



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS


Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



NINA DE CASTRO JORGE

**MOSAICO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E POTENCIAL
SINALIZADOR DOS VOLÁTEIS EM GALHAS INDUZIDAS POR
THYSANOPTERA EM *MYRCIA* spp.**



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 parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e
Diversidade Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



NINA DE CASTRO JORGE

**MOSAICO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E POTENCIAL
SINALIZADOR DOS VOLÁTEIS EM GALHAS INDUZIDAS POR
THYSANOPTERA EM *MYRCIA* spp.**

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 parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

**Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e
Diversidade Vegetal**

Orientador: Profa. Dra.: Rosy Mary dos Santos Isaias

Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Cavalleri

Universidade Federal do Rio Grande

BELO HORIZONTE – MG

2017

043

Jorge, Nina de Castro.

Mosaico de alterações estruturais e potencial sinalizador dos voláteis em galhas induzidas por *Thysanoptera* em *Myrcia* spp. [manuscrito] Nina de Castro Jorge. - 2017.

74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra.: Rosy Mary dos Santos Isaias. Coorientador: Prof. Dr. Adriano Cavalleri.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

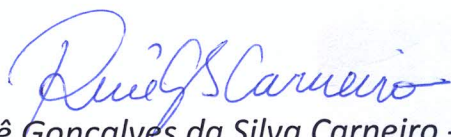
1. Fisiologia vegetal. 2. Myrtaceae. 3. Thysanoptera. 4. Galhas (Botânica). I. Isaias, Rosy Mary dos Santos. II. Cavalleri, Adriano. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581.1

**Dissertação defendida e aprovada, em 17 de fevereiro de 2017,
pela banca examinadora constituída pelos professores:**



Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias – orientadora - UFMG



Dr. René Gonçalves da Silva Carneiro - UFG



Dra. Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira - UFU

“Oh! Meu amor!
Viver
É todo sacrifício
Feito em seu nome.”

Dedico este trabalho à minha mãe, “asa do meu destino”.

Agradecimentos

“Ouvi dizer que só depende de mim fazer minhas fitas virarem”. “É necessário sempre acreditar que o sonho é possível, que o céu é o limite e você, truta, é imbatível.”. É certo que, atualmente, estar na posição em que me encontro hoje é raridade para nós, mulheres, pretas (os), pobres – e faveladas (os) – então “essa é para você, descendente de escravo, que não teve direito a indenização.”

“Da ponte pra cá, antes de tudo é uma escola.” e, sendo assim, gostaria de agradecer a Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Ciências Biológicas que foram meu segundo lar durante sete anos e a todos os grandes mestres que cruzaram meu caminho. Em especial a minha orientadora, Rosy Isaias, por todo apoio, oportunidade de crescimento e principalmente por ter me escolhido para fazer parte da família. Ao Fernando Vale, por ter sido o responsável pela minha paixão por botânica. Aos meus irmãos do Grupo Galhas, Anete Formiga -minha guru, Vinícius Moraes -meu gêmeo e fornecedor de todos os artigos, Bruno Ferreira, Renê Gonçalves, Cibele Bedetti, Gacielle Bragança e Thiago Magalhães, obrigada por todo conhecimento compartilhado, artigos trocados, experimentos acompanhados, em especial a Danielle Alvarenga, que foi parte fundamental desta dissertação. Sem ela, certamente, estes capítulos não seriam os mesmos, agradeço pelo acompanhamento nas coletas (as vezes com bastante adrenalina), pelos experimentos (com contas difíceis), e pela presença de sempre. Aos companheiros de laboratório, em especial à Ana Caroline Marques e a Camila Magalhães, obrigada pelo apoio incondicional, as horas de conversas, os aprendizados sobre a vida e pelas incontáveis risadas, vocês são incríveis! Ao Wagner Afonso, por todas as vezes que me socorreu em experimentos. Aos funcionários de Parque Estadual Serra Verde, em especial ao André Portugal Santana, obrigada por todo apoio, por cuidarem das minhas plantas na trilha, por me acompanharem em milhões de coletas e por compartilharem tanto conhecimento ao longos destes anos. Cada um de vocês, com seu jeito, constituiu um mosaico imenso de aprendizado.

“Hoje, por vocês eu vim, meus amigos são tudo pra mim, estamos juntos até o fim, tá no coração neguinho, irmão é irmão, é assim”. “Meus amigos, são antigos como meus ideais “.Só tenho a agradecer a todos os amigos de caminhada, “valor quem tem é quem tá comigo desde o começo, copo na mesa, risada, conversas são louvores, a quem é parceiro à vera”, a Clara Vaz de Mello -a melhor irmã que a vida me deu, a Mariana Dornas - minha companheira para as faltas de ar e insônias na madrugada, ao Alison Pelri

– o responsável pela grande volta que meu mundo deu, a Luiza Vieira – a pior conselheira de todas as horas, a Nathália Luísa Malacco – o grande exemplo dos aspirantes a mestre, ao Bonde – por todas as partidas jogadas, as risadas e as conversas, em especial ao Guilherme Silva pelo suporte técnico, ao Madrugadão – pelas incontáveis risadas, a família EJC – pelos momentos e oportunidades de crescimento espiritual, em especial ao Leonardo Sancho, artista responsável pela capa maravilhosa que compõem este texto. Sei que por muitas vezes só tive a oferecer a “minha presença, talvez até confusa, mas real e intensa”, mas apesar de toda correria e falta de tempo, eu “levo os dias com os irmãos, essa de bate cartão. Mas é isso, tem que ter a resposta todo dia, fazer o caminho, atrás dos dias de alegria”. Vocês são base fundamental de todas as conquistas, “sei que toda energia de vocês só vem para fortalecer”. “Amizade verdadeira, a gente sente. Eu posso ficar três vidas sem trombar que a gente é amigo pra sempre.”

Sobre nós, “uma dose só, dividida em dois copos”, que não se completam, mas transbordam, transformam, resplandecem. A você, Lucas Rubens Barbosa – meu namorado e melhor amigo, agradeço por ser calma enquanto eu era tempestade, obrigada por ser porto seguro.

“Proteja a raiz para que tenha bons frutos. Já diz o velho ditado: quem tá junto tá junto”. A minha família, base de tudo, agradeço imensamente por sempre acreditarem em mim e sempre me apoiarem, em especial a Verônica Cruz, prima-irmã de todas as horas, “eu me desenvolvo e evoluo” com você. Obrigada por ser exemplo, por ser amiga e por cuidar de mim.

Eu sou “o reflexo e o espelho do meu pai”, e com ele eu aprendi a correr atrás, a levantar cedo, a ir atrás do meu corre. Também aprendi a amar a distância e a ser presente por telefone. E, hoje, tenho a certeza que esteja onde estiver seremos um pelo outro até o fim. Ele, é meu “exemplo de vitórias, trajetos e glórias.” Agradeço imensamente pelo apoio constante, pelas broncas de sempre, por ser exatamente do jeito que é, e por ter feito de mim o que eu sou hoje. Sem o seu braço me apoiando certamente nada disso seria possível. É por você, também, toda essa caminhada. É para que você saiba que você, Cézar Jorge, é o melhor pai do mundo.

“Eu sempre quis chegar aqui e ver minha coroa onde eu sempre quis por, de turbante, chofer uma madame nagô”. A vida nos foi cruel “e o que eu quis foi gritar, por saber que minha mãe estava longe demais para visitar”, tão longe que impediu que você

visse nosso sonho se realizar, “mas eu não vou culpar Deus, o mundo é dos espertos. E lá no lugar dele eu também ia te querer mais por perto”. A cada dia vivido a obrigação de fazer valer cada coisa que eu aprendi com você, Margareth Jorge, cada noite de conversa, cada conselho que eu nunca escutei, cada boa noite, hoje faz falta. “Tenho medo de falhar, medo que chegue no fim e eu não tenha alcançado o que você esperava de mim”. Tudo que eu absorvi, o que contigo eu aprendi. Cada cintada nas pernas me fez aprender que eu tinha que ser calejada e forte para viver sem você”. “Chamei por ti nessa vida, e não te encontrava, mas hoje eu sei que não fiz nada sozinha, a cada passo, a cada respiração você estava dentro de mim”. A cada experimento, a cada frustração, a cada nova conquista, eu tenho certeza que você estava comigo, “em tudo eu ouvia a voz de minha mãe, em tudo eu via”. “E seja lá de onde for, me olhe por favor”.

Neste agradecimento eu quis deixar claro a minha origem, deixar claro as forças que me criaram e me moldaram e deixar ainda mais claro até onde a gente chegou. “Quem diz que mina não pode ser sensei?” Por que nós não vamos voltar para as senzalas, a casa grande terá que se acostumar cada vez mais com nossa presença aqui, e onde nós quisermos estar. “Tanta ofensa, luta intensa nega a minha presença. Chega! Sou voz das negras que integra resistência”. Nós vamos estar aqui, ocupando cada vez mais estes lugares que nos foram negados por tanto tempo. E no final “pros moleques da quebrada um futuro mais ameno é o que eu desejo”. “Unido a gente fica em pé, nunca se esqueça disso, entendeu? A rua é nós!”

“Eu que girei a maçaneta
Entrei e respeitei quem estava lá
Honrei meus ancestrais
Orei pra me abençoar.”

SUMÁRIO

Dedicatória.....	03
Agradecimentos.....	04
Epígrafe.....	07
Sumário.....	08
Resumo.....	09
Abstract.....	10
Introdução Geral.....	11
Capítulo I.....	14
A new leaf-galling <i>Holopothrips</i> (Thysanoptera: Phlaeothripidae) and the structural alterations om <i>Myrcia retorta</i> (Myrtaceae)	
Capítulo II.....	21
Distinct mosaic of alterations toward a convergent gall morphotype in Thysanoptera galls on <i>Myrcia</i> spp. (Myrtaceae)	
Capítulo III.....	49
Potencial sinalizador de voláteis em resposta à indução de galhas de enrolamento induzidas em <i>M. splendens</i> (Myrtaceae)	
Considerações Finais.....	73

Resumo

Estudos sobre galhas de Thysanoptera na região Neotropical são escassos e estima-se que diversas espécies de tripes indutores de galhas ainda não foram descritas por este motivo. Neste trabalho uma nova espécie de tripes galhador foi descrita, *Holopothrips striatus*, que induz galhas de dobramento/enrolamento em *Myrcia retorta*. Além disso, o estudo comparativo de duas galhas de dobramento/enrolamento em duas espécies de Myrtaceae, *Myrcia retorta* e *Myrcia splendens*, descreve processos distintos de desenvolvimento para a formação de uma mesma forma final. O mosaico de alterações observados nestas galhas, correspondente à áreas de hipersensibilidade, compactação e homogeneização do mesofilo, são gerados a partir da quebra ou não da polaridade adaxial-abaxial nas folhas. Este processo, mais expressivo em *M. retorta*, é desencadeado devido à idade da folha hospedeira no momento da oviposição, uma vez que o sinal para os domínios adaxiais e abaxiais são oriundos do meristema apical e desencadeiam respostas em folhas jovens. Como a indução de galhas em *M. splendens* se dá em folhas maduras o que se observa é a manutenção da diferenciação do mesofilo e menor resposta da folha aos danos gerados pelo galhador. Estes resultados destacam que, apesar do hábito alimentar ser importante para a formação das galhas, ele não é o único fator determinante. As restrições impostas pela planta hospedeira, a idade da folha hospedeira, além dos hábitos de oviposição também são cruciais para determinar o desenvolvimento das galhas. As alterações estruturais observadas nestas galhas, corroboram sua classificação como galhas verdadeiras, refutando a ideia de que seriam pseudogalhas, devido ao fato de serem permanentemente abertas, encontradas somente em folhas e não apresentarem neoformação de tecidos. Ambas as galhas apresentam processos morfogenéticos distintos, planta-dependentes, e convergiram para a mesma forma e função final. Às alterações estruturais somam-se as alterações químicas, especialmente em relação a voláteis que atuam como biomarcadores e na sinalização entre planta-inseto e entre planta-planta na população de *Myrcia splendens*. Apesar de consideradas simples, os sistemas Thysanoptera-*Myrcia* spp. aqui estudados apresentaram alterações estruturais e químicas bastante relevantes e se mostraram excelentes modelos de estudo para o entendimento dos processos de desenvolvimento vegetal e das potencialidades químicas envolvidas na indução das galhas. Além disso, as galhas são modelos potenciais para aumentar o conhecimento sobre a entomofauna na região neotropical.

Palavras-chave: domínios adaxial-abaxial, galhas de dobramento e enrolamento, *Holopothrips striatus*, Myrtaceae, tripes galhadores

Abstract

Studies on Thysanoptera galls in the Neotropical region are scarce, and many species of inducers are yet to be described. This research presents the description of a new species of galling Thysanoptera, *Holopothrips striatus*, which induces fold/roll galls on *Myrcia retorta*. In addition, the comparative study of these galls with those induced by an undescribed species of Thysanoptera on *Myrcia splendens* describes distinct developmental processes for the two fold/roll galls. The mosaic of alterations observed in these galls, corresponding to areas of hypersensitivity, and compactness and homogenization of mesophyll, which are generated by the impairment of leaf adaxial-abaxial polarity in distinct levels. This impairment, most expressive in *M. retorta*, is a result of leaf age by the time of oviposition. For the signaling for the establishment of the adaxial and abaxial domains originates from the apical meristem and promotes responses in young leaves. As the induction of galls on *M. splendens* occurs in mature leaves, the alterations are less expressive. Current results show that although the feeding habit is important for the determination of gall shape, it is not the only determinant factor. The constraints imposed by the host plant, the age of the host leaves, as well as the oviposition habits are also crucial for gall development. The observed structural alterations led us to conclude that *Myrcia* galls are true galls, refuting the concept of pseudogalls, based on the fact that they are permanently open, found only in leaves and do not present the tissue neoformation. Both galls have morphogenetic similarities, plant-dependent processes, and converged in form. In addition, an analysis of the chemical profile of the galls induced on *M. splendens* points out the role of volatiles in the signaling of stress and attraction or repellency of the gall inducers. Structural alterations are followed by chemical alterations to several signaling pathways, triggering direct and indirect defenses in the host plant. Although considered simple, the Thysanoptera-*Myrcia* spp. presented in this study, have important structural and chemical alterations and proved to be excellent models for the understanding of the processes of plant development and the chemical potential involved in the gall induction. In addition, galls are potential model for improving the knowledge on Neotropical entomofauna.

Key words: adaxial-abaxial domains, fold/roll galls, *Holopothrips striatus*, Myrtaceae, Thysanoptera galls

Introdução Geral

Tripes são comumente relatados como insetos galhadores e suas galhas são comuns nos trópicos. Embora a maior parte dos tripes galhadores sejam membros da subordem Tubulifera, há casos de galhas induzidas por insetos da subordem Terebrantia (Ananthakrishnan 1978). As galhas induzidas por estes insetos geralmente são foliares e mais simples do que as induzidas por dípteras ou hemípteras (Mani 1964), e são relativamente pouco conhecidas (Ananthakrishnan 1992), especialmente nos Neotrópicos. O estudo de galhas de Thysanoptera é escasso e estima-se que diversas espécies de tripes indutoras de galha ainda não tenham sido descritas por este motivo (Mound 2005). Neste trabalho uma nova espécie de tripes galhador, *Holopothrips striatus*, que induz galhas de dobramento/enrolamento em *Myrcia retorta*, é descrita.

Myrtaceae é a terceira família mais susceptível a formação de galhas de tripes, ficando atrás de Moraceae e Mimosae, respectivamente (Ananthakrishnan 1978). As galhas de tripes podem apresentar-se simples, como enrolamento ou dobramento da lâmina foliar ou como um conjunto de diversas anormalidades estruturais que evoluem para mudanças mais complexas no tecido galhado. Estas alterações são resultantes do estímulo provocado pela alimentação do galhador (Ananthakrishnan 1978). Embora estas galhas possam ser encontradas em todos os órgãos vegetais, o mais comum é que sejam induzidas nas folhas, com poucos casos de galhas induzidas nas gemas e caules (Ananthakrishnan 1978).

Por serem permanentemente abertas, induzidas majoritariamente em folhas e não apresentarem neoformação de tecidos, estas galhas foram previamente consideradas pseudogalhas (Chen e Qiao 2012). No entanto, apesar de rudimentares estas novas estruturas ocasionam novas funcionalidades ao órgão e promovem a formação de um microambiente favorável à vida do galhador (Stone e Schonrögge 2003), além de apresentarem alterações estruturais, e por isso são consideradas galhas verdadeiras (Mani 1964).

O presente estudo comparativo de duas galhas de dobramento/enrolamento induzidas por Tripes em espécies cogenéricas de *Myrcia*, *M. retorta* e *M. splendens*, mostra alterações estruturais ocorridas para a formação do morfotipo final. Apresentamos também evidências de que a formação de um mesmo morfotipo é dependente não apenas do hábito alimentar do galhador, mas também de restrições morfogenéticas impostas pela

planta hospedeira. Restrições estas que podem estar relacionadas à idade da folha hospedeira no momento da oviposição, isso por que, a idade deste estabelecimento é crucial para a manutenção ou não dos domínios adaxial e abaxial, e consequente crescimento e desenvolvimento das galhas (Yamaguchi 2012).

Sabe-se que a lesão mecânica e/ou a liberação de substâncias por parte dos insetos causa a indução da galha e altera o desenvolvimento e a diferenciação dos tecidos vegetais (Mani 1964; Meyer e Maresquelle 1983). Além disso, a presença das galhas provoca alterações na produção de metabólitos e na emissões de voláteis nas plantas hospedeiras (Tooker 2002, 2004 e 2006), como observado para *M. splendens*. Estes voláteis podem atrair inimigos naturais ou ainda servir na emissão de sinais de localização para atração de parceiros (Tooker 2002, 2004 e 2006), além de serem potenciais sinalizadores de estresse para plantas na vizinhança (Simpson et al 2011). O estudo da mudança no perfil químico de voláteis devido a indução das galhas discute mecanismos de sinalização de estresse e atração de parceiros para reprodução ou para defesa contra inimigos naturais.

Ananthakrishnan, T.N. (1978). Thrips galls and gall thrips. Technical Monograph of the Zoological Survey of India, 1, 1–69.

Ananthakrishnan, T.N. (1992). Unique aspects in the biology of thrips-induced galls. In: J. D. Sorthouse e O. R. pp. 185-195.

Chen, J. and Qiao, G.X. (2012). Gallling Aphids (Hemiptera: Aphidoidea) in China: Diversity and Host Specificity. *Psyche*, 1-11. doi: 10.1155/2012/621934.

Mani, M. S. (1964). Ecology of plant galls. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.

Meyer, J. e Maresquelle, H. J. (1983). Anatomie des galles. Gerbruder Borntraeger, Berlin.

Mound, L. A. and Morris, D. C. (2005). Gall-inducing thrips: an evolutionary perspective. Pp. 59-72 in Raman, A. Schaefer CW and Withers, T.M. (eds) Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods. Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA

Simpson, M., Gurr, G.M., Simmons, A.T., Wratten, S.D., James, D.G., Leeson, G. e Nicol, H.I. (2011): Insect attraction to synthetic herbivore-induced plant volatile-treated field crops. *Agricultural and Forest Entomology*, 13, 45-57.

Stone, G.N. e Schonrögge, K. (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(10), 512-522.

Tooker, J.F., Koenig, W.A., Hanks, L.M. (2002). Altered host plant volatiles are proxies for sex pheromones in the gall wasp *Antistrophus rufus*. *P Nat Acad Sci*, 99, 15486-15491.

Tooker, J.F., Hanks, L.M. (2004). Stereochemistry of host plant monoterpenes as mate location cues for the gall wasp *Antistrophus rufus*. *J Chem Ecol*, 30, 473-477.

Tooker, J.F., Hanks, L.M. (2006). Tritrophic interactions and reproductive fitness of the prairie perennial *Silphium laciniatum* Gillette (Asteraceae). *Environ Entomol*, 35, 537-545.

Yamaguchi, T., Nukazuka, A. and Tsukaya, H. (2012). Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant cell physiol*, 53,1180-1194.



A new leaf-galling *Holopothrips* (Thysanoptera: Phlaeothripidae) and the structural alterations on *Myrcia retorta* (Myrtaceae)

NINA CASTRO JORGE¹, ADRIANO CAVALLERI², CIBELE SOUZA BEDETTI¹
& ROSY MARY DOS SANTOS ISAIAS^{1,3}

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal. Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rua Mal. Floriano Peixoto, 2236, São Lourenço do Sul, RS, Brazil

³Corresponding author. E-mail: rosy@icb.ufmg.br

Abstract

Holopothrips striatus sp. n. is described inducing leaf-galls on *Myrcia retorta* (Myrtaceae) in Southern Brazil. The thrips is one of the few species of *Holopothrips* known to have the metanotum with striate rather than reticulate sculpture. The galls are green with brownish spots, and are characterised by a mix of folding and rolling of the leaf lamina upwards.

Key words: Neotropics, leaf-gall, phenolic compounds, thrips, hypertrophy, hyperplasia

Introduction

More than 350 species of Thysanoptera are known to induce galls in many unrelated plants (Crespi *et al.* 1997; ThripsWiki 2016). The majority of these thrips belong to the family Phlaeothripidae, and their galls arise in response to the feeding stimulus of one or more individuals (Mound 1994).

Almost all known Thysanoptera galls are restricted to leaf tissues, but may exhibit a wide range of morphological and developmental features. In some galls, the developmental processes involve simple alterations in the morphogenesis of the axis of leaf lamina expansion, resulting in the curling, folding and rolling of host leaves (Ananthkrishnan & Raman 1989). Some galls occur as simple curls, rolls and folds, while others are complex malformations such as rosettes, pouches and horns (Raman & Ananthkrishnan 1983). Even though cell hypertrophy and tissue hyperplasia are striking processes in gall induction by thrips, some authors refer to Thysanoptera galls as rudimentary, assuming that there is no new tissue differentiation (*cf.* Souza *et al.* 2000). This peculiarity might be true for most of the galls induced by *Liothrips* and *Gynaikothrips* species, which induce relatively simple leaf-galls. However, a few species of thrips induce more complex structures as pouch-galls, such as those induced by *Kladothrips* species on many Australian *Acacia*. These galls form a closed chamber when mature, contrasting with the majority of thrips-induced galls, which are open to invasion by predators, inquilines and kleptoparasites (see Crespi *et al.* 2004).

Gall inducing thrips are widely distributed in tropical areas, nevertheless, taxonomic and biological knowledge about them is largely restricted to Australia and Asia (Ananthkrishnan & Raman 1989; Mound 1994). Some studies indicate that the galling behaviour is also widespread in the Neotropics, and especially common in several species of the genus *Holopothrips* and its relatives *Mixothrips* and *Plagiathrips* (Mound & Marullo 1996; Cavalleri & Kaminski 2007; Cabrera & Segarra 2008; ThripsWiki 2016). The knowledge on structural alterations induced by galling thrips, however, seems to be restricted to the *Gynaikothrips* complex on *Ficus* spp., and in a few other Asian species (Ananthkrishnan & Raman 1989; Souza *et al.* 2000; Retana-Salazar & Sánchez-Chacón 2009). Moreover, the poor information on host plants and the way of life of thrips compromises taxa recollection and identification. In this sense, data on the biology of Neotropical thrips can be useful for delimiting species and understanding the evolution of the galling behaviour in Thysanoptera.

The genus *Holopothrips* comprises about 35 species and is widely distributed in South and Central America. Unfortunately, almost all of these species were described without any biological data or host plant information, jeopardizing any further study on their ecology. Possibly, the majority of *Holopothrips* species induce galls on leaves of various host plant species, but some are known to occupy galls of other gall-inducing insects, including Diptera and other Thysanoptera (Mound 2002; Cavalleri & Kaminski 2007; Zamora *et al.* 2015; Lindner *et al.* 2016).

The present paper describes a new species of gall inducing *Holopothrips* from *Myrcia retorta* (Myrtaceae), that induces leaf fold/roll galls, which are herein structurally characterized.

Material and methods

Sampling of host leaves, galls and insects. Non-galled leaves and galls at mature stage were collected at Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza Pró-Mata, São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brazil (29°29'16"S 50°12'04"W). The characterization of the gall morphotype followed Isaias *et al.* (2013). The mature galls were visually defined by the complete folding/rolling of leaf lamina, and 50–70% of the surface occupied by areas of hypersensitive response (HR).

All thrips specimens were fixed in 60% ethanol, and prepared on microscope slides using a standard procedure (Mound & Marullo 1996). The holotype is deposited in the Thysanoptera collection of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil and paratypes will also be available in Australian National Insect Collection (ANIC), Canberra, Australia.

Abbreviations: The following terms are used in the thrips description: po-postocular setae; pronotal setae: am-antennomarginals, aa-anteroangulals, ml-midlaterals, ep-epimerals, pa-posteroangulals; tergite IX setae: S1-pair nearest to midline, setae S2-major setae lateral to S1 setae.

Anatomical and histochemical analysis. For anatomical observations, non-galled leaves and mature galls ($n \geq 5$) were fixed in FAA (Johansen 1940), gradually dehydrated in an *n*-butyl series (from 50% to 100% butanol), and embedded in Paraplast® (Kraus & Arduin 1997). The samples were sectioned (12 µm) in a rotatory microtome (Leica 2035 BIO-CUT®), deparaffinized, and stained in astra blue-safranin 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modified to 0.5%). Part of the samples was fixed in 2% ferrous sulfate in 10% formalin (Johansen 1940) for checking the occurrence of phenolic compounds in HR sites. The slides were mounted with colorless varnish Acrilex® (Paiva *et al.* 2006), and the images were obtained with a photomicroscope (Leica ICC50 HP®).

Results

Holopothrips striatus sp. n.

(Figs 1, 3–9)

Macropterous female. Body uniformly dark brown including legs, fore tarsi somewhat paler; antennal segment I concolorous with head, II brownish at basal 2/3 and yellowish at tip, III–IV largely yellow but lightly shaded in apical third; V–VI with apical half brown; VII and VIII uniformly brown; fore wings pale but scale brown; without median dark line; tube dark brown at basal third and paler at apex.

Head about 1.4 times as long as greatest width (Fig. 4), cheeks straight and with faint lines of transverse reticulation; eyes about 0.4 times as long as head and not holoptic; po long and dilated at tip; maxillary stylets not retracted as far as po and about 1/3 of head width apart; antennae slender and 8-segmented, III and IV with three simple sense cones each; segment VI and VII with a narrow basal neck, segment VIII not broadly joined to VII (Fig. 5). Mouth-cone pointed and reaching ferna (Fig. 3).

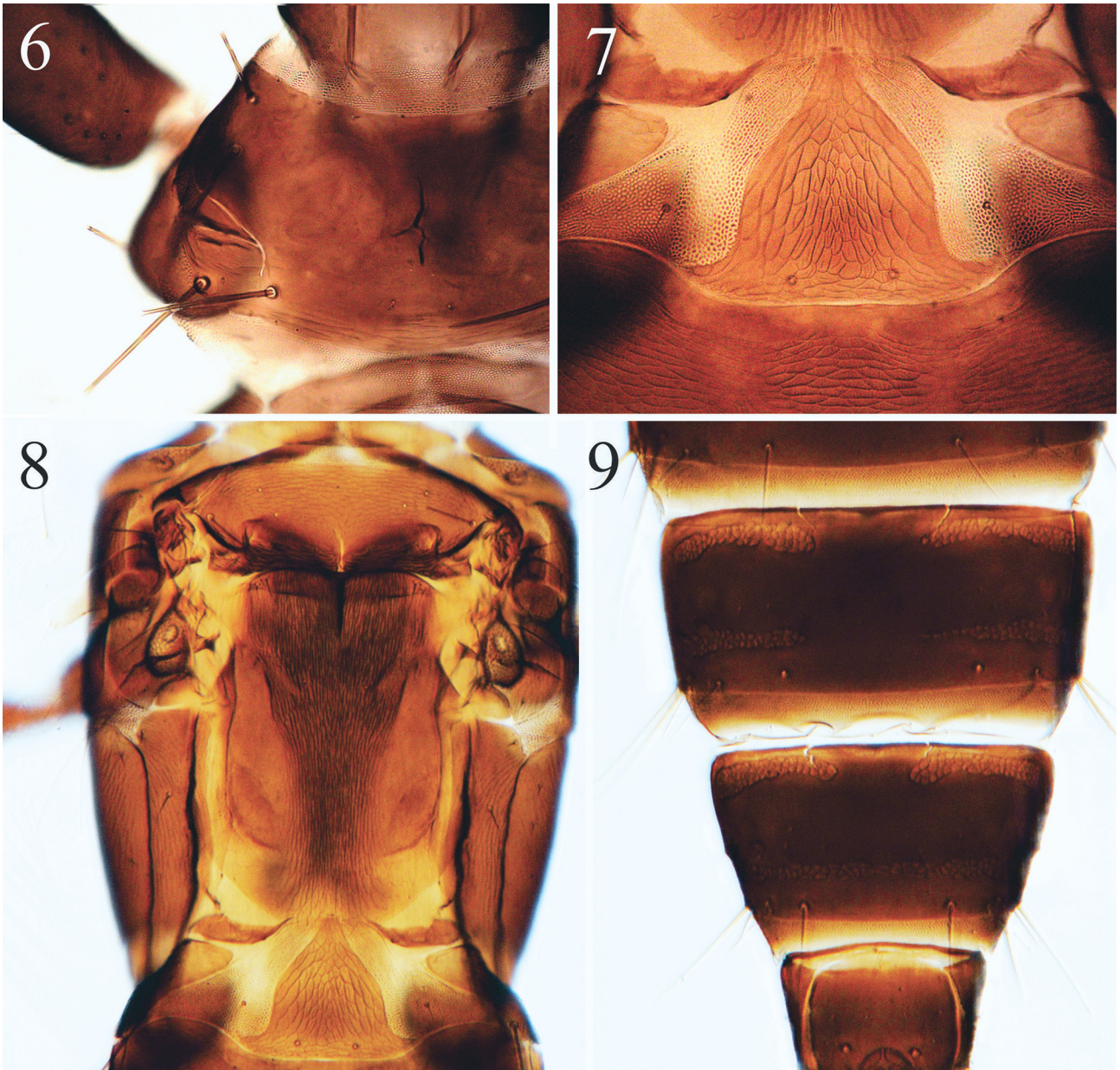
Pronotum transverse and smooth; four pairs of long and capitate setae, only one pair of elongate setae on epimera, am pointed and short, usually not longer than discal setae (Fig. 6); prosternum with well-developed ferna and basantra sometimes faintly sclerotized (Fig. 3); epimeral sutures incomplete; mesonotum with elongate transverse reticles; metanotum closely striate and with few internal markings (Fig. 8); fore wings parallel sided, each with three long and capitate setae arising basally and about 15 duplicated cilia. Pelta reticulate and triangular

in shape, but with distinct lateral lobes extending posteriorly (Fig. 7); paired campaniform sensilla present; abdominal tergites II–VII each with three pairs of wing-retaining setae; tergite IX setae S1 and S2 long and acute; length of tergite X about 0.65 of head length. Spermatheca not enlarged.

Measurements of female (holotype), in microns: Length about 2,875; head length 325, greatest width across cheeks 225, po length 80, eye dorsal length 135, interval between eyes (dorsal) 72; median length of pronotum 160, width 300, am length 20, aa length 48, ml length 58, ep length 107, pa length 105; tergite IX setae S1 262, S2 277; tergite X length 212, basal width 100, apical width 50; length (width) of antennal segments II–VIII 62(30), 100(35), 88(35), 85(32), 75(27), 70(22), 37(12), respectively.



FIGURES 1–5. *Holopothrips striatus*. (1) Male. (2) Larva. (3) Ventral view of head and prosternum. (4) Dorsal view of head. (5) Antenna.



FIGURES 6–9. *Holopothrips striatus*. (6) Pronotum (left side). (7) Pelta. (8) Dorsal view of pterothorax and first abdominal segment. (9) Male abdominal sternites VII–VIII.

Macropterous male. Similar to female in structure and coloration, though smaller and with fore tibiae and tibiae paler (Fig. 1); abdominal sternites VII and VIII each with one transverse pore plate extending across the posterior region (interrupted medially on VII) and two oval pore plates placed anterolaterally (Fig. 9); S2 setae on abdominal tergite IX acute and not shortened.

Measurements of male (paratype): Length about 2,625; head length 293, greatest width across cheeks 210, po length 77; tergite IX setae S1 225, S2 247; length (width) of antennal segments II–VIII 60(30), 97(30), 80(32), 75(30), 70(22), 62(22), 32(12), respectively.

Larva II. Body color largely white but antenna and abdominal segments IX–X brown, transverse bands of red internal pigmentation present in thorax and abdomen (Fig. 2).

Material examined. Holotype female, **Brazil**, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula, 17.ii.2014, on *Myrcia retorta* galls (A. Cavalleri) (UFRGS 3451). Paratypes: 2 females, 3 males collected with holotype.

Remarks. *Holopothrips striatus* might be related to *H. orites* from Peru, which also exhibits a long head and a closely striate metanotum. This type of metanotal sculpture is found only in few species of *Holopothrips*, with most species bearing elongate or equiangular reticles medially on the metanotum. The Brazilian *H. affinis*, *H. erianthi*

and *H. omercooperi* also have a striate metanotum but the head shape and maxillary stylet position are distinct from *H. striatus* (Table 1). The male sternites of these species also bear pore plates of similar shape to *H. striatus*, but in *H. affinis* and *H. erianthi* these structures are present on VI–VIII, whereas *H. omercooperi* has pore plates only on VIII. Moreover, the pelta of *H. striatus* is unusual in having lateral lobes.

The recognition of *Holopothrips* species is usually problematic due to extensive morphological variation within and between populations (Mound & Marullo 1996; Cavalleri & Kaminski 2007), and the only available key to species (Mound & Marullo 1996) does not include the species described in the last 20 years (see ThripsWiki 2016). Moreover, approximately 50% of the Brazilian species were described without any host-plant information or observation on their way of life. Information regarding the biology of these thrips certainly can be useful for delimiting species and understanding the origin of the galling behaviour in this group. Many *Holopothrips* species have been considered as gall-inducers, but no attempt has been made previously to investigate the tissue alterations induced by this lineage of Neotropical thrips.

TABLE 1. Morphological comparison of the *Holopothrips* species with longitudinal striate sculpture on metanotum. L:W=Length/width ratio; am=pronotal anteromarginal setae.

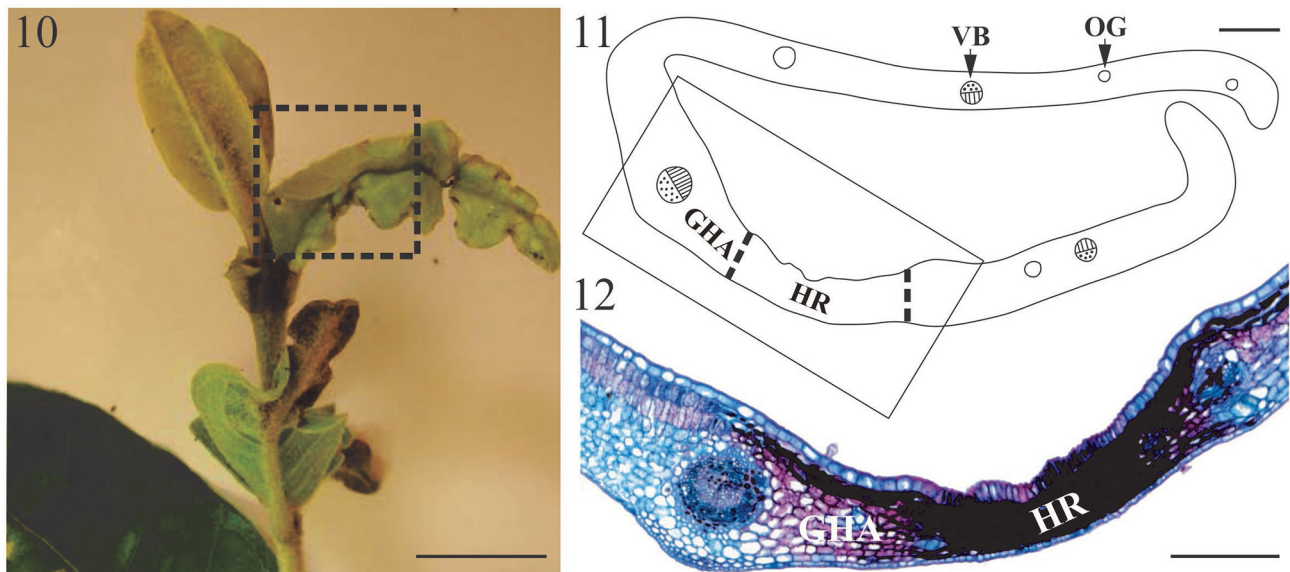
Species	Head L:W	Maxillary stylets	AM setae	Male sternal pore plates
<i>H. affinis</i> (Bagnall)	1.1	wide apart and not retracted as far as PO setae	very short, rarely larger than discal setae	VI–VIII
<i>H. erianthi</i> (Hood)	1.3	retracted as far as PO and close together medially	well-developed	VI–VIII
<i>H. omercooperi</i> (Bagnall)	1.2	wide apart and not retracted as far as PO setae	well-developed	VIII only
<i>H. orites</i> Hood	1.6	close together medially and retracted as far as PO setae	well-developed	unknown
<i>H. striatus</i> sp. n.	1.4	wide apart and retracted to basal third of head length	very short, rarely larger than discal setae	VI–VIII

Myrcia retorta galls

Holopothrips striatus induces green galls with brown spots, on the upper surface of *Myrcia retorta* leaves, provoking a fold/roll movement of leaf lamina upwards, along both sides of the mid rib (Figs 10–11). The galling insects develop inside a chamber formed by the whole leaf, which shelters an aggregation of *H. striatus* in all stages of development. The number of thrips per gall is variable, but more than 30 individuals (among immature and adults) were observed living in a single gall. The main feature of this gall is the alternation of sites with homogeneous cells and sites of HR along the altered leaf lamina. The cells of the homogeneous galled areas are alive, while the cells of the HR areas accumulate dense phenolic content (Fig. 12). The galls are permanently open, and allow the communication of the thrips with the outer environment.

Discussion

Holopothrips striatus shares its host plant, *Myrcia retorta*, with two species of Cecidomyiidae, and induces leaf fold/roll galls previously described for a cerrado area in Minas Gerais state (Fernandes *et al.* 1988, Maia *et al.* 2009). *H. striatus* galls is the only leaf fold/roll morphotype on *M. retorta*, and its peculiar brown spots are product of local hypersensitive responses. Brown spots have been associated with necrotic epidermal cells on thrips-induced galls, such as *Teuchothrips longus* on *Pavetta hispidula*, *Liothrips karnyi* on *Piper nigrum*, and *Liothrips viticola* on *Vitis lanceolaria* (Ananthakrishnan & Raman 1989). The brown spots that are indicative of HR and are observed in *H. striatus* galls on *M. retorta* have also been reported for the galls induced by *Gynaikothrips ficorum* on *Ficus microcarpa* (Souza *et al.* 2000).



FIGURES 10–12. Galls induced by *Holopothrips striatus* on leaves of *Myrcia retorta*. **(10)** Stem branch with leaf fold/roll galls. **(11)** Final form of leaf fold/roll gall morphotype on *Myrcia retorta*. (GHA) Gall homogeneous area; (HR) Hypersensitive area; (VB) Vascular bundles; (OG) Oil glands. **(12)** Anatomy of a gall, evidencing the mesophyll divided into homogeneous area and hypersensitive area. **Scale bars: 10: 2cm, 11–12: 200µm.**

The process of leaf fold/roll is peculiar to *H. striatus* galls on *M. retorta*, and is one of the predominant shapes of Thysanoptera galls, in which cell hypertrophy and tissue hyperplasia are not restricted to the epidermis (Maia 2009). Processes of leaf fold/roll induced by galling thrips involve cell stretching and hypertrophy, erratically periclinal cell divisions, anticlinal hyperplasia, and cell necrosis (Ananthakrishnan & Raman 1989). The HR areas, typical of *H. striatus* activity on *M. retorta* leaves, indicate sites of cell necrosis and death, and forces leaf lamina fold/roll toward its upper surface. While necrotic responses in thrips-induced galls are usually restricted to a group of epidermal cells, HR responses in the galls of *H. striatus* spread all over the mesophyll. This is indicative of a continuous process triggered by the feeding activity of the inducer, and spread in mesophyll cells by the disturbance in the balance between oxidative and reductive processes, which leads to phenolics accumulation, and cellular breakdown (Cruickshank 1980; Kiraly 1980; Staskawicz *et al.* 1995).

In galled leaves of *M. retorta*, the entire leaf lamina may fold/roll as occurs in the galls of *H. claritibialis* on *Mollinedia schottiana* (Monimiaceae) (Cavalleri & Kaminski 2007). Although structurally simple, i.e., without conspicuous neof ormation of specialized plant cells, the open galls induced by *H. striatus* seem to be very effective in sheltering a large number of *Holopothrips* and occasional inquilines. Moreover, the leaf fold/roll morphotype is only part of the large diversity of shapes and types of galls associated with *Holopothrips* species. Among South American species, *H. conducans* induces rosette galls on *Myrcia splendens*, whereas many others induce lenticular, globoid or kidney-shaped galls on leaves of several Myrtaceae in Brazil (A.C., unpublished data). Future studies on the mechanisms of gall induction by *Holopothrips* may help to understand and to build a comparative framework among galls induced by different congeneric species and lineages of galling Thysanoptera in the Neotropics.

Acknowledgments

The authors thank to FAPEMIG, CNPq, CAPES for financial support.

References

- Ananthakrishnan, T.N. & Raman, A. (1989) Morphology of Galls. In: Ananthakrishnan, T.N. & Raman, A. (Eds.), *Thrips and Gall Dinamics*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, pp. 67–73.
- Bukatsch, F. (1972) Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, 61 (8), 225–255.
- Cabrera, I. & Segarra, A. (2008) A new gall-inducing species of *Holopothrips* (Thysanoptera: Phlaeothripinae) from *Tabebuia* trumpet trees in the Caribbean region. *Florida Entomologist*, 91 (2), 232–236.
[http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040\(2008\)91\[232:angsoh\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040(2008)91[232:angsoh]2.0.co;2)
- Cavalleri, A. & Kaminski, L.A. (2007) A new *Holopothrips* species (Thysanoptera: Phlaeothripidae) damaging *Mollinedia* (Monimiaceae) leaves in southern Brazil. *Zootaxa*, 1625, 61–68.
- Crespi, B.J., Carmean, D.A. & Chapman, T.W. (1997) Ecology and evolution of galling thrips and their allies. *Annual Review of Entomology*, 42, 51–71.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.51>
- Crespi, B.J., Morris, D.C. & Mound, L.A. (2004) *Evolution of ecological and behavioural diversity: Australian Acacia thrips as model organisms*. Australian Biological Resources Study & Australian National Insect Collection, CSIRO, Canberra, 328 pp.
- Cruickshank, I.A.M. (1980) Defences triggered by the invader: hypersensitivity. *Plant Diseases*, 5, 247–267.
- Fernandes, G.W.A., Tameirão-Neto, E. & Martins, R.G. (1988) Ocorrência e caracterização de galhas entomógenas na vegetação do Campus Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zoologia* 5 (1), 11–29.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0101-81751988000100002>
- Isaias, R.M.S., Carneiro, R.G.S., Oliveira, D.C. & Santos, J.C. (2013) Illustrated and Annotated Checklist of Brazilian Gall Morphotypes. *Neotropical Entomology*, 42, 230–239.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13744-013-0115-7>
- Johansen, D.A. (1940) *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Company Inc., 523 pp.
- Kiraly, Z. (1980) Defences triggered by the invader: hypersensitivity. *Plant Diseases*, 5, 201–225.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-356405-4.50018-6>
- Kraus, J.E. & Arduin, M. (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, Rio de Janeiro, 198 pp.
- Lindner, M.F., Mendonça Jr., M.S. & Cavalleri, A. (2016) *Holopothrips molzi* sp.n. (Thysanoptera, Phlaeothripidae): natural history and interactions in Myrtaceae galls. *Zootaxa*, 4114 (2), 139–148.
- Maia, V.C., Fernandes, G.W. & Negreiros, D. (2009) A new genus and species of gall midge (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Myrcia retorta* (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 53 (1), 38–40.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0085-56262009000100010>
- Mound, L.A. (1994) Thrips and gall induction: a search for patterns. In: Williams, M.A.J. (Ed.), *Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations*. Systematics Association Special Volume 49. Clarendon Press, Oxford, pp. 131–149.
- Mound, L.A. (2002) Thysanoptera biodiversity in the Neotropics. *Revista de Biologia Tropical*, 50, 477–484.
- Mound, L.A. & Marullo, R. (1996) The thrips of Central and South America: an introduction (Insecta: Thysanoptera). *Memoirs on Entomology, International*, 6, 1–488.
<http://dx.doi.org/10.2307/3495826>
- Paiva, J.G.A., Fank-De-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P. & Graciano-Ribeiro, D. (2006) Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botânica Brasileira*, 20 (2), 257–264.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062006000200002>
- Raman, A. & Ananthakrishnan, T.N. (1983) Studies on some thrips (Thysanoptera: Insecta) induced galls. 2. Fine-structure of the nutritive zone. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 49 (6), 525–561.
- Retana-Salazar, A.P. & Sánchez-Chacón, E. (2009) Anatomía de la agalla em *Ficus benjamina* (Moraceae) associada a “thrips” (Tubulifera: Phlaeothripidae). *Revista de Biologia Tropical*, 57 (1), 179–186.
- Souza, S.C.P.M., Kraus, J.E., Isaias, R.M.S. & Neves, L.J. (2000) Anatomical and ultrastructural aspects of leaf galls in *Ficus microcarpa* L.F. (Moraceae) induced by *Gynaikothrips ficorum* Marchal (Thysanoptera), 14 (1), 57–69.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. & Jones, D.G. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268, 661–667.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.7732374>
- ThripsWiki (2016) *ThripsWiki - providing information on the World's thrips*. Available from: http://thrips.info/wiki/Main_Page (accessed 15 February 2016)
- Zamora, S., Hanson, P. & Mound, L.A. (2015) *Holopothrips chaconi* sp. n. (Thysanoptera: Phlaeothripinae) from leaf-vein galls on *Piper* species (Piperaceae) in Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical*, 63 (4), 1035–1042.

1 **Distinct mosaic of tissue alterations toward a convergent gall morphotype in**

2 **Thysanoptera galls on *Myrcia* spp. (Myrtaceae)**

3 Nina de Castro Jorge¹, Danielle Ramos Alvarenga¹, Adriano Cavalleri², Rosy Mary dos

4 Santos Isaias*¹

5 ¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento

6 de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal. Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha.

7 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ninacjorge@gmail.com;

8 daniralvarenga@hotmail.com.

9

10 ²Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Rua Mal.

11 Floriano Peixoto, 2236, São Lourenço do Sul, RS, Brazil.

12 cavalleri_adriano@yahoo.com.br.

13

14 *Corresponding author: Rosy M. S. Isaias. Phone: +553134092687. Fax:

15 +553134092671. E-mail: rosy.isaias@gmail.com.

16

17

18

19

20

21

22

23

24 **Abstract**

25 Thysanoptera-induced galls have no plant tissue neof ormation, which defines them as
26 pseudogalls. On the other hand, true galls develop in response to the gall inducer
27 behavior, as well as to constraints imposed by host plant morphogenesis. Moreover, the
28 younger the host tissues are, more ample tissue alterations should be in response to gall
29 induction. To check these concepts, two Thysanoptera-induced fold/roll galls on *Myrcia*
30 *retorta* and *M. splendens* (Myrtaceae) were investigated. The galls of *Holopothrips*
31 *striatus* (suborder Tubulifera) on *M. retorta* have the adaxial-abaxial pattern of leaf
32 lamina impaired, which culminates in areas of homogeneous cells alternated to
33 hypersensitive reactive areas. The galls of an undescribed species of Thripinae
34 (suborder Terebrantia) on *M. splendens* maintain their adaxial-abaxial domains, have
35 sites of mesophyll compactness interspersed to small necrotic spots, and air cavities.
36 Both fold/roll galls are true galls, with distinct mosaics of tissue alterations, as
37 consequence of the age of host leaves by the time of gall induction, which also
38 determine the impairment of the adaxial-abaxial domains. Such impairment constrains
39 the total leaf rolling on *M. retorta* galls, whereas the adaxiality maintenance in *M.*
40 *splendens* allows the continuity of leaf developmental pattern and the complete rolling
41 of the gall.

42 **Keywords:** Adaxial-abaxial polarity, fold/roll gall, hypersensitive reaction, *Myrcia*
43 galls, thysanoptera galls

44

45

46

47

48 **Introduction**

49 Galls can be defined as structures derived from the abnormal development of
50 host plant tissues (Shorthouse 2005, Raman 2007). They result from the interaction
51 between galling organisms and their host plants, and demand a highly complex and
52 intimate interaction between the associated individuals (Shorthouse 2005, Raman 2007).
53 These structures are also referred as the extended phenotype of their inducers, for
54 although they are composed of plant tissues, their development is controlled by the
55 genes of the galling organism (Stone and Schönrogge 2003). Herein, we revisit the
56 concept of pseudogalls, whose definition implies in no neoformation of plant tissues, in
57 two Thysanoptera-induced leaf galls. We take for granted that even simple galls may
58 have distinct levels of alterations in their host plant genotypes, and that leaves hosting
59 galling insects usually have modifications in their adaxial-abaxial polarity (Fukushima
60 and Hasebe 2014), which culminate in tissue reorganization in several degrees in gall
61 developmental sites. The alterations in the adaxial-abaxial patterning system can be the
62 major driving force in the generation of diverse leaf forms in angiosperms (Yamaguchi
63 2012), which also seems to be true for the development of the variety of shapes and
64 levels of complexity observed in leaf galls.

65 Galling thrips (Thysanoptera) induce both true and pseudogalls (Chen and Qiao
66 2012), whose distinction may rely on the degrees of alterations, and consequently on the
67 rupture in the adaxial-abaxial leaf organization. Such rupture starts with the contact of
68 these insects with the epidermal cells of their host leaves, which respond to the sucking
69 feeding habit of the insects (Mound 1994). Due to the variability of the effects induced
70 by thrips on different leaves (Ananthakrishnan 1978, Ananthakrishnan and Raman
71 1989), a comparative scenario of the anatomical changes due to gall formation should
72 elucidate distinct pathways that end up with similar or distinct shapes/morphotypes.

73 Some Thysanoptera-induced galls involve only the folding of one leaf margin,
74 while others involve the movement upward or both leaf margins, and result in a twisted
75 leaf becoming effectively tubular (Tree and Mound 2009). These galls are commonly
76 reported as pseudogalls, because they are commonly induced on leaves, are generally
77 open and relatively simple in structure (Chen and Qiao 2012). Some authors consider
78 leaf rolling galls as pseudogalls because they were supposed to be formed after the
79 feeding activity and death of epidermal cells, deforming the host leaves (e.g. Wool
80 2005), without tissue alterations such as cell hypertrophy, hyperplasia, or even cell
81 redifferentiation/tissue neoformation (Chen and Qiao 2012). In contrast, true galls are
82 defined as products of abnormal development in host plants, involving processes of
83 hyperplasia and/or hypertrophy, and may also require redifferentiation or neoformation
84 of tissues (Mani 1964, Meyer and Maresquille 1983). They are more diverse in shape,
85 complex in structure, and are not only induced on leaves. In addition, true galls may be
86 closed or open, and can also be initially closed, and open in maturity, while others
87 remain open during their entire period of development (Álvarez et al. 2009, Álvarez et
88 al. 2013).

89 It was believed that the mode of feeding of the galling insects should be
90 determinant for the final gall morphotypes (Rohfritsch 1992, Bronner 1992). However,
91 if the mouthparts and related mode of feeding were the main determining factor of gall
92 structure, all galls induced by organisms with similar feeding habit should be similar,
93 which does not occur in nature. Subsequently, the modifications in plant tissues due to
94 galling stimuli must also be dependent on the genome of the host plant, and also on its
95 morphogenetic constraints (Moura et al. 2009; Oliveira et al. 2010; Ferreira and Isaias
96 2014).

97 Our study focuses on two Neotropical fold/roll galls induced by *Holopothrips*
98 *striatus* (suborder Tubulifera) on *Myrcia retorta* Cambess (Jorge et al. 2016) and rolling
99 galls induced by a tiny Thripinae species, closely related to *Nexothrips* (suborder
100 Terebrantia), on *Myrcia splendens* (Sw) DC. We propose to analyze a typical
101 Tubulifera-induced gall, and a rare case of gall induction by individuals of Terebrantia.
102 Most of the Tubulifera lay eggs on flowers and leaves, while most of the Terebrantia lay
103 eggs in incisions made by the external ovipositor in plant tissues (Lewis 1973). We aim
104 to elucidate by anatomical analyses if the similar feeding habit of the inducers and the
105 contrasting oviposition habits may cause similar cell responses despite the age of the
106 host leaves by the time of gall induction. Alternatively, the morphogenetic processes
107 may diverge, and should be, therefore, host plant-dependent. In this latter alternative,
108 we hypothesize that the impairment of the adaxial-abaxial polarity in host leaves in
109 several degrees may imply in the distinctiveness among the Thysanoptera-induced galls.
110 Current anatomical analyses represent the first step to the understanding of how galling
111 Thysanoptera manipulate the molecular potentialities of their co-generic host plants
112 toward a convergent gall morphotype. Also, we argue for the status of Thysanoptera
113 galls as true galls.

114 **Material and methods**

115 Non-galled leaves and galls were collected from population of *Myrcia retorta*
116 Cambess. and *Myrcia splendens* (Sw.) DC. The samples of *M. retorta* were collected at
117 Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza Pró-Mata, São Francisco de Paula, Rio
118 Grande do Sul, Brazil (29°29'16"S 50°12'04"W). The samples of *M. splendens* were
119 collected at Parque Estadual Serra Verde (PESV), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
120 (19°47'21.8"S 43°57'34.4"W). The characterization of gall morphotypes followed
121 Isaias *et al.* (2013).

122 *Anatomical analysis*

123 For anatomical observations, non-galled leaves and galls ($n \geq 5$) were fixed in
124 FAA (Johansen 1940), dehydrated in an *n*-butyl series, and embedded in Paraplast®
125 (Kraus and Arduin 1997). The material was sectioned (12 μm) in a rotatory microtome
126 (Leica 2035 BIOCUT®), deparaffinized, and stained in astra blue-safranin 9:1 (v/v)
127 (Bukatsch 1972, modified to 0.5%). The slides were mounted with colorless varnish
128 Acrilex® (Paiva et al. 2006), and the images were obtained with a photomicroscope
129 (Leica ICC50 HP®).

130 *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

131 Non-galled leaves and galls fixed in FAA (Johansen 1940) were dehydrated in
132 an ethanol series (Johansen 1940), critical point dried, mounted on stubs, and covered
133 with 15 nm of gold (Balzers SCD 050) (O'Brien and McCully 1981). The specimens
134 were observed in a scanning electron microscope (JEOL JSM - 6360LV). Experiments
135 and analyses involving electron microscopy were performed in the Center of
136 Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
137 (<http://www.microscopia.ufmg.br>).

138 *Histometric analyses*

139 The histometric measurements were carried out in transverse sections ($n = 5$
140 non-galled leaves and galls from distinct individuals), using the Axion Vision 7.4
141 software (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, Jena, Germany). For *M. retorta*, three
142 categories were considered: non-galled leaves (NGL), homogeneous areas of young
143 galls (GHA), and hypersensitive areas of young galls (HR). In each category, the
144 anticlinal and periclinal axis of epidermal cells (5 cells per section). For *M. splendens*,
145 two categories were considered: non-galled leaves (NGL) and galls (GA). The anticlinal
146 and periclinal axes of epidermal cells (5 cells per section) were measured. Statistical

147 analyses were made in the SigmaStat® software, using the Tukey test for nonparametric
148 data and ANOVA or T test for parametric data, considering $p \leq 0.05$.

149 **Results**

150 *Myrcia retorta* - *Tubulifera* system

151 Anatomical analysis

152 In the NGL (non-galled leaf) condition of *M. retorta*, the young leaves are
153 yellow and the mature leaves are green (Fig. 1A), the epidermis is uniseriate, the
154 mesophyll has 1–2 layers of palisade parenchyma and 5–8 layers of spongy
155 parenchyma, and secretory cavities are present (Fig. 1B).

156 The galls are induced in young leaves, they are green with brown spots and
157 necrotic regions on the upper surface. There is a fold/roll movement of leaf lamina
158 upwards, along both sides of the midrib (Fig. 1A). In galled condition, the inner
159 epidermal surface is like that of the NGL, except by the lesions caused by the feeding
160 activity of the thrips. The adaxial domain is impaired, and the mesophyll becomes
161 divided into GHA (gall homogeneous areas) and HR (hypersensitive areas) (Fig. 1C). In
162 GHA, the cells of the mesophyll are compactly arranged and lose the dorsiventrality
163 characteristic of the NGL, turning into a homogeneous mesophyll (Fig. 1D). In HR
164 areas, the mesophyll has hypersensitive reactions, which end up in tissue necrosis (Fig.
165 1E). The area of the mesophyll remains similar to NGL, and slight alterations in the
166 elongation axis of the epidermal cells in HR areas occur. The midrib and minor veins
167 may be unaltered or completely necrotic.

168 Histometric analyses

169 The main alterations observed in galls in relation to NGL are related to cell
170 dimensions. During the development of *H. striatus* galls, the dimensions of the
171 anticlinal axis of the cells on the adaxial surface of the GHA are similar to that of the

172 NGL, but such dimensions are 1.7-fold higher over the HR area ($F = 17.33$, $p = 0.0003$)
173 (Fig. 2A, C, E). The periclinal axis of the epidermal cells on the adaxial surface
174 increases about 0.8-fold in the GHA in relation to the NGL ($F = 234.8$, $p < 0.0001$) (Fig.
175 2B, C-D). Over the HR area, the cells are about 2.1-fold shorter in the periclinal axis
176 than in the NGL ($F = 234.8$, $p < 0.0001$) (Fig. 2B, C, E).

177 The anticlinal axis of the epidermal cells on the abaxial surface maintains its
178 dimensions, both in the GHA and over the HR area, in relation to the NGL condition
179 (Fig. 3A). The periclinal axis of the epidermal cells of the GHA and HR is 1.5-fold
180 larger in relation to the NGL ($F=16.20$, $p=0.0004$) (Fig. 3B, C-E).

181 *Myrcia splendens* - *Terebrantia* system

182 Anatomical analysis

183 In the NGL condition of *M. splendens*, the young and mature leaves are green
184 (Fig. 4A), the epidermis is uniseriate, the mesophyll has a 1-layered palisade
185 parenchyma and 7-10 layered spongy parenchyma. Secretory cavities occur all over the
186 mesophyll, and in the midrib cortex (Fig. 4B).

187 The galls are green, induced in mature leaves, and it is not possible to observe
188 external alteration in leaf lamina. There is a fold/roll movement of leaf lamina upwards,
189 along both sides of the midrib (Fig. 4A). In the GA condition, small hypersensitive
190 spots are observed in the epidermis and mesophyll in response to the inducer's feeding
191 activity (Fig. 4C). The number of secretory cavities increases and the cells of the
192 epithelium are hypertrophied (Fig. 4D). There is a reduction of intercellular spaces in
193 the spongy parenchyma, which becomes more compact, and is 5-7 layered. Large air
194 cavities are evident within mesophyll cells (Fig. 4E). The oviposition takes place inside
195 leaf tissues, where the larvae develops (Fig. 5A-D). Later, they eclode and the immature
196 individuals hatches out of leaf tissues and start feeding.

197 Histometric analyses

198 In *M. splendens*, the dimensions of the anticlinal axis of the cells on the adaxial
199 surface is similar in the NGL and GA. The main alterations of galls in relation to NGL
200 are related to the periclinal axis of the epidermal cells on the adaxial surface, which
201 reduces about 1.18-fold ($t = 4.659$, $p < 0,0001$). The dimensions of both anticlinal and
202 periclinal axes on the abaxial surface are similar between the NGL and GA.

203 **Discussion**

204 *Distinct morphogenetical pathways toward convergent morphotypes*

205 The two galling thrips, Tubulifera and Terebrantia, induces convergent gall
206 morphotypes with divergent morphogenetical pathways on *Myrcia* spp.. The two galls
207 have distinct mosaics of alterations in epidermis and mesophyll, and conservative
208 features in the vascular system. Currently, the mosaic of alterations involves mesophyll
209 cells, and the impairment in the adaxial-abaxial polarity, which may be consequence of
210 the peculiar modes of feeding and oviposition of the inducers. On *M. retorta*, the
211 distribution of HR and the GHA areas, and the loss of adaxial domain restrain leaf
212 lamina movement toward total rolling, and just the leaf margins fold toward the adaxial
213 surface (Fig. 6A, C, E). On *M. splendens*, the maintenance of the adaxial domain, and
214 the additional cell division result in few alterations on adaxial epidermis and palisade
215 parenchyma. Additionally, the continuity of anticlinal divisions is widespread along leaf
216 lamina, especially in SP, allowing the complete leaf rolling toward the adaxial surface
217 (Fig. 6B, D, F). The age of host plant cells, their responsiveness to galling stimuli by the
218 time of gall induction, and the distinct oviposition behavior of the individuals of the
219 suborders Tubulifera and Terebrantia seem to determine the divergent pathways that led
220 to the final fold/roll morphotypes on *M. retorta* and *M. splendens*.

221

222 *Insect feeding, oviposition sites, and host plant cell ages determine the mosaic of tissues*

223 Gall epidermis on *Myrcia* spp. has a mosaic of anticlinally or periclinally
224 elongated cells, developed under the morphogenetic influence of the galling thrips. The
225 cell elongation mosaic has been previously referred as the stretching and
226 hypertrophying of the epidermal cells (Ananthakrishnan and Raman 1989). Herein, this
227 mosaic extends to the mesophyll on the galls of *H. striatus* on *M. retorta* galls, where
228 sites of differentiated palisade parenchyma and compactly arranged spongy parenchyma
229 may occur. Also, the sites of HR and of GHA on these galls seem to be common in
230 Thysanoptera galls, and has been previously reported for galls of *Gynaikothrips*
231 *flaviantennatus* Moulton on *Casearia tomentosa* Roxb.

232 The second mosaic with its peculiar air cavities and spongy parenchyma cell
233 compactness, herein observed in galls on *M. splendens*, has been previously described
234 for galls of *Aneurothrips priesneri* Bhatti on *Cordia obliqua* Willd. This pattern seems
235 to be consequence of cell displacement due to the stretching and folding of leaf lamina
236 throughout gall development (Ananthakrishnan and Raman 1989). Alternatively, this is
237 consequence of the maintenance of the adaxial domain, with an increment in local cell
238 division.

239 The mosaic of cell reorganization due to the induction of galls by the two
240 Thysanoptera has the implication of the ovipositor types, and consequent target on host
241 leaf lamina. The females of *Holopothrips*, as of all the Tubulifera, do not have external
242 ovipositor and the eggs are laid externally on epidermal cell surface. Conversely, most
243 of the Terebrantia females have well-developed external ovipositor and the oviposition
244 mechanism causes a cavity interspersed to mesophyll cells where the eggs are laid
245 (Lewis 1973). The whole act of oviposition lasts a few minutes and afterwards the
246 female moves off a short distance to rest or feed (Sharga 1933a, Bournier 1956a, Lewis

247 1973). Although the endophytic oviposition is typical of Terebrantia, the habit of
248 inducing galls is uncommon for the members of this suborder (Ananthakrishnan 1978),
249 with only three species reported as gall inducers (Tree and Mound 2009). Even though
250 the origin of gall induction stimuli remains unknown (Mound and Kranz 1997), the
251 effects of the saliva have been commonly discussed (Ananthakrishnan and Raman
252 1989). We currently assume that the distinct oviposition behaviors of the two inducers,
253 together with the age of host leaf cells, may be crucial for the distinctive morphogenesis
254 of the fold/roll galls on *Myrcia* spp. herein studied.

255 In general, almost all gall inducing Tubulifera start feeding on young tissues
256 (Mound and Morris 2005). But, while gall induction by *H. striatus* implies on
257 superficial oviposition on young leaves of *M. retorta*, gall induction by the Terebrantia
258 occurs on mature leaves of *M. splendens*. The oviposition on mature leaves avoids the
259 crushing of egg cavities due to high cell proliferation of young leaves (Rivnay 1935),
260 which ends up pushing eggs out of the leaf, and should not favor the galling thrips, and
261 gall establishment. Also, the ability of inducing galls on mature leaves rather than
262 exclusively on young leaves guarantees more available sites for the thrips to complete
263 their life cycles. However, the more differentiated a cell is, the less responsive it is, and
264 therefore the capability of inducing galls on mature host leaf cells may imply in a
265 constraint in inducing high specialized cells, such as those of a true nutritive tissue
266 (Oliveira and Isaias 2009, Ferreira et al. 2017).

267 Some Thysanoptera galls may have differentiated nutritive tissues
268 (Ananthakrishnan, and Raman 1989), which is not true for the galls studied herein. The
269 absence of nutritive tissues indicates that the galling insect must feed on epidermal cell
270 contents, whose degree of responsiveness depends on its juvenility. Accordingly, as *H.*
271 *striatus* induces galls on young leaf tissues, the responsiveness of host cells is so fast

272 and strong that it culminates in hypersensitivity reactions (HR). The HR in epidermal
273 cells is consequence of the feeding behavior of several insects (Souza et al. 2000,
274 Ananthakrishnan and Raman 1989), and it is common in other Thysanoptera-induced
275 galls (Ananthakrishnan and Raman 1989). In addition, the gall induction on the young
276 leaves of *M. retorta* implies in the rupture of the adaxialization (Fukyshima and Hasebe
277 2014, Yamaguchi et al. 2012) on local sites of leaf lamina, which cannot occur on the
278 mature sites of gall induction on *M. splendens*. The inability of impairing the
279 adaxialization in mature leaves relies on the genetic requirement of a signal derived
280 from the stem apical meristem (SAM) for the specification of adaxial-abaxial polarity.
281 The communication between the SAM and the leaf primordia is determinant for the
282 establishment of the adaxial and abaxial domains (Yamaguchi 2012). When leaf
283 primordia or young leaves are isolated from the SAM, leaves present only abaxial
284 characteristics (Reinhardt et al 2005). Gall induction by *H. striatus* on *M. retorta* on
285 young leaves seems to impair the signaling of the SAM, which results in the loss of
286 adaxial domain, and the development of gall homogeneous areas. On the other hand, *M.*
287 *splendens* galls are induced on mature leaves, and so by the time of oviposition, the
288 adaxialization has already been determined. The very reduced HR sites, associated to
289 the gall inducers' feeding, and their common occurrence next to the oil glands in galls
290 of *M. splendens*, are more than a consequence of cell responsiveness and leaf age by the
291 time of gall establishment. They may indicate that the gall inducer accesses the cells of
292 the oil glands, in a possible search for the highly energetic resource accumulated there.

293 The SAM signal is determinant for the specification and maintenance of the
294 adaxial identity. Moreover, the loss of the adaxial identity causes drastic consequences
295 for leaf lamina development (Yamaguchi 2012). Once the abaxial identity alone is not
296 sufficient for the complete leaf development (Yamaguchi 2012), the lower degree of

297 rolling of *M. retorta* galls should be consequence of the loss of the adaxial domain, and
298 the consequent damages to cell and tissues growth and development. On *M. splendens*,
299 the maintenance of the cellular domains guarantees the ability of dividing and keeping
300 on the growth and development of the tissues, which culminate in the complete rolling
301 of leaf lamina.

302 *Conclusions*

303 Taking all current diagnostic analyses of the galls on *M. retorta* and *M.*
304 *splendens*, and the concepts of galls reported by Mani (1964) and Álvarez et al. (2013),
305 we assume that their fold/roll galls are true galls. Although they do not have
306 differentiation of new tissues, they are new organs with new traits, allow and maintain
307 gall establishment. Developmental alterations in the ontogenetic pathways of host cells
308 and tissues, as the presence of necrotic sites, changes in cell divisions and elongation
309 rates, and neoformation of air cavities, cause the abnormal growth in the host organs,
310 and are herein considered diagnostic features of true galls. In addition, the distinct
311 pathways observed in the two galls indicate that the development of the fold/roll galls
312 are not only dependent on the galling insect stimuli, but also on the constraints imposed
313 by the plant, being currently leaf age-dependent.

314 **Acknowledgments**

315 The authors thank to FAPEMIG, CNPq, CAPES for financial support, the
316 Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais
317 (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support
318 for experiments involving electron microscopy. Dr. Mariana Bunger for the
319 identification of *M. splendens* in the field, and the professionals of Centro de Pesquisa e
320 Conservação da Natureza Pró-Mata and of Parque Estadual Serra Verde, and Msc.
321 Bruno Ferreira for critical reading of the manuscript.

322 **References list**

- 323 Álvarez, R., Encina, A., Pérez-Hidalgo, N. 2009. Histological aspects of three *Pistacia*
324 *terebinthus* galls induced by three different aphids: *Paracletus cimiciformis*, *Forda*
325 *marginata* and *Forda formicaria*. *Plant Sci.* 176: 303-314.
- 326 Álvarez, R., González-Sierra, S., Candelas, A., Martínez, J-J.I. 2013. Histological study
327 of galls induced by aphids on leaves of *Ulmus minor*: *Tetraneura ulmi* induces globose
328 galls and *Eriosoma ulmi* induces pseudogalls. *Athropod-Plant Interactions*, 7, 643-650.
329 doi: 10.1007/s11829-013-9278-8
- 330 Ananthakrishnan, T.N. 1978. Thrips galls and gall thrips. Technical Monograph of the
331 Zoological Survey of India, 1-69.
- 332 Ananthakrishnan, T. N. 1978. On some aspects of thrips galls. *Bulletin De La Société*
333 *Botanique De France. Actualités Botaniques*, 127, 31-34
- 334 Ananthakrishnan, T.N. 1992. Unique aspects in the biology of thrips-induced galls. In:
335 J. D. Shorthouse e O. Rohfritsch (Eds), *Biology of insect-induced galls*. Oxford
336 University Press, New York: 185-195
- 337 Ananthakrishnan, T.N. and Raman, A. 1989. Morphology of Galls. In: Ananthakrishnan
338 T.N. and Raman A. (Eds), *Thrips and Gall Dinamics*. Oxford and IBH Publishing, New
339 Delhi: 67-73.
- 340 Bournier, A. 1956a. Un nouveau cas de parthenogenese arrhentoque: *Liothrips oleae*
341 Costa (Thys.: Tubulif.). *Archives de Zoologie Experimental et Generale*, 93, 135-41.
- 342 Bronner, R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and
343 cecidomyiids. In: Shorthouse, J.D., Rohfritsch, O. (Eds), *Biology of insect induced*
344 *galls*. Oxford University, Oxford: 118-140.
- 345 Bukatsch, F. 1972. Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin.
346 *Mikrokosmos*, 61, 225-255.

347 Chen, J. and Qiao, G.X. 2012. Gallling Aphids (Hemiptera: Aphidoidea) in China:
348 Diversity and Host Specificity. *Psyche*, 1-11. doi: 10.1155/2012/621934

349 Ferreira, B.G., Álvarez, R., Avritzer, S.C. and Isaias, R.M.S. 2017. Revisiting the
350 histological patterns of storage tissues: beyond the limits of gall-inducing taxa. *Botany*
351 (in press). doi: 10.1139/cjb-2016-0189

352 Ferreira, B.G. and Isaias, R.M.S. 2014. Floral-like destiny induced by a galling
353 Cecidomyiidae on the axillary buds of *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Flora*,
354 209, 391-400. doi: 10.1016/j.flora.2014.06.004.

355 Fukushima, K. and Hasebe, M. 2014. Adaxial-abaxial polarity: The developmental basis
356 of leaf shape diversity. *Genesis* 52:1-18.

357 Isaias, R.M.S., Carneiro, R.G.S., Oliveira, D.C. and Santos, J.C. 2013. Illustrated and
358 annotated checklist of Brazilian gall morphotypes. *Neotrop Entomol*, 42:230-239. doi:
359 10.1007/s13744-013-0115-7

360 Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company Inc., New
361 York: 523 pp.

362 Jorge, N.C., Cavalleri, A., Bedetti, C.S. and Isaias R.M.S. 2016. A new leaf-galling
363 Holopothrips (Thysanoptera: Phlaeothripidae) and the structural alterations on *Myrcia*
364 *retorta* (Myrtaceae). *Zootaxa*, 4200 (1):174-180. doi: 10.11646/zootaxa.4200.1.8

365 Kraus, J.E. and Arduin, M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*.
366 Seropédica, Rio de Janeiro: 198 pp.

367 Lewis, T. 1973. *Thrips - their biology, ecology and economic importance*. Academic
368 Press, London: 349pp.

369 Mani, M. S. 1964. *Ecology of plant galls*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.

370 Meyer, J. and Maresquelle, H.J. 1983. *Anatomie des galles*. Gebrüder Borntraeger,
371 Berlin.

372 Mound, L.A. 1994. Thrips and gall induction: a search for patterns. In: Williams M.A.J.
373 (Eds), Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations. Systematics Association
374 Special, Clarendon Press; Oxford: 131-149.

375 Mound, L.A. and Kranz, B. 1997. Thysanoptera and plant galls: Towards a research
376 programme p.11-24. In A. Raman (ed.), Ecology and evolution of plant-feeding insects
377 in natural and man-made environments. National Institute of Ecology, New Delhi;
378 Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, 276p.

379 Mound, L. A. and Morris, D. C. 2005. Gall-inducing thrips: an evolutionary
380 perspective. Pp. 59-72 in Raman, A. Schaefer CW and Withers, T.M. (eds) Biology,
381 Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods. Science Publishers, Inc., Enfield
382 (NH), USA

383 Moura, M.Z.D., Soares, G.L.G. and Isaias, R.M.S. 2009. Ontogênese da folha e das
384 galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina: Eriophyidae) em *Lantana camara*
385 L. (Verbenaceae). Revista Brasileira de Botânica, 32, 271-282. doi: 10.1590/S0100-
386 84042009000200007.

387 O'Brien, T. P. and McCully, M. E. 1981. The study of plant structure: principles and
388 selected methods. Termarcaphy Pty, Melbourne.

389 Oliveira, D.C. and Isaias, R.M.S. 2009. Influence of leaflet age in anatomy and
390 possible adaptive values of the midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae:
391 Caesalpinioideae). Rev. Biol. Trop, 57 (1-2) 293-302.

392 Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Carneiro, R.G.S., Alvim, M.N. and Isaias, R.M.S.
393 2010. Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-
394 established cytological and histochemical patterns? Protoplasma, 242, 81-93. doi:
395 10.1007/s00709-010-0128-6.

396 Paiva, J.G.A., Fank-De-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P. and Graciano-Ribeiro D.
397 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem
398 economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica*, 20, 257-264. doi: 10.1590/s0102-
399 33062006000200002

400 Raman, A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current*
401 *Science*, 92, 748-757.

402 Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T. and Kuhlemeier, C. 2005. Microsurgical and laser
403 ablation analysis of leaf positioning and dorsoventral patterning in tomato.
404 *Development* 132: 15–26.

405 Rivnay, E. 1935. Ecological studies of the greenhouse thrips, *Heliothrips*
406 *haemorrhoidalis*, in Palestine. *Bulletin of Entomological Research*, 26, 267-278.

407 Rohfritsch, O. 1992. Patterns in gall development. In: J. D. Shorthouse e O. Rohfritsch
408 (Eds), *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York.

409 Sano, M., Akimoto S-Y. 2011. Morphological phylogeny of gall forming aphids of the
410 tribe Eriosomatini (Aphididae: Eriosomatinae). *Syst Entomol*, 36, 607–627.

411 Sharga, U.S. 1993. Biology and life-history of *Limothrips cerealium* Hal. And
412 *Aptinothrips rufus* Gmelin feeding o Gramineae. *Ann appl. Biol.* 20: 308-26, Pl. XXI, 1
413 fig. 1933a, On the internal anatomy of some Thysanoptera. *Trans. R. ent. Soc Lond.* 81:
414 185-204, pls. X-XIX

415 Shorthouse, J.D., Wool, D. and Raman, A. 2005. Gall-inducing insects—Nature’s most
416 sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology*, 6, 407-411.

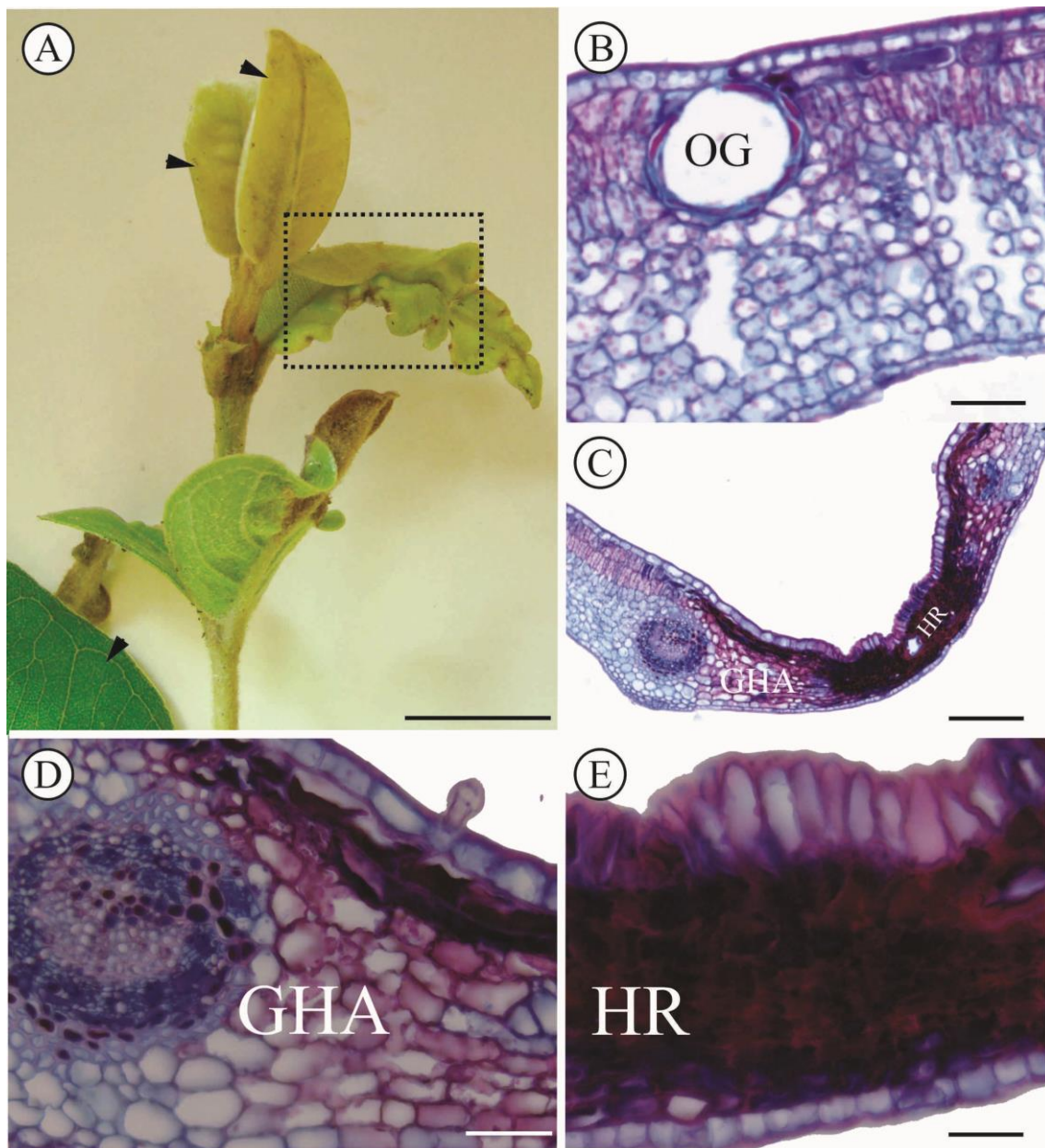
417 Souza, S.C.P.M., Kraus, J.E., Isaia,s R.M.S. and Neves, L.J. 2000. Anatomical and
418 ultrastructural aspects of leaf galls in *Ficus microcarpa* L.F. (Moraceae) induced by
419 *Gynaikothrips ficorum* Marchal (Thysanoptera). *Acta Botanica Brasilica*, 14, 57-69.

420 Stone, G.N. and Schonrögge, K. 2003. The adaptive significance of insect gall
421 morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 512-522.

422 Tree, D.J and Mound, L.A 2009. Gall-induction by an Australian insect of the family
423 Thripidae (Thysanoptera: Terebrantia). *Journal of Natural History*, 43, 1147-1158.

424 Yamaguchi, T., Nukazuka, A. and Tsukaya, H. 2012. Leaf adaxial-abaxial polarity
425 specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant cell physiol*, 53,
426 1180-1194.

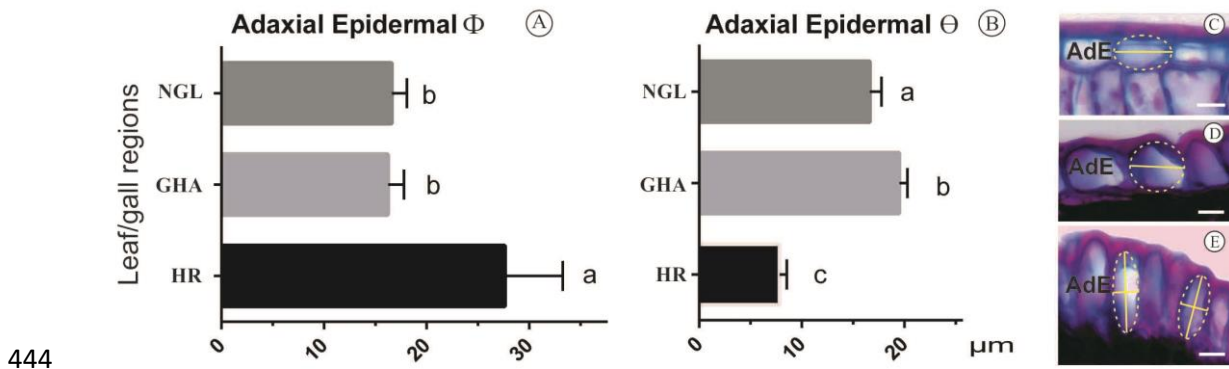
427 Wool, D. 2005. Gall-inducing Aphids: Biology, Ecology, and Evolution. In: Raman A,
428 Schaefer CW, Withers TM, *Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing*
429 *Arthropods*. Science Publishers Inc., Enfield, pp. 73-132.



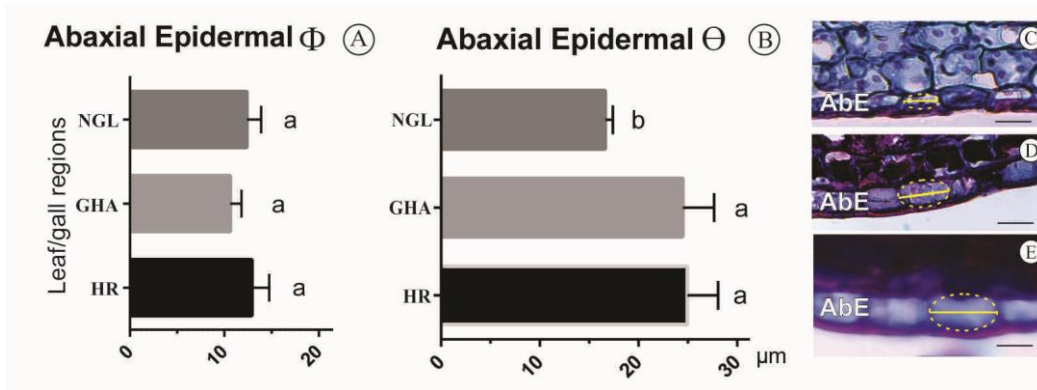
431

432 **Figure 1.** Non-galled leaves and galls induced by *Holopothrips striatus* (suborder
 433 Tubulifera) on leaves of *Myrcia retorta*. (A) Non-galled leaves and stem branch with
 434 fold/roll leaf galls. (B) Anatomy of non-galled leaves, evidencing the mesophyll and oil
 435 glands. (C) Anatomy of a gall, evidencing the mesophyll divided into homogeneous
 436 area (GHA) and hypersensitive area (HR). (D) Gall homogeneous area, evidencing the
 437 homogenization of the mesophyll and the loss of the differentiation between palisade
 438 and spongy parenchyma. (E) Hypersensitive area, evidencing hypersensitivity reactions

439 in the cells of mesophyll and the change in the elongation axis in the cells of epidermis.
440 **Arrowhead:** Non-galled leaves, **Dashed:** Fold/roll gall, **OG:** Oil gland, **GHA:** gall
441 homogeneous area, **HR:** Hypersensitive area. **Scale bars: A:** 2cm, **B, D, E:** 50 μm ; **C:**
442 200 μm .

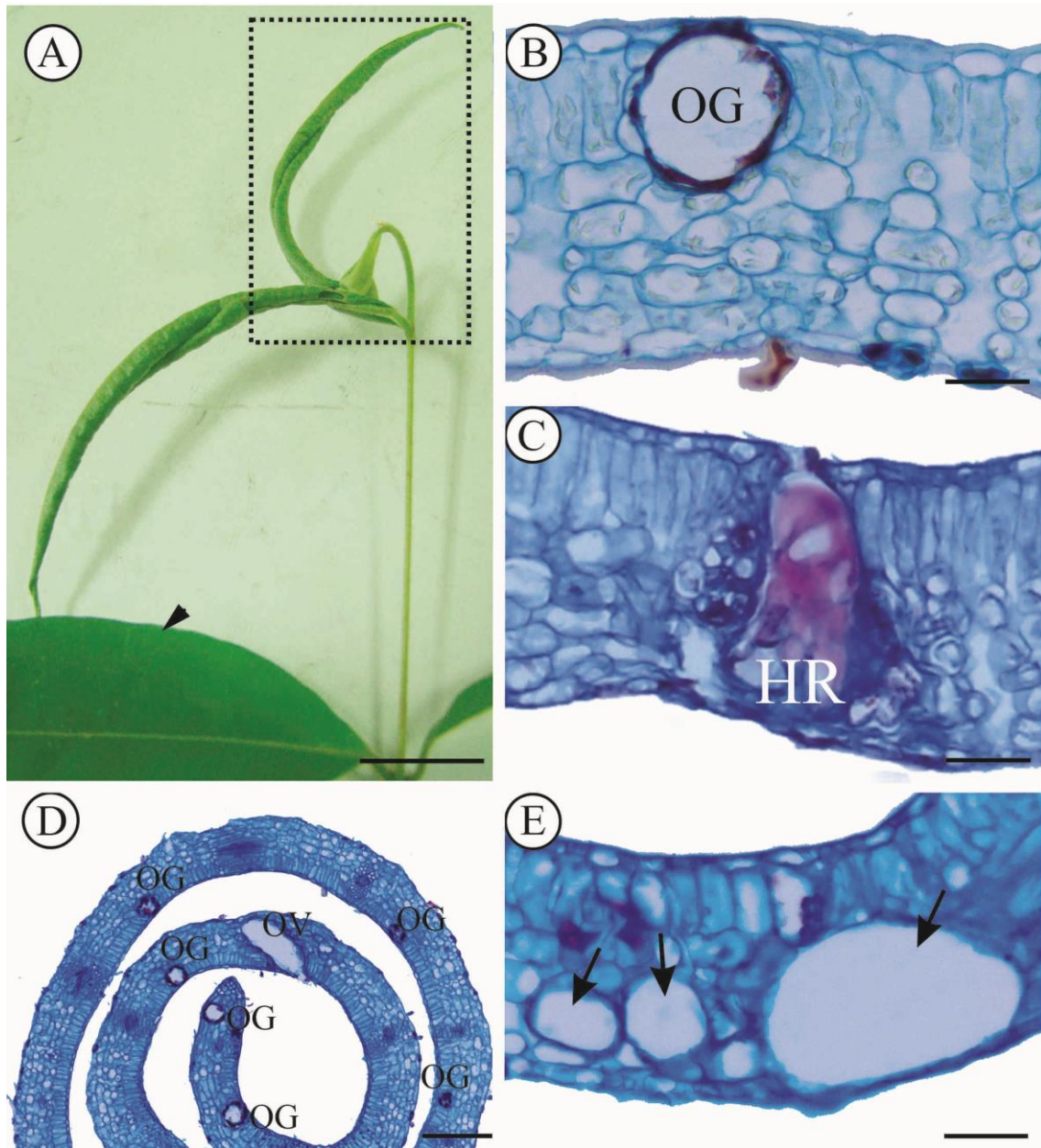


444
 445 **Figure 2.** Cytometry and anatomy of the adaxial epidermal cells of non-galled leaves
 446 and galls on *Myrcia retorta*. **(A-B)** Graphics evidence the average size of adaxial
 447 epidermal cells. Anova's test was applied, and the results followed by different letters
 448 differ statistically at 0.05%. **(A)** Anticlinal axis. **(B)** Periclinal axis. **(C-E)** Transverse
 449 sections of non-galled leaves and galls, evidencing the adaxial epidermal cells. **(C)** Non-
 450 galled leaf. **(D)** Gall homogeneous area. **(E)** Hypersensitive area. The lines represent
 451 cell axis. The yellow line in the cells indicates that the new elongation axes are
 452 statistically different. **AdE.** Adaxial Epidermal. **NGL.** Non-galled leaves. **GHA.** Gall
 453 homogeneous area. **HR.** Hypersensitive area. **Scale bars:** 50 μm



455

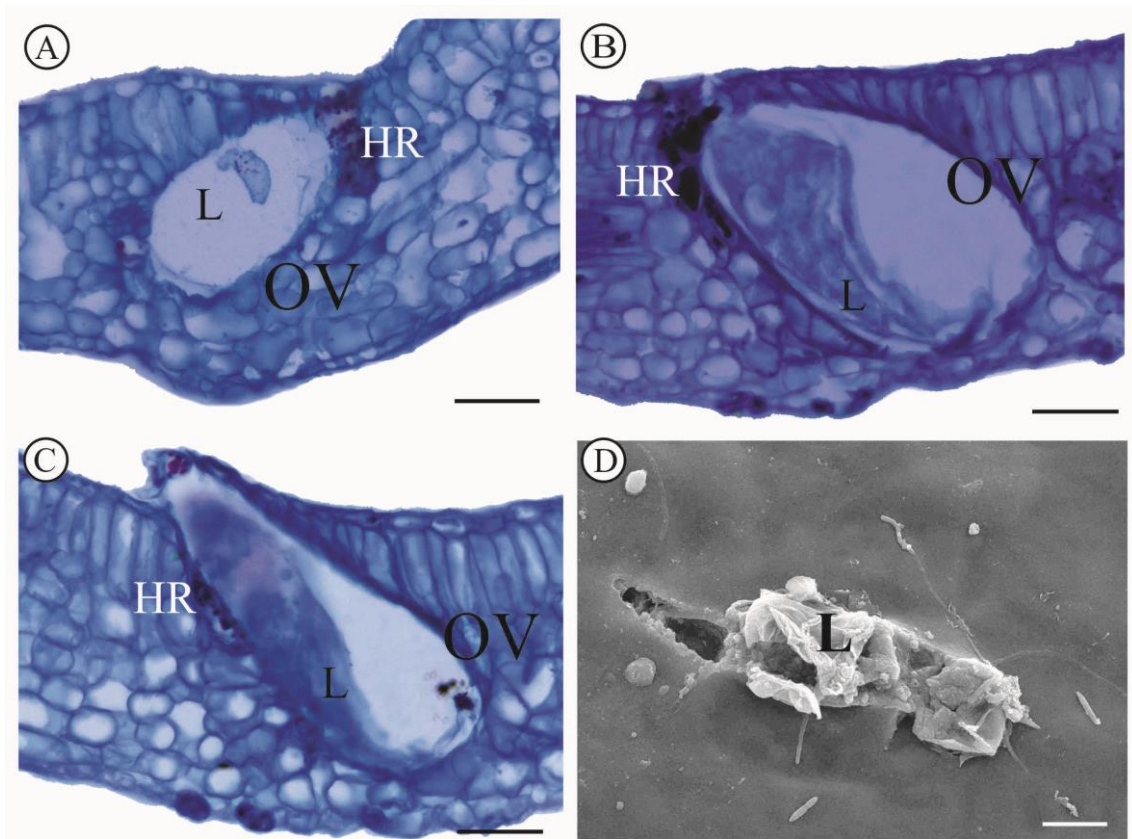
456 **Figure 3.** Cytometry and anatomy of the abaxial epidermal cells of non-galled leaves
 457 and galls on *Myrcia retorta*. **(A-B)** Graphics evidence the average size of the abaxial
 458 epidermal cells. Anova's test was applied, and the results followed by different letters
 459 differ statistically at 0.05%. **(A)** Anticlinal axis. **(B)** Periclinal axis. **(C-E)** Transverse
 460 sections of non-galled leaves and galls, evidencing the adaxial epidermal cells. **(C)** Non-
 461 galled leaf. **(D)** Gall homogeneous area. **(E)** Hypersensitive area. The lines represent
 462 cell axis. The yellow line in the cells indicates that the new elongation axes are
 463 statistically different. **AbE.** Abaxial Epidermal. **NGL.** Non-galled leaves. **GHA.** Gall
 464 homogeneous area. **HR.** Hypersensitive area. **Scale bars:** 50 μm .



466

467 **Figure 4.** Non-galled leaves and galls induced by an undescribed Thripinae (related to
 468 *Nexothrips*) (suborder Terebrantia) on leaves of *Myrcia splendens*. (A) Non-galled
 469 leaves and stem branch with leaf fold/roll galls. (B) Anatomy of non-galled leaves,
 470 evidencing the mesophyll and oil glands. (C) Gall mesophyll, evidencing the
 471 hypersensitive reaction in response to the inducer's feeding activity. (D) Anatomy of a
 472 gall, evidencing the increased number of secretory cavities. (E) Gall mesophyll,
 473 evidencing the reduction of intercellular spaces and air cavities. **Arrowhead:** Non-

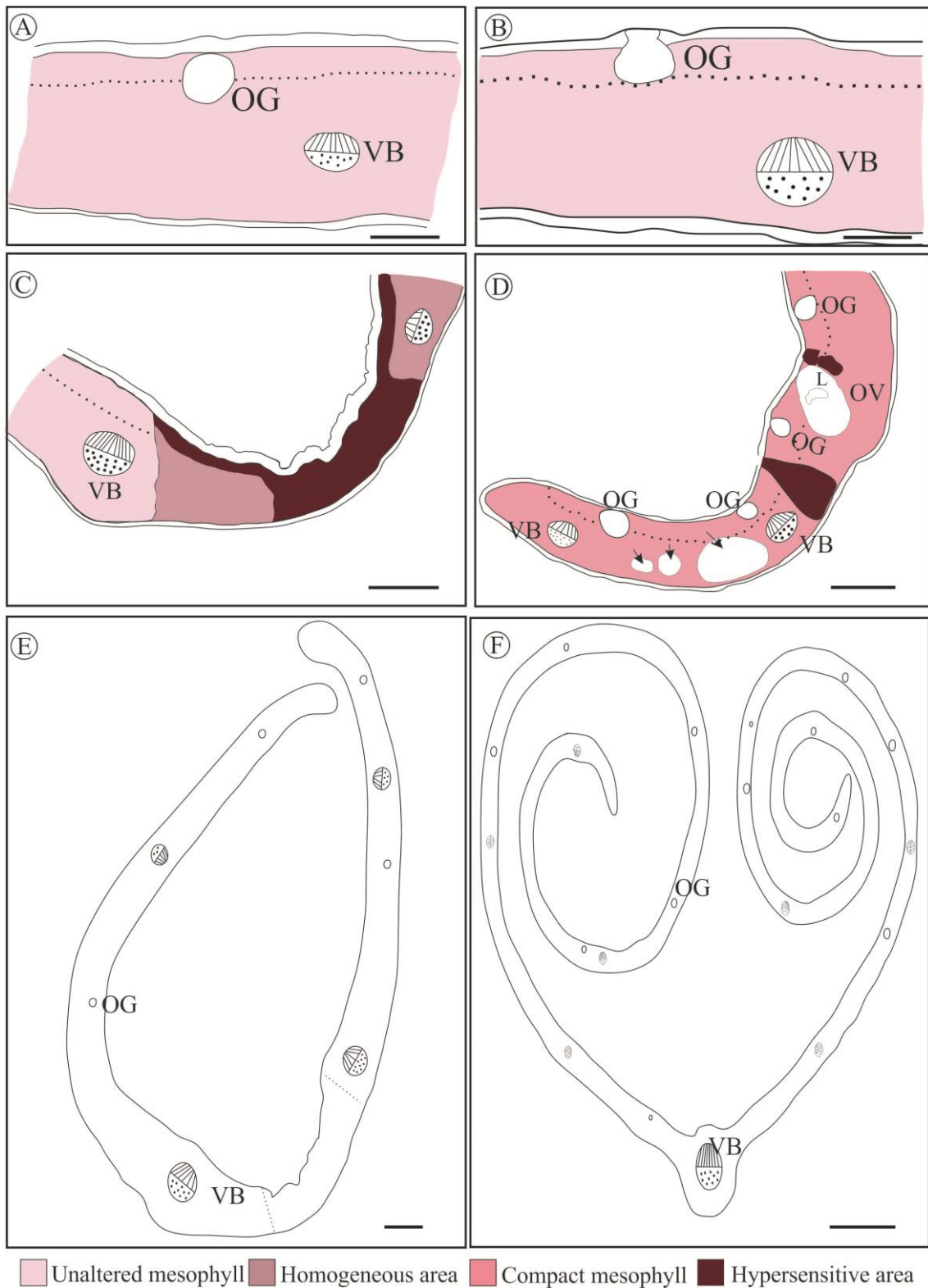
474 galled leaves, **Dashed:** Fold/roll gall, **OG:** Oil gland, **OV:** Oviposition, **HR:**
475 Hypersensitive area, **Arrow:** Air cavities **Scale bars:** **A:** 2cm, **B, C, E:** 50 μm ; **D:**
476 200 μm .



478

479 **Figure 5.** Oviposition inside the tissues of *Myrcia splendens* fold/roll galls by Thripinae
 480 inducer (related to *Nexothrips*) (suborder Terebrantia). (A) Initial development of the
 481 larva inside gall tissues. (B) Development of the larva. (C-D) Larvae hatching out of
 482 gall tissues. (C) Anatomy of a gall, evidencing hatching out of the leaf tissue. (D) MEV
 483 slides evidencing the hatching. **L:** Larva, **OV:** oviposition, **HR:** Hypersensitive area.

484 **Scale bars:** A-C: 50 μ m; D: 10 μ m.



487 **Figure 6.** Diagrams of non-galled leaves and galls induced on leaves of *Myrcia retorta*
 488 by *Holopothrips striatus* (suborder Tubulifera) and of *Myrcia splendens* by the
 489 undescribed Thripinae (related to *Nexothrips*) (suborder Terebrantia). (A-B) Non-galled

490 leaves. **(A)** Non-galled leaves of *M. retorta*. **(B)** Non-galled leaves of *M. splendens*. **(C-**
491 **D)** Galls on *M. retorta* and *M splendens*. **(C)** *M. retorta* gall evidencing three areas in
492 the mesophyll: unaltered mesophyll, homogeneous area and hypersensitive area. **(D)** *M.*
493 *splendens* gall evidencing the compact mesophyll, hypersensitive areas, oil glands, air
494 cavities and ovipositon inside the tissues. **(E-F)** Final gall morphotypes in transverse
495 sections. **(E)** Gall on *M. retorta*. **(F)** Gall on *M. splendens*. **Dashed:** Limit between
496 palisade and spongy parenchyma, **OG:** Oil gland, **VB:** vascular bundles, **L:** Larva. **OV:**
497 Oviposition, **Arrow:** Air cavities. **Scale bars:** **A-D:** 200 μm ; **E-F:** 500 μm .
498

Potencial sinalizador de voláteis em resposta à indução de galhas de enrolamento induzidas em *M. splendens* (Myrtaceae)

Nina de Castro Jorge, Érica Silva, Giovanni Saboia, Danielle Ramos Alvarenga, Geraldo Luiz Gonçalves Soares, Cláudia Alcaraz Zini, Adriano Cavalleri, Rosy Mary dos Santos Isaias

Resumo

Galhas são estruturas derivadas de alterações nos tecidos vegetais, cujo desenvolvimento é controlado pelo organismo indutor. Este indutor manipula o sistema de comunicação celular, e é capaz de produzir alterações anatômicas e bioquímicas no órgão hospedeiro. A planta reage a presença do galhador e desencadeia processos de sinalização química, os quais são bastante conhecidos para herbívoros de vida livre, porém praticamente desconhecidos para herbívoros galhadores. Neste trabalho, técnicas de histoquímica, análise quantitativa da densidade e dimensões das glândulas oleíferas e análise da composição de voláteis por micro extração em fase sólida (SPME) foram utilizadas para descrever o perfil químico de folhas não galhadas, galhas com e sem tripes em seu interior, e de plantas totalmente livres de galhas. Apesar de resultados similares para os testes hitoquímicos, a quantificação das glândulas de óleo mostrou alterações no tecido secretor nas galhas e a análise da composição dos voláteis mostrou variações na produção de sesquiterpenos e de voláteis verdes, destacando possíveis biomarcadores de estresse, com capacidade de provocar reações tanto locais, atuando diretamente na interação entre o galhador e a planta hospedeira, quanto reações ambientais, permitindo a comunicação com plantas vizinhas. Ainda, sugere-se que o organismo indutor de galhas em *Myrcia splendens* seja capaz de sequestrar os óleos essenciais produzidos e utilizar-se deles para alimentação e para reprodução.

Introdução

As galhas podem ser classificadas como um exemplo de fenótipo estendido do indutor (Stone e Schonrögge 2003) e, embora sejam compostas por tecidos vegetais da planta hospedeira, seu desenvolvimento é controlado pelos genes do organismo galhador (Oliveira et al. 2010, Ferreira et al. 2014). Este organismo manipula o sistema de comunicação celular da planta hospedeira suprimindo suas defesas (Oates 2016), e induz

alterações anatômicas e bioquímicas nos tecidos da planta hospedeira (Raman et al. 2005).

Apesar do sucesso da indução e do estabelecimento do galhador, a planta reage a sua presença dando início a processos de sinalização química, a semelhança do que ocorre em associações com herbívoros de vida livre. Embora o fenômeno de sinalização química contra herbivoria seja bem conhecido em se tratando de insetos herbívoros de vida livre (Rosenthal et al. 1992, Dicke et al 1993), o papel de sinalizadores, tais como os metabólitos secundários voláteis, nas interações com insetos galhadores é praticamente desconhecido (Damasceno 2010). Esse tipo de herbívoro permanece grande parte de seu ciclo de vida nos tecidos vegetais (Mani 1964) e, aparentemente, não tem estratégias comportamentais para evitar os efeitos dos metabólitos defensivos da planta.

Dentre os insetos herbívoros galhadores, os Thysanoptera, vulgarmente conhecidos como tripes, são sugadores e induzem suas galhas (Meyer 1987) por meio de estímulos químicos e/ou mecânicos alterando o desenvolvimento dos tecidos na planta hospedeira (Mani 1964, Hori 1992). Estas alterações são resultantes do estímulo provocado pela alimentação do galhador (Ananthakrishnan 1978). Das diversas famílias sujeitas à indução de galhas, Myrtaceae é a terceira família mais susceptível a formação de galhas de tripes, ficando atrás de Moraceae e Mimosae, respectivamente (Ananthakrishnan 1978).

Os efeitos destas alterações químicas nos tecidos galhados podem ser verificados por diversas técnicas de extração de voláteis. Dentre estas, as técnicas de "headspace" são vantajosas na extração de compostos voláteis de plantas por permitirem que o processo de extração ocorra a temperaturas baixas, reduzindo a probabilidade de alterações na composição da mistura volátil (Collins 1988, Damasceno 2010). Além disso, é uma técnica livre de solventes e a extração e concentração são realizadas em uma única etapa, o que fornece informações mais precisas sobre a composição da amostra vegetal (Zini et al. 2002, Zini et al. 2003).

Empregando a micro extração em fase sólida (SPME) no modo de "headspace" no estudo das galhas induzidas tripes em *Myrcia splendens* (Sw.) DC (Myrtaceae), este trabalho teve por objetivo (1) comparar a histolocalização de metabólitos primários e secundários de origem lipídica em folhas e galhas afim de determinar se há alterações na presença destes metabólitos nos tecidos galhados em relação aos compartimentos

teciduais da folha que lhes originaram, (2) quantificar o número e a área das glândulas produtoras de óleos essenciais de modo a determinar se a indução da galha altera o potencial da folha hospedeira para produção de voláteis; e (3) traçar a composição do óleo essencial nas folhas de indivíduos-referência (plantas totalmente livres de galhas), folhas não galhadas de plantas galhadas e nas galhas para detectar possíveis biomarcadores do estresse biótico oriundo da indução das galhas.

Material e métodos

Para este estudo folhas não galhadas (FNG) e galhas de enrolamento (GE) de *Myrcia splendens* foram coletadas em indivíduos no Parque Estadual Serra Verde, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (19°47'21.8"S 43°57'34.4"W) em julho de 2016. O material coletado foi processado para três tratamentos, que seguiram procedimentos usuais para cada um deles.

Análises Histoquímicas

Para análises histoquímicas, parte do material foi fixado (Karnovsky 1965), lavado em 0.1 M de tampão fosfato (30 min), lavado em água destilada (30 min), e embebido em PEG 6000. Seções (40 µm) obtidas em micrótomo rotativo (Leica 2035 BIOCUT[®]), foram lavadas em água destilada (Ferreira et al. 2014), e submetidas ao Sudan Red para detecção de lipídios (Brundett et al. 1991), α -naftol-*p*-fenilenodiamina (NADI) para detecção de terpenos (David e Carde 1964) e Liebermann-Burchard para detecção de triterpenos (Wagner et al. 1984).

Análises quantitativas das glândulas

Para as análises das glândulas produtoras de óleo folhas não galhadas (FNG) e galhas de enrolamento (GE) (n=20) foram clarificadas com imersão em hidróxido de potássio 50% até o clareamento completo, lavadas em água (três vezes), coradas com safranina 1% em etanol 95% e desidratadas em série etílica (Bersier e Bocquet 1960). As lâminas foram montadas em vernix Acrilex[®] (Paiva et al. 2006). Fotografias foram obtidas com microscópio de luz (Leica ICC50 HP[®]) em campo com área de 8,00 mm², as quais foram utilizadas para contagem visual do número de glândulas por área. A área relativas das glândulas em folhas não galhadas e galhas foi medida usando o programa Axion Vision 7.4 (Carl Zeiss[®] Microscopy GmbH, Jena, Germany). Análises estatísticas

foram feitas usando o programa SigmaStat[®], e o Teste T foi aplicado considerando $p \leq 0.05$.

Micro extração em fase sólida (SPME) no modo “Headspace”

Para as análises de extração de óleos essenciais, vinte indivíduos foram marcados em campo e observadas mensalmente durante um ano, para compreensão do ciclo das galhas e diagnose sobre a condição dos indivíduos e o aparecimento ou não de galhas. Folhas não galhadas, folhas não galhadas de indivíduos galhados (FNG) e galhas de enrolamento foram coletadas de indivíduos jovens de *M. splendens* em fenofase vegetativa localizados no Parque Estadual Serra Verde, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (19°47'21.8"S 43°57'34.4"W) em julho de 2016. A identidade do material foi confirmada pela Dra. Mariana de Oliveira Bünger. Na época da coleta apenas quatorze indivíduos dos vinte marcados apresentaram galhas, sendo assim, cinco folhas não galhadas de indivíduos galhados e cinco galhas foram coletadas em quatorze (14) indivíduos ($n = 14$). Além destes, um (1) indivíduo não apresentou galhas durante todo o ano e foi amostrado como indivíduo-referência, do qual foram coletados cinco folhas não galhadas ($n = 1$). As amostras foram imediatamente congeladas, em campo, sob gelo seco e posteriormente maceradas em nitrogênio líquido, pulverizadas e divididas em 3 ou 5 vials de 20 ml (massa – 0.025g/vial), no laboratório. Os "vials" foram imediatamente estocados em ultrafreezer (-80°C) até o momento da extração. As amostras coletadas foram divididas da seguinte forma: (1) indivíduo referência - composto de um indivíduo; (2) folha não galhada - composto geral dos quatorze indivíduos (CG-FNG); e (3) galhas – composto geral dos quatorze indivíduos, divididas em dois grupos, (3.1) galhas com indutores retirados manualmente (CG-GL), para detecção de voláteis produzidos apenas pelo tecido vegetal galhado e (3.2) galhas analisadas com indutores em seu interior (CG-GCT), para detecção de compostos voláteis oriundos também dos indutores e posterior comparação com os voláteis extraídos apenas do tecido vegetal.

Para o método utilizado frascos de 20ml contendo 0.025g da amostra foram retirados do ultrafreezer imediatamente antes da extração. Adicionou-se 2µL de padrão interno (solução aquosa de 1,4-cineole 100ppm). Para extração, utilizou-se o método “headspace” com fibra DVB/Car/PDM (1cm) por injeção manual. Durante 30 minutos, a amostra foi deixada em repouso a 30 °C para a pré-incubação. Após este período, o conteúdo volátil presente no frasco foi extraído por 30 minutos. Em seguida, a fibra foi

levada ao forno a temperatura de 250 °C durante 5 minutos para dessorção. Posteriormente, as amostras foram analisadas através da cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) com o equipamento Shimadzu 2010Q-Plus GC/MS equipado com coluna DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 µm).

Os resultados obtidos foram submetidos a análises multivariadas não supervisionadas (análise de componentes principais-PCA e análise de agrupamento hierárquico-HCA), bem como supervisionadas (mínimos quadrados parciais ortogonal – análise discriminante, OPLS-DA).

Resultados

Análises Histoquímicas

Lipídios foram detectados na cutícula, nos tricomas, no epitélio secretor das glândulas e no floema (Fig.1.1-2). Esta detecção foi similar para folhas não galhadas (FNG) e galhas (GA), no entanto no tecido galhado há uma maior visualização do conteúdo lipídico em todos os tecidos, principalmente no epitélio das glândulas (Fig.1.3). Nas FNG, os terpenos foram detectados na epiderme e nas glândulas (Fig.1.4-5), enquanto que nas GA, foram detectados também nos tricomas, nas glândulas e em feixes vasculares de menor calibre (Fig.1.6). Triterpenos foram detectados nas glândulas, e na epiderme em FNG (Fig.1.7-8), nas GA, a reação foi positiva nos mesmos sítios (Fig.1.9-10), no entanto a reação visualmente mais intensa se comparada à folha não galhada.

Análises quantitativas das glândulas

Tanto o número, quanto a área das glândulas apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação à FNG. A densidade das glândulas por mm² foi maior nas GE do que nas FNG (P < 0,0001) (Fig.2.1). A área das glândulas também foi maior e mais variável (P = 0,0227) entre FNG e GM (Fig.2.2).

Perfil de voláteis por SPME no modo “Headspace”

Voláteis verdes (hidrocarboneto não terpenoídicos), monoterpenos (não oxigenados e oxigenados) e sesquiterpenos (não oxigenados e oxigenados) foram detectados no indivíduo-referência de *M. splendens*. Os componentes observados em maiores proporção foram: *t*-cadinol, α -ylangeno, δ -elemeno, α -copanaeno e δ -muroleno (Fig.3).

O perfil de voláteis das folhas não galhadas (CG-FNG) presentes em indivíduos galhados mostrou-se diferente em relação ao perfil do indivíduo-referência. Foram detectados majoritariamente γ -elemeno, α -terpinen-4-ol (monoterpeno oxigenado), α -cadineno, β -cyclocitral, cyclosativeno, 2-hexenal,(E)-, 2-pental,(e)- e heptanal, voláteis que não eram detectáveis no indivíduo-referência (Fig.3). Foi possível ainda detectar δ -cadineno, β -caryophylleno, e germacrema b, possíveis biomarcadores de diferenciação entre as amostras de FNG e indivíduo-referência, com maior detecção em FNG (Tabela 1). As diferenças nos perfis químicos permitem separar as amostras do indivíduo-referência e de FNG em dois grupos (Fig.4).

O perfil de voláteis das galhas também sofreu modificações. Há uma separação clara entre FNG e as duas amostras com galhas (CG-GL e CG-GCT), nas quais foram detectados majoritariamente: linalool, 1-hexanol, nonanal, α -caryophyllene, 3,7(11)-selinadiene e α -terpinolene (Fig.3).

Novos biomarcadores, 3-hexen-1-ol,(z)-, metil salicilato, 1-hexanol, Muroleno e β -elemeno, permitem a distinção entre CG-GL de FNG (Tabela 2). A presença destes, e de outros possíveis biomarcadores permitem separar os dois grupos analisados (Fig.5). Assim como para CG-GL, o perfil químico para CG-GCT também foi alterado em relação à FNG. Nesta amostra foram detectados α -cariofileno, 3-hexen-1-ol-(Z), 3-hexenil cutanoato, salicilato de metila e 1-hexanol (Tabela 3). A presença majoritária destes biomarcadores é capaz de separar as duas amostras em dois grupos distintos (Fig.6). Além disso, é possível separar as amostras de CG-GL e CG-GCT devido à detecção de α -cariofileno, salicilato de metila, 3-hexenal (Z), δ -muroleno, β -elemeno, 3,7(11)-selinadieno e germacrema (Tabela 4) (Fig.7).

Discussão

Potencialização do perfil químico nos compartimentos celulares das galhas

O perfil histoquímico de folhas e galhas de *Myrcia splendens* indica um padrão conservativo quanto ao acúmulo de lipídios, óleos essenciais, terpenos e sesquiterpenos, compostos estes amplamente encontrados em Myrtaceae (Ramos et al. 2010). Contudo, a marcação histoquímica com os reagentes utilizados foi mais intensa nas galhas do que nas folhas não galhadas, indicando maior quantidade de sítios reativos no tecido galhado. Ademais, estes sítios de acúmulo mostraram localização similar entre os tecidos das galhas e os aqueles que os originaram. Não há mudança na compartimentalização dos

metabólitos, no entanto, são atribuídas novas funcionalidades à eles, por exemplo na alimentação e reprodução dos insetos galhadores.

A indução e o estabelecimento da galha provocou alterações na densidade e na área das glândulas oleíferas, que são maiores nas galhas se comparadas às folhas não galhadas, indicando maior potencial para produção de voláteis nas galhas. Tal potencial pode proporcionar um microambiente favorável aos galhadores, que podem se beneficiar dos produtos das glândulas (Stone e Schonrögge 2003), pois apesar de produzir substâncias que poderiam repelentes para os tripses, os indivíduos galhadores conseguem fazer uso destes compostos para o seu metabolismo.

Papel dos voláteis como biomarcadores e sinalizadores químicos

Em folhas de *M. splendens*, a produção de voláteis se dá nas glândulas oleíferas, cujo sesquiterpenos representam 95% de toda a sua composição (Cole 2008, Nakamura 2010), sendo majoritariamente compostos por hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados (Cole 2008). Nas galhas, às diferenças quantitativas somam-se as diferenças qualitativas detectadas pela análise por SPME, o que implica em funcionalidades favoráveis para o Thysanoptera galhador. A análise precisa dos voláteis produzidos nas diferentes amostras em *M. splendens* permite inferir não somente o estabelecimento de relações inseto-planta, mas também planta-planta, uma vez que constituintes majoritários nas amostras, os sesquiterpenos, têm funções variáveis, desde a atração de parceiros para reprodução ou inimigos naturais, até a repelência dos galhadores (Koschier et al. 2007). Ademais, o perfil químico do indivíduo totalmente livre de galhas, o indivíduo-referência, e o composto geral das folhas não galhadas (CG-FNG) demonstra que a atividade dos galhadores nas plantas hospedeiras provoca efeitos a longa distância (Mani 1964), ou seja, em órgãos que não aqueles que estritamente hospedam o galhador. Estes efeitos secundários ou “tele-effects” (Mani 1964) foram primeiramente descritos em *Heterodera marioni*, nos quais as galhas se estabelecem nas raízes e provocam alterações nas flores. O efeito da indução das galhas em outros órgãos, assim como a produção de metabólitos secundários, pode representar uma defesa direta da planta, enquanto a emissão de voláteis pela planta afetada pode ser interpretada como uma defesa indireta (Unsicker et al. 2009, Fürstenberg-Hägg et al. 2013 e Oates et al. 2016).

Os voláteis detectados em *M. splendens* podem atuar como sinalizadores químicos para herbívoros e sua biossíntese pode ser alterada em resposta à herbivoria (Valladares et al. 2002 e Banchio et al. 2005). A sinalização química mediada pelos voláteis pode

permitir aos insetos encontrar e reconhecer sua planta hospedeira (Hanula et al. 1985, Tooker et al. 2004) ou atrair inimigos naturais (James e Chem 2005). De modo geral, acredita-se que o indutor provoque alterações nas respostas da planta hospedeira, o que desencadeia reações tanto locais, interferindo diretamente na interação do galhador com sua planta hospedeira, (Moura 2009 e Oates et al. 2016), quanto ambientais, permitindo a comunicação com outras plantas na população.

Alguns compostos detectados nas amostras de galhas de *M. splendens*, como monoterpenos (geraniol) e sesquiterpenos, podem desempenhar papel atrativo para fêmeas adultas de tripses, conforme proposto para *Frankliniella occidentalis*, um parasita de diferentes espécies de angiospermas por todo o mundo (Koschier et al. 2010). Tal função poderia explicar a atração dos quatro galhadores associados a *M. splendens*, espécie super-hospedeira de galhas, com dois morfotipos induzidos por tripses (Portugal-Santana e Isaias 2014), uma delas indutora das galhas de enrolamento foliar.

Apesar da similaridade entre os perfis químicos de CG-FNG e amostras com galhas de *M. splendens*, a indução da galha parece provocar alterações nas emissões dos voláteis (Izzo et al. 2006), principalmente percebida em relação aos sesquiterpenos. Tais alterações parecem comuns a outros sistemas galhador-planta hospedeira (cf. Tooker 2002, 2004 e 2006), tendo os voláteis, além da propriedade de atração de parceiros (Koschier et al. 2010), a capacidade de atuar como defesas indiretas ou diretas das plantas (Dudareva 2004, Oates 2016).

Outro grupo de voláteis detectados nas amostras de galhas, alifáticos como álcoois e ésteres com peso molecular baixo denominados “voláteis verdes”, têm, apesar de sua estrutura molecular simples, papel importante na proteção contra herbivoria, pois estimulam as plantas vizinhas não atingidas a produzir ácido jasmônico, e induzem a expressão de genes relacionados à defesa e liberação de compostos voláteis (Damasceno et al. 2010, Yan e Wang 2006). Para a espécie estudada acreditamos ser verdadeira esta função dos voláteis verdes, uma vez que há, na mesma localidade, indivíduos que não apresentam galhas e nos indivíduos galhados não há sinais de danos causados por herbívoros de vida livre.

O salicilato de metila, detectado nas amostras de galhas em *M. splendens*, é um semioquímico vegetal relacionado à sinalização de estresse (Pickett et al 2006) que atua na defesa indireta das plantas ou na resistência adquirida (Oates 2016). Ele é geralmente descrito como anti-herbivórico, atrativo para insetos benéficos que matariam os herbívoros (Bruinsma et al. 2009), além de funcionar também como feromônio (James e

Price 2004, Troncoso et al. 2012). A detecção do salicilato de metila é indicativo da alimentação de herbívoros (Zhu e Park 2005, Blande et al. 2010), e ativa reações de defesa dependentes de ácido jasmônico em plantas vizinhas ou até mesmo em outras partes da mesma planta (Simpson et al 2011). Os efeitos do salicilato de metila em relação aos tripses parecem ser variáveis, uma vez que agem principalmente em duas vias: primeiro, atraindo inimigos naturais (Snoeren et al. 2010), segundo, desestimulando a alimentação e postura de ovos pelas fêmeas (Koschier et al 2007), ou ainda não apresentam efeitos pouco claros (Bruhin 2009), dependendo da concentração deste composto no tecido vegetal. Em *M. splendens* a produção do salicilato de metila parece não afetar o ciclo de vida dos tripses indutores, tampouco atrair inimigos naturais, uma vez que é possível identificar indivíduos em várias fases de vida dentro das galhas e a taxa de hiperparasitismo é aparentemente baixa. Tal incapacidade pode ser efeito da concentração do salicilato de metila e conseqüentemente seu parco potencial de estimular as respostas dos tripses galhadores, crucial para atratividade ou repelência (Koschier et al. 2000; Koschier et al. 2002; Bruhin 2009).

Além do efeito sinalizador dos óleos voláteis produzidos pelas folhas não galhadas e pelas galhas em *M. splendens*, a captura destes óleos voláteis pelos tripses galhadores parece ter acontecido. Tal conclusão se baseia na detecção de novos biomarcadores (α -cariofileno, 3-hexanal (z), germacreno b, 3,7(11)-selinadieno e sesquiterpeno 8) exclusivamente nas amostras contendo os tripses galhadores, indicando sua captura e/ou metabolização diretamente pelos indutores.

Conclusão

A alteração no tecido glandular, juntamente aos resultados histoquímicos indicam aumento na produção de metabólitos secundários lipofílicos. Os resultados de histoquímica são coerentes com os resultados do SPME, pois ambas as técnicas permitem demonstrar o papel sinalizador de terpenóides voláteis. Estes metabólitos, contudo, parecem estar relacionados à modulação da sinalização, resultando num processo complexo que envolve a localização das plantas por parte dos tripses, repelência de inimigos naturais, e provavelmente seu sequestro pelos tripses galhadores, tendo neles tripla função: reserva energética, proteção contra inimigos naturais e produção da substância lipídica e aromática que acalma as fêmeas durante a copulação.

Referências

Banchio, E.; Zygadlo, J.; Valladares, G. R. (2005). Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. *J. Chem. Ecol*, 31, 719-727.

Blande, J.D., Korjus, M. e Holopainen, J.K. (2010): Foliar methyl salicylate emissions indicate prolonged aphid infestation on silver birch and black alder. *Tree Physiology*, 30, 404-416.

Bersier, J.D. e Bocquet, G. (1960) Les methods d'éclaircissement en vascularisation et en morphogénie végétales compares. *Arch. Scienc. In: Kraus, J.E. (Ed.), Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, Rio de Janeiro, pp. 555–566.*

Bruinsma, M.; Posthumus, M.A.; Mumm, R.; Mueller, M.J.; Van Loon, J.J.A.; Dicke, M. (2009). Jasmonic acid-induced volatiles of *Brassica oleracea* attract parasitoids: Effects of time and dose, and comparison with induction by herbivores. *J. Exp. Bot*, 60, 2575–2587.

Bruhin D. (2009): Direct and indirect effects of methyl salicylate and methyl jasmonate on *Frankliniella occidentalis* Pergande on pot chrysanthemum. Master thesis. University of Applied Life Sciences and Natural Resources, Vienna.

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 and Histochemistry*, 66, 111–116.

Cole, R.A., Haber, W.A., Setzer, W.N. (2008). The leaf oil composition of *Myrciasplendens* from Monteverdi, Costa Rica. *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, 1, 41–44.

Collins, C. H.; de Aquino-Neto, F. R.; da Silva, J. R. P. (1988). *Quím. Nova*, 11, 443.

Damasceno, F.C., Nicolli, K.P., Caramão, E.B., Soares, G.L.G., Zini, C.A. (2010). Changes in the volatile organic profile of *Schinus polygamus* (Anacardiaceae) and *Baccharis spicata* (Asteraceae) induced by galling psyllids. *J. Bras. Chem. Soc.*, 3, 556-563.

David, R.; Carde, J.P. (1964). Coloration defférentielle des inclusions lipidiques terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif NADI. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 258, 1338–1340.

Dicke, M.; Bruin, J.; Sabelis, M. W. (1993). *Herbivore-Induced Plant Volatiles Mediate Plant-Carnivore, Plant-Herbivore and Plant-Plant Interactions: Talking Plant Revisited*, American Society of Plant Physiologists: Rockville, Maryland.

Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1893-1902.

Ferreira, B. G., Teixeira, C. T., Isaias, R. M. S. (2014). Efficiency of the Polyethylene-Glycol (PEG) Embedding Medium for Plant Histochemistry. *Journal of Histochemistry&Cytochemistry*, 62 (8) 577-583.

Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobelny, M.; Bak, S. (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 10242–10297.

Hanula, J. L.; Berisford, C. W.; Debar, G. L.; (1985). Monoterpene oviposition stimulants of *Dioryctria amatella* in volatiles from fusiform rust galls and second-year loblolly pine cones. *J. Chem. Ecol.*, 11, 943-952.

Hori, K. (1992). Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In: Shorthouse JD, Rohfrisch O (eds) *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp 157–170.

Izzo TJ, Julião GR, Almada ED, Fernandes GW. (2006). Hiding from defenders: localized chemical modification on the leaves of an amazonian ant-plant induced by a gall-making insect (Diptera: Cecidomyiidae). *Sociobiol.* 48, 417-26.

James, D. G., Price, T. S. (2004). Field-Testing of Methyl Salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. *J. Chem. Ecol.*, 30, 1595-1610.

James, D. G.; *J. Chem.* (2005). Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *J. Chem. Ecol.*, 31, 481-495.

Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27, 137-138.

Koschier, E.H., De Kogel, W.J. e Visser, J.H. (2000): Assessing the attractiveness of volatile plant compounds to western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. *J. Chem. Ecol.* 26, 2643-2655.

Koschier, E.H., Sedy, K.A. e Novak, J. (2002): Influence of plant volatiles on feeding damage caused by onion thrips *Thrips tabaci*. *Crop Protection*, 21, 419-425.

Koschier, E.H., Hoffmann, D. e Riefler, J. (2007): Influence of salicylaldehyde and methyl salicylate on post-landing behaviour of *Frankliniella occidentalis* Pergande. *J. Appl. Entomol*, 131, 362-367.

Meyer, J. (1987). *Anatomie des galles* Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Mani, M.S. (1964). *Ecology of plant galls*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.

Moura., M.Z.D., Alves, T.M.A., Soares, G.L.G, Isaias, R.M.S. (2009) Intra-specific phenotypic variations in *Lantana camara* leaves affect host selection by the gall maker *Aceria lantanae*. *Biochemical Systematics and Ecology* xxx, 1-8.

Nakamura, M.J., Monteiro, S.S., Bizarri, C.H.B., Siani, A.C., Ramos, M.F.S. (2010). Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 1170-1175.

Oates, C.N., Denby, K.J., Myburg, A.A., Slippers, B., Naidoo, S. (2016). Insect galls and their plant hosts: from omics data to systems biology. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1891. doi:10.3390/ijms17111891

Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Carneiro, R.G.S., Alvim, M.N., Isaias, R.M.S. (2010). Do Cecidomyiidae of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma*, 241, 81-93.

Paiva, J.G.A., Fank-De-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P., Graciano-Ribeiro, D. (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botânica Brasílica*, 20 (2), 257–264. doi: 10.1590/s0102-33062006000200002

Pickett, J.A., Bruce, T.J.A, Chamberlain, K., Hassanali, A., Khan, Z.R., Matthers, M.C., Napier, J.A., Smart, L.E., Wadhams, L.J. e Woodcock, C.M. (2006): Plant Volatiles Yielding New Ways To Exploit Plant Defence. In: Dicke M. and Takken W. (Editors) *Chemical Ecology: From Gene to Ecosystem*, Springer, 161-173.

Portugal- Santana, A., Isaias, RMS. (2014). Gallling insects are bioindicators of environmental quality in a Conservation Unit. *Acta Botanica Brasílica* 28 (4): xxx-xxx. doi: 10.1590/0102-33062014abb3510

- Raman, A. e Ananthkrishnan, T.N. (1983). Studies on Some Thrips (Thysanoptera: Insecta) Induced Galls. Proc. Indiannatn. Sci. Acad. B49 N° 5 pp 313-358.
- Raman, A., Schaefer, C.W., Withers, T.M. (2005). Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods. Science Publishers Inc.: Enfield, NH.
- Ramos, M.F.D., Monteiro, S.D., da Silva, V.P., Nakamura, M.J., Siani, A.C. (2010). Essential oils from Myrtaceae species of the Brazilian southeastern maritime forest (Restinga). Journal of Essential Oil Research, 22 (2), 109–113.
- Rosenthal, G. A.; Berenbaum, M. R.; (1992). Herbivores their Interactions with Secondary Plant Metabolites, Ed.: 2, vol:II. Academic Press Inc: San Diego, California.
- Simpson, M., Gurr, G.M., Simmons, A.T., Wratten, S.D., James, D.G., Leeson, G. e Nicol, H.I. (2011): Insect attraction to synthetic herbivore-induced plant volatile-treated field crops. Agricultural and Forest Entomology, 13, 45-57.
- Snoeren, T.A.L., Mumm, R., Poelman, E.H., Yang, Y., Pichersky, E. e Dicke, M. (2010): The herbivore-induced plant volatile methyl salicylate negatively affects attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum*. J. Chem. Ecol. 36, 479-489.
- Stone, G.N. e Schonrögge, K. (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. Trends in Ecology and Evolution, 18(10), 512-522.
- Tooker, J.F., Koenig, W.A., Hanks, L.M. (2002). Altered host plant volatiles are proxies for sex pheromones in the gall wasp *Antistrophus rufus*. P Nat Acad Sci., 99, 15486-15491.
- Tooker, J.F., Hanks, L.M. (2004). Stereochemistry of host plant monoterpenes as mate location cues for the gall wasp *Antistrophus rufus*. J Chem Ecol, 30:473-477.
- Tooker, J.F., Hanks, L.M. (2006). Tritrophic interactions and reproductive fitness of the prairie perennial *Silphium laciniatum* Gillette (Asteraceae). Environ Entomol; 35, 537-545.
- Troncoso, C.; Becerra, J.; Perez, C.; Hernandez, V.; Martin, A.S.; Sanchez-Olate, M.; Rios, D. (2012). Induction of defensive responses in *Eucalyptus globulus* (Labill) plants, against *Ctenarytaina eucalypti* (Maskell) (Hemiptera: Psyllidae). Am. J. Plant Sci., 589–595.

Unsicker, S.B.; Kunert, G.; Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: The role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12, 479–485.

Valladares, G. R.; Zapata, A.; Zygadlo, J.; Banchio, E.; J. Phytochemical induction by herbivores could affect quality of essential oils from aromatic plants. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4059-4061.

Wagner, H.; Blatt, S.; Zgainski, E.M. (1984). *Plant drug analysis* Berlin. Springer-Verlag.

Yan, Z.-G.; Wang, C.-Z.; Wound-induced green leaf volatiles cause the release of acetylated derivatives and a terpenoid in maize. *Phytochemistry*, 67, 34-42.

Zhu, J.W. e Park, K.C. (2005): Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *J. Chem., Ecol.* 31, 1733-1746.

Zini, C. A.; Augusto, F.; Christensen, E.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J.; J. (2002). SPME applied to the study of volatile organic compounds emitted by three species of Eucalyptus in situ. Solid-phase micro extraction. *Agric. Food Chem.*, 50, 7199-7205.

Zini, C. A.; Zanin, K. D.; Christensen, E.; Caramão, E. B.; Pawliszyn, J.; J. (2003). Solid-phase microextraction of volatile compounds from the chopped leaves of three species of Eucalyptus. *Agric. Food Chem.*, 51, 2679-2686.

Tabela 1: Possíveis biomarcadores de diferenciação entre amostras de Folhas não galhadas (FNG) e indivíduos-referência.

Substâncias que diminuíram de FNG para Referência			
Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
2-Hexenal (E)	14	-0.49337	-0.84141
3-Hexenal, (Z)-	12	-0.23552	-0.96783
Hexanal	13	-0.14578	-0.85493
β -Elemeno	59	-0.1316	0.87078
γ -Muurolen	67	-0.12784	-0.88705
4-Hexen-3-one, 5-metil-	22	-0.10469	-0.9822
Metil salicilato	42	-0.08521	-0.831
2-Penten-1-ol, (Z)-	11	-0.05635	-0.97373
1-Penten-3-one	3	-0.05482	-0.86034
Ciclosativeno	54	-0.06254	-0.95567
Substâncias que aumentaram de FNG para Referência			
Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
g-Cadineno	71	0.37419	0.97742
b-Cariofileno	62	0.3571	0.93877
Sesquiterpeno 8	75	0.24723	0.98569
Germacreno B	77	0.2026	0.98112
δ -Muuroleno	68	0.18433	0.98532
Sesquiterpeno 5	65	0.18137	0.97376
β -Bourboneno	57	0.14526	0.94779
α -Muuroleno	70	0.13402	0.97253
3-Hexen-1-ol, (Z)-	15	0.110382	0.90464
α -Ylangeno	55	0.091783	0.88336
Etanol	1	0.07851	0.95949
t-Cadinol	82	0.05321	0.9353

Tabela 2: Possíveis biomarcadores de diferenciação entre amostras de Folhas não galhadas (FNG) e Galhas limpas (GL).

Substâncias que diminuíram de FNG para GL			
Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
2-Hexenal (E)	14	-0.5566	-0.935
Sesquiterpeno 5	65	-0.25463	-0.97386
β -Bourboneno	57	-0.14777	-0.98086
δ -Elemeno	52	-0.14058	0.87891
4-Hexen-3-one, 5-metil-	22	-0.08311	-0.97256
t-Cadinol	82	-0.07561	-0.95712
γ -Elemeno	63	-0.08084	-0.85541
1-Penten-3-one	3	-0.06221	-0.9268
2-Pental, (Z)-	9	-0.06619	-0.91036
α -Copaeno	56	-0.05412	-0.89184
α -Ylangeno	55	-0.07197	-0.81516
Substâncias que aumentaram de FNG para GL			
Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
3-Hexen-1-ol, (Z)-	15	0.45661	0.99656
Metil salicilato	42	0.28378	0.97137
γ -Muuroleno	67	0.25703	0.9082
1-Hexanol	17	0.17381	0.99519
β -Elemeno	59	0.11007	0.86195
Linalol	34	0.07707	0.99223
Etanol	1	0.07008	0.93373

Tabela 3: Possíveis biomarcadores de diferenciação entre Folhas não galhadas (FNG) e Galhas com tripes (GCT).

Substâncias que diminuíram de FNG para GCT			
Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
2-Hexenal (E)	14	-0.4991	-0.95208
-Cadineno	71	-0.23753	-0.92258
δ -Cadineno	73	-0.16695	-0.93386
β -Bourboneno	57	-0.14155	0.98597
σ -Cadineno	72	-0.12797	-0.91749
-Elemeno	52	-0.10862	-0.86412
γ -Elemeno	63	-0.10142	-0.95223
α -Ylangeno	55	-0.07863	-0.91975
-Cadinol	82	-0.07162	-0.95567
2-Pental (Z)	9	-0.06254	-0.95567
α -Gurjeneno	61	-0.07772	-0.95924
1-Penten-3-ona	3	-0.05133	0.92089
5-metil-4-hexen-3-ona	22	-0.058263	0.93701
Substâncias que aumentaram de FNG para GCT			
Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
α -Cariofileno	64	0.34247	0.98313
3-Hexen-1-ol (Z)	15	0.31075	0.999258
3-hexenil butanoato	41	0.30926	0.997
Metil salicilato	42	0.29483	0.99611
1-Hexanol	17	0.15429	0.99315
-Elemeno	59	0.14585	0.92073
3-Hexanal (Z)	12	0.12743	0.8329
Germacreno B	77	0.11609	0.93129
δ -Muuroleno	68	0.11032	0.91977
3,7(11)-Selinadien	76	0.11148	0.97178
Sesquiterpeno 8	75	0.09775	0.92009
Etanol	1	0.06835	0.9684

Tabela 4: Possíveis biomarcadores de diferenciação entre Galhas com tripes (GCT) e Galhas limpas (sem tripes) (GL).

Substâncias que diminuíram de GCT para GL

Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
α -Cariofileno	64	-0.43146	-0.93108
Metil salicilato	42	-0.26789	-0.84502
3-Hexenal (Z)	12	-0.2109	-0.82751
δ -Muuroleno	68	-0.21918	0.95721
-Elemeno	59	-0.17799	-0.81809
3,7(11)-Selinadieno	76	-0.17634	-0.95327
Germacreno B	77	-0.16177	-0.90193
1-Hexanol	17	-0.086078	-0.85395
5-metil-4-Hexen-3-ona	22	-0.054494	-0.80732

Substâncias que aumentaram de GCT para GL

Substâncias	ID	p(1)	p(corr)1
3-Hexen-1-ol (Z)	15	0.36366	0.9876
-Cadineno	71	0.34614	0.89608
δ -Cadineno	73	0.24368	0.86016
α -Copaeno	56	0.21774	0.84908
σ -Cadineno	72	0.18023	0.84908

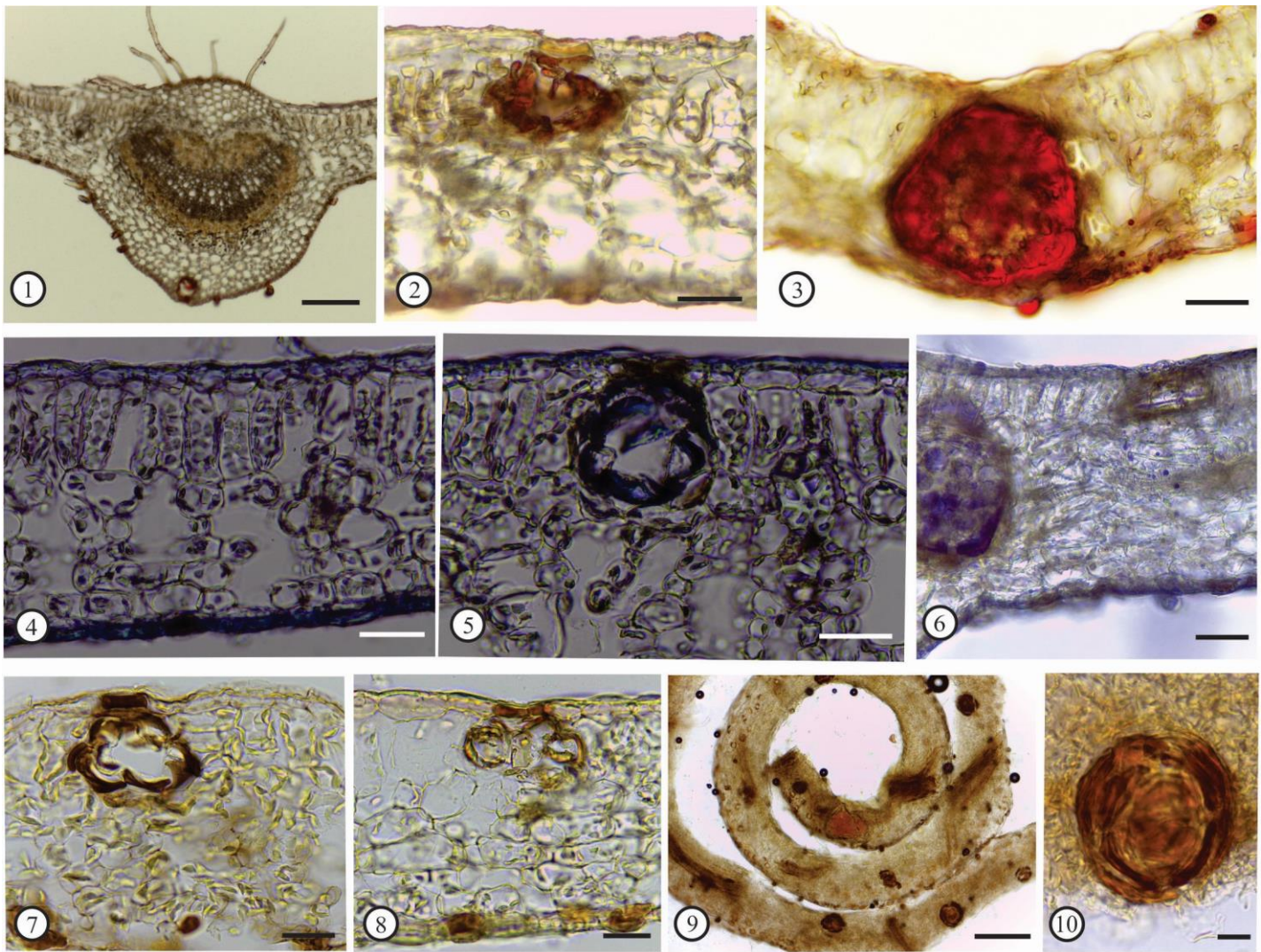


Figura 1. Testes Histoquímicos em secções transversais de folhas não galhadas (FNG) e galhas induzidas por Thysanoptera, Terebrantia em *Myrcia splendens* (SW) DC. **(1-3).** Detecção de lipídeos pelo Sudan Red B na cutícula, nos tricomas, no epitélio secretor das glândulas e no floema. **(1-2)** FNG. **(3)** Galhas. **(4-6).** Detecção de terpenos pelo alfa-naftol e p-fenilenodiamina (NADI). **(4-5)** FNG, mais evidentes na epiderme e nas glândulas. **(6)** Galhas, marcados positivamente nos tricomas, nas glândulas e em feixes vasculares de menor calibre. **(7-10)** Detecção de triterpenos pelo reagente de Liberman-Buchard. **(7-8)** FNG, detectados na epiderme e nas glândulas. **(9-10)** Galhas, detectados na epiderme e nas glândulas em maior intensidade. **(Barras:** 1,9 - 200 μm ; 2-8,10 - 50 μm).

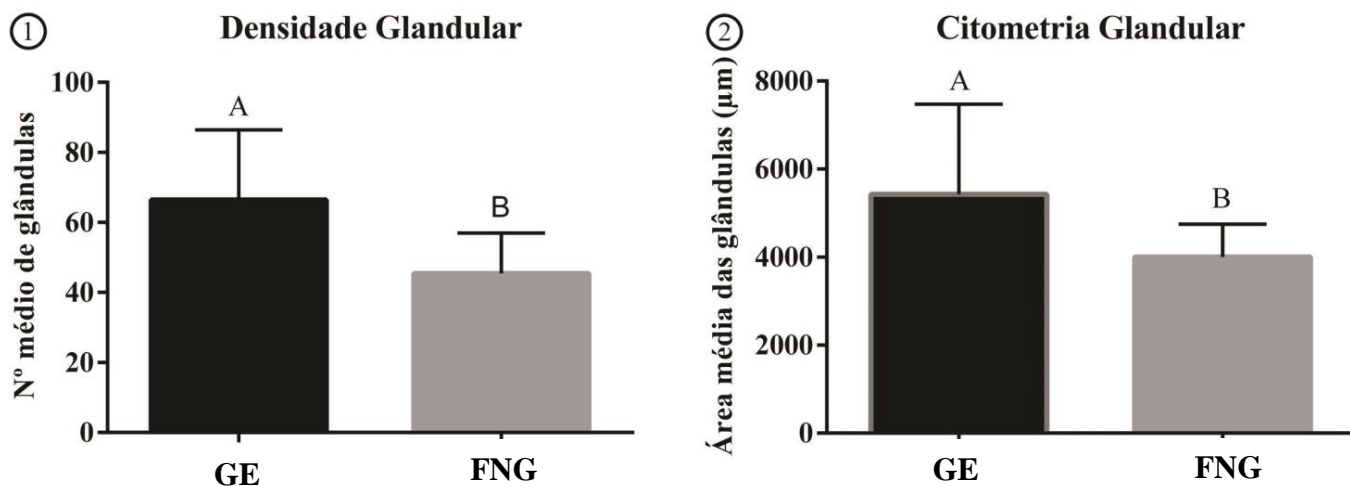


Figura 2. Densidade e Citometria das glândulas em galhas maduras e folhas não galhadas de *Myrcia splendens* (Sw) DC. **(1).** Comparação entre o número médio de glândulas por área. **(2).** Comparação entre a área das glândulas. Foi aplicado o teste de Anova para dados paramétricos e de Tukey para dados não paramétricos. Resultados identificados com letras diferentes indicam diferenças estatísticas de 0,05% entre os tratamentos. **GE.** Galha de Enrolamento. **FNG.** Folha não galhada.

Agrupamento hierárquico dos metabólitos em cada uma das amostras

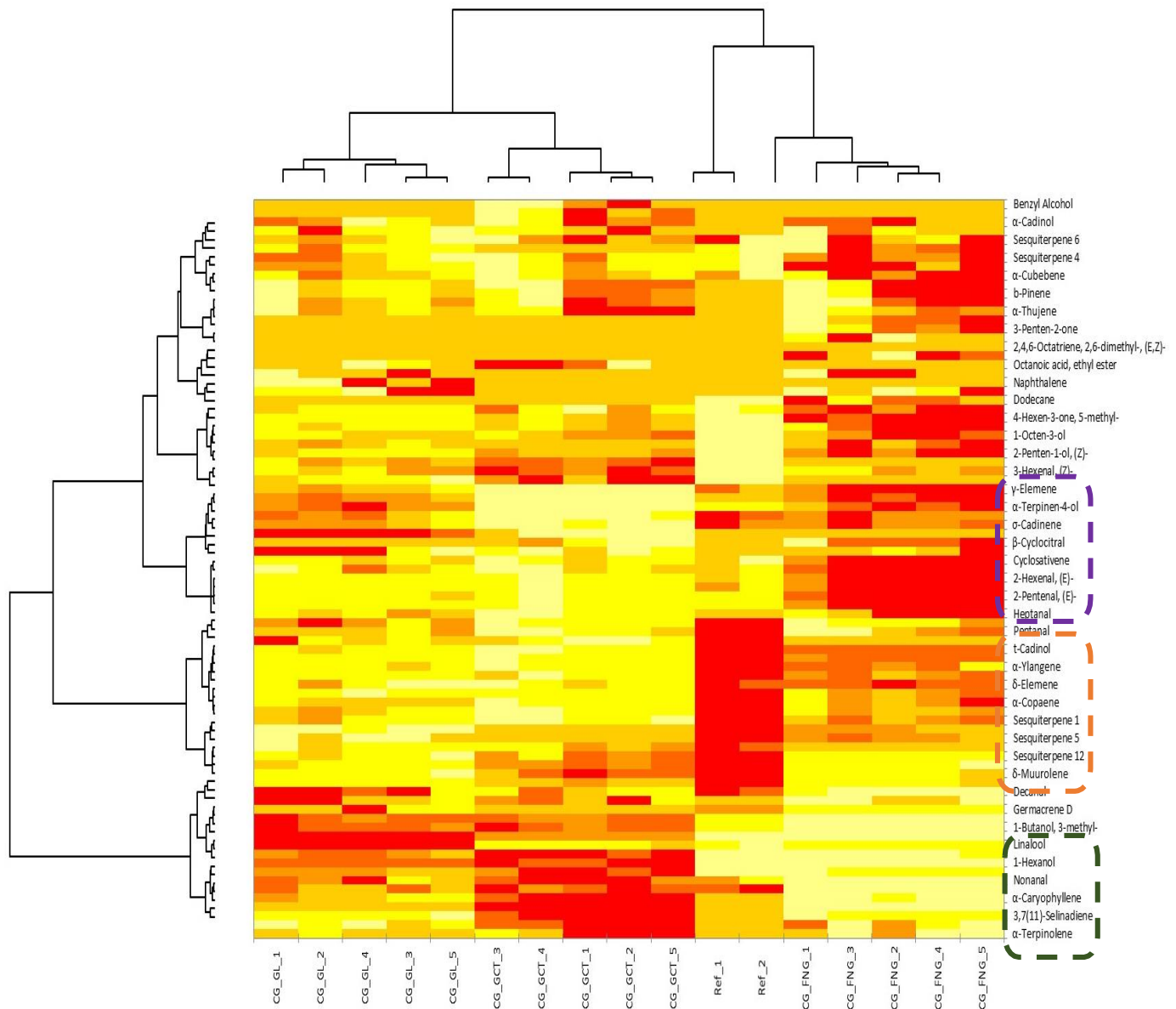


Figura 3: Os níveis de cada substância em cada amostra são apresentados em forma de mapa de calor representando a distribuição dos metabólitos nas amostras. A coloração vermelha indica maior concentração de um composto na amostra. **Laranja:** compostos presentes em maior quantidade nos indivíduos-referência. **Roxo:** compostos presentes em maior quantidade nas amostras de folhas não galhadas. **Verde:** compostos presentes em maior quantidade nas amostras de galhas.

**Gráfico comparativo entre as amostras de Folhas não galhadas (CG_FNG) e
Indivíduo Referência (Ref)**

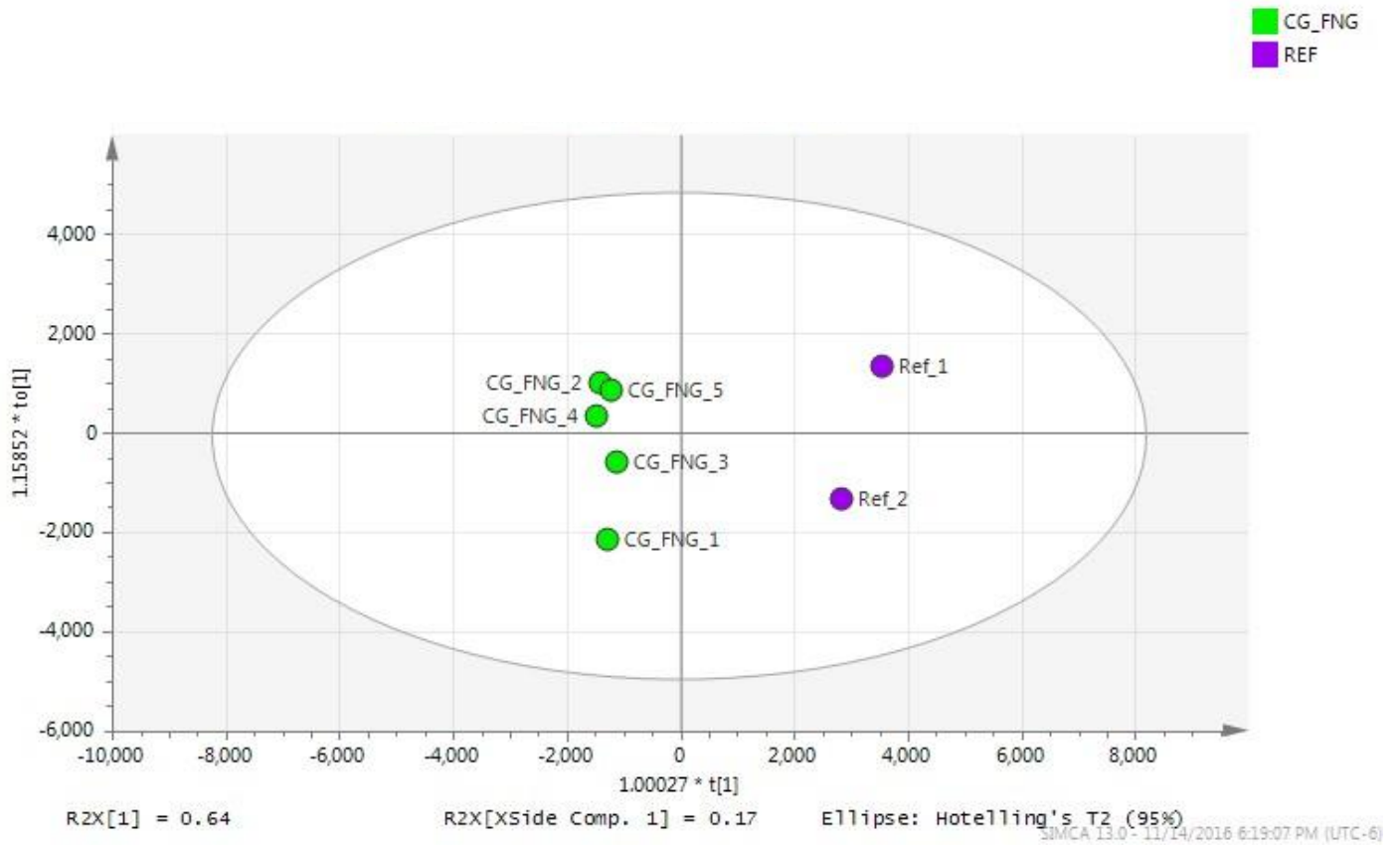


Figura 4: Gráfico de scores OPLS-DA correspondente às análises das amostras de Folha não galhada e indivíduos-referência. É possível visualizar padrões, tendências e agrupamentos. (As tendências demonstram que quanto mais afastados os grupos se posicionam maior é a divergência de padrões entre eles).

Gráfico comparativo entre as amostras de Folhas não galhadas (CG_FNG) e Galhas Limpas (CG_GL)

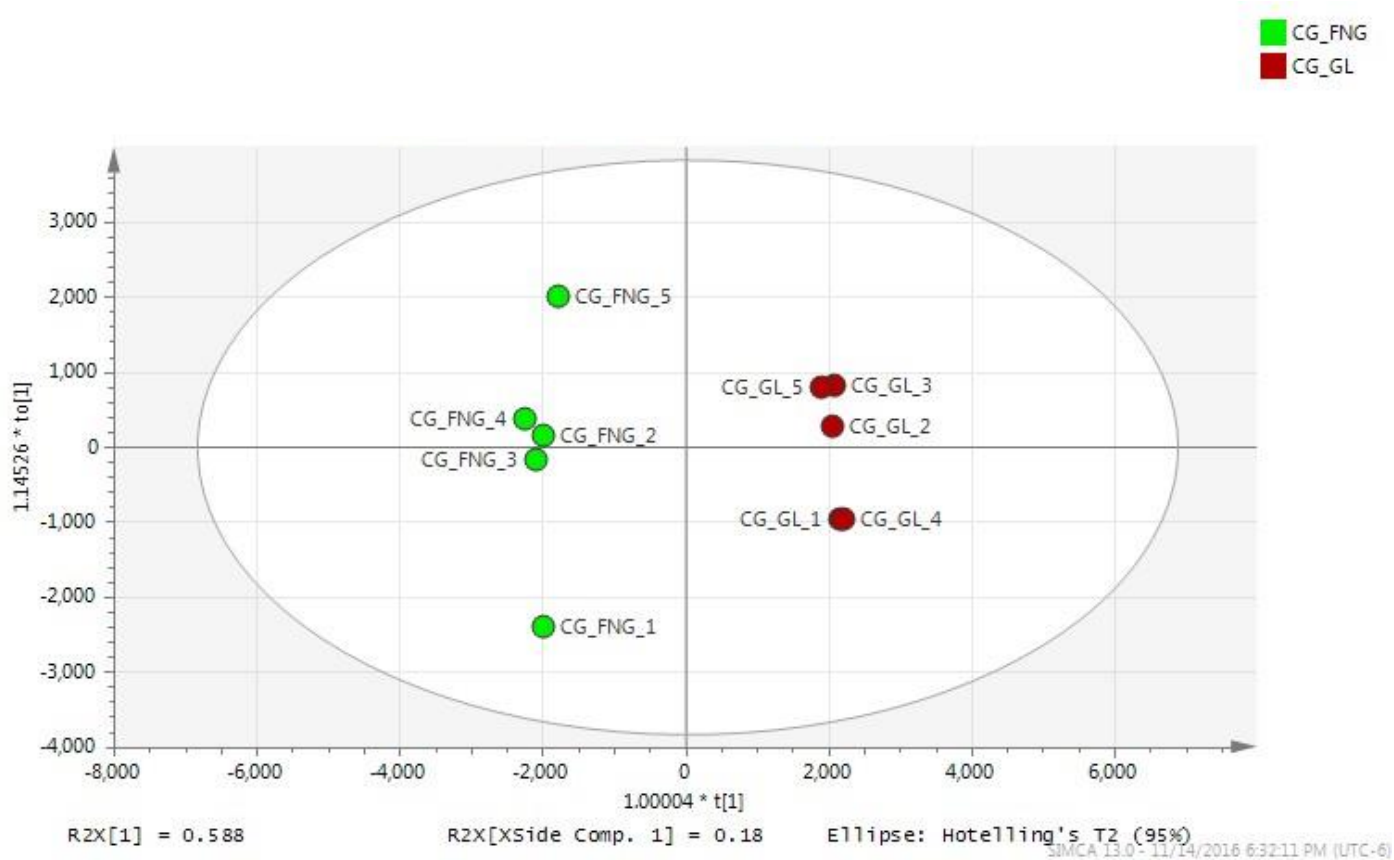


Figura 5: Gráfico de *scores* OPLS-DA correspondente às análises das amostras de Folhas não galhadas e Galhas limpas (sem tripes). É possível visualizar padrões, tendências e agrupamentos. (As tendências demonstram que quanto mais afastados os grupos se posicionam maior é a divergência de padrões entre eles).

Gráfico comparativo entre as amostras de Folhas não galhadas (CG_FNG) e Galhas com Tripes (CG_GCT)

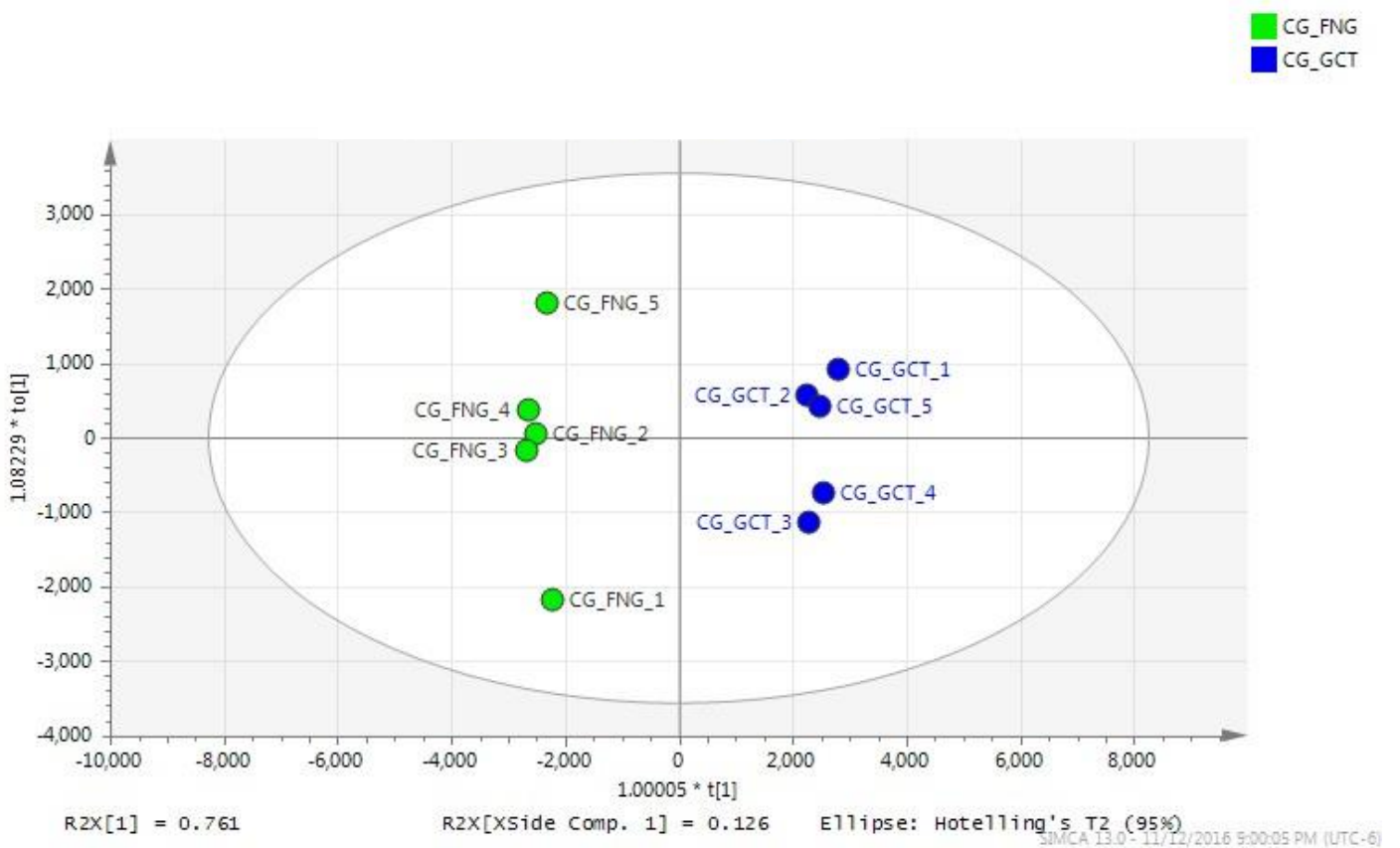


Figura 6: Gráfico de *scores* OPLS-DA correspondente às análises das amostras de Folhas não galhadas e Galhas com tripes. É possível visualizar padrões, tendências e agrupamentos. (As tendências demonstram que quanto mais afastados os grupos se posicionam maior é a divergência de padrões entre eles).

Gráfico comparativo entre as amostras de Galhas com tripes (CG_GCT) e Galhas limpas (sem tripes) (CG_GL)

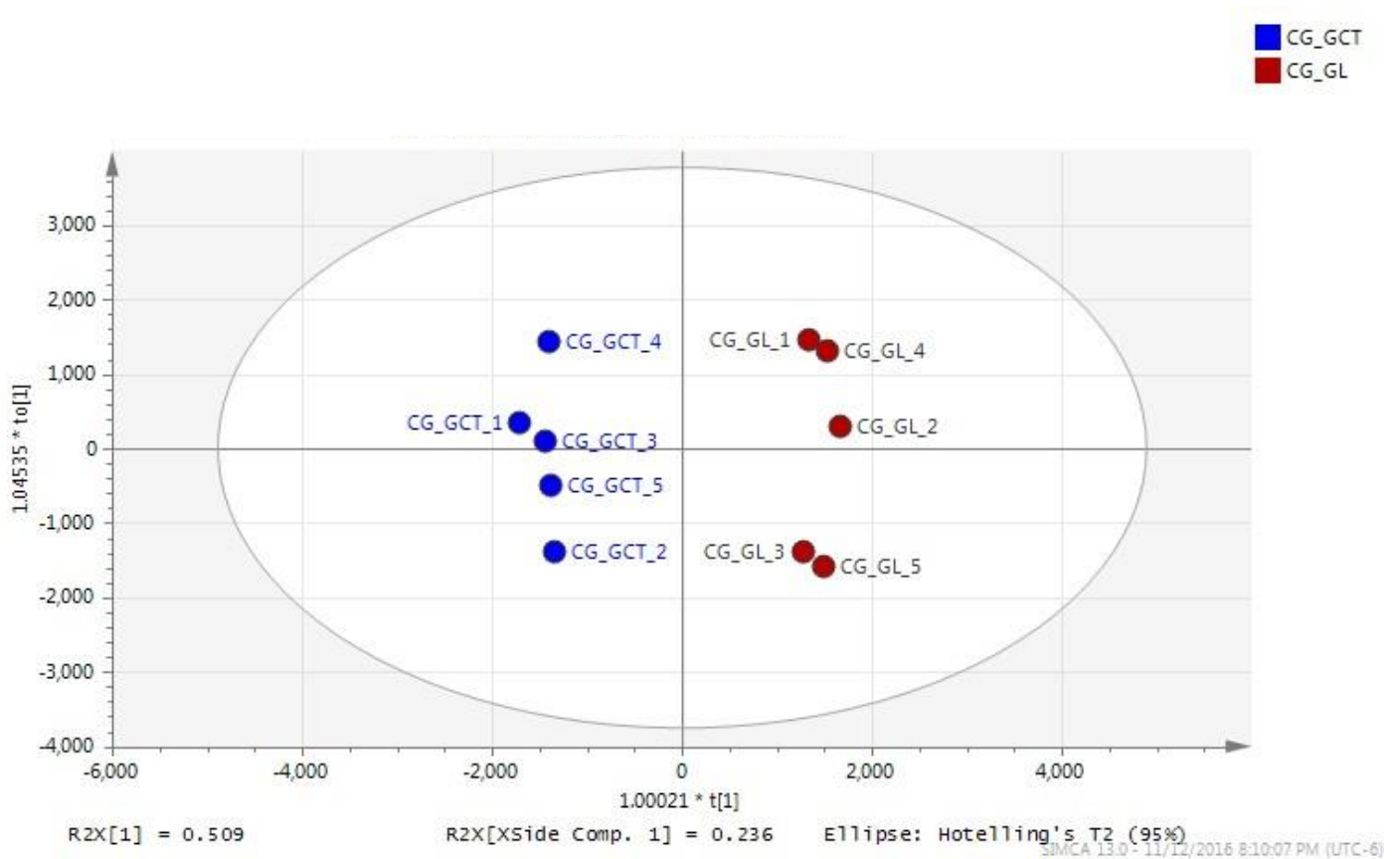


Figura 7: Gráfico de *scores* OPLS-DA correspondente às análises das amostras de Galhas com tripes e Galhas limpas (sem tripes). É possível visualizar padrões, tendências e agrupamentos. (As tendências demonstram que quanto mais afastados os grupos se posicionam maior é a divergência de padrões entre eles).

Considerações Finais

O conhecimento sobre os Thysanoptera indutores e das galhas induzidas por eles nos Neotrópicos ainda é escasso, já que várias espécies são desconhecidas para a ciência e suas galhas foram negligenciadas por anos, sendo comumente consideradas pseudogalhas. Neste trabalho, uma nova espécie de *Holopothrips* galhador foi descrita. Acredita-se que a grande maioria de espécies deste gênero induza galhas, no entanto, grande parte das descrições não contempla dados biológicos ou informações sobre a planta hospedeira, comprometendo assim, o estudo das relações inseto/planta. A nova espécie descrita, *H. striatus*, induz galhas de dobramento/enrolamento em *Myrcia retorta*, com alterações ainda não descritas para os tecidos de plantas hospedeiras nos Neotrópicos. O segundo modelo de estudo, envolve *M. splendens* e uma espécie não descrita de Thysanoptera, Tripinae, e as alterações anatômicas e químicas decorrentes da indução de galhas de enrolamento. Apesar de serem previamente consideradas simples ou rudimentares por não apresentarem neoformação de tecidos, o presente estudo demonstra que galhas de Thysanoptera podem apresentar alterações nas dinâmicas teciduais bastante relevantes.

Nos casos estudados, os morfotipos de dobramento/enrolamento apresentaram processos morfogenéticos diferentes. Isto mostra que, apesar de o hábito alimentar similar dos galhadores, tido como determinante para a morfogênese da galha, ser importante, este não é o único fator que define o desenvolvimento da estrutura. Os limites morfogenéticos relacionados à idade dos tecidos vegetais no momento da indução mostraram-se também capazes de influenciar a estrutura da galha. Em *M. retorta*, apesar da maior influência do *Holopothrips striatus* no padrão de desenvolvimento tecidual, o grau de enrolamento foliar foi menor do que em *M. splendens*. As alterações mais marcantes foram no sentido de alongamento e mudanças do eixo de divisão celular, principalmente nas regiões de hipersensibilidade, e a quebra da adaxialização da lâmina foliar, principalmente nas regiões homogêneas da galha.

Em *M. splendens*, a relação entre o galhador e a planta hospedeira mostrou maiores peculiaridades, pois neste sistema, o galhador realiza duas etapas do seu ciclo de desenvolvimento - reprodução e alimentação - em interdependência com os tecidos vegetais. Ademais, a ação deste galhador altera o tecido das glândulas de óleo e a expressão dos voláteis nos indivíduos galhados e nas galhas. O aumento na emissão de sesquiterpenos, concomitante a emissão de voláteis verdes e do metil salicilato demonstra

que a atividade do galhador na planta hospedeira provoca alterações nas vias de produção de terpenóides voláteis e nas defesas da planta. Estas alterações promovem efeitos diversos, desde a atração de fêmeas para a reprodução ou repelência, consequentes da ação do sesquiterpenos, até a sinalização de estresse para a própria planta ou para plantas vizinhas, consequência da emissão dos voláteis verdes e do metil salicilato. Ainda acredita-se que, neste sistema, o galhador faça uso das substâncias produzidas pelas glândulas de óleos para produzir a secreção lipídica que acalma as fêmeas durante a copulação.

Os modelos aqui estudados deram um novo passo ao estudo de galhas induzidas por tripes nos Neotrópicos. Isso porque, as mudanças no eixo de alongamento das células epidérmicas descritas em *M. retorta*, haviam sido relatadas apenas em algumas galhas na Índia, sem alusão a formação do mosaico de áreas com mudanças celulares distintas numa mesma galha. A oviposição interna aos tecidos foliares como descrito em *M. splendens*, também é um resultado raro, anteriormente descrito apenas para três casos de galhas induzidas por tripes da sub-ordem Terebrantia. O estudo das relações Thysanoptera-*Myrcia* spp. demonstrou relativa complexidade na determinação de mosaicos de alterações estruturais nas lâminas foliares hospedeiras e perfis químicos peculiares. Isto permite visitar o conceito de pseudogalhas e validar as galhas de tripes como verdadeiras, com diferentes níveis de complexidade devido à quebra da polaridade adaxial-abaxial. Estes resultados indicam que as galhas resultantes destes sistemas galhador-planta hospedeira são modelos importantes para a descoberta de novas espécies de insetos, do entendimento de lacunas do desenvolvimento vegetal e das potencialidades químicas envolvidas nas interações inseto-planta.

Como perspectivas futuras apontamos para as alterações químicas provocadas pelo estabelecimento das galhas, na planta hospedeira e na vizinhança. Acreditamos ainda que estudos relativos à idade da folha no momento da indução da galha são cruciais para o entendimento das alterações ocorridas nos tecidos galhados. Ademais, resultados obtidos pelas análises anatômicas das galhas são base para o surgimento de novas perguntas e abrem possibilidades para estudos relacionados à fisiologia das galhas, biologia molecular, entre outros.