

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Graziela Fleury Coelho de Araújo

**Reações estruturais, histoquímicas e fotossintéticas de
Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) à
Cecidomyiidae galhadores**

Orientadora: Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias
Co-orientador: Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares

Belo Horizonte - MG
Março/2009

Graziela Fleury Coelho de Araújo

**REAÇÕES ESTRUTURAIS, HISTOQUÍMICAS E FOTOSSINTÉTICAS DE
Guapira opposita (Vell.) Reitz (NYCTAGINACEAE) A CECIDOMYIIDAE
GALHADORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias
Co-orientador: Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares

Belo Horizonte - Minas Gerais

Março/2009

Ficha Catalográfica

ARAÚJO, Graziela Fleury Coelho

ISAIAS, Rosy Mary dos Santos (Orientadora)

SOARES, Geraldo Luiz Gonçalves (Co-orientador)

115 + 6pp.

Reações estruturais, histoquímicas e fotossintéticas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz
(Nyctaginaceae) a Cecydomiidae galhadores

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

Departamento de Botânica. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de
Minas Gerais.

1. *Guapira opposita* 2. Cecidomyiidae 3. Galhas 4. Anatomia

I. Departamento de Botânica. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de
Minas Gerais

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Zabelê Dantas Moura

Prof. Dr. Milton de Souza Mendonça Júnior

Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias
(Orientadora)

*À minha mãe (in memoriam) e ao meu pai,
Beto e filhos (Luca e
Mar), sem os quais
não teria realizado
esse trabalho...*

“O essencial é invisível aos olhos”

Antoine de Saint Exupéry

Agradecimentos

À profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias, pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade, apoio, palavras oportunas em momentos necessários... Seu exemplo profissional e pessoal me acompanhará sempre. Palavras faltam para expressar minha gratidão.

Ao prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares, por me apresentar as galhas em *Guapira opposita*, pelas constantes coletas do Sul, ensinamentos, sugestões de trabalho e amizade.

Aos prof. Dr. Elder Antônio Sousa e Paiva e Fernando Henrique Aguiar Vale, pelos ensinamentos e pelas agradáveis, porém rápidas, conversas nos intervalos de trabalho.

Aos amigos Dênis e Ana Sílvia, que me auxiliaram de diversas formas, na condução da dissertação. Em especial, Dênis: seu auxílio constante no campo e boas idéias acrescentaram muito na minha formação. A ausência de vocês no laboratório deixa muitas saudades...

A estagiária Cibelli Benetti, pela dedicação em seu trabalho e auxílio prestado no processamento de material.

Ao Grupo Galhas: Anete, Bruno, Carol, Dênis, Flávia, Graciela, Maria Zabelê, Renê e Thiago que formam uma equipe, pronta a trocar idéias e experiências, boas discussões teóricas... Em especial, Anete, Graci, Renê e Thiago pelo auxílio no processamento do material e leituras críticas do texto. Vocês são um exemplo profissional!

Aos colegas de laboratório de ontem e hoje, Sandrinha, Esmeire, Ernesto, Rafael, Marcos, Márcia e Jôsie sempre dispostos a auxiliar e dar um ombro amigo.

Ao Pedro Lage Vianna e a Nara Furtado por terem me indicado a população de *Guapira opposita* em Brumadinho – MG.

Ao Dr. Marcos Sobral, do Herbário BHCB (Departamento de Botânica da UFMG), pelo auxílio na identificação das espécies e pelos ensinamentos prestados em campo.

À profa. Dra. Valéria Cid Maia (Museu Nacional, Departamento de Entomologia) pelo auxílio na identificação dos insetos indutores e pelas informações prestadas ao longo da pesquisa.

À técnica Maria do Socorro Silva pelo auxílio nas extrações de clorofila.

À profa. Dra. Elizabeth Ribeiro da Silva, coordenadora técnico-científica da área biológica e ao Breno Barbosa Moreira do Centro de Microscopia da UFMG.

À Danessa Schardong Boligon e ao Abner Elpino Campos, em nome dos quais agradeço aos demais colegas do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos da UFRGS e do Laboratório de Ecologia de Interações, pela acolhida e auxílio prestado durante as coletas em Porto Alegre – RS.

Ao Danilo Bastos, do Departamento de Zootecnia da UFMG, pelo auxílio prestado nas análises estatísticas.

Aos meus irmãos Flávia, Joaquim e minha irmã de coração Lorenza, pelo apoio incondicional, pela moradia, pelas palavras de conforto que deram força para continuar meu caminho.

Aos meus tios Milton e Consuelo, por me receberem tão bem em seu lar.

Às amigas Simone e Suzana, que durante esses anos me deram apoio, incentivo e trouxeram muita descontração nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, pelo incentivo expresso em palavras e no orgulho que sente por mim.

Aos três homens da minha vida: Beto, Lucas e Marcelo, pela renúncia, carinho e compreensão dos momentos de convívio que lhes foram furtados. Dedico essa vitória à vocês!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	02	
ABSTRACT.....	03	
INTRODUÇÃO GERAL		
.....	04	
Referências.....	10	
CAPÍTULO 1 – SIMILARIDADES ENTRE QUATRO MOFOTIPOS DE GALHAS INDUZIDAS POR DIPTERA: CECIDOMYIIDAE (SCHIZOMYIINA) EM <i>GUAPIRA OPPOSITA</i> (VELL.) REITZ (NYCTAGINACEAE).....		14
Resumo.....	15	
Abstract.....	16	
Introdução.....	17	
Material e Métodos.....	18	
Resultados.....	21	
Discussão.....	35	
Referênci.....	40	
CAPÍTULO 2 – PROCESSOS ONTOGÊNICOS NAS GALHAS INDUZIDAS POR <i>PISPHONDYLIA BRASILIENSIS</i> COURI & MAIA 1992 (CECIDOMYIIDAE) EM <i>GUAPIRA OPPOSITA</i> (VELL.) REITZ (NYCTAGINACEAE).....		46
Resumo.....	47	
Abstract.....	48	
Introdução.....	49	
Material e Métodos	50	
Resultados.....	52	
Discussão.....	65	
Referências.....	70	
CAPÍTULO 3 – RELAÇÕES ESTRUTURAIS E FOTOSSINTÉTICAS NO SISTEMA <i>PISPHONYLIA BRASILIENSIS</i> COURI & MAIA 1992 (CECIDOMYIIDAE) - <i>GUAPIRA OPPOSITA</i> (VELL.) REITZ (NYCTAGINACEAE).....		75
Resumo.....	76	
Abstract.....	77	
Introdução.....	78	
Material e Métodos	79	
Resultados e Discussão	83	
Referências.....	96	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101	
ANEXO 1.....	102	

Resumo

Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae), super-hospedeira de galhas de Cecidomyiidae (Schizomyiina), é utilizada como modelo para verificar o grau de manipulação das potencialidades vegetais por diferentes herbívoros galhadores. O estudo morfológico, anatômico e histoquímico de quatro morfotipos induzidos por *Bruggmannia elongata*, *Bruggammnia robusta*, *Pisphondylia brasiliensis* e um Cecidomyiidae não identificado visa testar se galhas induzidas por espécies filogeneticamente relacionadas apresentam maior número de caracteres em comum relacionados ao abrigo, defesa e nutrição do indutor. As galhas induzidas por *B. robusta*, *B. elongata* e do Cecidomyiidae não identificado apresentaram os mais altos níveis de similaridade demonstrando que galhadores congêneros compartilham um maior número de caracteres quando se estabelecem em uma mesma planta hospedeira. A galha de *Pisphondylia brasiliensis* mostra o fenótipo mais distante dos demais morfotipos por apresentar um maior número de caracteres exclusivos. Esta galha, única induzida em gemas de *G. opposita*, apresenta similaridades com galhas de gemas descritas na literatura, demonstrando encurtamento de entrenós com ampla manipulação do sítio meristemático, levando a grande produção de projeções foliares. As projeções são originadas a partir de dois padrões de atividades meristemáticas: o primeiro repete o modelo apical, no qual há formação de pares de folhas opostas cruzadas e o segundo a partir do meristema localizado na base das projeções foliares que dá origem a uma nova projeção com seu próprio meristema axilar. As diferenças nos padrões organogênicos do caule e das projeções foliares expressam a capacidade deste indutor em modificar o curso da atividade do meristema apical a seu favor. De modo a verificar se a estrutura e capacidade fotossintética das projeções foliares são similares às da folha padrão, foram realizadas análises da anatomia foliar, condutância estomática estimada, teor de pigmentos e fluorescência da clorofila *a* na folha não galhada e nas projeções foliares da galha. As projeções, apesar da área reduzida, demonstraram grande similaridade anatômica com a folha não galhada, sendo hipostomáticas, com mesofilo dorsiventral. A condutância estomática estimada não diferiu significativamente, enquanto que foi verificada redução no teor de pigmentos e nos valores de rendimentos quânticos potencial e efetivo. Conclui-se que, a grande densidade de projeções pode conferir aumentos compensatórios à fotossíntese na galha sendo que estas podem auxiliar na manutenção do sistema *Pisphondylia brasiliensis* – *Guapira opposita*.

Abstract

Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae), a super-host of Cecidomyiidae (Schizomyiina) galls, is used as a model for evaluating the degree of different galling herbivores potential for plants manipulation. Morphological, anatomical and histochemical studies of four morphotypes induced by *Bruggmannia elongata*, *B. robusta*, *Pisphondylia brasiliensis* and an unidentified Cecidomyiidae aims to test if phylogenetically related species induced galls with higher number of similarities related to shelter, protection and nutrition to the gall maker. The galls induced by *Bruggmannia robusta*, *B. elongata* and the unidentified Cecidomyiidae presented the highest level of similarities demonstrating that congeneric gall makers share the highest number of characters when set in the same host plant. The gall of *Pisphondylia brasiliensis* shows the most distinct phenotype when compared to the other three morphotypes because of its larger number of unique characters. This gall, induced only in buds of *G. opposita*, is similar to the bud galls described in literature, with shortening of internodes and extensive manipulation of the meristematic site, which end up with a high production of leaf projections. These projections are generated from two patterns of meristematic activity: the first one repeats apical pattern model in which crossed-opposite pairs of leaves are generated, and the second from a meristem located at the base of each leaf projection, which gives rise to a new projection with its own axillary meristem. Differences in stem organogenic patterns and leaf projections production reflect the gall maker's ability to changing the course of apical meristem activity in its favor. In order to verify whether the structure and photosynthetic capacity of the leaf projections are similar to the non galled leaf pattern, leaf anatomy, estimated stomatal conductance, pigment content and fluorescence of chlorophyll were analyzed in both materials. The projections, despite their small area, are anatomically similar to the non galled leaves. The estimated stomatal conductance did not differ significantly, whereas chlorophylls content and the potential and effective quantum yields were reduced. We can conclude that the high density of projections may provide a compensatory increase in gall photosynthesis, and so they can assist the maintenance of *Pisphondylia brasiliensis* - *Guapira opposita* system.

Introdução geral

Introdução geral

Espécies super-hospedeiras de herbívoros galhadores

Insetos galhadores compõem um grupo de herbívoros endofíticos especializados, cuja maioria possui alto grau de especificidade à planta e órgão hospedeiros (Weis *et al.* 1988). São capazes de manipular os tecidos vegetais, de forma coordenada, dando origem a estruturas altamente específicas que permitem caracterizar tanto o indutor quanto o hospedeiro no qual se alojam (Redfern & Askew 1992; Raman 2007). A formação das galhas resulta da atividade do indutor que provoca uma série de reações nos tecidos vegetais, comumente ligadas à hiperplasia e hipertrofia celulares (Mani 1964).

Induzida por um organismo e produzida por outro, as galhas são a expressão de uma complexa relação na qual a planta modifica a morfogênese de seus tecidos para a acomodação do inseto (Schaefer *et al.* 2005), fornecendo para o mesmo abrigo, nutrição e proteção (Redfern e Askew 1992; Raman 2007). Contudo, nessa relação, aparentemente é o galhador que controla as modificações tissulares, e deste modo o morfotipo da galha representa o fenótipo estendido do indutor (Stone & Schönrogge 2003). Como insetos altamente especializados, os galhadores demonstram ser sensíveis às variações na fisiologia, no perfil químico, no desenvolvimento e na fenologia de sua planta-hospedeira (Raman 2007).

Enquanto alguns taxa de galhadores tendem a se especializar em diferentes famílias vegetais (Price 2005), algumas plantas são mais atacadas que outras (Roskam 1992). Levantamentos de galhas em diversas regiões do Brasil apontam maior riqueza de galhadores associados a famílias como Asteraceae, Bignoniaceae, Leguminosae, Fabaceae, Melastomataceae, Myrtaceae e Sapindaceae (Gonçalves-Alvim & Fernandes 2001; Julião *et al.* 2002; Maia & Fernandes 2004; Maia *et al.* 2008). Na maioria destes estudos, a maior riqueza de galhadores está relacionada ao maior número de espécies da família hospedeira na composição florística local (Gonçalves-Alvim & Fernandes 2001; Julião *et al.* 2002). Entretanto, a presença de super-hospedeiras, capazes de abrigar sozinhas diversos morfotipos de galhas, altera as relações entre riqueza de plantas e galhadores (Veldtman & MacGeoch 2003; Espírito-Santo & Fernandes 2007;

Mendonça 2007), sendo que os níveis taxonômicos mais baixos de hospedeiros, como gênero e espécie, se tornam relevantes nos levantamentos de galhas (Mendonça 2007).

Em diversas partes do mundo, espécies vegetais super-hospedeiras são documentadas na literatura, tais como *Quercus turbinella* (Fernandes & Price 1988); *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (Fernandes *et al.* 1996), *Chrysothamnus nauseosus* spp *consimilis* e *C. nauseosus* spp *hololeucus* (Fernandes *et al.* 2001), *Eugenia multiflora* (Maia 2001), *Terminalia sericea* (Veldtman & MacGeoch 2003); *Copaifera langsdorffii* (Drummond 2005), *Myrciaria cuspidata* (Mendonça 2007) e *Lantana camara* (Moura 2007).

Além da importância supracitada em estudos ecológicos, a análise das super-hospedeiras pode gerar informações sobre as potencialidades das plantas frente à capacidade de manipulação dos tecidos vegetais por parte dos indutores (Moura 2007). Morfotipos que ocorrem em uma única espécie, como nas super-hospedeiras, podem fornecer dados estruturais comparativos em um mesmo modelo vegetal, possibilitando a identificação de limites impostos pelas plantas no desenvolvimento das galhas bem como a verificação da capacidade de resposta dos vegetais frente à ação destes herbívoros (Moura 2007; Moura *et al.* 2008).

***Guapira opposita* - super-hospedeira de galhas**

Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) é distribuída em todo o território brasileiro (Souza & Lorenzi 2008). Esta espécie é nativa do Brasil, possui hábito arbustivo a arbóreo, com folhas simples, opostas cruzadas, geralmente glabras e ramos jovens verdes a vináceos com pilosidade esparsa. É uma espécie monóica, com inflorescências terminais dispostas em cimeiras trímeras. Suas infrutescências são normalmente glabras, de cor lilás à vinácea, com antocarpos globosos a oblongos, geralmente elipsóides que enegrecem quando maduros (Furlan 1996).

Uma das características marcantes nessa espécie é sua plasticidade fenotípica (Furlan 1996) que foi objeto de estudos anatômicos em plantas crescendo sob sol (restinga) e em sombra (mata atlântica) (Fermino *et al.* 2003; Fermino 2004). Estes autores demonstraram diferenças significativas entre as duas populações encontradas na área e espessura foliar, densidade estomática, teor de pigmentos, presença de estômatos e número de camadas de parênquima paliçádico.

Levantamentos de riqueza de galhadores indicam *G. opposita* como super-hospedeira de galhas (Maia 2001; Mendonça 2007; Maia *et al.* 2008), apesar destas estruturas não serem abundantes em Nyctaginaceae. Numa determinada população, a presença de *G. opposita* frequentemente coloca esta família em níveis altos de riqueza de galhadores (Mendonça 2007; Maia *et al.* 2008). Associados a ela encontram-se cerca de nove morfotipos de galhas induzidos, em sua maioria, por espécies de Diptera: Cecidomyiidae (Schizomyiina) (Gagné 2004; Maia 2004; Maia *et al.* 2008). Destes morfotipos, cinco são induzidos por espécies de *Bruggmannia* (Maia & Couri 1993; Maia 2004; Maia *et al.* 2008), um por *Pisphondylia* (Couri & Maia 1992), dois por *Proasphondylia* (Maia 1993) e um por uma espécie ainda não identificada de Cecidomyiidae (Maia *et al.* 2008).

Populações de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) com até seis morfotipos de galhas são encontradas em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul. Destas, quatro morfotipos se destacam pelas características morfológicas, alta frequência, sítios de oviposição e presença de indumentos variados.

Galhas induzidas por Cecidomyiidae - desenvolvimento, aspectos gerais e impactos nas plantas hospedeiras

Apesar da capacidade de induzir galhas ter evoluído independentemente em diversos grupos de insetos (Felt 2001), a família Cecidomyiidae (Diptera) é o grupo mais representativo de indutores de galhas em todo o mundo, seguido por Cynipidae (Hymenoptera) e pelas ordens Hemiptera e Thysanoptera (Espírito-Santo & Fernandes 2007). Os cecidomiídeos estão associados a várias famílias vegetais colonizando nichos diversos como gemas, folhas, caules, flores, frutos e sementes (Price 2005). Suas galhas apresentam grande variedade morfológica, caracterizada por um alto nível de especialização de seus tecidos, estruturas e mecanismos de abertura (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992).

Do ponto de vista anatômico, as galhas de Cecidomyiidae passam por quatro estágios ontogênicos básicos: indução, crescimento e desenvolvimento, maturação e deiscência. A indução é caracterizada por uma sucessão de sistemas de reconhecimento inseto-plantas, inseto-órgão ou inseto-tecido. No estágio de crescimento e desenvolvimento pode ser verificado o aumento de biomassa decorrente da hiperplasia (divisão celular) e/ou hipertrofia (aumento celular) em volta do sítio de alimentação da

larva. Nesse estágio, a neoformação de tricomas pode ocorrer. O estágio da maturação é caracterizado pelo fechamento completo dos tecidos da galha em volta da larva, com neoformação de feixes vasculares e formação de tecido nutritivo rico em carboidratos. Há a formação de esclerênquima próximo ao tecido vascular, formando uma bainha que separa a galha em duas regiões. A região interna é diretamente influenciada pelo cecidozoa enquanto a região externa está sob maior influência da planta hospedeira. A porção externa da galha está sempre envolvida com o seu estágio final que é a deiscência (Rohfritsch 1992). Nesse estágio os tecidos iniciam um processo de morte celular que leva a estrutura a assumir externamente uma coloração amarronzada ou mesmo preta, típicas de tecidos vegetais em decomposição.

No local de formação das galhas as alterações nos aspectos morfológicos e anatômicos da planta hospedeira podem ser acompanhadas por mudanças nos padrões de desenvolvimento, metabolismo e da fisiologia da planta. O desenvolvimento das galhas está associado a padrões únicos de diferenciação, os quais normalmente não estão presentes no curso normal da morfogênese do órgão atacado (Raman 2007). Além das grandes mudanças percebidas nos sistemas de revestimento, fundamental e vascular, as galhas podem alterar a organogênese vegetal, levando a superprodução ou neoformação de órgãos (Mani 1964). Essas mudanças são frequentemente observadas em galhas induzidas em gemas (Weis *et al.* 1988; Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992; Kraus *et al.* 2003; Raman 2007).

As alterações estruturais causadas pelos indutores são acompanhadas por mudanças químicas, tendo os galhadores papel importante no controle da produção e armazenagem de compostos primários e secundários nos tecidos de suas galhas (Bronner 1992; Hartley 1998; Nyman & Julkunen-Tiitto 2000). Os compostos primários estão relacionados à nutrição e os secundários podem estar relacionados à proteção do galhador. Usualmente, as substâncias de reservas são típicas para cada taxon indutor, onde tecidos nutritivos das galhas de cinipídeos possuem um gradiente de amido e lipídios que diminui em direção à câmara larval e as galhas de cecidomiídeos apresentam apenas amido (Bronner 1992). Em galhas induzidas por diversos taxa, substâncias fenólicas são frequentemente encontradas na região externa ao tecido nutritivo (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000; Moura *et al.* 2008).

Esta concentração e localização diferenciada de metabólitos estão relacionadas ao estabelecimento das galhas como drenos em seus hospedeiros e como tal podem causar alterações no metabolismo vegetal constituindo-se em um excelente modelo para

estudos de estresse biológico em plantas (Raman *et al.* 2006). Durante seu desenvolvimento, as galhas atuam como drenos, promovendo a translocação, em sua direção e conseqüentemente em direção ao indutor, de nutrientes que seriam destinados ao desenvolvimento dos tecidos normais da planta (McCrea *et al.* 1985; Raman *et al.* 2006). A potência do dreno que as galhas exercem nas plantas está relacionada ao “*fitness*” do indutor (Larson & Whitham 1997), sendo que a escolha da planta ou do órgão hospedeiro influencia na força deste dreno (McCrea *et al.* 1985; Burstein *et al.* 1996; Larson & Whitham 1997).

As mudanças nos aspectos fisiológicos das plantas frente à ação de herbívoros galhadores são variáveis e pouco estudadas (Larson 1998). Enquanto alguns estudos indicam que as galhas podem levar a aumentos compensatórios nas taxas fotossintéticas dos órgãos vizinhos (Fay *et al.* 1996), outros demonstram que essas taxas são reduzidas (Larson 1998; Aldea *et al.* 2006). Decréscimos e aumentos nas taxas de condutância estomática foram documentados na literatura (Larson 1998; Florentine *et al.* 2005; Lemos-Filho *et al.* 2007). Mudanças negativas (Yang *et al.* 2003; Castro 2007) ou a constância no teor de pigmentos em galhas (Landa 2008) quando comparadas a tecidos não galhados reforçam a dificuldade de se estabelecer uma tendência nos aspectos fisiológicos de galhas e no impacto gerado em seus hospedeiros. As informações supracitadas demonstram a importância de estudos de cunho estrutural-fisiológico na formação das galhas para auxiliar na compreensão dos mecanismos de manipulação dos insetos indutores e dos impactos gerados em suas plantas hospedeiras.

Face ao exposto, o presente trabalho tem como objetivos:

- 1) Comparar quatro morfotipos distintos induzidos por espécies de Cecidomyiidae (Schizomyiina) presentes na super-hospedeira *Guapira opposita* (Vell) Reitz (Nyctaginaceae) a fim de encontrar similaridades e diferenças anatômicas, e verificar se indutores filogeneticamente próximos induzem galhas com maiores níveis de similaridade.
- 2) Caracterizar as galhas induzidas em gemas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia (Diptera: Cecidomyiidae) investigando os processos organogênicos envolvidos em sua formação.

- 3) Analisar as relações estruturais e fotossintéticas das projeções foliares produzidas nas galhas de *P. brasiliensis* Couri & Maia verificando a função que estas exercem no sistema.

Referências bibliográficas

- Aldea, M.; Hamilton, J.; Resti, J.; Zangerl, A.R.; Berenbaum, M.R.; Frank, T.D.; DeLucia, E.H.** 2006. Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia* 149:221-232.
- Bronner, R.** 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.) *Biology of Insect-induced galls*. Oxford University Press, New York. pp.118-140.
- Burstein, M.; Wool, D. & Eshel, A.** 1994. Sink strength and clone size of sympatric, gall-forming aphids. *European Journal Entomology* 91:57-61.
- Castro, A.C.R.** 2007. Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- Couri, M.S. & Maia, V.C.** 1992. Considerações sobre *Pisphondylia* Möhn, 1960 (Diptera, Cecidomyiidae, Asphondyliidi), com descrição de uma espécie nova do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*. 36(4):729-730.
- Dreger-Jauffret, F. & Shorthouse, J.D.** 1992. Diversity of gall-inducing insects and their galls. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.) *Biology of Insect-induced galls*. Oxford University Press, New York. pp.8-33.
- Drummond, M.M.** 2005. Galhas entomógenas em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae): estrutura anatômica, histoquímica e sazonalidade. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- Espírito-Santo, M.M.; Fernandes, G.W.** 2007. How many species of gall-inducing insects are there on Earth, and where are they? *Entomological Society of America* 100(2):95-99.
- Fay, P.A.; Preszler R.W. & Whitham T.G.** 1996. The functional resource of a gall-forming adelgid. *Oecologia* 105:199-204.
- Felt, E.P.** 2001. Plant galls and gall makers. *Agrobios (India)*.
- Fermino Jr., P.C.P.** 2004. Anatomia ecológica comparada de folhas de *Guapira opposita* (Vell) Reitz (Nyctaginaceae) na vegetação de restinga e na floresta ombrófila densa. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Santa*

Catarina, Santa Catarina. Disponível em:
<http://www.tede.ufsc.br/teses/PBVE0018.pdf>. Acesso em: agosto 2008.

- Fermino Jr., P.C.P.; Santos, M.; Paulilo, M.T.S.; Machado, A.V.** 2003. Leaf Structural Aspects of *Guapira opposita* (Vell) Reitz in the Atlantic rainforest and restinga. *Acta Microscopica* 12(B):27-28.
- Fernandes, G.W.; Carneiro, M.A.A.; Lara, A.C.F.; Allain, L.R.; Andrade, G.I.; Julião, G.R.; Reis, T.R.; Silva, I.M.** 1996. Gallling insects on Neotropical species of *Baccharis* (Asteraceae). *Tropical Zoology* 9:315-332.
- Fernandes, G.W. & Price, P.W.** 1988. Biogeographical gradients in gallling species richness. Tests of hypotheses. *Oecologia* 76:161-167.
- Fernandes, G.W.; Saraiva, C.; Soares, G.A.; Negreiros, D.; Duarte, M.; Price, P.W.** 2001. Some insects galls of Arizona. *Naturalia* 26:191-209.
- Florentine, S.K.; Raman, A.; Dhilepan K.** 2005. Effects of gall inducton by *Epiblema strenuana* on gas exchange, nutrients, and enegertics in *Parthenium hysterophorus*. *Biocontrol*. 50:787-801.
- Furlan, A.** 1996. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. Tese de doutorado. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.*
- Gagné, R.** 2004. A catalog of the Cecidomyiidae (diptera) of the world. *Memoirs of the entomological society of Washington* 25:1- 408.
- Gonçalves-Alvim, S.J. & Fernandes, G.W.** 2001. Biodiversity of gallling insects: historical, community and habitat effects in four Neotropical savannas. *Biodiversity and Conservation* 10:79-98.
- Hartley, S.E.** 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113:492-501.
- Julião, G.R.; Amaral, M.E.C.; Fernandes, G.W.** 2002. Galhas de insetos e suas plantas hospedeiras no pantanal sul-matogrossense. *Naturalia* 27:47-74.
- Kraus, J.E.; Isaias, R.M.S.; Vecchi, C.; Fernandes, G.W.** 2003. Structure of insect galls on two sympatric subspecies of *Chrysothamnus nauseosus* (Pall. ex Pursh) Britton (Asteraceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21(2):251-263.
- Landa, F.S.L.** 2008. Respostas estrtrurais e fisiológicas de *Richeria grandis* Vahl. (Phyllanthaceae) ao estabelecimento do Psyllidae galhador. Tese de doutorado. *Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.*

- Larson, K.G.** 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia* 115:161-166.
- Larson, K.G. & Whitham, T.G.** 1997. Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia* 109:575-582.
- Lemos-Filho, J.P.; Christiano, J.C.S.; Isaias, R.M.S.** 2007. Efeitos da infestação de insetos galhadores na condutância e taxa relativa de transporte de elétrons em folhas de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. e *A. spruceanum* Benth. ex Müell. Arg. *Revista Brasileira de Biociências* 5(2):1152-1154.
- McCrea, K.D.; Abrahamson, W.G.; Weis, A.E.** 1985. Goldenrod Ball Effects on *Solidago Altissima*: ¹⁴C Translocation and growth. *Ecology* 66(6):1902-1907.
- Mani, M.S.** 1964. Ecology of plant galls. *The Hague: Junk.*
- Maia, V.C.** 2001. The gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) from three restingas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18(2):583-629.
- Maia, V.C.** 1993. Considerações sobre *Proasphondylia* Felt (Diptera, Cecidomyiidae) com descrições de duas espécies novas associadas com *Guapira opposita* (Velloso) Reitz (Nyctaginaceae). *Revista Brasileira de Zoologia* 10(2):215-218.
- Maia, V.C. & Couri, M.S.** 1993. Descrição de três espécies novas de *Bruggmannia* Tavares, 1906 (Diptera, Cecidomyiidae, Asphondyliidi) do Brasil associadas com *Guapira opposita* (Nyctaginaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 53(2):209-215.
- Maia, V.C.** 2004. Description of a new species of *Bruggmannia* Tavares (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Guapira opposita* (Vell) Reitz (Nyctaginaceae) from Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(4):761-764.
- Maia, V.C. & Fernandes, G.W.** 2004. Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* 64(3):423-445.
- Maia, V.C.; Magenta, M.A.G.; Martins, S.E.** 2008. Ocorrência e caracterização de galhas de insetos em áreas de restinga de Bertioiga (São Paulo, Brasil). *Biota Neotropica* 8(1):167-197.
- Mendonça, M.S. Jr.** 2007. Plant diversity and galling arthropod diversity searching for taxonomic patterns in an animal-plant interaction in the Neotropics. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botanica* 42(3-4):347-357.
- Moura, M.Z.D.** 2007. Padrões anatômicos relacionados a cecidogênese na multi-hospedeira *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Tese de doutorado. *Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.*

- Moura, M.Z.D.; Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S.** 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf gallers in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany* 56:153-160.
- Nyman, T. & Julkunen-Tiitto, R.** 2000. Manipulation of phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Science* 97:13184-13187.
- Price, P.W.** 2005. Adaptive radiation of the gall-inducing insects. *Basic and Applied Ecology* 6:413-421.
- Raman, A.** 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92(6):748-757.
- Raman, A.; Madhavan, S.; Florentine, S.K.; Dhileepan, K.** 2006. Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema strenuana* inferred from signatures of isotopic carbon and nitrogen and concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119:101-107.
- Redfern, M. & Askew, R.R.** 1992. Plant galls. *Richmond Publishing Co.*
- Roskam, J.C.** 1992. Evolution of the gall-induced guild. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.). *Biology of Insect-induced galls. Oxford University Press, New York.* pp.34-49.
- Rohfritsch, O.** 1992. Patterns in gall development. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.). *Biology of Insect-induced galls. Oxford University Press, New York.* pp.60-86.
- Schaefer, C.W.; Raman, R. & Withers, T.N.** 2005. Galls and galls-induced arthropods: ecological issues and evolutionary problems. In: Raman, A.; Schaefer, C.W. Withers, T.N. (eds.) *Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods. New Hampshire: Science Publishers (2):761-766.*
- Souza, V.C. & Lorenzi, H.** 2008. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII. 2ed. *Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.*
- Stone, G.N. & Schönrogge, K.** 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18(10):512-522.
- Veldtman, R & MacGeoch, M.A.** 2003. Gall-forming insect species richness along a non-scleromorphic vegetation rainfall gradient in South Africa: The importance of plant community composition. *Austral Ecology* 28:1-13.

- Weis, A.E.; Walton, R.; Crego, C.L.** 1988. Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review in Entomology* 33:467- 486.
- Yang, C.M., Yang, M.M.; Huang, M.Y.; Hsu, J.M.; Jane, W.N.** 2003. Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44:314-321.

**Similaridades entre quatro morfotipos de galhas
induzidas por Diptera: Cecidomyiidae (Schizomyiina)
em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae)**

**Similaridades entre quatro morfotipos de galhas induzidas por Diptera:
Cecidomyiidae (Schizomyiina) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae)**

Resumo

Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae), super-hospedeira de galhas de Cecidomyiidae (Schizomyiina), é utilizada como modelo para verificar a manipulação das potencialidades vegetais por diferentes herbívoros galhadores. O estudo morfológico, anatômico e histoquímico de quatro morfotipos de galhas induzidas por *Bruggmannia elongata*, *Bruggammnia robusta*, *Pisphondylia brasiliensis* e um Cecidomyiidae não identificado visa testar se galhas induzidas por espécies filogeneticamente relacionadas compartilham maior número de caracteres relacionados à obtenção de abrigo, defesa e nutrição. As galhas de *Bruggmannia* spp. e a do Cecidomyiidae não identificado apresentam similaridade de 45%, compartilhando, em especial, o sítio de oviposição, o número de câmaras larvais e a reserva de amido. *B. elongata* apresenta como peculiaridades a forma discóide, o isolamento no limbo e o incremento das divisões procambiais. *P. brasiliensis* apresentou maior número de caracteres exclusivos o que justifica sua baixa similaridade ($\cong 20\%$) com os demais morfotipos. A análise de similaridade seguida do PCA demonstrou que espécies congênicas compartilham maior número de caracteres quando se estabelecem numa mesma planta hospedeira.

Palavras-chave: anatomia; Cecidomyiidae; galhas; histoquímica; *Guapira*; similaridade

**Similarities among four gall morphotypes induced by Diptera: Cecidomyiidae
(Schizomyiina) in *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae)**

Abstract

Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae), a superhost for galling Cecidomyiidae (Schizomyiina), is used as a model to verify the potential of plant feature manipulation by different galling herbivores. The morphological, anatomical and histochemical study of four gall morphotypes induced by *Bruggmannia elongata*, *Bruggammnia robusta*, *Pisphondylia brasiliensis*, and an unidentified Cecidomyiidae aims to test whether galls induced by phylogenetically related species share shelter, protection and nutrition related traits. The galls of *Bruggmannia* spp. and those of the unidentified Cecidomyiidae show 45% of similarity sharing, in particular, the site of oviposition, the number of larval chambers, and the reserve of starch. *B. elongata* peculiarities are discoid in shape, isolation in leaf lamina, and an increase in divisions of the procambium. *Pisphondylia brasiliensis* presents the largest number of exclusive characters which justifies its low similarity ($\cong 20\%$) with the other three morphotypes. The analysis of similarity followed by PCA showed that congeneric species share the highest number of features when established in a single host plant.

Key words: anatomy; Cecidomyiidae; galls; histochemistry; *Guapira*; similarity

Introdução

Insetos galhadores são endofitófagos especialistas associados a uma única planta hospedeira (Shorthouse *et al.* 2005). Distinguem-se dos outros herbívoros por serem capazes de manipular os tecidos vegetais, de forma coordenada, dando origem a estruturas altamente específicas que permitem tanto a discriminação do indutor quanto do hospedeiro no qual se alojam (Redfern & Askew 1992; Raman 2007). A formação das galhas é complexa, uma vez que sua estrutura deriva da interação entre dois organismos provenientes de reinos distintos (ex. Animalia e Plantae) (Schaefer *et al.* 2005). Independente da complexidade, seu valor adaptativo é usualmente relacionado ao abrigo, defesa e nutrição do galhador (Price *et al.* 1987; Stone & Schönrogge 2003).

Para tais funções, nas galhas podem existir camadas de esclerênquima ao redor da câmara larval, usualmente relacionadas à proteção do galhador e suporte mecânico da galha. Nas camadas de tecido que revestem a câmara, se encontra a fonte de alimento dos galhadores, o tecido nutritivo. Este possui características diferenciadas similares às encontradas no endosperma, com alto valor nutricional, sendo a forma de armazenagem dos recursos possivelmente relacionada aos taxa indutores (Bronner 1992). A translocação de nutrientes se dá por uma rede extensa de tecidos vasculares, capazes de realizar a condução de nutrientes e água para as proximidades da câmara larval (Rohfritsch 1992).

Os Cecidomyiidae (Diptera) possuem aproximadamente 3850 espécies indutoras de galhas (Price 2005) exibindo diversos padrões de associação com seus hospedeiros (Yukawa & Rohfritsch 2005). Espécies congêneras podem colonizar uma ou várias famílias vegetais (Yukawa *et al.* 2005) ou ainda um único gênero de plantas (Gagné 2004), gerando padrões de radiação complexos (Shorthouse *et al.* 2005). De fato, os insetos galhadores ilustram bem o processo de radiação adaptativa, no qual os membros de uma linhagem filogeneticamente relacionada divergem em uma série de nichos. Os Cecidomyiidae são capazes de ovipositar em gemas, folhas, caules, flores, frutos e sementes (Price 2005), induzindo galhas com grande variabilidade morfológica (Rohfritsch 1992). As formas finais da estrutura são tradicionalmente atribuídas à espécie indutora, reforçando o conceito de fenótipo estendido do inseto (Dawkins 1982).

Apesar da associação entre galhador e planta hospedeira ser bastante específica, algumas espécies vegetais apresentam maior susceptibilidade para a formação de galhas

comportando um grande número de indutores em seus órgãos (Fernandes *et al.* 1996; Fernandes *et al.* 2000; Veldtman & MacGeoch 2003; Drummond 2005). Dentre essas super-hospedeiras se destaca *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) com registros de diversos morfotipos de galhas (Mendonça 2007; Maia *et al.* 2008) induzidos por Diptera: Cecidomyiidae: Asphondyliini (Schizomyiina) dos gêneros, *Bruggmannia*, *Pisphondylia* e *Proasphondylia* (Gagné 2004).

Conforme exposto por Moura (2007), a análise das super-hospedeiras de insetos galhadores permite testar a capacidade de manipulação dos tecidos vegetais por parte dos indutores e a imposição de limites estruturais pela planta hospedeira. Nos sistemas *G. opposita* – Cecidomyiidae (Schizomyiina), as características morfológicas e anatômicas podem fornecer informações sobre os padrões de desenvolvimento de galhas em uma mesma espécie hospedeira por insetos filogeneticamente relacionados. A presença de indutores de taxa relacionados, com diferentes sítios de alimentação em um único hospedeiro indica um processo de diversificação desses insetos (Cook *et al.* 2002), podendo a caracterização dos diversos morfotipos de galhas de *G. opposita* indicar peculiaridades ligadas aos padrões comportamentais de Schizomyiina.

O objetivo deste estudo é buscar similaridades e diferenças em galhas induzidas por *Bruggmannia elongata* Maia, *Bruggmannia robusta* Maia, *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia e uma espécie não identificada de Diptera: Cecidomyiidae (Schizomyiina) em uma única planta hospedeira: *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae). Os graus de similaridade entre os morfotipos são traçados a fim de testar se as similaridades morfológicas entre as galhas correspondem à proximidade filogenética dos indutores. Paralelamente são discutidas as vantagens adaptativas da galha madura para os indutores.

Material e Métodos

Área de estudo

Quatro morfotipos de galhas foram coletados de duas populações distintas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, localizadas no *campus* do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (30°03'13''S, 51°09'44''W), Porto Alegre, RS, entre novembro de 2006 e novembro de 2008 e na Serra da Calçada (20°05'35''S, 43°59'01''W) região

de Brumadinho-MG, entre outubro de 2007 e novembro de 2008. As galhas induzidas pelo Cecidomyiidae não identificado e por *Bruggmannia robusta* foram coletadas exclusivamente no *campus* do Vale da UFRGS, Porto Alegre – RS, enquanto as galhas induzidas por *B. elongata* e por *Pisphondylia brasiliensis* foram coletadas em ambas as áreas.

As duas áreas de coleta possuem características climáticas e vegetacionais distintas, sendo a primeira composta por floresta estacional semidecídua e a segunda, por campos rupestres sobre canga.

Coleta dos indutores

As galhas foram dissecadas para a retirada de larvas e pupas sob estereomicroscópio Olympus SHZ. Para a captura de insetos adultos, galhas maduras foram acondicionadas em potes plásticos fechados com tecido de malha fina. As armadilhas foram checadas diariamente até a eclosão dos insetos. Os insetos adultos juntamente com as larvas e pupas foram fixados em etanol 70% e enviados juntamente com fotografias das galhas à especialista para confirmação da identificação.

Análises estruturais

Medidas das maiores dimensões (altura e largura) dos morfotipos de galhas maduras (n = 30 por morfotipo) foram realizadas com auxílio de paquímetro digital (Digimess). A altura e a largura foram medidas no sentido longitudinal e transversal ao órgão hospedeiro.

Folhas sadias e galhas maduras foram fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50%, ácido acético, 1:1:18, v/v) por 24 - 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen 1940). Lâminas semipermanentes foram preparadas com secções transversais realizadas à mão livre com auxílio de lâmina de barbear em suporte de isopor. As secções foram clarificadas em hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com a mistura de azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%) e montadas com gelatina glicerizada de Kaiser (Kraus & Arduin 1997). Para a preparação de lâminas permanentes, o material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940) e incluído em Paraplast[®] (Kraus & Arduin 1997) em estufa a 60°C. Cortes transversais (10-14 µm) das folhas não galhadas e galhas foram obtidos em

micrótomo rotatório (Leica[®] 2035 BIOCUT). Os cortes histológicos foram afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing 1974). Após a retirada do Paraplast[®] com acetato de butila a 45°C, em banho-maria, as amostras foram desidratadas em série etílica e coradas com a mistura de azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%) e montadas em verniz vitral incolor Acrilex[®] (Paiva 2006).

Testes histoquímicos para a detecção de substâncias do metabolismo primário (açúcares redutores, lipídios e amido) e secundário (substâncias fenólicas e alcalóides) foram realizados em secções transversais de folhas não galhadas e galhas maduras de ambas as populações. O reagente de Fehling (Sass 1951) foi utilizado para a detecção de açúcares redutores em material fresco. A presença de substâncias lipídicas foi testada em material fresco ou fixado em formalina neutra tamponada (formaldeído, água, NaH₂PO₄.H₂O, Na₂HPO₄, 1:9:0,04:0,065, v/v) (Lillie 1948) com vermelho B do Sudão (C.I. 26050) em etanol 70°GL (Brundett *et al.* 1991). Cortes obtidos de material fresco ou fixado em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50%, ácido acético, 1:1:18, v/v) foram submetidos ao reagente de Lugol (Johansen 1940) para detecção de amido. O teste para substâncias fenólicas foi feito pela fixação do material em sulfato ferroso 2% em formalina 10% (Johansen 1940). Para detecção de alcalóides, cortes de material fresco foram submetidos ao reagente de Dragendorff (Yoder & Mahberg 1976) e Dittmar (Furr & Mahlberg 1981). As lâminas foram montadas com gelatina glicerinada de Kaiser (Kraus & Arduin 1997). Testes-controle foram realizados para cada uma das substâncias testadas. O amido foi extraído pela digestão através da amilase salivar (Culling 1974), lipídios com clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) (Moore *et al.* 1991), derivados fenólicos com reagente de Stockwell (Johansen 1940) e alcalóides com ácido tartárico 5% em etanol 95% (Johansen 1940).

Desenhos esquemáticos foram realizados com auxílio de câmara clara (CH3-TR45) acoplada ao microscópio (Olympus CH-30). Fotomicrografias foram obtidas em microscópio fotônico (Olympus BH2).

Análises de similaridade e PCA

As análises de similaridade e PCA entre as galhas induzidas por *Bruggmania robusta*, *Bruggmannia elongata*, *Pisphondylia brasiliensis* e pela espécie não identificada de Cecidomyiidae foram realizadas utilizando-se o *software* NTSYS-PC versão 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf 2000).

Resultados

Folha não galhada. A folha de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz é hipostomática com mesofilo dorsiventral (fig. 1). A epiderme é unisseriada com cutícula conspícua (fig. 1, 2 e 5). A pilosidade é variável, sendo que na população do RS as folhas são glabras (fig. 3) e na população de MG, tricomas esparsos são encontrados na epiderme da face abaxial da folha (fig. 4). Os estômatos são frequentemente paracíticos (fig. 3 e 4) ou anomocíticos e mais raramente actinocíticos (fig. 3). A epiderme, em vista frontal, possui células com formato irregular tanto na face adaxial quanto na abaxial, paredes retilíneas a levemente onduladas e delgadas (fig. 3 e 4). O mesofilo é composto por 1-2 camadas de parênquima paliçádico (fig. 1 e 5) e 7-10 camadas de parênquima lacunoso (fig. 1). A nervura principal apresenta sistema vascular composto por 4-12 feixes colaterais organizados em forma de anel (fig. 6).

Galhas. Quatro morfotipos de galhas induzidas por diferentes espécies de Cecidomyiidae foram encontrados em *G. opposita* causando alterações nos três sistemas de tecidos do órgão hospedeiro (fig. 7-14).

Galha esférica. Induzida por uma espécie não identificada de Cecidomyiidae em folhas (fig. 7); pétalas e ramos jovens (fig. 15), pecíolos (fig. 16) e nas projeções foliares da galha de *Pisphondylia brasiliensis*. É uma galha fechada, glabra e séssil (fig. 8), isolada ou agrupada, preferencialmente na face inferior do limbo, de formato arredondado e coloração verde com tamanho médio de 4,97 X 5,0 mm. O sistema de revestimento é formado por epiderme unisseriada. O córtex apresenta 1-2 camadas de esclerênquima subepidérmico (fig. 17 e 18) apresentando pontoações, seguidas de 11-25 camadas de parênquima amilífero com células hipertrofiadas e homogêneas (fig. 17), 1-5 camadas de esclerênquima e 2-4 camadas de tecido nutritivo propriamente dito (fig. 19) envolvendo a câmara larval única. Feixes neoformados colaterais (fig. 20) estão distribuídos ao redor da câmara que ocupa posição central (fig. 8 e 17). A galha possui grãos de amido em abundância no córtex (fig. 21) e pequenas quantidades de substâncias fenólicas na epiderme e no esclerênquima (fig. 22).

Galha rosa. Induzida por *Bruggmannia robusta* Maia & Couri (Diptera, Cecidomyiidae) em folhas. É uma galha fechada, séssil e pilosa, com formato

arredondado (fig. 9 e 10), isolada ou agrupada, ocorrendo preferencialmente na face inferior do limbo com tamanho médio de 2,26 x 2,29 mm. O sistema de revestimento é formado por epiderme unisseriada com longos tricomas pluricelulares rosa-avermelhados (fig. 23 e 24), que conferem tal coloração a galha (fig. 9). O córtex é composto por 8-12 camadas de parênquima (fig. 25) cujas células, com formato similar às células do parênquima lacunoso são hipertrofiadas ao redor da câmara larval (fig. 26). Com o amadurecimento das galhas, essas camadas mais internas do córtex tendem a lignificar-se (fig. 27 e 28), até o limite da câmara larval, que é única, de localização central, e apresenta células com paredes periclinais internas colonizadas por fungos (fig. 29). Feixes vasculares neoformados (fig. 30) se encontram dispersos em meio às células corticais. Sinais de cicatrização com acúmulo de fenólicos indicam possível sítio de oviposição (fig. 31). Testes histoquímicos revelaram pequenas quantidades de amido no córtex (fig. 32) e lipídios nos fungos presentes na câmara larval (fig. 33).

Galha achatada. Induzida por *Bruggmannia elongata* Maia & Couri (Diptera, Cecidomyiidae) nas folhas (fig. 11) e nas projeções foliares da galha de *P. brasiliensis*. É uma galha isolada, inconspícua, fechada, séssil. Possui formato simples e achatado, coloração verde clara formando um halo no limbo (fig. 11) com tamanho médio de 4,74 X 4,34 mm. O sistema de revestimento é formado por epiderme unisseriada, com raros tricomas tectores na face abaxial (fig. 12, 34). O parênquima paliçádico é unisseriado seguido de 2-3 camadas de esclereídes (fig. 35 e 36). Internamente a estas se encontra o parênquima vascular formado por células seriadas, que em corte transversal, são retangulares e sem espaços intercelulares desenvolvidos (fig. 34, 37 e 38), originadas por intensas divisões no procâmbio. Estas camadas de parênquima vascular afastam o xilema do floema e formam o córtex da galha (fig. 37). Ao final da fase de maturação, os tecidos mais internos do córtex passam por processo de lignificação (fig. 38 e 39). A câmara larval é alongada, ocupa posição central (fig. 12 e 39) e apresenta grande parte das paredes periclinais internas colonizadas por fungos (fig. 39 e 40). Sinais de cicatrização com acúmulo de fenólicos sugerem o local de oviposição (fig. 40 e 42). Ocasionalmente, no córtex externo são encontrados grãos de amido (fig. 41). Açúcares solúveis (fig. 42) e substâncias lipídicas (fig. 43) foram detectados nos fungos que coabitam a câmara larval com o inseto indutor.

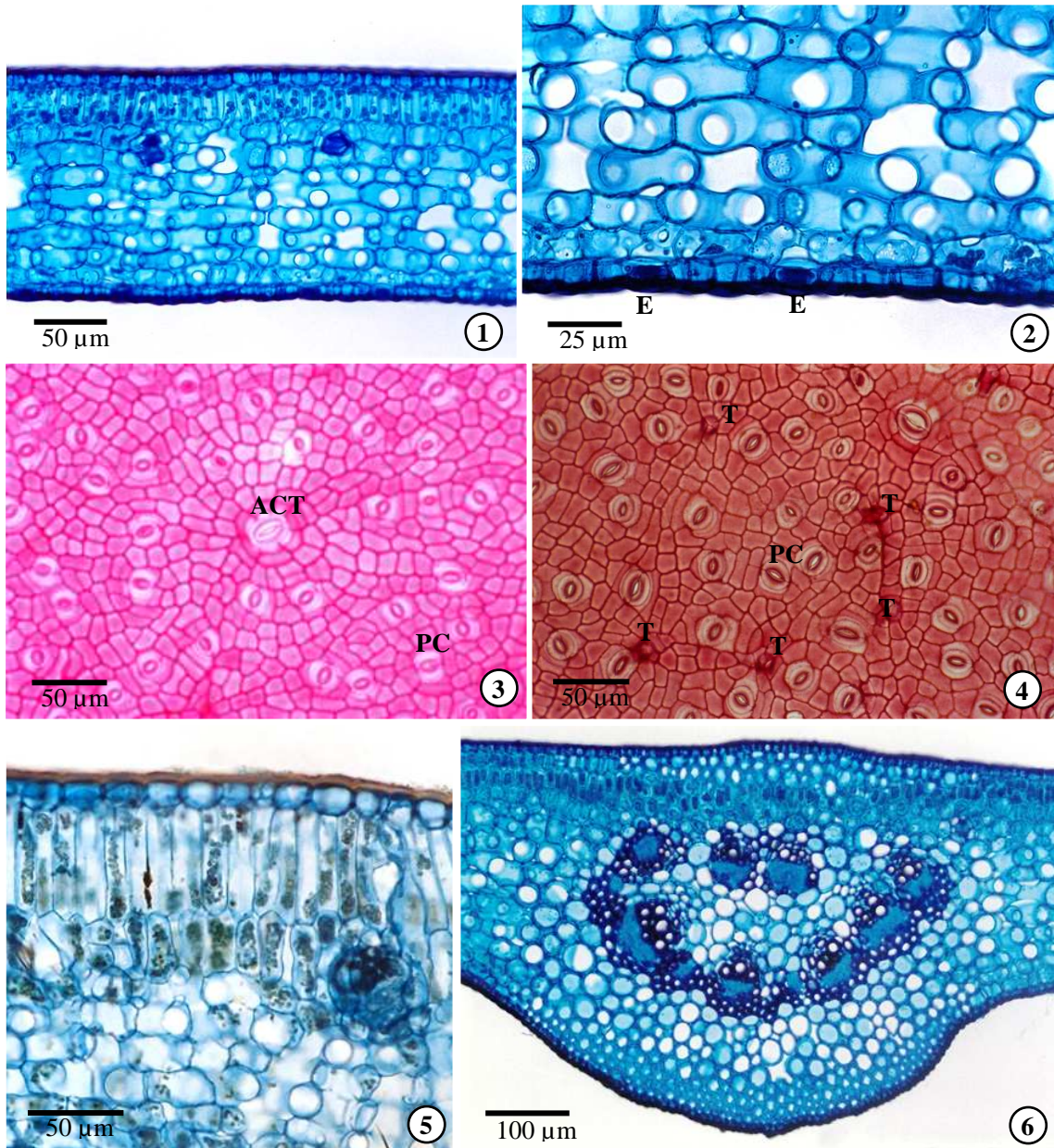
Galha gemífera. Induzida por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia (Diptera – Cecidomyiidae) em gemas apicais e/ou axilares (fig. 13). Galha fechada e sésil (fig. 14), isolada ou agrupada, em decorrência de oviposições nas gemas neoformadas, com tamanho médio de 8,99 x 7,92 mm, formato elíptico sendo revestida por projeções foliares de tamanho diminuto (fig. 13), verdes a verde-ferrugíneas (devido à presença de tricomas com esta coloração). O sistema de revestimento é um mosaico composto pela epiderme unisseriada das projeções, tricomas e pela superfície de regiões meristemáticas (fig. 44 e 45). O córtex é formado por numerosas camadas de parênquima homogêneo (fig. 44) com grande quantidade de cristais (fig. 47) e 1-5 camadas de esclerênquima que envolvem o tecido nutritivo propriamente dito (fig. 46). Possui de 1- 14 câmara (s) larval (ais) em posição central (fig. 14). Feixes vasculares neoformados se encontram distribuídos no córtex, ao redor da(s) câmara(s) (fig. 44). Estas galhas podem apresentar crescimento secundário, caracterizado pelo meristema lateral (fig. 48). Açúcares redutores foram detectados no tecido nutritivo propriamente dito (fig. 49), substâncias fenólicas (fig. 50) e alcaloídicas foram detectadas no córtex externo.

Análise de similaridade. A análise das características morfológicas e anatômicas dos quatro morfotipos estudados em *G. opposita* revelou cerca de 45% de similaridade entre as galhas foliares (fig. 51). Dentre estas, a maior proximidade fenotípica (\cong 50%) foi encontrada entre as galhas de *B. robusta* e as da espécie não identificada de Cecidomyiidae (fig. 51). As galhas induzidas em gemas por *P. brasiliensis* possuem baixa similaridade (\cong 20%) com os morfotipos induzidos nas folhas (fig. 51). A análise de PCA demonstra a proximidade fenotípica entre as galhas de *Bruggmannia* explicando 68% da variabilidade existente entre estas e a galha de *P. brasiliensis* (fig. 52).

Tabela 1 - Características da morfologia externa e interna de quatro morfotipos de galhas de Diptera: Cecidomyiidae (Schizomyiina) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz Nyctaginaceae.

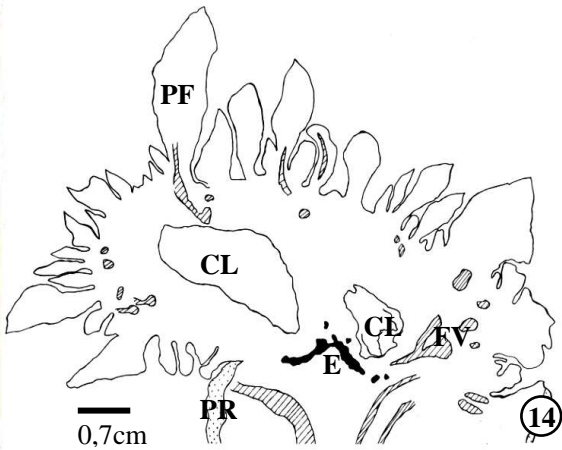
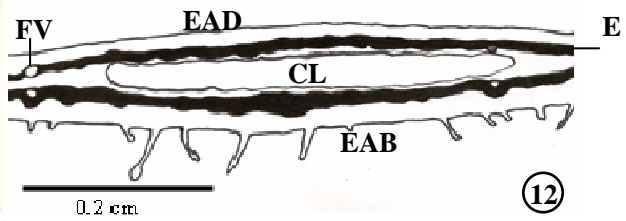
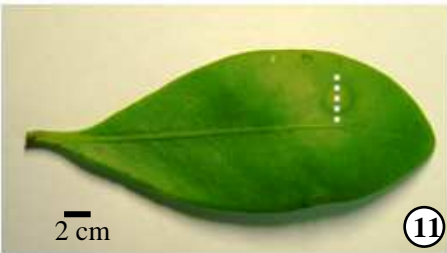
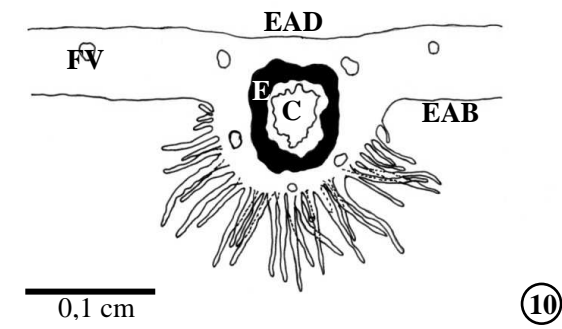
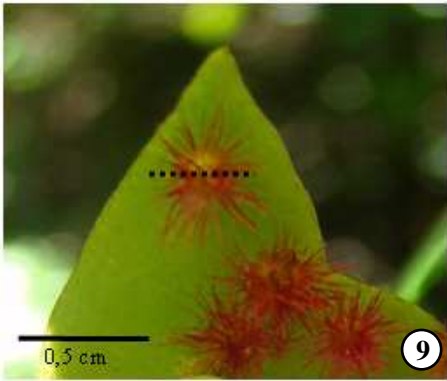
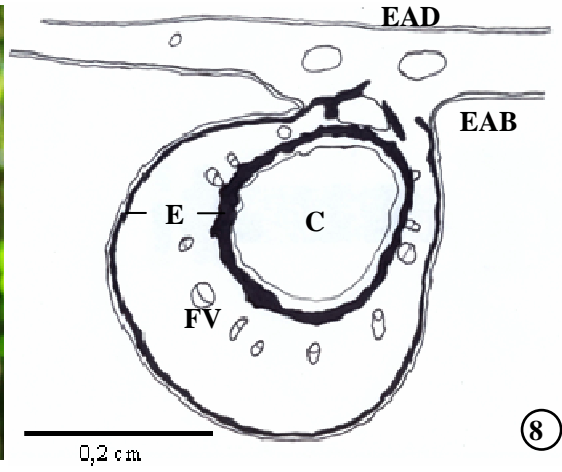
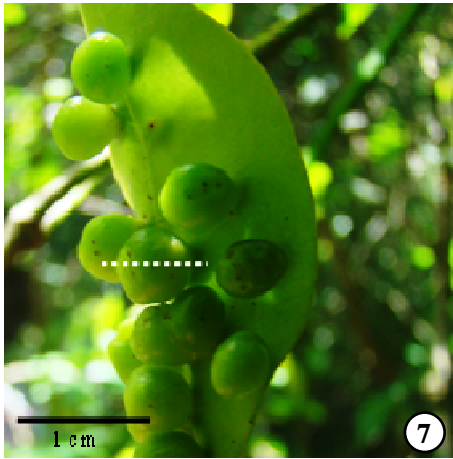
	<i>Cecidomyiidae</i>	<i>Bruggmannia robusta</i>	<i>Bruggmannia elongata</i>	<i>Pisphondylia brasiliensis</i>
I- Localização				
1- Folhas	X	X	X	
2-Gemas				X
3-Pecíolo	X			
4 – Corola	X			
II- Maior dimensão				
5 – Menor que 3 mm		X		
6- De 3 a 7 mm	X		X	
7- Maior que 7 mm				X
III- Forma				
8- Discóide			X	
9- Elipsóide				X
10-Esférica	X	X		
IV-Coloração				
11- Rosa		X		
12-Verde	X		X	X
V-Agrupamento				
13- Agrupada	X	X		X
14-Isolada			X	
VI- Número de lojas				
15-Exclusivamente monotálama	X	X	X	
16-Politálama				X
VII- Pilosidade				
17-Exclusivamente glabra	X		-	-
18-Exclusivamente pilosa		X	-	-
VIII-Indumentos: projeções foliares				
19- Ausente	X	X	X	
20-Presente				X
IX – Esclerificação subepidérmica				
21- Ausente		X	X	X
22- Presente	X			
X- Lignificação das camadas mais internas do córtex				
23- Ausente	X			X
24- Presente		X	X	
XI-Crescimento secundário				
25- Ausente	X	X	X	
26- Presente				X
XII-Ativação do procâmbio				
27- Ausente	X	X		X
28- Presente			X	
XIII- Neoformação de feixes vasculares				
29- Ausente			X	
30- Presente	X	X		X

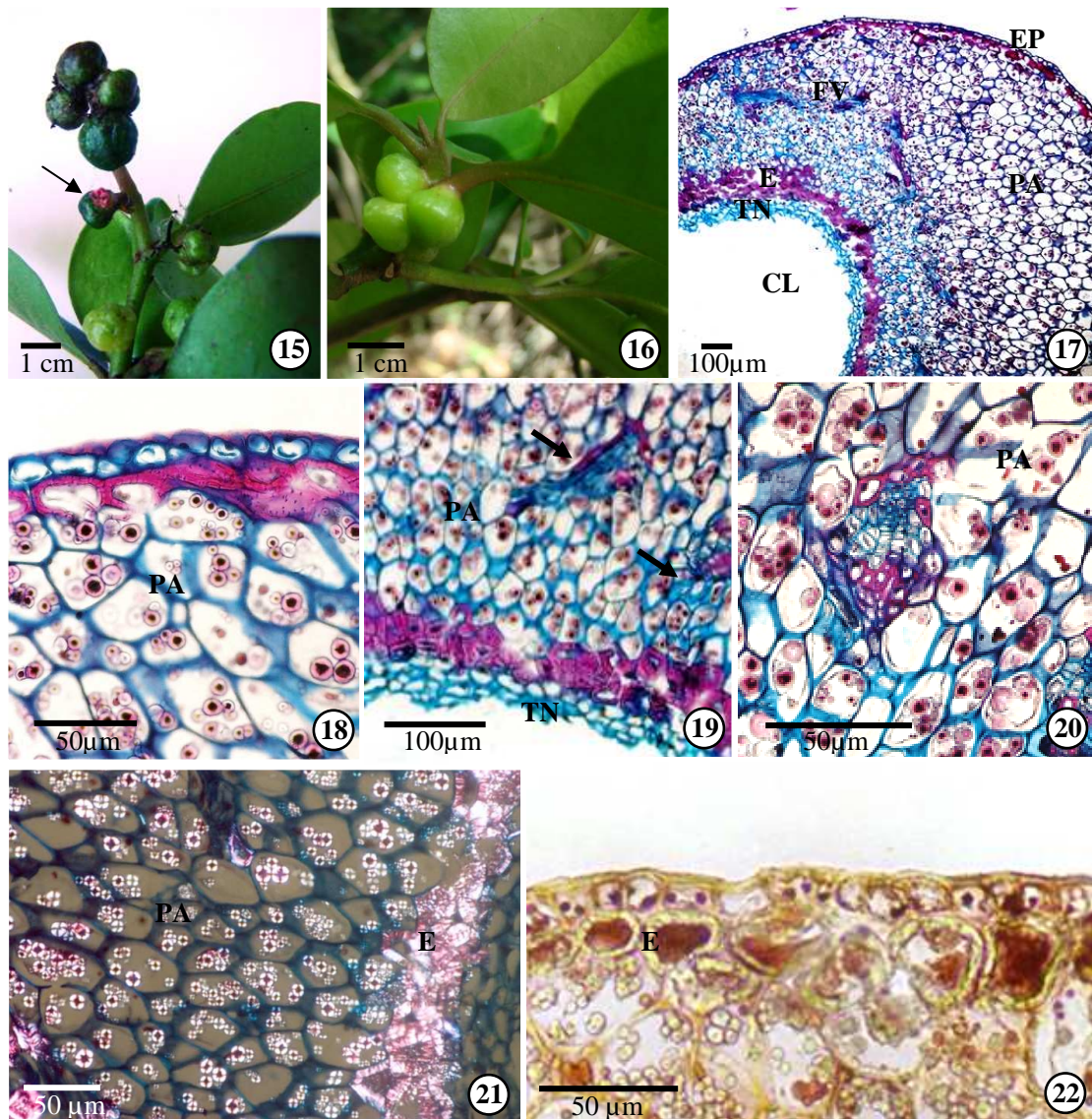
	Cecidomyiidae	<i>Bruggmannia robusta</i>	<i>Bruggmannia elongata</i>	<i>Pisphondylia brasiliensis</i>
XIV-Açúcares redutores				
31- Ausente	X	X	X	
32- Presente				X
XV-Parênquima de reserva (amido)				
33- Ausente				X
34- Presente	X	X	X	
XVI- Lipídeos				
35- Ausente	X	X	X	
36- Presente				X
XVII-Fenólicos				
37- Ausente		X	X	
38- Presente	X			X
XVIII-Alcalóides				
39- Ausente	X	X	X	
40- Presente				X
XIX-Fungos na câmara larval				
41- Ausente	X			X
42- Presente		X	X	



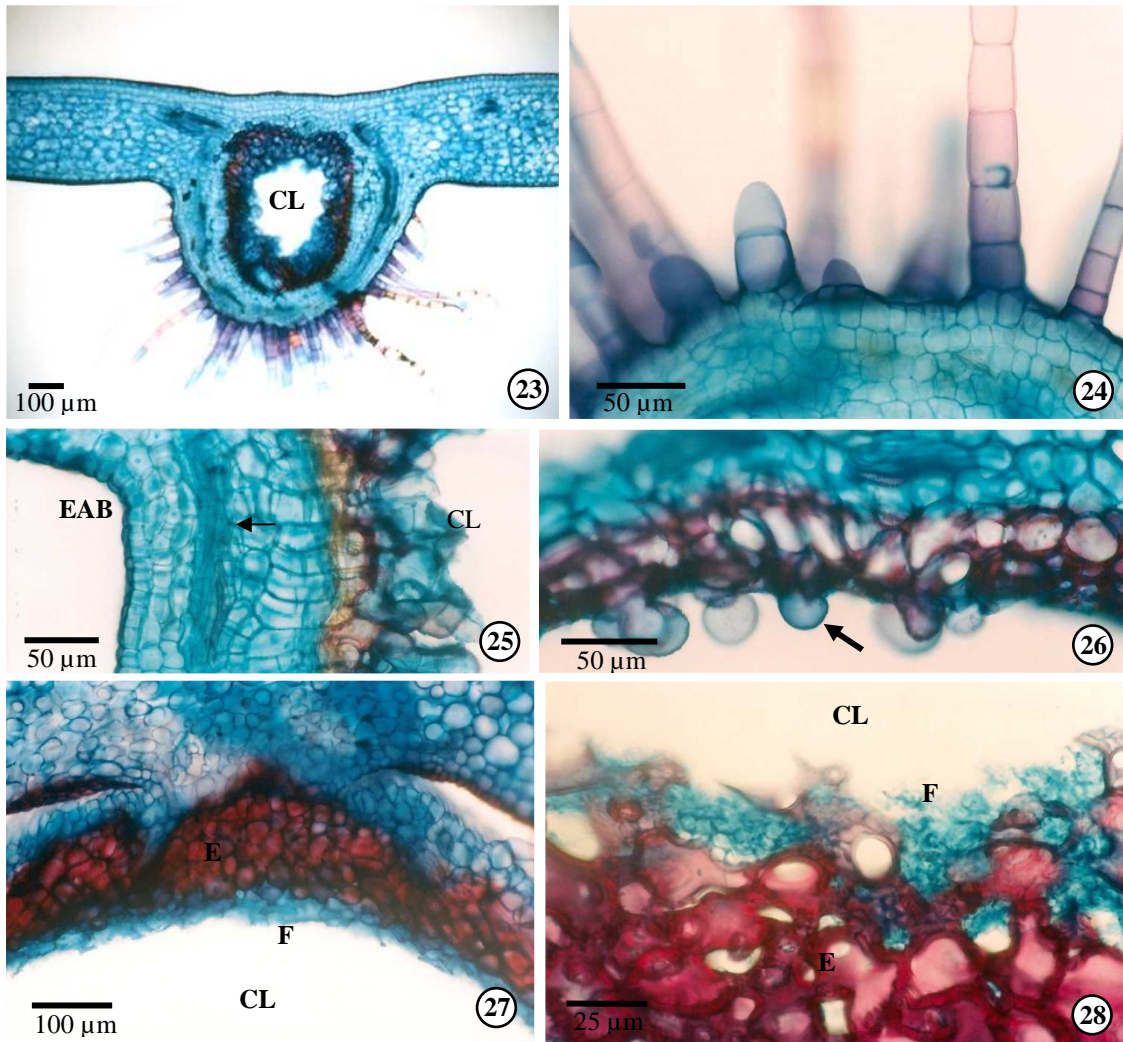
Figuras 1-6. Folha não galhada de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. 1-2, 5-6. Secções transversais. 3-4. Vista Frontal. 1. Aspecto geral. Mesófilo dorsiventral. 2. Parênquima lacunoso. Estômatos na face abaxial (E). 3. Epiderme da face abaxial. Espécime do Morro de Santana - RS. 4. Epiderme da face abaxial. Presença de tricomas. Espécime da Serra da Calçada, MG. 5. Detalhe do parênquima paliçádico. 6. Nervura mediana evidenciando feixes colaterais dispostos em anel. ACT = estômato actinocítico; ET = estômato; PC = estômato paracítico; T = tricoma.

Figuras 7-14. Morfotipos de galhas induzidas por Cecidomyiidae (Schizomyiina) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. 7, 9, 11 e 13. Aspectos macroscópicos. 8, 10, 12 e 14. Desenhos esquemáticos evidenciando aspectos anatômicos. Secções transversais ao órgão hospedeiro. 7-8. Galhas foliares induzidas por uma espécie não identificada de Cecidomyiidae (Schizomyiina). 9 e 10. Galhas foliares induzidas por *Bruggmannia robusta* Maia & Couri. 11 e 12. Galhas foliares induzidas por *Bruggmannia elongata* Maia & Couri. 13 e 14. Galhas gemíferas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia. CL = Câmara larval; EAD = epiderme da face adaxial; EAB = epiderme da face abaxial; E = esclerênquima; FV = feixe vascular; PF = projeção foliar; PR = periderme.

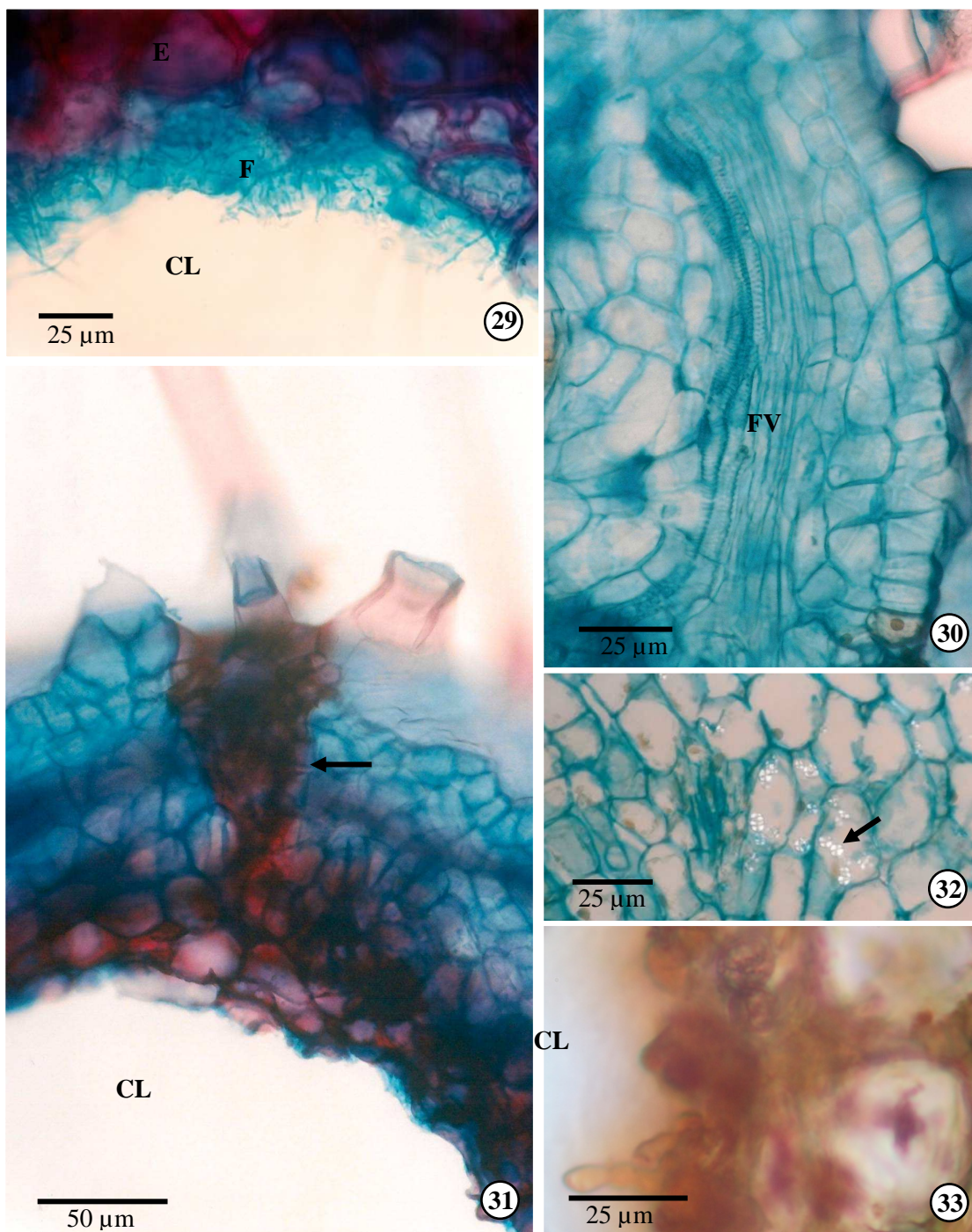




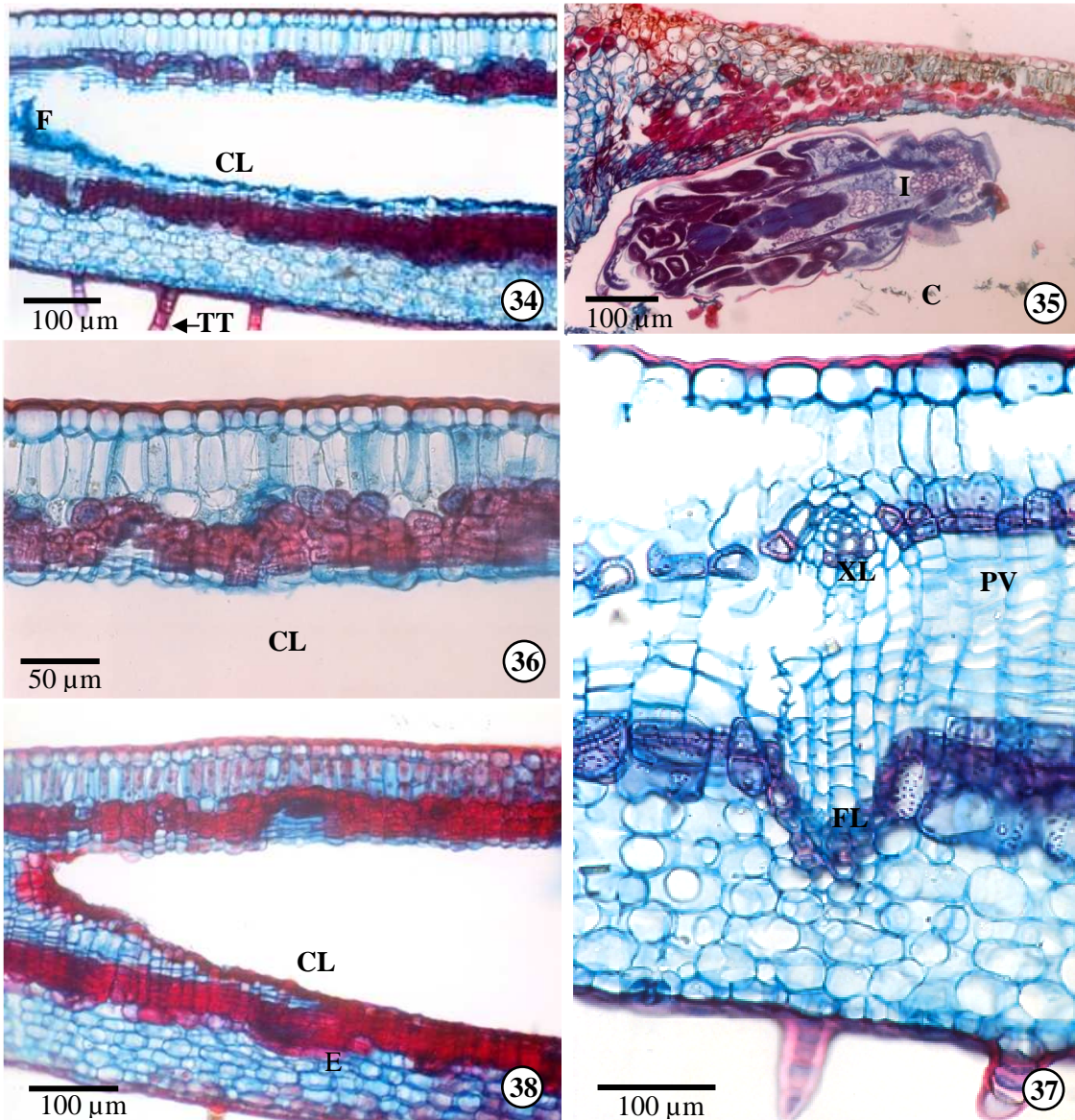
Figuras 15-22. Galhas induzidas por espécie de Cecidomyiidae não identificada em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. 15-16. Sítios de indução alternativos. 17-21. Aspectos anatômicos em secção transversal. 22. Teste histoquímico. 15. Galhas em flores (seta) e folha jovem. 16. Galhas em pecíolo e ramo jovem. 17. Organização geral dos tecidos. 18. Epiderme unisseriada. Esclerênquima subepidérmico. Grande número de pontoações. Parênquima amilífero. 19. Esclerênquima. Feixes vascular (seta). Tecido nutritivo. 20. Detalhe do feixe vascular colateral. 21. Grãos de amido no parênquima amilífero sob luz polarizada. 22. Reação positiva para substâncias fenólicas na epiderme e no esclerênquima subepidérmico. CL = câmara larval; E = esclerênquima; EP = epiderme; FV = feixe vascular; PA= Parênquima amilífero; TN= tecido nutritivo.



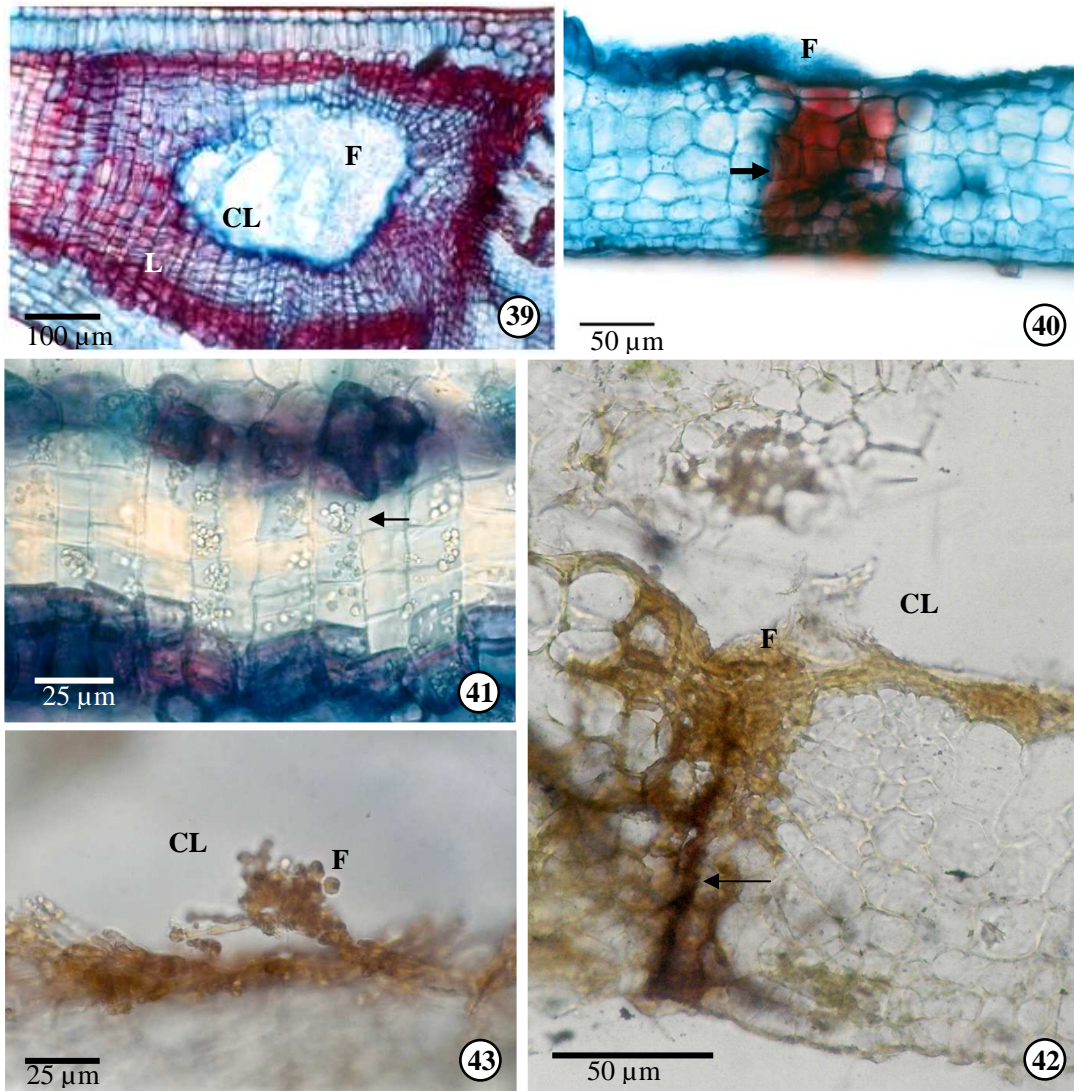
Figuras 23-28. Galhas foliares induzidas por *Bruggmannia robusta* Maia & Couri em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. Seções transversais em relação ao órgão hospedeiro. 23. Aspecto anatômico geral. 24. Epiderme unisseriada com tricomas pluricelulares. 25. Córtex da galha. Células predominantemente parenquimáticas. 26. Tecido nutritivo. Células hipertrofiadas (seta). 27. Lignificação das camadas mais internas do córtex. Fungos na câmara larval. 28. Detalhe das camadas celulares que revestem a câmara larval. CL = câmara larval; EAB = Face abaxial da epiderme; F = fungos.



Figuras 29-33. Galhas foliares induzidas por *Bruggmannia robusta* Maia & Couri em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. Secções transversais em relação ao órgão hospedeiro. 29. Detalhe das células que revestem a câmara larval. Fungos. Células lignificadas. 30. Feixe vascular no córtex da galha. 31. Cicatriz do provável local de oviposição com acúmulo de fenólicos (seta). 32. Grãos de amido (seta) sob luz polarizada no córtex. 33. Lipídios no fungo. CL = câmara larval; F = fungo; FV = feixe vascular.

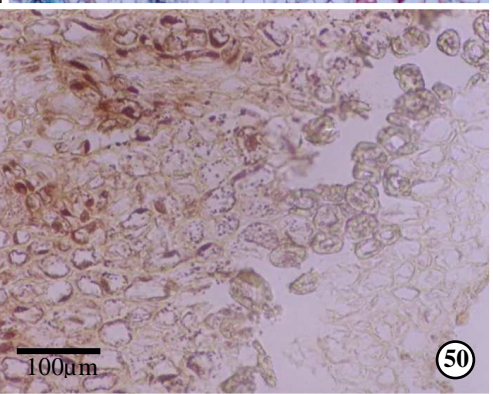
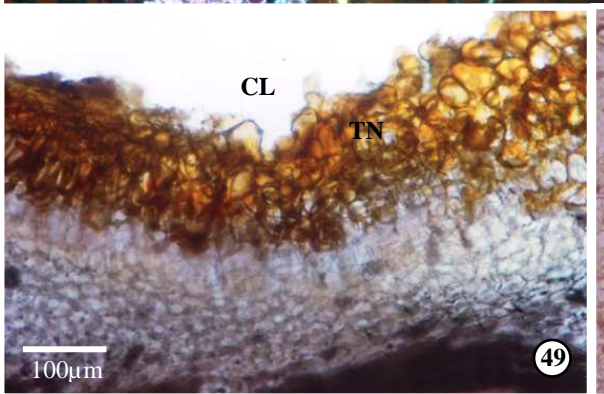
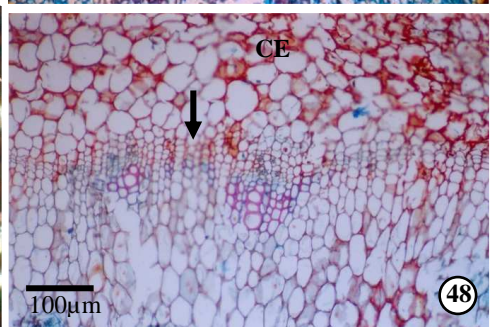
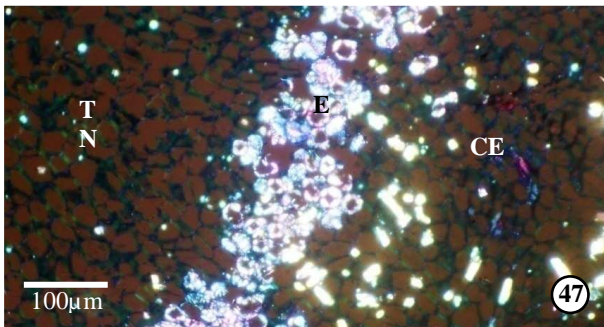
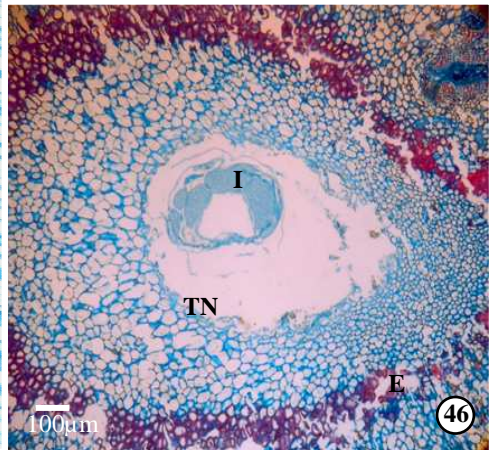
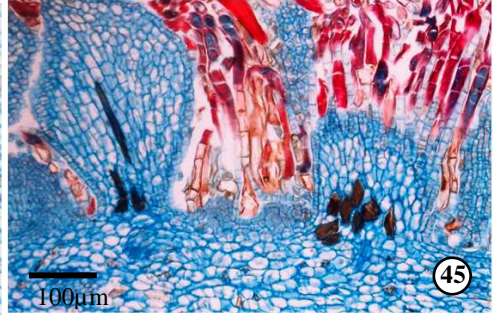
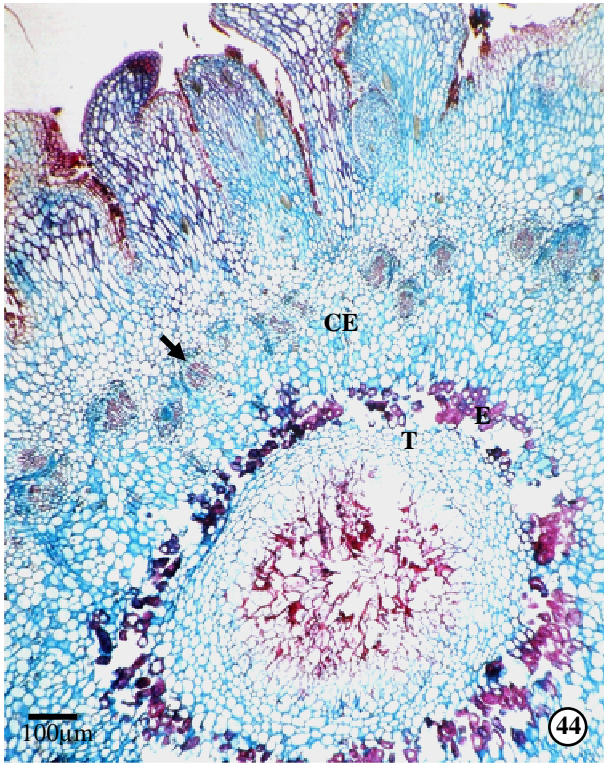


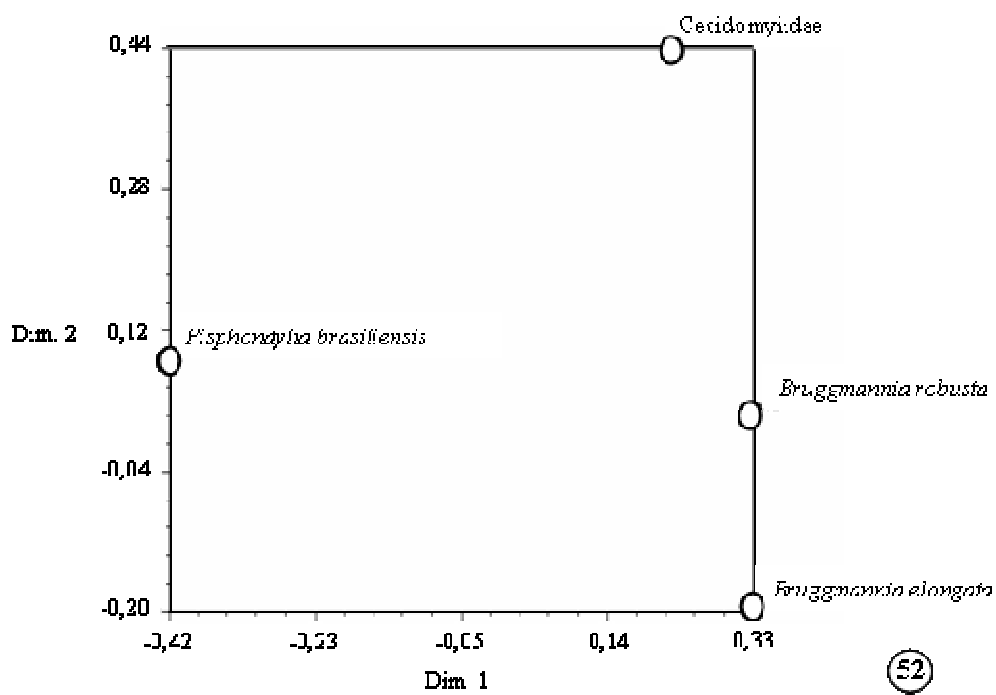
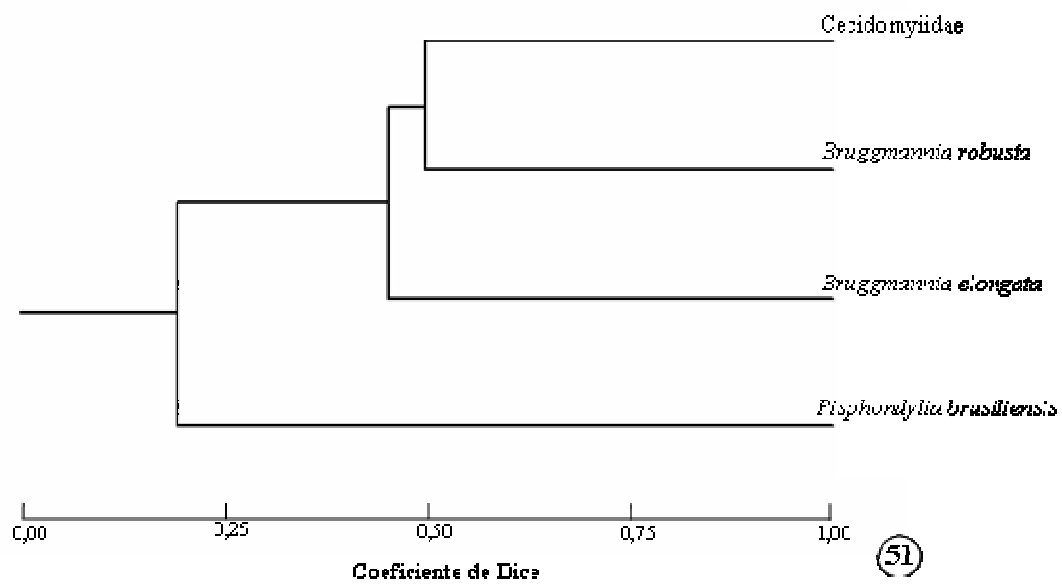
Figuras 34-38. Galhas foliares induzidas por *Bruggmannia elongata* Maia & Couri em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. Secções transversais. 34. Aspecto geral da galha madura. Tricomas tectores na face abaxial. 35. Detalhe de indutor em galha de projeção foliar. 36. Epiderme unisseriada. Parênquima paliçádico inalterado. Tecido esclerenquimático neoformado. 37. Feixe vascular alterado. Divisões das células procambiais. Afastamento de xilema e floema. 38. Lignificação das células alinhadas com o xilema e o floema. E = esclerênquima; F= fungos; FL = floema; I = indutor; PV = parênquima vascular; TT= tricoma tector; XL = xilema.



Figuras 39-43. Galhas foliares induzidas por *Bruggmannia elongata* Maia & Couri em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. Secções transversais. 39. Lignificação do córtex interno. Fungos na câmara larval. 40. Possível sinal de oviposição com acúmulo de fenólicos nas células do limbo (seta). Fungos na câmara larval. 41. Grãos de amido (seta) no córtex interno vistos sob luz polarizada. 42. Reação positiva para açúcares redutores no fungo. Possível sinal de oviposição (seta). 43. Reação positiva para lipídios no fungo. CL = câmara larval; F = fungo; L = lignificação.

Figuras 44-50. Galhas gemíferas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia em *Guapira opposita* (Vell) Reitz. 44. Aspecto geral. Feixes vasculares neoformados (seta) no córtex externo. Esclerênquima. Córtex interno. **45.** Superfície da galha com revestimento formado pela epiderme das projeções foliares, da galha e pelos tricomas glandulares pluricelulares. **46.** Camadas de esclerênquima contornando o tecido nutritivo. **47.** Cristais no córtex externo. **48.** Crescimento lateral (seta) no córtex externo. **49.** Açúcares solúveis detectados no tecido nutritivo. **50.** Substâncias fenólicas no córtex externo da galha. CE = córtex externo; CI = Córtex interno; E = esclerênquima; I = indutor; TN = tecido nutritivo.





Figuras 51 e 52. Análises entre os quatro morfotipos de galhas induzidos por Cecidomyiidae em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. 51. Dendrograma de similaridade fenotípica. 52. Análise de componentes principais (PCA).

Discussão

A ocorrência de galhas em Nyctaginaceae é incomum quando comparada a outras famílias botânicas como Fabaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Malpighiaceae (Gonçalves-Alvim & Fernandes 2001) e Melastomataceae (Maia *et al.* 2008). Contudo, a subtribo Schizomyiina (Diptera: Cecidomyiidae) possui ampla associação às espécies de Nyctaginaceae (Gagné 1994; 2004), em especial àquelas pertencentes à subtribo Pisoniae dentro da qual *G. opposita* se encontra com aproximadamente nove morfotipos de galhas induzidas em diversos órgãos vegetais (Gagné 2004; Maia 2004; Maia *et al.* 2008). Os registros de galhas nesta espécie demonstram que a indução em folhas é majoritária (Couri & Maia 1992; Maia 1993; Maia & Couri 1993; Maia 2004; Maia *et al.* 2008), o que segue o padrão encontrado em levantamento de riqueza de galhas nos quais a folha é o sítio preferencial para a oviposição tanto em regiões temperadas (Mani 1964) quanto em regiões neotropicais (Maia & Fernandes 2004; Maia *et al.* 2008). Das três galhas foliares estudadas, duas são induzidas por espécies do gênero *Bruggmannia* o qual também apresenta preferência pela indução nesse órgão (Gagné 1994).

De todos os morfotipos registrados em *G. opposita* (Maia 1993; Maia & Couri 1993; Maia 2004; Maia *et al.* 2008), *Pisphondylia brasiliensis* é o único a ocupar um nicho exclusivo, as gemas. Esta condição pode evitar a competição interespecífica entre esta galha e as demais, o que é vantajoso para este indutor, ao contrário dos indutores de galhas coexistentes no mesmo órgão, onde a competição leva a danos no desenvolvimento (Hartley 1998). Além disso, as gemas são consideradas fortes drenos naturais, o que garantiria uma maior vantagem nutricional a *P. brasiliensis*. Nesse sentido, as galhas foliares de *B. elongata*, *B. robusta* e do Cecidomyiidae não identificado repartem os recursos quando ocorrem simultaneamente numa mesma folha. A possibilidade de sítios de oviposição alternativos realizada pela espécie não descrita de Cecidomyiidae indica uma diversificação, que pode levar à colonização exclusiva de outros órgãos no hospedeiro, conforme apontado por Cook *et al.* (2002). Deste modo, este galhador tende a um comportamento de escape à competição com os demais galhadores.

O sistema de revestimento, em todas as galhas, é constituído por epiderme simples, porém com diversos níveis de alterações. A galha induzida por *B. robusta* apresenta uma pilosidade distinta da epiderme da folha não galhada bem como dos outros morfotipos. Essa galha possui tricomas com acúmulo de betalaínas, comuns nas

Nyctaginaceae (Judd *et al.* 2002; Gandía-Herrero *et al.* 2005). As betalainas são pigmentos nitrogenados restritos à ordem Caryophyllales e a alguns gêneros de basidiomycetos (Stintzing & Carle 2004), divididas em duas classes de acordo com a cor amarela (betaxantinas) ou violeta (betacianinas) exibida (Gandía-Herrero *et al.* 2005). Apesar da sua natureza atóxica para os humanos (Stintzing & Carle 2004), podem ter ação deletéria contra herbivoria (Judd *et al.* 2002). A similaridade de coloração, de distribuição de tecidos e de absorbância (535-540nm) sugere que a ação das betacianinas pode ser análoga às atribuídas para as antocianinas como a proteção contra raios UV (Lee & Collins 2001; Stintzing & Carle 2004), sendo que a presença desses pigmentos pode estar relacionada à resistência a patógenos, defesa viral e ainda ação antioxidante nos tecidos vegetais (Stintzing & Carle 2004).

A grande densidade de tricomas em galhas pode ainda conferir defesa mecânica (Stone & Schönrogge 2003) e propiciar um microclima adequado para o desenvolvimento do galhador (Fernandes 1994; Isaias 1998). Essas mesmas funções podem estar associadas aos tricomas encontrados nas galhas de *P. brasiliensis* na Serra da Calçada-MG. O conteúdo vacuolar destes tricomas reagiu positivamente para a presença de proantocianidinas (*cf.* Fleury 2009, capítulo 2), as quais podem auxiliar na sinalização e na prevenção de ataques contra herbívoros.

O sistema fundamental em três dos morfotipos estudados é formado pela hiperplasia e/ou hipertrofia do parênquima com a diferenciação de camadas de esclerênquima. A hiperplasia juntamente com a hipertrofia produz grandes células parenquimáticas poliédricas, conforme descrito por Rohfritsch (1992). Nas galhas foliares, há uma tendência à homogeneização do parênquima lacunoso, mais evidente na galha esférica, sendo um caráter já observado em galhas de *Machaerium* spp. (Isaias 1998), *Caryocar brasiliensis* (Castro 2007), *Copaifera langsdorffii* (Oliveira 2007) e *Lantana camara* (Moura *et al.* 2008). No caso das galhas induzidas por *B. elongata*, o parênquima paliçádico e o lacunoso permanecem praticamente inalterados.

A diferenciação do esclerênquima nas galhas estudadas é comum a muitos morfotipos induzidos por Cecidomyiidae (Kraus *et al.* 1996; Isaias 1998; Kraus *et al.* 2003; Drummond 2005; Castro 2007); Lepidoptera (Vecchi 2004) e Psyllidae (Oliveira *et al.* 2006; Landa 2008) na região neotropical. Este tipo celular localiza-se entre o córtex e o tecido nutritivo propriamente dito, permitindo a transfusão de nutrientes e água para o indutor, através das numerosas pontoações (Rohfritsch 1992). Além do transporte de substâncias a curta distância, o esclerênquima confere proteção

extra a inimigos naturais (Fernandes 1994; Ronquist & Liljeblad 2001) e resistência mecânica à galha devido a lignificação intensa das paredes celulares (Esau 2000; Cutler *et al.* 2008). Nesse sentido, a camada de esclerênquima adicional encontrada abaixo da epiderme da galha do Cecidomyiidae não identificado denota maior resistência mecânica e potencial do indutor contra o ataque de predadores e/ou parasitóides.

O padrão para o sistema vascular das galhas de Cecidomyiidae é a neoformação de feixes no córtex da galha, ao redor da câmara larval (Rohfritsch 1992), o que foi validado em três dos modelos avaliados. Essa característica é importante tanto para as galhas quanto para o indutor, pois a vascularização permite o transporte dos recursos destinados ao desenvolvimento das galhas e o aporte de fotoassimilados em direção ao galhador, garantindo a nutrição do mesmo (Larson & Whitham 1991; Inbar *et al.* 1995). Dentre os modelos estudados, a galha de *P. brasiliensis* apresenta maior complexidade na vascularização, pois o próprio morfotipo desenvolve grande quantidade de projeções foliares superficiais, cujos feixes se conectam a feixes neoformados no córtex da galha. Além disso, essa galha quando alcança maiores dimensões apresenta crescimento secundário pela atividade do meristema lateral que adiciona maior quantidade de tecidos vasculares à estrutura. O meristema lateral é característico das Nyctaginaceae (Carlquist 2004), e sua atividade na galha demonstra que esta se desenvolve à semelhança de um órgão constituinte do eixo vegetativo.

Diferentemente dos outros morfotipos, aquele induzido por *B. elongata* não possui neoformação vascular, sendo que os feixes originais da folha hospedeira, próximos à câmara larval, garantem o suprimento vascular a este morfotipo. Além disso, o aumento da atividade procambial resulta não em novos tecidos condutores, mas em divisões do parênquima vascular constituindo o córtex da galha.

O tecido nutritivo nas galhas estudadas é formado por camadas parenquimáticas adjacentes à câmara larval, contudo cada modelo apresenta características distintas. Nas galhas induzidas pela espécie não identificada de Cecidomyiidae e nas de *P. brasiliensis*, as células do tecido nutritivo são menores do que aquelas do parênquima externo ao tecido esclerenquimático. Nas galhas de *Bruggmannia*, fungos foram observados na câmara larval, sendo que as células que limitam essa câmara lignificam-se na maturidade. Processos de infecção por fungos seguidos de lignificação são relatados por Fink (1999). Tendo em vista que a lignificação das células pode dificultar a alimentação dos Cecidomyiidae e a não detecção de nutrientes nas células adjacentes à câmara larval, através dos testes histoquímicos, é plausível supor que as hifas sejam o

sítio de alimentação dos indutores. Tal suposição é corroborada pela reação positiva para açúcares redutores e lipídios nas hifas presentes nas galhas de *B. elongata* e para lipídios naquelas induzidas por *B. robusta*, configurando possíveis galhas de ambrosia. Além disso, tanto na tribo Asphondyliini quanto na subtribo Schizomyiina, às quais pertence o gênero *Bruggmannia*, há indutores de galhas de ambrosia (Yukawa & Rohfritsch 2005). Segundo Rohfritsch (2008), as galhas de ambrosia são mais simples, com poucas alterações nos sistemas de tecidos e hiperplasia do parênquima sem a formação de um tecido nutritivo típico, pois o micélio dos fungos mimetiza um pseudoparênquima similar ao tecido nutritivo. Nos sistemas analisados por Rohfritsch (2008), os fungos demonstraram ação essencial na indução da galha, pois o indutor sozinho não consegue estimular as células vegetais. Para a comprovação da natureza e função dos fungos nas galhas de *Bruggmannia* spp. em *Guapira opposita*, estudos ontogênicos das mesmas associados a análises morfológicas dos indutores e identificação dos fungos são necessários.

Além das reações positivas no micélio nas câmaras larvais das galhas de *Bruggmannia* spp., as análises histoquímicas revelaram a presença de substâncias de reserva no córtex da galha do Cecidomyiidae não identificado e, ocasionalmente, nas galhas de *Bruggmannia* spp., onde grãos de amido foram detectados. Nas galhas de *P. brasiliensis*, lipídios foram encontrados na epiderme das projeções foliares e açúcares redutores no tecido nutritivo propriamente dito o que indica que os fotoassimilados são diretamente direcionados para o sítio de alimentação reforçando a hipótese da Nutrição (Price *et al.* 1987), sem contudo ocorrer acúmulo de amido em um tecido de reserva externo. Neste caso, o alto metabolismo na galha promovido pelo indutor gera um grande dreno.

Em relação aos compostos secundários, as galhas induzidas por *P. brasiliensis* e pelo Cecidomyiidae não identificado apresentaram substâncias fenólicas nas camadas celulares periféricas. A localização destas substâncias é comum a outras galhas (Motta *et al.* 2005) e segundo Nyman & Julkunem-Tiito (2000), é mais expressiva nos tecidos externos à câmara larval justamente por ser este último o sítio de alimentação do indutor, sendo mais fácil à larva adaptar-se à tecidos com menor grau de toxidez. Além de seu importante papel na defesa contra predadores, os fenólicos podem participar no crescimento vegetal (Hartley 1999). A presença de fenólicos somente em dois morfotipos estudados e sua localização restrita às regiões externas corrobora a proposição de Nyman & Julkunem-Tiito (2000), de que os indutores manipulam a

composição química das galhas. Substâncias alcalóidicas foram exclusivamente detectadas nas galhas de *P. brasiliensis* e também são reconhecidas pela sua toxidez e ação contra herbívoros (Wittstock & Gershenzon 2002; Taiz & Zeiger 2004) o que torna esta galha potencialmente mais protegida do ponto de vista químico em relação aos outros modelos do ponto de vista químico.

De forma geral, Rohfritsch (1992) destaca que as galhas de Cecidomyiidae apresentam diferenciação de tricomas, espessa camada de parênquima com células hipertrofiadas e faixa de esclerênquima envolvendo o tecido nutritivo. Bronner (1992) acrescenta que carboidratos são as substâncias de reserva típicas das galhas induzidas por essa família. Todavia, *G. opposita* demonstra variabilidade de reações frente à ação dos quatro Cecidomyiidae (Asphondyliini: Schizomyiina), conforme observado pela baixa similaridade (20 a 50%) entre os morfotipos. De fato, o nível de similaridade entre os três morfotipos induzidos em folhas e aquele induzido em gemas é em torno de 20%, enquanto que os morfotipos induzidos em folhas são 45% similares. As galhas de *B. robusta* e as do Cecidomyiidae não identificado demonstram similaridade fenotípica um pouco maior, com valor próximo a 50%.

As maiores similaridades entre as galhas de *B. robusta* e a do Cecidomyiidae não identificado ($\cong 50\%$) devem-se ao compartilhamento do órgão hospedeiro, agrupamento, forma esférica, câmara larval única, parênquima de reserva amilífera e a neoformação de feixes vasculares. *Bruggmannia elongata* difere destas duas pela forma discóide, isolamento e ativação do procâmbio. A galha de *P. brasiliensis* é a única a apresentar indução em gemas, forma elipsóide, várias câmaras larvais, projeções foliares, crescimento secundário, açúcares redutores, lipídios e alcalóides, além de alcançar maiores dimensões em relação às demais, características estas que explicam a maior distância entre este morfotipo e as galhas foliares.

Nos sistemas *Guapira opposita*-Cecidomyiidae analisados, a maior similaridade fenotípica (50%) foi evidenciada entre as galhas induzidas por *Bruggmannia* spp. e aquelas do Cecidomyiidae não identificado, o qual segundo Maia (com. pess.) pode pertencer ao gênero *Proasphondylia* ou a *Bruggmannia*. Como até o momento galhadores descritos associados às folhas em *G. opposita* são exclusivamente do gênero *Bruggmannia*, (Maia 1993; Maia & Couri 1993; Gagné 1994; Maia 2004; Maia *et al.* 2008), as maiores similaridades podem ser mais fortemente relacionadas ao taxa do indutor. Deste modo, o estudo em questão corrobora a hipótese de que galhas induzidas por espécies filogeneticamente próximas compartilham maior número de caracteres.

Referências bibliográficas

- Bissing, D.R.** 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain technology* 49:116-117.
- Bronner, R.** 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.) *Biology of Insect-induced galls*. Oxford University Press, New York. pp.118-140.
- Brundett, M.C.; Kendrick, B.; Peterson, C.A.** 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* 66:111-116.
- Bukatsch, F.** 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61(8):255.
- Carlquist, S.** 2004. Lateral meristems, successive cambia and their products: a reinterpretation based on roots and stems of Nyctaginaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146:129-143.
- Castro, A.C.R.** 2007. Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- Cook, J.M.; Rokas, A.; Pagel, M.; Stone, G.H.** 2002. Evolutionary shifts between host oak sections and host-plant organs in *Andricus* gallwasps. *Evolution* 56(9):1821-1830.
- Couri, M.S. & Maia, V.C.** 1992. Considerações sobre *Pisphondylia* Möhn, 1960 (Diptera, Cecidomyiidae, Asphondyliidi), com descrição de uma espécie nova do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 36(4):729-730.
- Culling, C.F.A.** 1974. *Modern microscopy: elementary theory and practice*. Butterworths, London.
- Cutler, D.F.; Botha, T.; Stevenson, D.W.** 2008. *Plant Anatomy: an applied approach*. Blackwell Publishing.
- Dawkins, R.** 1982. *The extended phenotype*. Oxford University Press. Oxford.
- Drummond, M.M.** 2005. Galhas entomógenas em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae): estrutura anatômica, histoquímica e

sazonalidade. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.

Esau, K. 2000. Anatomia das plantas com sementes. 15ª ed. Ed. *Edgard Blücher*, São Paulo.

Fernandes, G.W. 1994. Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Revista Brasileira de Entomologia* 38(2):421-433.

Fernandes, G.W.; Carneiro, M.A.A.; Lara, A.C.F.; Allain, L.R.; Andrade, G.I.; Julião, G.R.; Reis, T.R.; Silva, I.M. 1996. Gall-forming insects on the neotropical species of *Baccharis* (Asteraceae). *Tropical Zoology* 9:315-332.

Fernandes, G.W.; Saraiva, C.; Cornelissen, T.G.; Price, P.W. 2000. Diversity and morphology of insect galls on *Chrysothamnus nauseosus* (Asteraceae) in North Arizona. *Bios* 8(8):39-48.

Fink, S. 1999. Pathological and regenerative plant anatomy. *Gebrüder Borntraeger*, Berlin.

Furr, M. & Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44:153-159

Gagné, R. 1994. The gall midges of the Neotropical region. Ithaca, *Comstock Cornell University Press*.

Gagné, R. 2004. A catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 25:1- 408.

Gandía-Herrero, F.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J. 2005. Fluorescent pigments: new perspectives in betalain research and applications. *Food Research International* 38:879-884.

Gonçalves-Alvim, S.J. & Fernandes, G.W. 2001. Biodiversity of gall-forming insects: historical, community and habitat effects in four neotropical savannas. *Biodiversity and Conservation* 10:79-98.

Hartley, S.E. 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113:492-501.

Hartley, S.E. 1999. Are insect galls large rhizobia? *Oikos* 84:333-342.

Inbar, M.; Eshel, A.; Wool, D. 1995. Interspecific competition among phloem-feeding insects mediated by induced host-plant sinks. *Ecology* 76(5):1506-1515.

- Isaias, R.M.S.** 1998. Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Pappilonoideae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. *Universidade de São Paulo*, São Paulo.
- Johansen, D.A.** 1940. Plant microtechnique. *McGraw-Hill Book*. New York.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M.J.** 2002. Plant systematics: a phylogenetic approach. *Sinauer Associates Publishers*, Massachusetts.
- Kraus, J.E; Sugiura, H.C.; Cutrupi, S.** 1996. Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *Tuberculata* (Meliaceae). *Fitopatologia Brasileira* 21(3):349-356.
- Kraus, J.E & Arduin, M.** 1997. Manual Básico de métodos em morfologia vegetal. *Seropédica: EDUR*.
- Kraus, J.E; Isaias, R.M.S.; Vecchi, C.; Fernandes, G.W.** 2003. Structure of insect galls on two sympatric subspecies of *Chrysothamnus nauseosus* (Pall. ex Pursh) Britton (Asteraceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21(2): 251-263.
- Landa, F.S.L.** 2008. Respostas estruturais e fisiológicas de *Richeria grandis* Vahl. (Phyllanthaceae) ao estabelecimento do Psyllidae galhador. Tese de doutorado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- Larson, K.G. & Whitham, T.G.** 1991. Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia* 88:15-21.
- Lee, D.W. & Collins, T.M.** 2001. Phylogenetic and ontogenetic influences on the distribution of the anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. *International Journal of Plant Sciences* 162(5):1141-1153.
- Lillie, R.D.** 1948. Histopathologic technic and practical histochemistry. *McGraw-Hill Book Company*. New York.
- Maia, V.C.** 1993. Considerações sobre *Proasphondylia* Felt (Diptera, Cecidomyiidae) com descrições de duas espécies novas associadas com *Guapira opposita* (Velloso) Reitz (Nyctaginaceae). *Revista Brasileira de Zoologia* 10(2):215-218.
- Maia, V.C. & Couri, M.S.** 1993. Descrição de três espécies novas de *Bruggmannia* Tavares, 1906 (Diptera, Cecidomyiidae, Asphondyliidi) do Brasil associadas com *Guapira opposita* (Nyctaginaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 53(2):209-215.

- Maia, V.C.** 2004. Description of a new species of *Bruggmannia* Tavares (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) from Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21(4):761-764.
- Maia, V.C. & Fernandes, G.W.** 2004. Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* 64(3):423-445.
- Maia, V.C.; Magenta, M.A.G.; Martins, S.E.** 2008. Ocorrência e caracterização de galhas de insetos em áreas de restinga de Bertiooga (São Paulo, Brasil). *Biota Neotropica* 8(1):167-197.
- Mani, M.S.** 1964. Ecology of plant galls. *The Hague: Dr. W. Junk Publishers.*
- Mendonça, M.S. Jr.** 2007. Plant diversity and galling arthropod diversity searching for taxonomic patterns in an animal-plant interaction in the neotropics. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 42(3-4):347-357.
- Moore, A.E.P.; Ashford, A.E.; Peterson, R.L.** 1991. Reserve substances in *Paxillus involutus* sclerotia. Determination by histochemistry and X-ray analysis. *Protoplasma* 163:67-81
- Moura, M.Z.D** 2007. Padrões anatômicos relacionados a cecidogênese na multi-hospedeira *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Tese de doutorado. *Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.*
- Moura, M.Z.D; Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S.** 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany* 56:153-160.
- Motta, L.B.; Kraus, J.E.; Salatino, A.; Salatino, M.L.F.** 2005. Distribution of metabolites in galled and non-galled tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33:971-981.
- Nyman, T. & Julkunen-Tiitto, R.** 2000. Manipulation of phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Science* 97:13184-13187.
- Oliveira, D.C.** 2007. Relações entre ontogenia foliar e idade dos tecidos para o valor adaptativo de galhas em *Copaifera langsdorff* Desf. (Fabaceae). Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.*
- Oliveira, D.C.; Christiano, J.C.S.; Soares, G.L.S.; Isaias, R.M.S.** 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hass. (fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera, Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica* 29(4):657-667.

- Paiva, J.G.A.** 2006. Verniz vitral incolor 500[®] : uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica* 20(2):257-264.
- Price, P.W.; Waring, G.L.; Fernandes, G. W.** 1987. Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88(2):361-363.
- Price, P.W.** 2005. Adaptive radiation of the gall-inducing insects. *Basic and Applied Ecology* 6:413-421.
- Raman, A.** 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92(6):748-757.
- Redfern, M. & Askew, R.R.** 1992. Plant galls. *Richmond Publishing Co.* England.
- Ronquist, F. & Liljeblad, J.** 2001. Evolution of the gall wasp-host plant association. *Evolution* 55(12): 2503-2522.
- Rohfritsch, O.** 1992. Patterns in gall development. *In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.) Biology of Insect-induced galls. Oxford University Press, New York.* pp.60-86.
- Rohfritsch, O.** 2008. Plants, gall midges, and fungi: a three-component system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128:208-216.
- Rohlf, F.J.** 2000. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. *Exeter Software, Setauker.*
- Sass, J.E.** 1951. Botanical Microtechnique. 2ed. *Ames:Iowa State College Press.*
- Schaefer, C.W.; Raman, R.; Withers, T.N.** 2005. Galls and galls-induced arthropods: ecological issues and evolutionary problems. *In: Raman, A.; Schaefer, C.W. Withers, T.N. (eds.) Biology, Ecology, and evolution of gall-inducing arthropods. New Hampshire: Science Publishers. (2):761-766.*
- Shorthouse, J.D.; Woll, D.; Raman, A.** 2005. Gall-inducing insects – Nature’s most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology* 6:407-411.
- Stintzing, F.C. & Carle, R.** 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 15: 19-38.
- Stone, G.N. & Schönrogge, K.** 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18(10):512-522.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. Fisiologia Vegetal. *Ed. Artmed.*
- Vecchi, C.** 2004. Reações diferenciais a herbívoros galhadores em espécies de Meslastomataceae. Tese de Doutorado. *Universidade de São Paulo, São Paulo.*

- Veldtman, R. & MacGeoch, M.A.** 2003. Gall-forming insect species richness along a non-scleromorphic vegetation rainfall gradient in South Africa: The importance of plant community composition. *Austral Ecology* 28:1-13.
- Wittstock, U. & Gershenzon, J.** 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5:1-8.
- Yoder, L.R. & Mahlberg, P.G.** 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63(9):1167-1173
- Yukawa, J. & Rohfritsch, O.** 2005. Biology and Ecology of gall-inducing Cecidomyiidae (Diptera). *In: Raman, A.; Schaefer, C.W. Withers, T.N. (eds.)* Biology, Ecology, and evolution of gall-inducing arthropods. *Science Publishers* (1):273-304.
- Yukawa, J. Uechi, N.; Tokuta, M.; Sato, S.** 2005. Radiation of gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) in Japan. *Basic and Applied Ecology* 6:453-461.

Processos ontogênicos nas galhas induzidas por
***Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992**
(Cecidomyiidae) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz
(Nyctaginaceae)

Processos ontogênicos nas galhas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992 (Cecidomyiidae) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae)

Resumo

Guapira opposita (Nyctaginaceae) é uma superhospedeira de herbívoros galhadores dentre os quais se destaca *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992 (Diptera, Cecidomyiidae), pelo sítio de indução único, as gemas, e pela ampla distribuição no território brasileiro. Este trabalho visa testar a hipótese de que galhas em gemas podem causar o encurtamento dos entrenós e a maximização da diferenciação de gemas axilares. Os aspectos de desenvolvimento das galhas são abordados para responder (1) onde se localizam os sítios de oviposição? (2) Qual a origem das projeções que revestem as galhas? (3) Quais os processos ontogênicos envolvidos que levam a forma final destas estruturas? Dois padrões de atividade meristemática foram observados nessa galha, um deles repete o modelo apical, com formação de pares de folhas anexas às gemas e no outro, o meristema localizado na base das projeções foliares dá origem a uma nova projeção com seu próprio meristema axilar que repete o processo até a maturação da galha. Nesta fase, as galhas podem apresentar crescimento secundário expresso na atividade do meristema lateral típico das Nyctaginaceae. À exceção deste crescimento, a organização anatômica da galha de *P. brasiliensis* se enquadra no proposto para galhas de Cecidomyiidae. Conjuntamente, as características dessa galha indicam o encurtamento dos entrenós e a ampliação da potencialidade de gerar novas folhas de modo que além de se estabelecer como fonte de nutrição, abrigo e proteção para o indutor, com a produção de projeções foliares, este morfotipo pode auxiliar na manutenção do sistema *G. opposita*-*P. brasiliensis*.

Palavras – chave: encurtamento de entrenós, galha gemífera, *Guapira opposita*, *Pisphondylia brasiliensis*, primórdios foliares

Ontogenical processes in galls induced by *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992 (Cecidomyiidae) in *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae)

Abstract

Guapira opposita (Nyctaginaceae) is a superhost of galling herbivores among which *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992 (Diptera, Cecidomyiidae) stands out because of its unique site of induction, the stem buds, and its wide distribution all over Brazil. This study aims to test the hypothesis that bud gall may cause the shortening of the internodes together with the maximization of the differentiation of axillary buds. Aspects of gall development are addressed to answer (1) where the sites of oviposition are located; (2) what the origin of the leaf projections is; (3) what the processes involved in the formation of galls are and, (4) what substances related to the protection and nutrition of *P. brasiliensis* can be found in gall tissues. Two patterns of activity were observed in gall meristem, the first repeating the apical model, and forming leaves in pairs, and the latter with new buds located nearby the base of leaf projections and giving rise to a new projection with its proper axillary meristem. This second pattern is repeated until gall maturation, when a secondary growth typical of the lateral meristem, common in Nyctaginaceae, is activated in gall sites. Appart from this meristematic activity, the anatomical organization of the galls of *P. brasiliensis* seems to fit in the Cecidomyiidae model. Reserve and signaling substances were detected. Altogether, the characteristics that indicate the shortening of the internodes and the potentialization to generate new leaves, so in addition to its source of nutrition, shelter and protection for the inducer, with the production of new leafy projections, this morphotype can help in the maintenance of *G. opposita*-*P. brasiliensis* system.

Key words: Bud galls, *Guapira opposita*, internodes shortening, leaf primordia *Pisphondylia brasiliensis*

Introdução

Galhas são modificações que ocorrem nos tecidos vegetais em resposta à ação de organismos endofíticos (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992). Estes organismos obtêm abrigo e nutrição dos tecidos vegetais ao gerar um crescimento anormal e coordenado, através da hipertrofia celular e hiperplasia do órgão afetado (Mani 1964; Redfern & Askew 1992; Raman 2007).

Dentre os herbívoros galhadores, os insetos se destacam por induzirem as mais diversas formas, tamanhos, cores e projeções superficiais (Rohfritsch 1992), sendo que independentemente da variedade, para cada morfotipo de galha existe um único inseto indutor, o que denota a alta especificidade dessas estruturas (Redfern & Askew 1992). Devido a essa especificidade, as galhas são tidas como fenótipos estendidos do galhador (*sensu* Dawkins 1982), muito embora sejam constituídas por tecidos vegetais.

A organização dos tecidos que compõem a galha obedece a um padrão que pode ser associado ao taxa indutor, com caracteres diagnósticos descritos para galhas induzidas por cinipídeos, cecidomiídeos e tentredinídeos na região temperada (Rohfritsch 1992). Enquanto a variedade das características internas da galha está associada à nutrição do galhador, a diversidade das estruturas externas pode ser decorrente da pressão exercida pelos inimigos naturais (Stone & Schönrogge 2003). Deste modo, análises anatômicas e morfológicas podem elucidar aspectos adaptativos aos quais a diversidade estrutural das galhas está relacionada. Em alguns casos, o local de indução, juntamente com tamanho, forma e presença de apêndices, auxilia no estabelecimento da galha e na sobrevivência do galhador. Segundo a hipótese de Price-Roinin (Nyman 2000), a posição das galhas no hospedeiro pode fornecer informações importantes a respeito dos aspectos evolutivos de alguns taxa indutores. Galhas induzidas em posições mais centrais no eixo vegetal seriam mais derivadas por terem maior aporte de nutrientes, facilitando a alocação de recursos nutricionais para o indutor.

Guapira opposita (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) é uma super-hospedeira de galhas (Mendonça 2007) com cerca de nove morfotipos descritos, induzidos por diferentes espécies de Diptera: Cecidomyiidae (Gagné 2004; Maia *et al.* 2008). Dentre os morfotipos, as galhas induzidas nas gemas se destacam pela distribuição ampla, tamanho e pela grande quantidade de projeções foliares revestindo sua superfície (Couri & Maia 1992; Rodrigues *et al.* 2007; Maia *et al.* 2008;).

Embora a literatura registre similaridades morfológicas entre galhas induzidas em gemas expressas na produção de apêndices variados (Raman 2007), na inibição do crescimento do ramo (Weis *et al.* 1988; Kraus *et al.* 2003) e no aspecto em roseta (Mani 1964), poucos estudos analisam as características anatômicas e/ou de desenvolvimento das mesmas (Kraus *et al.* 1994; Kraus *et al.* 2003; Vecchi 2004) possivelmente devido a sua complexidade. Assim, análises destes sistemas auxiliam na compreensão dos mecanismos que levam o meristema vegetativo, sob influência do galhador, a desviar-se do padrão de diferenciação gerando estruturas nas quais eventualmente ocorre a total supressão do desenvolvimento foliar (Raman 2007).

Frente ao fenótipo apresentado pelas galhas de gema induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992 (Diptera, Cecidomyiidae) na super-hospedeira *Guapira opposita* (Nyctaginaceae), este trabalho utiliza análises anatômicas para testar a hipótese de que as mesmas são produtos de um encurtamento de entrenós com maximização da diferenciação de gemas axilares. Além disso, aspectos relacionados ao desenvolvimento das galhas são abordados de modo a responder as seguintes questões: (1) onde se localizam os sítios de oviposição? (2) Qual a origem das projeções que revestem as galhas? E, (3) quais os processos ontogênicos responsáveis pela forma final destas?

Material e Métodos

Coletas

Folhas não galhadas, gemas, ramos e galhas de *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia foram coletados em duas populações distintas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae), localizadas no Morro de Santana, campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, de novembro de 2006 a novembro de 2008, e na Serra da Calçada (20°05'35''S, 43°59'01''W), região de Brumadinho, MG, de outubro de 2007 a novembro de 2008. Os espécimes-testemunha foram incluídos nos acervos dos herbários ICN 138.855 e BHCB 124.204, respectivamente.

Coleta do inseto indutor

Para a confirmação da identificação do indutor, galhas foram dissecadas sob estereomicroscópio (Olympus SHZ) para retirada de formas imaturas. Dez ramos portando galhas maduras de ambas as áreas amostrais foram acondicionados em armadilhas constituídas de pequenos potes plásticos com água posicionados dentro de potes maiores fechados com tecido de malha fina (voal). As armadilhas foram checadas diariamente. Após a emergência dos adultos, as galhas foram dissecadas para a retirada da exúvia pupal. Amostras de galhas fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50%, ácido acético, 1:1:18, v/v) e estocadas em etanol 70% juntamente com larvas, pupas, exúvias e adultos fixados em etanol 70% foram enviadas à especialista para identificação. O material testemunho foi incorporado à coleção de Diptera do Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro.

Análises biométricas e morfológicas

Observações no campo sobre o desenvolvimento e características externas da galha foram realizadas quinzenalmente, na população da Serra da Calçada, entre abril e novembro de 2008.

Foram coletadas 45 galhas maduras, verdes e túrgidas as quais já apresentavam pelo menos um canal de fuga do indutor. Medidas da altura e largura dessas galhas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital (Digimess), seguidas da dissecação das mesmas para contagem do número de câmaras larvais sob estereomicroscópio (Olympus – SZH). Os dados resultantes foram submetidos à análise de correlação através de GraphPad Prism[®] para Windows, versão 5.0. (GraphPad software, San Diego, CA, USA). A contagem do número de larvas por câmara e o registro da presença de parasitóides foram realizados.

Análises estruturais

Ápices caulinares, gemas axilares, caules em crescimento secundário, folhas não galhadas e galhas em três fases de desenvolvimento (jovem, madura e senescente) foram fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50%, ácido acético, 1:1:18, v/v) por 24-48 horas e posteriormente lavadas e estocadas em etanol 70% (Johansen 1940). Os

estágios das galhas foram estabelecidos pelas suas dimensões, número e tamanho proporcional das projeções foliares (galhas jovens possuíam menores dimensões e projeções em menor quantidade) e, principalmente pela presença de esclerênquima nas galhas maduras.

Para a preparação de lâminas semipermanentes, foram realizadas secções transversais e longitudinais à mão livre com auxílio de lâmina de barbear em suporte de isopor. As secções foram clarificadas em hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com mistura de azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%) e montadas em gelatina glicerinada de Kaiser (Kraus & Arduin 1997). Para a produção de lâminas permanentes, o material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940) e incluído em Paraplast[®] em estufa a 60°C. Cortes transversais e longitudinais do material (10-14 µm) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica[®] 2035 BIOCUT). Os cortes histológicos foram afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing, 1974). Após a retirada do Paraplast[®] com acetato de butila a 45°C, os cortes foram desidratados em série etílica, corados com azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%) e montados em verniz vitral incolor Acrilex[®] (Paiva 2006).

Para as análises em microscópio eletrônico de varredura (MEV), amostras de galhas jovens foram fixadas em Karnovsky 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (Karnovsky 1965, modificado), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por duas horas, desidratadas em série etílica (Johansen 1940) e secas em aparelho de ponto crítico (Bal-Tec). O material foi fixado a um porta-amostras com auxílio de cola branca e metalizado com 30 nm de ouro em metalizador (Sputtering Bal-Tec). As análises e captura de imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200-FEG-FEI-2006).

Resultados

Anatomia dos tecidos não galhados

Em secções longitudinais das gemas apicais e axilares, observa-se o meristema apical propriamente dito e os primórdios foliares (fig. 1) com filotaxia oposta. O meristema apical é dividido em túnica, com três camadas de células (C₁, C₂ e C₃) e corpo, formado por um pequeno grupo de células logo abaixo da C₃ (fig. 1). As células

da túnica apresentam divisões predominantemente anticlinais e as do corpo divisões anti- e periclinais. No meristema apical, se distinguem a zona central, as zonas periféricas e a zona de crescimento (fig. 2), sendo que as duas primeiras possuem células pequenas homogêneas, com citoplasma denso e núcleo evidente. Já na zona de crescimento, as células estão em diferenciação com alongamento e vacuolização crescentes à medida que se afastam da zona central (fig. 2). Nos primórdios foliares, distinguem-se a protoderme, o meristema fundamental e o procâmbio (fig. 3).

As gemas com mais de dois pares de primórdios apresentam alongamento dos entrenós. Nas axilas dos primórdios em estágios mais avançados, novas gemas são formadas (fig. 3). Em secção transversal e longitudinal da região do nó, percebem-se conexões vasculares entre o caule e a gema por meio de feixes medulares que se desviam do eixo do caule em direção ao procâmbio da gema axilar (fig. 4).

Em secção transversal do caule na região dos entrenós próximos ao ápice, observa-se o início de crescimento secundário (fig. 5) com epiderme unisseriada remanescente da estrutura primária, periderme em formação, com 1-10 camadas de felema e felogênio (fig. 6). O felogênio se instala na camada de colênquima adjacente a epiderme (fig. 5 e 6). O córtex é formado por 10-12 camadas de células parenquimáticas (fig. 5) e uma camada de células esclerificadas (fig. 7), a endoderme lignificada, que faz limite com o meristema lateral, originado do periciclo e suas derivadas. O meristema lateral, por sua vez, possui atividade diferenciada produzindo câmbio vascular que dá origem a feixes colaterais, e fibras em meio às quais os feixes ficam inclusos (fig. 7 - 9). Na medula parenquimática, feixes vasculares remanescentes do caule (fig. 5 e 7) em estrutura primária e idioblastos com monocristais encontram-se distribuídos aleatoriamente.

Inseto indutor

Os insetos obtidos das galhas de gema de *G. opposita* foram identificados como *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia, 1992 (Diptera, Cecidomyiidae, Asphondyliidi, Schizomyiina). A partir dos espécimes provenientes das duas populações, foram obtidos 3 pupas e 9 adultos, sendo 6 fêmeas e 3 machos. A fêmea e a pupa foram descritas pela primeira vez (Maia *et al.* subm. - anexo 1).

Características gerais da galha

As galhas induzidas nas gemas apicais e axilares (fig. 10-11) possuem formato elíptico e são ornamentadas por inúmeras projeções foliares (fig. 10-12). Essas projeções na população de MG possuem coloração ferrugínea (fig. 12), decorrente da presença de tricomas. Os primórdios foliares são produzidos em maior intensidade nas galhas (fig. 12) em relação às gemas não galhadas (fig. 13).

Na grande maioria das galhas, apenas uma larva por câmara foi encontrada, sendo que o desenvolvimento de larva a adulto de *P. brasiliensis* ocorre totalmente dentro da galha. As projeções foliares senescem ao redor do local de saída do inseto (fig. 14), enquanto que nas demais porções da galha as projeções mantêm-se verdes. Posteriormente, toda a estrutura senesce (fig. 15). Ocasionalmente, endoparasitóides não identificados foram detectados nas larvas de *P. brasiliensis* foi detectada em galhas da população do RS. Himenópteros adultos foram encontrados em ambas as populações.

Apesar das galhas serem inicialmente monotálamas, a indução pode ocorrer em gemas neoformadas na própria superfície da galha, culminando com a coalescência de galhas induzidas em momentos distintos. Nesse caso, distinguem-se câmaras larvais com o inseto em fase de pupa e outras com larvas de tamanhos variados. As dimensões das galhas variam bastante, sendo que há uma correlação positiva entre o número de câmaras larvais (cf. Fleury 2009 capítulo 1) e a altura da galha ($r^2 = 0,61$) (fig. 16), e o número de câmaras (cf. Fleury 2009 capítulo 1) e a largura ($r^2 = 0,70$) da galha (fig. 17). A correlação entre o aumento da altura *versus* a largura da galha também é alta ($r^2 = 0,77$) (fig.18).

Desenvolvimento das galhas

Na figura 19, distinguem-se a gema reprodutiva e as gemas axilares não galhada e a galhada, do mesmo par de folhas opostas. Na gema galhada verifica-se uma maior produção de projeções foliares (fig. 19) quando comparada à gema não galhada oposta. Nas galhas, mesmo bem jovens essas projeções foliares desenvolvem-se sem provocar o alongamento de entrenós (fig. 20). A produção de projeções na galha obedece a dois padrões de atividade do meristema: o primeiro é similar àquele das folhas não galhadas onde os primórdios se diferenciam nos flancos do meristema apical (fig. 21); o segundo ocorre por meio de divisões anticlinais e periclinais na base de uma projeção foliar.

Estas divisões originam uma pequena protuberância com células caracteristicamente meristemáticas que se diferenciam diretamente em uma nova projeção foliar (fig. 22-25). Na base dessa projeção recém formada, um grupo de células meristemáticas permanece indiferenciado repetindo todo o processo (fig. 25). A emergência das projeções foi observada somente nas bases das projeções foliares um pouco mais desenvolvidas, onde se localizam células remanescentes do meristema apical (fig. 26-29). Em decorrência desses dois padrões de atividade do meristema, as projeções foliares formadas na galha não apresentam filotaxia oposta cruzada, que se mantém nas projeções oriundas das gemas apicais e axilares. As projeções foliares se estabelecem lado a lado, formando um denso agregado de folhas. Concomitantemente, há formação do córtex da galha, resultado da hiperplasia do parênquima em processo de diferenciação na gema (fig. 19).

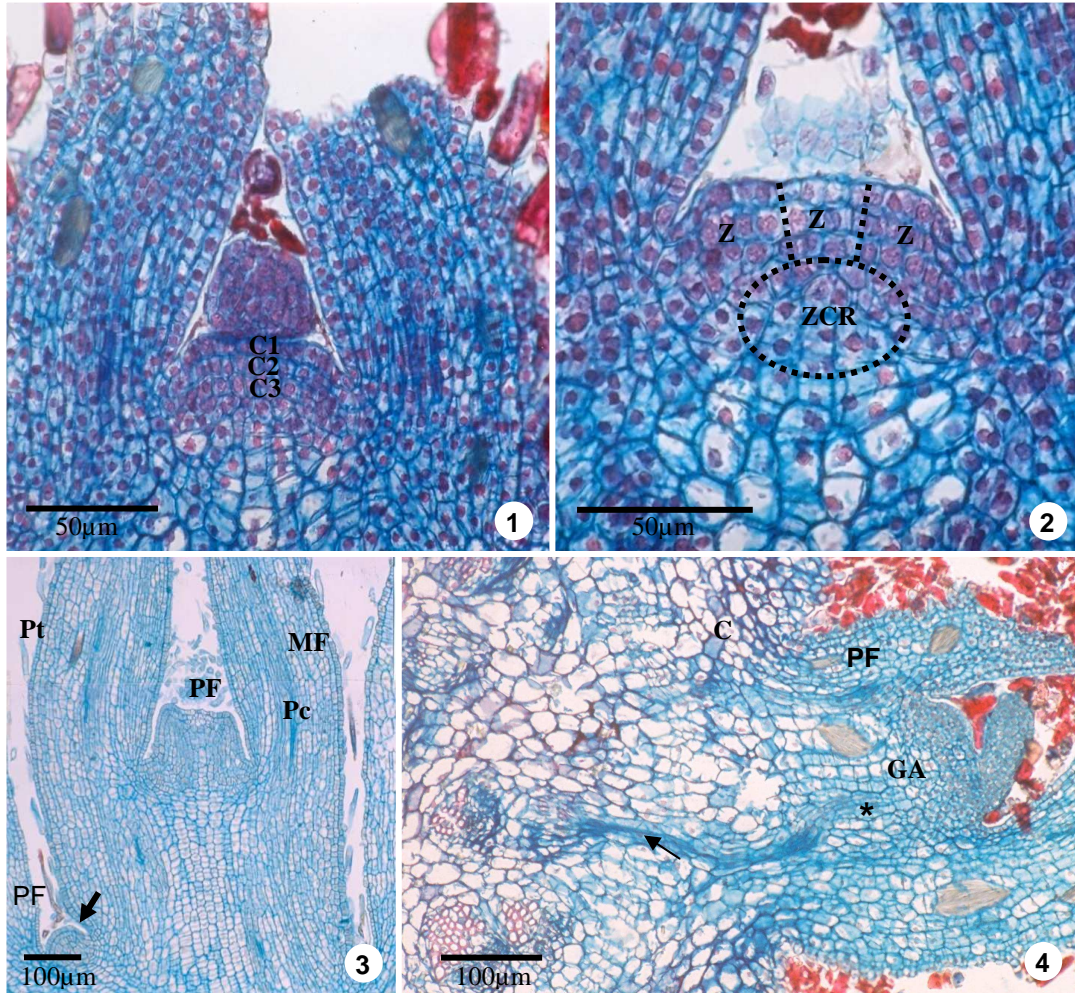
Na fase jovem, as galhas apresentam sistema de revestimento complexo, córtex bem desenvolvido e uma câmara larval central (fig. 19). A epiderme da galha é unisseriada, podendo ser definida como um mosaico composto pela epiderme das projeções e pela superfície das gemas que são formadas ao longo da galha, com tricomas glandulares numerosos e aleatoriamente dispostos (fig. 20 e 30). As projeções foliares em desenvolvimento apresentam protoderme, meristema fundamental, contendo ráfides, e procâmbio conectado diretamente ao tecido vascular do córtex da galha (fig. 31-33). O córtex da galha é formado por células parenquimáticas homogêneas e isodiamétricas. Feixes colaterais em início de diferenciação encontram-se aleatoriamente dispersos (fig. 31), alguns dos quais se interconectam com os feixes medulares do caule (fig. 33).

As galhas maduras são freqüentemente coalescidas, possuindo de 1-14 câmaras larvais. Apresentam organização similar à fase jovem exceto pela maior quantidade e desenvolvimento das projeções foliares, menor quantidade de tricomas, córtex mais desenvolvido e formação de uma faixa de tecido esclerenquimático (fig. 34) com 2-8 camadas dividindo o córtex externo mais espesso do córtex interno, mais delgado. Esse tecido pode formar um anel envolvendo a câmara larval ou formar faixas interrompidas. O córtex interno tem células parenquimáticas de dimensões menores e inclui nas camadas mais internas o tecido nutritivo propriamente dito revestindo a câmara larval. Estas células possuem uma quantidade de cristais visualmente menor quando comparada à região mais externa do córtex da galha madura (fig. 35). Apesar das projeções que compõem o revestimento da galha se encontrarem em diversos estágios

de desenvolvimento, a grande maioria está completamente expandida, com estômatos e mesofilo diferenciado (*cf.* Fleury 2009, cap. 3).

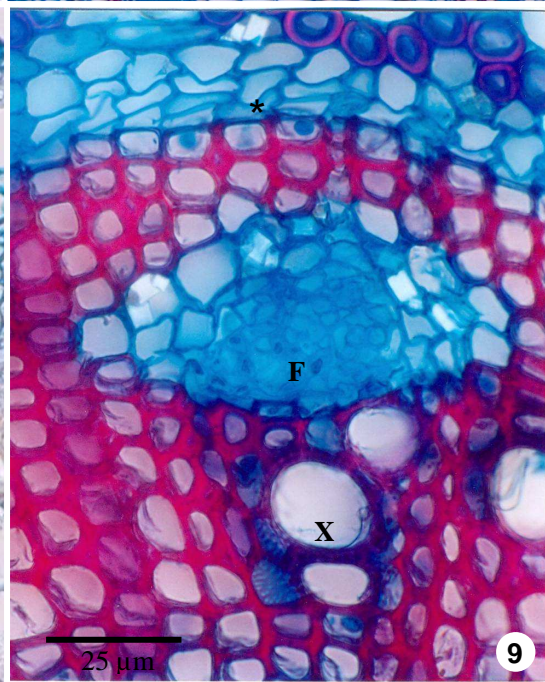
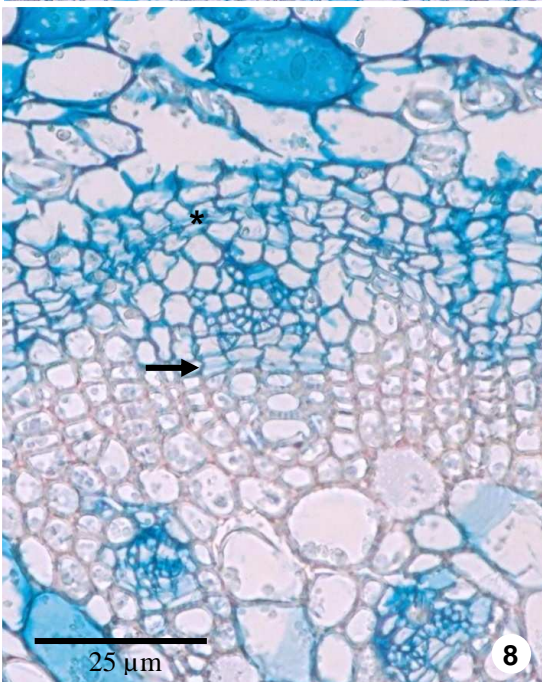
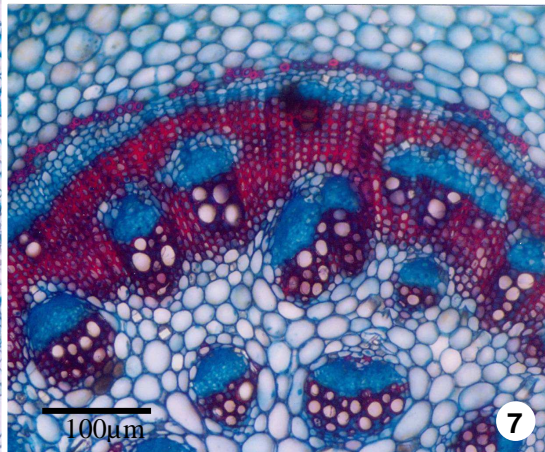
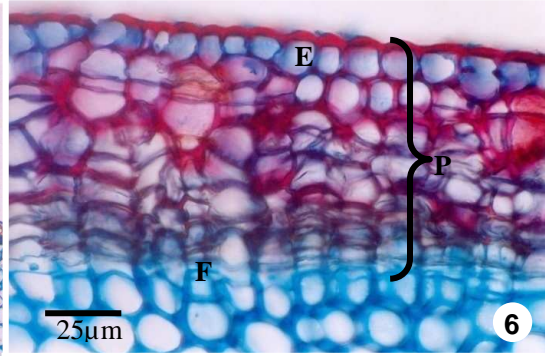
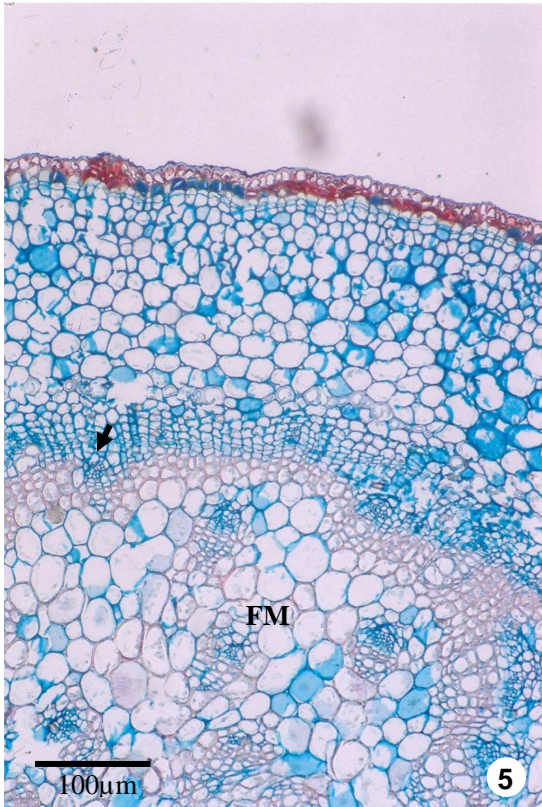
Nas galhas maduras com dimensões maiores, foi visualizada em meio ao córtex, a diferenciação de meristema lateral (fig. 36) similar ao encontrado no caule jovem (fig. 5). Na galha, esse meristema parece se originar de faixas procambiais provenientes das projeções foliares e produz câmbio vascular (fig. 37) e tecido parenquimático para o interior (fig. 36). A vascularização nessas galhas apresenta maior complexidade, uma vez que é constituída pelos feixes do córtex da galha e pelos feixes colaterais provenientes do crescimento secundário.

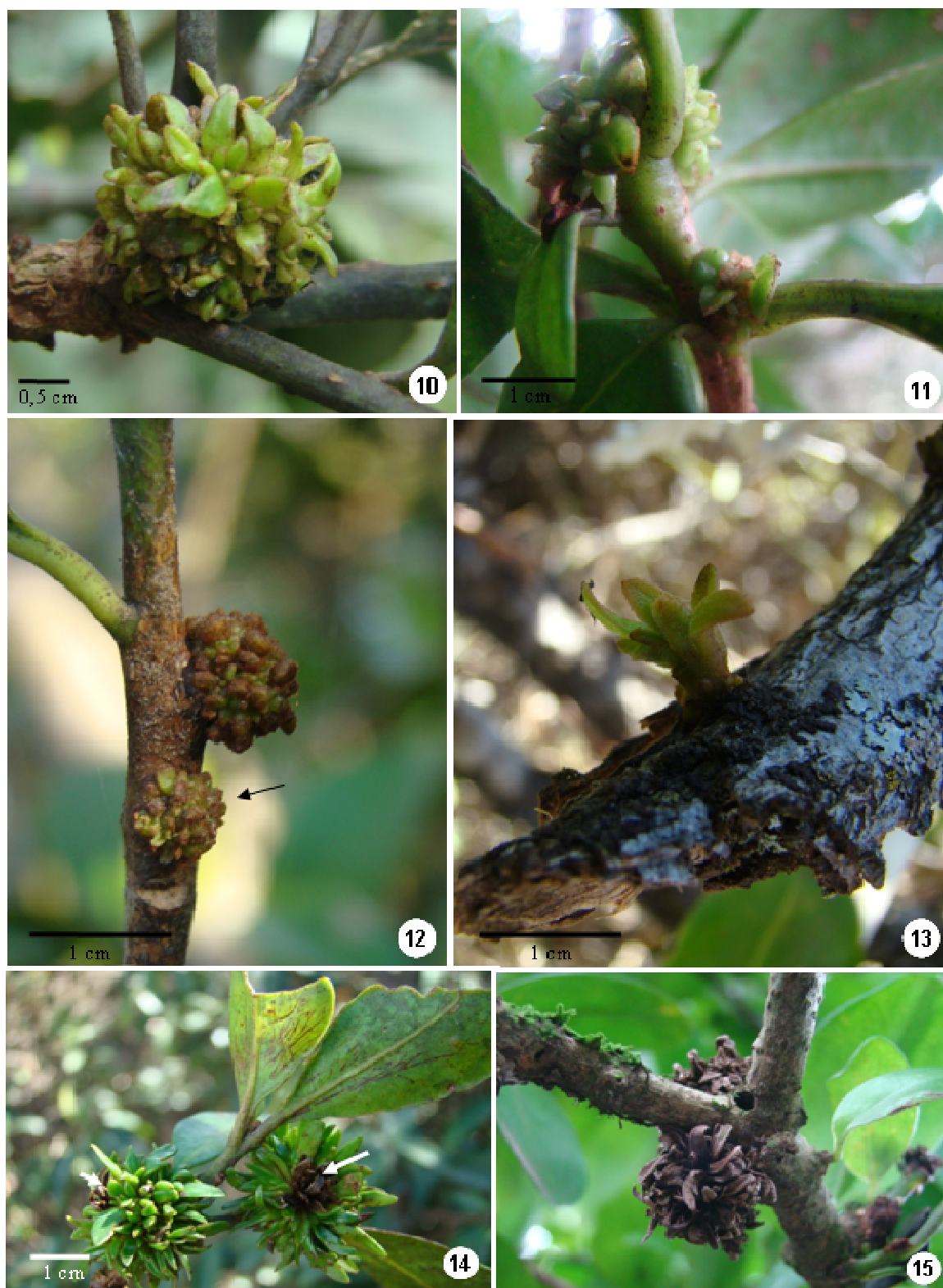
A galha senescente mantém o padrão da galha madura, exceto pelo desenvolvimento de periderme de cicatrização externa ao esclerênquima. O felogênio forma células em direção à câmara larval, destacando os tecidos internos da galha. Nessa fase, grãos de amido podem ser encontrados no córtex externo e a câmara larval encontra-se revestida pelo felema.



Figuras 1-4 . Aspectos da gema não galhada de *Guapira opposita* (Vell) Reitz. 1-3. Secções longitudinais. 4. Secção transversal do caule. 1. Meristema apical e primórdios foliares adjacentes. Camadas da túnica (C1, C2 e C3). **2.** Zoneamento do meristema. **3.** Gema apical evidenciando o alongamento de entrenós. Gema axilar em formação (seta). **4.** Vascularização da gema axilar no caule (seta). Feixes medulares. C = córtex GA = gema apical PF = primórdios foliares Pt = protoderme ZC = zona central ZCR = zona de crescimento ZP = Zona periférica

Figuras 5-9. Caracterização do caule não galhado de *Guapira opposita* Vell (Reitz) em início de crescimento secundário. Secções transversais. 5. Aspecto geral. Observar a instalação do felogênio na camada subepidérmica, córtex parenquimático, feixes medulares remanescentes do caule primário e feixes colaterais provenientes do crescimento secundário (seta). 6. Detalhe da periderme. Observar a epiderme remanescente do caule em crescimento primário, células suberificadas e felogênio. 7. Detalhe de feixes vasculares colaterais secundários inclusos às fibras produzidas pelo meristema lateral. 8. Detalhe do meristema lateral (*). Câmbio vascular (seta). 9. Detalhe do feixe vascular secundário evidenciando organização do xilema e floema. Meristema lateral (*). E = epiderme F = floema Fe = felogênio FM = feixes medulares P = periderme X = xilema.





Figuras 10-12; 14-15. Galhas gemíferas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia em *Guapira opposita*. Figura 13. Aspecto morfológico da gema não galhada. 10. Aspecto geral. 11. Ramo portando galhas gemíferas induzidas em gema apical e em gema axilar. 12. Galhas jovens. Observar a quantidade de projeções foliares comparadas a gema que se desenvolveram aproximadamente na mesma época do início de desenvolvimento da galha (figura 13). 13. Aspecto geral da gema não galhada. 14. Local de saída do indutor (seta branca). 15. Galha senescente.

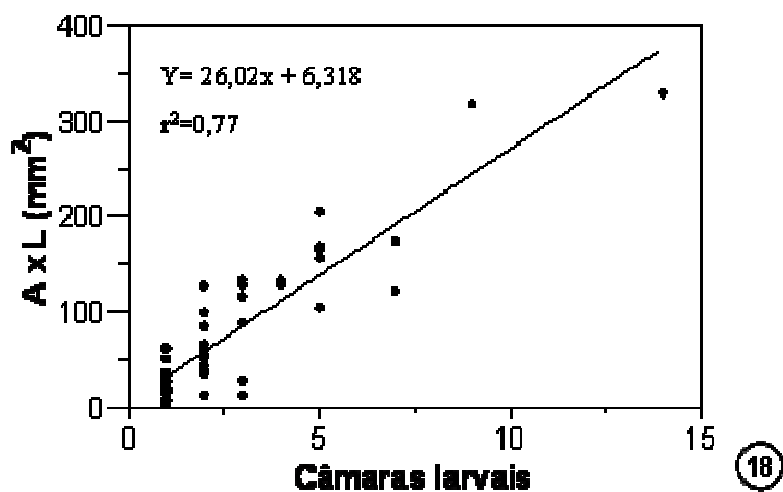
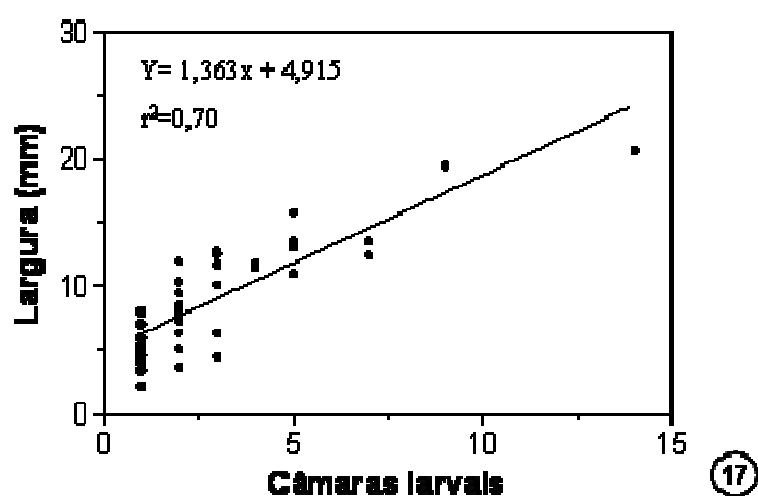
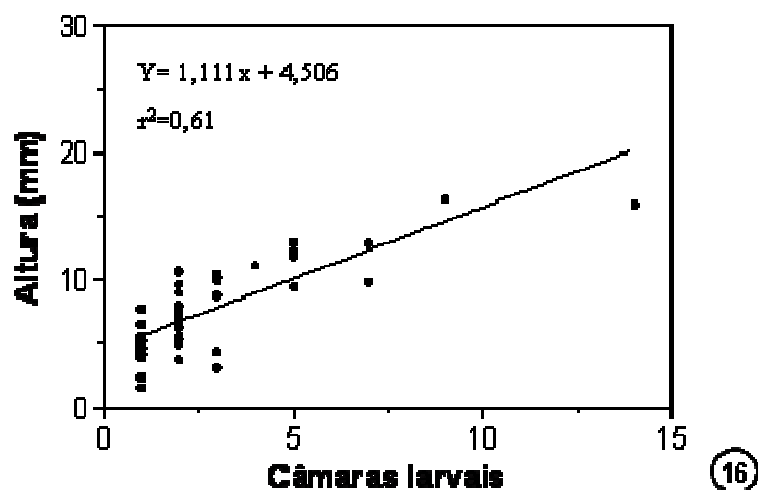
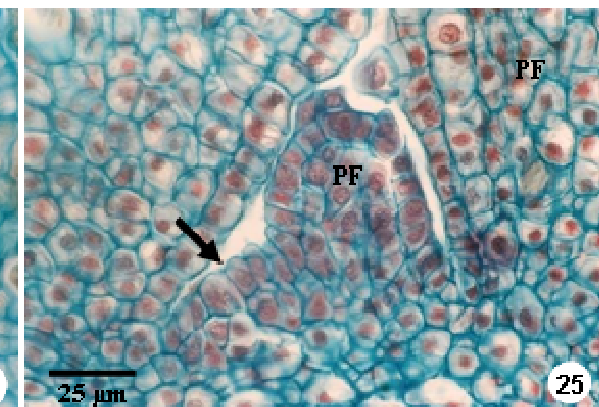
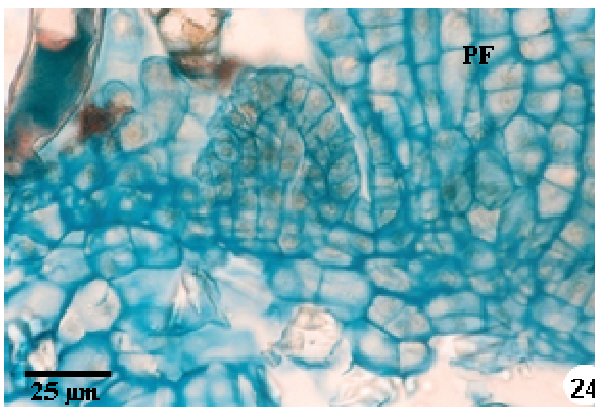
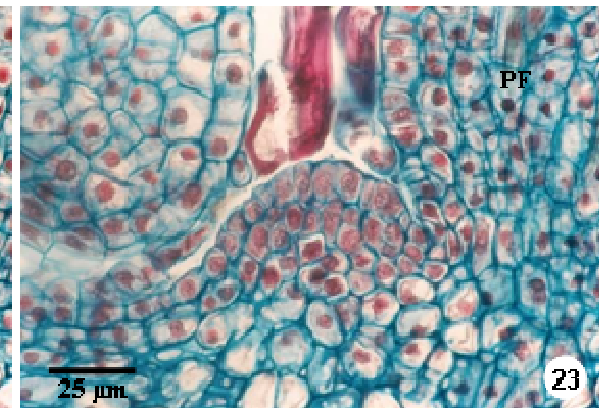
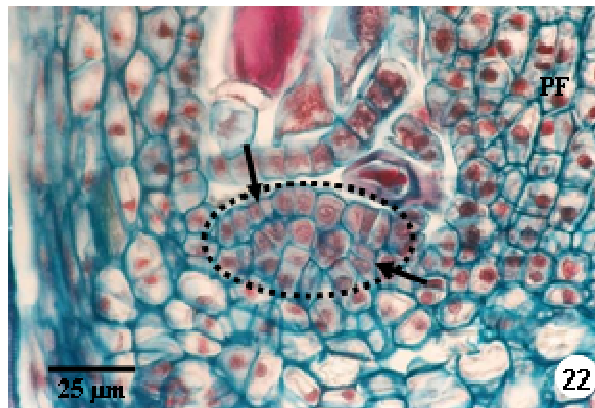
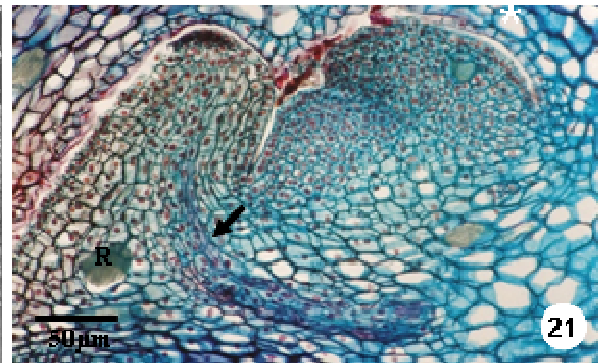
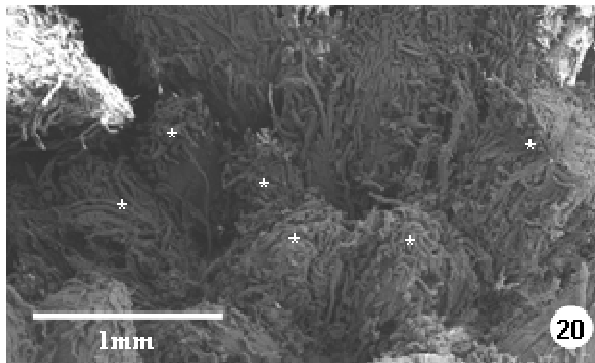
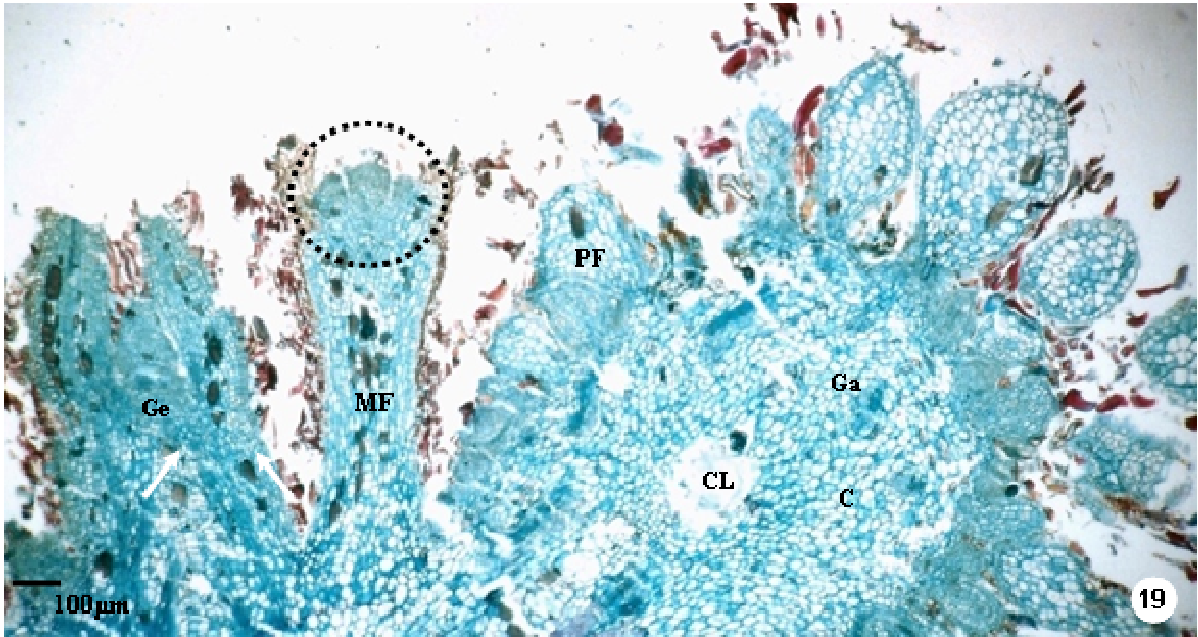
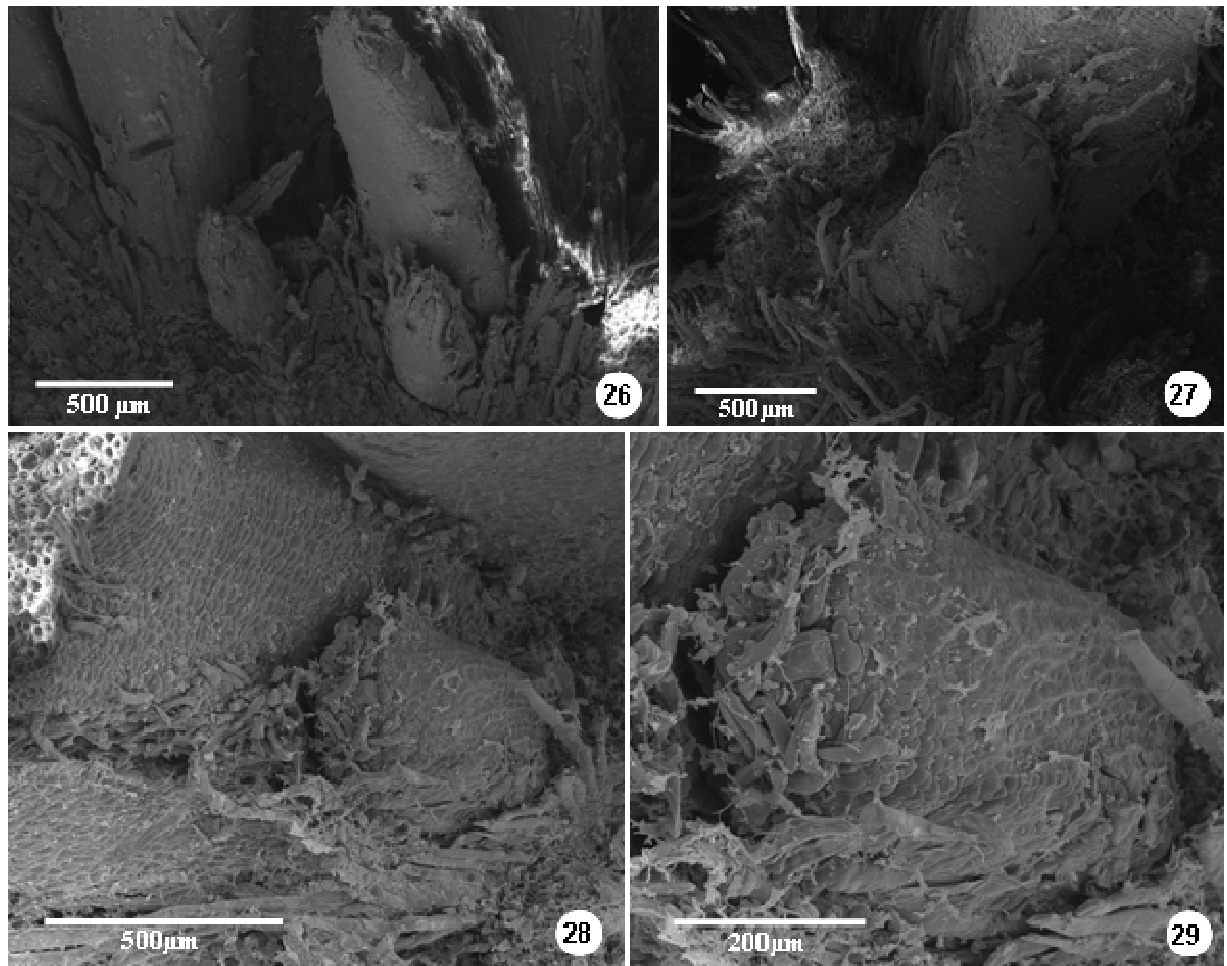


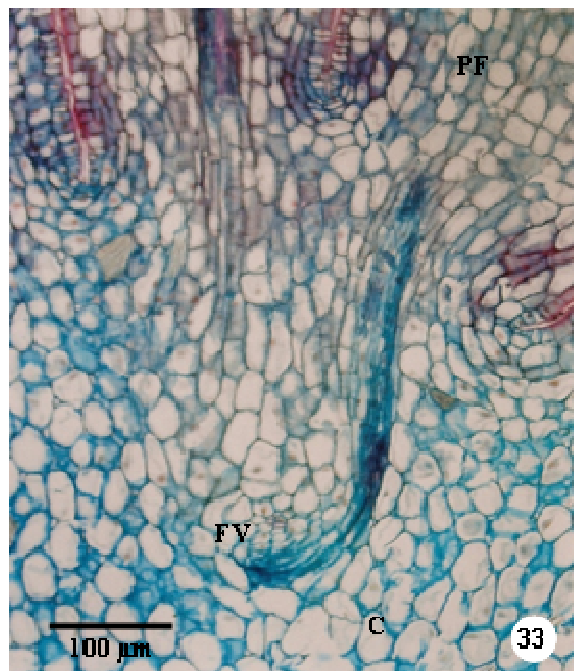
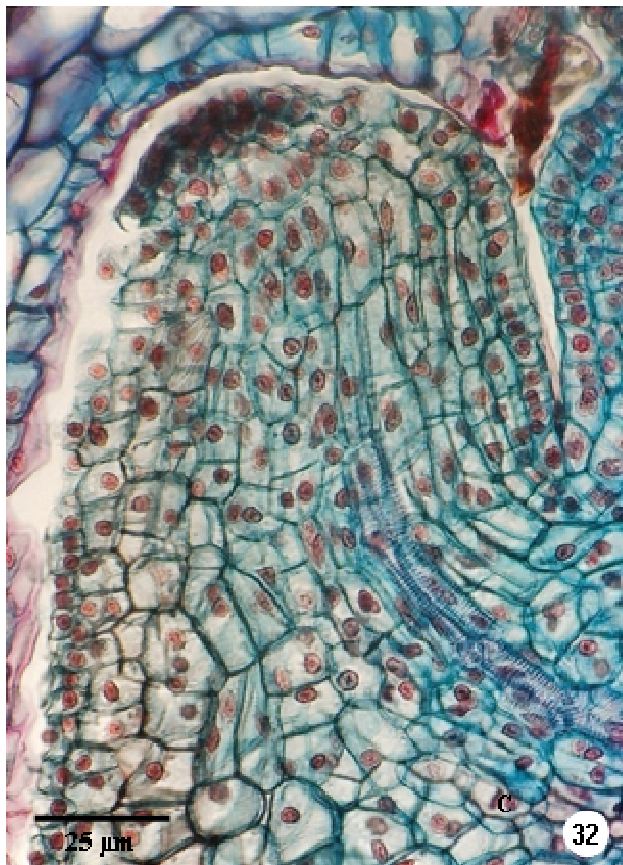
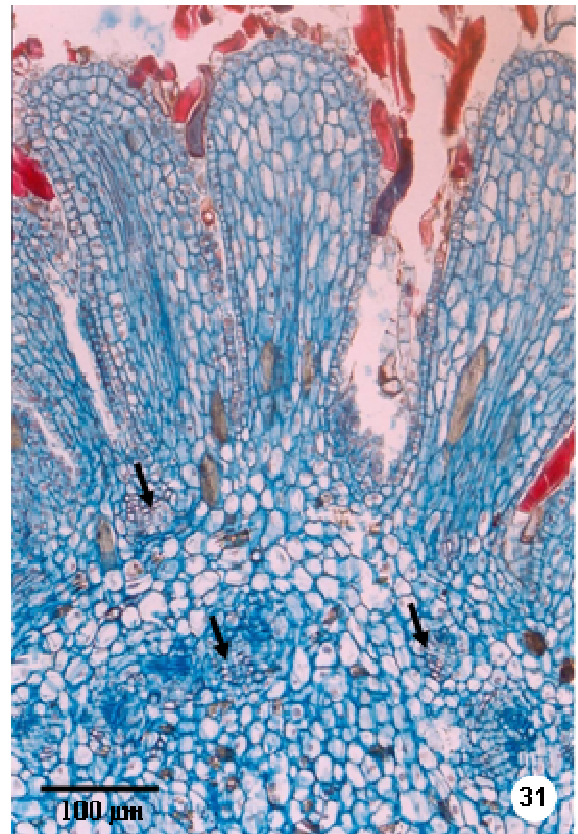
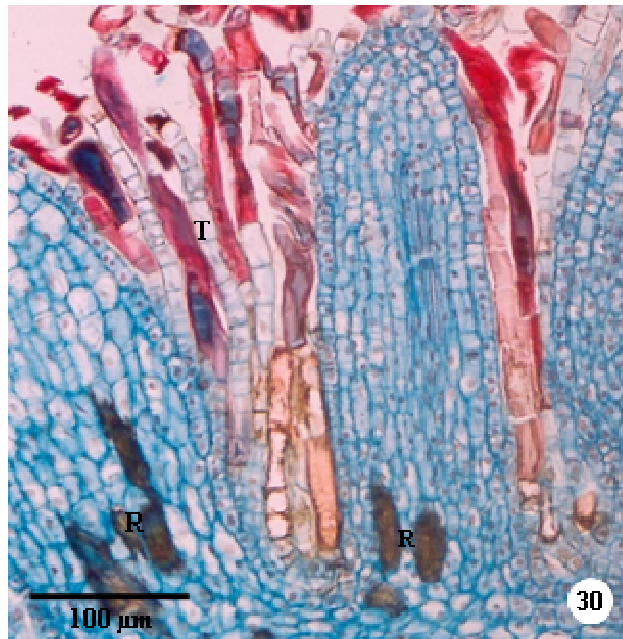
Figura 16-18. Relações o entre número de câmaras larvais e tamanho da galha.
16. Altura e número de câmaras. 17. Largura e número de câmaras. 18. Altura x
Largura e número de câmaras ($p < 0,0001$).

Figuras 19-25. Desenvolvimento das projeções foliares. **19.** Gema reprodutiva (ao centro). Três meristemas florais (pontilhado). Diferença entre o número de primórdios e o tamanho entre a gema não galhada e a galhada. **20.** Projeções foliares (*) na superfície da galha sem evidência de alongamento de entrenós em microscopia eletrônica de varredura.. **21.** Gema neoformada na galha. Atividade padrão do meristema. Par de primórdios foliares. **22.** Início das divisões anticlinais da túnica e em diferentes planos no corpo. **23.** Alongamento do eixo pelo crescimento anticlinal da protoderme e maior número de divisões no corpo. **24.** Divisões anti- e periclinais (seta) a túnica. **25.** Projeção jovem com região meristemática em sua base (seta). C= córtex, CL= câmara larval, Ga= gema galhada, Ge= gema não galhada, MF= meristema floral, PF= projeções foliares, R= ráfides.

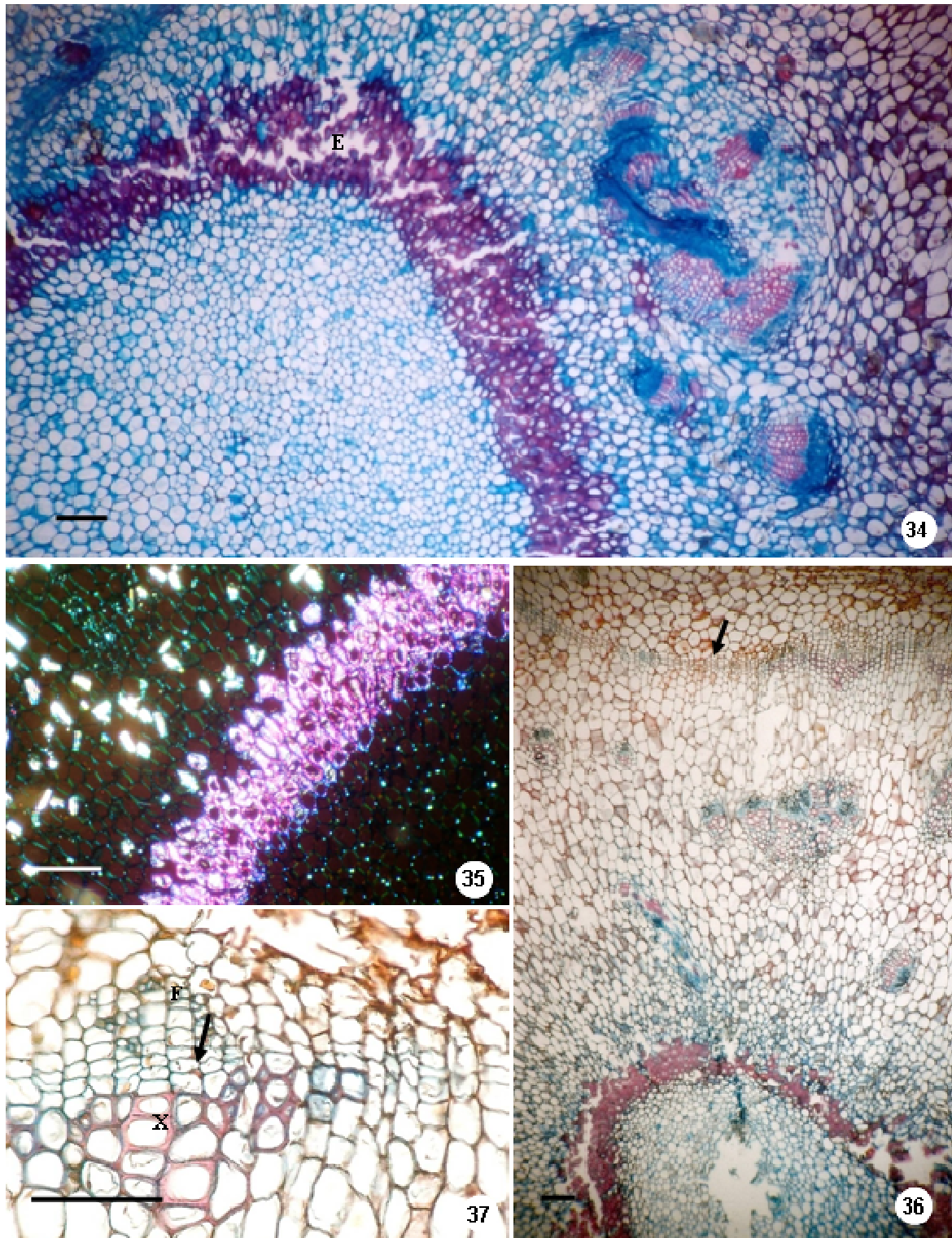




Figuras 26-29. Fotomicrografias em microscópio eletrônico de varredura. 26. Formação de dois novos primórdios nas bases das projeções foliares mais desenvolvidas. **27.** Detalhe de um dos primórdios com base envolvida por tricomas. **28.** Gema desenvolvida na base de uma projeção foliar. **29.** Detalhe da gema. Notar superfície pilosa da galha.



Figuras 30 – 33. Projeções foliares da galha de *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia em *Guapira opposita*. 30. Detalhe de projeção envolvida por tricomas glandulares. 31. Feixes vasculares neoformados no córtex da galha. 32. Primórdio foliar. Elementos traqueais diferenciados. 33. Feixe vascular ligando projeção foliar ao córtex da galha.



Figuras 34-37. Galhas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Maia & Couri em *Guapira opposita* Vell (Reitz). 34. Galha madura. Carnada de esclerênquima externa à câmara larval. 35. Cristais prismáticos no córtex externo ao anel de esclereídes e areia cristalífera no córtex interno vistos em luz polarizada. 36. Meristema lateral (seta). 37. Detalhe do câmbio vascular (seta). Formação de feixe vascular colateral de origem secundária. E = esclerênquima. F = floema. X = xilema.

Discussão

Muitos fatores afetam o estabelecimento das galhas, sendo que a escolha do hospedeiro e dos sítios de oviposição corretos é crucial e revela alto grau de especialização dos galhadores (Weis et al. 1988; Rohfritsch 1992; Raman et al. 2005). A galha de *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia, 1992 (Diptera: Cecidomyiidae) é induzida em gemas apicais ou axilares, as quais constituem bons sítios de indução (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992; Felt 2001; Price 2005), pois nestas se encontram tecidos meristemáticos responsáveis pelo crescimento indeterminado e formação do corpo primário da planta (Fahn 1990). Além disso, nessas regiões, as células são pluripotentes (Lev-Yadun 2003), com alto potencial mitótico que sob a ação do indutor podem desenvolver-se prontamente contribuindo para a formação do fenótipo da galha (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992). De fato, aproximadamente 40% das galhas de gema são induzidas por Diptera: Cecidomyiidae (Mani 1964) e apesar de não ser uma regra, esta taxa parece apresentar preferência por sítios meristemáticos na escolha da indução (Rohfritsch 1992).

As características morfológicas da galha de *P. brasiliensis* em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz apresentam muitas similaridades com as de outras galhas induzidas em gemas (Kraus et al. 2003; Julião et al. 2005) nas quais o alongamento do caule cessa e ocorre multiplicação de folhas modificadas (Weis et al. 1988; Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992). A similaridade fenotípica apresentada em galhas de gemas demonstra que o órgão hospedeiro pode determinar em algum grau o arranjo estrutural exibido pelas galhas que nele se desenvolvem conforme observado por Cornell (1983). Desta forma, mesmo sendo a galha um fenótipo estendido do galhador, este atua dentro de limites impostos pela planta ou pelo órgão hospedeiro (Weis et al. 1988). No sistema *G. opposita*-*P. brasiliensis*, a indução leva a alteração do padrão de desenvolvimento caulinar, com expressivo encurtamento de entrenós. Entretanto, a capacidade de produção de gemas e primórdios foliares do sítio de indução é potencializada, sendo, neste sistema em particular, realizada por dois tipos de atividade do meristema.

Durante a atividade padrão, os primórdios surgem nos flancos do meristema propriamente dito, mais precisamente das zonas periféricas (Barton 1998; Bowman & Eshed 2000), tal qual observado na galha de *P. brasiliensis*. Contudo, a atividade diferenciada do meristema presente nas bases das projeções foliares também ocorre. Nesta, divisões anti- e periclinais promovem a formação direta de um novo primórdio

em cuja axila forma-se uma nova gema e assim sucessivamente durante todo o desenvolvimento das galhas. Assim, não há a formação de um par de folhas, fato que resulta na perda da filotaxia e no grande aglomerado de projeções, característico do morfotipo.

A formação anômala de primórdios foliares é um fenômeno raro embora casos de origem incomum de folhas em decorrência de danos ao ápice e em culturas de tecidos tenham sido descritos (Fink 1999). Na galha estudada, as gemas dormentes localizadas na base das folhas parecem ser formadas por células remanescentes do meristema apical propriamente dito, que quando estimuladas retomam o crescimento determinado e não o padrão de crescimento indeterminado descrito por Fahn (1990). Durante a ontogênese normal, alguns meristemas podem se apresentar determinados, se diferenciando diretamente em tecidos maduros, tais como os meristemas basais dos espinhos, os meristemas intercalares das gramíneas e os meristemas florais (Kerstetter & Hake 1997; Fink 1999). Neste estudo, o meristema desenvolve-se em uma única projeção foliar, na base da qual pode surgir uma outra projeção e assim sucessivamente.

Apesar da atividade do meristema ser bastante conservativa (Byrne 2005), um grande número de mutantes demonstra que a filotaxia, a ramificação vegetativa, a produção de folhas e a manutenção da atividade do meristema apical podem ser modificadas. A totipotência e a plasticidade das células dos vegetais demonstram que a planta, sob a sinalização adequada, pode apresentar processos incomuns de desenvolvimento (Kerstetter & Hake 1997). Sendo os insetos galhadores capazes de alterar a morfogênese de tecidos e órgãos de forma coordenada (Mani 1964; Rohfritsch 1992), sugere-se que a formação dos primórdios das galhas de *P. brasiliensis* seja resultado da manipulação diferenciada de sítios meristemáticos potenciais.

A intensa formação de folhas e a alteração do padrão de atividade do meristema apical constituem as principais mudanças geradas por *P. brasiliensis* na planta hospedeira, pois via estímulo da gema axilar ou quebra da dominância apical a arquitetura do ramo caulinar é alterada. A capacidade de alterar a arquitetura vegetal pela quebra da dominância apical já foi descrita para herbívoros galhadores levando a respostas positivas ou negativas no hospedeiro (Larson & Whitham 1991; Silva *et al.* 1996).

A maximização da atividade meristemática somada a demanda energética da galha, explicaria em parte a supressão do alongamento do caule. Como as galhas são consideradas fortes drenos (Larson & Whitham 1991; Inbar *et al.* 1995) e dada a sua

localização, os recursos para a formação de primórdios foliares e para o alongamento dos entrenós seriam interceptados e redirecionados pela galha. Segundo Nyman *et al.* (2000), galhas encontradas nas partes mais centrais da planta hospedeira teriam maior controle dos fotoassimilados. Logo, a ação de *P. brasiliensis* nas gemas de *G. opposita* potencializaria um forte dreno, facilitando o aporte energético utilizado para a formação da galha com suas projeções foliares e o acúmulo de reservas para a nutrição do(s) indutor(es). A ocorrência de oviposições sucessivas nas gemas neoformadas possivelmente aumenta a força deste dreno redirecionando recursos para a formação dos tecidos da galha.

Corroborando com essa premissa, no sistema *G. opposita*-*P. brasiliensis*, o maior de número de câmaras larvais demonstrou correlação positiva com o tamanho final das galhas. Dados semelhantes foram encontrados em galhas apicais em roseta de *Solidago altissima* Linn. (Asteraceae) induzidas por *Rhopalomyia solidaginis* (Diptera: Cecidomyiidae) (Raman & Abrahamson, 1995). Muito embora esses mesmos autores afirmem que a partir de 12 câmaras larvais, a competição intraespecífica possa atuar levando a uma correlação negativa, o número de câmaras no sistema em estudo não chegou ao limite crítico capaz de gerar este tipo de competição.

Pisphondylia brasiliensis consegue induzir alterações nos sistemas de tecidos tanto mais significativas e numerosas quanto maior o número de indutores presentes na mesma gema. Nas 3 fases de desenvolvimento da galha, o sistema de revestimento apresentou epiderme unisseriada com maior densidade de tricomas glandulares e filiformes nas galhas jovens quando comparado às maduras. A densidade de tricomas em órgãos não galhados pode estar relacionada a mudanças de fases juvenis a adultas, ou ainda às condições ambientais (Fahn 1990) e à defesa contra herbivoria (Fernandes 1994; Martin & Glover 2007). Apesar de *G. opposita* possuir folhas e caules maduros glabros, a esparsa pubescência em seus órgãos quando jovens não é incomum (Furlan 1996). Deste modo, o caráter expresso na galha pode estar relacionado à manutenção da juvenilidade nos sítio de desenvolvimento destas galhas e às características inerentes à espécie hospedeira, sendo a função de defesa nas fases jovens um ganho secundário para o galhador.

O sistema fundamental da galha jovem é caracterizado por processos crescentes de hipertrofia das células e hiperplasia do parênquima, processos comuns no desenvolvimento de galhas (Mani 1964; Isaias 1998; Vecchi 2004; Oliveira *et al.* 2006), que promovem um intumescimento expressivo na gema. Em *G. opposita*, à medida que

a galha de *P. brasiliensis* amadurece, as camadas corticais mais internas se lignificam formando uma capa esclerenquimática. A presença desta capa, comum nas proximidades da câmara larval (Isaias 1998; Castro 2007; Oliveira 2007), é muitas vezes relacionada à sustentação mecânica e à defesa do galhador contra inimigos naturais (Kraus 1997). Os processos de lignificação podem ser desencadeados por estresses bióticos (ataque de patógenos) e abióticos (estresse hídrico) (Vance *et al.* 1980; Lee *et al.* 2007). Nesse sentido, a ação de formas ativas de oxigênio, como os encontrados nos metabólitos ditos de estresse (Gottlieb *et al.* 1996) influenciam a lignificação local. A indução desses metabólitos se concentra em locais de cicatrização do tecido vegetal (Gottlieb *et al.* 1996), sendo possível encontrá-los nas proximidades do tecido nutritivo onde há estresse constante pela ação alimentar dos indutores.

Grande quantidade de monocristais similares àqueles da medula do caule foi observada no córtex da galha, reforçando que características detectadas nas galhas estão comumente presentes na planta hospedeira. Os cristais são comuns em Nyctaginaceae (Solereeder 1908; Judd *et al.* 2002) e em *G. opposita* (Furlan 1996), sendo que as diferentes formas de cristais de oxalato de cálcio podem atuar na defesa contra herbivoria (Fernandes 1994) e balanço na concentração de cálcio (Franceschi & Nakata 2005). Uma grande quantidade de ráfides foi encontrada no mesofilo das projeções foliares e nas regiões meristemáticas. A presença de ráfides nos tecidos meristemáticos parece estar ligada a ausência de vacúolos para estocar níveis altos de Ca^{2+} indesejáveis na região apoplástica das células meristemáticas, cuja presença pode interferir nos processos de expansão celular. Os cristais atuam, pois como um recurso para seqüestrar o cálcio dessas regiões, permitindo que as células se desenvolvam normalmente (Nakata 2003; Franceschi & Nakata 2005). Contudo, a ausência de cristais no tecido nutritivo indica uma limitação possivelmente imposta pela atividade de alimentação do indutor, conforme descrito por Bronner (1992).

As conexões vasculares da galha com o caule são similares àquelas estabelecidas com as gemas e provêm de neoformações vasculares oriundas das projeções foliares, nas quais hormônios como a auxina têm participação ativa, como reportado por Aloni (2001). Segundo este autor, primórdios foliares em desenvolvimento são fontes primárias de auxina, que, com o transporte polar, promovem a diferenciação de tecidos vasculares desde a margem das folhas até os ápices radiculares, estabelecendo a conexão entre os órgãos. Processo similar estaria acontecendo durante o desenvolvimento da galha de *P. brasiliensis* em *G. opposita*. De fato, altos níveis de

vascularização são requisitos parciais para o estabelecimento fonte-dreno entre os órgãos vegetais (Ho 1988) e a extensão dessas conexões auxilia o estabelecimento da galha como um dreno competitivo (Larson & Witham 1991), reforçando a idéia de que a localização e as características distintas da galha de *P. brasiliensis* promovem vantagens adaptativas ao sistema.

Dentre as características observadas na galha de *P. brasiliensis*, a grande maioria se enquadra no padrão proposto por Rohfritsch (1992) para galhas de Cecidomyiidae, contudo uma característica distinta, a presença de crescimento secundário a partir do meristema lateral, se faz notar em galhas maduras coalescidas com maiores dimensões. Esse meristema, responsável pelo crescimento anômalo do caule, é representativo de Nyctaginaceae (Carlquist 2004) e sua manutenção nas galhas é importante para seu crescimento e desenvolvimento, indicando que os padrões de crescimento da estrutura estão sob controle do caule. Sendo a gema o local de indução, o crescimento da galha para o hospedeiro é similar ao do caule, corroborando a hipótese de que a galha seria um ramo encurtado.

Os processos ontogênicos responsáveis pelo tamanho da galha de *P. brasiliensis* em *G. opposita* dependem primariamente do número de oviposições realizadas pelas fêmeas nas gemas apicais ou axilares do eixo vegetativo, ou ainda, nas gemas neoformadas na galha. Estas gemas apresentam dois padrões de atividade meristemática que diferenciam o grande número de projeções foliares que caracterizam o fenótipo deste sistema. Em galhas com maior número de câmaras, o meristema lateral é ativado incrementando os tecidos de preenchimento, reserva e vascular.

O presente estudo confirma a hipótese de que a galha gemífera de *G. opposita* decorre de um encurtamento de entrenós e maximização da diferenciação de gemas. Além disso, sua forma final é influenciada tanto pelas atividades dos meristemas primários quanto do lateral.

A escolha das gemas como sítio de oviposição pode conferir vantagens ao indutor, pois há formação de inúmeras projeções foliares através da atividade diferenciada de meristema presente nas gemas apicais/axilares e nas bases das projeções foliares. Estas últimas são órgãos potencialmente fotossintetizantes. Estudos fisiológicos complementares comparando as projeções foliares e as folhas não galhadas podem elucidar sua importância na manutenção do sistema *P. brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae) – *G. opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae).

Referências Bibliográficas

- Aloni, R.** 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *J. Plant Growth Regul.*20:22-34.
- Barton, M.K.** 1998. Cell type specification and self renewal in the vegetative shoot apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology* 1:37-42.
- Bissing, D. R.** 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain technology* 49:116-117.
- Bowman, J.L. & Eshed, Y.** Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science* 5(3): 110-115.
- Bronner, R.** 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.). *Biology of Insect-induced galls. Oxford University Press, New York.* pp.118-140.
- Bukatsch, F.** 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61 (8):255.
- Byrne, M.E.** 2005. Networks in leaf development. *Current Opinion in Plant Biology* 8:59-66.
- Carlquist, S.** 2004. Lateral meristems, successive cambia and their products: a reinterpretation based on roots and stems of Nyctaginaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 146:129-143.
- Castro, A.C.R.** 2007. Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.* 72p.
- Cornell, H.V.** 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cinipinae (Hymenoptera): why and how? *Oikos* 79:6-25.
- Couri, M.S. & Maia, V.C.** 1992. Considerações sobre *Pisphondylia* Möhn, 1960 (Diptera, Cecidomyiidae, Asphondyliidi), com descrição de uma espécie nova do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia.* 36(4): 729-730.
- Dawkins, R.** 1982. The extended phenotype: The gene as the unit of selection. *Oxford University Press, Oxford, UK*
- Dreger-Jauffret, F. & Shorthouse, J.D.**1992. Diversity of gall-inducing insects and their galls. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.). *Biology of Insect-induced galls. Oxford University Press, New York.* pp.8-33.

- Fahn, A.** 1990. Plant Anatomy. *Pergamon Press*, Oxford. 588 p.
- Felt, E.P.** 2001. Plant Galls and Galls Makers. *Agrobios (India)*. 364p.
- Fernandes, W.G.** 1994. Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Revista Brasileira de Entomologia* 38(2):421-433.
- Fink, S.** 1999. Pathological and Regenerative Plant Anatomy. *Gebrüder Borntraeger*, Berlin. 1096p.
- Furlan, A.** 1996. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. Tese de doutorado. *Instituto de Biociências*, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Franceschi, V.R. & Nakata, P.A.** 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review Plant Biology* 56:41-71.
- Gagné, R.** 2004. A catalog of the Cecidomyiidae (diptera) of the world. *Memoirs of the entomological Society of Washington* 25: 1- 408.
- Gottlieb, O.R.; Kaplan, M.A.C. & Borin, M.R.M.B.** 1996. Biodiversidade: Um enfoque químico-biológico. *Ed. UFRJ*, Rio de Janeiro. 268p.
- Hartley, S.E.** 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113: 492-501.
- Ho, L.C.** 1988. Metabolism and compartmentation of import sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 39: 355-378.
- Inbar, M., Eshel & A. Wool, D.** 1995. Interspecific competition among phloem-feeding insects mediated by induced host-plant sinks. *Ecology* 76(5):1506-1515.
- Isaias, R.M.S.** 1998. Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Pappilonoideae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. *Universidade de São Paulo*, São Paulo. 205p.
- Johansen, D.A.** 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book. New York.
- Judd, W. S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J.** 2002. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. *Sinauer Associates Publishers*, Massachusetts. 576p.
- Julião, G.R.; Fernandes, G.W.; Negreiros, D.; Bedê, L. & Araújo, R.C.** 2005. Insetos galhadores associados a duas espécies invasoras de áreas urbanas e peri-urbanas. *Revista Brasileira de Entomologia* 49(1):97-106.
- Karnovsky, M.J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.

- Kerstetter, R.A. & Hake, S.** 1997. Shoot Meristem formation in Vegetative development. *The Plant Cell* 9: 1001-1010.
- Kraus, J.E.** 1997. Respostas morfogênicas de plantas a indutores galhadores. *In:* Araújo, M.C.P.; Coelho, G.C. & Medeiros, L. (eds.). Interações ecológicas e biodiversidade. *Ed. UNIJUÍ, Ijuí*, p.59-75.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual Básico de métodos em morfologia vegetal. *Seropédica: EDUR*. 198pp.
- Kraus, J.E.; Solórzano Filho, J.A.; Arduin, M. & Isaias, R.M.S.** 1994. Respostas morfogênicas de plantas brasileiras a insetos galhadores. *In:* Proceedings of the VI Congreso Latinoamericano de Botânica Mar del Plate, Argentina.(eds. Bacigalupo, N. Fortunato, R.) *Missouri Botanical Garden Press, St. Louis*.
- Kraus, J.E., Isaias, R.M.S. & Fernandes, G.W.** 2003. Structure of insect galls on two sympatric subspecies of *Chrysothamus nauseosus* (Pall. Ex Pursh) Britton (Asteraceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21(2):251-263.
- Larson, K.C. & Whitham T.G.** 1991. Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia* 88:15-21.
- Lee, B.; Kim, K.; Jung, W.; Avicé, J.; Ourry, A. & Kim, T.** 2007. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.) *Journal of Experimental Botany*. 58(6):1271-1279.
- Lev-Yadun, S.** 2003 Stem cells in plant are differentiated too. *Current Topics in Plant Biology* 4:93-102.
- Maia, V.C.; Magenta, M.A.G. & Martins, S.E.** 2008. Ocorrência e caracterização de galhas de insetos em áreas de restinga de Bertioga (São Paulo, Brasil). *Biota Neotropica* 8(1):167-197.
- Mani, M.S.** 1964. Ecology of plant galls. *The Hague: Junk*. 434p.
- Martin, C. & Glover, B.J.** 2007. Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Current Opinion in Plant Biology* 10:70-82.
- Mendonça, M.S. Jr.** 2007. Plant diversity and galling arthropod diversity searching for taxonomic patterns in an animal-plant interaction in the neotropics. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 42 (3-4): 347-357.
- Nakata, P.A.** 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164:901-909.

- Nyman, T.** 2000. Phylogeny and ecological evolution of gall-inducing sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). PhD Dissertations in Biology. Vol.6. *University of Joensuu*
- Nyman, T.; Widmer, A. & Roininen, H.** 2000. Evolution of gall morphology and host-plant relationships in Willow-feeding sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Evolution* 54(2):526-533.
- Oliveira, D.C.** 2007. Relações entre ontogenia foliar e idade dos tecidos para o valor adaptativo de galhas em *Copaifera langsdorff* Desf. (Fabaceae). Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais*. 77p.
- Oliveira, D.C.; Christiano, J.C.S.; Soares, G.L.S; Isaias, R.M.S.** 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hass. (fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera, Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica*. 29(4): 657-667
- Paiva, J.G.A.** Verniz vitral incolor 500[®] : uma alternative de meio de montagem economicamente viável. 2006. *Acta botanica brasílica* 20(2):257-264.
- Price, P. W.** 2005. Adaptive radiation of gall-inducing insects. *Basic and Applied Ecology* 6:413-421.
- Raman, A.** 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92(6): 748-757.
- Raman, A. & Abrahamson, W.G.** 1995. Morphometric relationships and energy allocation in the apical rosette galls of *Solidago altissima* (Asteraceae) induced by *Rhopalomyia solidaginis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Environmental Entomology* 24 (3):635- 639.
- Raman, A.; Schaefer, C.W. & Withers, T.M.** 2005. Galls and gall-induced arthropods: An overview of their biology, ecology, and evolution. In: Raman, A.; Schaefer, C.W.; Withers, T.M. (eds.). *Biology, Ecology, and evolution of gall-inducing arthropods. New Hampshire: Science Publishers, Inc.* (1) : 1-33.
New Hampshire: Science Publishers, Inc. pp 1-33.
- Redfern M. & Askew R.R.** 1992. Plant galls. *Richmond Publishing Co Ltd*.97p.
- Rodrigues, C.; Jahnke, S.M. & Mendonça, M. de S., Jr.** 2007. Sazonalidade de galhadores sobre *Guapira Opposita* (Nyctaginaceae) no Morro Santana, Porto Alegre, RS. In: VIII Congresso Brasileiro de Ecologia, Caxambu, MG.

- Rohfritsch, O.** 1992. Patterns in gall development. *In*: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.). *Biology of Insect-induced galls*. Oxford University Press, New York. pp.60-86.
- Silva, I.M.; Andrade, G.I.; Fernandes, G.W; Filho, J.P.L.** 1996. Parasitic relationships a gall-forming insect *Tomoplagia Rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its host plant *Vernonia polyanthes* (Asteraceae). *Annals of Botany* 78:45.
- Solereder, H.** 1908. Systematic anatomy of the Dicotyledons. v. 2. *Oxford at the Clarendon Press*.
- Stone, G.N. & Schönrogge, K.** 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18(10):512-522.
- Vance, CP.; Kirki, TK.; Sherwood, RT.** 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phitopathology*. 18:259-288
- Vecchi,C.** 2004. Reações diferenciais à herbívoros em espécies de Melastomaceae. 113f. Tese (doutorado em Biologia Vegetal) – *Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - Departamento de Botânica, São Paulo*.
- Weis, A.E.; Walton, R. & Crego, C.L.** 1988. Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Reviews in Entomology* 33: 467- 486

Relações estruturais e fotossintéticas no sistema
***Pisphondylia brasiliensis*, Couri & Maia 1992**
(Cecidomyiidae) - *Guapira opposita* (Vell.) Reitz
(Nyctaginaceae)

Relações estruturais e fotossintéticas no sistema *Pisphondylia brasiliensis*, Couri & Maia 1992 (Cecidomyiidae) - *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae)

Resumo

Galhas induzidas em gemas são reconhecidas por apresentarem indumentos de aspectos variados, referidos muitas vezes como folhas rudimentares ou mal-formadas. Galhas gemíferas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992 (Diptera:Cecidomyiidae) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz apresentam projeções foliares originadas a partir de gemas neoformadas. Sendo assim, espera-se que estas projeções possuam organização anatômica e comportamento fisiológico similar àquela das folhas padrão da espécie, sendo, portanto órgãos fotossintetizantes funcionais capazes de auxiliar na manutenção do sistema. De modo a testar esta hipótese, análises da anatomia foliar, condutância estomática estimada, teor de pigmentos e fluorescência da clorofila *a* na folha não galhada e nas projeções da galha foram realizadas. As projeções foliares da galha são hipostomáticas e possuem mesofilo dorsiventral tal quais as folhas não galhadas. Apesar dos valores de condutância estomática não terem variado entre as amostras, as projeções apresentaram menor teor de clorofilas e menores taxas de fotossíntese, avaliadas em termos dos rendimentos quânticos potencial e efetivo. Contudo, a grande densidade de projeções pode conferir aumentos compensatórios à fotossíntese na galha.

Palavras-chave: Galhas, Cecidomyiidae, projeções foliares, condutância estomática estimada, pigmentos, fluorescência da clorofila *a*.

Structural and photosynthetic relationships in *Pisphondylia brasiliensis*, Couri & Maia 1992 (Cecidomyiidae) - *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) gall system

Abstract

Bud galls are recognized for presenting various indumental features, such as rudimentary or misformed leaves. The leaf projections of the bud galls induced by *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia 1992 (Diptera: Cecidomyiidae) in *Guapira opposita* (Vell.) Reitz are differentiated from new formed buds. Therefore, it is expected that their anatomical organization and physiological behavior are similar to those of non galled leaves, and so are capable of photosynthesizing and assisting on the maintenance of the system. To test this hypothesis, leaf anatomy, estimated stomatal conductance, pigment content and chlorophyll fluorescence in non galled leaves and gall leaf projections were evaluated. Non galled leaves are hypostomatic with dorsiventral mesophyll, and so are the leaf gall projections. Despite the similarity on stomatal conductance with non galled leaves, the projections have lower levels of chlorophylls and photosynthesis, measured in terms of income and effective quantum potential. However, the high density of leaf gall projections may provide a compensatory increase in gall photosynthesis.

Key words: Galls, Cecidomyiidae, leaf projections, estimated stomatal conductance, pigments, chlorophyll *a* fluorescence.

Introdução

Herbívoros galhadores manipulam a morfogênese dos tecidos atacados (Isaias 1998; Oliveira 2007; Moura *et al.* 2008) de modo que as características morfológicas, anatômicas e histoquímicas geradas na galha garantam-lhes abrigo, alimento e proteção contra inimigos naturais (Mani 1964; Bronner 1992; Stone & Schonrörogge 2003). Este processo altera o funcionamento do órgão hospedeiro influenciando, mesmo que localmente, a arquitetura, a reprodução (Silva *et al.* 1996) e aspectos da fisiologia do vegetal (Larson 1998; Aldea *et al.* 2006; Raman *et al.* 2006).

Nas folhas, a formação das galhas além de ocasionar modificações estruturais no tecido clorofiliano, altera também parâmetros fotossintéticos como a quantidade pigmentos (Yang *et al.* 2003; Castro 2007; Yang *et al.* 2007), aumento ou decréscimo da condutância estomática (Florentine *et al.* 2005; Lemos-Filho *et al.* 2007; Nabity *et al.* 2008) e até mesmo mudanças significativas no potencial fotossintético, avaliados em termos de danos ao fotossistema II (Aldea *et al.* 2006). Em galhas caulinares, registros de aumentos compensatórios nas taxas de fotossíntese das folhas sadias adjacentes, com redirecionamento do uso dos fotoassimilados produzidos para manutenção da galha, demonstram que esta age como um verdadeiro dreno (Fay *et al.* 1996).

As relações fonte-dreno são processos críticos no desenvolvimento das galhas (MacCrea *et al.* 1985; Larson & Whitham 1997) e são regidas por diversos fatores, tais como a distância e o nível de conexões vasculares existentes entre a fonte e o dreno, e a fase de desenvolvimento do dreno, conferida pela sua atividade metabólica (Ho 1988; Taiz & Zeiger 2004). Meristemas laterais, gemas em desenvolvimento, folhas jovens e raízes são considerados drenos competitivos (Ho 1988). Galhas localizadas nestes órgãos (Weis *et al.* 1988) ou que estão situadas em locais privilegiados na interceptação do fluxo de nutrientes são mais eficientes na manutenção do sistema (Nyman 2000). Logo, podem alterar o padrão de translocação do floema, estabelecendo-se como drenos adicionais e altamente competitivos (Mani 1964; MacCrea *et al.* 1985; Larson & Whitham 1991; Inbar *et al.* 1995).

Os herbívoros galhadores podem se alimentar diretamente da seiva ou promover a translocação de nutrientes para os tecidos nutritivos que circundam a câmara onde se desenvolvem (Bronner 1992), sendo que o redirecionamento dos fotoassimilados está relacionado tanto à nutrição do galhador quanto ao desenvolvimento da própria galha (Hartley 1998; Oliveira *et al.* 2006). Dessa forma, o estabelecimento da galha como

dreno competitivo e a garantia do seu suprimento de fotoassimilados são primordiais para o desenvolvimento da espécie indutora, sendo que possíveis aumentos compensatórios nas taxas fotossintéticas do órgão hospedeiro ou dos órgãos próximos à galha podem conferir vantagens adaptativas ao inseto galhador (Hartley 1998).

Galhas induzidas em gemas frequentemente apresentam similaridade morfológica, na qual o desenvolvimento do caule é suprimido e a galha é revestida por projeções que variam desde folhas rudimentares (Mani 1964) a emergências diversas (Vecchi 2004). Poucos estudos avaliaram as características dessas projeções ou emergências (Kraus *et al.* 2003; Vecchi 2004), sendo que não foram encontrados na literatura dados sobre a possibilidade destes órgãos serem fotossintetizantes.

Galhas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* (Cecidomyiidae) em gemas de *Guapira opposita* (Nyctaginaceae) se caracterizam por grande número de projeções foliares superficiais. A indução desta galha causa alterações na arquitetura vegetal, gerando um encurtamento de entrenós (*cf.* Fleury 2009, capítulo 2).

O presente estudo pretende testar se essas projeções são folhas verdadeiras, com aparato anatômico funcional e capacidade fotossintética similar ou superior àquela das folhas não galhadas da espécie vegetal hospedeira. Partindo do pressuposto que herbívoros galhadores drenam recursos de fontes próximas ao sítio de indução, poderia a galha de *P. brasiliensis* ser fonte e dreno de seus próprios recursos?

Materiais e Métodos

Área de estudo

Galhas gemíferas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia, 1992 (Cecidomyiidae) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) foram coletadas na Serra da Calçada (“020°04’714” W e 043°59’611” S), município de Brumadinho, Minas Gerais, Brasil. O local é constituído por diversos tipos vegetacionais, dentre os quais se destacam matas de galeria, capões de mata, campos rupestres sobre quartzito e campos rupestres sobre canga (Viana & Lombardi 2007). Na área de coleta, predominam as cangas que representam depósitos hematíticos superficiais, pertencentes ao Quadrilátero Ferrífero (Jacobi *et al.* 2007). *Guapira opposita* ocorre com frequência na área e encontra-se distribuída nas margens dos capões de mata em área de canga (fig. 1). Um

espécime testemunho do material coletado foi incluído no acervo do herbário do Departamento de Botânica, ICB – UFMG (BHCB – 124.204).

Análises estruturais

Para o cálculo do número de projeções foliares por galha, seis galhas maduras foram selecionadas e as projeções contadas manualmente. Para as medidas da área foliar foram escolhidos aleatoriamente seis indivíduos, dos quais cinco folhas não galhadas totalmente expandidas e cinco projeções das galhas foram coletadas (n de folhas = 30). As áreas foliares foram obtidas a partir de folhas escaneadas e analisadas através do programa EasyQuantify – Quantikov Image Analyzer 1992-2001[®] (Pinto 1996).

Para a produção de cortes histológicos, folhas não galhadas totalmente expandidas (3^o ao 5^o nó) e projeções da galha foram selecionadas aleatoriamente de cinco indivíduos (n de folhas \geq 30). O material foi fixado em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50%, ácido acético, 1:1:18, v/v) por 24 - 48 horas (Johansen 1940) e estocado em etanol 70%. Lâminas semipermanentes foram preparadas com secções transversais do material à mão livre com auxílio de lâmina de barbear em suporte de isopor. As secções foram clarificadas em hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com a mistura de azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%). Para a preparação de lâminas permanentes, o material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940) e incluído em Paraplast[®] (Kraus & Arduin 1997). Cortes transversais das folhas e projeções das galhas (10-14 μ m) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica[®] 2035 BIOCUT). Os cortes histológicos foram afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing 1974). Após a retirada do Paraplast[®] com acetato de butila a 45°C, em banho maria, as amostras foram desidratadas em série etílica e coradas com a mistura de azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%).

Fragmentos de 0,25 cm² da porção mediana de 3 folhas não galhadas e 3 projeções das galhas de 5 indivíduos foram acondicionados separadamente em placas de Petri com hipoclorito de sódio 50% por 24-48 horas para o destacamento da epiderme. O material foi lavado em água destilada, corado com safranina 1% e diferenciado em etanol 50% (Johansen 1940).

Lâminas semipermanentes com os cortes histológicos feitos à mão livre e fragmentos epidérmicos foram montadas com gelatina glicerinada de Kaiser (Kraus &

Arduin 1997) e as lâminas permanentes com verniz vitral incolor Acrilex® (Paiva 2006).

A espessura da epiderme na face abaxial e adaxial da folha e dos tecidos do mesofilo de folhas não galhadas e projeções da galha foi obtida através de imagens das seções transversais capturadas com câmera digital (Motic CAM 350®) acoplada ao microscópio (Olympus BH-S) com auxílio do software Motic Image Plus®. Foram utilizadas a média de três repetições em três folhas não galhadas e em projeções de cinco indivíduos (n=15).

A densidade de estômatos (n^{st}) por mm^2 foi calculada através de imagens obtidas em câmara clara (CH3-TR45) acoplada ao microscópio óptico (Olympus CH-30). Foram contados, o número de células epidérmicas e o número de estômatos em áreas com $0,04 mm^2$ (n = 45 campos).

Desenhos da profundidade, da largura e do comprimento do poro estomático (n = 45 estômatos) foram realizados através de imagens obtidas em câmara clara (CH3-TR45) acoplada ao microscópio óptico (Olympus CH-30) a partir de lâminas com cortes transversais e fragmentos epidérmicos, respectivamente. As imagens foram escaneadas e as medidas realizadas através do software EasyQuantify – Quantikov Image Analyzer 1992-2001® (Pinto 1996). A área (a^{st}) do poro foi obtida através da fórmula da elipse, sendo

$$A^{st} = \pi r_1 r_2$$

sendo $\pi = 3,14$; r_1 =raio da largura do poro; r_2 =raio do comprimento do poro. A área ocupada pelos poros estomáticos em $1 mm^2$ de área foliar (na_{st}) foi expressa em porcentagem e calculada multiplicando-se os valores médios do poro estomático (A_{st}) pela densidade estomática (n_{st}).

Condutância estomática

A condutância estomática foi estimada (gl^{st}) a partir de parâmetros anatômicos aplicando a seguinte fórmula:

$$gl^{st} = D n a^{st} (\delta^{st} + r^{st})^{-1}$$

onde $D = 2,4 \cdot 10^{-5} m^2 \cdot s^{-1}$ é o coeficiente de difusão da água a $20^\circ C$, n é o número de estômatos por unidade de área, a^{st} , r^{st} e δ^{st} são, respectivamente, a área, o raio e a profundidade do poro estomático (Nobel 1999).

Dosagem de clorofilas

Foram preparadas 30 amostras de folhas não galhadas contendo cinco discos de 1cm^2 com peso conhecido, coletados aleatoriamente de 10 indivíduos. Devido ao tamanho diminuto das projeções da galha, as 30 amostras com cinco projeções cada, de peso conhecido, foram coletadas aleatoriamente de 10 galhas. A extração das clorofilas foi realizada em acetona 80% seguida da maceração do material, centrifugação e quantificação segundo as equações propostas por Lichtenthaler & Wallburn (1983).

Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada nas folhas não galhadas e projeções das galhas de cinco indivíduos de *G. opposita* utilizando-se um medidor de fluorescência modulada (MINI-PAM, Waltz). As medições das folhas sadias foram pareadas com as medições das projeções de galhas coexistentes em um mesmo indivíduo, possibilitando dessa forma a aquisição de respostas sistêmicas comparativas (Aldea *et al.* 2006). Os valores de rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m) foram obtidos no *predawn* e ao longo do dia (duas em duas horas, após aclimatação ao escuro por 30 min.), onde F_v é a fluorescência máxima variável e F_m é a fluorescência máxima da clorofila na amostra adaptada ao escuro sob um pulso saturante de luz. Avaliações da performance diária do rendimento quântico efetivo do PSII foram realizadas durante o curso de um dia com intervalos de duas em duas horas. O rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$) foi determinado conforme Genty *et al.* (1989) através da fórmula:

$$\Delta F/F'm = (F'm - F)/F'm$$

onde F é a fluorescência da clorofila na amostra adaptada à luz e $F'm$ a máxima fluorescência da amostra à luz, com o pulso saturante. Todas as medições foram realizadas em 20 de abril de 2008, no final da estação chuvosa.

Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa JMP (SAS Institute, US, 1989-2002). Foram feitos testes de normalidade e homogeneidade. Quando necessário, as variáveis sofreram transformação logarítmica e radicial para a normalização. Para os dados normais e homogêneos, foram aplicados testes ANOVA/t-Student, e para os demais dados foram aplicados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (Sall 2002).

Resultados e Discussão

Folha não galhada x Projeção foliar

As folhas são opostas cruzadas (fig. 2) e apresentaram área média de $1193 \text{ mm}^2 \pm 358$ (tab. 1), valor abaixo do descrito por Fermino (2004) para indivíduos de *Guapira opposita* de restinga. Devido à expressiva plasticidade fenotípica que *G. opposita* possui, variações no tamanho da folha são esperadas (Furlan 1996), sendo as características ambientais da área onde os indivíduos se encontram um fator determinante para este caráter. As espécies desse estudo se localizam em capões de mata associados a afloramentos hematíticos (canga). As cangas possuem altos níveis de metais pesados no solo, grande intensidade luminosa, variação ampla na temperatura ao longo do dia e baixa umidade relativa do ar (Viana & Lombardi 2007; Jacobi *et al.* 2007; Scarano 2007), assim, características xeromórficas são comuns nas plantas destas áreas com condições ambientais estressantes, sendo um dos parâmetros conhecidos o nanismo (Jacobi *et al.* 2007).

Diferentemente das folhas dos ramos não galhados, as projeções foliares formadas na galha não apresentaram filotaxia regular (*cf.* Fleury 2009, cap. 2). A área média destas projeções foi de $16,01 \pm 6,0 \text{ mm}^2$ (tab. 1), o que demonstra uma redução de 98,6% quando comparada à folha padrão (fig. 3). Alterações na área do limbo frente a ação de herbívoros galhadores na região neotropical foram documentadas por Gonçalves *et al.* (2005) e Castro (2007).

Tabela 1 - Área foliar, número de estômatos por mm² de área foliar, área do poro estomático (A_{st}), porcentagem da folha ocupada pelo poro estomático (n_{st}a_{st}) e condutância estomática (g_{st}) de folhas não galhadas e projeções foliares da galha de *P. brasiliensis* Maia, 1992 (Diptera-Cecidomyiidae) em *G. opposita* (Vell.) Reitz, Serra da Calçada-MG.

Órgão	Área foliar (mm ²)	n _{st} (estômatos mm ⁻²)	a _{st} (μm ²)	n _{st} a _{st} (%)	g _{st} (mmol m ⁻² s ⁻¹)
Folha não galhada	1193a	147 a ±29	72,52a ±29,03	0,009a 0,002	364,08a ±141,12
Projeção foliar	16,01b	86 b ±22	118,82b ±41,04	0,010a ±0,003	338,79a ±104,67

Resultados acompanhados de letras iguais não diferem significativamente. (N=45; p=0,05)

Muito embora esses estudos tenham sido realizados em galhas foliares, a indução de galhas em gemas comumente leva a diferenciação de folhas e neoformações numerosas e diminutas (Mani 1964; Vecchi 2004). A redução expressiva no limbo das projeções foliares observada nesse estudo pode ser resultado da grande produção de folhas em um curto espaço de tempo (*cf.* Fleury 2009, cap. 2) e/ou da demanda energética gerada pelos próprios primórdios da galha em formação. No início do desenvolvimento, o estímulo do indutor gera o crescimento da galha e a produção potencializada de primórdios foliares formando projeções foliares (*cf.* Fleury 2009, cap. 2) que variam de 320 a 1100 por galha. A formação dessas estruturas é baseada em divisões e diferenciação celulares, processos correlacionados com o gasto de fotoassimilados (Ho 1988) no qual tanto as galhas (Burstein *et al.* 1994; Florentine *et al.* 2005) quanto os primórdios foliares em formação (Ho 1988) funcionam como fortes drenos. No caso da galha de *P. brasiliensis* em *G. opposita* estes drenos podem ser competitivos. Larson & Whitham (1997) demonstraram que galhas e primórdios foliares não galhados competem por recursos limitados, deste modo, no sistema em estudo a intensa atividade metabólica da galha pode contribuir para a geração de uma forte demanda energética na sua fase inicial que, por sua vez, deverá ser repartida com os primórdios foliares em formação. O compartilhamento de recursos nesse estágio pode limitar a expansão dos primórdios foliares em desenvolvimento, pois, os tecidos da galha em formação protegem e alimentam o indutor demandando maiores gastos energéticos.

Apesar da diferença expressiva na área, em termos anatômicos, a folha e as projeções demonstraram altos níveis de similaridade. Análises anatômicas permitiram verificar que ambos os órgãos são hipostomáticos com mesofilo dorsiventral (fig. 4 e 5), organização comum nas espécies de Nyctaginaceae (Solereeder 1908). Fermino *et al.* (2003) encontraram estrutura semelhante nas folhas de *G. opposita* presentes em populações de mata atlântica e de restinga.

Na epiderme, as características das células da folha não galhada e das projeções foliares não variaram sendo que, em vista frontal, observam-se células com formato irregular, paredes retilíneas a levemente onduladas e delgadas (fig. 6 e 7). Os estômatos são encontrados somente no mesmo nível das demais células epidérmicas. Os tipos mais comuns foram paracítico e anomocítico (fig. 8), entretanto, estômatos do tipo actinocítico (fig. 9) foram raramente observados tanto nas folhas quanto nas projeções. Estômatos paracíticos e anomocíticos são citados na literatura para as Nyctaginaceae (Solereeder 1908) e para *G. opposita* (Fermino *et al.* 2003; Fermino 2004), contudo esse é o primeiro registro de estômatos actinocíticos nessa espécie.

Análises histométricas não mostraram diferenças significativas entre os tecidos (tab. 2). A epiderme unisseriada apresentou células compactas, com formato retangular a quadrangular e cutícula evidente para ambos os órgãos (fig. 10 e 11). A espessura da epiderme da folha não galhada nas faces adaxial e abaxial foi de $46,56 \pm 3,70 \mu\text{m}$ e $33,79 \pm 4,40 \mu\text{m}$, respectivamente, e na projeção foliar $42,42 \pm 7,16 \mu\text{m}$ e $36,59 \pm 5,38 \mu\text{m}$, respectivamente (tab.2).

Tabela 2 - Espessura do mesofilo e dos tecidos da folha sadia e projeção foliar da galha de *P. brasiliensis* em *G. opposita* (população da Serra da Calçada - MG).

Órgão	Epiderme	Epiderme	Parênquima	Parênquima	Mesofilo
	face adaxial (μm)	face abaxial (μm)	paliçádico (μm)	lacunoso (μm)	
Folha sadia	46,56 $\pm 3,70\text{a}$	33,79 $\pm 4,40\text{a}$	104,63 $\pm 15,77\text{a}$	316,29 $\pm 52,75\text{a}$	401,04 $\pm 45,66\text{a}$
Projeção foliar	42,42 $\pm 7,16\text{a}$	36,59 $\pm 5,38\text{a}$	113,06 $\pm 20,52\text{a}$	342,94 $\pm 51,57\text{a}$	424,84 $\pm 67,55\text{a}$

Resultados acompanhados de letras iguais não diferem significativamente. (N= 15; p=0,05)

Tricomas glandulares filiformes (fig.12) foram observados tanto na folha não galhada quanto nas projeções. Esse tipo de tricoma foi descrito por Solereeder (1908) para *Pisonia* e *Neea*, espécies da mesma subtribo de *Guapira* (Douglas & Manos 2007).

Fermino *et al.* (2003) descreveram a ocorrência de tricomas glandulares filiformes em espécies de *G. opposita* de mata atlântica e tricomas glandulares capitados em espécies de restinga. Os tricomas glandulares podem auxiliar na defesa contra insetos fitófagos (Fernandes 1994; Martin & Glover 2007), entretanto, devido a sua distribuição esparsa na folha madura, é pouco provável um papel significativo nesta função.

O mesofilo da folha não galhada apresenta espessura de $401,04 \pm 45,66 \mu\text{m}$ contendo 1-2 camadas de parênquima paliçádico (fig. 10 e 11; tab. 2) e 7-10 camadas de parênquima lacunoso, constituído de células braciiformes que em secção transversal têm formato irregular com extensões de aspecto cilíndrico (fig. 4). Fermino *et al.* (2003) encontraram estrutura semelhante nas folhas de *G. opposita* em mata atlântica e em restinga. Entretanto, nas folhas de restinga mais expostas ao sol, o parênquima paliçádico apresentou maior número de camadas. As espessuras do parênquima paliçádico e lacunoso foram respectivamente, $104,63 \pm 15,77 \mu\text{m}$ e $316,29 \pm 52,75 \mu\text{m}$ (tab. 2). Nas projeções foliares, o mesofilo apresentou $424,84 \pm 67,55 \mu\text{m}$, sendo representado por 1-2 camadas de parênquima paliçádico com $113,06 \pm 20,52 \mu\text{m}$ (fig. 11; tab. 2) de espessura e 8-13 camadas de parênquima lacunoso com $342,94 \pm 51,57 \mu\text{m}$ (fig. 5; tab. 2) de espessura.

Em todo o mesofilo, tanto nas folhas não galhadas quanto nas projeções das galhas, foram visualizados idioblastos com cristais diversos (ráfides, monocristais e drusas) (fig. 13). As drusas foram observadas comumente no parênquima paliçádico, enquanto os monocristais e as ráfides no lacunoso (fig. 13). A presença de cristais diversos é comum em Nyctaginaceae (Solereider 1908; Judd *et al.* 2002) e em *Guapira opposita* (Furlan 1996; Fermino 2004), sendo que diversas funções são atribuídas para eles, dentre elas a defesa contra herbivoria e a regulação dos níveis de concentração de Ca^{+2} (Nakata 2003; Franceschi & Nakata 2005).

Na região da nervura mediana, em corte transversal, o córtex apresenta 3-4 camadas de colênquima angular seguidas eventualmente de 1-2 camadas de parênquima paliçádico. Internamente, 2-3 camadas de parênquima com monocristais são observadas. O sistema vascular, composto por 4 -12 feixes colaterais organizados em forma de anel (fig. 14), ocupa posição central. Abaixo dos tecidos vasculares, o córtex é formado por células parenquimáticas seguidas de 4-6 camadas de colênquima angular adjacentes à epiderme da face abaxial da folha. Nas projeções foliares, o colênquima e menor número de camadas (1-3) voltadas para a região adaxial e 0-3 camadas voltadas para a

abaxial, 1-3 feixes constituem o sistema vascular (fig. 15). O menor número de feixes vasculares nas projeções pode ser relacionado a sua menor área. Segundo Aloni (2001), a diferenciação vascular nas folhas se inicia nas margens dos primórdios foliares em direção ao eixo do caule, na direção do transporte da auxina. Este transporte diminui à medida que os tecidos se diferenciam. Uma vez que a expansão das projeções ocorre precocemente, logo, a diferenciação dos feixes vasculares também é reduzida.

As projeções são do ponto de vista anatômico, folhas verdadeiras e a despeito do tamanho reduzido possuem aparato fotossintético potencialmente similar àquele da folha não galhada.

Aspectos da fotossíntese

Índice, densidade e condutância estomática

A folha não galhada apresentou em média 147 estômatos $\text{mm}^{-2} \pm 29$ diferindo significativamente das projeções foliares, que apresentaram 86 estômatos mm^{-2} (tab. 1).

A área do poro estomático apresentou valor médio de $72,52 \mu\text{m}^{-2}$ na folha não galhada e tamanho 1,63 vezes maior nas projeções (tab. 1). Contudo, estas diferenças não foram suficientes para alterar a condutância estomática estimada, que apresentou valores de $364,08 \pm 141,12 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a folha não galhada e $338,79 \pm 104,67 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para as projeções foliares. Deste modo, a maior área do poro pode estar associada a um mecanismo de compensação pela baixa densidade estomática, garantindo os mesmos níveis de condutância na folha e na galha (tab. 1). Os dados encontrados no sistema *P. brasiliensis-G. opposita* diferem dos encontrados por Lemos-Filho *et al.* (2007) que registraram diminuição na g_{st} em galhas de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. induzidas por *Pseudophacopteron sp.* (Psylloideae) e de *A. spruceanum* Benth. ex Müell. Arg. induzidas por uma espécie não identificada de Cecidomyiidae. Dados de condutância estomática em órgãos envolvidos na interação com insetos herbívoros mostram-se contraditórios (Larson 1998 e Florentini *et al.* 2005). Desta forma, a resposta da condutância estomática parece apresentar grande variação entre os diferentes sistemas planta hospedeira-organismo galhador, não havendo até o momento uma tendência geral para esta variável frente à ação de herbívoros galhadores.

Pigmentos fotossintetizantes

O teor médio das clorofilas *a* e *b* e clorofilas totais foi significativamente menor nas projeções foliares da galha quando comparada às folhas não galhadas (tab. 3) com redução aproximada de 62% nas clorofilas totais. As projeções foliares apresentaram maior razão clorofila *a/b* do que as folhas não galhadas (tab. 3).

Tabela 3 – Conteúdo de pigmentos (n = 30) em folhas não galhadas e projeções foliares da galha de *Pisphondylia brasiliensis* Maia, 1992 (Diptera- Cecidomyiidae) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz, Serra da Calçada-MG.

Órgãos	Clorofila a ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)	Clorofila b ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)	Clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)	Clorofila a/b ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)
Folha não galhada	987.26 a ± 224.51	309.88a ± 78.25	1297.14a ± 301.95	3.21a ± 0.17
Projeção foliar	413,44b $\pm 135,04$	79,37b $\pm 43,93$	492,81b $\pm 178,97$	5,21b $\pm 3,07$

Resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t -Student (P=0,05).

Alguns estudos demonstram que as galhas provocam uma diminuição no teor de pigmentos (Yang *et al.* 2003; Castro 2007). Conforme exposto anteriormente, no sistema *P. brasiliensis* – *G. opposita*, o menor teor de pigmentos veio acompanhado pela maior razão clorofila *a/b*. A redução no teor de clorofilas e o aumento da razão clorofila *a/b* (com valores superiores a 4,0) foram observados em mutantes deficientes de clorofila em milho, ervilha, feijão e beterraba (Yang *et al.* 1993 *apud* Yang *et al.* 2007). Yang *et al.* (2007) sugere que a indução da galha pode levar a um tipo de mutação na produção de pigmentos fotossintéticos.

A forma como os insetos galhadores alteram a quantidade de pigmentos não é bem compreendida. O nitrogênio e o carbono desempenham papel importante na construção do aparato fotossintético, pois são elementos componentes da clorofila e das moléculas de citocromos, bem como das proteínas (Taiz & Zeiger 2004; Lüttge 1997). Nas galhas maduras de *P. brasiliensis*, açúcares solúveis, substâncias alcaloídicas e

fenólicas e intensa lignificação externamente à câmara larval foram observadas (cf Fleury 2009, cap. 1 e 2). Yang *et al.* (2003) encontraram maiores quantidades de compostos secundários e menores teores de pigmentos em galhas de Cecidomyiidae quando comparadas a folha não galhada, sugerindo que a galha sintetiza menos pigmentos em função da maior produção de compostos envolvidos na defesa do indutor. A produção de metabólitos secundários, em especial a lignina, é dispendiosa para o vegetal, pois aloca carbono e nitrogênio do metabolismo primário (Gottlieb *et al.* 1996). Deste modo, no sistema em estudo, é possível que a redução dos pigmentos nas projeções seja consequência da realocação dos recursos do metabolismo primário para a produção de compostos secundários nitrogenados (alcalóides) e compostos fenólicos.

Fluorescência da clorofila *a*

Os pigmentos têm papel chave nos processos fotossintéticos (Taiz & Zeiger 2004), sendo que mudanças nos seus teores podem afetar a captação de luz e a transferência de elétrons (Yang *et al.* 2003). Corroborando essas premissas, a avaliação da fluorescência da clorofila *a* neste estudo indicou diferença no comportamento do rendimento quântico efetivo do PSII ($\Delta F/F'm$) entre as folhas não galhadas e as projeções foliares. As folhas não galhadas apresentaram valores maiores quando comparados àqueles das projeções foliares (figura 16). Similarmente, o rendimento quântico potencial ($F_v/F'm$) demonstrou resultados ligeiramente superiores nas folhas não galhadas (figura 17).

Em todos os horários, os órgãos avaliados obtiveram valores de $\Delta F/F'm$ abaixo de 0,8 indicando possível fotoinibição (fig. 16). A fotoinibição pode ser definida como a inativação do centro de reação do PSII, levando ao decréscimo da atividade fotoquímica (Bertamini *et al.* 2004). A análise da dinâmica dos valores de $F_v/F'm$ possibilita caracterizar o nível desta fotoinibição (Rascher *et al.* 2000). Valores de $F_v/F'm$ inferiores a 0,8 avaliados em folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos caracterizam a fotoinibição aguda (Lüttge *et al.* 1998) e a constância desses valores abaixo de 0,8 no $F_v/F'm$ avaliados durante o *predawn* confirmam uma fotoinibição crônica, com danos mais severos ao PSII (Rascher *et al.* 2000). Nas folhas não galhadas e nas projeções foliares, apesar dos valores de $F_v/F'm$ (fig. 17 e 18) terem sido maiores do que os encontrados no $\Delta F/F'm$, esse aumento não foi suficiente para a recuperação do PSII,

demonstrando uma fotoinibição crônica para ambos os órgãos, com maior intensidade na projeção foliar.

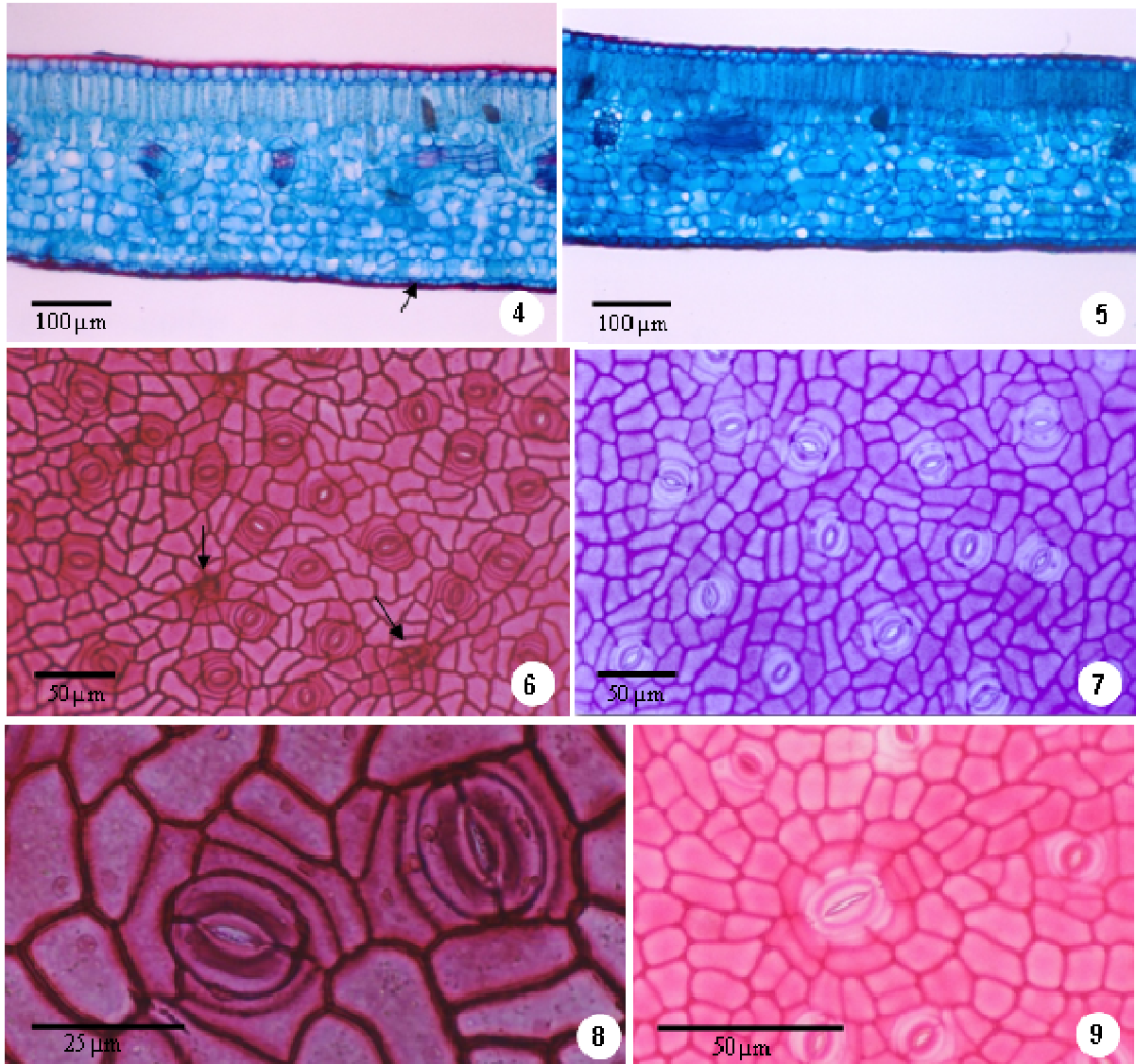
A fotossíntese pode ser afetada por diversos fatores, entre eles, a luz e a disponibilidade de CO₂ e de água (Nobel 1999; Taiz & Zeiger 2004). Como a condutância estomática estimada não diferiu entre as folhas e as projeções, sugere-se que ambas têm a mesma capacidade de realizar as trocas gasosas e, conseqüentemente, não possuem diferenças na captação de CO₂. Todavia, uma baixa produtividade fotossintética foi encontrada em galhas por Aldea *et al.* (2006) e Larson (1998), os quais sugerem a influência de fatores biológicos na fotossíntese. O presente estudo mostra o baixo teor de clorofilas nas projeções foliares da galha de *P. brasiliensis* como um fator que influenciou o rendimento fotossintético.

Em conclusão, este estudo demonstrou que as projeções foliares da galha de *P. brasiliensis* em *G. opposita* são folhas verdadeiras, com menor área quando comparadas às folhas não galhadas. Sua organização anatômica é similar a da folha, com mesofilo diferenciado e estômatos somente na face abaxial. Os aspectos fotossintéticos, por sua vez, apresentaram-se contraditórios, com a condutância estomática estimada não diferindo entre os órgãos e os teores de pigmentos e os valores de $\Delta F/F'm$ e $F_v/F'm$ são menores nas projeções.

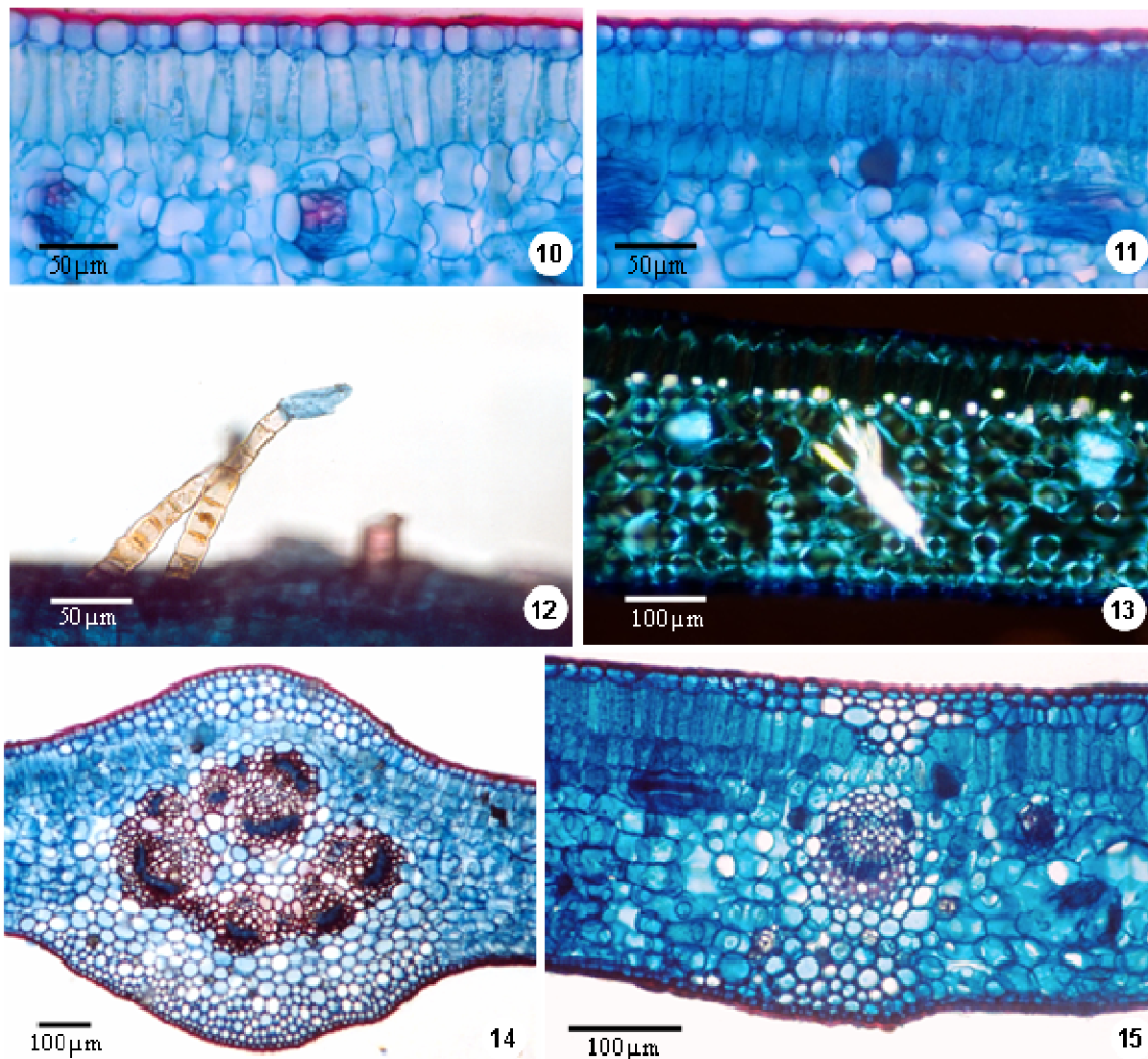
Apesar das projeções apresentarem atividade fotossintética reduzida, a grande densidade destas sobre as galhas pode promover uma compensação na fotossíntese. Burstein *et al.* (1994) demonstraram através de ¹⁴C, que galhas de gemas são poderosos drenos, sequestrando no início de seu desenvolvimento recursos de fontes próximas e, no final, de fontes distantes, como ramos vizinhos. É possível que o conjunto das projeções foliares destas galhas auxilie no fornecimento de fotoassimilados em direção aos tecidos que irão nutrir o galhador na galha madura. Contudo, devido ao baixo rendimento fotossintético das projeções, a produção das mesmas pode não ser suficiente para a completa manutenção do sistema *Pisphondylia brasiliensis* – *Guapira opposita*, que drenará recursos de fontes vizinhas.



Figuras 1-3. *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. 1. Visão geral da área de coleta na Serra da Calçada, Brumadinho, MG. Capões de mata sobre canga. 2. Folhas não galhadas com filotaxia oposta cruzada. 3. Galhas de *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia (Diptera – Cecidomyiidae).



Figuras 4-9. Aspectos anatômicos da folha não galhada e projeção foliar da galha induzida por *Pispiondylia brasiliensis* Couri & Maia em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz 4-5. Secções transversais. 6 - 9. Vista frontal da epiderme da face abaxial da folha. 4. Folha não galhada. Mesófilo dorsiventral, epiderme unisseriada e folha hipostomática. Estômato (seta). 5. Projeção foliar. 6. Face abaxial da folha não galhada. Tricomas (setas). 7. Projeção foliar. 8. Estômatos anomocíticos e paracíticos em folha não galhada. 9. Estômato actinocítico em folha não galhada.



Figuras 10-15. Aspectos anatômicos da folha não galhada e projeção foliar da galha de *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. 10. Parênquima paliçádico da folha não galhada. 11. Projeção foliar. 12. Presença de tricomas glandulares na folha não galhada. 13. Presença e distribuição de cristais na folha não galhada. Luz polarizada. 14. Nervura mediana na folha não galhada. 15. Projeção foliar.

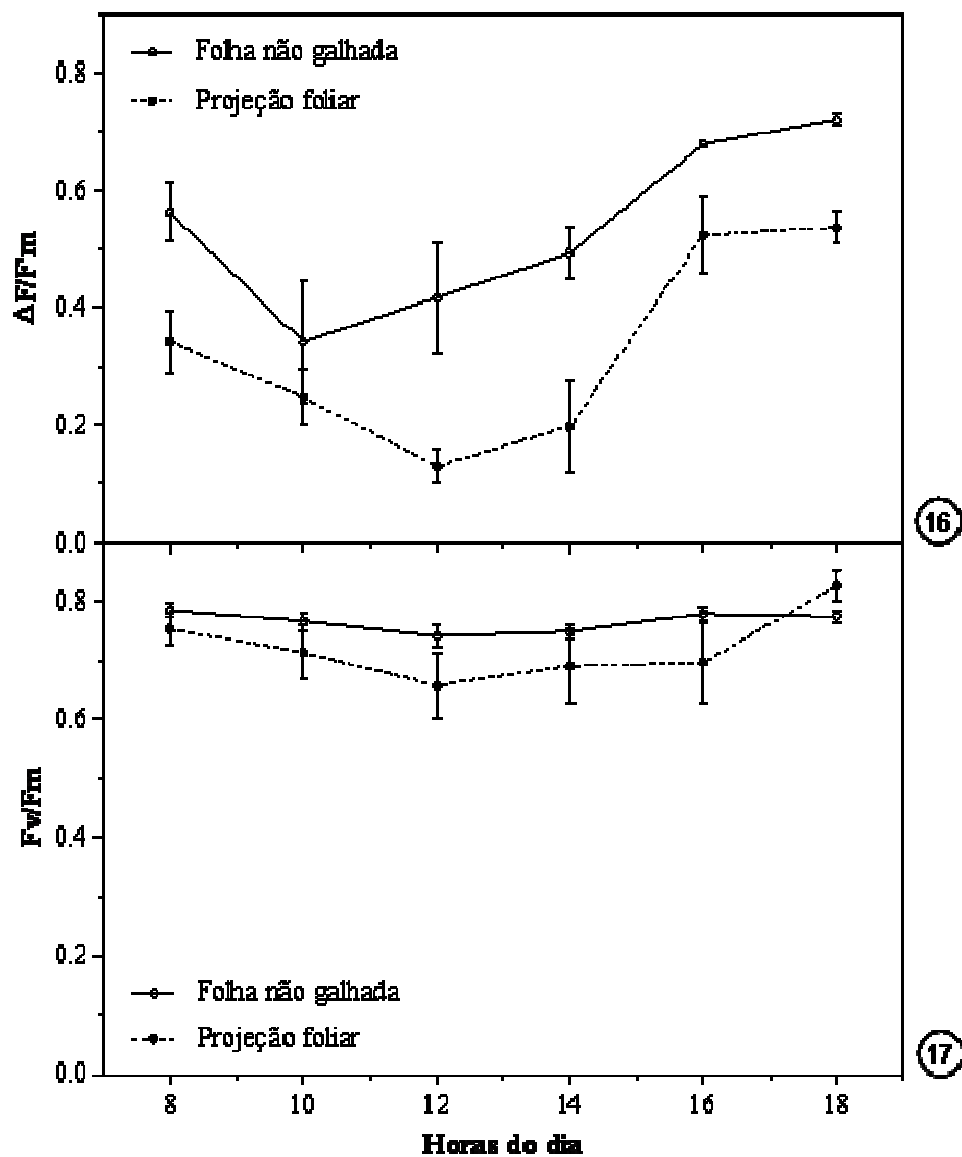


Figura 16-17. Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* relacionados a performance fotossintética ao longo do dia de folhas não galhadas e projeções foliares da galha de *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia (Diptera-Cecidomyiidae) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. 16. Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'm$). 17. Rendimento quântico potencial ($F_v/F'm$).

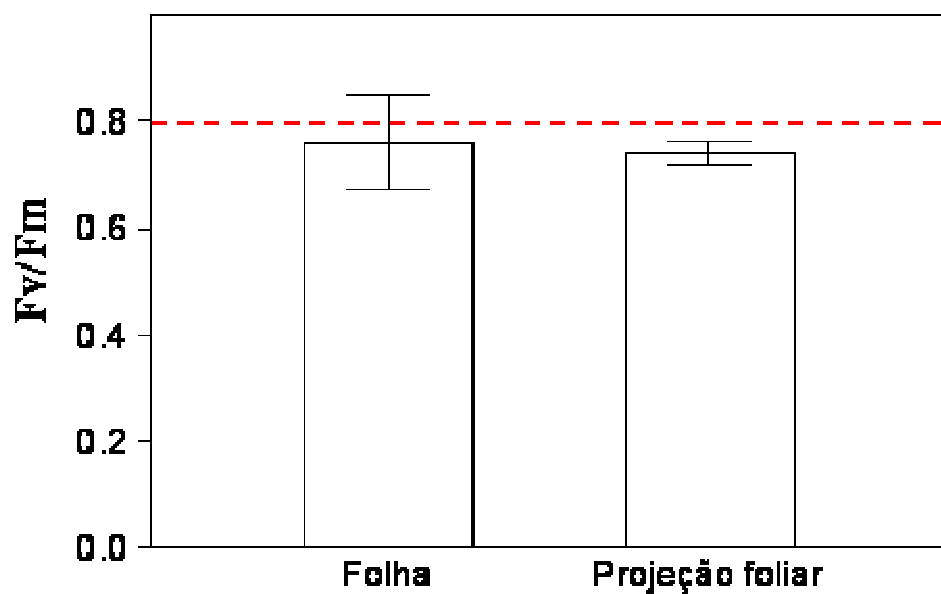


Figura 18 . Valor médio (\pm desvio padrão) do rendimento quântico potencial do PSII (*predawn*). 18. Comparação entre a folha não galhada e a projeção foliar da galha de *Pisphondylia brasiliensis* Couri & Maia em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz.

Referências Bibliográficas

- Aldea, M.; Hamilton, J.; Resti, J.; Zangerl, A.R.; Berenbaum, M.R.; Frank, T.D.; DeLucia, E.H.** 2006. Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia* 149:221-232.
- Aloni, R.** 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *Journal Plant Growth Regulation*. 20:22-34.
- Bertamini, M.; Mutguchelian, K.; Nedunchezian, N.** 2004. Photoinhibition of photosynthesis in sun and shade grown leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Photosynthetica* 42(1):7-14.
- Bissing, D. R.** 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain technology* 49:116-117.
- Bronner, R.** 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse, J.D. & Rohfritsch, O. (eds.) *Biology of Insect-induced galls*. Oxford University Press, New York.
- Bukatsch, F.** 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61(8):255.
- Burstein, M.; Wool, D. & Eshel, A.** 1994. Sink strength and clone size of sympatric, gall-forming aphids. *European Journal Entomology* 91:57-61.
- Castro, A.C.R.** 2007. Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- Douglas, N. A. & Manos, P.S.** 2007. Molecular phylogeny of Nyctaginaceae: Taxonomy, Biogeography, and characters associated with a radiation of xerophytic genera in North America. *American Journal of Botany* 94(5):856-872.
- Fay, P.A.; Preszler R.W. & Whitham T.G.** 1996. The functional resource of a gall-forming adelgid. *Oecologia* 105:199-204.
- Fernandes, W.G.** 1994. Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Revista Brasileira de Entomologia* 38(2):421-433.
- Fermino Jr., P.C.P.** 2004. Anatomia ecológica comparada de folhas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) na vegetação de restinga e na floresta ombrófila densa. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Santa*

Catarina, Santa Catarina. Disponível em:
<http://www.tede.ufsc.br/teses/PBVE0018.pdf>. Acesso em: agosto 2008.

- Fermino Jr., P.C.P.; Santos, M.; Paulilo, M.T.S.; Machado, A.V.** 2003. Leaf Structural Aspects of *Guapira opposita* (Vell.) Reitz in the Atlantic Rainforest and restinga. *Acta Microscopica* 12(B):27-28.
- Florentine, S.K.; 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.
- Franceschi, V.R. & Nakata, P.A.** 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review Plant Biology* 56:41-71.
- Furlan, A.** 1996. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. Tese de doutorado. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo*.
- Genty B.; Briantias, J.M.; Baber, N.** 1989. The relation between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica, Biophysica Acta* 990:87-92.
- Gonçalves, S.J.M.R.; Isaias, R.M.S.; Vale, F.H.A.; Fernandes, G.W.** 2005. Sexual dimorphism of *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson & Gonçalves 2004 (Hemiptera Coccoidea Eriococcidae) influences gall morphology on *Rollinia laurifolia* Schltdl. (Annonaceae). *Tropical Zoology* 18:161-169.
- Gottlieb, O.R.; Kaplan, M.A.C.; Borin, M.R.M.B.** 1996. Biodiversidade um enfoque químico-biológico. *Ed. UFRJ, Rio de Janeiro*.
- Hartley, S.E.** 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113:492-501
- Ho, L.C.** 1988. Metabolism and compartmentation of import sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 39:355-378.
- Inbar, M.; Eshel, A.; Wool, D.** 1995. Interspecific competition among phloem-feeding insects mediated by induced host-plant sinks. *Ecology* 76(5):1506-1515.
- Isaias, R.M.S.** 1998. Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Pappilonoideae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. *Universidade de São Paulo, São Paulo*.
- Jacobi, C.M.; Carmo, F.F.; Vincent, R.C.; Stehmann, J.R.** 2007. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiversity Conservation* 16:2185-2200.

- Johansen, D.A.** 1940. Plant microtechnique. *New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.*
- Judd, W. S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J.** 2002. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. *Sinauer Associates Publishers, Massachusetts.*
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual Básico de métodos em morfologia vegetal. *Seropédica: EDUR.*
- Kraus, J.E., Isaias, R.M.S.; Fernandes, G.W.** 2003. Structure of insect galls on two sympatric subspecies of *Chrysothamus nauseosus* (Pall. Ex Pursh) Britton (Asteraceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21(2):251-263.
- Larson, K.G.** 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia* 115:161-166.
- Larson, K.G. & Whitham, T.G.** 1991. Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia* 88:15-21.
- Larson, K.G. & Whitham, T.G.** 1997. Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia* 109:575-582.
- Lemos-Filho, J.P.; Christiano, J.C.S.; Isaias, R.M.S.** 2007. Efeitos da infestação de insetos galhadores na condutância e taxa relativa de transporte de elétrons em folhas de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. E *A. spruceanum* Benth. ex Müell. Arg. *Revista Brasileira de Biociências* 5(2):1152-1154.
- Lichtenthaler, H.K. & Wallburn, A.R.** 1983. Determinations of total carotenoides, and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Translations* 11:591-592.
- Lüttge, U.** 1997. Physiological Ecology of Tropical Plants. *Spring Verlag, Berlin.*
- Lüttge, U.; Haridosan, M.; Fernandes, G.W.; Mattos, E.A.; Trimborn, P.; Ziegler, H.** 1998. Photosynthesis of mistletoes in relation to their hosts at various sites in tropical Brazil. *Trees* 12:167-174
- MacCrea, K.D.; Abrahamson, W.G.; Weis, A.E.** 1985. Goldenrod ball gall effects on *Solidago altissima*: ¹⁴C translocation and Growth. *Ecology* 66(6):1902-1907.
- Mani, M.S.** 1964. Ecology of Plant Galls. *Dr. W. JunkPublis. The Hague.* 432p
- Martin, C. & Glover, B.J.** 2007. Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Current Opinion in Plant Biology* 10:70-82.

- Moura, M.Z.D.; Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S.** 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf gallers in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany* 56:153-160.
- Nabity, P.D.; Zavala, J.A.; DeLucia, E. H.** 2008. Indirect suppression of photosynthesis on individual leaves by arthropod herbivory. *Annals of Botany* Disponível em: <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/content/full/mcn127>. Acesso: agosto de 2008.
- Nakata, P.A.** 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164:901-909.
- Nobel, P.S.** 1999. Physicochemical and Environmental plant physiology. *Academic Press*, San Diego.
- Nyman, T.** 2000. Phylogeny and ecological evolution of gall-inducing sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). PhD Dissertations in Biology. Vol.6. *University of Joensuu*
- Oliveira, D.C.** 2007. Relações entre ontogenia foliar e idade dos tecidos para o valor adaptativo de galhas em *Copaifera langsdorff* Desf. (Fabaceae). Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- Oliveira, D.C.; Christiano, J.C.S.; Soares, G.L.S.; Isaias, R.M.S.** 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hass. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera, Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica* 29(4):657-667.
- Paiva, J.G.A.** 2006. Verniz vitral incolor 500[®] : uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta botânica brasílica* 20(2):257-264.
- Pinto, L.M.C.** 1996. Quantikov: um analisador microestrutural para o ambiente Windows. Tese de Doutorado. *Universidade de São Paulo*, São Paulo.
- Raman, A.; Madhavan, S.; Florentine, S.K.; Dhilepan, K.** 2006. Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema strenuana* inferred from signatures of isotopic carbon and nitrogen and concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119:101-107.
- Rascher, U.; Liebig, M.; Lüttge, U.** 2000. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant, Cell and Environment* 23:1397-1405.

- Sall, J.; Lehman, A.; Creighton, L.** 2002. JMP. Start Statistics. Cary, NC, USA, Sas Institute Inc.
- Scarano, F.R.** 2007. Rock outcrop vegetation in Brazil: a brief overview. *Revista Brasileira de Botânica* 30(4):561-568.
- Silva, I.M.; Andrade, G.I.; Fernandes, G.W.; Filho, J.P.L.** 1996. Parasitic Relationships a Gall-forming Insect *Tomoplagia Rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its Host Plant (*Vernonia polyanthes*, Asteraceae). *Annals of Botany* 78: 45-48.
- Solereder, H.** 1908. Systematic anatomy of the Dicotyledons. v. 2. *Oxford at the Clarendon Press*.
- Stone, G.N. & Schönrogge, K.** 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in ecology and evolution* 18:512-522.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. Fisiologia Vegetal. *Ed. Artmed*.
- Vecchi, C.** 2004. Reações diferenciais a herbívoros em espécies de Melastomaceae. Tese de Doutorado. *Universidade de São Paulo, São Paulo*.
- Viana, P. L. & Lombardi, J.A.** 2007. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 58(1):159-177.
- Weis, A.E.; Walton, R.; Crego, C.L.** 1988. Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology* 33:467- 486
- Yang, C.M.; Yang, M.M.; Huang, M.Y.; Hsu, J.M.; Jane, W.N.** 2003. Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leave. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44:314-321.
- Yang, C.M.; Yang, M. M.; Huang, M.Y.; Hsu, J.M.; Jane, W.N.** 2007. Life time deficiency of photosynthetic pigment-protein complexes CP1, A1, AB1, and AB2 in two cecidomyiid galls derived from *Machilus thunbergii* leaves. *Photosynthetica* 45(4):589-593.

Considerações finais

As super-hospedeiras de herbívoros galhadores são modelos de grande interesse para estudos comparativos acerca do desenvolvimento vegetal. Nestas plantas, a influência de diversos galhadores pode ser avaliada tendo como padrão a morfogênese de uma única espécie vegetal.

Guapira opposita, cuja presença em uma dada população é apontada como de grande influência para a riqueza de galhadores, teve quatro de seus morfotipos estudados do ponto de vista comparativo e um deles, o morfotipo induzido por *Pisphondylia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae), avaliado sob os aspectos ontogênico, histoquímico e fisiológico.

Deste estudo são propostos quatro artigos científicos, sendo três avaliados como a presente dissertação de mestrado e um já submetido (anexo 1). Os resultados obtidos em *G. opposita* somam dados às análises comparativas entre galhas induzidas em outras super-hospedeiras (*Lantana camara* e *Copaifera langsdorffii*) estudadas pelo Grupo de Pesquisa em “Estrutura, Química e Fisiologia de Galhas Tropicais” e ampliam o entendimento sobre os níveis de similaridade e a relação nutricional com os taxa indutores.

Os estudos de desenvolvimento e histoquímica na galha de *P. brasiliensis* corroboram a importância do sítio de indução na determinação da forma e funcionamento da estrutura. Este morfotipo constitui o primeiro modelo no qual os aspectos da fotossíntese foram abordados de modo a testar a potencialidade da galha como fonte e dreno de seus próprios recursos.

Description of the female, pupa and gall of *Pisphondylia brasiliensis*

Couri & Maia, 1993 (Diptera: Cecidomyiidae, Schizomyiina) with new records

V. C. MAIA¹, G. FLEURY², G.L.G. SOARES³, R. M. S. ISAIAS²

¹ Departamento de Entomologia, Museu Nacional, Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Laboratório de Anatomia Vegetal - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, MG, Brasil

³ Departamento de Botânica- Instituto de Biologia, UFRS, Porto Alegre, RS, Brasil

The gall of *Pisphondylia brasiliensis* on *Guapira opposita*, its female and pupa are described and illustrated. The geographic distribution of this species is extended to Minas Gerais and Rio Grande do Sul (Brazil). The gall is located in apical and axillary buds of young shoots. It is round or elliptic and covered with small leaves. For the first time, a female of the genus is described.

KEYWORDS: Asphondyliini, Cecidomyiidae, Diptera, *Pisphondylia brasiliensis*, Schizomyiina

INTRODUCTION

Guapira opposita Vell (Reitz) (Nyctaginaceae) is an arboreous-arbustive species of wide distribution occurring all over Brazilian states, in diverse habitats from rain

¹ Corresponding author: V.C.Maia (maiaavid@acd.ufrj.br).

forests to rupestrian fields with large phenotypic plasticity in function of environment variation (Furlan 1996). This species is a superhost for galling insects within witch *Pisphondylia brasiliensis* (Maia 2005).

Pisphondylia Möhn, 1960 is known from two Neotropical species that form galls on Nyctaginaceae: *P. salvadorensis* Möhn, 1960 described from El Salvador (larva, pupa, male, and gall) (Möhn 1960) and *P. brasiliensis* Maia & Couri, 1993 described from Rio de Janeiro State, Brazil (male and gall) (Maia & Couri 1993). The genus can be recognized by the following characters: male antennal circumfila longitudinally sinuous; palpus three-segmented; tarsal claws simple; empodia rudimentary; teeth of gonostyli denticulate; parameres absent; aedeagus bulbous; pupal antennal horns absent and dorsal abdominal spines present; larval spatula absent and anal segment elongated. The female is unknown.

In this paper, the female, pupa of *P. brasiliensis* are described and gall morphology is revisited and illustrated. The former is compared with females of other Schizomyiina genera in order to complete the genus definition. The pupa is compared with that of *P. salvadorensis*. Besides, the geographic distribution of *P. brasiliensis* is extended to Minas Gerais and Rio Grande do Sul (Brazil).

MATERIAL AND METHODS

Galls of *P. brasiliensis* were collected in November, 2007 in rupestrian field on ferruginous “canga” at Brumadinho, Minas Gerais, Brazil, and in February 2008 at a estational semideciduous forest in Porto Alegre, Rio Grande de Sul, Brazil. To obtain adults and pupal exuviae, part of the samples was carried to the laboratory and kept in plastic pots layered at the bottom with damp cotton and covered by a fine screening.

These pots were checked daily. To obtain pupae and perform gall macroscopical analysis, part of the samples was dissected under a stereoscopic microscope.

Insect specimens were first preserved in 70% ethanol and later mounted on microscope slides following the methodology of GAGNÉ (1994). Galls were fixed in formalin-acetic acid-50% ethanol (FAA) (1:1:18) (Johansen 1940) for 48 hours, washed in 50% ethanol and transferred to 70% ethanol. Part of the samples were dehydrated in n-butyl series (Johansen 1940) and embedded in Paraplast (Kraus and Arduin 1997). Transverse sections (12 μ m) were obtained with a rotatory microtome (Biocut Jung), and stained in 0.5% astrablue-safranin (2:8) (v/v). Schematic drawings were made using an Olympus BH2-DA drawing attachment connected to an Olympus light microscope (Olympus BH2/BHS).

All insect material was deposited in the Diptera collection of Museu Nacional, Rio de Janeiro (MNRJ), and plant material at BHC B Herbarium.

RESULTS

Female description

(Figs. 1-5)

Adult. Body length (from vertex to bilobed structure at posterior end of tergite 8): 3.55-4.30 mm (n=5). Head: eye facets hexagonal, closely appressed. Antenna: scape obconic, 0.10-0.12 mm long, 0.07-0.09 mm wide, 1.1-1.6 as long as wide; pedicel short, globose, 0.05-0.06 mm long (n=6); flagellomeres 9-12 progressively and conspicuously shortened (Fig. 1); flagellomere neck short and bare. Flagellomeres 1 and 2 not connate, flagellomere 1: 0.25-0.28 mm long, and 1.0-1.13 times longer than flagellomere 2; flagellomere 2: 0.23-0.25 mm long, and 1.04-1.13 times longer than

flagellomere 3; flagellomere 3: 0.21-0.23 mm long, and 1.04-1.15 times longer than flagellomere 4; flagellomere 4: 0.20-0.21 mm long, and 1.0-1.05 times longer than flagellomere 5; flagellomere 5: 0.19-0.21 mm long, and 1.0-1.05 times longer than flagellomere 6; flagellomere 6: 0.19-0.20 mm long, and 1.0-1.17 times longer than flagellomere 7; flagellomere 7: 0.17-0.19 mm long, and 1.0-1.35 times longer than flagellomere 8; flagellomere 8: 0.14-0.17 mm long, and 1.16-1.33 times longer than flagellomere 9; flagellomere 9: 0.12-0.13 mm long, and 1.18-1.33 times longer than flagellomere 10; flagellomere 10: 0.09-0.13 mm long, and 1.42-1.83 times longer than flagellomere 11; flagellomere 11: 0.06-0.07 mm long, and 1.2-1.4 times longer than flagellomere 12; and flagellomere 12: 0.06-0.05 mm long (n=6). Circumfila wavy (Fig. 2). Frontoclypeus with 22-36 setae (n=2). Labrum long-attenuate. Hypopharynx of the same shape of labrum, with long anteriorly directed lateral setulae. Labella elongate-convex, each with some lateral setae and three pairs of short mesal setae. Palpus with three setose segments: segment one globoid, 0.03-0.04 mm long, and 0.03-0.04 mm wide; segment 2 ovoid, 0.05-0.06 mm long, 0.035-0.04 mm wide, 1.25-1.71 times as long as wide, and 1.25-1.66 times longer than segment 1; segment 3 cylindrical, tapering to apex, 0.11-0.12 mm long, 0.03-0.035 mm wide, 3.6-4.0 times as long as wide, and 1.8-2.4 times longer than segment 2.

Thorax. Anepimeron setose, other pleural sclerites asetose. Wing length (from arculus to apex): 3.20-3.30 mm (n=5). Tarsal claws simple, curved beyond midlength, similar on all legs; empodia rudimentary (Fig. 3).

Abdomen (Fig. 4). tergites 1-7 rectangular, with complete row of posterior setae, several lateral setae, some setae at midlength, two basal trichoid sensilla and elsewhere with scattered scales. Tergite 8 laterally notched, with complete row of posterior setae. Sternites 2-6, with setae more abundant at midlength, complete row of posterior setae,

several lateral setae, two basal trichoid sensilla and elsewhere with scattered scales. Sternite 7 with many scattered setae at distal 4/5 distal (bare at basal 1/5) and 1.7-2.0 times as long as sternite 6. Sternite 8 not sclerotized. Ovipositor protrusible, elongated, pliable, with long ventral, sparse dorsal setae and tiny cercus (Fig. 5); when completely protracted 0.75 mm long (from caudal margin of tergite 8 to apex).

Material examined. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 20.II.2008, Geraldo Soares and Graziela Fleury col.: 6 females (emergence on 03.II.2008).

Pupa description

(Figs.6-10)

Color: brownish. Length: 3.2-4.4 mm (n=4). Head (Fig.6): antennal horn triangular 0.02 mm long (n=4), apicomeral margin not serrated; cephalic setae 0.07-0.09 mm long (n=4) (Fig. 7); two upper frontal horns triangular, 0.03mm long (n=4); two lower frontal horns triangular, 0.01 mm long (n=4); two pairs of lower facial papillae: one pair setose, seta 0.03 mm long (n=4), the other asetose; two pairs of lateral facial papillae: one pair setose, seta rudimentary (<0.01mm long) (n=4), the other without setae. Upper cephalic margin laterally thickened.

Thorax: thoracic segments with three pairs of dorsal papillae: two pairs setose and the other asetose, and two pairs of pleural papillae setose (Fig. 8); prothoracic spiracle rudimentary (Fig. 9).

Abdomen (Fig.10): segments 2-9 with two irregular transverse rows of dorsal spines, distal spines longer than the others, 0.05 mm long; three pairs of dorsal papillae (two pairs setose and the other without setae, and two pairs of pleural papillae setose).

Material examined. Brumadinho, Minas Gerais, Brazil, XI.2007, Graziela Fleury col.: 2 pupae, 3 pupal exuviae; Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 20.II.2008, same collectors: 1 pupa and 5 pupal exuviae.

Gall description

(Figs. 11-12)

Pisphondylia brasiliensis induces galls on the apical and axillary buds of *Guapira opposita* young shoots. These galls are round or elliptic, and covered with densely disposed small leaves (Fig. 11). The induction alters the growing pattern of the shoots resulting in a rosette of small leaves. They are commonly monothalamous, but when oviposition sites are close enough, galls may coalesce getting to 1-6 larval chambers. Galls coalescence causes a wide variety on final gall size. Before pupating, larva feeds on plant tissues, widening the chamber and opening the escape channel up to gall epidermis. The small leaves just around gall exit senesce.

Gall covering system is formed by the epidermis of the small leaves. The ground system consists of a large mass of parenchyma cells within which a great number of vascular bundles differentiate. Schlerenchyma may limit the larval chamber (Fig. 12). Even though *P. brasiliensis* galls on *G. opposita* is essentially monothalamous with just one larvae per chamber, some galls from Brumadinho, MG, presented two larvae per chamber.

DISCUSSION

The galls of *P. brasiliensis* are very distinct from those of *P. salvadorensis*. The former can be described as a rosette of small leaves, while the latter is a hemispherical or blister hairy gall developed on leaves.

The pupa of *P. brasiliensis* differs from that of *P. salvadorensis* by the following characters: 1) body length: 3.2 mm in *P. brasiliensis*; 2,6mm in *P. salvadorensis*; 2) upper frontal horn: present in *P. brasiliensis* and absent in *P. salvadorensis*; 3) lower frontal horn: present in *P. brasiliensis* and absent in *P. salvadorensis*; 4) number of rows of dorsal spines on segments abdominal 2-9: two in *P. brasiliensis* and four in *P. salvadorensis*; 5) length of prothoracic spiracle: normal in *P. salvadorensis* (0.135 mm long) and reduced in *P. brasiliensis*; 6) number of facial lateral papillae: two pairs in *P. brasiliensis* and three pairs in *P. salvadorensis*; 7) lower facial papillae: one pair setose and other bare in *P. brasiliensis* and both pairs setose in *P. Salvadorensis*, and 8) length of dorsal spines: 0.050 mm in *P. brasiliensis* and 0.064-0.065 mm in *P. salvadorensis*.

The female of *Pisphondylia* can be characterized by having: 1) flagellomeres 9-12 progressively and conspicuously shortened; 2) circumfila wavy; and 3) ovipositor protrusible, elongated, pliable, with long ventral, sparse dorsal setae and tiny cercus. The ovipositor of *Pisphondylia* resembles that of *Bruggmannia* Tavares, 1916, and wavy circumfila are also found in some species of *Bruggmannia* (Gagné 1994). But in *Pisphondylia*, the flagellomeres 9 to 12 are progressively and conspicuously shortened, differing from those of *Bruggmannia*, which are subequal in length. Flagellomeres 9-12 progressively and conspicuously shortened are found in many Schizomyiina, as in *Anasphondylia* Tavares, 1920, *Burseramyia* Möhn, 1960, *Metasphondylia* Tavares, 1918, *Pisoniamyia* Möhn, 1960, *Proasphondylia* Felt, 1915, *Schizomyia* Kieffer, 1889, and *Stephomyia* Tavares, 1916, and in all Asphondyliina. Flagellomeres subequal in

length are found only in *Bruggmannia*, *Macroporpa* RübSaamen, 1916 and *Polystepha* Kieffer, 1897 among all Asphondyliini.

Galls from the two collection areas are quite similar except for the coalescence and number of larval chambers, which reveals differences in insects' strategies for survival. According to Resetarits (1996), oviposition site choice must be under equally strong selection with egg size, egg number and the other hard components of life histories in order to generate and optimize locally adapted or ecologically specialized life history phenotypes, what can be perfectly associated to gall systems. Nevertheless, when the female oviposits at the same site, its offspring might compete for vital resources, what is not essentially positive for species success. For the host plant, this oviposition behavior may result in wider galls, and be more harmful because of a more powerful sink of photosimilates to gall site.

ACKNOWLEDGMENTS

To CAPES, CNPq (472491/2003-2, 304851/2004-3, 084/2007-0 e 301197/2007-5 and FAPERJ (E-26/171.290/2006) for financial support. To Dr. Marcos Sobral, from BHCB Herbarium (Departamento de Botânica - ICB/UFMG) for plant species identification.

REFERENCES

COURI, M. S. & MAIA, V. C. 1992. Considerações sobre *Pisphondylia* Möhn, 1960 (Diptera, Cecidomyiidae, Asphondyliidi), com descrição de uma espécie nova do Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 36 (4): 729-730.

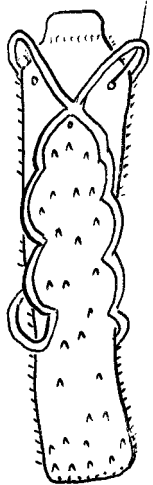
- FURLAN, A. 1996. A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil. Tese de doutorado. *Instituto de Biociências*, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GAGNÉ, R.J. 1994. The gall midges of the Neotropical region. *Ithaca: Cornell University Press* + 352pp.
- JOHANSEN, D.A.1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book. New York + 523 pp.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. Manual Básico de métodos em morfologia vegetal. *Seropédica: EDUR*. + 198pp.
- MAIA, V. C. 2005. Catálogo dos Cecidomyiidae (Diptera) do estado do Rio de Janeiro. *Biota Neotropica* (Ed. Portuguesa), v. 5, p. 1-26.
- MÖHN, E. 1960. Gallmücken (Diptera, Itonididae) aus El Salvador. *Senckenbergiana Biologica* 41 (5/6): 333-358.
- RESETARITS, W. J. 1996. Oviposition site choice and life history evolution. *American Zoology* 36:205-215

Figures:

Figs. 1-5 - Female of *Pisphondylia brasiliensis*. 1, flagellomere 4, circumfila; 2, flagellomeres 9-12; 3, midleg, tarsal claw and empodium; 4. Abdominal segment 2 to end, lateral view; 5, Ovipositor, lateral view.

Figs. 6-10 - Pupa of *Pisphondylia brasiliensis*. 6, head, frontal view; 7, cephalic seta, dorsal view; 8, spiracle prothoracic; 9, thoracic segments, dorsal view; 10, abdominal segment 6, dorsal view.

Figs. 11-12 - Gall of *Pisphondylia brasiliensis* on *Guapira opposita* branch. 11, General aspect. 12, Schematic drawing showing plant tissues arrangement in longitudinal section. (EP) Epidermis; (PR) Periderm; (PP) Parenchyma; (SC) Schlerenchyma; (VT) Vascular tissue; (LC) Larval chamber.



1

0.10 mm



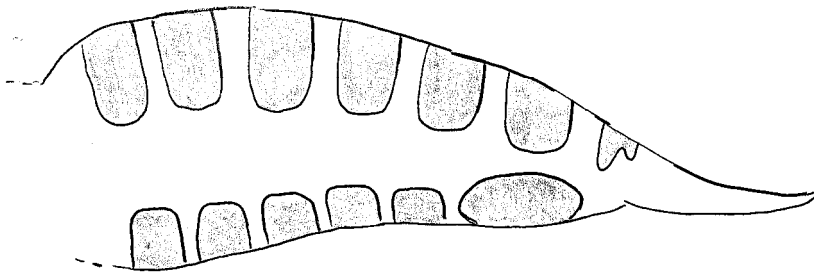
2

0.30 mm



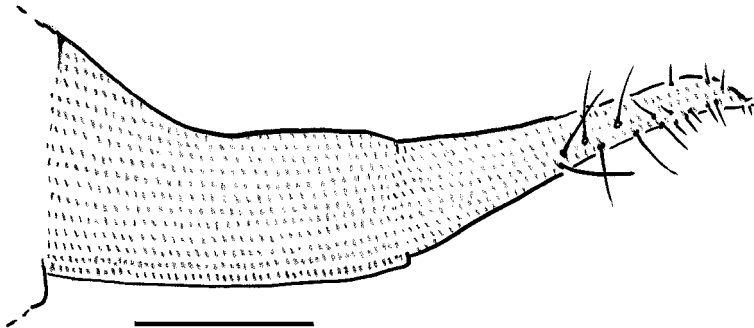
3

0.04 mm



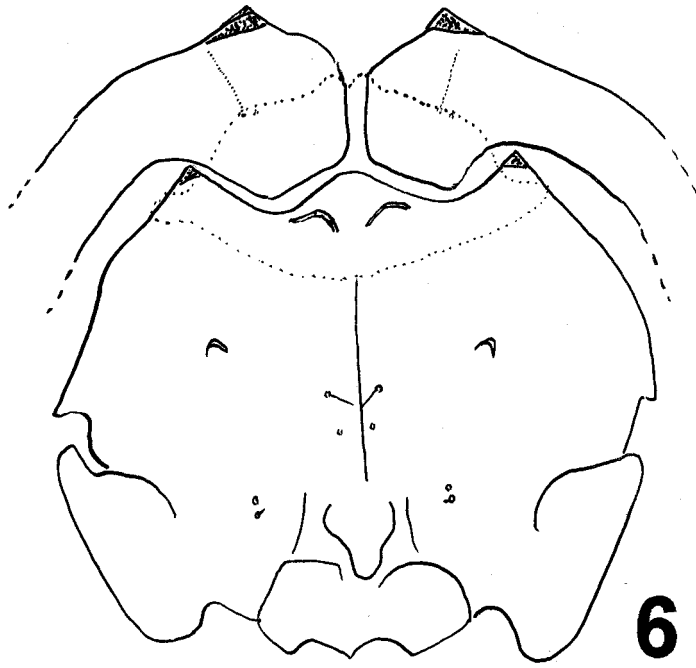
4

1.00 mm



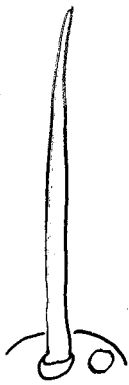
5

0.20 mm



6

0.40 mm



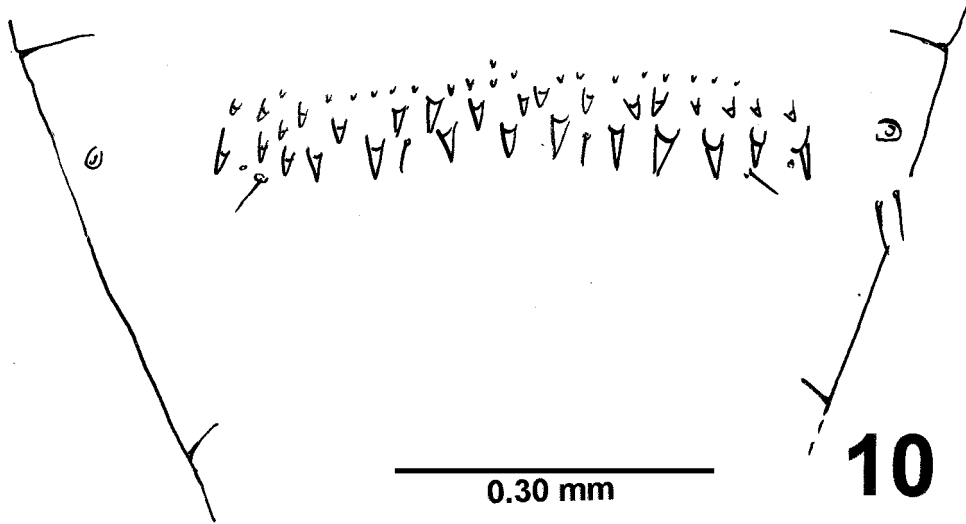
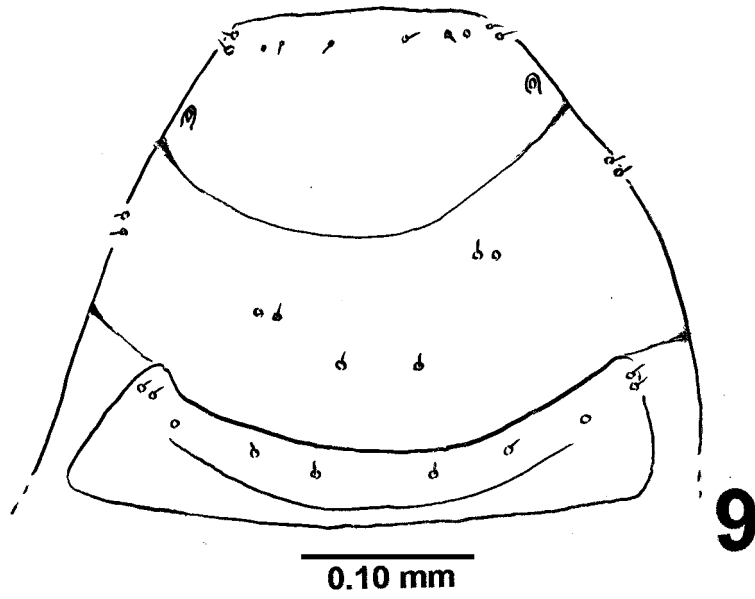
7

0,04 mm



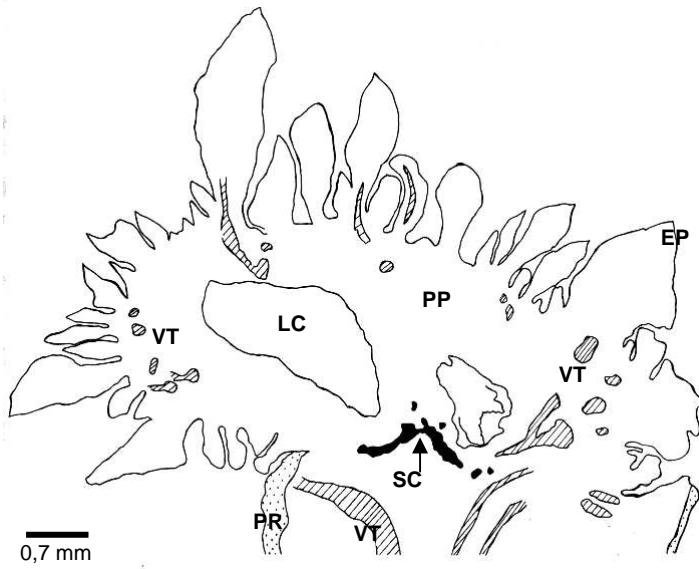
8

0.05 mm





11



12