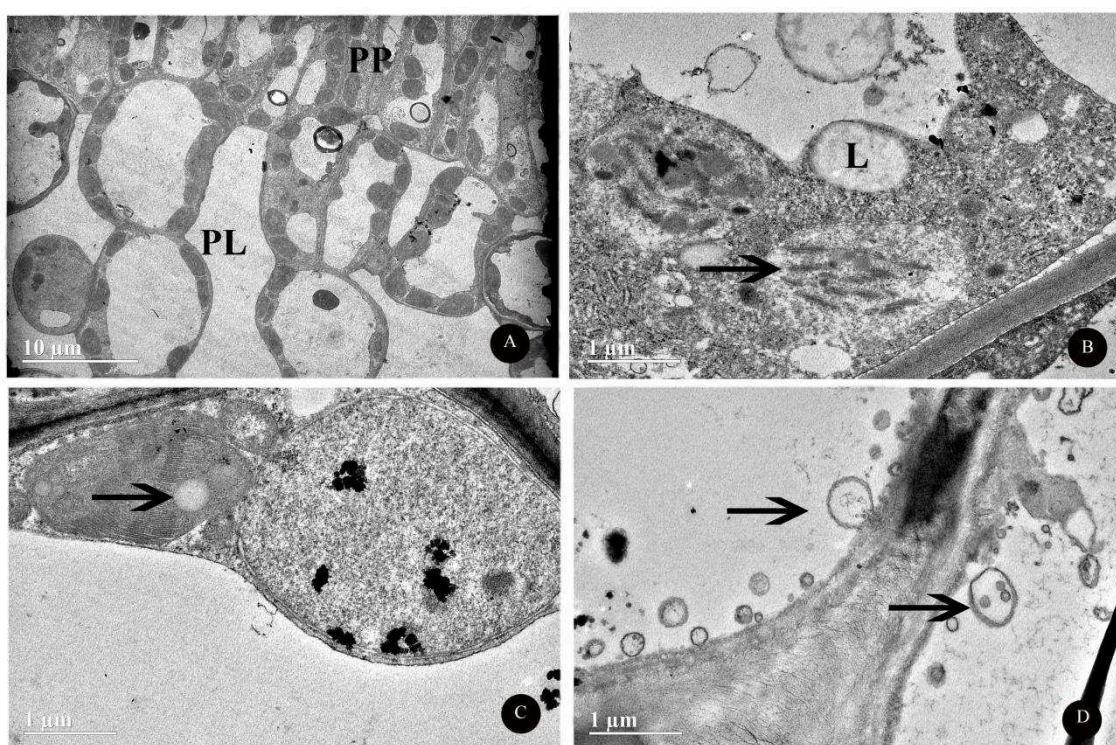


Figura 2 - Eletromicrografias de transmissão do tecido foliar não galhado de *Aspidosperma tomentosum*. (A) Aspecto do parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL). (B) Cloroplastos pouco desenvolvido no tecido jovem (seta). Detalhe de lisossomo (L). (C) Cloroplastos desenvolvidos na folha madura, com presença de plastoglóbulos (setas). (D) Detalhe corpúsculos multivesiculares em folha madura (setas).

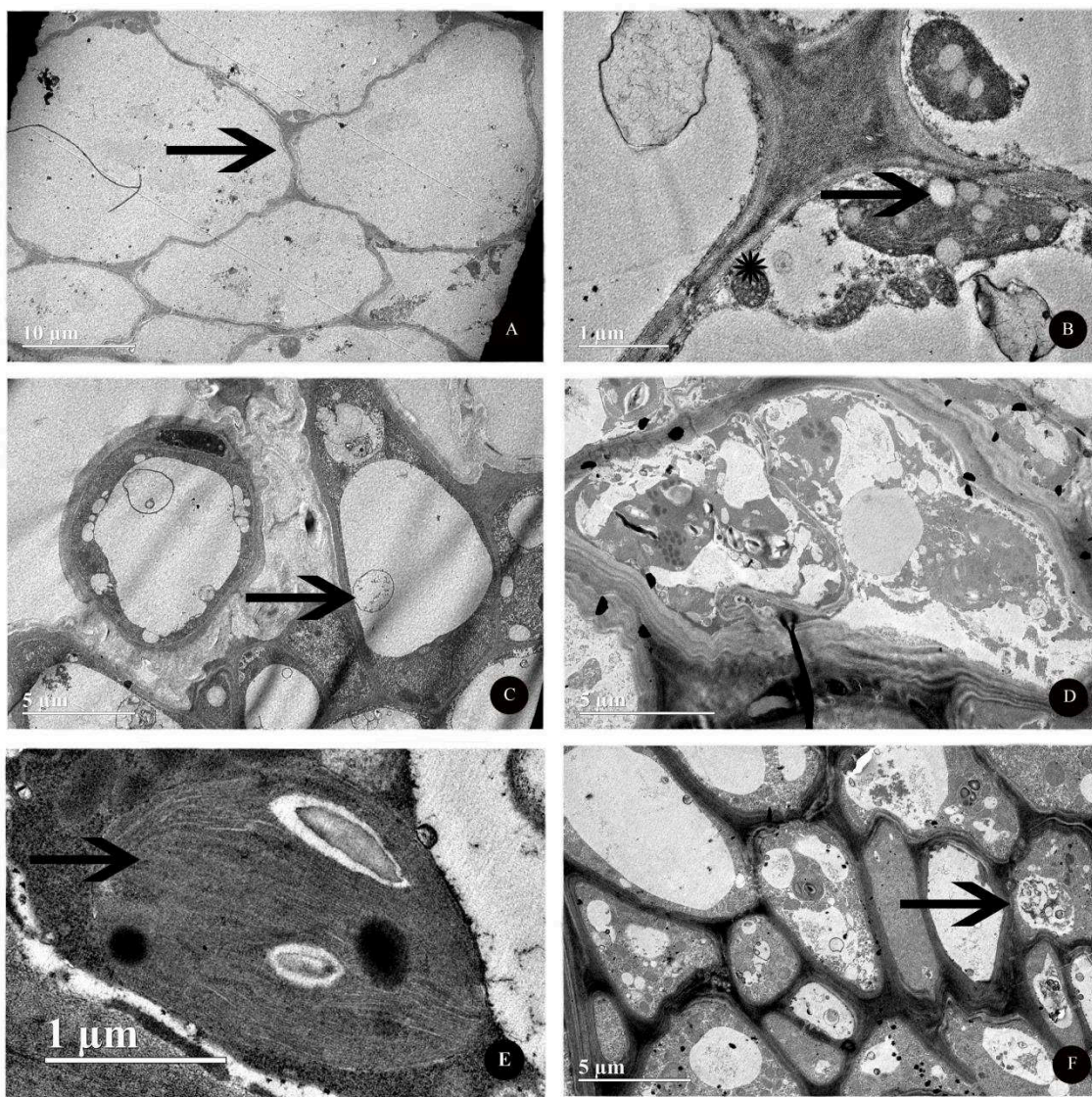


Figura 3 – Eletromicrografias de transmissão das galhas jovens e maduras ocorrentes em *Aspidosperma tomentosum*. (A) Células do parênquima lacunoso rediferenciado já na galha jovem, com paredes celulares sinuosas e delgadas (seta). (B) Cloroplasto de galha madura, com grande número de plastoglóbulos (seta) e mitocôndrias associadas (*). (C) Galha madura com corpúsculo multivesicular (seta). (D) Galha madura com alta desorganização do protoplasto. (E) Detalhe de cloroplasto no parênquima paliádico da galha madura com tamanho reduzido e grana pouco desenvolvidos (seta). (F) Galha madura com tecido próximo ao sítio de alimentação do inseto com poucos espaços intercelulares, paredes sinuosas e sistema de membranas com aspecto deteriorado (seta).

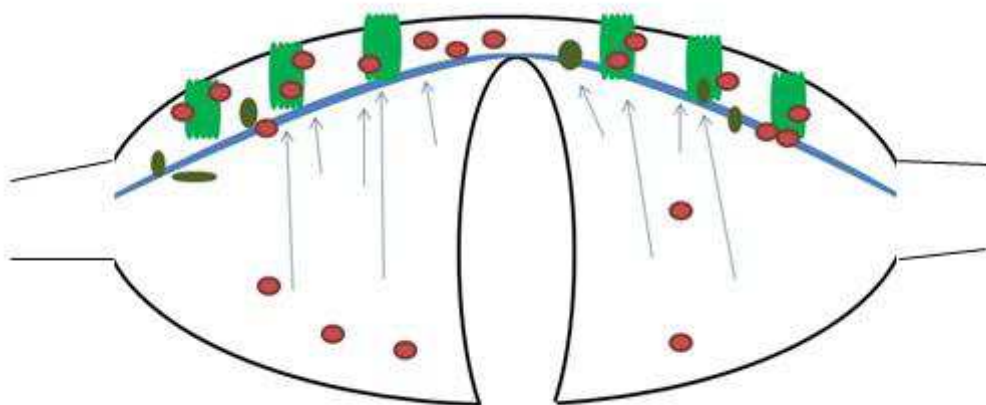


Figura 4 – Diagrama de gradientes energéticos em galhas maduras de *Aspidosperma tomentosum*, induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*. Azul representa proteínas, vermelho, lipídeos e verde escuro, os açúcares redutores.

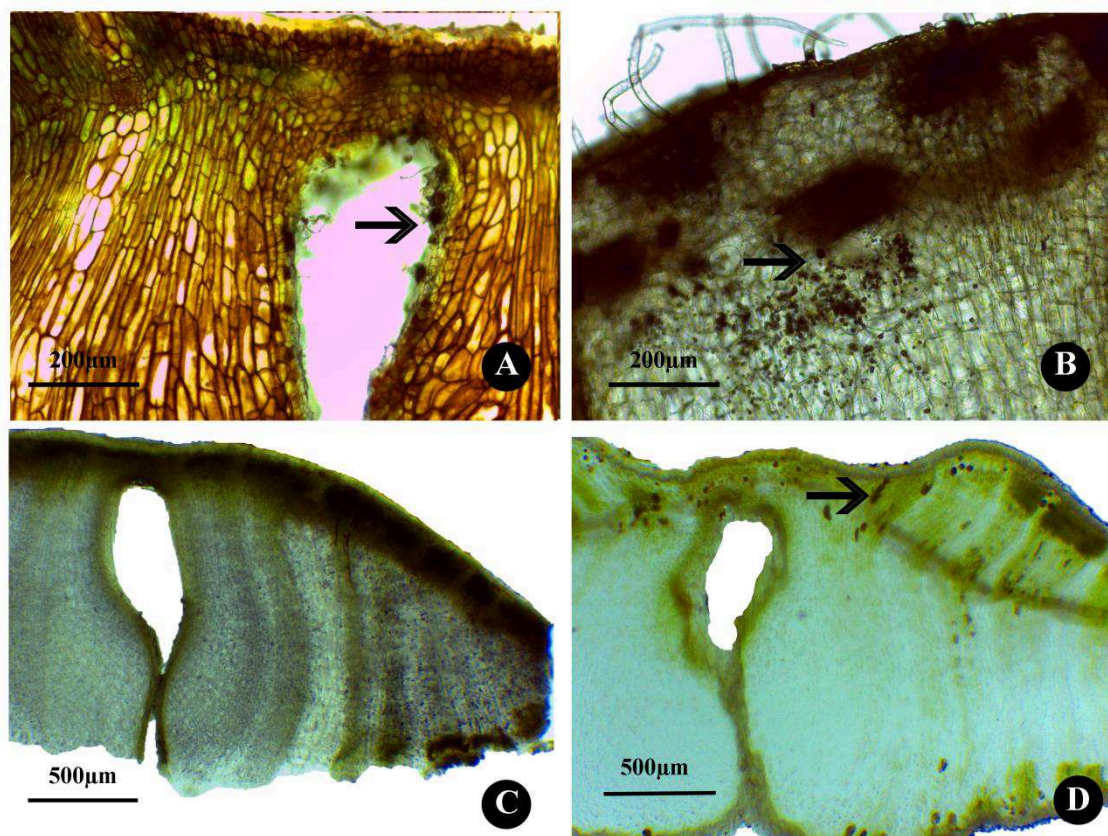


Figura 5 – Fotomicrografias dos resultados dos testes histoquímicos em galhas ocorrentes em *Aspidosperma tomentosum*. (A) Espécies ativas de oxigênio (EAO) em galha madura, marcando parede celular e a epiderme da câmara ninfal (seta). (B) Amido acumulando nos feixes vasculares da galha jovem (seta). (C) Gradiente de amido centripeto à câmara ninfal na galha madura. (D) Açúcares redutores (setas) na galha madura, com gradiente centripeto a favor feixe vascular.

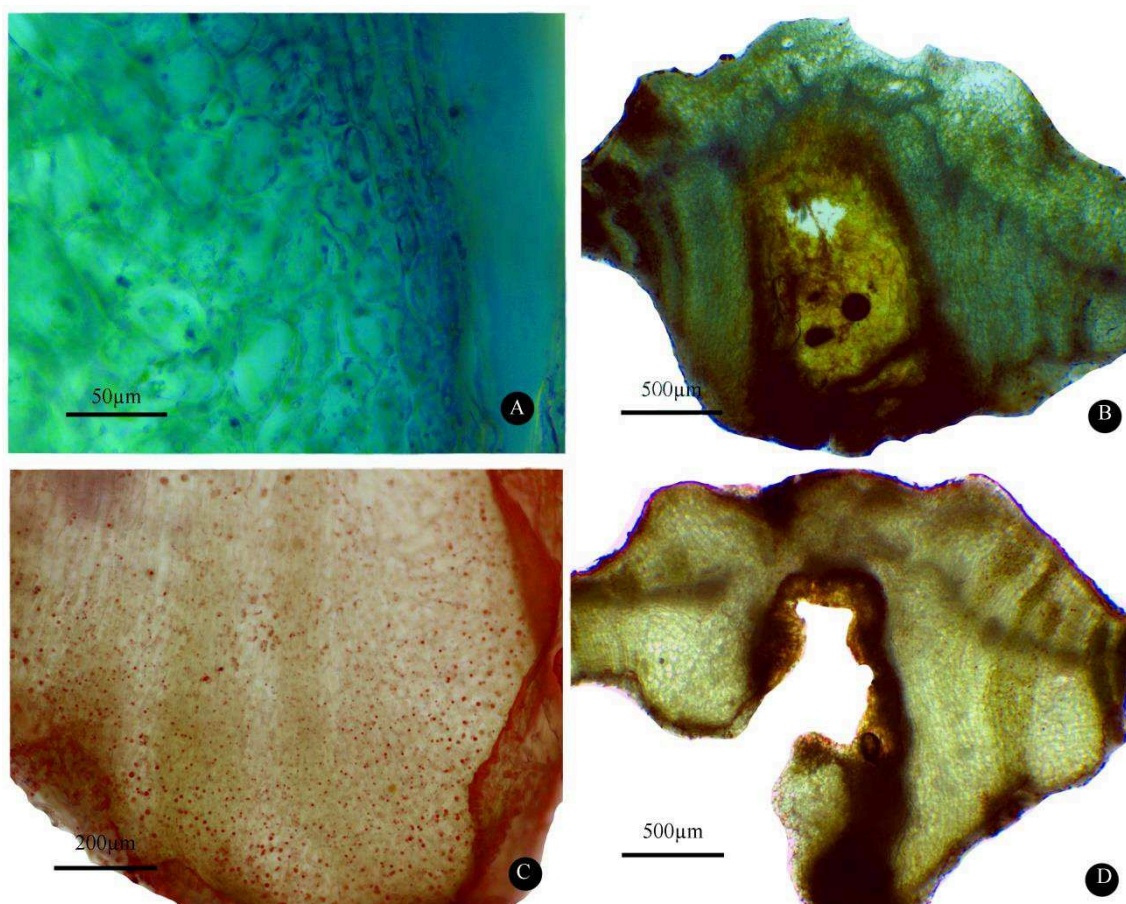


Figura 6 – Fotomicrografias dos resultados dos testes histoquímicos em galhas foliares ocorrentes em *Aspidosperma tomentosum*. (A) Teste de proteínas marcando a epiderme da câmara ninfal. (B) Proteínas restritas ao feixe vascular em galha senescente. (C) Lipídeos com gradiente centrifugo à câmara ninfal. (D) Lipídeos restritos a células clorofilianas em galha senescente.

Tabela 1 – Testes histoquímicos aplicados em galhas foliares de *Aspidosperma tomentosum*.

Teste/Substância reagente	Procedimento	Referências
Reagente Lugol – Amido	Imersão das amostras em iodeto de potássio 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” (tartarato de sódio e potássio a 34,6% e hidróxido de sódio a 12% m:m:v) aquecidas até atingir a pré-ebulição	Sass (1951)
Reagente Azul Mercúrio de Bromofenol – Proteínas	Imersão das amostras em azul de bromofenol a 0,1% em solução saturada de cloreto de magnésio em álcool 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 70% durante 5 minutos	Sass (1951)
Reagente DAB – Espécies ativas de oxigênio (EAO)	Imersão das amostras em 3,3’ diaminobenzidina durante 20 minutos no escuro em refrigeração. Lavagem rápida e montagem em água destilada	Rossetti & Bonnatti (2001)

Tabela 2. Quadro resumo de resultados obtidos nas análises histoquímicas realizadas em galhas foliares de *Aspidosperma tomentosum*.

Substâncias detectadas	Sítio de reação	
	Folha	Galha
Espécies ativas de oxigênio (EAO)	Floema; parênquima paliçádico e lacunoso; epidermes.	Parede celular; epiderma e da câmara larval em todos os estágios (Fig. 5A)
Amido	Porção central da nervura central	Deposição nos feixes vasculares de galha jovem (Fig 5B). Um gradiente centrífugo a partir da câmara ninfal em galhas maduras (Fig 5C). E ausência na senescente
Açúcares redutores	Células adjacentes; parênquima paliçádico	Gradiente centrífugo em a partir da epiderme adaxial; marcações ao longo do feixe vascular em galhas jovens, maduras e senescentes (Fig. 5D)
Proteínas	Floema; Parênquima paliçádico e lacunoso	Marcação adjacente ao tecido clorofiliano na galha jovem e madura. E no floema dos feixes vasculares em todos os estágios Na galha madura, um acúmulo de proteínas na parede da câmara ninfal (Fig. 6A e B)
Lipídios	Parênquima paliçádico; laticíferos; cutícula	Em galhas jovens presente na cutícula. Gradiente centrípeto em direção ao tecido vascular e perivascular; tecido clorofiliano; cutículas na galha madura (Fig. 5C) e restrito ao tecido clorofiliano na galha senescente (Fig. 6D)

Variação na composição péctica da parede celular durante o desenvolvimento de galhas foliares em *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae) induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera)

Vitor Martini¹, Ana Silvia F P Moreira², Vinícius C Kuster¹, Denis C Oliveira¹

¹ Laboratório de Anatomia de Desenvolvimento Vegetal (LADEV), Instituto de Biologia, Campus Umuarama – UFU;

² Laboratório de Fisiologia Vegetal (LAFIVE), Instituto de Biologia, Campus Umuarama – UFU;

*Correspondence author: vitorcmartini@gmail.com

Resumo

Galhas de insetos são umas das interações mais intrigantes da natureza. O inseto é capaz de manipular os tecidos da hospedeira em seu benefício obtendo assim abrigo, nutrição e proteção contra inimigos naturais. A formação da estrutura da galha é dependente de alterações celulares, incluindo na composição pectica e proteica da parede celular. Galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) em *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae) são intralaminares e apresentam uma só câmara ninfal com um único inseto galhador. O tecido galhado sofre um processo de hiperplasia e hipertrofia, formando uma galha ovalada. O estudo avaliou se houve variação no grau de metil-esterificação das HGAs, na presença de AGPs e RGI durante o desenvolvimento da galha. As galhas alteram a estrutura e desenvolvimento dos tecidos e órgão hospedeiro. Estas alterações passam pela reestruturação da parede celular durante o desenvolvimento da galha, especialmente quando o grau de metil-esterificação das HGAs. A parede celular da galha, diferente do tecido não galhado, apresenta HGAs de alta metil-esterificação, alterando sua dinâmica de transporte de soluto e crescimento quando comparada a folha. Ao entrar em senescência, nota uma perda no grau de metil-esterificação das HGAs nos dois tecidos.

Palavras-chave: Imunocitoquímica, pectinas, *Aspidosperma*

Introdução

Insetos galhadores manipulam os tecidos da planta hospedeira para formar estruturas conhecidas como galhas, que são consideradas órgãos vegetais neoformados (Shorthouse *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2010; Isaias *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2016). O desenvolvimento desta estrutura é dependente de estímulos mecânicos e/ou químicos do inseto galhador, incluindo ações hormonais que agem de forma sinérgica no tecido vegetal (Hori 1992; Rawat *et al.* 2012; Giron *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2014). O inseto passa praticamente todo o seu ciclo de vida no interior da galha (Mani 1964), sendo tal hábito possibilitado pela criação de um ambiente com tecidos de disposição e funcionalidade adequados ao fornecimento de alimento ao galhador, além de abrigo e proteção contra inimigos naturais (Stone & Schonröge 2003; Formiga *et al.* 2009; 2011).

O desenvolvimento da galha ocorre através da hiperplasia dos tecidos e hipertrofia celular (Mani 1964; Meyer 1987), processo que pode ser dividido em três fases: jovem, com alta taxa de divisão celular; madura, com tecidos totalmente formados; e senescente, onde os indutores deixam a galha. Essa morfogênese envolve uma série de passos citológicos, dentre os quais as alterações na composição e conformação da parede celular são determinantes para a morfologia final da galha (Formiga *et al.* 2013; Carneiro *et al.* 2014a; Magalhaes *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2014). A parede celular vegetal é composta por celulose e por elementos não celulósicos, como as pectinas, as hemiceluloses e as proteínas (Willats *et al.* 2000), com destaque para as pectinas por estarem envolvidas em funções importantes no desenvolvimento de células, tecidos e órgãos vegetais (Knox 1997).

As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico (GalA) e classificadas em Homogalacturonanos (HGAs), Rhamnogalacturonanos I (RG-I) e Rhamnogalacturonanos II (RG-II) (Albersheim *et al.* 1996; Ridley *et al.* 2001; Pérez *et al.* 2003). As HGAs são homopolímeros lineares com aproximadamente 100 moléculas de ácido (1-4)- α -linked-D-

Galacturonanos (GalA), maior constituinte da parede celular, representando 65% de todas as pectinas. As RG-I são similares, porém, com canais laterais de arabinose e galactose, representando 20-35% das pectinas. As RG-II possuem estrutura mais complexa e representam 10% das pectinas. O grau de metil-esterificação das HGAs determina o estado físico e consequentemente a funcionalidade da parede celular, regulando o desenvolvimento e o crescimento da célula, tecidos e órgãos (Albersheim *et al.* 1996; Knox 1997; Wolf & Greiner 2012). Assim, o grau de metil-esterificação influencia na adesão, expansão, porosidade, sinalização celular, morfogênese e defesa (Knox 1992; Jones *et al.* 1997; Albersheim *et al.* 1996; Ridley *et al.* 2001; Willats *et al.* 2001; Rose 2003; Wolf & Greiner 2012). As proteínas arabinogalactanos (AGPs) também podem auxiliar na regulação do desenvolvimento dos tecidos da galha (Braidwood 2013), sendo caracterizadas por terem consistência mucilagínosa e por estarem envolvidas na adesão entre as células, no crescimento, nutrição e proliferação celular (Pennel & Roberts 1990; Majewska-Sawka & Nothnagel 2000).

Aspidosperma tomentosum pertence à família Apocynaceae e apresenta galhas intralaminares (Isaias *et al.* 2014) induzidas *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera). Essas galhas contêm apenas uma câmara ninfal, que é ocupada por um inseto galhador, que também é capaz de induzir galhas foliares em *A. macrocarpon* (Malenovsky *et al.* 2015). Partindo do pressuposto que a indução dessa galha provoca rediferenciação de tecidos foliares, espera-se que haja alterações na composição da matriz péctica das folhas para a galha e entre as fases jovem, madura e senescente, especialmente em relação ao grau de metil-esterificação das HGAs, devido ao ganho de novas funções no órgão neoformado. Assim, esse estudo busca avaliar se há variação no grau de metil-esterificação das HGAs, na presença de AGPs e RGI durante o desenvolvimento da galha intralaminar *A. tomentosum* e o seu papel na manutenção estrutural da galha.

Material e métodos

Área de estudo

Folhas não galhadas e galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) em *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae), ambas adquiridas nas fases jovem, madura e senescente (n=9), foram coletadas no Clube Caça e Pesca Itororó (18°60'S – 48°O), que se localiza a oeste do perímetro urbano de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. A reserva possui 127 ha, onde predomina a vegetação de cerrado *stricto sensu* (Lima *et al.* 1989).

Análises anatômicas

Fragmentos da nervura mediana e região intercostal do terço mediano das folhas não galhadas e das galhas foram fixados em glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) (Roland & Vian 1991), desidratados em série etanólica, e emblocados em *2-hidroxietil metacrilato* (Historesin, Leica® Instruments, Alemanha). Cortes de 7 µm foram obtidos por meio de um micrótomo rotatório e coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (Figueiredo *et al.* 2007). As lâminas foram montadas com Entellan® (Kraus & Arduin 1997) e analisadas em microscópio de luz (Lieca® DM2500, país) com câmera HC500 acoplada.

Análises imunocitoquímicas

As análises de imunocitoquímica foram desenvolvidas em amostras similarmente processadas como descrito no subitem anterior, porém sem a realização das etapas de coloração e montagem. Os cortes em Historresina foram imersos em uma solução 5% bloqueadora de leite em pó Molico®/PBS durante 30 minutos. Em seguida, foram incubados por duas horas com os anticorpos monoclonais JIM5, JIM7, LM1, LM2 e LM6 (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) (Tabela 1) diluídos em solução leite em pó Molico®/PBS (1:10). Após incubação, os cortes foram lavados em PBS e re-incubados com o

anticorpo secundário FITC (1:100 em 3% leite/PBS) durante duas horas e lavados novamente em PBS. As incubações sempre foram realizadas na ausência de luz. Testes controle foram conduzidos através da supressão da incubação com o anticorpo primário. As imagens foram obtidas usando um microscópio de fluorescência (Lieca® DM2500) com câmera HC500 acoplada.

Resultados

Características estruturais do sistema

A galha induzida por *Pseudophacopteron longicaudatum* nas folhas de *Aspidosperma tomentosum* são intralaminares com a maior parte do tecido projetado para a face abaxial (Figuras 1A-C). A galha é induzida nas folhas ainda tênues e em processo de expansão, apresentando menor tamanho quando jovem. Na galha (Figura 1B) o ostíolo fica voltado para a face abaxial e conecta a região externa à câmara ninfal, que abriga somente um inseto galhador (Figura 1C). A folha não galhada apresenta epiderme uniestratificada com parede periclinal externa espessa, tecido clorofiliano com apenas uma camada de parênquima paliçádico, uma camada de parênquima paravenal e cerca de duas camadas de parênquima lacunoso (Figura 1D). A nervura mediana apresenta feixe vascular bicolateral circundado por laticíferos (Figura 1E).

Na galha jovem nota-se hipertrofia das células ao redor do sítio de indução (Figura 2A) e perda na organização tecidual. A galha madura é formada após intensa divisão e hipertrofia das células do parênquima paliçádico, paravenal e especialmente do parênquima lacunoso, cuja hipertrofia e hiperplasia forma todo córtex da galha (Figura 2B). Feixes vasculares irrigam a face adaxial da galha, onde ainda pode se observar resquícios de parênquima paliçádico (Figura 2C) e estômatos voltados para o interior da galha (Figura 2D). A epiderme ao redor da câmara ninfal, que está em contato direto com o inseto galhador,

apresenta parede celular fina muitas vezes com sinais de injúria (Figura 2E). A galha senescente tem a abertura do ostíolo maior para saída do inseto, com tecidos que começam a necrosar. Em alguns casos, pode ocorrer a permanência da exúvia do inseto (Figura 2F).

Análises de imunocitoquímica da parede celular

Epitopos de Homogalacturananos (HGAs) de baixa metil-esterificação, marcados pelo JIM5, marcaram principalmente a epiderme adaxial do tecido não galhado jovem (Figura 3A, Tabela 2) e junções celulares das primeiras camadas do córtex (Figura 3B). Durante o desenvolvimento da folha, a marcação continua (Figura 3C) e encontra-se no parênquima paliádico quando madura (Figura 3D). Durante a senescência foliar, epitopos de HGAs de alta metil-esterificação reconhecidos pelo JIM7 foram marcados em menor intensidade no parênquima (Figura 3E) e no xilema (Figura 3F). Epitopos para β -D-galactanos reconhecidos pelo LM5 marcaram os laticíferos na folha senescente (Figura 3G), enquanto que o parênquima do tecido vascular foi marcado pelos epitopos para α -L-arabinanos, reconhecidos pelo LM6 (Figura 3H, I).

Nos tecidos galhados, epitopos de HGAs de baixa metil-esterificação reconhecidos pelo JIM5 foram detectados com baixa intensidade na epiderme adaxial da galha jovem (Figura 4A, Tabela 2), e na epiderme da câmara larval na galha madura (Figura 4B). Nos tecidos senescentes, a epiderme (Figura 4C) e o córtex são marcados pelo JIM5 com intensidade moderada. Epitopos de HGAs de alta metil-esterificação (reconhecidos pelo JIM7) foram marcados no tecido jovem, especialmente nas células que se dividem para formar a câmara larval (Figura 4D). Após a maturação da galha, tal composto não foi encontrado no córtex, estando presente somente na parede da epiderme da câmara larval (Figura 4E). Na senescência, a marcação de HGA de alta metil-esterificação diminui drasticamente em todos os tecidos da galha (Figura 4F).

Discussão

Pseudophacopteron longicaudatum altera o padrão tecidual das folhas de *Aspidosperma tomentosum* levando à formação da galha. Esta galha intralaminar é formada especialmente pela hiperplasia, hipertrofia e expansão das células a partir do parênquima lacunoso. A hipertrofia e a expansão celular no córtex da galha, com grau de anisotropia variado, é comum e está relacionado às novas funcionalidades deste novo órgão (Shorthouse *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2010; Carneiro *et al.* 2014a; Isaias *et al.* 2014). Galhas induzidas em *Baccharis dracunculifolia* apresentam expansão anisotrópica do córtex (Magalhães *et al.* 2014), semelhante ao observado no sistema *A. tomentosum*-*P. longicaudatum*. Entretanto, em galhas induzidas por *Nothotrioza myrtoideis* em *Psidium myrtoideis* o padrão de expansão mostrou-se isotrópico (Carneiro *et al.* 2014a), como observados em outros morfotipos de galhas (Oliveira & Isaias 2010; Isaias *et al.* 2011). Pode-se inferir que estes padrões de expansão celular são extremamente importantes e estão intimamente ligados ao desenvolvimento da galha, uma vez que são completamente relacionados à natureza química e disposição de pectinas na parede celular (Willats *et al.* 2000). As galhas induzidas por *P. longicaudatum* em *A. tomentosum* tem sua parede celular alterada em relação ao tecido não galhado, principalmente no grau de metil-esterificação das HGAs. De forma geral, os tecidos da galha tem marcação mais intensa para epitopos de HGA com alta metil-esterificação, reconhecidos pelo JIM7, enquanto nos tecidos da folha não galhada epitopos de baixa metil-esterificação são reconhecidos de forma mais intensa.

Em galhas neotropicais, a marcação de epitopos pécticos usando anticorpos monoclonais mostram resultados convergentes, dependentes do grau de metil-esterificação das HGAs. Plantas tem a capacidade de controlar sua elasticidade, capacidade de trocas iônicas, porosidade, adesão celular e ataques de patógenos (Lionetti *et al.* 2012; Braidwood *et al.* 2013; Salazar-Irribé *et al.* 2016) pela alteração dinâmica da sua composição celulósica e

péctica. Em galhas foliares de *Baccharis reticularia* (Formiga *et al.* 2013), *Psidium myrtoides* (Carneiro *et al.* 2014b) e *P. cattleianum* (Carneiro *et al.* 2014a) a presença de epitopos de baixa metil-esterificação reconhecidos pelo JIM5 indicam aumento da rigidez celular. Nestes sistemas, epitopos de alta metil-esterificação reconhecidos por JIM7 foram relacionados essencialmente ao aumento da elasticidade da parede, divisão e adesão celular. No sistema *A. tomentosum* – *P. longicaudatum*, a presença de HGAs de alta metil esterificação pode ser reflexo de uma maior produção de cadeias laterais, e possivelmente indicar uma resposta do hospedeiro ao ataque. A presença de HGAs de alta metil esterificação na galha também causa um funcionamento distinto da rota apoplástica na galha, visto que a heterogeneidade da matriz de pectina proporciona diferentes funções fisiológicas na parede celular (Peréz 2003; Braidwood *et al.* 2013; Salazar-Iribe *et al.* 2016).

A variação no grau de metil-esterificação nas pectinas depende da ação da pectina metil esterase ou poligalacturonase, que retiram os grupos metil das HGAs da parede celular (Willats *et al.* 2000; Hongo *et al.* 2012). O decréscimo na intensidade da marcação de epitopos de alta metil esterificação durante o desenvolvimento da galha foliar em *A. tomentosum*, indicam um processo contínuo e linear de de-metil esterificação. O processo linear de de-metil esterificação das HGAs ocorre em geral pela ação das pectinas metil esterases e está associado ao processo de enrijecimento celular (Jiang *et al.* 2005). Ao contrário, quando o processo de de-metil esterificação ocorre pela ação das poligalacturonases, são observados sintomas de perda da integridade estrutural como lise celular, necrose e morte celular programada (Hongo *et al.* 2012); características não observadas na galha foliar de *A. tomentosum*. Em geral, o processo de perda de grupos metil durante o desenvolvimento da galha ocorre de forma concomitante ao processo de hipertrofia celular, como observado em embriões de *Arabidopsis thaliana* (Sala *et al.* 2013), galhas

foliares em *Baccharis dracunculifolia* (Oliveira *et al.* 2104) e na galha foliar em *A. tomentosum*.

A associação de epitopos (1→ 4) β -D-galactano e (1 → 5) α -L-arabinanos com HGAs aparentemente mantém a integridade estrutural (Schindler *et al.* 1995; Gao *et al.* 1999) e aumenta a porosidade da parede celular (Foster *et al.* 1996). Em galhas, estes epitopos estão associados ao processo de hipertrofia celular e rigidez da parede (galactanos) (Formiga *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2014; Carneiro *et al.* 2014a; Carneiro *et al.* 2014b). Em galhas foliares de *A. tomentosum* estes epitopos não foram detectados e aparentemente não exercem nenhum papel importante no estabelecimento deste novo órgão. Extensinas foram detectadas em baixa intensidade nas galhas madura e senescente, e tecidos não galhados (folha madura e senescente). Assim como em galhas de *Baccharis reticularia* (Formiga *et al.* 2013), as extensinas não seriam essenciais ao processo de hipertrofia e expansão celular.

Conclusão

O estudo mostrou que existe uma diferença na metil esterificação da matriz péctica entre o tecido galhado e não galhado, mas também entre diferenças entre galhas de outros estudos. A marcação de HGAs de alta metil esterificação no tecido das galhas indica uma alteração na dinâmica do apoplasto, porém, não está claro se as cadeias laterais não se soltam, ou se aumentam o numero de cadeias sintetizadas pelo complexo de Golgi. Mais estudos com PMEs e modificações pécticas em resposta a ataques de patógenos são necessários.

Referências

Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ. 1996. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: Visser J, Voragen AGJ (eds.) Pectins and Pectinases. Amsterdam, Elsevier Sciences B.V. p. 47-53.

- Braidwood L, Breuer C, Sugimoto K. 2013. My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist* 201: 388–402.
- Carneiro RGS, Oliveira DC, Isaias RMS. 2014a. Developmental anatomy and immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium myrtoides* (Myrtaceae) towards the globoid galls of *Nothotrioza myrtoidis* (Triozidae). *Plant Cell Reports* 33: 2093–2106.
- Carneiro RGS, Castro AC, Isaias RMS. 2014b. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany* 92: 97–104.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Ascensão L. 2007. Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos. Lisboa, 1ª Edição, Edição Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal. p: 29.
- Formiga AT, Gonçalves SJMR, Soares GLG, Isaias RMS. 2009. Relações entre o teor de fenóis totais e o ciclo das galhas de Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* Müell. Arg. (Apocynaceae). *Acta Botanica Brasilica* 2: 93-99.
- Formiga AT, Soares GLG, Isaias RMS. 2011. Responses of the host plant tissues to gall induction in *Aspidosperma spruceanum* Müell. Arg. (Apocynaceae). *American Journal of Plant Sciences* 2: 823-834.
- 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: 899-908.
- Foster TJ, Ablett S, McCann MC, Gidley MJ. 1996. Mobility-resolved C-13-NMR spectroscopy of primary plant-cell walls. *Biopolymers* 39: 51-56.

- Giron D, Frago E, Glevarec G, Pieterse CMJ, Dicke M. 2013. Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional Ecology* 27: 599-609.
- Gao M, Kieliszewski MJ, Lamport DTA, Showalter AM. 1999. Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *The Plant Journal* 18: 43-55.
- Hongo S, Sato K, Yokoyama R, Nishitani K. 2012. Demethylesterification of the primary wall by pectin methylesterase35 provides mechanical support to the *Arabidopsis* Stem. *Plant Cell* 24: 2624–2634.
- Hori K. 1992. Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In Shorthouse JD & Rohfritsch O. (eds.) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, p: 157-170.
- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS. 2011. Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* 89: 581–592.
- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS, Kraus JE. 2014. Developmental anatomy of galls in the neotropics: arthropods stimuli versus host plant constraints. In: Fernandes GW, Santos JC (eds). *Neotropical insect galls*. Springer. p: 15- 34.
- Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puah CS, Zhang XQ. 2005. VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell* 17: 584–596.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York, MacGraw-Hill.
- Jones L, Seymour GB, Knox JP. 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1R4) b-D-galactan. *Plant Physiology* 113: 1405–1412.

- Knox JP. 1992 Cell adhesion, cell separation and plant morphogenesis. *Plant Journal* 2: 137–141.
- Knox JP. 1997 The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology* 171: 79–120.
- Kraus JE, Arduin M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro, EDUR.
- 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.
- Lionetti V, Cervone F, Bellincampi D. 2012. Methylesterification of pectin plays a role during plant–pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *Journal of Plant Physiology* 169: 1623–1630.
- 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* 251:747–753.
- Malenovský I, Burckhardt D, Queiroz DL, Isaias RMS, Oliveira DC. 2015. Descriptions of two new *Pseudophacopteron species* (Hemiptera: Psylloidea: Phacopteronidae) inducing galls on *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 55: 513-538.
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA. 2000. The multiple roles of arabinogalactan protein in plant development. *Plant Physiology* 122: 3–9.
- Mani MS. 1964. Ecology of plant galls. The Hague: Dr. W. Junk Publishers.
- Meyer J. 1987. Plant galls and gall inducers. Gebrüder Bornträger, Berlin.

- Oliveira DC, Isaias RMS. 2010. Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). Plant Science 178: 350-358.
- 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: 81–93.
- Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMS. 2014. Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall. Plos One 9: e94588.
- 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.
- Pellerin P, Doco T, Vidal S, Williams P, Brillouet JM, O'Neill MA. 1996. Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. Carbohydrate Research 290: 183–197.
- Pennel RI, Roberts K. 1990. Sexual developmental in pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. Nature 344: 547–549.
- Pérez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. Biochimie 85: 109–121.
- Rawat N, Neeraja CN, Nair S, Bentur JS. 2012. Differential gene expression in gall midge susceptible rice genotypes revealed by suppressive subtraction hybridization (SSH) cDNA libraries and microarray analysis. Rice 5 p:8. doi:10.1186/1939-8433-5-8
- Ridley B, O'Neil MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry 57: 929–967.

- Roland JC, Vian B. 1991. General preparation and staining of thin sections. In: Hall JL, Hawes E. (eds). *Electron Microscopy of Plant Cells*. Academic Press, London. p: 2–26.
- Rose JC. 2003. *The plant cell wall*, Blackwell Publishing, Garsington Road, Oxford.
- Sala K, Potocka I, Kurczynska E. 2013. Spatio-temporal distribution and methylesterification of pectic epitopes provide evidence of developmental regulation of pectins during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 57: 410-416.
- Salazar-Irribé A, Agredano-Moreno LT, Zúniga-Sánchez E, Jiménez-García LF, Gamboa-deBuen A. 2016. The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation. *Plant Science* 253: 206-214.
- Schindler TM, Bergfeld R, Van Cutsem P, Schopfer DV, Sengbusch A. 1995. Distribution of pectins in cell walls of maize coleoptiles and evidence against their involvement in auxin-induced extension growth. *Protoplasma* 188: 213–224.
- Shorthouse JD, Wool D, Raman A. 2005. Gall-inducing insects – nature’s most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology* 6: 407–411.
- Stone GN, Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 512-522.
- Willats WGA, Limberg G, Buchholt HC, VanAlebeeck GJ, Benen J. 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defines oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research* 327: 309–320.
- Willats WGA, McCartney L, Mackie L, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* 47: 9–27.
- Wolf S, Greiner S. 2012. Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249: 169–175.

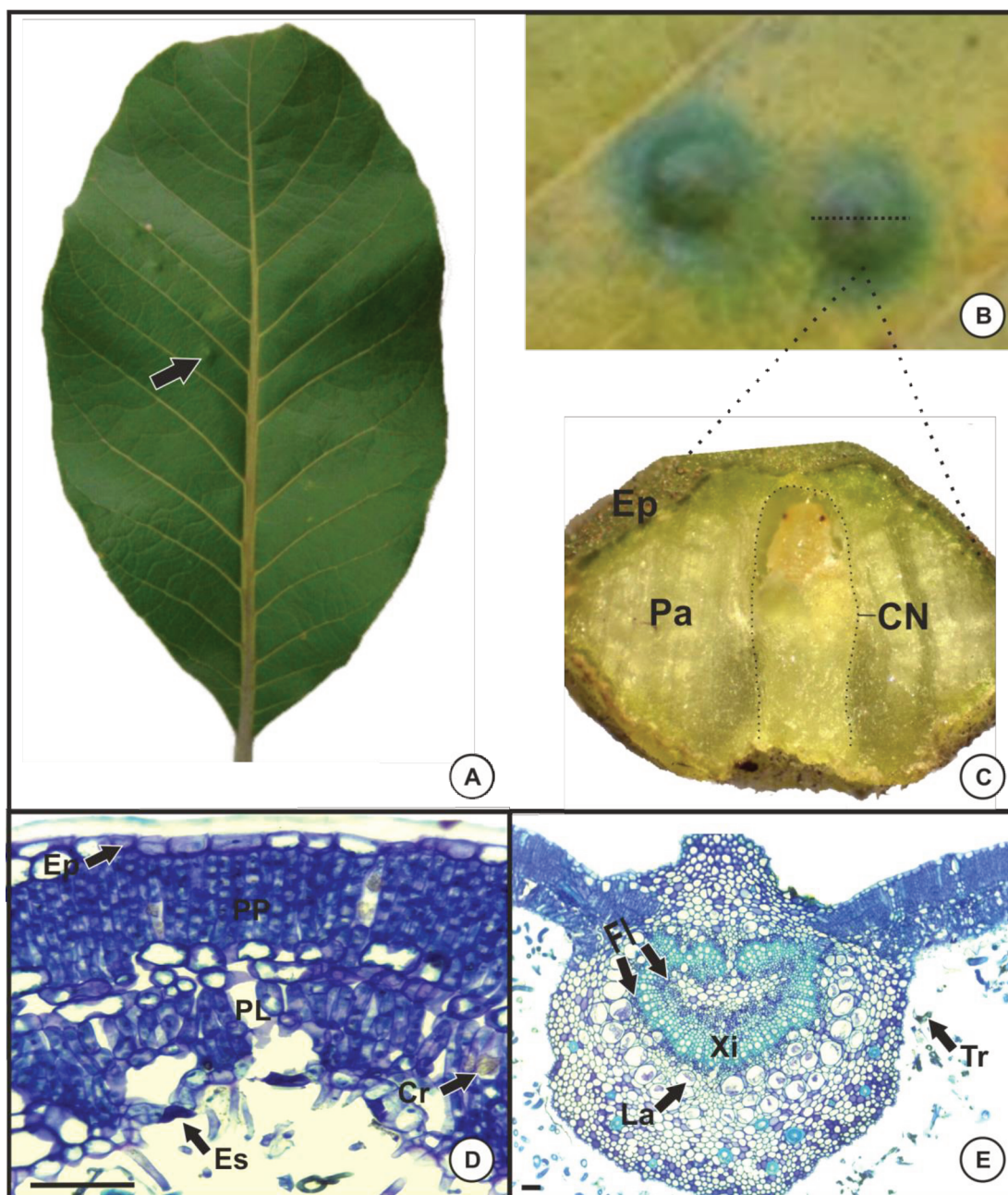


Figura 1. Características morfológicas e anatômicas de folhas não galhadas de *Aspidosperma tomentosum* e galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*. A- Vista frontal da folha com galhas jovens. Setas indicam galhas; B- Detalhe de galhas senescentes; C- Galha madura; D- Corte transversal da folha madura não galhada; E- Corte transversal da nervura mediana. Abreviações: Ep- Epiderme; Pa- Parênquima; CN- Câmara ninfal; PP- Parênquima paliçádico; PL- Parênquima lacunoso; Es- Estômato; Cr- Cristais; Fl- Floema; Xi- Xilema; La- Laticífero; Tr- Tricomas. D e E - Barra= 50 µm.

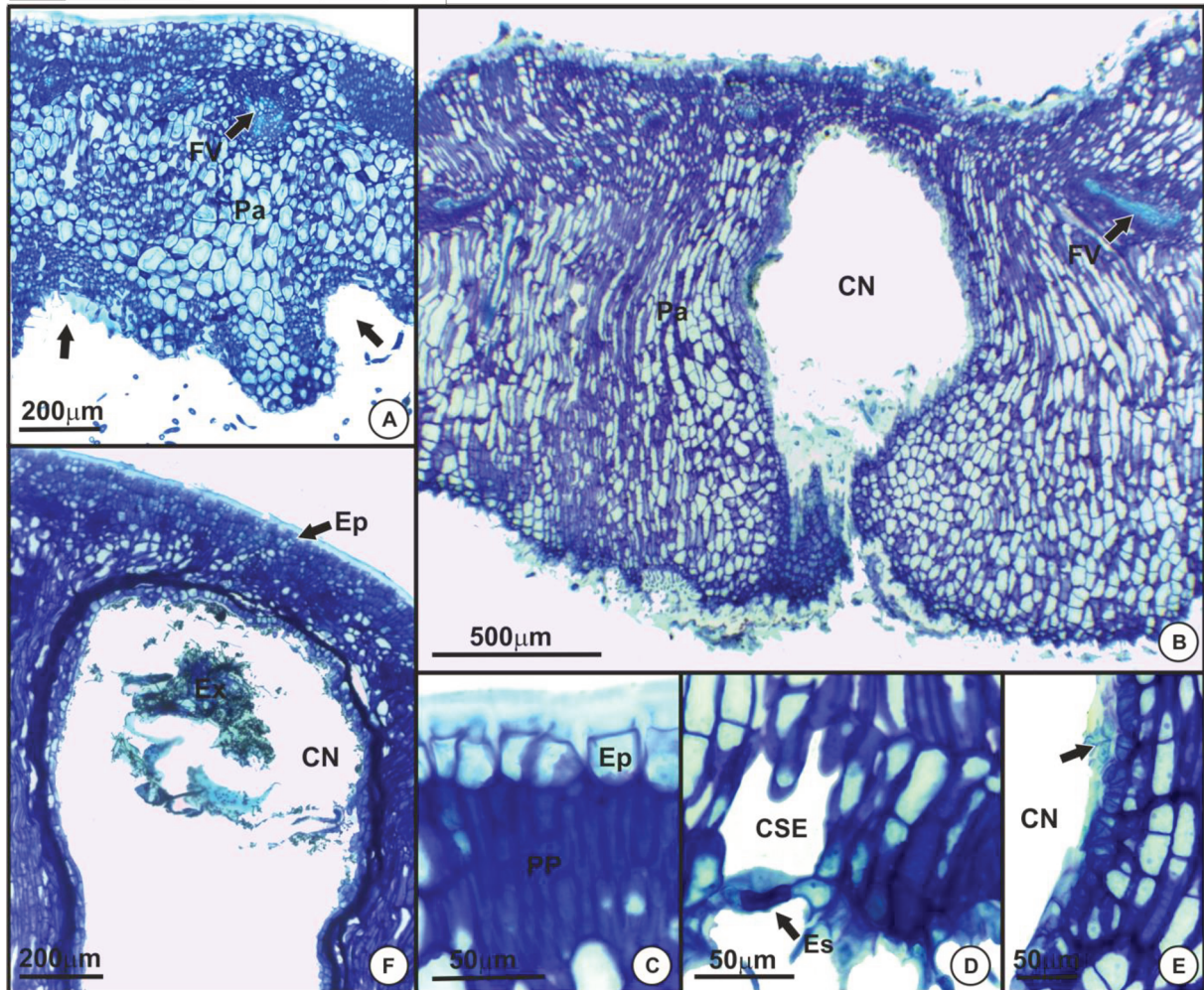


Figura 2. Características anatômicas da galha jovem (A), madura (B - E) e senescente (F) de *Aspidosperma tomentosum* induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*. A- Início da formação da galha na folha jovem (seta); B- Visão geral com hiperplasia e hipertrofia celular formando córtex da galha; C- Detalhe da epiderme na face superior da galha e conservação do parênquima paliçádico; D- Detalhe da epiderme na face interna da galha; E- Detalhe do córtex interno mostrando injúrias na epiderme; F- Visão geral da galha senescente. Abreviações: FV- Feixe vascular; Pa- Parênquima; CN- Câmara ninfal; Ep- Epiderme; PC- Parênquima paliçádico; Es- Estômato; CSE- Câmara subestomática; Ex - exúvia.

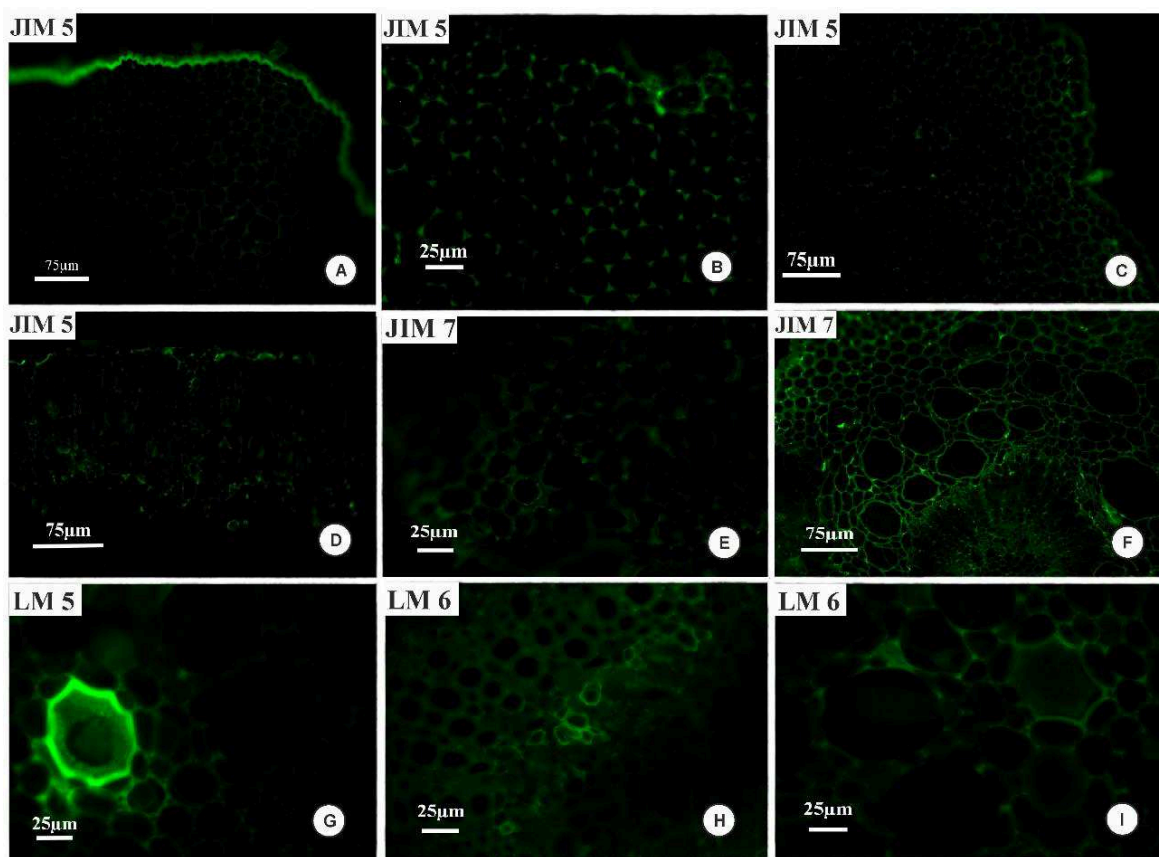


Figura 3. Distribuição de compostos péclicos na parede celular de folhas jovens (A,B), maduras (C,D,E) e senescentes (F,G,H,I) de *Aspidosperma tomentosum*. A-D- Epitopos de Homogalacturananos (HGAs) de baixa metil-esterificação, marcados na epiderme adaxial (A) e junções celulares do córtex (B) de galhas jovens, e no parênquima (C e D) de folhas maduras; E, F- Epitopos de Homogalacturananos (HGAs) de alta metil-esterificação, marcados no parênquima paliçádico (E) e no xilema (F) de folhas senescentes; G- Epitopos de (1→4) β -D-galactano nos laticíferos; H, I- Epitopos de (1 → 5) α -L-arabinanos reconhecidos no parênquima vascular.

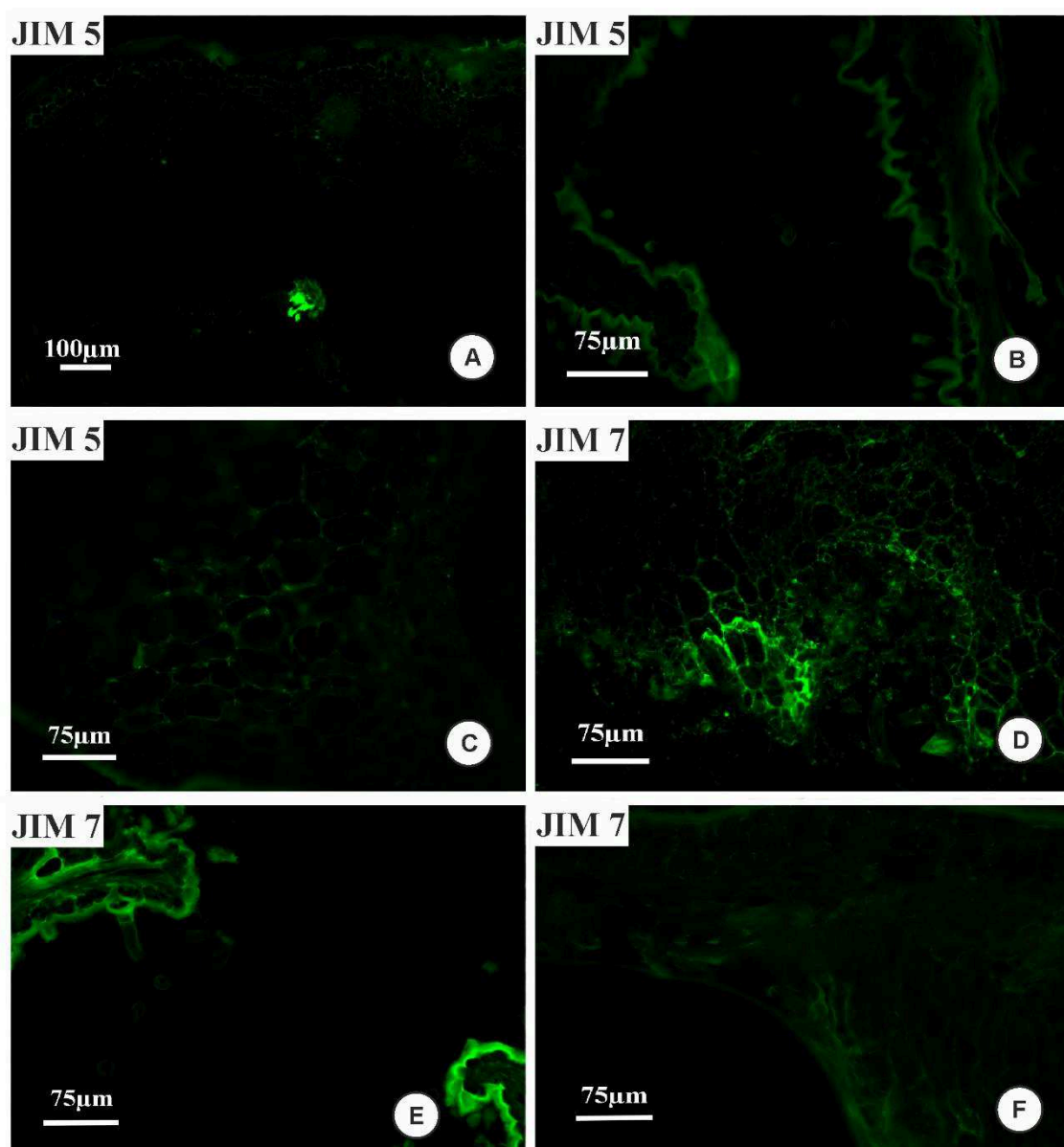


Figura 4. Distribuição de compostos péclicos na parede celular em tecidos de galhas jovens (A,D), maduras (B,E) e senescentes (C,F) de *Aspidosperma tomentosum* induzida por *Pseudophacopteron longicaudatum*. A, B, C- Epitopos de Homogalacturananos (HGAs) de baixa metil-esterificação, reconhecidos pelo JIM5 D, E, F- Epitopos de Homogalacturananos (HGAs) de alta metil-esterificação, reconhecidos pelo JIM7.

Tabela 1. Anticorpos monoclonais e seus respectivos epitopos.

Epitopos	Anticorpos monoclonais	Referências
HGA parcialmente metil-esterificado até 40%	JIM 5	Willats <i>et al.</i> 2000, Clausen <i>et al.</i> 2004
HGA (15–80% metil-esterificado)	JIM 7	Willats <i>et al.</i> 2000, Clausen <i>et al.</i> 2004
Extensinas	LM1	Leroux <i>et al.</i> 2011, Cassab 1998.
AGP glicano	LM2	Smallwood <i>et al.</i> 1995.
(1→4) β-D-galactano	LM 5	Jones <i>et al.</i> 1997
(1 → 5) α-L-arabinanos	LM 6	Willats <i>et al.</i> 1998

Tabela 2. Intensidade de reação dos epitopos.

Anticorpos monoclonais	Folha			Galha		
	<i>Jovem</i>	<i>Madura</i>	<i>Senescente</i>	<i>Jovem</i>	<i>Madura</i>	<i>Senescente</i>
Jim 5	++	++	++	+	+	+
Jim 7	-	+	++	+++	++	+
LM 1	-	+	+	-	+	+
LM 2	-	-	-	-	-	-
LM 5	-	+	++	-	-	-
LM 6	+	+	++	-	-	+

Danos e performance fotossintética em galhas foliares induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) em *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)

Vitor Martini^{1*}, Denis C Oliveira¹, Ana Silvia F.P. Moreira²

¹ Laboratório de Anatomia, Desenvolvimento Vegetal e Interações (LADEVI), Instituto de Biologia, Campus Umuarama – UFU;

² Laboratório de Fisiologia Vegetal (LAFIVE), Instituto de Biologia, Campus Umuarama – UFU;

* Autor para correspondência: vitorcmartini@gmail.com

Resumo

O processo de indução e estabelecimento de galhas provoca um alto estresse oxidativo nos tecidos da planta hospedeira. Esse impacto causado pelo inseto galhador durante o desenvolvimento da galha altera a capacidade fotossintética e as relações fonte-dreno entre tecido não galhado e galha. *Pseudophacopteron longicaudatum* (Pseudophacopteronidae) induz galhas foliares intralaminares em *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae), mantendo um pronunciado tecido clorofiliano. A formação da galha compromete o desempenho fotossintético potencial e dificulta a dissipação de energia não fotoquímica, embora a capacidade fotossintética seja mantida a baixos níveis. Durante o efeito Kautsky fica claro a deficiência dos tecidos maduros galhados, especialmente, uma grande quena na fluorescência do tecido não galhado senescente. Esta deficiência favorece a formação de radicais livres e o aumento do estresse oxidativo. Uma vez mantida, a fotossíntese contribui para a oxigenação do tecido galhado e a captura de gás carbônico, evitando a hipóxia e a hipercarbia. A galha induzida por *P. longicaudatum* em *A. tomentosum* se configura como um dreno de fotoassimilados.

Palavras-chave : Galha de sugadores, dosagem de carboidratos, efeito Kautsky,

Aspidosperma

Introdução

O estresse gerado pelos insetos galhadores nos tecidos da planta hospedeira pode causar efeitos tanto positivos (Oliveira *et al.* 2011a) quanto negativos na atividade fotossintética da galha (Florentine *et al.* 2005; Castro *et al.* 2012). Os efeitos negativos são produtos, muitas vezes, de alterações causadas na estrutura do tecido clorofiliano, no teor de pigmentos fotossintéticos, densidade e má formação de estômatos (Oliveira *et al.* 2011a; Castro *et al.* 2012). A nova organização e composição tecidual é decorrente de reações bioquímicas e biofísicas que ocorrem na membrana plasmática e parede celular e, envolvem o estabelecimento de um novo balanço redox na galha (Isaias *et al.* 2015). Tal balanço tem sido descrito como ponto chave na coordenação, manutenção e/ou modificação de vários processos metabólicos. A célula busca um equilíbrio entre a alta produção de espécies reativas de oxigênio, maximizada pelo estresse biótico na região da galha, e a dissipação destas moléculas como uma tentativa de manutenção das atividades metabólicas vitais, como respiração e fotossíntese (Oliveira *et al.* 2011b; Isaias *et al.* 2015). Como produto final, em alguns casos, o estresse oxidativo, juntamente com as alterações no tecido clorofiliano (desde sua organização até na estrutura do aparato fotossintético), comprometem de forma direta o metabolismo fotossintético. A atividade fotoquímica da fotossíntese, por sua vez, além do papel primordial na produção fortes redutores, também atua na regulação do potencial redox nos tecidos da galha (Foyer & Noctor 2005; Isaias *et al.* 2015), aumentando a disponibilidade e difusão de O₂ em seus tecidos e na câmara ninfal, além de reduzir a hipercarbica no tecido vegetal (Pincebourde & Casas 2015).

A fotoquímica da fotossíntese é dependente da absorção de luz, que excita as moléculas de clorofila *a* um estado de alta energia, permanecendo assim por nanosegundos (10⁻⁹s) até retornar ao estado basal (Papageorgiou & Govindjee 2004). Esta diferença de energia é usada para mover a cadeia transportadora de elétrons (*quenching* fotoquímico – Qy),

e seu excesso pode ser dissipado como calor (*quenching* não fotoquímico, NPQ) ou reemitido na forma de fluorescência (Pavlovic 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). A 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). Análises de fluorescência da clorofila se configuram como uma excelente ferramenta para avaliar e quantificar o estresse em plantas (Lichtenthaler & Rinderle 1988; Kooten & Snel 1990; Lichtenthaler & Miehe 1997). Parâmetros da fluorescência da clorofila têm sido uma importante ferramenta na detecção de modificações ou danos no aparato fotossintético causados pelo estresse abiótico ou biótico, como o gerado por insetos galhadores nos tecidos vegetais (Oliveira *et al.* 2011a), ou mesmo em nível molecular, como o impacto do estresse oxidativo sobre o aparato fotoquímico (Baker 2008).

Neste estudo, o balanço entre o *quenching* fotoquímico e não fotoquímico foi avaliado em *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae), tanto no tecido não galhado (TNG) quanto em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera). O aumento do estresse oxidativo, causado por fatores bióticos, provoca danos ao aparato fotoquímico e um desequilíbrio na eficiência quântica, com consequente decréscimo no qP e NPQ. Como ferramentas para avaliar os danos, parâmetros associados à fluorescência da clorofila foram estudados em conjunto com o conteúdo relativo de água, a massa foliar específica, pigmentos totais, suculência e conteúdo de carboidratos foliares. Com base na hipótese proposta, foram elaboradas as seguintes questões. Há diferença entre o rendimento fotossintético da galha e do tecido sadio? O tecido não galhado apresenta maior eficiência na dissipação de energia na fotossíntese? A galha é um dreno de fotoassimilados?

Material e métodos

Área de coleta e sistema galhador-planta hospedeira

A população de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae) utilizada neste estudo localiza-se na Reserva Ecológica do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU), situada a oeste do perímetro urbano de Uberlândia, MG (18°60'S – 48°O), na Região do Triângulo Mineiro. A reserva possui 127 ha onde predomina a vegetação de cerrado sentido restrito, entre outros tipos fisionômicos. O clima da região é do tipo Cwa (Alvares *et al.* 2013), megatérmico com duas estações bem definidas: um inverno seco (abril a setembro) com temperaturas médias baixas, e um verão chuvoso (outubro a março) com as temperaturas mais altas (acima de 35°C) (Alvares *et al.* 2013).

Todos os indivíduos da população encontravam-se infestados com galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) (Malenovsky *et al.* 2015). Uma vez que foram encontradas poucas folhas sem infestação por galhas, dentro deste estudo foram comparados o tecido da galha e tecidos não galhados (TNG) de folhas com galhas. As amostras (tanto galhas quanto TNG) foram coletadas de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento (jovem, madura e senescente) entre 8 e 10 horas da manhã. As folhas jovens e maduras inteiras, expandidas e sem injúrias foram coletadas durante a estação chuvosa, enquanto que as folhas senescentes foram coletadas durante a estação seca, e distinguidas pela coloração mais amarelada e algumas manchas de necrose. Galhas nos diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas em sincronia com as folhas, ou seja, galhas jovens foram coletadas em folhas jovens, galhas maduras em folhas maduras e, galhas senescentes em folhas senescentes.

Determinação do conteúdo relativo de água, massa específica e suculência

O conteúdo relativo de água (CRA), a massa específica (ME) e a suculência foram medidos em discos de 0,64 cm² de diâmetro do limbo foliar (três folhas de cinco indivíduos, n = 15 folhas) e da galha (três galhas de cinco indivíduos, n = 15 galhas). O CRA foi obtido pela fórmula $CRA = (MF-MS)/(MT-MS)$ onde MF refere-se à massa fresca, MS à massa seca após desidratação por 24 h em estufa a 50°C, e MT à massa turgida após hidratação do tecido fresco em água destilada por 24 h (Turner 1981). A ME foi obtida pela razão entre a MS e a área do disco ($ME = MS/A$, Witkowski & Lamont 1991). A suculência (SU) das amostras seguiu a formula proposta por Ogburn & Edwards (2012), onde $SU = (MT-MS)/MS$.

Dosagem de pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila

Discos de 15 indivíduos, medindo 0.9 cm² foram pesados em balança analítica e imersos em acetona 80% por 48 h. Em seguida, foram macerados e a solução centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm para extração dos pigmentos fotossintéticos. Foram realizadas leituras em espectrofotometro de luz (SP-220 Biospectro, Brasil) nos comprimentos de onda 470, 646 e 663 nm, sendo os valores utilizados para calcular os conteúdos de clorofilas *a* e *b*, e carotenóides através das fórmulas propostas por Lichtenthaler & Wellburn (1983).

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada em tecidos sadios (n = 15) e galhas (n = 15). Dados da cinética de fluorescência transitória entre as fases de adaptação ao escuro e ao claro foram obtidos com o equipamento Handy FluorCam (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 – F₀; máxima fluorescência adaptada ao escuro – F_m, rendimento quântico potencial – F_v/F_m; rendimento quântico efetivo durante a adaptação à luz - QY_{Lss}; *quenching* não fotoquímico após adaptação à luz no *steady-state* - NPQ e razão do declínio da fluorescência no *steady-state* – Rfd) foram obtidos com o auxílio do software Fluorcam7 (protocolo *Quenching*).

Dosagem dos teores de carboidratos

Os teores de carboidratos (açúcares solúveis totais, polissacarídeos solúveis em água e amido) foram obtidos em 2 folhas de 6 indivíduos. Os teores de açúcares solúveis totais (AST) foram obtidos após extração em metanol:clorofórmio:água, 12:5:3. O resíduo foi ressuspensionado em etanol 10% para posterior determinação dos teores de polissacarídeos solúveis em água (PSA). Nova ressuspensão do resíduo foi realizada com ácido perclórico 30% e possibilitou a dosagem de amido. A dosagem de carboidratos foi realizada utilizando-se o método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956; Chow & Landhäusser 2004) e glicose como padrão.

Análises estatísticas

Tecidos não galhados e galhas foram utilizadas como unidades amostrais. Quando no mesmo estágio de desenvolvimento, os TNGs e galhas foram comparados utilizando-se student-T. Os diferentes estágios de desenvolvimento dos tecidos não galhados ou das galhas foram comparados utilizando ANOVA, sendo testes de comparação de médias aplicados posteriormente. A interação entre a presença ou não da galha, e os estágios de desenvolvimento foi obtida através de uma ANOVA de 2 fatores. Para todas as análises foi utilizada a plataforma R e Rstudio.

Resultados

As galhas de *Pseudophacopteron longicaudum* induzidas nas folhas de *Aspidosperma tomentosum* são intralaminares com abertura e maior projeção para a face abaxial (Fig. 1A - D). Na face adaxial da galha, o tecido clorofiliano é mantido em forma de paliçada (Fig. 1B). Na região abaxial, o parênquima lacunoso sofre hipertrofia e hiperplasia das células, e perde grande parte dos seus cloroplastos. Quando a folha entra em senescência e perde a clorofila, algumas galhas permanecem verdes e com tecido clorofiliano, um fenômeno denominado efeito de “Ilha verde” (Fig. 1C).

Conteúdo relativo de água, massa específica e suculência

Os TNGs e galhados diferem durante seu crescimento e desenvolvimento, sendo observada interação entre a presença ou não da galha e os estágios de desenvolvimento dos tecidos para o conteúdo relativo de água (CRA, $F=8,98$ e $p<0,001$), a massa específica (ME, $F=35,5$ e $p<0,0001$) e suculência (SU, $F=8,8$ e $p<0,001$). O tecido galhado maduro apresentou CRA 20% maior do que o TNG (Tabela 1). A ME foi sempre maior no tecido galhado, diferindo significativamente em todos os estágios de desenvolvimento. A suculência aumentou com o desenvolvimento e foi duas vezes maior na galha do que no tecido não galhado, especialmente na galha madura e senescente.

Dosagem de pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila

Também foi observada interação entre a presença ou não da galha e os estágios de desenvolvimento dos tecidos para o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos ($F=10,6$ e $p<0,0001$ tanto para clorofilas totais quanto para carotenóides; $F=11,7$ para razão clorofila a/b e $F=4$ e $p<0,05$ para a razão clorofilas totais/carotenóides). Os TNG apresentaram maior conteúdo de clorofilas e carotenóides por unidade de massa do que as galhas. Tanto no TNG quanto na galha, a concentração de pigmentos fotossintetizantes diminuiu durante o envelhecimento do tecido (senescência) ($F=109,9$ e $p<0,0001$). A razão clorofila a/b foi 30% maior nos tecidos não galhados em comparação à galha somente no estágio maduro, enquanto que a razão clorofilas totais/ carotenóides foi 22% maior. A razão clorofila a/b foi maior no estágio maduro (até três vezes maiores nos tecidos não galhados e duas vezes nas galhas), comparando-se os estágios de desenvolvimento, e a razão clorofilas totais/carotenóides foi maior nos tecidos jovens (quase três vezes maior tanto nas galhas quanto nos tecidos não galhados).

Os valores da fluorescência mínima no escuro (F_0) foram maiores nas galhas maduras e senescentes quando comparadas aos tecidos sadios ($F=92,37$ e $p<0,0001$) (Tabela 3, Fig. 2).

Nas galhas, a F_0 aumentou com o amadurecimento dos tecidos, enquanto que nos tecidos não galhados, a F_0 não se alterou durante os diferentes estágios de desenvolvimento. A fluorescência máxima (F_m) foi maior nos tecidos não galhados jovens, mas não se diferenciando entre galhas e folhas maduras e senescentes. Nas galhas, os valores de F_m se mantiveram constantes ao longo de seu desenvolvimento, enquanto que nos tecidos não galhados, os valores de F_m reduziram das folhas jovens para as folhas senescentes, houve uma relação entre os estágios de desenvolvimento com $F=38$ e $p<0,0001$, também reflexo da menor variação entre o estágio maduro e senescente na galha. Durante os picos de luz no efeito Kautsky fica claro que o tecido não galhado se recupera de forma mais eficiente, emitindo menores valores de fluorescência, especialmente quando comparado aos tecidos maduro e senescentes da galha (Figura 2). O rendimento quântico potencial dos fotossistemas adaptados ao escuro (F_v/F_m) e o *quenching* não fotoquímico (NPQ) foram maiores nos tecidos não galhados quando maduros, também reduzindo com o envelhecimento dos tecidos. O rendimento quântico efetivo médio adaptado à luz (Q_y_{lss}) foi maior no tecido não galhado, e se manteve maior em todos os estágios de desenvolvimento, apresentando uma diferença entre os tecidos ($F=94,9$ e $p<0,0001$). O índice R_{fd} foi maior nos tecidos não galhados maduros, permanecendo constante nas folhas jovens e senescentes. Este índice foi menor durante o estágio de senescência, tanto para folhas quanto para as galhas.

Dosagem dos teores de carboidratos

Diferentemente dos outros parâmetros analisados, o conteúdo de carboidratos não demonstrou interação entre a presença ou não da galha e os estágios de desenvolvimento dos tecidos, tanto para os AST quanto para os PSA. O único carboidrato que mostrou alguma relação foi o teor de amido ($F=30$ e $p<0,0001$). Os TNG e as galhas não apresentaram diferença entre os teores de AST, apresentando um acréscimo durante seu desenvolvimento ($F=95,3$ e $p<0,0001$). Do mesmo modo, os PSA não variaram entre os TNG e as galhas,

porém as galhas tiveram um acréscimo menor durante o desenvolvimento. As análises para amido foram os que menos variaram entre os estágios de desenvolvimento, porém, mostraram menores teores durante a fase madura, e aumentando na senescência, especialmente na galha.

Discussão

O galhador *P. longicaudatum* gera um alto estresse oxidativo nos tecidos foliares de *A. tomentosum* (ver cap. 1). Este estresse, por sua vez, aumenta a energia a ser dissipada e sobrecarrega a dissipação de energia na fotossíntese, especialmente nas galhas maduras em relação ao tecido sadio, conforme pode ser observado nos resultados de fluorescência inicial ($F=92,3$ e $p<0,0001$) obtidos a partir da curva de Kautsky realizadas nos tecidos não galhados e nas galhas. O estresse oxidativo gerado em resposta ao ataque de insetos galhadores já foi anteriormente reportado na literatura e discutido considerando-se seu impacto na performance fotossintética (Oliveira *et al.* 2011b; Oliveira *et al.* 2014; Carneiro *et al.* 2014). A manutenção do aparato fotossintético pode manter os níveis adequados de oxigênio e gás carbônico nos tecidos, além de se configurar como um mecanismo eficiente de redução do estresse oxidativo em galhas. O tecido da galha induzida por *P. longicaudatum* em *A. tomentosum* pode ser caracterizado como um dreno de fotoassimilados, isso porque a quantidade de açúcares nos tecidos não galhados não difere daqueles encontrados nas galhas, apesar do maior conteúdo relativo de água e a maior capacidade de armazenamento hídrico (suculência) da galha reflexo da hiperplasia e a hipertrofia celular nesta região. O maior volume nas galhas, diluem as gramas de carboidrato, o que mostra um maior numero de carboidratos região galhada.

Alterações na performance fotossintética

Há um decréscimo no conteúdo de pigmentos fotossintéticos das galhas quando comparadas com os tecidos não galhados ($F=96,5$ e $p<0,0001$). O decréscimo de pigmentos fotossintéticos em galhas tem sido relatado em vários sistemas como: galhas induzidas por Cecidomyidae em *Copaifera langsdorffii* (Castro *et al.* 2012) e *Aspidosperma spruceanum*

(Oliveira *et al.* 2011b); e induzidas por Psylloidea em *Psidium myrtoides* (Carneiro *et al.* 2014) e *Aspidosperma australe* (Oliveira *et al.* 2011b). 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 clorofiliano durante a fase de crescimento e desenvolvimento da galha. No sistema *P. longicaudatum* – *A. tomentosum*, o desempenho fotossintético foi comprometido quando comparado com o dos tecidos não galhados, apresentando valores de rendimentos quântico potencial e efetivo menores que do TNG, o que vai de encontro ao encontrado na literatura para outros sistemas galhador – planta hospedeira. O tecido da galha ainda sofre uma desorganização do parênquima lacunoso, diminuindo a eficiência no aproveitamento da luz e difusão de gases (Taiz & Zeiger 2004). Ambos os tecidos reduzem os teores de clorofila e carotenoides com o envelhecimento. Tal fato poderia ser indicativo de degradação dos pigmentos pelo aumento do estresse oxidativo, como proposto para *A. australe* (Oliveira *et al.* 2011a). Entretanto, o menor teor de pigmentos nas galhas pode ser explicado pelo aumento do número e tamanho das células, que de certa forma aumenta o CRA, a suculência, e a massa específica, diluindo os pigmentos no tecido. A expansão celular também ocorre durante a maturação dos tecidos, corroborando o fato dos tecidos jovens apresentarem maior conteúdo de pigmentos. Embora a redução no conteúdo de pigmentos possa ser efeito de uma diluição decorrente da hiperplasia celular nas galhas, as análises de fluorescência também mostram uma redução no rendimento quântico potencial nos tecidos da galha. A presença de clorofila por si só já indica capacidade fotossintética do tecido da galha, mas a redução nos teores de clorofila e carotenoides, juntamente com o alto estresse oxidativo induzido pelo galhador, pode afetar o balanço final da fotossíntese, como reportado anteriormente para outros sistemas Neotropicais (Oliveira *et al.* 2010; Isaias *et al.* 2015). Os carotenoides são importantes agentes na dissipação de energia; o excesso de energia nos fotossistemas, leva à de-epoxidação da violaxantina a anteraxantina e zeaxantina, sendo o processo reverso

responsável por regular a dissipação de energia (Demmig-Adams 1996). Esta energia é liberada principalmente na forma de calor, aumentando os valores do quenching não-fotoquímico (NPQ) e assim menores teores de carotenoides nos tecidos não refletem os menores valores de NPQ (tabela 3). Na galha, a redução dos carotenóides também acontece, mas o NPQ sofre um aumento no estágio maduro, o que pode reduzir as taxas de fluorescência (Demmig-Adams *et al.* 1996).

Os baixos valores de rendimento quântico potencial na galha madura (inferiores a 0,8) de *A. tomentosum* indicam fotoinibição do PSII (Lüttge 1998). Durante o processo de fotoinibição, as espécies ativas de oxigênio (principalmente o $^1\text{O}_2$) 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 altos valores de F_0 observado nas galhas de *A. tomentosum*, assim como nas galhas induzidas por *Eugeniamyia dispar* (Diptera: Cecidomyiidae) nas folhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) (Isaias *et al.* 2015). A fluorescência inicial (F_0) 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 – Nordenkamp *et al.* 1989). Sendo assim, os níveis mais altos de F_0 indica comprometimento dos PSII nos tecidos das galhas de *A. tomentosum*, e estresse oxidativo.

Como consequência do aumento do estresse em plantas, geralmente há um decréscimo no rendimento quântico, diminuindo o *quenching* fotoquímico e não fotoquímico (Lichtenthaler & Miehè 1997; Ruban *et al.* 2004) nos tecidos da galha. Ambos Q_y e NPQ ajudam a minimizar a produção de $^3\text{Chl}^*$ (Clorofila tripleto). Esta molécula transfere energia para o O_2 gerando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2^*$), uma EAO extremamente tóxica (Pavlovic 2012),

que é prontamente convertida na forma mais estável, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (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). O decréscimo na eficiência de dissipação de calor (NPQ) nos tecidos das galhas poderia levar a um efeito ainda mais negativo no rendimento fotossintético e aumentar o estresse oxidativo. Esta deficiência na capacidade de dissipação de energia pelas galhas também pode ser verificada na curva de Kautsky que, logo após os picos de luz, mostram menor taxa de recuperação quando comparada ao tecido não galhado. Estratégias de combate ao estresse oxidativo, como produção de plastoglôbulos que auxiliam na recuperação do aparato fotossintético, já foram descritas (Oliveira *et al.* 2011b) e detectadas nas galhas de *A. tomentosum* (Capítulo 1), assim como lignificação e o investimento em compostos fenólicos têm sido discutidos como eficiente estratégia de dissipação do estresse. De fato, a deficiência em dissipação de energia na fotossíntese das galhas maduras e senescentes pode levar a um aumento do estresse oxidativo na forma de produção de EAO. Estas moléculas precisam ser dissipadas para manutenção do balanço redox no tecido (Isaias *et al.* 2015).

O maior rendimento quântico potencial dos tecidos jovens e maduros reflete os maiores valores de Rfd ($2,24 \pm 0,13$ e $2,61 \pm 0,40$ nas folhas jovens e maduras, e $2,27 \pm 0,25$ nas galhas jovens) indicando maior vitalidade destes tecidos (Lichtenthaler & Miehè 1997). Assim, pode se concluir que o aparato fotossintético das galhas jovens ainda não foi comprometido pela ação do inseto galhador. 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_2 e consequente estresse (Haitz & Lichtenthaler 1988). Entretanto, é importante ressaltar que a galha, em nenhum estágio de desenvolvimento avaliado apresentou valores de Rfd menor que 1,

embora haja uma redução da vitalidade e eficiência do ciclo de Calvin nas galhas quando comparadas às folhas, este processo permanece eficaz.

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 induzida por *P. longicaudatum* em *A. tomentosum* possui altos valores de CRA, ME e SU indicando aumento de água e quantidade de massa por área. A hipertrofia das células, e redução dos espaços intercelulares dificulta a difusão de gases, podendo levar a hipóxia e hipercarbia do tecido (Haiden *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2011b; Isaias *et al.* 2015). Haiden *et al.* 2012 reportaram que a fotossíntese ocorre até dois milímetros de profundidade nos tecidos das galhas de *Trichilogaster acaciaelongifoliae* induzidas em *Acacia longifolia*. Assim, a fotossíntese concentra-se nos tecidos periféricos e, quanto mais espessa a galha mais profunda é a câmara larval, menor é disponibilidade de O₂ e mais intensa é a concentração de CO₂ nos tecidos internos. Alternativamente, o galhador *T. acaciaelongifoliae*, demonstra grande habilidade em controlar seu metabolismo, de acordo com os níveis de O₂ e CO₂ disponíveis na galha, aumentando ou diminuindo a respiração conforme lhe for necessário (Haiden *et al.* 2012). Entretanto, nos próprios tecidos da galha, 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 O₂, viabilizando a respiração aeróbica (Oliveira *et al.* 2011; Castro *et al.* 2012; Isaias *et al.* 2015). O consumo de CO₂ no ciclo de Calvin durante a atividade fotossintética nos tecidos da galha evita a hipercarbia nos tecidos e pode ajudar a reduzir a concentração de CO₂ na câmara ninfal.

No sistema *P. longicaudatum* e *A. tomentosum*, os teores de carboidratos não apresentaram grande alteração entre os TNG e as galhas, indicando que esta galha não é forte

dreno de carboidratos. Os carboidratos são produto de uma das vias metabólicas primárias dos vegetais. São responsáveis por suprir a demanda energética metabólica e garantir o balanço osmótico dos tecidos (açúcares solúveis totais), por constituir a parede celular na forma de celulose e hemicelulose (polissacarídeos solúveis em água) e, quando em abundância, podem ser armazenados na forma de amido (Preiss 1988). Os maiores valores de polissacarídeos solúveis em água nas galhas jovens, quando comparados com os tecidos sadios não galhados, é reflexo da alta taxa de divisão celular e, portanto, da alta densidade do tecido nesta fase, se preparando para a expansão da própria galha (Fuzaro 2014).

Conclusão

A análise de parâmetros fisiológicos em galhas induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum* em *Aspidosperma tomentosum* mostra que a estrutura neoformada é capaz de manter seu metabolismo fotossintético em todas as fases de desenvolvimento. A fotossíntese que ocorre nos tecidos galhados desempenha papel fundamental na manutenção do maquinário celular, e talvez no controle do estresse oxidativo, bem como na prevenção da hipóxia e hipercardia nos tecidos. A disponibilidade de O₂ e o controle na concentração de CO₂ são importantes para o metabolismo da galha e do inseto galhador. A galha induzida *Pseudophacopteron longicaudatum* em *Aspidosperma tomentosum* não pode ser considerada como um forte dreno de fotoassimilados, pois não é acumuladora de carboidratos.

Referência de literatura

- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift 22: 711–728.
- Baker NR. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of photosynthesis in vivo. Annual Review of Plant Biology 59: 89–113.

- 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.
- Bedetti CS, Modolo 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.
- Bhattacharjee S. 2010. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: Gupta SD (eds). Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Science Publishers. p: 1-30.
- 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 Ecology* 3: 497–514.
- Carneiro RGS, Castro AC, Isaias RMS. 2014. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. *South African Journal of Botany* 92: 97–104.
- 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: 1891–1900.
- 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.
- Chow PS, Landhäuser SM. 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology* 24: 1129-1136.
- Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams III WW. 1996. Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* 10: 403-412

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-256.
- 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: 787–801.
- 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 and Environment* 29: 1056–107.
- Fuzaro L. 2015. Padrões de alongamento celular durante a ontogênese foliar e de galhas induzidas por *Pseudophacopteron* sp. em *Aspidosperma tomentosum* Mart. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Uberlândia UFU.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *BBA - General Subjects* 990: 87–92.
- Haiden SA, Hoffmann JH, Cramer MD. 2012. Benefits of photosynthesis for insects in galls. *Oecologia* 170: 987–997.
- Haitz M, Lichtenthaler HK. 1988. The Measurement of Rfd-values as plant vitality indices with the portable field chlorophyll fluorometer and the pam-fluorometer. In: Lichtenthaler HK. (eds). *Applications of chlorophyll fluorescence*. Kluwer Academic Publishers. p: 249-254.
- Heldt HW, Piechulla B. 2011. *Plant biochemistry*. Elsevier, London.
- 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* 8: 1509-1517.

- Kautsky H, Hirsch A. 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19: 964-964.
- Kooten VO, Snel JFH. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 3: 147–150.
- Kraus JE. 2009. Galhas: morfogênese, relações ecológicas e importância econômica. In: Tissot-Squalli ML (eds). *Interações Ecológicas & Biodiversidade*, Editora Unijuí, Ijuí, p: 109-140.
- Lichtenthaler HK, Wallburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 11: 591–592.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Rinderle U, Schmuck G. 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation Environmental Biophysics* 25: 297–308.
- Lichtenthaler HK, Miehe JA. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2(8): 316–320.
- Lichtenthaler HK, Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *C R C Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19: 29-85.
- Lüttge 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.
- Malenovský I, Burckhardt D, Queiroz DL, Isaias RMS, Oliveira DC. 2015. Descriptions of two new *Pseudophacopteron* species (Hemiptera: Psylloidea: Phacopteronidae) inducing galls on *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 55: 513-538.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.

- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 8777-8796.
- 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: 81–93.
- Oliveira DC, Carneiro RGDS, Magalhães TA, Isaias RMS. 2011a. Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)-Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma* 248: 829–837.
- 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: An International Journal of Experimental Plant Biology* 180: 489–95.
- 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, p:550.
- 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. p:103-113
- Ogburn RM, EJ Edwards. 2012. Quantifying succulence: a rapid, physiologically meaningful measure of plant water storage. *Plant, Cell and Environment* 35: 1533-1542.
- Papageorgiou GC, Govindjee. 2004. Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. In: *Advances in photosynthesis and respiration*, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 818pp.

- Papageorgiou GC, Tsimilli-Michael M, Stamatakis K. 2007. The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. *Photosynthesis Research*. 94: 275-290.
- Pavlovič A. 2012. The effect of electrical signals on photosynthesis and respiration. In: Volkov AG. (eds). *Plant Physiology*, Bratislava, Slovakia.
- 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* 86: 137-153.
- Preiss J. 1988. *The biochemistry of plants: carbohydrates*. Academic Press, San Diego.
- Ruban A, Lavaud J, Rousseau B, Guglielmi G, Horton P, Etienne A. 2004. The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photosynthesis Research* 82: 165.
- Taiz L, Zeiger E. 2004. *Fisiologia vegetal*. 3ed. Artmed.
- Turner NC. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* 58: 339-366.
- 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.

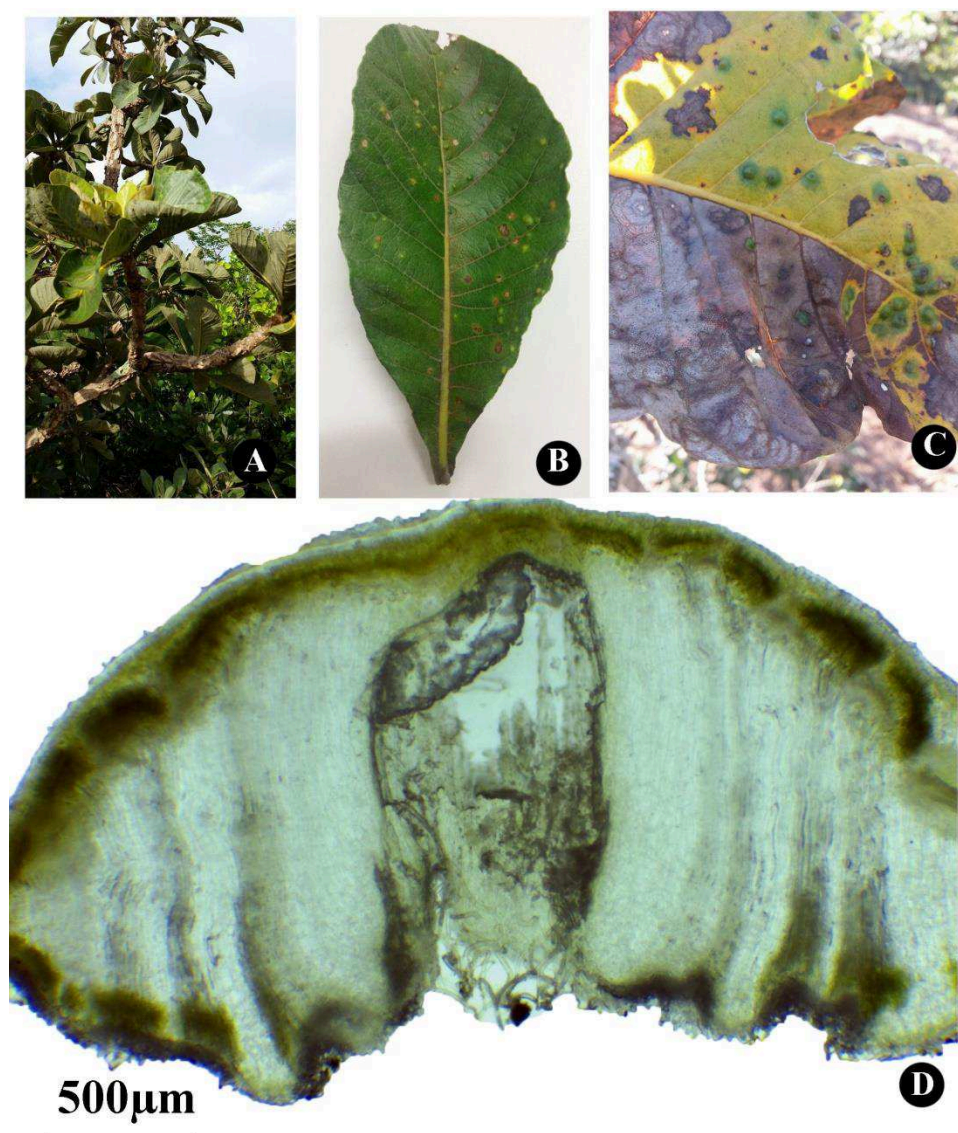
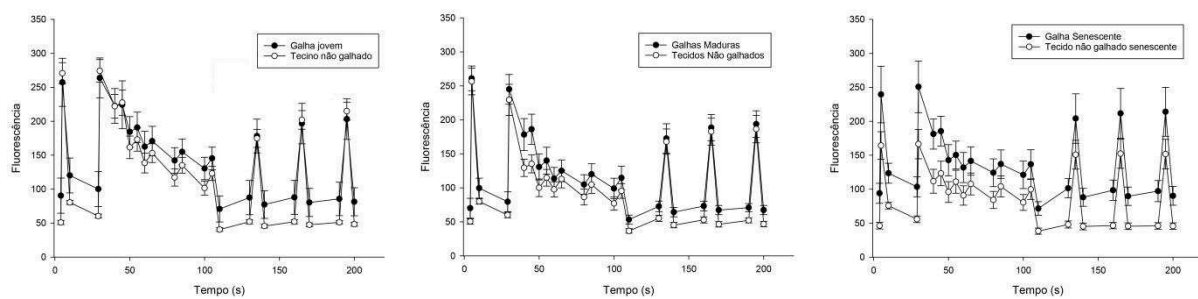


Figura 1 – Galhas de *Aspidosperma tomentosum* induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*. (A) *A. tomentosum* com folhas maduras. (B) Detalhe de folha com galhas jovens. (C) Folha senescente e galha formando o efeito “ilha verde”. (D) Galha madura em corte transversal sem coloração, evidenciando tecido clorofiliano.



(Figura 2) Grafico da curva Kautsky em galhas de *Aspidosperma tomentosum* induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*. 1 – Galha jovem e tecido não galhado jovem, 2 – Galha madura e tecido não galhado maduro, 3 – Galha senescente e tecido não galhado senescente.

Maturação do órgão	CRA (%)			ME (mg MS cm ⁻²)			SU (mg H ₂ O g ⁻² MS)		
	TNG	Galha	P	TNG	Galha	p	TNG	Galha	p
Jovem	62,51 ± 10 ^{bA}	63,56 ± 8,2 ^{bA}	0,76	9,2 ± 1,1 ^{cA}	13,46 ± 1,7 ^{cA}	<0,0001	2,52 ± 0,57 ^{aA}	3,11 ± 0,76 ^{aA}	0,024
Maduro	64,29 ± 5,29 ^{bA}	76,94 ± 4,15 ^{aA}	<0,0001	14,60 ± 0,72 ^{aB}	22,75 ± 2,71 ^{bB}	<0,0001	0,9 ± 0,09 ^{cB}	2,10 ± 0,28 ^{bB}	<0,0001
Senescente	71,22 ± 4,25 ^{aB}	75,39 ± 4,78 ^{aB}	0,047	10,99 ± 1,28 ^{bC}	28,07 ± 6,14 ^{aC}	<0,0001	1,55 ± 0,18 ^{bC}	3,23 ± 0,26 ^{aA}	<0,0001
p	<0,01	<0,0001		<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001	

*Letras maiúsculas comparam os diferentes estágios de desenvolvimento e minúsculas os tecidos.

Tabela 1 - Conteúdo relativo de água (CRA), massa específica (ME) e suculência (SU) em galhas (induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*) e tecidos não galhados de *Aspidosperma tomentosum* em diferentes estágios de desenvolvimento (jovens, maduros e senescentes). Galhas (n=15) e folhas (n=15) em um mesmo estágio de desenvolvimento foram comparados com o teste T-student e os diferentes estágios foram comparados utilizando-se ANOVA 2 fatores, todos considerando diferenças a 5% de probabilidade.

Maturação do órgão	Clorofilas totais ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)			Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)			Clorofila a/b			Clorofilas totais/carotenóides		
	TNG	Galha	P	TNG	Galha	P	TNG	Galha	p	TNG	Galha	p
Jovem	$1,8 \pm 0,4^{\text{aA}}$	$1,0 \pm 0,4^{\text{aA}}$	<0,0001	$0,22 \pm 0,06^{\text{cA}}$	$0,14 \pm 0,05^{\text{bA}}$	<0,001	$2,4 \pm 0,2^{\text{bB}}$	$2,4 \pm 0,4^{\text{bA}}$	0,67	$8,3 \pm 1,1^{\text{aA}}$	$7,4 \pm 0,9^{\text{aA}}$	0,05
Maduro	$1,3 \pm 0,2^{\text{aB}}$	$0,5 \pm 0,1^{\text{bB}}$	<0,0001	$0,4 \pm 0,1^{\text{aB}}$	$0,2 \pm 0,03^{\text{aB}}$	<0,0001	$8,3 \pm 0,3^{\text{aA}}$	$5,6 \pm 2,1^{\text{aB}}$	<0,01	$3,5 \pm 0,3^{\text{bB}}$	$2,7 \pm 0,7^{\text{bB}}$	<0,01
Senescente	$0,4 \pm 0,3^{\text{bC}}$	$0,2 \pm 0,1^{\text{cC}}$	0,013	$0,3 \pm 0,1^{\text{bB}}$	$0,1 \pm 0,02^{\text{bC}}$	<0,0001	$1,9 \pm 0,9^{\text{bB}}$	$2,1 \pm 0,7^{\text{bB}}$	0,085	$1,1 \pm 0,8^{\text{cC}}$	$1,7 \pm 0,9^{\text{bC}}$	0,47
p	<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001	

*Letras maiúsculas comparam os diferentes estágios de desenvolvimento e minúsculas os tecidos.

Tabela 2 - Teor de pigmentos cloroplastídicos em galhas (induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*) e tecidos não galhados de *Aspidosperma tomentosum* em diferentes estágios de desenvolvimento (jovens, maduros e senescentes). Os tecidos em um mesmo estágio de desenvolvimento foram comparados com o teste T-student e os diferentes estágios foram comparados utilizando-se ANOVA 2 fatores, todos considerando diferenças a 5% de probabilidade.

	Galhas			Tecidos não galhados		
	Jovem	Madura	Senescente	Jovem	Maduro	Senescente
F ₀	53,4 ± 4,5 ^B	75,2 ± 8,5 ^A	89,2 ± 17,9 ^A	45,3 ± 2,8 ^B	50,5 ± 4,3 ^A	49,0 ± 4,2 ^{AB}
F _m	147,54 ± 15 ^B	249,8 ± 29,9 ^A	222,1 ± 41,6 ^A	225,28 ± 14,4 ^A	256,6 ± 21,7 ^B	179,4 ± 17,2 ^C
F _v /F _m	0,69 ± 0,02 ^A	0,69 ± 0,03 ^A	0,59 ± 0,07 ^B	0,79 ± 0,08 ^A	0,80 ± 0,007 ^A	0,72 ± 0,01 ^B
Qy_Lss	0,01 ± 0,01 ^B	0,07 ± 0,03 ^A	0,07 ± 0,04 ^A	0,18 ± 0,03 ^A	0,11 ± 0,02 ^B	0,11 ± 0,02 ^B
NPQ	1,69 ± 0,26 ^A	1,33 ± 0,20 ^A	0,92 ± 0,33 ^B	1,7 ± 0,12 ^A	2,22 ± 0,16 ^B	0,69 ± 0,18 ^C
Rfd	1,93 ± 0,35 ^A	1,57 ± 0,24 ^{AB}	1,20 ± 0,35 ^B	2,55 ± 0,10 ^A	2,61 ± 0,40 ^B	1,22 ± 0,11 ^C

*Letras maiúsculas comparam os diferentes estágios de desenvolvimento.

Tabela 3 - Análise da fluorescência da clorofila em galhas (induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*) e tecidos não galhados de *Aspidosperma tomentosum* em diferentes estágios de desenvolvimento (jovens, maduros e senescentes). Galhas (n=5) e folhas (n=5) foram comparados com o teste T-student e os diferentes estágios de desenvolvimento foram comparados utilizando-se ANOVA 2 fatores, todos considerando diferenças a 5% de probabilidade.

Maturação do órgão	Açúcares solúveis totais (mg g ⁻¹)			Polissacarídeos solúveis em água (mg g ⁻¹) 1)			Amido (mg g ⁻¹)		
	TNG	Galha	P	TNG	Galha	P	TNG	Galha	p
Jovem	94,4 ± 38,5 ^{bA}	84,4 ± 28,6 ^{cA}	0,52	11,4 ± 9,1 ^{bA}	30,2 ± 14,7 ^{bB}	<0,005	235,7 ± 67,1 ^{bA}	294,9 ± 102,5 ^{bA}	0,14
Maduro	333,9 ± 96,7 ^{aB}	258,7 ± 96,6 ^{bB}	0,099	65,1 ± 26,4 ^{aB}	51,3 ± 12,1 ^{bB}	0,15	183,4 ± 37,2 ^{bAB}	162,2 ± 55,2 ^{bB}	0,33
Senescente	444,6 ± 112,6 ^{aC}	507,6 ± 116,0 ^{aC}	0,23	146,8 ± 63,4 ^{aC}	114,0 ± 36,7 ^{aA}	0,17	360,9 ± 72,5 ^{aB}	410,7 ± 35,3 ^{aC}	0,072

*Letras maiúsculas comparam os diferentes estágios de desenvolvimento e minúsculas os tecidos.

Tabela 4 – Teores de carboidratos em galhas (induzidas por *Pseudophacopteron longicaudatum*) e tecidos não galhados de *Aspidosperma tomentosum* em diferentes estágios de desenvolvimento (jovens, maduros e senescentes). Galhas (n=???) e folhas (n=??) em um mesmo estágio de desenvolvimento foram comparados com teste T-student e os diferentes estágios de desenvolvimento foram comparados utilizando-se ANOVA 2 fatores, todos considerando diferenças a 5% de probabilidade.

Considerações finais

A avaliação dos gradientes funcionais da galha de *Aspidosperma tomentosum* induzida por *Pseudophacopteron longicaudatum*, possibilitou a compilação de dados para discussão do papel das pectinas durante o desenvolvimento da galha e do órgão vegetal, além de fornecer um material comparativo com outras galhas quanto ao padrão de acúmulo de nutrientes e alimentação de galhadores. As análises da fotossíntese mostraram sua maquinaria estressada, e fazendo parte da dissipação de espécies reativas de oxigênio, o que coloca a galha como um dreno. Foi visto também a capacidade de manter o tecido clorofiliano pelo galha, uma vez que na senescência apresentou menor queda nos parâmetros medidos.

