

U F *m* G

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica  
Programa de pós-graduação em Biologia Vegetal

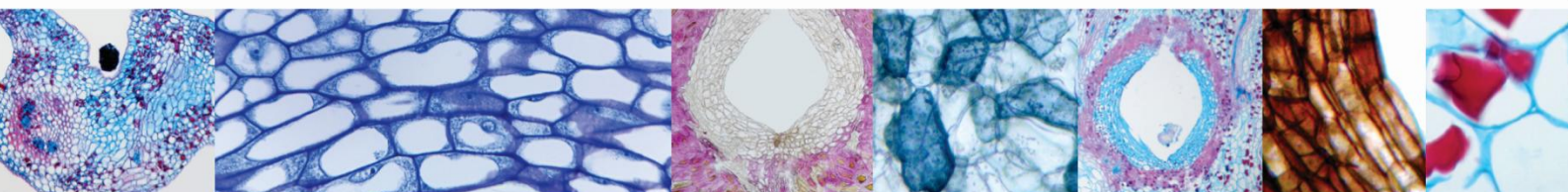


Aline Yasko Marinho Suzuki

**Desenvolvimento estrutural e implicações  
metabólicas no sistema *Lonchocarpus cultratus*-  
Cecidomyiidae**

Orientadora: Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias

Belo Horizonte  
2015





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**ALINE YASKO MARINHO SUZUKI**

**Desenvolvimento estrutural e implicações metabólicas no  
sistema *Lonchocarpus cultratus*-Cecidomyiidae**

**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**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**ALINE YASKO MARINHO SUZUKI**

**Desenvolvimento estrutural e implicações metabólicas no  
sistema *Lonchocarpus cultratus*-Cecidomyiidae**

**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.**

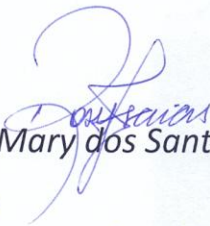
**Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal**

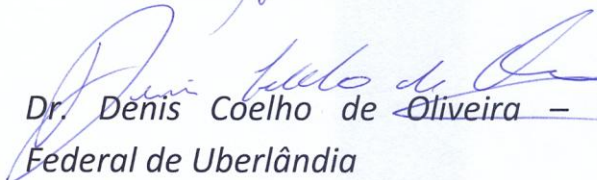
**Orientadora: Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias  
Universidade Federal de Minas Gerais**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2015**

Dissertação defendida e aprovada, em 24 de fevereiro de 2015, pela banca examinadora constituída pelos professores:

  
Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias – UFMG

  
Dr. Denis Coelho de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia

  
Dra. Anete Teixeira Formiga – UFMG



## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, ao Instituto de Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realizar este trabalho. A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa. Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG, sou grata pelo suporte financeiro fundamental para a realização deste estudo.

À Deus por colocar pessoas maravilhosas em minha vida (família e amigos) e pela oportunidade de estudar um pouco da natureza que ele criou.

À Profª. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias, que me apresentou o “mundo das galhas” durante a graduação e me incentivou a continuar estudando. Obrigada pela orientação, ensinamentos, ajuda na redação da dissertação e disponibilidade. Por todas as ideias, esclarecimentos, investimento em minha formação e pelo exemplo profissional.

À grande amiga Gracielle Bragança (“Batman”) por me ajudar em todos os momentos durante as coletas, análises, leitura dos textos. Que por ser uma pessoa tão bondosa me ensinou a ser uma pessoa melhor. Sentirei sua falta diariamente! Obrigada por tudo!

À Cibele Bedetti pelas contribuições na escrita do artigo, ensinamentos desde a graduação, amizade e companheirismo.

Ao Thiago Magalhães por me ensinar e acompanhar nas análises de microfibrilas e pelo apoio em todos os momentos.

À estagiária Amanda Caeiro pelo auxílio na dissociação das epidermes.

Ao Mateus Scarpelli pela ajuda nas análises fotossintéticas.

Ao Wagner Rocha, pelos primeiros ensinamentos durante a iniciação científica, pelo auxílio prestado durante os experimentos e por me acompanhar em campo sempre que precisei.

Aos funcionários do Parque Estadual Serra Verde, em especial ao Lúcio Neto por se preocupar com nossa segurança durante as coletas, por todo carinho e disponibilidade em ajudar (até mesmo às 4 horas da manhã).

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) agradeço pelos ensinamentos e disponibilidade para sanar dúvidas. Especialmente aos professores Fernando Vale, Élder Paiva e Denise Trombert, sempre prontos a ajudar.

As funcionárias do departamento Denise Monteiro e Maria Romagnoli pelos favores prestados e a Selminha pelo carinho e companhia na hora do almoço.

Ao grupo galhas: Anete Formiga, André Portugal, Ariane Castro, Bruno Garcia, Cibele Souza, Cristiane Trindade, Franciele Carvalho, Gracielle Bragança, Nina de Castro, Priscila Pacheco, Renê Carneiro, Thiago Magalhães e Vinícius Morais, por me acolher e por toda ajuda que recebi.

Aos demais colegas do laboratório: Advânio Silva, Carolina Oliveira, Patrícia Gonçalves, Rafaella Ribeiro, Vinícius Kuster, Lucimara Souza, Poliana Fernandes, Camila Magalhães, Caroline Marques, Narah Vitarelli, Deborah Soares, Sarah Reis, Mateus Scarpelli, pela convivência diária.

Aos membros da banca, profa. Dra. Anete Formiga e prof. Dr. Denis Oliveira e aos suplentes, prof. Dr. Fernando Vale e prof. Dr. Hildeberto Caldas, por terem aceitado ler e das suas importantes contribuições a este trabalho.

À todos meus familiares que sempre que me encontram demonstram sentir orgulho de mim. Aos amigos de longa data Elisa Maria, Déborah Ferrarezi, Izabella Marques, Ezequiel Vitor, Hugo Timóteo e Karine Sayure.

À minha mãe Aleide Marinho que é um exemplo de bondade, mulher forte que tem sempre os melhores conselhos e ao meu pai Yukio Suzuki pelo exemplo de vida, por investir em meus estudos e por sempre encontrar uma forma de me ajudar. A minha irmã Andreza Suzuki por sempre fazer tudo que eu peço e por alegrar nossa casa. Ao meu irmão de coração Wanderley Gonçalves, palavras faltam para expressar toda minha gratidão pelo que você faz por mim e minha família, agradeço a Deus por ter nos dado você e sua mãe Neide para cuidar de nós. Ao Thalisson pelo companheirismo, amor, conselhos e por todos os momentos felizes que passo ao seu lado. Dedico esta conquista a vocês!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton).

## SUMÁRIO

<b>Folha de aprovação da banca</b> .....	ii
<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>Epígrafe</b> .....	v
<b>Sumário</b> .....	vi
<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introdução geral</b> .....	3
<b>Referências</b> .....	6
<b>Capítulo I - Perfis estruturais e histoquímicos da galha fusiforme em <i>Lonchocarpus cultratus</i> (Fabaceae) ligadas ao seu valor adaptativo para o Cecidomyiidae galhador</b> .....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	13
Introdução.....	14
Materiais e métodos.....	15
Resultados.....	18
Discussão.....	23
Considerações finais.....	28
Agradecimentos.....	29
Referências.....	29
Figura 1.....	36
Figura 2.....	37
Figura 3.....	38
Figura 4.....	39
Figura 5.....	40
Figura 6.....	41
Figura 7.....	42
Figura 8.....	43
Figura 9.....	44
Figura 10.....	45
<b>Capítulo II - The role cell growth regulators and of the cellulose microfibrils in the development of galls on <i>Lonchocarpus cultratus</i> (Fabaceae)</b> .....	46
Abstract.....	48
Introduction.....	49
Materials and methods.....	51
Results.....	54
Discussion.....	58
Final considerations.....	61
Acknowlegments.....	61
References.....	62
Figure 1.....	69
Figure 2.....	70
Figure 3.....	71
Figure 4.....	72

Figure 5.....	73
Figure 6.....	74
Figure 7.....	75
<b>Capítulo III - Remodeling of pectins and proteins on the cell walls during the development of the leaflet and gall on <i>Lonchocarpus cultratus</i> (Fabaceae).....</b>	<b>76</b>
Abstract.....	78
Introduction.....	79
Materials and methods.....	80
Results.....	81
Discussion.....	85
Final considerations.....	87
Acknowledgements.....	88
References.....	88
Table 1.....	91
Figure 1.....	92
Figure 2.....	93
Figure 3.....	94
Figure 4.....	95
Figure 5.....	96
Figure 6.....	97
<b>Considerações finais.....</b>	<b>98</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>98</b>

## Resumo

*Lonchocarpus cultratus* (Vell.) Azevedo & Lima (Fabaceae) abriga galhas foliolares induzidas por *Lopesia* sp. (Diptera: Cecidomyiidae). Em termos de desenvolvimento, os destinos celulares nos sítios de formação das galhas são profundamente alterados. A neoformação de estômatos, a presença de células esclerenquimáticas vivas que circundam o tecido nutritivo e os processos de hipertrofia celular e hiperplasia dos tecidos são as características estruturais mais relevantes durante o desenvolvimento das galhas. Do ponto de vista bioquímico, o Cecidomyiidae galhador estimula a produção de triterpenos e suprime o acúmulo de amido e esteroides livres nos tecidos da galha. Tanto a síntese quanto o bloqueio, bem como a compartimentalização espacial dos metabólitos conferem funcionalidades específicas aos tecidos neoformados, garantindo proteção e nutrição ao galhador. O acúmulo de proteínas nas células nutritivas indica que estes metabólitos são utilizados na dieta do Cecidomyiidae galhador. Compostos reguladores do crescimento como: ácido-indol-3-acético (AIA), (poli)fenóis e flavonoides são intensamente detectados nos sítios de células hipertrofiadas e restritos a um pequeno grupo de células nos sítios hiperplásicos, evidenciando o papel destes compostos no desenvolvimento da galha. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e AIA nas paredes celulares pode causar acidificação e, conseqüentemente, o afrouxamento das microfibrilas de celulose que influenciam na direção do alongamento celular. Outro componente da parede celular, as pectinas, podem afetar a expansão celular através do controle da flexibilidade e rigidez. O redirecionamento das funções celulares ocorre principalmente no tecido nutritivo, onde a dinâmica péctica e proteica das paredes celulares converge para a manutenção da porosidade e garante maior fluxo de nutrientes para o galhador. Nos estágios iniciais e intermediários de desenvolvimento do folíolo e da galha, são detectados epitopos pécticos e proteicos relacionados com a flexibilidade, enquanto nos estágios finais, os compostos de parede celular convergem para aquisição de rigidez.

**Palavras-chave:** histoquímica, interação inseto-planta, ontogênese, parede celular.

## **Abstract**

*Lonchocarpus cultratus* (Vell.) Azevedo & Lima (Fabaceae) hosts leaflet galls induced by an unidentified species of *Lopesia* sp. (Diptera: Cecidomyiidae). Cell fates are strongly altered during gall development. The neoformed stomata, the presence of live sclerenchyma cells surrounding the nutritive tissue, and the processes of cell hypertrophy and tissue hyperplasia are the most important structural features involved in gall development. From the biochemical point of view, the galling Cecidomyiidae stimulates the production of triterpenes, and suppress the accumulation of starch and free steroids in gall tissues. Synthesis, blockage and spatial compartmentalization of metabolites provide specific functionalities to the newly formed tissue, ensuring protection and nutrition to the galling insect. The accumulation of proteins in nutritive cells indicates that these metabolites are used in the diet of the galling Cecidomyiidae. Growth regulators such as the acid-indole-3-acetic acid (IAA), (poly)phenols and flavonoids are strongly detected in the sites of hypertrophied cells, and restricted to a small group of cells in hyperplastic sites, corroborating the associate roles of these compounds in gall development. The accumulation of reactive oxygen species (ROS) and IAA in the cell walls may cause acidification and, consequently, the loosening of the cellulose microfibrils that influence the direction of cell elongation. Another component of the cell wall, the pectins, can affect cell expansion by controlling the flexibility and rigidity. The redirection of cell functions occurs mainly in the nutritive tissue, where the pectin and protein dynamics of the cell wall converges to maintain porosity, and guarantee a higher flow of nutrients to the galling insect. At the early and intermediate stages of leaflet and gall development, pectin and protein epitopes related to flexibility are detected, while at the final stages, the cell wall compounds guarantee stiffness.

**Keywords:** cell wall, histochemistry, insect-plant interaction, ontogenesis.



## Introdução geral

*Lonchocarpus cultratus* (Vell.) Azevedo & Lima (Fabaceae) é uma espécie arbóreo-arbustiva, que pode atingir até 7 metros de altura (Panarari *et al.* 2008). Esta espécie conhecida popularmente como "feijão-cru" ou "imbira" é abundante em várias áreas do Sul e Sudeste do Brasil (Panarari *et al.* 2008). Estudos na região Sudeste revelam que *L. cultratus* abriga uma espécie identificada de galhador pertencente ao gênero *Lopesia* sp, família Cecidomyiidae que induz galhas fusiformes nos folíolos da planta hospedeira. A família Cecidomyiidae representa o maior grupo de galhadores, e compreende cerca de 60% dos insetos indutores de galhas, com aproximadamente 22.0000 espécies nativas da região Neotropical (Skuhrová *et al.* 1984, Espírito-Santo & Fernandes 2007). Suas galhas exibem grande variedade morfológica, com variação do número de câmaras larvais, formação de tecido nutritivo típico ou a presença de fungos na câmara larval e presença ou ausência de esclereides isoladas ou agrupadas circundando totalmente ou parcialmente o tecido nutritivo (Arduin *et al.* 1991, Oliveira *et al.* 2008, Sá *et al.* 2009, Oliveira & Isaias 2010).

Independentemente do grau de complexidade, o desenvolvimento das galhas, envolve quatro estágios básicos: indução, crescimento e desenvolvimento ou estágio jovem, maturação e deiscência (Rohfritsch 1992) ou senescência (Isaias & Oliveira 2012, Isaias *et al.* 2014). Durante o desenvolvimento das galhas, o balanço entre os processos de hiperplasia e hipertrofia celular (Isaias *et al.* 2011, Ferreira & Isaias 2013) e modificações no padrão de expansão e sentido de alongamento celular (Magalhães *et al.* 2014) são responsáveis por gerar os designs estruturais das galhas (Isaias *et al.* 2013, Isaias *et al.* 2014).

As alterações estruturais observadas nos sítios de desenvolvimento das galhas são típicas, constantes e resultam na formação de estruturas simétricas com diferentes graus de complexidade (Raman 2007, Oliveira & Isaias 2010). A maioria das galhas induzidas por cecidomiídeos são estruturalmente mais complexas e apresentam variações na composição química dos metabólitos (Oliveira *et al.* 2014a). Dessa forma, tanto as alterações estruturais como o acúmulo de substâncias dos metabolismos primário e secundário podem garantir ao galhador e sua progênie nutrientes presentes no sítio de alimentação, proteção contra inimigos naturais e microambiente adequado, segundo as três hipóteses sobre o valor adaptativo das galhas (Price *et al.* 1987, Stone & Schonrögge 2003). A hipótese nutricional sugere que o galhador obtém alimento através

da manipulação dos tecidos da planta hospedeira (Price *et al.* 1987, Stone & Schönrogge 2003), sendo comum o acúmulo de açúcares e proteínas utilizadas na dieta do galhador (Oliveira *et al.* 2010, Oliveira *et al.* 2011). A hipótese microambiental propõe que a estrutura da galha propicia um ambiente favorável ao galhador protegendo-o contra condições abióticas desfavoráveis, como altas temperaturas que podem levar a dessecação (Price *et al.* 1987, Fernandes & Price 1992, Stone & Schönrogge 2003). A hipótese do inimigo natural postula que a galha protege o indutor contra predadores e parasitoides (Price *et al.* 1987, Stone & Schönrogge 2003), fornecendo proteção mecânica, por meio da formação de tecidos esclerenquimáticos (Kraus 1997, Oliveira *et al.* 2008), e proteção química através da síntese e acúmulo de compostos anti-herbivóricos (Oliveira *et al.* 2006, Isaias *et al.* 2014).

A defesa química contra herbívoros predadores é atribuída aos metabólitos secundários, frequentemente observados nas camadas celulares externas das galhas (Carneiro *et al.* 2014a, Isaias *et al.* 2014). Outras funcionalidades, raramente discutidas, são desempenhadas pelos compostos secundários como os (poli)fenóis e flavonoides que juntamente com as espécies reativas de oxigênio (EROs) e auxinas influenciam os processos de hiperplasia dos tecidos e hipertrofia celular (Hori 1992, Fosket 1994, Murphy *et al.* 2000, Del Río & Puppo 2009, Bedetti *et al.* 2014). Em sítios de intensa divisão celular, a ausência ou menor acúmulo de (poli)fenóis foi notado, por exemplo, em galhas de *Struthantus vulgaris* (Arduin *et al.* 1991). Além da relação com a hiperplasia, certos derivados fenólicos, os flavonoides, atuam como moduladores no transporte de auxinas permitindo que a hipertrofia celular ocorra (Murphy *et al.* 2000, Peer & Murphy 2007, Bedetti *et al.* 2014). A co-ocorrência de (poli)fenóis e ácido-indol-3-acético (AIA) nos mesmos sítios das galhas em *Piptadenia gonoachanta* foi comprovada por Bedetti *et al.* (2014), que relacionaram o acúmulo de (poli)fenóis com o bloqueio da ação das AIA-oxidases, elevando os níveis de auxinas envolvidas no processo de expansão celular. Outra funcionalidade desempenhada pelas auxinas é a acidificação da parede celular (Rayle & Cleland 1992) também realizada pelas EROs (Cosgrove 1998, 1999), garantindo o afrouxamento das microfibrilas de celulose, necessário para que o alongamento celular ocorra (Del Rio & Puppo 2009, Swanson & Giroy 2010). Para melhor entendimento do processo de expansão celular, Magalhães *et al.* (2014) avaliaram os padrões de orientação das microfibrilas de celulose que afetam diretamente o sentido de alongamento celular em galhas de *Baccharis dracunculifolia*.

Além das mudanças estruturais e químicas supracitadas, alterações na composição e distribuição dos componentes da parede celular estão relacionadas aos valores adaptativos dos tecidos das galhas. A remodelagem dos componentes pécicos e proteicos das paredes celulares em prol das novas funcionalidades assumidas pelos tecidos neoformados foi recentemente avaliada por Formiga *et al.* (2013), Carneiro *et al.* (2014b) e Oliveira *et al.* (2014b). Dentre os componentes das paredes celulares estudados, as pectinas têm importante papel na adesão e expansão celular, controle da porosidade, rigidez e flexibilidade da parede (Knox *et al.* 1990, Ridley *et al.* 2001, Willats *et al.* 2001, Zykwiniska *et al.* 2005, O'Donoghue & Sutherland 2012). A família das pectinas é composta por polissacarídeos complexos que compreendem os homogalacturonanos (HGAs), os ramnogalacturonanos do tipo I (RG-I), os ramnogalacturonanos do tipo II (RGII) e os xilogalacturonanos (XGAs) (Pelloux *et al.* 2007, Mohnen 2008). Os HGAs são polímeros lineares e homogêneos de unidades de ácido galacturônico ligadas em  $\alpha$ -(1,4), que podem estar metiladas na carboxila C-6 ou acetiladas no O-2 e O-3 (Ridley *et al.* 2001). O grau de esterificação dos HGAs confere diferentes funcionalidades às paredes celulares, sendo que quando altamente metil-esterificados, os HGAs garantem flexibilidade à estrutura e quando são de-metil-esterificados os HGAs enrijecem as paredes (Knox *et al.* 1990, Willats *et al.* 2000, Sabba & Lulai 2005).

As cadeias laterais de RGI podem ser substituídas por arabinanos e galactanos (Albersheim *et al.* 2010). Os arabinanos conferem adesão à parede celular (O'Donoghue & Sutherland 2012), enquanto os galactanos permitem que o alongamento celular ocorra (McCartney *et al.* 2003, Mastroberti & Mariath 2008, Formiga *et al.* 2013, Carneiro *et al.* 2014b, Oliveira *et al.* 2014b). Além das pectinas, fazem parte da composição da parede celular, as arabinogalactano-proteínas (AGPs) e as extensinas (Showalter 1993). As AGPs atuam no direcionamento do plano de crescimento celular, permitindo que a expansão celular ocorra sem que haja morte celular programada (MCP) (Cassab 1998, Gao & Showalter 1999, Majewska-Sawka & Nothnagel 2000, Seifert & Roberts 2007). À medida que o grau de diferenciação se estabelece, as extensinas conferem estabilidade e rigidez às paredes celulares indicando o fim do crescimento celular (Brett & Waldron 1996). Estudos recentes (Formiga *et al.* 2013, Carneiro *et al.* 2014b e Oliveira *et al.* 2014b) têm permitido evidenciar que as galhas são bons modelos para análises de domínios pécicos e proteicos durante o desenvolvimento celular, apresentando funcionalidades específicas nas diferentes camadas de tecido.

A presente dissertação é dividida em três capítulos, nos quais o primeiro aborda os valores adaptativos conferidos pelas alterações estruturais e químicas observadas nos tecidos vegetais hospedeiros sob o impacto do Cecidomyiidae galhador. O segundo capítulo relaciona as diferentes funcionalidades desempenhadas pelos compostos reguladores do crescimento: espécies reativas de oxigênio, AIA, (poli)fenóis e flavonoides com os processos de hiperplasia e hipertrofia e com a consequente reorientação das microfibrilas de celulose no sítio de desenvolvimento da galha. O terceiro capítulo, por fim, capítulo relaciona a dinâmica dos compostos pécnicos e proteicos da parede celular com a funcionalidade diferencial dos tecidos durante o desenvolvimento do folíolo e da galha.

## Referências

- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, A., Staehelin, A. 2010. Plant cell walls, garland science, Taylor and Francis Group, New York.
- Arduin, M., Kraus, J.E., Venturelli, M. 1991. Estudo morfológico de galha achatada em folha de *Struthanthus vulgaris* Mart.(Loranthaceae). Revta. Bras. Bot. **14**: 147-56.
- Bedetti, C.S., Modolo, L.V., Isaias, R.M.S. 2014. The role of phenolics in the control of auxin in galls of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae: Mimosoideae). Biochem. Syst. Ecol. **55**: 53-59. doi: 10.1016/j.bse.2014.02.016.
- Brett, C.T., Waldron, K.W. 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls. *In* Topics in plant functional biology. Edited by M. Black and B. Charlwood. London, U.K. Chapman and Hall. pp. 129-135.
- Carneiro, R.G.S., Castro, A.C., Isaias, R.M.S. 2014a. Unique histochemical gradients in photosynthesis-deficient plant gall. S. Afr. J. Bot. **92**: 94-104.
- Carneiro, R.G., Oliveira, D.C., Isaias, R.M. 2014b. Developmental anatomy and immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium myrtoides* (Myrtaceae) towards the globoid galls of *Nothotrioza myrtoidis* (Triozidae). Plant Cell Rep. pp. 1-14. doi: 10.1007/s00299-014-1683-7.
- Cassab, G.I. 1998. Plant cell wall proteins. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. **49**: 281-309. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.281.
- Cosgrove, D.J. 1998. Cell wall loosening by expansins. Plant Physiol. **118**: 333-339.
- Cosgrove, D.J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. **50**: 391-417.

- Del Río, L.A., Puppo, A. 2009. Reactive oxygen species in plant signaling. Springer, Berlin.
- Espírito-Santo, M.M., Fernandes, G.W. 2007. How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they? *Ann. Entomol. Soc. Am.* **100**: 95-99. doi: 10.1603/0013-8746(2007)100.
- Fernandes, G.W., Price, P.W. 1992. The adaptive significance of insect gall distribution: survivorship of species in xeric and Mesic habitats. *Oecologia*. **90**: 14-20.
- Ferreira, B.G., Isaias, R.M.S. 2013. Developmental stem anatomy and tissue redifferentiation induced by a galling Lepidoptera on *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Botany*. **91**: 752-760
- Formiga, A.T., Oliveira, D.C., Ferreira, B.G., Magalhães, T.A., Castro, A.C., Fernandes, G.W., Isaias, R.M.S. 2013. The role of pectic composition of cell walls in the determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma*. **250**: 899-908. doi: 10.1007/s00709-012-0473-8.
- Fosket, D.E. 1994. Plant growth and development. Academic Press. San Diego.
- Gao, M., Showalter, A.M. 1999. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J.* **19**: 21-331.
- Hori, K. 1992. Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. *In* Biology of insect induced galls. *Edited by* J.D. Shorthouse, & O. Rohfritsch, Oxford University Press, Oxford. pp. 157-170.
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S. 2011. Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* **89**(9): 581-592.
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C. 2012. *In* Gall phenotypes-product of plant cells defensive responses to the inducers attack. *Edited by* J.M. Méridon & K.G. Ramawat. *Plant Defense: Biological Control*. pp. 273-290.
- 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.
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S., Kraus, J.E. 2014. Developmental anatomy of galls in the neotropics: arthropods stimuli versus host plant constraints. *In* neotropical insect galls. *Edited by* G.W. Fernandes & J.C. Santos Springer. pp. 15-

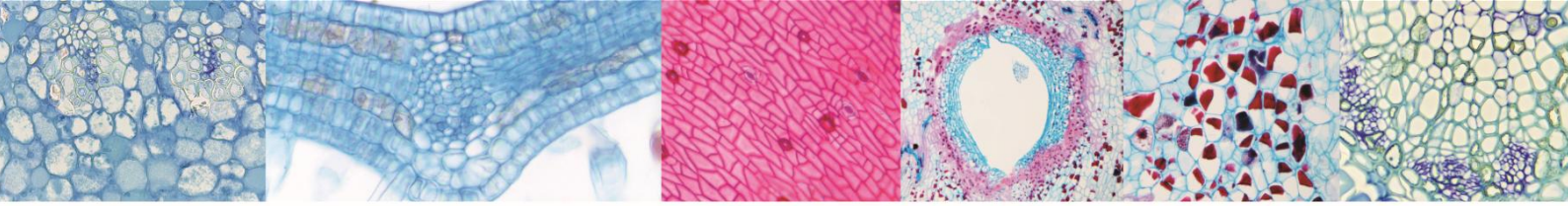
- Kraus, J.E. 1997. Respostas morfo genéticas de plantas a indutores galhadores. *In* Interações ecológicas de biodiversidade. Edited by M.C.P. Araújo, G.C. Coelho & I. Medeiros. Unijuí, Ijuí. pp. 59-76.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C., Roberts, K. 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta*. **181**: 512-521.
- McCartney, L., Steele-King, C.G., Jordan, E., Knox, P. 2003. Cell wall pectic (1→4)-β-d-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J.* 33: 447-454.
- Magalhães, T.A., Oliveira, D.C., Suzuki, A.Y.M., Isaias, R.M.S. 2014. Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Protoplasma*. **251**: 747-753. doi: 10.1007/s00709-013 0574-z.
- Majewska-Sawka, A., Nothnagel, E.A. 2000. The multiple roles of arabinogalactan protein in plant development. *Plant Physiol.* **122**: 3-9.
- Mastroberti, A.A., Mariath, J.E.A. 2008. Development of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma*. **232**: 233-245.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**(3): 266-277.
- Murphy, A., Peer, A., Taiz, L. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. **211**: 315-324.
- O'Donoghue, E.M., Sutherland, P.W. 2012. Cell wall polysaccharide distribution in *Sandersonia aurantiaca* flowers using immunodetection. *Protoplasma*. **249**(3): 843-849.
- Oliveira, D.C., Christiano, J.C.S., Soares, G.L.G., Isaias, R.M.S. 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev. Brasil. Bot.* **29**(4): 657-667.
- Oliveira, D.C., Drummond, M.M., Moreira, A.S.F.P., Soares, G.L.G., Isaias, R.M.S. 2008. Potencialidades morfo genéticas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae): super-hospedeira de herbívoros galhadores. *Rev. Biol. Neotrop.* **5**(1): 31-39.
- Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S. 2010. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *S. Afr. J. Bot.* **76**: 239-248.

doi: 10.1016/j.sajb.2009.10.011.

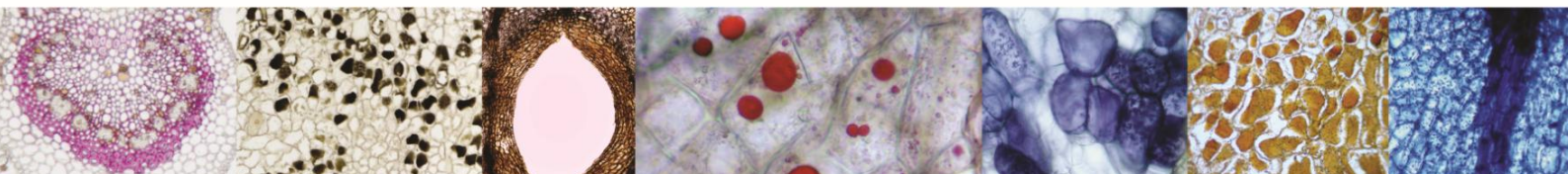
- Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Carneiro, R.G.S., Alvim, M.N., Isaias, R.M.S. 2010. Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma*. **242**: 81-93.
- Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S., Magalhães, T.A., Isaias, R.M.S., 2011. Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)-Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma*. **248**: 829-837.
- Oliveira, D.C., Moreira, A.S.F.P., Isaias, R.M.S. 2014a. Functional gradients in insect gall tissues: studies on neotropical host plants. *In Neotropical Insect Galls. Edited by G.W. Fernandes & J.C. Santos*. Springer. pp. 35-49.
- Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Ferreira, B.G., Teixeira, C.T., Formiga, A.T., Fernandes, G.W., Isaias, R.M.S. 2014b. Variation in the degree of pectin methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall. *PLoS One*. **9**(4): 1-8. doi: 10.1371/journal.pone.0094588.
- Panarari, S.R., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., de Souza, M.C., de Oliveira, A.V., Boni, T.A., Prioli, L.M. 2008. Molecular polymorphism in *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae) from riparian areas of natural reforestation in Upper Paraná River, Brazil. v26i3. 1596. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **26**(3): 335-341. doi: 10.4025/actasciobiolsci.
- Peer, W., Murphy, A. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci*. **12**: 556-563.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., Mellerowicz, E.J. 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci*. **12**(6): 267-277.
- Price, P.W., Fernandes, G.W., Waring, G.L. 1987. Adaptive nature of insect galls. *Environ. Entomol.* **16**: 15-24.
- Raman, A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Curr. Sci*. **92**: 748-757.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E. 1992. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant physiol.* **99**(4): 1271-1274.
- Ridley, B., O'Neil, M.A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. **57**: 929-967.
- Rohfritsch, O. 1992. Patterns in gall development. *In Biology of insect-induced galls. Edited by J.D. Shorthouse & O. Rohfritsch*. Oxford University Press, Oxford, pp. 60-86.



- Sá, C.E.M.D., Silveira, F.A., Santos, J.C., Isaias, R.M.D.S., Fernandes, G.W. 2009. Anatomical and developmental aspects of leaf galls induced by *Schizomyia macrocapillata* Maia (Diptera: Cecidomyiidae) on *Bauhinia brevipes* Vogel (Fabaceae). *Braz. J. Bot.* **32**(2): 319-327.
- Sabba, R.P., Lulai, E. 2005. Immunocytological analysis of potato tuber periderm and changes in pectin and extension epitopes associated with periderm maturation, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **130**: 936-942.
- Seifert, G.J., Roberts, K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 137-161.
- Showalter, A.M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell.* **5**(1): 9-23.
- Skuhrová, M., Skuhrový, V., Brewer, J.W. 1984. Biology of gall midges. *In* Biology of gall insects. *Edited by* T.N. Ananthakrishnan. Oxford IBH, New Delhi, India. pp. 169-222.
- Stone, G.N., Schönrogge, K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 512-522.
- Swanson, S., Gilroy, S. 2010. ROS in plant development. *Plant. Physiol.* **138**: 384-392.
- Willats, W.G., Limberg, G., Buchholt, H.C., Van Alebeek, G.J., Benen, J., Christensen, T.M., Knox, J.P. 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* **327**(3): 309-320.
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Mackie, L., Knox, P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* **47**: 9-27.
- Zykwinska, A.W., Ralet, M.C.J., Garnier, C.D., Thibault, J.F.J. 2005. Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol.* **139**(1): 397-407.



**Perfis estruturais e histoquímicos da galha fusiforme em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae) ligadas ao seu valor adaptativo para o Cecidomyiidae galhador**



## **Perfis estruturais e histoquímicos da galha fusiforme em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae) ligadas ao seu valor adaptativo para o Cecidomyiidae galhador**

### **Resumo**

Neofomações vegetais simétricas induzidas em resposta ao ataque de artrópodes são denominadas galhas. Ao se estabelecer, o galhador induz alterações nos perfis estruturais e químicos da planta hospedeira, aqui estudadas nas galhas fusiformes foliolares em *Lonchocarpus cultratus*. Os resultados são discutidos a luz do valor adaptativo da galha para o galhador, um Diptera: Cecidomyiidae. Amostras de folíolos não galhados e galhas foram coletadas na Estação Ecológica da UFMG e no Parque Estadual Serra Verde, Belo Horizonte-Minas Gerais e submetidas aos procedimentos usuais para análises ontogenéticas e histoquímicas. O desenvolvimento do folíolo não galhado segue o padrão ontogenético descrito na literatura, com epiderme originada da protoderme, mesofilo do meristema fundamental e sistema vascular do procâmbio. O Cecidomyiidae induz alterações significativas nos destinos das células epidérmicas da superfície adaxial e do mesofilo. A rediferenciação das células da epiderme da superfície adaxial e do parênquima adaxial do folíolo não galhado levam a formação do tecido nutritivo que armazena proteínas, que constitui a dieta preferencial do galhador. Células parenquimáticas do córtex externo originadas a partir daquelas da epiderme da face adaxial e do mesofilo, acumulam substâncias de reserva como açúcares redutores utilizados na manutenção estrutural da galha, e compostos anti-herbivóricos que conferem proteção ao galhador. O galhador estimula a neo-síntese de triterpenos que formam uma barreira química conferindo proteção contra o ataque de parasitoides, predadores e cecidófagos. A não detecção de amido na galha indica que os carboidratos são direcionados à manutenção do design estrutural do órgão neoformado, que apresenta zoneamento tecidual típico das galhas de Cecidomyiidae: córtex externo parenquimático, zona mecânica formada por células esclerenquimáticas e tecido nutritivo circundando a câmara larval. Baseado nestes resultados, a futura detecção da atividade da fosfatase ácida e da protease pode vir a elucidar as vias de degradação de amido e proteínas, cujos produtos podem ser direcionados à manutenção estrutural e disponibilização de nutrientes para o galhador, respectivamente.

**Palavras-chave:** anatomia, interação inseto-planta, metabólitos, rediferenciação celular

## **Abstract**

Galls are neoformed symmetrical plant structures induced in response to the attack of an arthropod. This arthropod induces changes in structural and chemical profiles of the host plant, herein studied in the leaflet fusiform galls on *Lonchocarpus cultratus*. The results are discussed in the light of the adaptive value of the gall to galling insects, a Diptera: Cecidomyiidae. Samples of the non-galled leaflets and galls were collected at the Estação Ecológica of UFMG and at Parque Estadual Serra Verde, both in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, and subjected to the usual procedures for ontogenetic and histochemical analyzes. The development of the non-galled leaflets follows the ontogenetic pattern described in literature, with epidermis originated from the protoderm, mesophyll originated from the ground meristem, and the vascular system originated from the procambium. The Cecidomyiidae induces significant changes in the fates of the cells of the adaxial surface epidermis, and of the mesophyll. The redifferentiation of the cells of the adaxial surface epidermis, and of the adaxial parenchyma of the non-galled leaflets leads to the formation of the nutritive tissue that stores proteins, which is the preferred diet of galling insect. Parenchyma cells of the outer cortex originated from the adaxial surface epidermis and of the mesophyll accumulate reserve substances such as reducing sugars used in the structural maintenance of gall and anti-herbivoric compounds related to galling protection. The gall-inducing stimulates the neo-synthesis of triterpenes which form a chemical barrier conferring protection against attack of parasitoids, predators and cecidophagous. The non-detection of starch at the gall site indicates that the carbohydrates are directed to the maintenance of the structural design of neoformed organ, which has the typical tissue zonation of Cecidomyiidae galls: a parenchymatic outer cortex, a mechanical zone formed by sclerenchymatic cells, and a nutritive tissue surrounding the larval chamber. Given these findings, the future detection of the enzymatic activity of acid phosphatase and protease may elucidate the pathways starch and protein degradation, whose products may be directed to structural maintenance and mobilization of nutrients for gall-inducing, respectively.

**Keywords:** anatomy, cell redifferentiation, metabolites, insect-plant interaction

## Introdução

Galhas são produtos de alterações estruturais e químicas nos tecidos vegetais (Mani 1964, Bronner 1992) originadas em resposta ao ataque de um indutor específico (Raman 2007) que pode ser vírus, bactérias, fungos, nematódeos, ácaros ou, mais comumente, insetos (Mani 1964, Arduin & Kraus 2001). Dentre os insetos, a família Cecidomyiidae constitui o principal grupo de galhadores, com aproximadamente 22.0000 espécies nativas da região Neotropical (Espírito-Santo & Fernandes 2007), sendo responsáveis pela formação de galhas que apresentam desde formas mais simples a estruturas altamente complexas (Meyer 1987). Grande diversidade de morfotipos de galhas é encontrada em diferentes famílias de plantas hospedeiras, com destaque para Fabaceae, Myrtaceae, Asteraceae e Melastomataceae (Maia & Fernandes 2004, Mendonça 2007, Maia *et al.* 2008), sendo as espécies de Fabaceae as mais comumente atacadas por galhadores na América do Sul, África e Índia (Dreger-Jaufret & Shorthouse 1992). Dentre os morfotipos de galhas mais frequentes o fusiforme representa 31,1% do total de registros encontrados nos inventários Neotropicais (Isaias *et al.* 2013). O estudo de morfotipos comuns nos permite detectar mecanismos conservativos que podem elucidar passos ontogenéticos pouco entendidos. Independente do grau de complexidade, o estudo ontogenético do órgão hospedeiro relacionado aos estágios de desenvolvimento da galha permite compreender em quais etapas seus padrões de diferenciação foram alterados pela ação do galhador, por meio de rediferenciação celular (*sensu* Lev-Yadun 2003), estruturação de novos tecidos, culminando na forma final da galha. A grande diversidade de formas é explicada tanto pelo equilíbrio peculiar entre os processos de hiperplasia e hipertrofia celular, recorrentes durante o desenvolvimento das galhas (Mani 1964, Isaias *et al.* 2013), como pela pressão seletiva imposta pelos inimigos naturais (Stone & Schönrogge 2003). Em folhas, a variedade de morfotipos parece ser resultante principalmente de mudanças no sistema fundamental, cujas células respondem mais rapidamente aos estímulos do inseto (Formiga *et al.* 2011).

Segundo Hartley (1998), ao se estabelecer, o artrópode galhador pode modificar o perfil químico da planta hospedeira, visando obter alimento, abrigo e proteção contra inimigos naturais, o que está proposto em três hipóteses sobre o valor adaptativo das galhas para o inseto galhador (Price *et al.* 1987, Stone & Schönrogge 2003). Metabólitos primários como proteínas, lipídeos, açúcares redutores e amido,

frequentemente detectados nas células próximas a câmara larval, constituem a principal fonte alimentar do galhador (Oliveira *et al.* 2010, Oliveira & Isaias 2010b, Oliveira *et al.* 2014). Alterações estruturais como a neoformação de tricomas pode contribuir para a geração de um microambiente favorável no interior das galhas (Fernandes 1994, Isaias 1998), protegendo o galhador de condições abióticas desfavoráveis, como altas temperaturas que podem levar a dessecação (Price *et al.* 1987, Fernandes & Price 1992, Stone & Schönrogge 2003). O acúmulo de compostos de defesa do metabolismo secundário e a formação de células esclerenquimáticas ao redor do tecido nutritivo conferem proteção química e mecânica, respectivamente, protegendo o galhador do ataque de inimigos naturais (Kraus 1997, Stone & Schönrogge 2003, Oliveira *et al.* 2006, Isaias *et al.* 2014). Dentre os compostos de defesa frequentemente detectados em galhas os (poli)fenóis e flavonoides apresentam potencial antioxidante (Gottlieb *et al.* 1996, Yamasaki *et al.* 1997, Soares *et al.* 2000, Oliveira *et al.* 2006, Pourcel *et al.* 2007), protegendo os tecidos da galha do estresse oxidativo ocasionado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Oliveira & Isaias 2010b). O modelo proposto para a avaliação das mudanças estruturais e químicas induzidas por um inseto galhador à luz das hipóteses sugeridas para explicar o valor adaptativo das galhas para os galhadores é a interação de um Diptera: Cecidomyiidae com os folíolos de *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) Azevedo & Lima (Fabaceae). O estudo das galhas resultantes desta interação visa responder as seguintes questões: (1) Como os destinos celulares dos folíolos hospedeiros são modificados em função da formação da galha? (2) Quais caracteres dos perfis estruturais e químicos estão relacionados aos valores adaptativos da galha para o galhador? (3) Os estímulos do Cecidomyiidae induzem alguma neo-síntese ou inibição de metabólitos primários e secundários detectados no perfil histoquímico dos folíolos hospedeiros?

## **Materiais e métodos**

### ***Área de estudo e coleta***

No presente estudo, foram analisados dez indivíduos (n = 10), metade deles presente na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais (EEUFMG), *campus* Pampulha (19°53'02.4"S; 43°58'09.8"O) e a outra metade no Parque Estadual Serra Verde (PESV), em Belo Horizonte, Minas Gerais (19°47'22.47"S;

43°57'32.35"O). Exsicatas dos materiais foram depositadas no Herbário BHCB sob o número de registro 155.758 (EEUFMG) e 169.410 (PESV).

### ***Identificação do inseto galhador***

As galhas foram dissecadas em estereomicroscópio (Olympus SHZ) para observação e coleta dos insetos galhadores. Para obtenção de formas adultas, as galhas foram acondicionadas em potes de vidro cobertos com tecidos de malha fina até que os indutores emergissem. Os galhadores e a guilda associada foram fixados em etanol 70% e encaminhados a especialista para identificação.

### ***Fixação e preparo das amostras***

Para o estudo da ontogênese do folíolo não galhado (FNG) e das galhas, foram coletados e processados: meristemas apicais (MA), primórdios foliolares (PF) do primeiro ao terceiro nó, folíolos jovens (FJ), folíolos maduros (FM), galhas jovens (GJ), maduras (GM) e senescentes (GS) ( $n \geq 10$ , para cada estágio). Todas as amostras foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 4.5% e glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato (PBS) 0.1M (pH 7.2) (Karnovsky 1965, modificado) e posteriormente submetidas a vácuo.

Análises anatômicas foram feitas em amostras previamente fixadas, incluídas em Paraplast<sup>®</sup> (Kraus & Arduin 1997) ou Historesina (Leica<sup>®</sup> Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Para inclusão em Paraplast<sup>®</sup>, o material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940). O seccionamento foi feito em micrótomo rotatório (12-18  $\mu$ m) (Leica<sup>®</sup> Jung BIOCUT 2035), e a afixação das seções às lâminas foi realizada com adesivo de Bissing (Bissing 1974). Para retirada do Paraplast<sup>®</sup>, as lâminas contendo os cortes foram imersas em acetato de butila a 40°C em banho-maria, desparafinizadas e desidratadas em série etílica. As seções foram coradas com azul de Astra e safranina, na proporção de 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0.5%) e montadas em Verniz Vitral (Paiva *et al.* 2006). Para a infiltração em Historesina Leica<sup>®</sup> (Leica<sup>®</sup> Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), amostras previamente fixadas foram desidratadas até etanol 95%, submetidas a pré-infiltração com etanol 95% e resina pura, 1:1 (v/v), por 3 dias, seguidas de infiltração em resina pura por 24 horas. O polimerizador foi misturado a resina pura 1:15 (v/v) (conforme instruções do fabricante)



e as amostras foram emblocadas em moldes plásticos. Procedeu-se a montagem e posteriormente secção dos blocos (5 µm) em micrótomo rotatório (Leica® Jung BIOCUT 2035). As secções foram aderidas às lâminas com água, coradas com 0.05% de azul de toluidina em tampão fosfato 0.1M (pH 6.8) (O'Brien *et al.* 1964) e montadas em Entellan (Merck® Millipore International).

Para dissociação de epidermes, fragmentos (0.5 cm<sup>2</sup>) foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio 1%, lavados em água destilada, corados com safranina 1% (Johansen 1940) e posteriormente montados em gelatina glicerinada 50% (Kraus & Arduin 1997). Os resultados obtidos foram registrados com câmera digital (Canon® Power Shot A650) acoplada ao microscópio ótico (Zeiss® Primo Star).

### ***Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

Para análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), amostras fixadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por duas horas e desidratadas em série etílica crescente (Johansen 1940). Em seguida, o material foi submetido ao “ponto crítico” com gás carbônico (Bal-Tec® CPD 030). As amostras foram fixadas aos stubs e metalizadas com 15 nm de ouro (O'Brien & McCully 1981) em metalizador (Bal-Tec® MD 20). As imagens obtidas foram registradas em microscópio eletrônico de varredura (DSM-950) no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI).

### ***Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)***

FM e GM fixadas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% foram desidratadas em série etílica (O'Brien & McCully 1981) e embebidas em resina Spurr® (Lufth 1961). O material foi seccionado transversalmente em ultramicrótomo Reichert-Jung-Ultracut (Leica, Wetzlar, Germany) e contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds 1963). As seções foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo Tecnai G2-12 SpiritBiotwin (FEI, Hillsboro, USA) a 120 kV no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI).

### ***Análises histoquímicas***

Testes histoquímicos para detecção de substâncias dos metabolismos primário e

secundário foram realizados em FM e GM a partir de amostras recém-coletadas seccionadas à mão livre. Para detecção de lipídios, o material foi submetido ao Sudan Red B em solução saturada em etanol 70% (Brundett *et al.* 1991). Para detecção de amido, foi utilizado o reagente de Lugol (0.3% de iodo e 1.5% de iodeto de potássio) (Johansen 1940). A presença de açúcares redutores foi testada com reagente de Fehling (solução A- 7.9% de sulfato de cobre e solução B- 34.6% de tartarato sódico de potássio e 1% de hidróxido de sódio, misturados sobre o corte, seguidos de aquecimento) (Sass 1951). Para detecção de proteínas, as amostras foram imersas em solução saturada de cloreto de magnésio e 0.1g de azul de bromofenol durante 15 minutos, e lavadas em ácido acético e água (Baker 1958).

Para detecção de substâncias do metabolismo secundário, como os (poli)fenóis, as amostras foram submetidas ao cloreto férrico 1% (Johansen 1940). O reagente de Dittmar (1g de iodeto de potássio e 1g de iodo) foi utilizado para identificação de alcaloides (Furr & Mahlberg 1981). Para detecção de flavonoides, as secções foram imersas em 0.5% de cafeína/benzoato de sódio em butanol 90% por cinco minutos e incubadas em 1% de *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), ácido clorídrico e etanol na proporção de (5:1:5) por aproximadamente 2 horas (Feucht *et al.* 1986). Para detecção de ligninas, foi utilizado o floroglucinol acidificado (solução A- 2% de floroglucina e solução B- 25% de ácido clorídrico, misturados sobre o corte) (Johansen 1940). A presença de terpenoides foi testada com 1% de  $\alpha$ -naftol, e 1% de dimetil-*p*-fenilenodiamina em tampão fosfato 0.01M (pH 7.2) por 30 minutos (NADI) (David & Carde 1964). O reagente de Liebermann-Buchard (solução concentrada de ácido sulfúrico e ácido acético, 1:1, v/v) foi utilizado para detecção de triterpenos e esteroides livres (Wagner *et al.* 1984). A presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi testada em 0.5% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por aproximadamente 30 minutos. As secções submetidas às reações histoquímicas foram comparadas com cortes branco para validação dos resultados. As secções transversais das amostras submetidas aos reagentes foram montadas em água. Fotografias foram obtidas em microscópio óptico (Zeiss Primo Star<sup>®</sup>) com câmera digital (Canon<sup>®</sup> Power Shot A650).

## **Resultados**

### ***Morfologia externa***

*Lonchocarpus cultratus* (Leguminosae: Papilionoideae) é uma espécie arbóreo-

arbustiva (Fig. 1A), conhecida popularmente como embira-de-carrapato, com folíolos predominantemente elípticos (Fig. 1B-C). Suas folhas apresentam galhas fusiformes induzidas próximas ou sobre as nervuras com coloração verde semelhante a ambas as faces do folíolo (Fig. 1B-C). Estas galhas apresentam câmara larval esférica (Fig. 1D) na qual foram encontrados representantes de *Lopesia* sp. pertencentes à supertribo Lasiopteridi, parasitadas por Hymenoptera da superfamília Chalcidoidea. A fase de indução é caracterizada pela formação de uma ligeira proeminência no folíolo maduro (FM) (Fig. 1E). Nas galhas jovens (GJ), há um aumento da projeção (Fig. 1E), e nos estágios de maturação (GM) (Fig. 1F) e senescência (GS) (Fig. 1G), nota-se aumento do volume total da galha. A abertura do canal de saída do indutor nas GS se dá pela face adaxial do folíolo (Fig. 1G), onde se pode observar a presença da exúvia/pupário (Fig. 1G-H) do Cecidomyiidae que deixa a galha na fase adulta (Fig. 1I).

### ***Ontogênese do folíolo não galhado***

O meristema apical (MA), em seção transversal, apresenta túnica dividida em três camadas celulares (C1, C2 e C3) e corpo formado por um grupo de células alongadas periclinalmente (Fig. 2A). Os primórdios foliolares (PF), em disposição oposta, apresentam protoderme constituída por uma camada de células isodiamétricas (Fig. 2B). A região que originará a nervura principal sobressai da superfície abaxial apresentando células procambiais isodiamétricas ocupando posição central (Fig. 2B). O MA, em seção transversal, apresenta-se envolvido por tricomas densamente distribuídos (Fig. 2C) e estípulas revestidas por epiderme unisseriada com feixes vasculares em desenvolvimento (Fig. 2D). Tricomas tectores revestem a estípula no meristema (Fig. 2D).

O primórdio foliolar (PF) localizado no primeiro nó, a partir do MA, apresenta lâmina foliolar dobrada ao longo da nervura mediana (Fig. 2E). A protoderme unisseriada que o reveste é originada a partir de divisões anticlinais das células iniciais marginais, enquanto o meristema fundamental, formado por quatro camadas de células isodiamétricas, é originado a partir das iniciais submarginais (Fig. 3). O cordão procambial tem forma de arco com abertura voltada para a face adaxial e acúmulo de compostos fenólicos nas células centrais (Fig. 2E). Neste estágio de desenvolvimento, uma grande densidade de tricomas tectores revestem os PF (Fig. 2F). No PF do segundo nó, as células protodérmicas e do meristema fundamental são alongadas anticlinalmente

e apresentam núcleo conspícuo (Fig. 2G). O meristema fundamental é subdividido em três camadas: meristema adaxial formado por uma camada celular, meristema mediano constituído por duas camadas celulares e meristema abaxial com uma camada celular (Fig. 2G). Na camada mediana do meristema fundamental, grupos de células se dividem em vários planos iniciando a diferenciação dos cordões procambiais, com células pequenas que formarão os feixes vasculares de menor calibre (Fig. 2G). No PF do terceiro nó, o sistema de revestimento encontra-se protegido por tricomas tectores multicelulares diferenciados a partir da protoderme (Fig. 2H). Divisões das células procambiais são responsáveis pelo desenvolvimento das nervuras de segunda ordem (Fig. 2H).

O folíolo jovem (FJ) está diferenciado a partir do 4-6 nó e apresenta epiderme unisseriada (Fig. 4A) com tricomas tectores distribuídos de forma esparsa (Fig. 4B) e mesofilo composto por quatro camadas celulares (Fig. 4A). O sistema vascular é formado por feixes colaterais. No FM, o sistema de revestimento é formado por epiderme unisseriada, com cutícula mais espessa na face adaxial (Fig. 4C). Células epidérmicas de ambas as faces possuem paredes anticlinais retilíneas (Fig. 4D-E). O folíolo é hipostomático com estômatos predominantemente anomocíticos (Fig. 4E). Tricomas tectores e glandulares apresentam-se dispersos por todo folíolo, sendo os glandulares, presentes apenas na face abaxial. O mesofilo possui de 4-6 camadas de células parenquimáticas, que acumulam compostos fenólicos (Fig. 4C). O parênquima paliçádico adaxial, abaxial e o paravenal são formados por 1-2 camadas celulares. O sistema vascular é formado por feixe colateral circundado por bainha esclerenquimática (Fig. 4F).

### ***Ontogênese da galha***

O estágio de indução é caracterizado pela invaginação da epiderme adaxial (Fig. 5A), que apresenta divisões em ambos os sentidos (anticlinal e periclinal) dando início à formação do tecido nutritivo (Fig. 3). A epiderme abaxial se mantém unisseriada, com cutícula delgada e tricomas tectores mais frequentes que tricomas glandulares. As galhas apresentam feixes vasculares colaterais semelhantes aos do folíolo (Fig. 5A). Na galha jovem (GJ), o mesofilo origina o córtex externo parenquimático (Fig. 3) dividido em regiões adaxial (7-18 camadas celulares) e abaxial (9-21 camadas celulares). Os estímulos gerados pelo indutor promovem necrose de células próximas a ele (Fig. 5B).

As células do tecido nutritivo em diferenciação dividem-se periclinalmente (Fig. 5C) resultando no aumento do número de camadas (3-6 camadas celulares). A epiderme adaxial e as células parenquimáticas adjacentes iniciam divisões em diferentes planos promovendo o fechamento da galha (Fig. 5D). Feixes vasculares neoformados são observados no córtex externo (Fig. 5D). A galha madura (GM) é caracterizada pela formação do córtex interno composto por células esclerenquimáticas (4-7 camadas celulares) e pelo tecido nutritivo (5-11 camadas celulares). Neste estágio de desenvolvimento, é observado aumento das projeções adaxial (26-42 camadas celulares) e abaxial (15-41 camadas celulares) (Fig. 5E). O acúmulo de (poli)fenóis é intenso em ambas as faces do córtex externo (Fig. 5E), contudo um baixo acúmulo de (poli)fenóis é observado em um grupo de células parenquimáticas do córtex externo adaxial que ocupam posição central (Fig. 5F). Os feixes vasculares da galha mantêm arranjo colateral (Fig. 5G). O tecido nutritivo é constituído por células alongadas periclinalmente com núcleo evidente (Fig. 5H). A bainha esclerenquimática apresenta esclereides vivas com numerosas pontoações (Fig. 5I-J) e mitocôndrias (Fig. 5J), podendo acumular compostos fenólicos. A galha é anfiestomática, com células epidérmicas com paredes anticlinais retilíneas em ambas as faces e estômatos predominantemente anomocíticos (Fig. 5K-L). No último estágio de desenvolvimento da galha (GS), após a saída do indutor, acúmulo de suberina é detectado no córtex externo adaxial (24-36 camadas celulares) (Fig. 6A) e no tecido nutritivo (2-5 camadas celulares) (Fig. 6B). Células do córtex externo abaxial (16-31 camadas celulares) podem apresentar paredes celulares colabadas (Fig. 6C). O canal de saída do indutor com abertura para a face adaxial é observado (Fig. 6D).

### ***Perfil histoquímico do folíolo não galhado***

Dentre os metabólitos primários, lipídios, amido, açúcares redutores e proteínas são detectados nos tecidos do FNG, marcados pela coloração vermelha, preta, acastanhada e azulada, respectivamente. Lipídios são detectados na cutícula e como gotículas no citoplasma das células da epiderme adaxial e células parenquimáticas do mesofilo (Fig. 7A; 8A-B). Grãos de amido são raramente observados nas células parenquimáticas (Fig. 7A). Açúcares redutores são evidenciados menos intensamente no vacúolo do parênquima paliádico adaxial e paravenal se comparado ao parênquima paliádico abaxial e floema (Fig. 7A; 8C). Proteínas são detectadas de forma intensa no

citoplasma das células do mesofilo (Fig. 7A; 8D). Os metabólitos secundários detectados no FNG foram: (poli)fenóis, alcaloides, flavonoides, ligninas, terpenoides e esteroides livres. A coloração preta indicativa da presença de (poli)fenóis é observada mais intensamente no vacúolo das células do parênquima paliçádico adaxial e abaxial se comparado a detecção menos intensa na epiderme adaxial e no parênquima paliçádico paravenal (Fig. 7A; 8E). O acúmulo intenso de alcaloides evidenciados pela coloração acastanhada é observado no vacúolo das células do mesofilo (Fig. 7A; 8F). A coloração azul indicativa da presença de flavonoides é observada mais intensamente no citoplasma das células parenquimáticas adaxiais e abaxiais se comparado às células do parênquima paravenal (Fig. 7A; 8G). Ligninas são detectadas nas paredes celulares da bainha esclerenquimática e do xilema através da coloração rosa (Fig. 7A; 8H). A coloração azul indicativa da presença de terpenoides ocorre no vacúolo das células parenquimáticas do mesofilo (Fig. 7A; 8I) e em menor frequência no vacúolo da epiderme adaxial (Fig. 7A; 8J). Triterpenos não são evidenciados nos tecidos do FNG. Esteroides livres são intensamente marcados no citoplasma das células parenquimáticas, através da coloração verde-azulada (Fig. 7A; 8K). Espécies reativas de oxigênio (EROs) marcadas pela coloração marrom são detectadas de forma mais intensa nas paredes celulares e citoplasma do parênquima paliçádico paravenal, abaxial e epiderme abaxial quando comparadaa marcação na epiderme adaxial e parênquima paliçádico adaxial (Fig. 7A).

### ***Perfil histoquímico da galha madura***

Lipídios são detectados na cutícula e como gotículas pouco frequentes no citoplasma das células da epiderme da superfície adaxial (Fig. 7B; 9A), do córtex externo adaxial (Fig. 7B; 9A), do tecido nutritivo (Fig. 7B; 9B) e do córtex externo abaxial (Fig. 7B; 9C). No vacúolo das células parenquimáticas do córtex externo adaxial (Fig. 7B; Fig. 9D) e abaxial (Fig. 7B; Fig. 9E), açúcares redutores são evidenciados de forma moderada, enquanto no vacúolo das células epidérmicas da superfície abaxial são menos evidentes (Fig. 7B). Proteínas são detectadas em menor intensidade no citoplasma da epiderme adaxial e mais intensamente no citoplasma das células do tecido nutritivo (Fig. 7B; Fig. 9F).

Ligninas ocorrem nas paredes das células esclerenquimáticas que circundam o tecido nutritivo (Fig. 7B; Fig. 10A). Terpenoides são evidenciados moderadamente nos

vacúolos das células parenquimáticas do córtex externo adaxial (Fig. 7B; Fig. 10B), do tecido nutritivo (Fig. 7B; Fig. 10C) e do córtex abaxial (Fig. 7B; Fig. 10D). Triterpenos são observados de forma moderada no vacúolo das células parenquimáticas do córtex externo adaxial (Fig. 7B; Fig. 10E) e abaxial (Fig. 7B; Fig. 10F). (Poli)fenóis, alcaloides e flavonoides são detectados intensamente nas células parenquimáticas do córtex externo (Fig. 7B; Fig. 10G-K). (Poli)fenóis também estão presentes no vacúolo da epiderme adaxial e células esclerenquimáticas (Fig. 7B). EROs são detectadas de forma intensa nas paredes celulares e vacúolo das células parenquimáticas do córtex externo adaxial, abaxial e do tecido nutritivo (Fig. 7B; Fig. 10L). Esteroides livres e grãos de amido não são observados nos tecidos da galha.

## **Discussão**

### ***Ontogênese do folíolo não galhado***

A ontogênese do folíolo não galhado (FNG) de *Lonchocarpus cultratus* segue o padrão de desenvolvimento submarginal mediano descrito por Hara (1957), com padrões de células-mães e células-derivadas confirmadas em outras espécies por Fahn (1990). Este padrão foi também observado para folhas de *Lantana camara* (Moura *et al.* 2009a), folíolos de *Copaifera langsdorffii* (Oliveira & Isaias 2010a) e de *Lonchocarpus muehlbergianus* (Isaias *et al.* 2011). Em relação a uma espécie cogenérica *L. muehlbergianus*, a estrutura anatômica dos FNG de *L. cultratus* é parcialmente similar. *Lonchocarpus muehlbergianus* apresenta células epidérmicas de paredes anticlinais sinuosas em ambas às faces do folíolo e estômatos paracíticos (Oliveira *et al.* 2006 e Isaias *et al.* 2011), enquanto as células epidérmicas dos folíolos de *L. cultratus* têm paredes anticlinais retilíneas e os estômatos são predominantemente anomocíticos. O sistema fundamental de *L. cultratus* é subdividido em parênquima paliçádico adaxial, paravenal e abaxial, diferindo do observado para *L. muehlbergianus*, no qual o mesofilo é formado por parênquima paliçádico, paravenal e lacunoso (Oliveira *et al.* 2006 e Isaias *et al.* 2011). Tal comparação demonstra potencial de uso da anatomia foliolar para distinção destas duas espécies cogenéricas.

A redução gradativa da densidade de tricomas do primórdio foliolar (PF) do primeiro nó para o folíolo jovem (FJ) em *L. cultratus* pode ser explicada pelo fato da diferenciação dos tricomas ocorrer primeiro, enquanto as células epidérmicas básicas

estão em processo de expansão e divisão celular (Fahn 1990, Glover 2000). Esta maior densidade de tricomas nas fases iniciais de desenvolvimento do folíolo pode conferir proteção contra herbivoria e dessecação (Herms & Mattson 1992, Isaias *et al.* 2011). A baixa predação dos folíolos de *L. cultratus* nos estágios iniciais de desenvolvimento e a alta radiação luminosa que os indivíduos analisados estão expostos indica que os tricomas conferem tanto proteção contra herbivoria quanto a radiação solar.

### ***Alterações nos destinos celulares e valores adaptativos conferidos pelo novo design estrutural da galha***

O destino celular dos tecidos foliulares em *L. cultratus* é profundamente alterado pela ação do galhador, de modo similar ao observado nas galhas induzidas por uma espécie não identificada de Cecidomyiidae em *Copaifera langsdorffii* (Oliveira & Isaias 2010a). Em *L. cultratus* modificações nos destinos celulares são notáveis tanto na epiderme da face adaxial quanto no mesofilo enquanto a epiderme da face abaxial mantém destino similar àquele do FNG. O gradiente de alterações nas camadas de tecidos obedece ao campo cecidogenético proposto por Mani (1964), no qual quanto mais próximo ao estímulo do galhador, mais marcantes são as alterações.

Embora para Edwards & Wratten (1980), a face abaxial das folhas seja o sítio preferencial para a indução das galhas, devido às condições microclimáticas menos estressantes, as galhas em *L. cultratus* são induzidas na face adaxial. O mesmo foi observado para os sistemas *Lantana camara-Acerina lantanae* (Moura *et al.* 2008, Moura *et al.* 2009a) e *Copaifera langsdorffii*-Cecidomyiidae (Oliveira & Isaias 2010a). Tal fato denota que a face foliar não é fator restritivo a oviposição. O impacto do galhador no sistema de revestimento da galha leva a neoformação de estômatos aparentemente funcionais em *L. cultratus*, o que é reportado por Meyer & Maresquelle (1983) e Souza *et al.* (2000). Além das alterações nos estômatos, os tricomas tectores tornam-se abundantes em todos os estágios de desenvolvimento da galha, enquanto tricomas glandulares são escassos. Esta neodiferenciação celular indica o rompimento dos padrões de estímulo-inibição propostos por Glover (2000) para o desenvolvimento da epiderme foliolar. Os tricomas tectores podem contribuir para a geração de um microambiente favorável no interior das galhas (Fernandes 1994, Isaias 1998), já que influenciam na manutenção da temperatura e umidade (Fahn 1990, Oliveira *et al.* 2006). Portanto, a mudança no padrão morfogenético do órgão hospedeiro indica alta



especialização da interação e favorece o desenvolvimento do indutor.

Corroborando o padrão proposto por Rohfritsch (1992) para galhas de Cecidomyiidae, três tipos de tecidos especializados são observados nas GM: o tecido nutritivo, células esclerenquimáticas, e o córtex externo parenquimático que acumula substâncias de reserva. Conforme proposto por Meyer (1987) e Bronner (1992, 1997), os Cecidomyiidae ao se alimentarem não ocasionam grandes danos às células do tecido nutritivo, sendo observadas necroses esparsas semelhantes às detectadas nas galhas jovens (GJ). A diferenciação do esclerênquima na galha estudada é comum a diversos morfotipos induzidos por cecidomiídeos na região neotropical (Kraus *et al.* 1996, Isaias 1998, Kraus *et al.* 2003, Castro 2007, Formiga *et al.* 2011). A lignificação é uma resposta comum das plantas ao estresse abiótico e biótico e garante proteção contra inimigos naturais e sustentação mecânica (Bronner 1992, Rohfritsch 1992, Kraus 1997, Stone & Schönrogge 2003, Lee *et al.* 2007). Em *L. cultratus*, as análises citológicas comprovam que as células esclerenquimáticas são metabolicamente ativas, podendo atuar na translocação de água e nutrientes para o galhador, através das numerosas pontuações, fato já relatado por Rohfritsch (1992) e Arduin & Kraus (1995).

O arranjo colateral dos feixes vasculares do folíolo é mantido nas galhas, onde há ainda neoformações vasculares. A formação de novos feixes pode conferir uma oferta adicional de nutrientes, dando embasamento estrutural à hipótese nutricional (Price *et al.* 1987). Conforme proposto por Mani (1964), feixes colaterais são característicos de galhas de Cecidomyiidae, e já foram observados em outros morfotipos induzidos por esta família de insetos em *Copaifera langsdorffii* (Oliveira & Isaias 2009, Oliveira & Isaias 2010a) e em *Aspidosperma spruceanum* (Formiga *et al.* 2011). Considera-se também o arranjo dos feixes vasculares como produto do padrão morfogenético das galhas em questão na qual o dobramento da lâmina foliolar ocorre pela face adaxial do folíolo. Os feixes vasculares mantêm desta forma a porção xilemática voltada para a face interna da galha.

Nas GS, o processo de suberização das células do córtex externo é decorrente da cicatrização após a saída do galhador, e pode proteger a galha da invasão de agentes patogênicos (Isaias & Olivera 2012). A suberização não é exclusiva de galhas de insetos, como as induzidas por um Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* (Formiga *et al.* 2011) e por *Callophya duvauae* (Psylloidea) em *Schinus poligamus* (Dias *et al.* 2013) já que também ocorre em galhas induzidas por *Aceria lantanae* (Acari) em *L. camara* (Moura *et al.* 2009a).

### ***Síntese, inibição e compartimentalização de metabólitos leva a aquisição do novo design funcional***

A atividade do galhador estimula a produção de triterpenos, presentes apenas nos tecidos da galha madura (GM), e suprime o acúmulo de amido e esteroides livres. Os demais metabólitos analisados estão presentes tanto nos tecidos do folíolo não galhado (FNG) quanto da GM, entretanto o local de ocorrência destes compostos varia. Tais resultados demonstram que a neo-síntese, o bloqueio e a compartimentalização tecidual dos metabólitos conferem funcionalidades específicas aos tecidos da galha. A detecção, embora rara, de grãos de amido no FNG indica que seu acúmulo é provavelmente resultante do processo de assimilação de CO<sub>2</sub> cujos produtos são exportados e utilizados em diversas vias metabólicas (Souza *et al.* 2005). A ausência de amido na galha de *L. cultratus* indica sua provável despolimerização para utilização na manutenção estrutural do órgão neoformado, conforme proposto por Oliveira & Isaias (2010b) para galhas em *Aspidosperma australe*. Reservas lipídicas detectadas em diferentes tecidos da GM correspondem a um padrão esperado para galhas de Cynipidae e não para galhas de Cecidomyiidae, conforme proposto para galhas da região Temperada (Bronner 1992). O acúmulo de gotículas lipídicas no córtex externo de *L. cultratus* evidencia a atuação deste composto como substância de reserva, podendo contribuir para manutenção estrutural da galha, uma vez que são moléculas altamente energéticas e possíveis precursoras de diferentes vias metabólicas das plantas (Buchanan *et al.* 2000, Oliveira *et al.* 2006, Moura *et al.* 2008, Oliveira & Isaias 2010b). A detecção de lipídios no tecido nutritivo pode estar associada à mobilização de reservas para a produção de novas células. Este metabólito foi observado no tecido nutritivo das galhas induzidas por *Pipaldiplois pipaldiplois* em *Ficus religiosa* (Raman & Gopinathan 1987) e por *Schismatodiplois lantanae* em *Lantana camara* (Moura *et al.* 2008), ambos com galhas induzidas por Cecidomyiidae. Em todos os casos relatados, o acúmulo de lipídios parece advir do potencial metabólico das plantas hospedeiras para sua síntese. Outro metabólito detectado nas células nutritivas das galhas em *L. cultratus*, as proteínas, parecem constituir a principal fonte alimentar do galhador, similarmente ao observado por Oliveira *et al.* (2010) para galhas em *Aspidosperma spruceanum*. Além do papel nutricional, as proteínas podem estar relacionadas ao aumento da tensão respiratória (Schönrogge *et al.* 2000). Em galhas

induzidas por Cynipidae em *Quercus* sp. a proteína formato-desidrogenase (FDH) detectada nos tecidos circundantes a câmara larval é atribuída ao estresse respiratório do indutor (Schönrogge *et al.* 2000). Dessa forma, a detecção expressiva de proteínas nas células nutritivas de *L. cultratus* também pode ser relacionada ao aumento do estresse oxidativo ocasionado pela respiração do galhador.

Os carboidratos são importantes fontes de reserva presentes em galhas de Cecidomyiidae (Bronner 1992). O acúmulo de açúcares redutores e amido no mesofilo do FNG e apenas de açúcares redutores no córtex externo das galhas em *L. cultratus* é mais um indicativo de que os carboidratos estão envolvidos na manutenção celular da galha (Oliveira *et al.* 2010), sem potencial para acúmulo na forma de amido. O não acúmulo de açúcares no tecido nutritivo reflete o intenso consumo destes metabólitos na dieta do galhador ou durante a respiração celular. Outra via potencial para os açúcares redutores seria a de proteção contra o estresse oxidativo (Couée *et al.* 2006), corroborada pela detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos mesmos locais de acúmulo de carboidratos nas galhas em estudo. A formação das galhas em *L. cultratus*, contudo, suprime a expressão de compostos com potencial antioxidante, os esteroides livres (Cui *et al.* 2005), os quais são intensamente detectados em todo mesofilo do FNG.

No gênero *Lonchocarpus*, a presença de (poli)fenóis e seus derivados é frequentemente relatada (Alavez *et al.* 2000, Argáez *et al.* 2000, Oliveira *et al.* 2006) e embora sua produção seja atribuída a defesa contra inimigos naturais (Hartley 1998), em *L. cultratus*, os (poli)fenóis não impedem a indução da galha, de modo que sua função primária parece estar relacionada ao desenvolvimento estrutural do órgão neoformado (Suzuki *et al.* 2015 - cap. 2. Submetido). Ao inibir a ação do ácido-indol-3-ácetico (AIA), os (poli)fenóis participam dos processos de crescimento, regulando a expansão celular, conforme discutido por Bedetti *et al.* (2014) em galhas de *Piptadenia gonoachanta*. Os flavonoides, derivados fenólicos, são também comumente produzidos pelo gênero *Lonchocarpus* (Pires *et al.* 2011) e além de conferirem proteção contra predadores, fornecida pelas catequinas e outros flavonoides adstringentes (Pietta 2000), têm atividade antioxidante (Bors *et al.* 1990, Yamasaki *et al.* 1997, Soares *et al.* 2000, Pourcel *et al.* 2007). Tal papel é corroborado em *L. cultratus* pela detecção destes metabólitos nos mesmos sítios de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Suzuki *et al.* 2015 - cap. 2. Submetido). A redução na palatabilidade dos tecidos das galhas é conferida pelos (poli)fenóis, flavonoides e reforçada pelos alcaloides, que

geram sabor amargo e conferem toxicidade aos tecidos (Henriques *et al.* 2000).

Uma particularidade do perfil histoquímico das galhas de *L. cultratus* é a ocorrência de terpenoides no tecido nutritivo. O Cecidomyiidaegalhador parece não sofrer os efeitos deletérios deste composto, possivelmente, devido a mecanismos que inativam a toxicidade desse metabólito, semelhantemente ao observado por Miles (1968) e por Hori (1992) para insetos que degradam os (poli)fenóis por meio das polifenol oxidases presentes em sua saliva. Triterpenos observados nas células da epiderme da superfície adaxial e do córtex externo adaxial e abaxial da galha em *L. cultratus* constituem possivelmente uma barreira química contra o ataque de inimigos naturais. Em outro sistema estudado nos Neotrópicos, Moura *et al.* (2009b) investigaram a influência de diferentes classes de terpenóides na indução de galhas em *Lantana camara*. A ausência de monoterpenos e sesquiterpenos, juntamente com a menor densidade de tricomas foram determinantes para a escolha das plantas hospedeiras que não apresentaram tais restrições químicas e estruturais (Moura *et al.* 2009b).

### **Considerações finais**

Os destinos celulares da epiderme adaxial, e das células do parênquima adaxial, paravenal e abaxial do folíolo são modificados para formar a galha fusiforme, estabelecendo um novo design estrutural que corrobora o padrão proposto para galhas de Cecidomyiidae. Tanto as alterações químicas quanto estruturais garantem nutrição ao galhador, a partir da formação do tecido nutritivo, da rediferenciação de esclereides vivas que permitem a passagem de água e nutrientes através das numerosas pontoações e do acúmulo de proteínas. Proteção é conferida pela rediferenciação de células esclerenquimáticas que circundam o tecido nutritivo e pelo acúmulo de compostos anti-herbivóricos como (poli)fenóis, terpenoides, flavonoides, alcaloides e triterpenos, detectados predominantemente nos tecidos externos da galha. A compartimentalização espacial de metabólitos primários e secundários reforça o papel destes compostos na nutrição e proteção do inseto indutor, respectivamente. A presença de tricomas em ambas as faces da galha pode manter a temperatura e a umidade em níveis adequados para a sobrevivência do galhador, garantindo um microambiente favorável ao seu desenvolvimento. O Cecidomyiidae estimula a neo-síntese de triterpenos que garante proteção contra inimigos naturais e suprime o acúmulo de amido e esteroides livres.

Como perspectivas futuras, investigações enzimáticas como a detecção da fosfatase ácida poderá reforçar a proposta de que os carboidratos estão sendo direcionados para a manutenção estrutural da galha. As investigações acerca do tecido nutritivo podem evoluir para a detecção da protease e o papel desta enzima na disponibilização de proteínas para nutrição do galhador.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a CAPES, FAPEMIG e CNPq pelas bolsas de estudo e apoio financeiro, e a Dra. Valéria Cid Maia pela identificação dos insetos galhadores e guilda associada.

### **Referências**

- Alavez, S.D., Chilpa, R.R., Estrada, J.M., Garibay, G.F., Uribe, C.I., Sánchez, S.M. 2000. Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*. *Phytochemistry*. **55**: 953-957.
- Arduin, M., & Kraus, J.E. 1995. Anatomia e ontogenia de galhas foliares de *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). *Bol. Bot. Univ.* **14**: 109-130.
- Arduin, M., & Kraus, J. 2001. Anatomia de galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concinna* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Rev. Bras. Bot.* **24**(1):63-65.
- Argáez, B.R., Rodríguez, P.L.M., Waterman, P.G. 2000. Flavonoids from the item bark of *Lonchocarpus xuul*. *Phytochemistry*. **54**: 611-614.
- Baker, J.R. 1958. Note on the use of bromophenol for the histochemical recognition of protein. *Q. J. Microsc. Sci.* **99**: 459-460.
- Bedetti, C.S., Modolo, L.V., & Isaias, R.M.S. 2014. The role of phenolics in the control of auxin in galls of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae: Mimosoideae). *Biochem. Syst. Ecol.* **55**: 53-59. doi: 10.1016/j.bse.2014.02.016.
- Bissing, D.R. 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Technol.* **49**: 116-117.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**: 343-355.
- Bronner, R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. *In Biology of insect induced galls. Edited by J.D. Shorthouse & O.*

- Rohfritsch. Oxford University Press. New York. pp. 118-140.
- Bronner, R. 1997. Contribution a l'étude histochimique des tissus nourriciers des zoocécidies. *Marcellia*. **40**: 1-134.
- Brundett, M.C., Kendrick, B. Peterson, C.A. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow in polyethylene glycol-glycerol. *Biotech. Histochem.* **66**: 111-116.
- Buchanan, W., Gruissem, R.L., Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville.
- Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*. **61**: 255.
- Castro, A.C.R. 2007. Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **57**(3): 449-459.
- Cui, Y., Kim, D.S., Park, K.C. 2005. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol.* **96**(1): 79-85.
- David, R., Carde, J. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*. **258**: 1338-1340.
- Dias, G.G., Moreira, G.R.P., Ferreira, B.G., Isaias, R.M.S. 2013. Developmental pathway from leaves to galls induced by a sap-feeding insect on *Schinus molle* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). *Anais Acad. Bras. Cienc.* **85**: 187-200.
- Dreger-Jauffret, F., Shorthouse, J.D. 1992. Diversity of gall-inducing insects and their galls. *In Biology of Insect-Induced Galls. Edited by Shorthouse, J.D., Rohfritsch, O.* Oxford University, Oxford, pp. 8-33.
- Edwards, P.J., Wratten, S.D. 1980. *Ecology of insect-plant interactions*. The Carmelot Press. Southampton.
- Espírito-Santo, M.M., Fernandes, G.W. 2007. How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they? *Entomol. Soc. Am.* **100**: 95-99. doi: 10.1603/0013-8746(2007)100.
- Fahn, A. 1990. *Plant Anatomy*. Pergamon Press. Oxford. pp. 1-534.
- Fernandes, G.W., Price, P.W. 1992. The adaptive significance of insect gall distribution:

- survivorship of species in xeric and Mesic habitats. *Oecologia*. **90**:14-20.
- Fernandes, W.G. 1994. Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Rev. Bras. Entomol.* **38**(2):421-433.
- Feucht, W., Schmid, P.P.S., Christ, E. 1986. Distribution of flavanols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *J. Plant Physiol.* **25**: 1-8.
- Formiga, A.T., Soares, G.L.G., Isaias, R.M.S. 2011. Responses of the host plant tissues to gall induction in *Aspidosperma spruceanum* Müell. Arg. (Apocynaceae). *A. J. Plant Sci.* **2**: 823-834.
- Furr, M., Mahlberg, P.G. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.***44**: 153-159.
- Glover, B.J. 2000. Differentiation in plant epidermal cells. *J. Exp. Bot.* **51**: 497-505.
- Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C., & Borin, M.R.M.B. 1996. Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. Ed. UFRJ. Rio de Janeiro. pp. 267.
- Hara, N. 1957. On the types of the marginal growth in dicotyledonous foliage leaves. *Bot. Mag. Tokyo.* **70**: 108-114.
- Hartley, S.E. 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall former? *Oecologia*. **113**: 492-501.
- Henriques, A.T., Kerber, V.A., Moreno, P.R.H. 2000. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. *In Farmacognosia: da planta ao medicamento. Edited by C.M.O Simões, E.P Schenkel, G. Gosmann, J.C.P Mello, L.A Mentz & P.R Petrovik. Editora da UFSC, Santa Catarina.*
- Herms, D.A., Mattson, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* **67**(3): 283-335. doi:10.1086/ 417659.
- Hori, K. 1992. Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. *In Biology of insect induced galls. Edited by J.D. Shorthouse & O. Rohfritsch , Oxford University Press, Oxford. pp. 157-170.*
- Isaias, R.M.S. 1998. Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Pappilonoideae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S. 2011. Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany.* **89**: 581-592.
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C. 2012. *In Gall phenotypes-product of plant cells defensive responses to the inducers attack. Edited by J.M. Méridon & K.G. Ramawat. Plant*

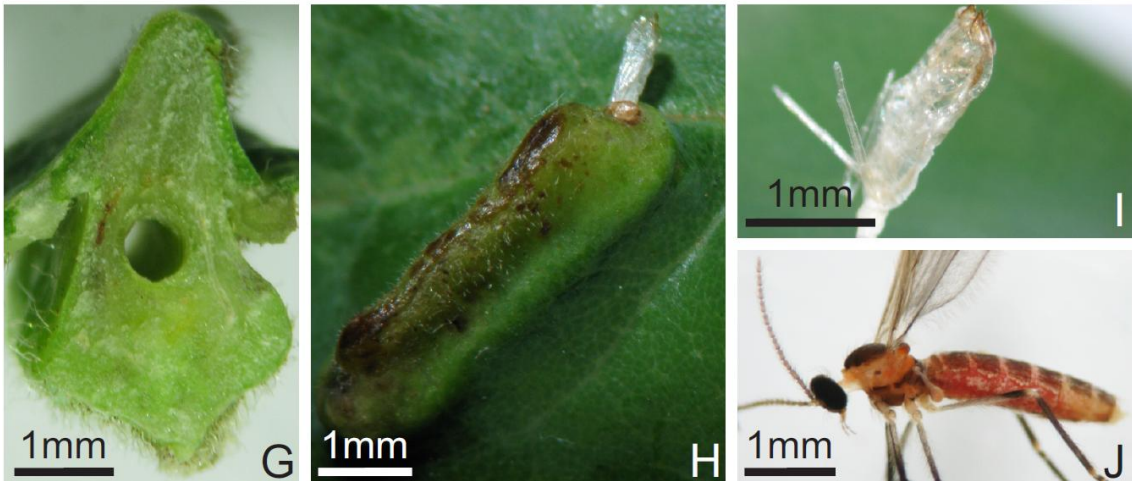
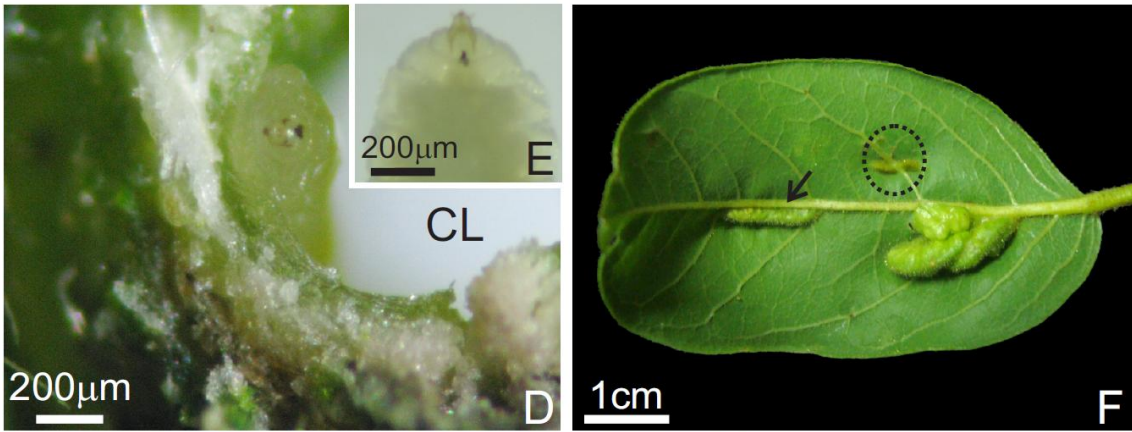
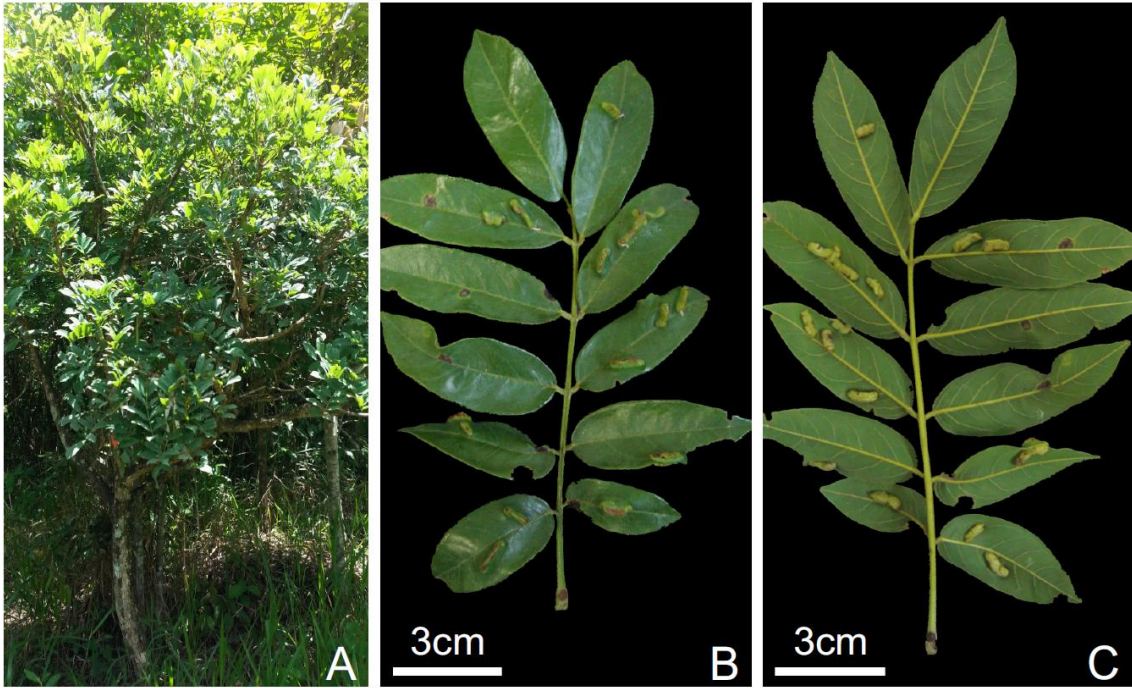
- Defense: Biological Control, pp. 273-290.
- Isaias, R.M.S., Carneiro, R.G.S., Oliveira, D.C., Santos, J.C. 2013. Illustrated and annotated checklist of Brazilian gall morphotypes. *Neotrop. Entomol.* **42**: 230-239.
- Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S., Kraus, J.E. 2014. Developmental anatomy of galls in the neotropics: arthropods stimuli versus host plant constraints. *In* Neotropical Insect Galls. *Edited by* G.W. Fernandes and, J.C Santos. Springer. pp. 15-34.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**: 137-138.
- Kraus, J.E., Sugiura, H.C., Cutrupi, S. 1996. Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *Tuberculata* (Meliaceae). *Fitopatol. Brasil.* **21**(3): 349-356.
- Kraus, J. E., Arduin, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Kraus, J.E. 1997. Respostas morfogênicas de plantas a indutores galhadores. *In* Interações ecológicas e biodiversidade. *Edited by* M.C.P, Araújo, G.C Coelho & I. Medeiros Unijui. Ijuí. pp. 59-76.
- Kraus, J.E., Isaias, R.M.S., Vecchi, C., Fernandes, G.W. 2003. Structure of insect galls on two sympatric subspecies of *Chrysothamnus nauseosus* (Pall. ex Pursh) Britton (Asteraceae). *Bol. Bot. Univ. São Paulo.* **21**(2): 251-263.
- Lee, B.R., Kim, K.Y., Jung, W.J., Avicé, J.C., Ourry, A., Kim, T.H. 2007. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* **58**(6): 1271-1279.
- Lev-Yadun, S. 2003. Stem cells in plants are differentiated too. *Curr. Top. Plant Biol.* **4**:93-100.
- Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 404-414.
- Maia, V.C., Fernandes, G.W. 2004. Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil). *Bras. J. Biol.* **64**: 423-445.
- Maia, V.C., Magenta, M.A.G., Martins, S.E. 2008. Ocorrência e caracterização de galhas de insetos em áreas de restinga de Bertioga (São Paulo, Brasil) *Biota Neotrop.* **8**(1): 167-197.
- Mani, M. S. 1964. Ecology of plant galls. Dr. W Junk Publishers, The Hague.



- Mendonça, M.S.J. 2007. Plant diversity and galling arthropod diversity searching for taxonomic patterns in an animal-plant interaction in the Neotropics. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **42**(3-4): 347-357.
- Meyer, J., Maresquelle, H.J. 1983. Anatomie des galles. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- Meyer, J. 1987. Plant galls and gall inducers. Berlin, Gebrüder Borntraeger.
- Miles, P.W. 1968. Insect secretions in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **6**(1): 137-164.
- Moura, M.Z.D., Soares, G. L. G., Isaias, R.M.S. 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Aust. J. Bot.* **56**(2): 153-160.
- Moura, M.Z.D., Soares, G.L.G., Isaias, R.M.S. 2009a. Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina: Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Rev. Bras. Bot.* **32**(2):271-282.
- Moura, M.Z.D., Soares, G.L.G., Alves, T.M.A., Isaias, R.M.S. 2009b. Intra-specific phenotypic variations in *Lantana camara* leaves affect host selection by the gall maker *Aceria lantanae*. *Biochem. Systematic. Ecol.* **37**(5):541-548.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma.* **59**: 368-373. doi:10.1007/ BF01248568.
- O'Brien, T.P., McCully, M.E. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi Pty. Melbourne.
- Oliveira, D.C., Christiano, J.C.S., Soares, G.L.G., Isaias, R.M.S. 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev. Bras. Bot.* **29**(4): 657-667.
- Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S. 2009. Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Rev. Biol. Tropic.* **57**: 293-302.
- Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S. 2010a. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *S. Afr. J. Bot.* **76**: 236-248.
- Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S. 2010b. Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Sci.* **178**: 350-358.
- Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Carneiro, R.G.S., Alvim, M.N., Isaias, R.M.S. 2010. Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma.* **242**: 81-93.

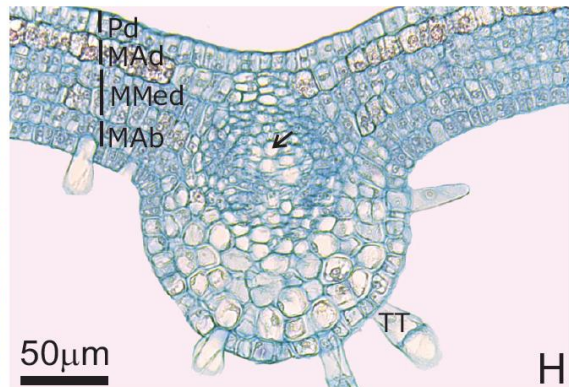
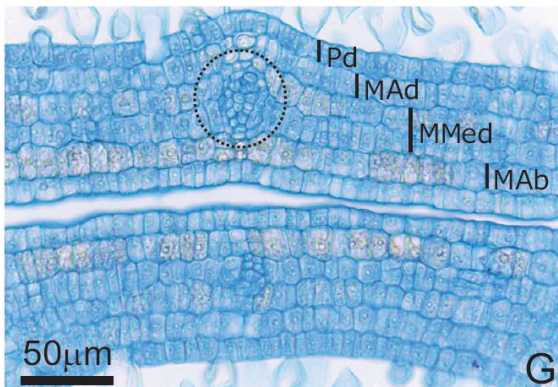
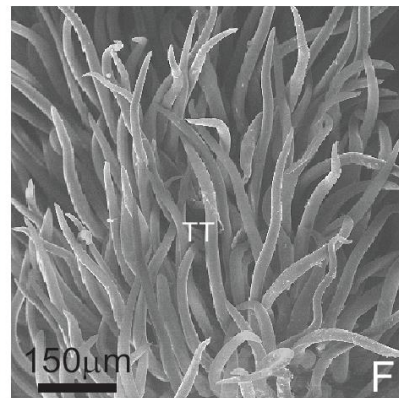
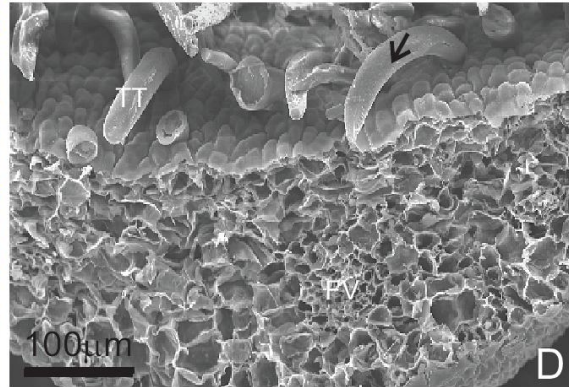
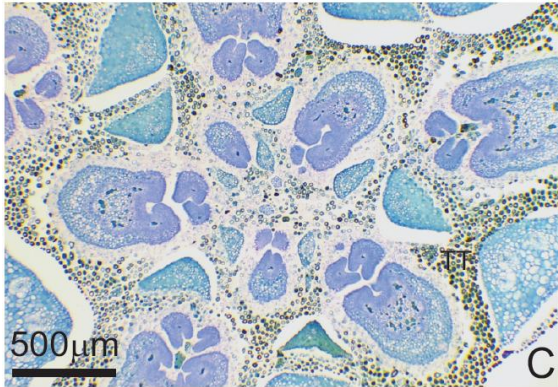
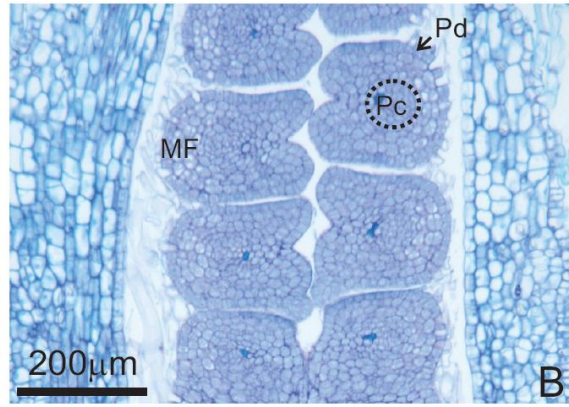
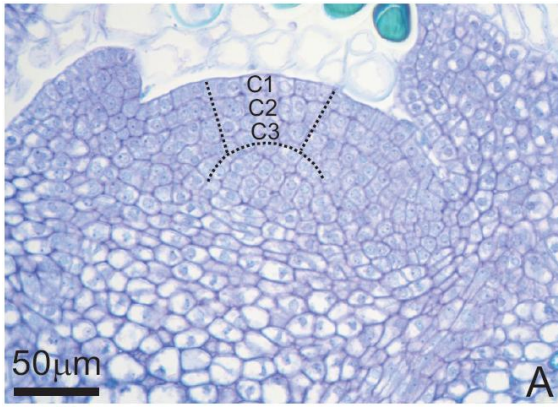
- Oliveira, D.C., Moreira, A.S.F.P., Isaias, R.M.S. 2014. In Functional gradients in insect gall tissues: studies on neotropical host plants. Edited by G.W.Fernandes., J.C. Santos. Neotropical Insect Galls. Springer. pp. 35-49.
- Paiva, J.G.A., Frank-de-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P., & Graciano-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral incolor 500<sup>®</sup>: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. Acta Bot. Bras. **20**(2): 257-264. doi:10.1590/S0102-33062006000200002.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. **63**(7): 1035-1042.
- Pires, A.M.L., Silveira, E.R., Pessoa, O.D.L. 2011. Flavonoids from *Lonchocarpus campestris* (Leguminosae). Quim. Nova. **34**(2): 268-271.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. Trends Plant Sci. **12**(1): 29-36. doi: 10.1016/j.tplants.2006.11.006.
- Price, P.W., Fernandes, G.W., Waring, G.L. 1987. Adaptive nature of insect galls. Environ. Entomol. **16**: 15-24.
- Raman, A., Gopinathan, K. 1987. On the structure and morphogenesis of the leaf galls of *Ficus religiosa* Linn. (Moraceae) induced by *Pipaldiplosis pipaldiplosis* (Cecidomyiidae: Diptera). Beitr. Biol. Pfl. **62**: 69-77.
- Raman, A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. Curr. Sci. **92**: 748-757.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol. **17**: 208-212.
- Rohfritsch, O. 1992. Patterns in gall development. In Biology of insect-induced galls. Edited by J.D. Shorthouse & O. Rohfritsch. Oxford University Press, Oxford. pp. 60-86.
- Sass, J.E. 1951. Botanical Microtechnique. Ames, Iowa State College Press.
- Schönrogge, K., Harper, L.J., Lichtenstein, C.P. 2000. The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): similarities between cynipid galls and seeds. Plant Cell Environ. **23**(2): 215-222. doi:10.1046/j.1365-3040.2000.00543.x.
- Soares, G.L.G., Isaias, R.M.S., Gonçalves, S.J.M.R., Christiano, J.C.S. 2000. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). Rev. Bras. Zootecnia. **2**: 103-116.
- 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). Acta bot. bras. **14**: 57-69.
- Souza, A., de Moraes, M.G., Ribeiro, R.D.C.L.F. 2005. Gramíneas do cerrado: carboidratos não estruturais e aspectos ecofisiológicos. Acta bot. bras. **19**(1): 81-90.
- Stone, G.N., Schönrogge, K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. Trends Ecol. Evol. **18**: 512-522.
- Suzuki, A.Y.M., Bedetti, C.S., Isaias, R.M.S. 2015. The role of cell growth regulators and of the cellulose microfibrils in the development of galls on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). Botany. In press.
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M. 1984. Plant drug analysis. Berlin: Springer-Verlag.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., & Ikehara, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plant Physiol. **115**(4): 1405-1412.



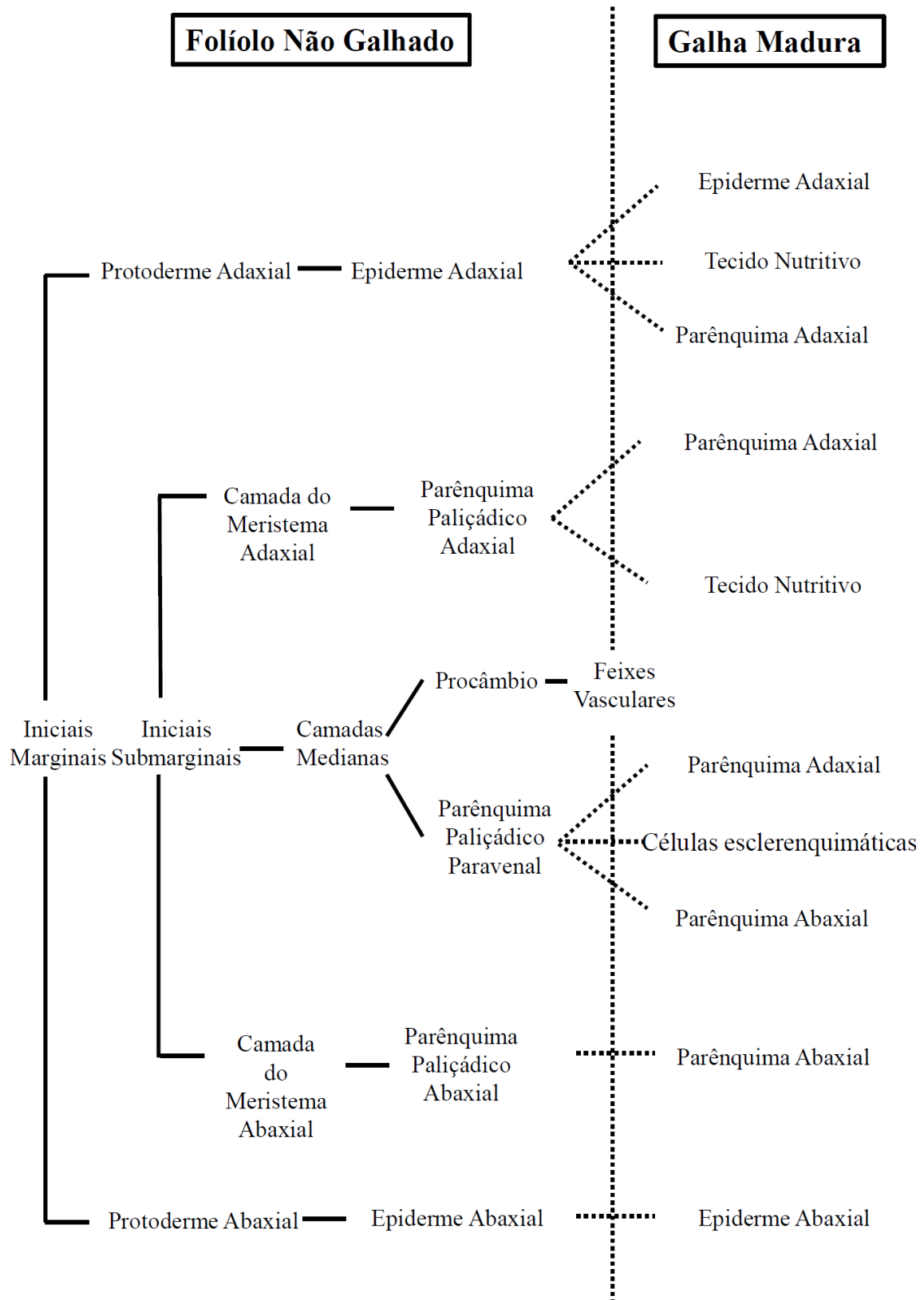
**Fig. 1. Aspectos gerais da folha e da galha em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).**  
**A.** Indivíduo marcado em campo. **B.** Face adaxial da folha galhada. **C.** Face abaxial da folha galhada. **D.** Câmara larval com larva do indutor Diptera: Cecidomyiidae. **E.** detalhe do indutor. **F.** Folíolo com galhas em estágio de indução (círculo pontilhado), galha jovem (seta) e galha madura. **G.** Secção transversal da galha madura. **H.** Visão geral da galha senescente. **I.** Exúvia do indutor. **J.** Indutor adulto.





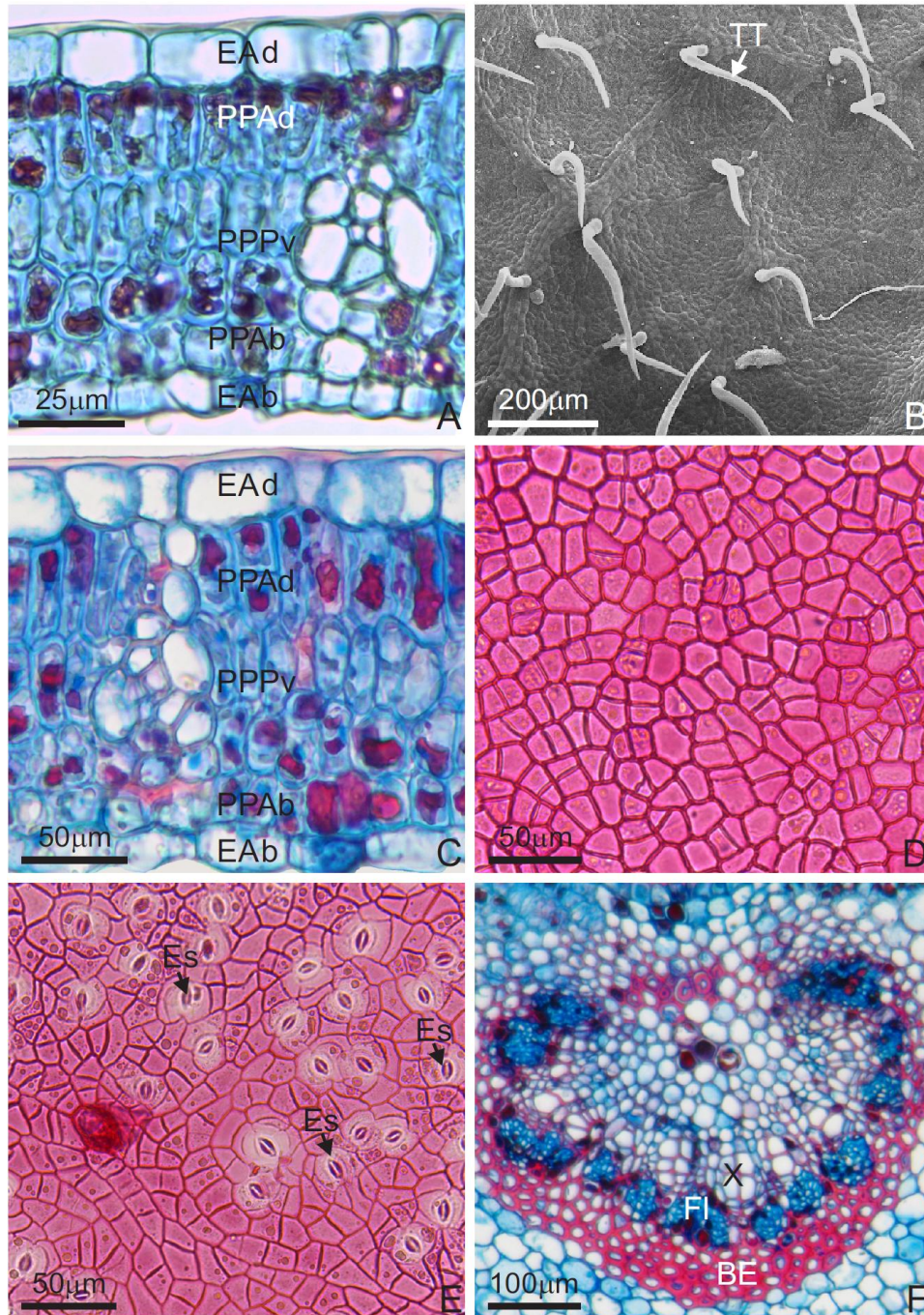
**Fig. 2. Ontogênese do folíolo não galhado em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).**

**A.** Secção longitudinal do meristema apical evidenciando camadas da túnica (C1, C2, C3) e zona periférica (ZP), central (ZC) e de nervura (ZN). **B.** Secção longitudinal do meristema apical evidenciando primórdios foliolares. **C.** Secção transversal do meristema apical evidenciando primórdios foliares opostos, presença de estípulas e tricomas. **D.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando tricomas tectores (seta) presentes no meristema apical revestindo a estípula. **E.** Folíolo jovem no primeiro nó. **F.** Tricomas revestindo o folíolo no primeiro nó (MEV). **G.** Formação de feixes de menor calibre no segundo nó (pontilhado) e meristema fundamental composto por quatro camadas celulares. **H.** Folíolo no terceiro nó com tricomas tectores multicelulares. **FV**= Feixe Vascular. Camadas celulares: **MAd**= Meristema Adaxial. **MMed**= Meristema Mediano. **MAb**= Meristema Abaxial. **MF**= Meristema Fundamental. **Pc**= Procâmbio. **Pd**= Protoderme. **TT**= Tricoma Tector.



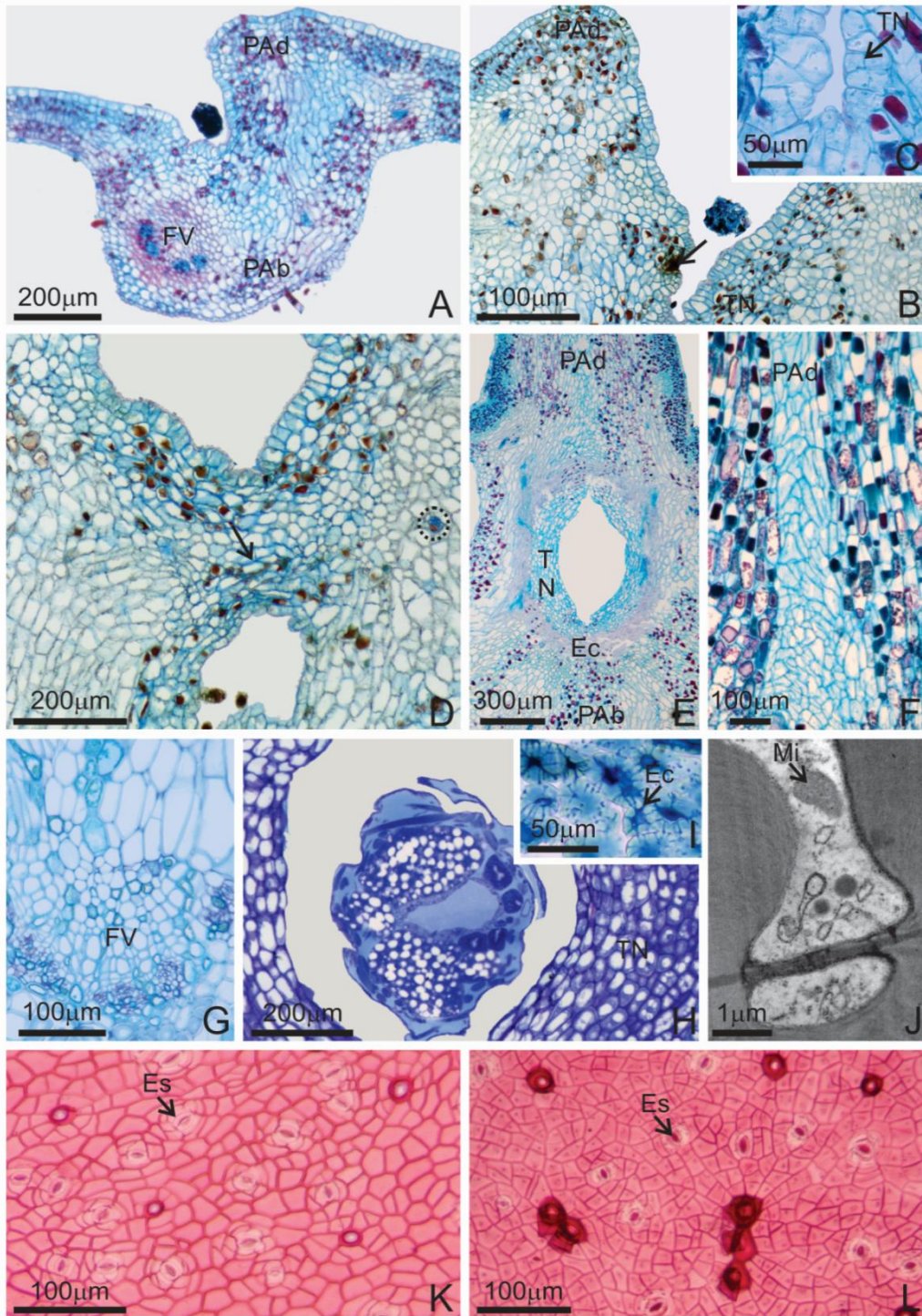
**Fig.3. Desenvolvimento do folículo não galhado (seta contínua) e da galha madura (seta pontilhada) em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).**





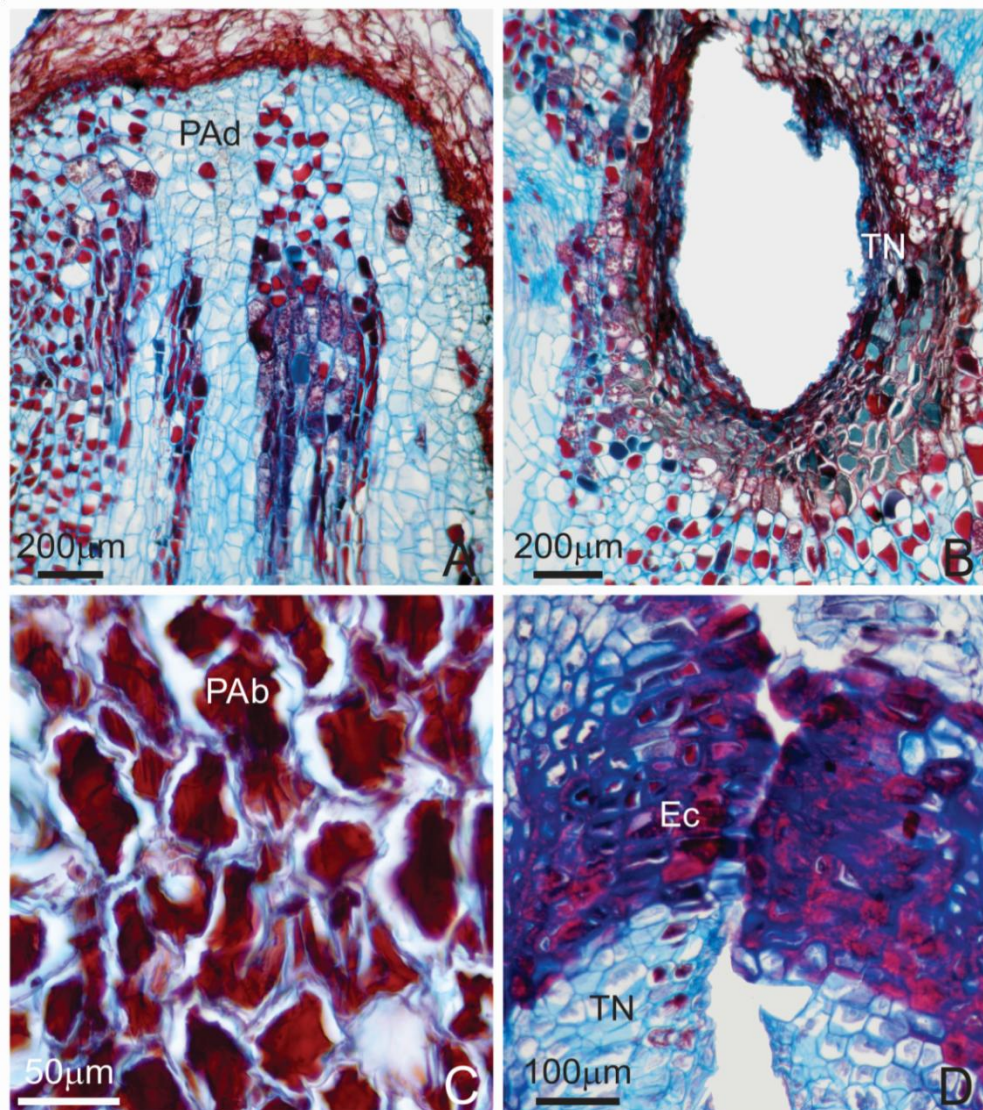
**Fig. 4. Folíolo jovem e maduro em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).** A-B. Folíolo jovem (FJ). C-F. Folíolo maduro (FM) A. Mesofilo do FJ. B. Tricomas tectores observados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). C. Epiderme unisseriada e mesofilo do FM. D. Vista frontal da epiderme adaxial evidenciando células com paredes anticlinais retilíneas. E. Vista frontal da epiderme abaxial evidenciando estômatos. F. Feixe colateral. BE= Bainha Esclerenquimática. EAb= Epiderme Abaxial. EAd= Epiderme Adaxial. Es= Estômato. FI= Floema. PPAAb= Parênquima Paliçádico Abaxial. PPAAd= Parênquima Paliçádico Adaxial. PPPv= Parênquima Paliçádico Paravenal. TT= Tricoma Tector. X= Xilema.



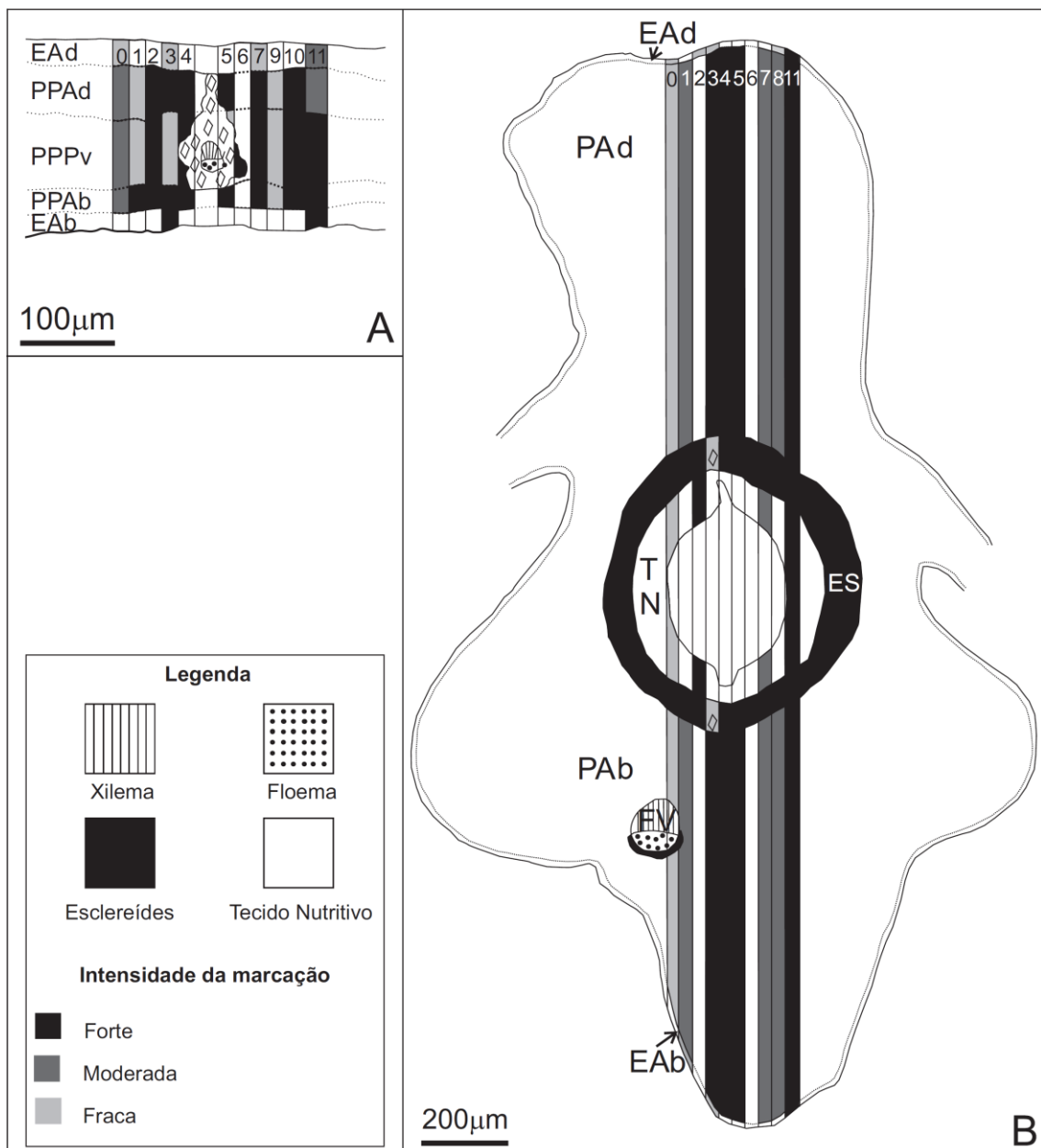


**Fig. 5. Estágio de indução e galhas jovens e maduras em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). A. Indução. B-D. Galha Jovem (GJ). E-L. Galha Madura (GM). A.** Estágio de indução com formação de uma ligeira protuberância. **B.** Necrose ocasionada pela atividade alimentar do indutor (pontilhado). **C.** Divisões periclinais das células do tecido nutritivo (seta). **D.** Junção das células para formação da câmara larval (seta) e feixe neoformado (círculo e detalhe). **E.** Visão geral da GM. **F.** Detecção menos frequente de (poli)fenóis nas células parenquimáticas centrais do córtex externo adaxial. **G.** Feixe vascular. **H.** Tecido nutritivo com núcleo evidente. **I.** Esclereides com pontoações e acúmulo de compostos fenólicos. **J.** Microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciando esclereide viva com pontoação. **K.** Epiderme adaxial da GM. **L.** Epiderme abaxial da GM. **Ec=** Esclereídes. **Es=** Estômato. **FV=** Feixe Vascular. **Mi=** Mitocôndria. **PAb=** Parênquima Abaxial. **PAd=** Parênquima Adaxial. **TN=** Tecido Nutritivo.



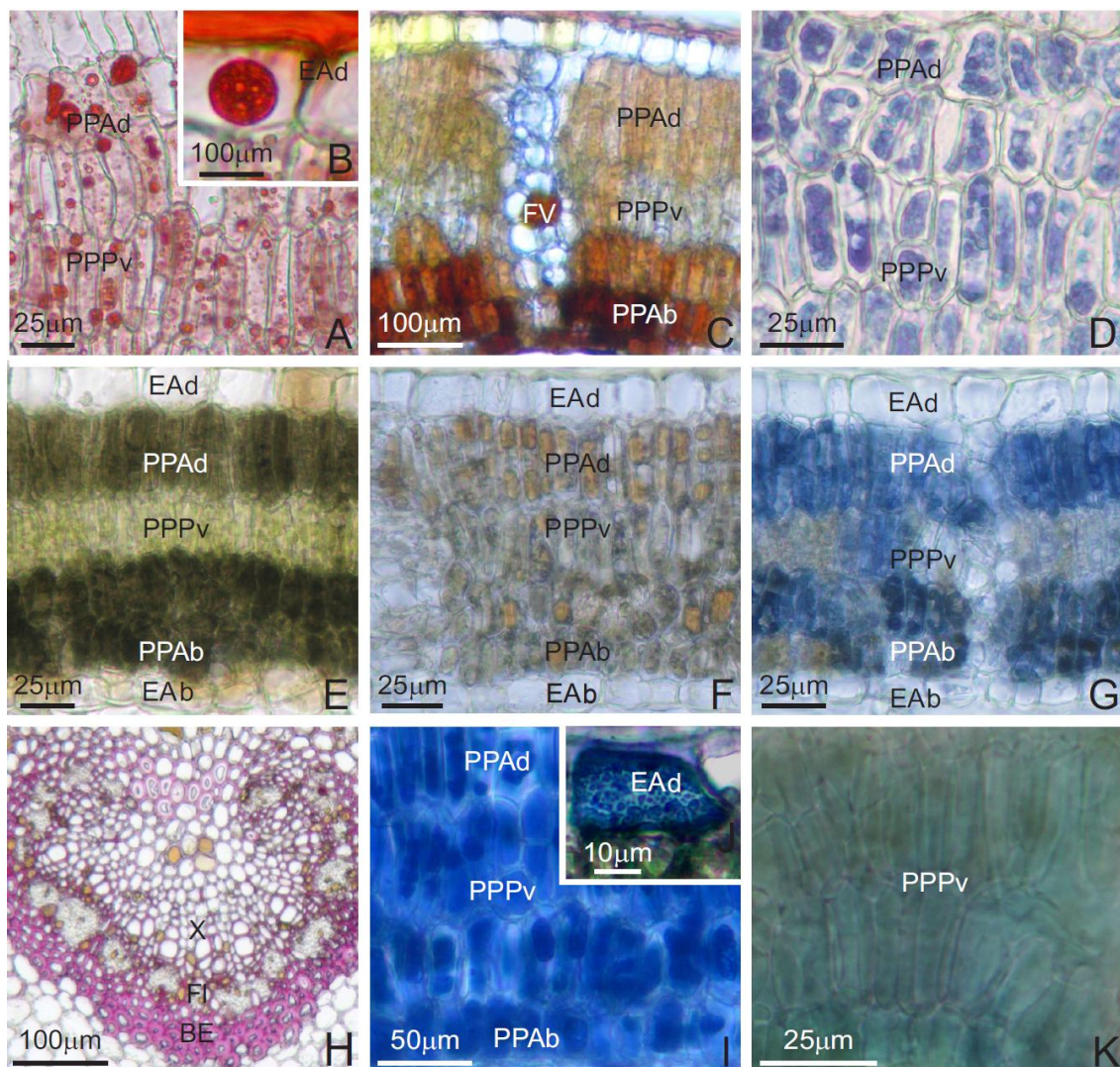


**Fig. 6. Ontogênese da galha senescente (GS) em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).** **A.** Face adaxial da galha com células suberizadas. **B.** Tecido nutritivo com acúmulo de suberina. **C.** Células colabadas no córtex externo abaxial. **D.** Rompimento celular para formação do canal de saída do indutor. **Ec=** Esclereídes. **PAb=** Parênquima Abaxial. **PAd=** Parênquima Adaxial. **TN=** Tecido Nutritivo.



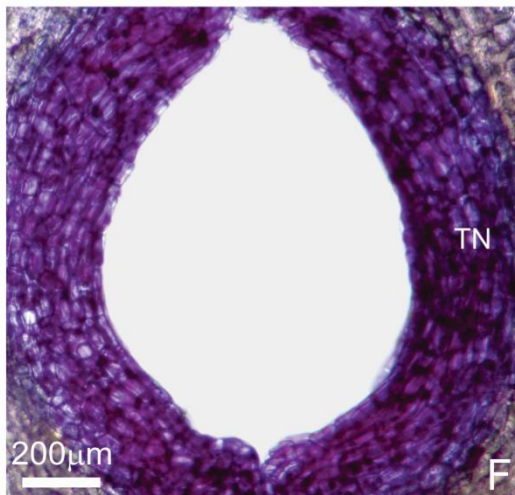
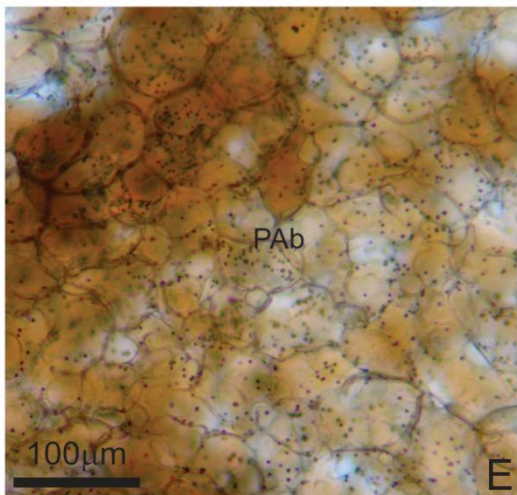
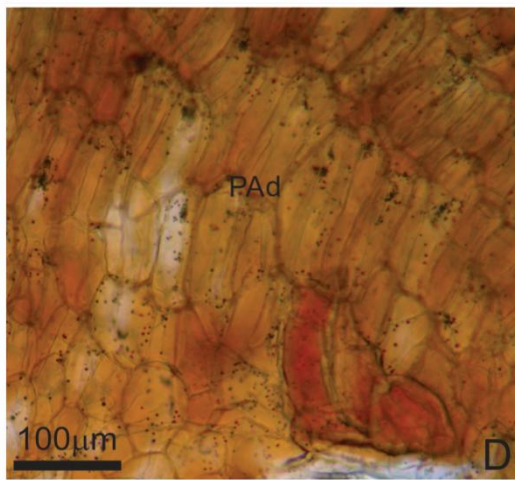
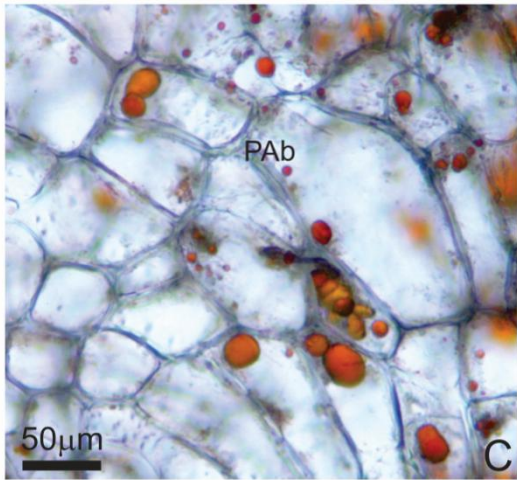
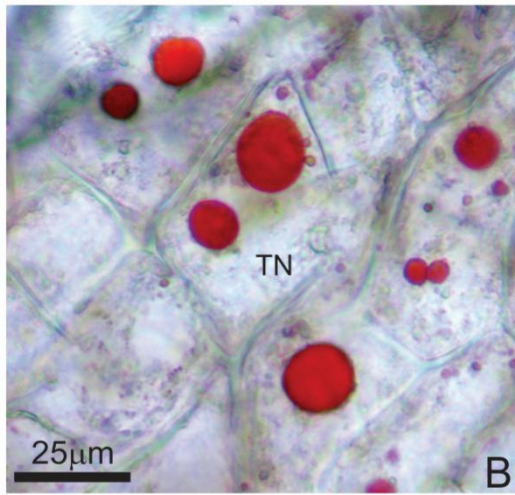
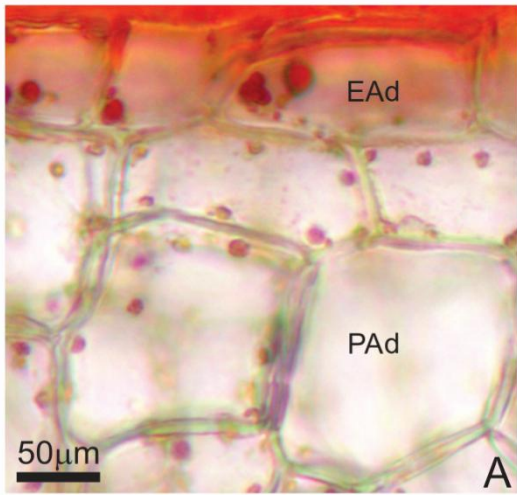
**Fig. 7. Diagrama de testes histoquímicos no folíolo não galhado e galha madura em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). A. Folíolo não galhado (FNG). B. Galha madura (GM). EAb= Epiderme Abaxial. EAd= Epiderme Adaxial. Es= Esclereídes. PAb= Parênquima Abaxial. PAd= Parênquima Adaxial. PPAAb= Parênquima Paliçádico Abaxial. PPAAd= Parênquima Paliçádico Adaxial. PPPv= Parênquima Paliçádico Paravenal. TN= Tecido Nutritivo. FV= Feixe Vascular. 0= Lipídios. 1= Açúcares redutores. 2= Proteínas. 3= (Poli)fenóis. 4= Alcaloides. 5= Flavonoides. 6= Ligninas. 7= Terpenoides. 8= Triterpenos. 9= Amido. 10= Esteroides livres. 11= Espécies Reativas de Oxigênio.**





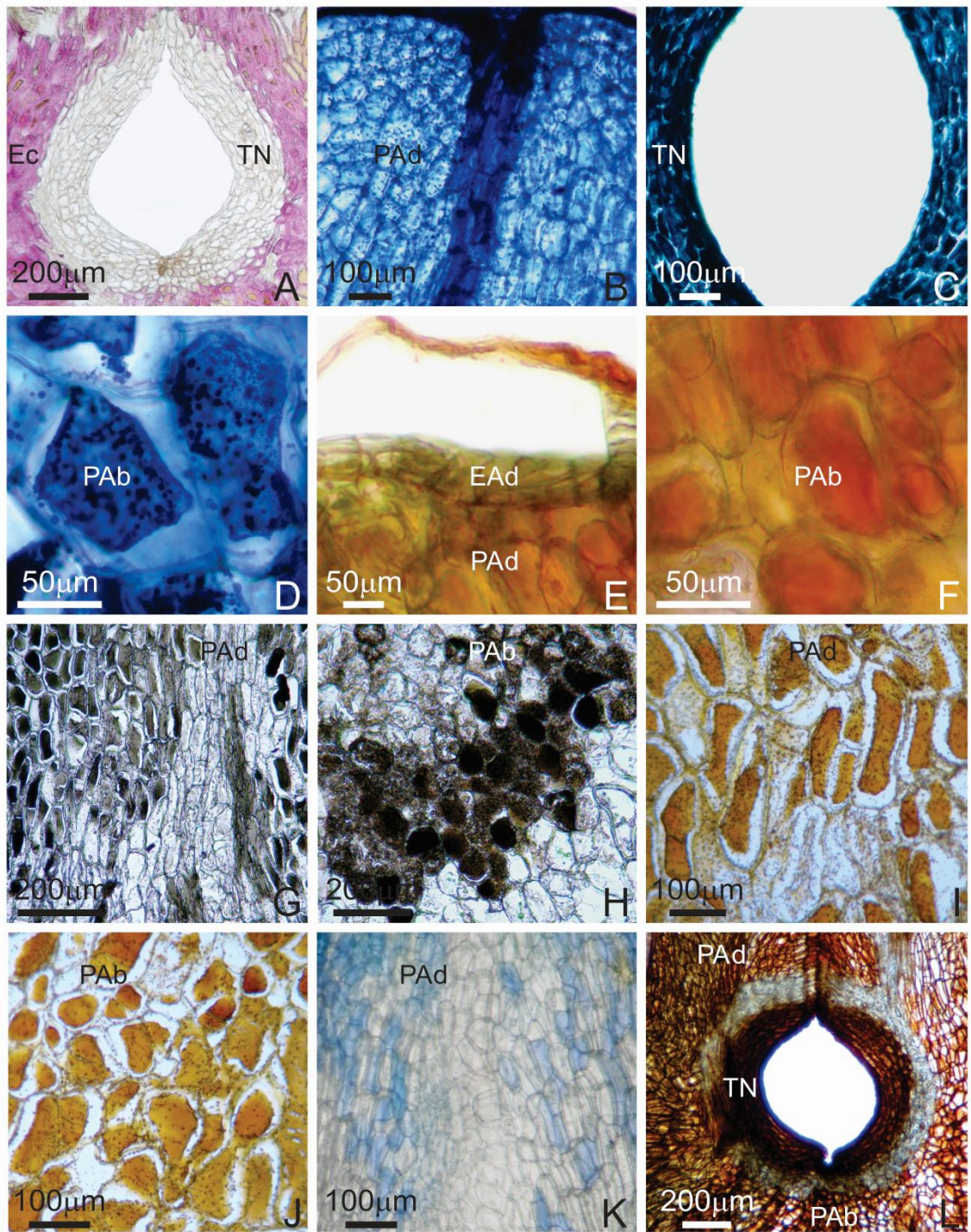
**Fig. 8. Testes histoquímicos para metabólitos primários e secundários em folíolos não galhados (FNG) em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).** **A.** Reação de Sudan Red evidenciando lipídio no mesofilo. **B.** Natureza lipídica da cutícula e gotícula lipídica na epiderme adaxial. **C.** Reação de Fehling evidenciando açúcares redutores no parênquima paravenal, abaxial, adaxial, epiderme abaxial e floema. **D.** Proteínas presentes em todo mesofilo. **E.** Cloreto férrico evidenciando (poli)fenóis no mesofilo. **F.** Reação de Dittmar mostrando alcaloides no mesofilo. **G.** Flavonoides presentes mais intensamente no parênquima adaxial e abaxial. **H.** Ligninas nas paredes celulares da bainha esclerenquimática e xilema da nervura central. **I.** Terpenoides evidenciados no mesofilo. **J.** Terpenoides na célula epidérmica adaxial. **K.** Reação de Liebermann-Buchard evidenciando esteroides livres no mesofilo. **BE=** Bainha Esclerenquimática. **EAb=** Epiderme Abaxial. **EAd=** Epiderme Adaxial. **Fl=** Floema. **PPPAb=** Parênquima Paliçádico Abaxial. **PPPAAd=** Parênquima Paliçádico Adaxial. **PPPv=** Parênquima Paliçádico Paravenal. **X=** Xilema.



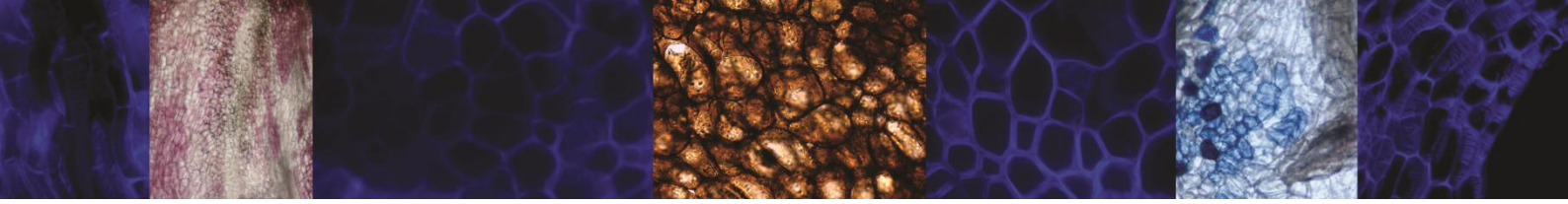


**Fig. 9. Testes histoquímicos na galha madura (GM) em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).** **A.** Lipídios presente na cutícula e como gotículas na epiderme adaxial e células do córtex externo adaxial. **B.** Gotículas lipídicas nas células nutritivas. **C.** Gotículas lipídicas nas células parenquimáticas do córtex externo abaxial. **D.** Açúcares redutores nas células do córtex externo adaxial. **E.** Açúcares redutores nas células parenquimáticas do córtex externo abaxial. **F.** Proteínas detectadas nas células nutritivas. **EAd**= Epiderme Adaxial. **PAb**= Parênquima Abaxial. **PAd**= Parênquima Adaxial. **TN**= Tecido Nutritivo.



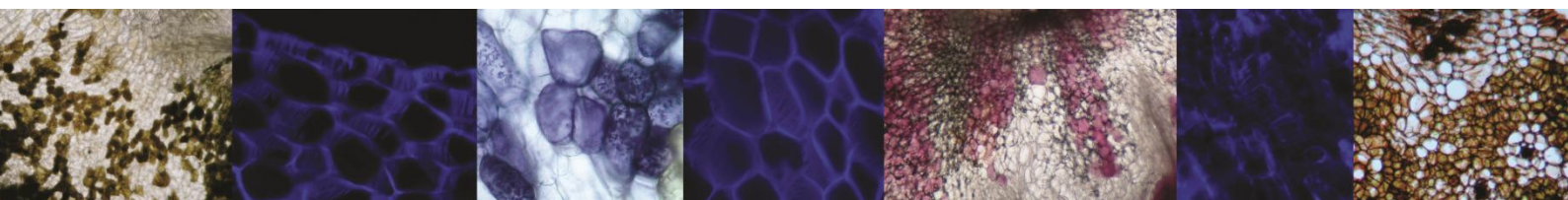


**Fig. 10. Testes histoquímicos na galha madura (GM) em *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).** **A.** Ligninas presentes nas paredes celulares das células esclerenquimáticas. **B.** Reagente NADI evidenciando terpenoides nas células parenquimáticas do córtex externo adaxial. **C.** Terpenoides nas células nutritivas. **D.** Terpenoides nas células parenquimáticas do córtex externo abaxial. **E.** Triterpenos presentes na epiderme e células parenquimáticas do córtex externo adaxial. **F.** Triterpenos no córtex parenquimático abaxial. **G.** (Poli)fenóis evidenciados nas células do córtex externo adaxial. **H.** (Poli)fenóis presentes nas células parenquimáticas do córtex externo abaxial. **I.** Reagente de Dittmar evidenciando alcaloides na face adaxial. **J.** Alcaloides presentes na face abaxial. **K.** DMACA evidenciando flavonoides nas células parenquimáticas do córtex externo adaxial. **L.** Espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células do córtex externo adaxial, abaxial e tecido nutritivo. **EAd**= Epiderme Adaxial. **Ec**= Esclereídes. **PAb**= Parênquima Abaxial. **PAd**= Parênquima Adaxial. **TN**= Tecido Nutritivo.



**Detection and distribution of cell growth regulators  
and of cellulose microfibrils during the development  
of *Lopesia* sp. galls on *Lonchocarpus cultratus*  
(Fabaceae)**

Manuscrito submetido (Suzuki *et al.* 2015)-Botany



1 **Detection and distribution of cell growth regulators and of cellulose microfibrils**  
2 **during the development of *Lopesia* sp. galls on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae)**

3

4 Aline Yasko Marinho Suzuki<sup>1</sup>, Cibele Souza Bedetti<sup>1</sup>, Rosy Mary dos Santos Isaias<sup>1\*</sup>

5

6 <sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento  
7 de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal. Avenida Antônio Carlos, 6627,  
8 Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 31270-901. Caixa postal  
9 486.31270-901. Phone: +55(31)34092687. Fax: +55(31)34092671.

10 [aline\\_suzuki@yahoo.com.br](mailto:aline_suzuki@yahoo.com.br), [bedetti@ufmg.br](mailto:bedetti@ufmg.br).

11 \*Corresponding author: [rosy@icb.ufmg.br](mailto:rosy@icb.ufmg.br)

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22



1 **Abstract**

2 Gall-inducing insects cause their plant hosts' cells to redifferentiate, divide and  
3 elongate, which are processes mediated by cell growth regulators. Herein, the  
4 histochemical detection of these regulators, and of cellulose microfibrils are performed  
5 in a gall induced by *Lopesia* sp. (Cecidomyiidae) on *Lonchocarpus cultratus*. The co-  
6 occurrence of reactive oxygen species, (poly)phenols, flavonoids, and indole-3-acetic  
7 acid are age-independent, and are detected at the sites of cell hypertrophy. Nevertheless,  
8 the intensity of the reactions may vary from young to mature galls. First, changes in the  
9 axis of cell elongation are observed from the non-galled leaflets to the young galls, in  
10 the cortical parenchyma, and in the nutritive tissue. During maturation, the elongation  
11 axis of the nutritive cells changes again. In young galls, sites of hyperplasia and  
12 hypertrophy co-occur, and in mature galls, the orientation of cellulose microfibrils  
13 determines the predominant anisotropic pattern of cell expansion. The detection of  
14 (poly)phenols and indole-3-acetic acid, reactive oxygen species, and flavonoids  
15 coincide with the sites of cell elongation and division. These results denote a chemical  
16 balance between the regulation of growth and the avoidance of cell death at gall sites.  
17 The rearrangement of cellulose microfibrils coordinates the anisotropic expansion,  
18 which determines the development of the tissue projections both to adaxial and abaxial  
19 leaflet lamina, and typical to this gall morphotype.

20

21 *Key words:* cell hypertrophy, hyperplasia, indole-3-acetic acid, leaflet galls,  
22 (poly)phenols, reactive oxygen species.

23

24

25

## 1 **Introduction**

2 Gall-inducing insects alter the normal development of plant tissues (Mani 1964;  
3 Meyer and Maresquelle 1983; Rohfritsch 1992; Oliveira and Isaias 2010) resulting in  
4 the formation of symmetric structures, known as galls (Raman 2007; Castro et al. 2012).  
5 Cell responses to the gall inducers lead to the formation of specific morphotypes (Isaias  
6 et al. 2013, Isaias et al. 2014), with variations in shape, size, color and anatomical  
7 structure (Rohfritsch 1992). During the development of galls, cell redifferentiation  
8 (Lev-Yadun 2003), division, and elongation are constantly observed (Moura et al. 2008;  
9 Oliveira and Isaias 2010; Isaias and Oliveira 2012; Ferreira and Isaias 2013). However,  
10 the steps of these processes are rarely discussed. The group of galling insects capable of  
11 inducing the strongest redifferentiation of plant cells and rearrangement of plant tissues  
12 is the Diptera: Cecidomyiidae (Oliveira and Isaias 2010; Formiga et al. 2011). Besides  
13 the structural changes, these gall-inducing insects may induce changes in the production  
14 and accumulation of primary and secondary metabolites (Formiga et al. 2009; Detoni et  
15 al. 2011). The (poly)phenols, for instance, may influence the successful establishment  
16 and development of the gall-inducers (Hartley 1999; Soares et al. 2000) either by  
17 protecting them against natural enemies (Hartley 1998) or by modulating plant growth,  
18 while interacting with stimulatory growth regulators, such as indole-3-acetic acid (IAA)  
19 (Hori 1992; Bedetti et al. 2014). The (poly)phenols are usually detected during the early  
20 stages of gall development (Isaias and Oliveira 2012), and may inhibit the IAA-  
21 oxidases, thus increasing the levels of auxins involved in the process of cell expansion  
22 (Hori 1992; Bedetti et al. 2014), via acidification of the cell wall (Rayle and Cleland  
23 1992).

24 The reactive oxygen species (ROS) are produced during photosynthesis and cell  
25 respiration (Del Río and Pupo 2009; Heldt and Piechulla 2011), and may control the

1 extensibility of the cell walls (Del Río and Pupo 2009). Alternatively, the ROS can take  
2 part in a cascade of events that culminate in programmed cell death (PCD) (Bolwell  
3 1999; Del Río and Pupo 2009). To counterbalance the positive and negative effects of  
4 the ROS, and guarantee the maintenance of plant tissues, the accumulation of  
5 antioxidants, such as flavonoids, is essential (Bors et al. 1990; Yamasaki et al. 1997;  
6 Pourcel et al. 2007). Consequently, their presence is expected for the development of  
7 the new structural and functional design of the gall. The histochemical detection of  
8 ROS, (poly)phenols, flavonoids, and IAA in specific cells of the pinnula lenticular galls  
9 and rachis fusiform galls on *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae) has  
10 recently been performed, and the dynamics of this co-occurrence has been discussed  
11 (Bedetti et al. 2014).

12 Variations in the structure of the cell walls determine the final shape of the cell.  
13 The structure of these cell walls is influenced by the patterns of cellulose microfibrils  
14 deposition (Isaias and Oliveira 2012), which was elegantly demonstrated in the kidney-  
15 shaped gall on *Baccharis dracunculifolia* (Magalhães et al. 2014). According to Baskin  
16 (2005), the isotropic cell expansion results from equal pressure all over the cell wall,  
17 while the anisotropic cell expansion results from differential pressure either in the  
18 anticlinal or periclinal direction. Another factor that determines the cell's new size and  
19 shape is the distribution of pectins, which influence cell expansion by controlling the  
20 flexibility and rigidity of the cell wall (Cassab 1998; Carneiro et al. 2014). The  
21 functionalities conferred by the distribution of pectins in the cell walls of different gall  
22 morphotypes were recently evaluated (Formiga et al. 2013; Carneiro et al. 2014; and  
23 Oliveira et al. 2014).

24 This study examines hypotheses concerning relationship between sites of  
25 accumulation of ROS, phenolic derivatives, and IAA to the patterns of deposition of

1 cellulose microfibrils. The first hypothesis proposes that the sites of hyperplasia are  
2 related to reduced cell areas, and isotropic cell expansion, which implies low  
3 accumulations of phenolics and indole-3-acetic acid (IAA). The second hypothesis  
4 suggests that the sites of cell hypertrophy involves the accumulation of ROS, phenolic  
5 derivatives, and IAA, which are related to the reorientation of cellulose microfibrils,  
6 associated with changes in cell shape.

7       The model of study is the fusiform gall induced by *Lopesia* sp. (Diptera:  
8 Cecidomyiidae) on the leaflets of *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) Azevedo and Lima  
9 (Fabaceae). To test the hypotheses above, the following questions are addressed: (1) is  
10 there correlation among the sites of accumulation of ROS, (poly)phenols, flavonoids  
11 and IAA with those of intense cell division and elongation? (2) How do the patterns of  
12 cell elongation and of deposition of cellulose microfibrils influence the development of  
13 the tissue projections for both gall surfaces? And (3) how do cell growth regulators  
14 influence the patterns of deposition of cellulose microfibrils?

## 15 **Materials and methods**

### 16 *Sampling and collection*

17       Samples of non-galled leaflets (NGL) ( $n \geq 13$ ) and galls at three stages of  
18 development - young (YG), mature (MG) and senescent (SG) ( $n \geq 13$ , per stage) - were  
19 collected at the Estação Ecológica of the Universidade Federal de Minas Gerais  
20 (EEUFMG), *campus* Pampulha (19°53'02.4"S, 43°58'09.8"W), and at the Parque  
21 Estadual Serra Verde (PESV) (19°47'22.47"S, 43°57'32.35"W), Belo Horizonte, Minas  
22 Gerais, Brazil. The voucher specimens were deposited in the BHCB Herbarium under  
23 the registration numbers 155 758 (EEUFMG) and 169 410 (PESV).

### 24 *Anatomical analysis*

25       For anatomical observations, samples ( $n \geq 5$ ) were fixed in 4.5% formaldehyde



1 and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PBS), pH 7.2 (Karnovsky 1965,  
2 modified), for 48 hours at room temperature. The histological sections were dehydrated  
3 in *n*-butyl series, and embedded in Paraplast<sup>®</sup> (Kraus and Arduin 1997). Sections (12-14  
4  $\mu$ m) were produced using a rotary microtome (Leica<sup>®</sup> Jung BIOCUT 2035). The  
5 sections were deparafinized, and stained with astra blue and safranin 9:1 (v/v)  
6 (Bukatsch 1972, modified to 0.5%). The slides were mounted in clear varnish Acrilex<sup>®</sup>  
7 (Paiva et al. 2006). Samples ( $n \geq 5$ ) were dehydrated in an ethanol series, embedded in  
8 Historesin (Leica<sup>®</sup> Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), and sectioned using a  
9 rotary microtome (5-7 $\mu$ m) (Zeiss<sup>®</sup> Hyrax M40). Subsequently, the slides were stained  
10 with 0.05% toluidine blue in 0.1M PBS, pH 6.8 (O'Brien et al. 1964), and mounted in  
11 Entellan (Merck Millipore<sup>®</sup> International). The sections were photographed with a  
12 digital camera (Canon<sup>®</sup> Power Shot A650) coupled to an optical microscope (Zeiss  
13 Primo Star<sup>®</sup>).

#### 14 *Histolocalization of growth regulators and associated metabolites*

15 Hand-made sections of fresh samples ( $n \geq 3$ ) of NGL and YG, MG and SG were  
16 used for the detection of ROS, IAA, (poly)phenols and flavonoids. ROS were detected  
17 by immersing the sections in 0.5% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, St.  
18 Louis, MO, USA) for 30 min, in the dark (Rossetti and Bonatti 2001). The intensity of  
19 the reaction was analyzed by the color intensity; the intense brown color indicated  
20 strong reaction and the weak brownish color indicated weak reaction.

21 The accumulation of (poly)phenols was detected in samples using a 2% ferrous  
22 sulfate in 10% formalin solution (Johansen 1940). A positive reaction was confirmed  
23 by the development of a brownish or black color at the sites of accumulation.  
24 Flavonoids were detected by the development of a blue color in sections fixed in 0.5%  
25 caffeine, 0.5% sodium benzoate, and 90% butanol for 5 min, and incubated in 1% *p*-

1 dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA), hydrochloric acid, and ethanol (5: 1: 5) for  
2 2h (Feucht et al. 1986). For indole-3-acetic acid (IAA) detection, the sections were  
3 treated with Ehrlich reagent (1% *p*-dimethylaminobenzaldehyde in 1M HCl; w/v)  
4 (Leopold and Plummer 1961) for 5 min at room temperature, and positive reactions  
5 were confirmed by the pink color of tissues (Bedetti et al. 2014). The results were  
6 photographed with a digital camera (Canon<sup>®</sup> Power Shot A650) coupled to an optical  
7 microscope (Zeiss<sup>®</sup> Primo Star).

### 8 *Cytometric analysis*

9 For comparative purposes, the origin of galled tissues was determined by  
10 ontogenetic analyses and their continuity to the non-galled tissues. In the NGL, the cells  
11 of the epidermis, and of the adaxial, paravenal, and abaxial palisade parenchyma were  
12 measured (n = 40, for each layer). In the three developmental stages of the galls, cell  
13 areas (n = 40) of the epidermis, adaxial outer parenchyma and abaxial cortical  
14 parenchyma, sclerenchymatic layers, and nutritive tissue were measured. The number  
15 of cell layers in transverse sections was accounted for in the NGL tissues and in the YG,  
16 MG, and SG (n = 10, for sample). Cell areas and the longest cell axis (periclinal and  
17 anticlinal) (n=40) were measured using the software Axion Vision<sup>™</sup> 7.4<sup>®</sup> (Carl Zeiss<sup>®</sup>  
18 Microscopy GmbH, Jena, Germany). The type of cell expansion was determined using  
19 both longitudinal and transverse sections.

### 20 *Statistical analyzes*

21 Statistical analyses were made with GraphPad Prism<sup>™</sup> 5.0 software (Motulsky  
22 1992-2009) to verify differences among the patterns of elongation, cell areas, and  
23 number of cell layers. Parametric data were compared using a t-test (for two categories)  
24 or analysis of variance (ANOVA) (for three or more categories), followed by Tukey's

1 test. The non-parametric variables were transformed to logarithmic scale ( $\log_{10}$ ) to  
2 normalize the values and equalize variances. The transformed data that did not pass  
3 normality tests (Shapiro-Wilk tests) were analyzed using the Mann-Whitney test (for  
4 two categories) or the Kruskal-Wallis test (for three or more categories), followed by  
5 Dunn's test. The level of significance used in all tests was  $p \leq 0.05$ .

#### 6 *Analysis of the patterns of deposition of cellulose microfibrils*

7 Sections obtained from fresh material, and embedded in Paraplast<sup>®</sup> were treated  
8 with 50% Calcofluor White in distilled water for 30 min in the dark (Herth and Schnepf  
9 1980), for detection of the orientation of the cellulose microfibrils. The sections were  
10 washed in distilled water, mounted in 50% glycerin, analyzed, and photographed with a  
11 fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti<sup>®</sup>) using DAPI filter in the Centro de  
12 Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG).

### 13 **Results**

#### 14 *General features*

15 Leaves of *L. cultratus* are compound, alternate and imparipinnate, and  
16 approximately 10-25 cm in length (Fig. 1A). The fusiform galls occur isolated or  
17 grouped, have trichomes and are green in young and mature stages (Fig. 1B-D). The  
18 larval chamber (Fig. 1D) shelters one individual of *Lopesia* sp. The SG have brownish  
19 portions, and opens to the adaxial surface (Fig. 1E), enabling the escape of the *Lopesia*  
20 sp. (Fig. 1F).

#### 21 *Anatomical analysis*

22 The NGL of *L. cultratus* have uniseriate epidermis and are hypostomatic (Fig.  
23 2A). The mesophyll consists of 4-6 cell layers and is divided into adaxial, paravenal,

1 and abaxial palisade parenchyma (Fig. 2A). The vascular bundles are collateral and  
2 surrounded by a sclerenchymatic sheath (Fig. 2B). The YG are characterized by cell  
3 divisions and elongation, which causes the hypertrophy and arching of the leaflet lamina  
4 (Fig. 2C). In the MG, the parenchymatic outer cortex is subdivided into adaxial and  
5 abaxial portions (Fig. 2D), in relation to the position of the larval chamber. This stage is  
6 characterized by the formation of the inner cortex composed by sclerenchymatic cells  
7 and the nutritive tissue (Fig. 2D). At senescence, the nutritive tissue (Fig. 2E), the  
8 adaxial epidermis, and the adaxial parenchyma have some necrotic sites.

### 9 *Histolocalization of growth regulators and associated metabolites*

10         The detection of ROS by DAB in the NGL is more intense in the paravenal  
11 palisade parenchyma, in the abaxial palisade parenchyma, in the phloem, and in the  
12 abaxial epidermis (Fig. 3A). In the adaxial epidermal cells and in the adaxial palisade  
13 parenchyma, the detection of ROS is less intense (Fig. 3A-B). (Poly)phenols and  
14 flavonoids are distributed all over the mesophyll, mainly in the adaxial and abaxial  
15 parenchymatic cells (Fig. 3C-D). In the YG, the ROS are strongly detected in the cells  
16 of the adaxial epidermis, in the nutritive tissue undergoing redifferentiation, in the  
17 abaxial outer cortex, and in the phloem (Fig. 3E). (Poly)phenols (Fig. 3F), indole-3-  
18 acetic acid (Fig. 3G), and flavonoids (Fig. 3H) occur in a small group of cells in the  
19 abaxial outer cortex. All the compounds are detected in the adaxial (Fig.3 I-L) and  
20 abaxial outer cortices of the MG (Fig. 3M-P). Overlapping sites of occurrence of ROS,  
21 (poly)phenols, IAA, and flavonoids were observed on both surfaces of the SG (Fig. 4A-  
22 I). The presence of IAA is restricted to small groups of cells in the adaxial (Fig. 4C) and  
23 abaxial outer cortices of the SG (Fig. 4H).

24  
25

1 *Cytometry and new pattern of cell elongation*

2         The adaxial epidermis of the NGL is responsible for the formation of the gall  
3 adaxial epidermis, and part of the adaxial outer cortex, as well as of the nutritive tissue  
4 (Fig. 5). Changes in the pattern of cell elongation are observed in the redifferentiating  
5 nutritive tissue, and in the adaxial and abaxial outer cortices of the YG (Fig. 5). The  
6 adaxial outer cortex, which originates from the adaxial epidermis, and the adaxial and  
7 paravenal palisade parenchyma presents anticlinal cell elongation at all stages of gall  
8 development (Fig. 5). The abaxial outer cortex of the YG has two patterns of cell  
9 expansion. The portion originating from the paravenal parenchyma expands  
10 isodiametrically, while the cells originating from the abaxial parenchyma expand  
11 anisotropically (Fig. 5). In the MG and SG, the cells of the adaxial and abaxial outer  
12 cortices elongate anticlinally, while the nutritive cells elongate periclinally (Fig. 5).

13         The YG, MG, and SG have uniseriate epidermis with periclinally elongated cells  
14 on both surfaces. The number of cell layers of the adaxial outer cortex is higher in the  
15 MG ( $32.4b \pm 4.9$ ) when compared to the YG ( $10.8a \pm 3.6$ ), which is also true for the  
16 nutritive tissue ( $4.9a \pm 0.9$  and  $7.7b \pm 1.8$ , in YG and MG) and the abaxial outer cortex  
17 ( $13.7a \pm 3.4$  and  $25.4b \pm 7.4$ , in YG and MG). In the SG, the number of cell layers of  
18 the adaxial ( $30.0b \pm 4.2$ ), and abaxial ( $22.8b \pm 4.4$ ) outer cortices does not differ  
19 significantly, when compared to the MG. The number of cell layers of the  
20 sclerenchymatic layer from the MG ( $4.8b \pm 1.1$ ) to the SG ( $4.8b \pm 1.0$ ) does not vary. A  
21 significant decrease is observed in the number of cell layers of the nutritive tissue  
22 between the MG ( $7.7b \pm 1.8$ ) and the SG ( $3.9a \pm 1.1$ ).

23         The area of the cells of the adaxial epidermis does not vary between the NGL  
24 ( $294.4a \mu\text{m}^2 \pm 77.2$ ) and the YG ( $231.1a \mu\text{m}^2 \pm 69.4$ ). The area of the cells of the  
25 adaxial ( $877.1b \mu\text{m}^2 \pm 197.3$ ) and abaxial ( $662.3b \mu\text{m}^2 \pm 276.4$ ) outer cortices, and of

1 the nutritive tissue ( $348.3b \mu\text{m}^2 \pm 143.7$ ) of the YG are large. The differences in areas of  
2 these tissue layers are larger than those of the adaxial epidermis ( $294.4a \mu\text{m}^2 \pm 77.2$ ),  
3 adaxial palisade parenchyma ( $219.9a \mu\text{m}^2 \pm 67.6$ ), paravenal palisade parenchyma  
4 ( $141.9a \mu\text{m}^2 \pm 37.9$ ), and abaxial palisade parenchyma ( $144.3a \mu\text{m}^2 \pm 37.1$ ) of the NGL.  
5 In the MG, the area of the cells of the adaxial epidermis ( $447.4c \mu\text{m}^2 \pm 202.1$ ), of the  
6 adaxial ( $2936.8c \mu\text{m}^2 \pm 1139.7$ ) and abaxial ( $2458.7c \mu\text{m}^2 \pm 711.2$ ) outer cortices, of the  
7 nutritive tissue ( $1113.9c \mu\text{m}^2 \pm 303.4$ ), and of the abaxial epidermis ( $298.7c \mu\text{m}^2 \pm$   
8  $100.9$ ) are significantly larger than those of the YG. In the SG, the area of the adaxial  
9 epidermal cells ( $201.8ad \mu\text{m}^2 \pm 334.6$ ), adaxial ( $1868.8d \mu\text{m}^2 \pm 294.1$ ) and abaxial  
10 ( $1483.1d \mu\text{m}^2 \pm 483.7$ ) outer cortical cells, and nutritive cells ( $680.7d \mu\text{m}^2 \pm 275.3$ ) are  
11 significantly smaller when compared to the cell areas of the MG.

#### 12 *Analysis of the patterns of cellulose microfibrils deposition*

13 The cells of the NGL (Fig. 6A) present anisotropic expansion (Fig. 6B). The  
14 cellulose microfibrils in the cell walls of the adaxial epidermis (Fig. 6C) and mesophyll  
15 (Fig. 6D-F) are oriented perpendicularly to the major axis of the elongated cells. From  
16 YG to SG, the arrangement of the cellulose microfibrils changes in the distinct cell  
17 layers (Fig. 7A-O). In the YG (Fig. 7A), the adaxial epidermal and the parenchymatic  
18 cells of the adaxial outer cortex (Fig. 7D) invaginate and divide anticlinally and  
19 periclinally to form the nutritive tissue (Fig. 7G). The abaxial outer cortex has two  
20 different types of cell expansion; isotropic next to the larval chamber, and anisotropic  
21 next to the abaxial epidermis (Fig. 7J). The cellulose microfibrils are perpendicularly  
22 oriented to the major axis of cell elongation in the anisodiametric cells of the adaxial  
23 parenchyma, randomly arranged in the isodiametric cells and perpendicularly arranged  
24 in the anisodiametric cells of the abaxial outer cortex.

1           In the MG (Fig. 7B), the cells of the adaxial outer cortex (Fig. 7E), nutritive  
2 tissue (Fig. 7H), and abaxial outer cortex (Fig. 7K) present cellulose microfibrils  
3 aligned perpendicularly to the major axis of cell elongation (Fig. 7M-O). The shape of  
4 the gall, the predominant type of anisotropic expansion, and the direction of cell  
5 elongation are similar in the MG and in the SG (Fig. 7F, 7I, 7L). In the SG (Fig. 7C),  
6 the cellulose microfibrils of the adaxial outer cortex, nutritive tissue, and abaxial outer  
7 cortex are arranged perpendicularly to the major axis of the anisodiametric cells.

## 8 **Discussion**

9 *Correlation between the accumulation of growth regulators and associated metabolites*  
10 *with the sites of hyperplasia and cell hypertrophy*

11           In the *Lonchocarpus cultratus-Lopesia* sp. system, the establishment of the gall-  
12 inducing insect completely alters the ontogenetic steps of the NGL tissues in a process  
13 called neo-ontogenesis (Carneiro et al. 2014). The first cell responses are hypertrophy  
14 and an increase in cell division resulting in tissue hyperplasia (Rohfritsch 1992; Arduin  
15 and Kraus 1995; Isaias and Oliveira 2012). Hyperplasia implies an immediate reduction  
16 in cell areas, which is a diagnostic feature of isotropic expansion (Rose 2003). In fact,  
17 the isotropic expansion of the abaxial outer cortical cells can be determined by their  
18 small cell areas, and are an exclusive feature of YG on *L. cultratus*. The second step in  
19 the development of these cells is an increase in area in relation to the NGL cells, as  
20 observed in gall cells induced on the leaves of *Rosa virginiana* by *Diplolepis rosaefolii*  
21 (Hymenoptera: Cynipidae) (LeBlanc and Lacroix 2001). The key factors that trigger cell  
22 hypertrophy and hyperplasia in galls are still poorly known, but recent studies suggest  
23 the interaction of the phenolic compounds with regulators of cell growth, mainly IAA,  
24 as documented in galls of *Piptadenia gonoacantha* (Fabaceae) (Bedetti et al. 2014). The  
25 detection of (poly)phenols, IAA, and flavonoids occurred exclusively in the abaxial

1 outer cortical cells in YG. These cells undergo anisotropic expansion, which is the  
2 predominant pattern in the YG. In the typical morphogenesis of plant organs, cell  
3 divisions and elongation are separated in time (Obroucheva 2008), while in the YG on  
4 *L. cultratus*, the cells elongate and divide concomitantly, showing that hyperplasia and  
5 cell hypertrophy are not spatially or temporarily separated, as observed for the leaves of  
6 *Populus deltoides* (Stiles and Van Volkenburgh 2002). The co-detection of hyperplasia  
7 and hypertrophy in YG was also observed in the galls induced by *Baccharopelma*  
8 *dracunculifoliae* on the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Magalhães et al. 2014).

9 Cell expansion requires the extensibility of the cell walls, which is influenced  
10 among other things by the biosynthesis of (poly)phenols. Hori (1992) proposed that the  
11 increasing biosynthesis of (poly)phenols can inhibit the activity of IAA-oxidase, and  
12 consequently increase the levels of IAA, responsible for cell hypertrophy. The  
13 interaction of these metabolites in the tissue layers of the MG in *L. cultratus* was  
14 demonstrated by their histochemical detection in the parenchymatic cells of the outer  
15 cortices, which coincides with the sites of intense cell hypertrophy.

16 The best established hypothesis by which auxins stimulate cell wall extension is  
17 known as the acid growth model (Rayle and Cleland 1992). This hypothesis postulates  
18 that auxins stimulate the rate of proton H<sup>+</sup> extrusion across the plasma membrane, and  
19 that the increased proton concentration in the wall spaces weakens the cross hydrogen  
20 bonds between cellulose and adjacent hemicelluloses (Brett and Waldron 1996;  
21 Obroucheva 2008). This linkage weakening facilitates the lateral slippage of  
22 microfibrils relative to the cell-wall matrix, thus allowing cell elongation (Obroucheva  
23 2008). Another hypothesis about the role of auxin in cell elongation suggests that auxins  
24 stimulate the production of superoxide radicals in the cell walls (Rose 2003). The  
25 superoxide radicals are converted into hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which is then



1 converted into hydroxyl radicals (OH) by wall-bound peroxidases (Rose 2003). The  
2 hydroxyl radicals break many chemical bonds, including glycosidic linkages in the  
3 backbone of wall polysaccharides, enabling cell wall extension (Cosgrove 1999; Rose  
4 2003; Cosgrove 2005). The histochemical detection of both IAA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at similar  
5 sites corroborates the occurrence of the acid growth model in the MG of *L. cultratus*,  
6 and indicates the possible role of auxin in the conversion of superoxide radicals to  
7 hydrogen peroxide, herein histochemically detected.

8 In SG, the accumulation of IAA is restricted to a small group of cells, where the  
9 histochemical reaction to the Ehrlich's reagent was weak, indicating the cessation of cell  
10 hypertrophic responses. Similar results were obtained from the rachis fusiform galls on  
11 *Piptadenia gonoacantha* (Bedetti et al. 2014).

12 *Cytometry and new pattern of cell elongation orchestrated by the reorientation of the*  
13 *cellulose microfibrils*

14 The mechanical and chemical stimuli of the gall-inducing Cecidomyiidae alter  
15 the morphogenesis of *L. cultratus* leaflets causing an increase in cell areas, and changes  
16 in the patterns of cell expansion and elongation. These cytometric alterations are  
17 orchestrated by the reorientation of the cellulose microfibrils.

18 Cellulose microfibrils in the cells of the galls on *L. cultratus* are oriented  
19 perpendicularly to the longest cell axis in elongated cells, and randomly arranged in  
20 isodiametric cells, as described by Baskin (2005) for plant organs in general. In fact,  
21 anisotropic expansion is crucial for molding plant organs (Baskin 2005), and is  
22 controlled by the peripheral microtubules in the cells that promote the arrangement of  
23 cellulose synthase for the aligned deposition of microfibrils in the cell walls (Green  
24 1980; Baskin 2001, 2005; Crowell et al. 2010). In *L. cultratus*, the pattern of deposition  
25 of cellulose microfibrils accompanied the new directions of cell elongation acquired by

1 the cells of the adaxial and abaxial outer cortices in the YG, and by the cells of the  
2 nutritive tissue of the YG and MG. These changes in the direction of cell elongation  
3 require the acidification of the cell wall, conferred by ROS and IAA (Rayle and Cleland  
4 1992; Cosgrove 1998, 1999), which facilitates the reorientation of the cellulose  
5 microfibrils (Magalhães et al. 2014). The nutritive cells in *L.cultratus* acquired a pattern  
6 of periclinal elongation in the MG and SG, generating the elliptical shape of the larval  
7 chamber triggered by the random feeding activity of the Cecidomyiidae. While the  
8 periclinal elongation is crucial for the development of the kidney-shaped galls on *B.*  
9 *dracunculifolia* (Magalhães et al. 2014), on the galls in *L. cultratus*, the anticlinal  
10 elongation is responsible for the final shape of the gall, with increased number of tissue  
11 layers developed to both leaflet surfaces. As far as we are concerned, the development  
12 of these two host plant-galling herbivore systems, i.e., *B. dracunculifolia*-  
13 *Baccharoplema dracunculifolia* and *L. cultratus*-*Lopesia* sp. demonstrates the  
14 reorientation of the cellulose microfibrils during the development of the kidney-shaped  
15 and the fusiform galls, respectively.

## 16 **Final considerations**

17 The histochemical tests used in this study are simple and direct methods for detecting  
18 specific sites of accumulation of (poly)phenols and IAA. Moreover the detection of  
19 these compounds occurred at sites of cell division and elongation, corroborating the  
20 associated roles of these compounds in gall development. The new design of the *L.*  
21 *cultratus* fusiform gall is the consequence of cell anisotropic elongation orchestrated by  
22 the rearrangement of cellulose microfibrils, in sites where growth regulators could be  
23 detected.

## 24 **Acknowledgments**

25 The authors thank CAPES, FAPEMIG, and CNPq for scholarships and financial

1 support, Dr Valeria Cid Maia for the identification of the galling Cecidomyiidae, and  
2 Thiago Alves Magalhães for helping with the detection of cellulose microfibrils.

### 3 **References**

4 Arduin, M., and Kraus, J.E. 1995. Anatomia e ontogenia de galhas foliares de  
5 *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). Bol. Bot. Univ. São Paulo. **14**:  
6 109-130.

7 Baskin, T.I. 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a  
8 review and a model. Protoplasma. **215**: 150-171. doi: 10.1007/BF01280311.

9 Baskin, T.I. 2005. Anisotropic expansion of the plant cell wall. Annu. Rev. Cell. Dev.  
10 Biol. **21**: 203-222. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.082503.103053.

11 Bedetti, C.S., Modolo, L.V., and Isaias, R.M.S. 2014. The role of phenolics in the  
12 control of auxin in galls of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae:  
13 Mimosoideae). Biochem. Syst. Ecol. **55**: 53-59. doi: 10.1016/j.bse.2014.02.016.

14 Bors, W., Heller, W., Michel, C., and Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants:  
15 determination of radical-scavenging efficiencies. Methods. Enzymol. **186**: 343-  
16 355.

17 Bolwell, G.P. 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses.  
18 Curr. Opin. Plant. Biol. **2**: 287-294. doi: 10.1016/S1369-5266(99)80051-X.

19 Brett, C.T., and Waldron, K.W. 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls.  
20 *In* Topics in plant functional biology. Edited by M. Black and B. Charlwood.  
21 London, U.K. Chapman and Hall. pp. 129-135.

22 Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin.  
23 Mikrokosmos. **61**: 255.

24 Carneiro, R.G., Oliveira, D.C., and Isaias, R.M.S. 2014. Developmental anatomy and  
25 immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium*

1 *myrtoides* (Myrtaceae) towards the globoid galls of *Nothotrioza myrtoidis*  
2 (Triozidae). Plant Cell Rep. pp. 1-14. doi: 10.1007/s00299-014-1683-7.

3 Cassab, G.I. 1998. Plant cell wall proteins. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.  
4 **49**: 281-309. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.281.

5 Castro, A.C., Oliveira, D.C., Moreira, A.S.F.P., Lemos-Filho, J.P., and Isaias, R.M.S.,  
6 2012. Source-sink relationship and photosynthesis in the horn-shaped gall and its  
7 host plant *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). S. Afr. J. Bot. **83**: 121-126. doi:  
8 10.1016/j.sajb.2012.08.007.

9 Cosgrove, D.J. 1998. Cell wall loosening by expansins. Plant Physiol. **118**: 333-339.  
10 doi: 10.1104/pp.118.2.333. Cosgrove, D.J. 1999. Enzymes and other agents that  
11 enhance cell wall extensibility. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. **50**:  
12 391-417. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.391.

13 Cosgrove, D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. Nat. Rev. Mol. Cell. Bio. **6**(11):  
14 850-861. doi:10.1038/nrm1746. doi: 10.1038/nrm1746.

15 Crowell, E.F., Gonneau, M., Vernhettes, S., and Höfte, H. 2010. Regulation of  
16 anisotropic cell expansion in higher plants. C. R. Biol. **333**: 320-324. doi:  
17 10.1016/j.crv.2010.01.007.

18 Del Río, L.A., and Puppo, A. 2009. Reactive oxygen species in plant signaling.  
19 Springer, Berlin. doi: 10.1007/978-3-642-00390-5.

20 Detoni, M.L., Vasconcelos, E.G., Maia, A.C.R.G., Gusmão, M.A.N, Isaias, R.M.S,  
21 Soares, G.L.G., Santos, J.C., and Fernandes, G.W. 2011. Protein content and  
22 electrophoretic profile of insect galls on susceptible and resistant host plants of  
23 *Bauhinia brevipes* Vogel (Fabaceae). Aust. J. Bot. **59**(6): 509-514. doi.  
24 10.1071/BT11104.

- 1 Ferreira, B.G., and Isaias, R.M. 2013. Developmental stem anatomy and tissue  
2 redifferentiation induced by a galling Lepidoptera on *Marcetia taxifolia*  
3 (Melastomataceae). Botany. **91**(11): 752-760. doi: 10.1139/cjb-2013-0125.
- 4 Feucht, W., Schmid, P.P.S., and Christ, E. 1986. Distribution of flavanols in  
5 meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. J. Plant Physiol. **125**: 1-8.  
6 doi:10.1016/S0176-1617(86)80237-1.
- 7 Formiga, A.T., Gonçalves, S.J.M.R., Soares, G.L.G., and Isaias, R.M.S. 2009. Relações  
8 entre o teor de fenóis totais e o ciclo das galhas de Cecidomyiidae em  
9 *Aspidosperma spruceanum* Müll. Arg. (Apocynaceae). Acta Bot. Bras. **23**(1): 93-  
10 99. doi: 10.1590/S0102-33062009000100012.
- 11 Formiga, A.T., Soares, G.L.G., and Isaias, R.M.S. 2011. Responses of the host plant  
12 tissues to gall induction in *Aspidosperma spruceanum* Müell. Arg. (Apocynaceae).  
13 A. J. Plant Sci. **2**: 823-834. doi: 10.4236/ajps.2011.26097.
- 14 Formiga, A.T., Oliveira, D.C., Ferreira, B.G., Magalhães, T.A., Castro, A.C.,  
15 Fernandes, G.W., and Isaias, R.M.S. 2013. The role of pectic composition of cell  
16 walls in the determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis*  
17 *reticularia* (Asteraceae). Protoplasma. **250**: 899-908. doi: 10.1007/s00709-012-  
18 0473-8.
- 19 Green, P.B. 1980. Organogenesis-a biophysical view. Annu. Rev. Plant Physiol. **31**(1):  
20 51-82. doi: 10.1146/annurev.pp.31.060180.000411.
- 21 Hartley, S.E. 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and  
22 secondary compounds controlled by the gall former? Oecologia. **113**: 492-501.  
23 doi: 10.1007/s004420050401.
- 24 Hartley, S.E. 1999. Are gall insects large rhizobia? Oikos. **84**: 333-342.
- 25 Heldt, H., and Piechulla, B. 2011. Plant Biochem. Academic Press, London.

- 1 Herth, W., and Schnepf, E. 1980. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to  
2 structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma*. **105**(1-2): 129-133. doi:  
3 10.1007/BF01279855.
- 4 Hori, K. 1992. Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference  
5 to hemipterans. *In Biology of insect induced galls. Edited by J.D. Shorthouse, and*  
6 *O. Rohfritsch, Oxford University Press, Oxford. pp. 157-170.*
- 7 Isaias, R.M.S., and Oliveira, D.C. 2012. Gall Phenotypes-Product of Plant Cells  
8 Defensive Responses to the Inducers Attack. *In Plant Defence: Biological Control.*  
9 *Edited by J.M. Méridon, and K.G. Ramawat. Springer Netherlands. pp. 273-290.*  
10 doi: 10.1007/978-94-007-1933-0\_11.
- 11 Isaias, R.M.S., Carneiro, R.G.S., Oliveira, D.C., and Santos, J.C. 2013. Illustrated and  
12 annotated checklist of Brazilian gall morphotypes. *Neotrop. Entomol.* **42**: 230-239.  
13 doi: 10.1007/s13744-013-0115-7.
- 14 Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S., and Kraus, J.E. 2014. Developmental  
15 Anatomy of galls in the Neotropics: Arthropods Stimuli Versus Host Plant  
16 Constraints. *In Neotropical Insect Galls. Edited by G.W. Fernandes and, J.C*  
17 *Santos. Springer Netherlands. pp. 15-34. doi: 10.1007/978-94-017-8783-3\_2.*
- 18 Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- 19 Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for  
20 use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**: 137-138.
- 21 Kraus, J.E., and Arduin, M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal.*  
22 *Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.*
- 23 LeBlanc, D.A., and Lacroix, C.R. 2001. Developmental potential of galls induced by  
24 *Diplolepis rosaefolii* (Hymenoptera: Cynipidae) on the leaves of *Rosa virginiana*

1 and the influence of *Periclistus* species on the *Diplolepis rosaefolii* galls. *Int. J.*  
2 *Plant Sci.* **162**(1): 29-46. doi: 10.1086/317900.

3 Leopold, A.C., and Plummer, T.H. 1961. Auxin-phenol complexes. *Plant Physiol.* **36**:  
4 589-591.

5 Lev-Yadun, S. 2003. Stem cells in plants are differentiated too. *Curr. Top. Plant Biol.* **4**:  
6 93-100.

7 Magalhães, T.A., Oliveira, D.C., Suzuki, A.Y.M., and Isaias, R.M.S. 2014. Patterns of  
8 cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma*  
9 *dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae).  
10 *Protoplasma.* **251**:747-753. doi: 10.1007/s00709-013 0574-z.

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

12 Meyer, J., and Maresquelle, H.J. 1983. Anatomie des Galles. Gebrüder Borntraeger,  
13 Berlin.

14 Moura, M.Z.D., Isaias, R.M.S., and Soares, G.L.G. 2008. Species-specific changes in  
15 tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L.  
16 (Verbenaceae). *Aust. J. Bot.* **56**:153-160. doi: 10.1071/BT07131.

17 Motulsky, H. 1992-2009. Analyzing data with GraphPad Prism software. San Diego,  
18 California, USA. GraphPad Software Inc.

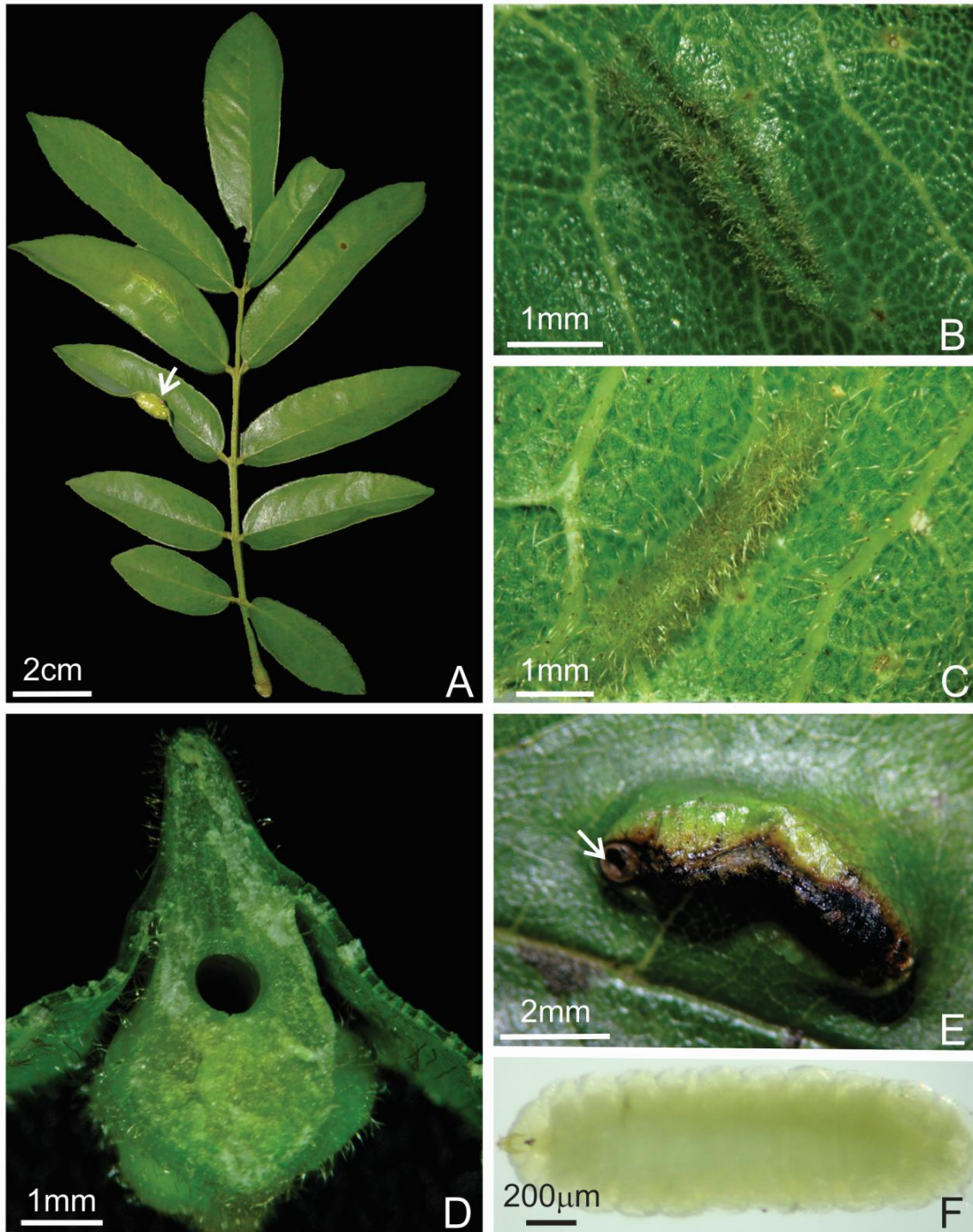
19 Murphy, A., Peer, A., and Taiz, L. 2000. Regulation of auxin transport by  
20 aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta.* **211**: 315-324. doi:  
21 10.1007/s004250000300.

22 O'Brien, T.P., Feder, N., and McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell  
23 walls by toluidine blue O. *Protoplasma.* **59**: 368-373. doi:10.1007/BF01248568.

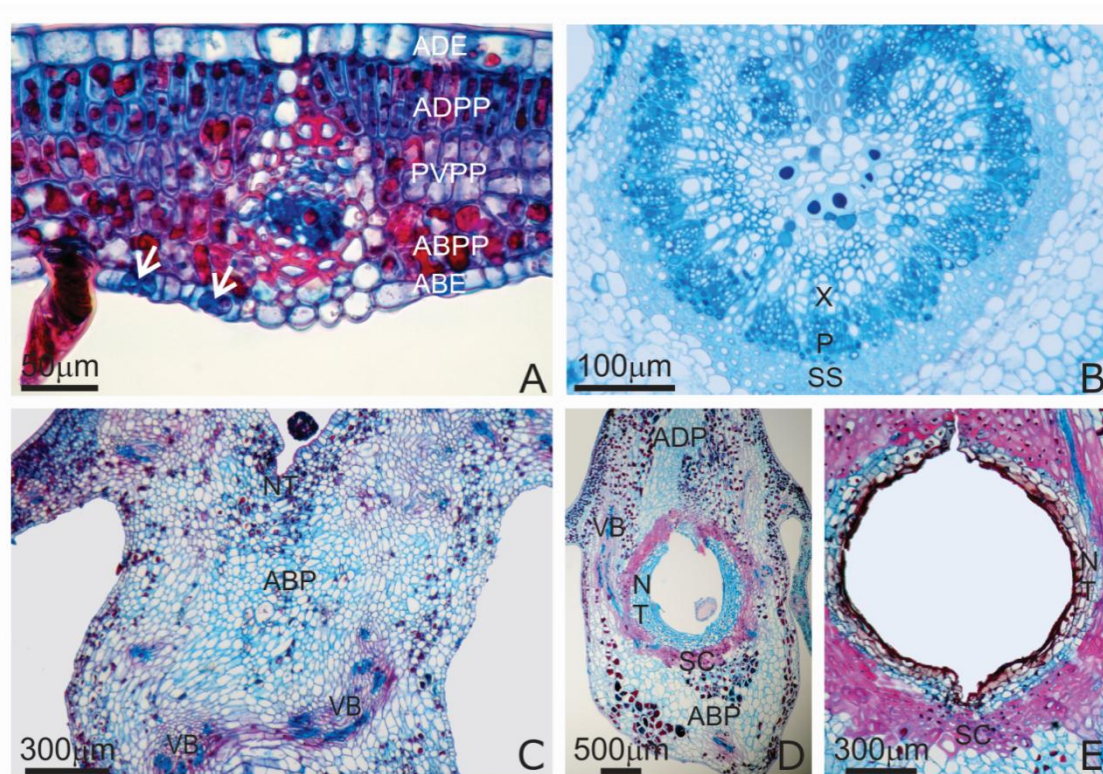
- 1 Obroucheva, N.V. 2008. Cell elongation as an inseparable component of growth in  
2 terrestrial plants. Russ. J. Develop. Biol. **39**(1): 13-24. doi:  
3 10.1134/S1062360408010049.
- 4 Oliveira, D.C., and Isaias, R.M.S. 2010. Redifferentiation of leaflet tissues during  
5 midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). S. Afr. J. Bot. **76**:  
6 239-248. doi: 10.1016/j.sajb.2009.10.011.
- 7 Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Ferreira, B.G., Teixeira, C.T., Formiga, A.T.,  
8 Fernandes, G.W., and Isaias, R.M.S. 2014. Variation in the degree of pectin  
9 methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney  
10 shaped gall. PLoS One. **9**(4): 1-8. doi: 10.1371/journal.pone.0094588.
- 11 Paiva, J.G.A., Frank-de-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P., and Graciano-Ribeiro, D.  
12 2006. Verniz vitral incolor 500<sup>®</sup>: uma alternativa de meio de montagem  
13 economicamente viável. Acta Bot. Bras. **20**(2): 257-264. doi:10.1590/S0102-  
14 33062006000200002.
- 15 Peer, W., and Murphy, A. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or  
16 regulators? Trends Plant Sci. **12**(12): 556-563. doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.003.
- 17 Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepiniec, L., and Debeaujon, I. 2007.  
18 Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological  
19 functions. Trends Plant Sci. **12**(1): 29-36. doi: 10.1016/j.tplants.2006.11.006.
- 20 Raman, A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. Curr. Sci.  
21 **92**: 748-757.
- 22 Rayle, D.L., and Cleland, R.E. 1992. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell  
23 elongation is alive and well. Plant Physiol. **99**(4): 1271-1274. doi:  
24 10.1104/pp.99.4.1271.



- 1 Rohfritsch, O. 1992. Patterns in gall development. *In* Biology of insect-induced galls.  
2 Edited by J.D. Shorthouse and O. Rohfritsch. Oxford University Press, Oxford, pp.  
3 60-86.
- 4 Rose, J.C. 2003. The plant cell wall. Blackwell, Garsington Road, Oxford.
- 5 Rossetti, S., and Bonatti, P.M. 2001. In situ histochemical monitoring of ozone- and  
6 TMV induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiol. Biochem.*  
7 **39**: 433-442. doi:10.1016/S0981-9428(01)01250-5.
- 8 Stiles, K.A., and Van Volkenburgh, E. 2002. Light-regulated leaf expansion in two  
9 *Populus* species: dependence on developmentally controlled ion transport. *J. Exp.*  
10 *Bot.* **53**(374): 1651-1657. doi: 10.1093/jxb/erf015.
- 11 Soares, G.L.G., Isaias, R.M.S., Gonçalves, S.J.M.R., and Christiano, J.C.S. 2000.  
12 Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea,  
13 Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). *Rev. Bras.*  
14 *de Zoociências.* **2**(1): 103-133.
- 15 Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Ikehara, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a  
16 detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* **115**(4): 1405-  
17 1412.
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

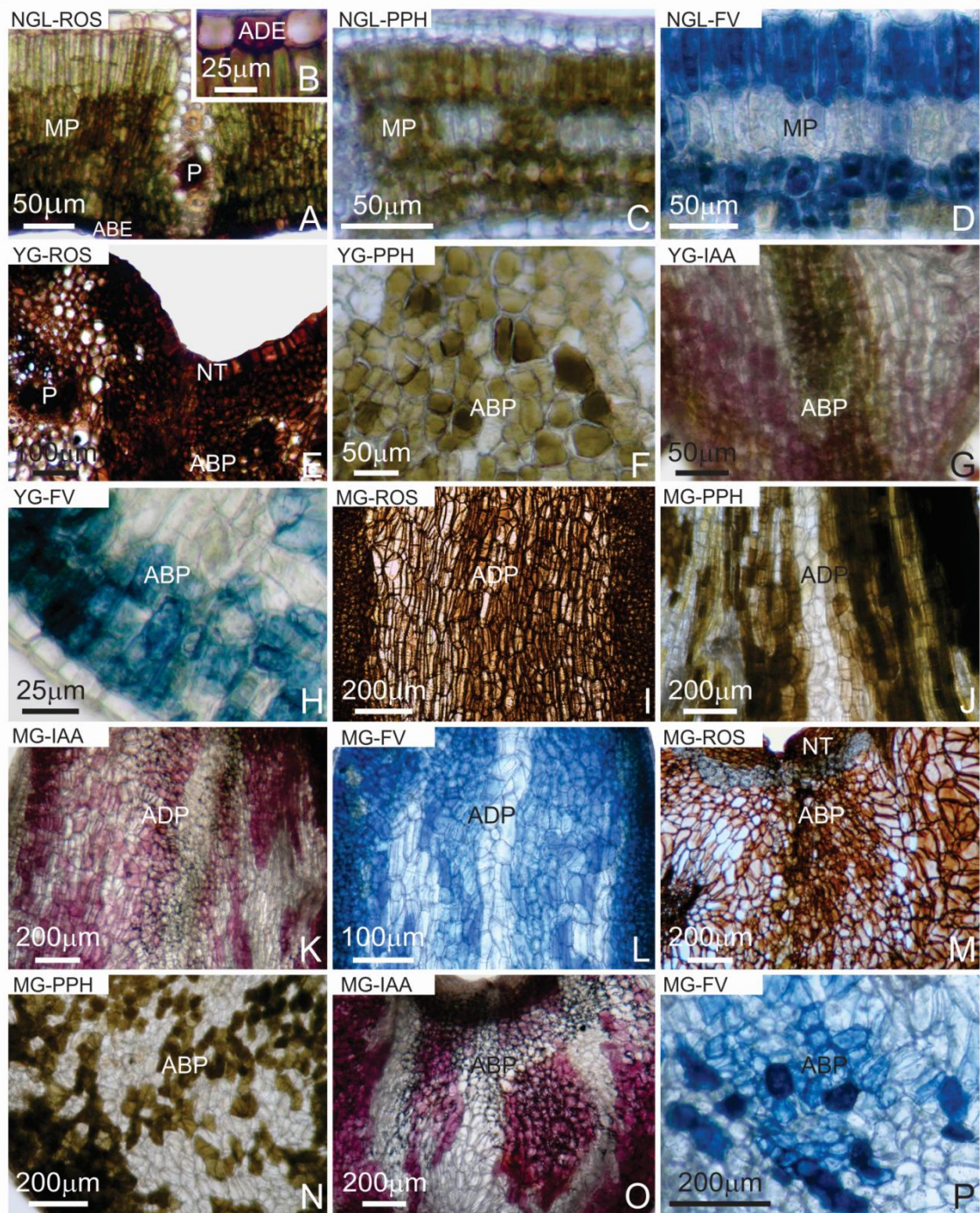


**Fig. 1.** *Lonchocarpus cultratus*-Cecidomyiidae system. (A) Leaf of *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae) with a gall induced by a Cecidomyiidae (arrow). (B) Detail of a young gall (YG) seen on the adaxial surface. (C) Detail of a young gall (YG) seen on the abaxial surface. (D) Transverse section of a mature gall (MG) showing the larval chamber. (E) Senescent gall (SG) showing the escape channel (arrow). (F) Larva of *Lopesia* sp.



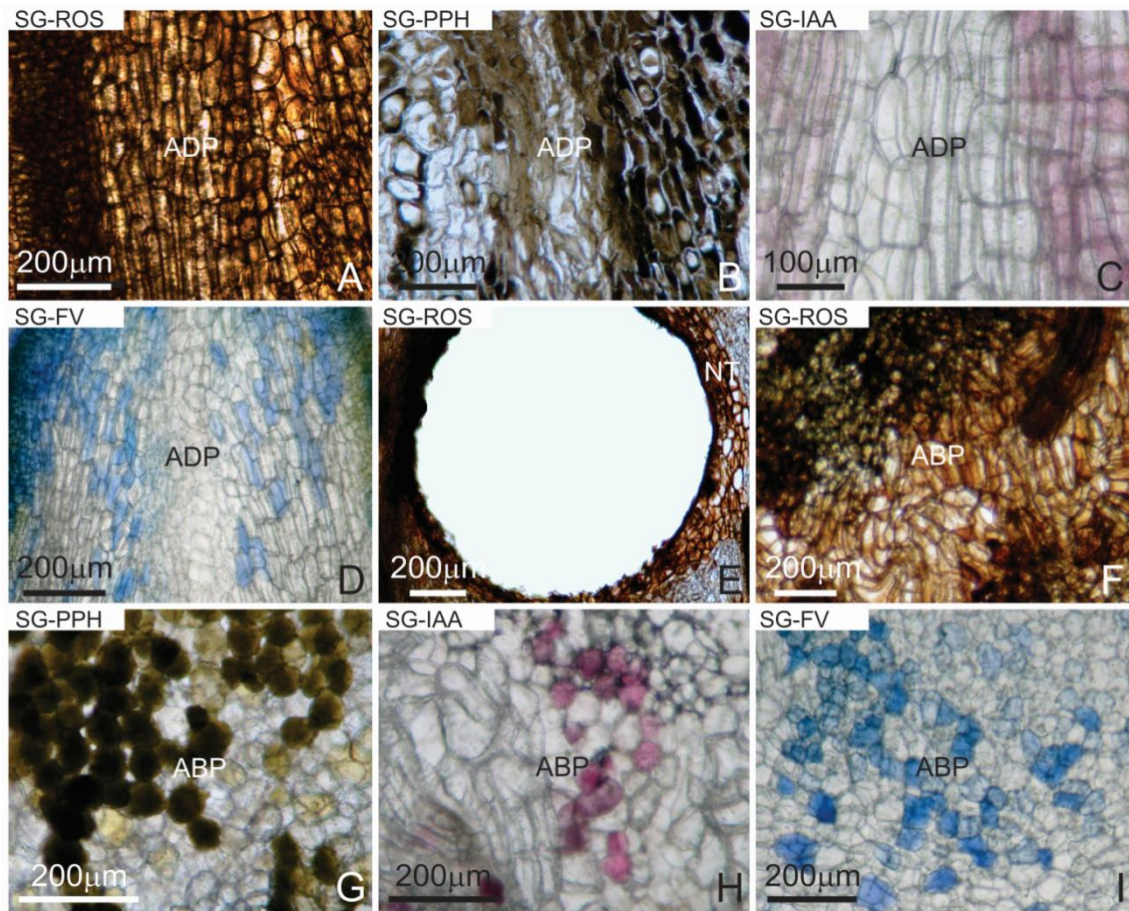
**Fig. 2.** Anatomical aspects of the non-galled leaflet and galls of *Lopesia* sp. on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). (A-B) Non-galled leaflet (NGL). (C) Young gall (YG). (D) Mature gall (MG). (E). Senescent gall (SG). (A) NGL with uniseriate epidermis, mesophyll divided into adaxial palisade parenchyma, paravenal palisade parenchyma, abaxial palisade parenchyma, and stomata on the abaxial surface (arrows). (B) Collateral vascular bundle surrounded by sclerenchymatic sheath. (C) YG characterized by cell divisions and elongation, which causes the hypertrophy and arching of the leaflet lamina. (D) MG with parenchymatic outer cortices, nutritive tissue and sclereids. (E) Detail of suberization in the nutritive tissue adjacent to the larval chamber. Abaxial epidermis (ABE), abaxial palisade parenchyma (ABPP), abaxial parenchyma (ABP), adaxial epidermis (ADE), adaxial palisade parenchyma (ADPP), adaxial parenchyma (ADP), paravenal palisade parenchyma (PVPP), phloem (P), nutritive tissue (NT), sclereids (SC), sclerenchymatic sheath (SS), vascular bundle (VB), xylem (X).



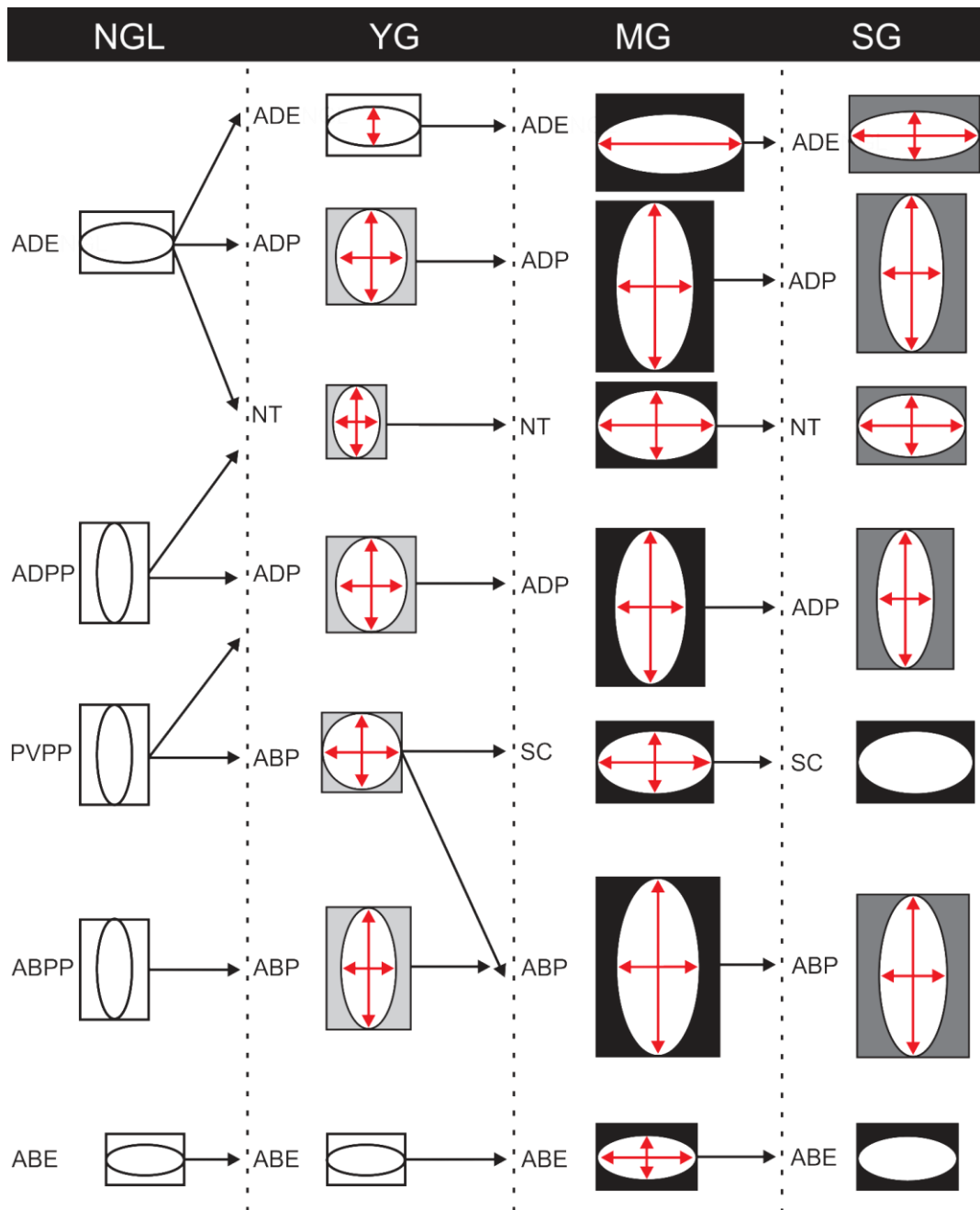


**Fig. 3.** Histochemical tests on transverse sections of the non-galled leaflet and galls of *Lopesia* sp. on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). (A-D) Non-galled leaflet (NGL). (E-H) Young gall (YG). (I-P) Mature gall (MG). (A) Detection of reactive oxygen species (ROS) (brown color) by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) more intense in the paravenal palisade parenchyma, abaxial palisade parenchyma, and phloem. (B) ROS detected by DAB in the adaxial epidermis. (C) (Poly)phenols (PPH) (brownish color) evidenced by ferrous sulfate in formalin in the mesophyll. (D) Detection of flavonoids (FV) (blue color) by *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) in the mesophyll. (E) ROS detected by DAB in the nutritive tissue, abaxial outer cortex and phloem. (F) (Poly)phenols in the abaxial outer cortex. (G) Detection of indole-3-acetic acid (IAA) (pink color) by Ehrlich reagent in the abaxial outer cortex. (H) Flavonoids (blue color) evidenced in the abaxial outer cortex. (I) ROS in the cells of the adaxial outer cortex. (J) (Poly)phenols in the cells of the adaxial outer cortex. (K) IAA in the cells of the adaxial outer cortex. (L) Flavonoids in the cells of the adaxial outer cortex. (M) ROS detected in the cells of the abaxial outer cortex. (N) (Poly)phenols in the abaxial surface. (O) Detection of IAA in the cells of the abaxial outer cortex. (P) Flavonoids in the cells of the abaxial outer cortex. Abaxial epidermis (ABE), abaxial palisade parenchyma (ABPP), abaxial parenchyma (ABP), adaxial epidermis (ADE), adaxial palisade parenchyma (ADPP), adaxial parenchyma (ADP), paravenal palisade parenchyma (PVPP), phloem (P), nutritive tissue (NT).

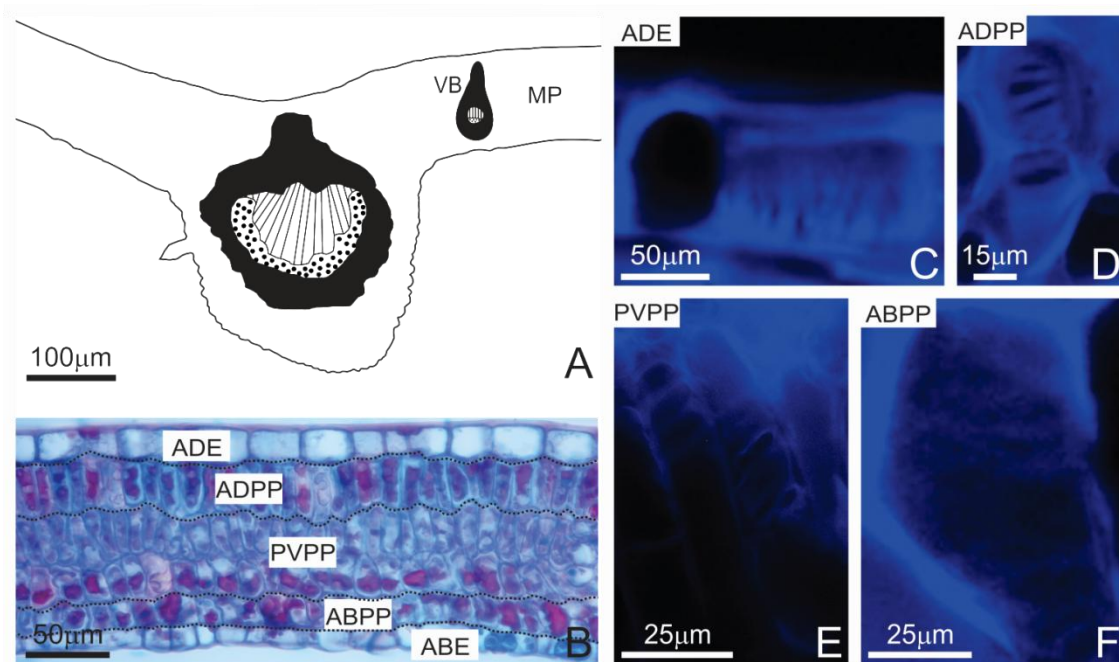




**Fig. 4.** Histochemical tests on transverse sections of the senescent galls (SG) of *Lopesia* sp. on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). (A) Detection of reactive oxygen species (ROS) (brown color) by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in the adaxial outer cortex. (B) (Poly)phenols (PPH) (black color) evidenced by ferrous sulfate in formalin in the adaxial outer cortex. (C) Detection of indole-3-acetic acid (IAA) (pink color) by Ehrlich reagent in the adaxial outer cortex. (D) Flavonoids (FV) (blue color) detected by *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) in the adaxial outer cortex. (E) ROS detected by DAB in the nutritive tissue. (F) Detection of ROS in the abaxial outer cortex. (G) (Poly)phenols in the abaxial surface. (H) Detection of IAA in the abaxial outer cortex. (I) Detection of flavonoids in the abaxial outer cortex. Abaxial parenchyma (ABP), adaxial parenchyma (ADP), nutritive tissue (NT).

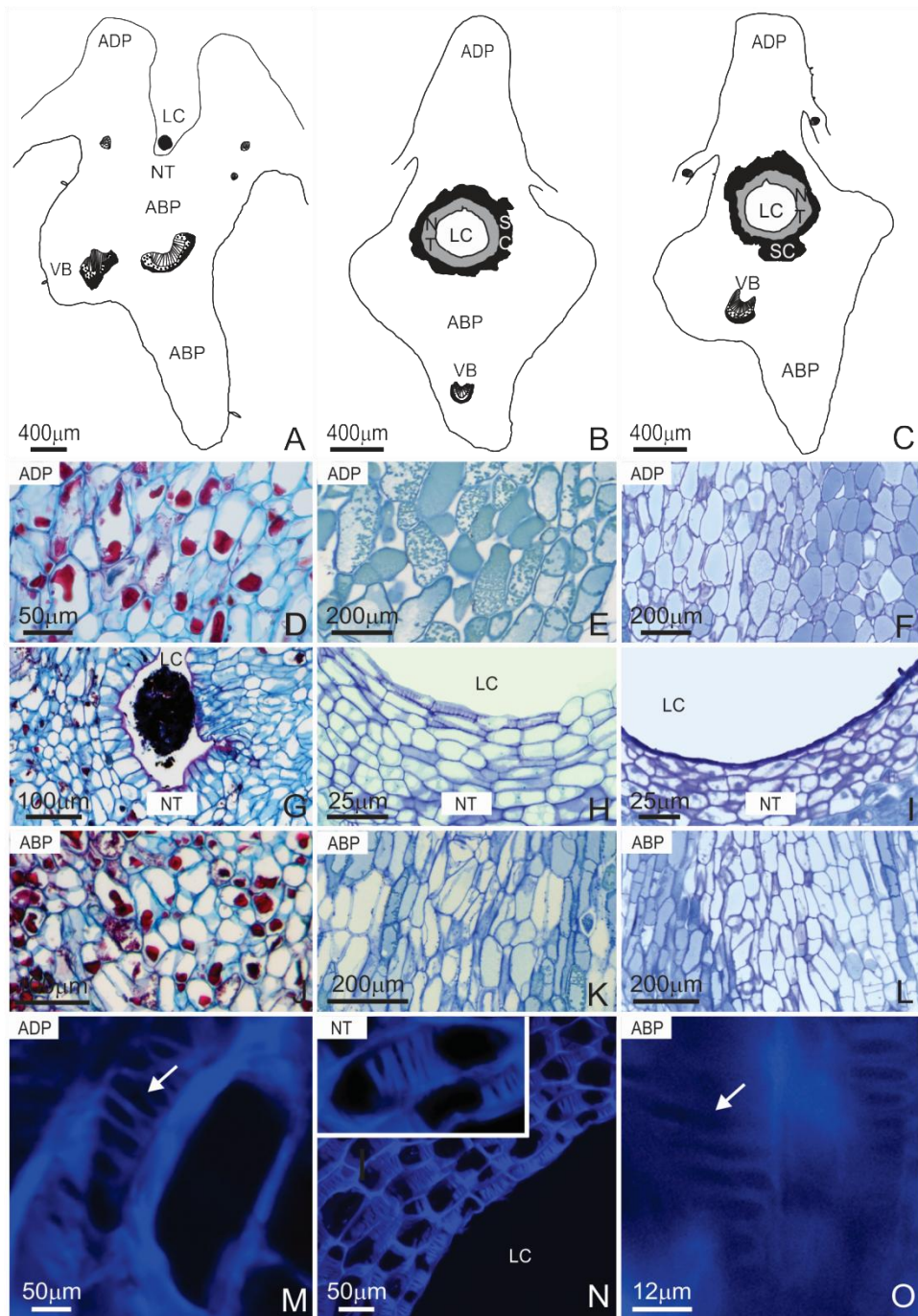


**Fig. 5.** Patterns of cell elongation and changes in cell areas during the development of the fusiform gall of *Lopesia* sp. on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). Squares with different shading indicate statistical differences in cell area. Anisodiametric cells are represented by ellipses with only two ends contacting the square. Isodiametric cells are represented by circles touching all sides of the squares. Arrows indicate changes in elongation patterns. (n= 10;  $p \leq 0.05$ ). Abaxial epidermis (ABE), abaxial palisade parenchyma (ABPP), abaxial palisade parenchyma (ABP), adaxial epidermis (ADE), adaxial palisade parenchyma (ADPP), adaxial palisade parenchyma (ADP), mature gall (MG), non-galled leaflet (NGL), nutritive tissue (NT), paravenal palisade parenchyma (PVPP), sclereids (SC), senescent gall (SG), young gall (YG).

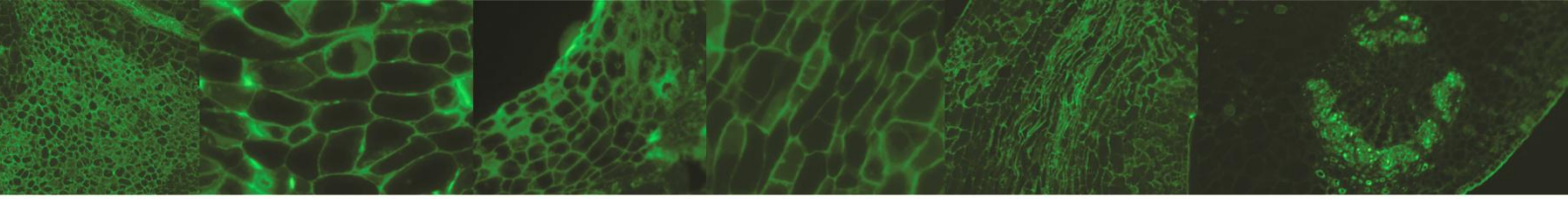


**Fig. 6.** Diagram, anatomy, and patterns of deposition of cellulose microfibrils of non-galled leaflets (NGL) of *Lopesia* sp. on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). (A) Diagram of NGL in transverse section. (B) Transverse section of the NGL, showing tissue organization. (C) Adaxial epidermis with aligned microfibrils. (D) Adaxial palisade parenchyma with aligned microfibrils. (E) Paravenal palisade parenchyma with aligned microfibrils. (F) Abaxial palisade parenchyma with microfibrils aligned transversely to the long axis of cell elongation. Abaxial epidermis (ABE), abaxial palisade parenchyma (ABPP), adaxial epidermis (ADE), adaxial palisade parenchyma (ADPP), mesophyll (MP), paravenal palisade parenchyma (PVPP), vascular bundle (VB).



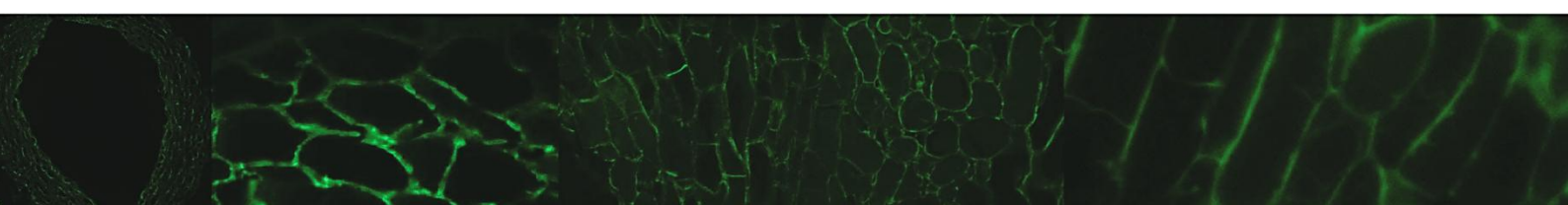


**Fig. 7.** Diagram, anatomy, and patterns of deposition of cellulose microfibrils of young (YG), mature (MG), and senescent galls (SG) of *Lopesia* sp. on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). (A) YG in transverse section. (B) MG in transverse section. (C) SG in transverse section. (D) Adaxial outer cortical cells of a YG. (E) Adaxial outer cortical cells of a MG. (F) Adaxial outer cortical cells of a SG. (G) Nutritive tissue in differentiation in a YG. (H) Nutritive tissue of a MG. (I) Nutritive tissue of a SG. (J) Abaxial outer cortical cells of a YG. (K) Abaxial outer cortical cells of a MG. (L) Abaxial outer cortical cells of a SG. (M) Adaxial cortical cells of a MG with aligned microfibrils (arrow). (N) Nutritive tissue of a MG with aligned microfibrils (arrow). (O) Abaxial outer cortical cells of a MG with aligned microfibrils (arrow). Abaxial parenchyma (ABP), adaxial parenchyma (ADP), larval.



**Remodeling of pectins and proteins on the cell walls  
during the development of the leaflet and of leaflet  
gall on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae)**

Manuscrito formatado para submissão - Functional Plant Biology



1 **Remodeling of pectins and proteins on the cell walls during the development of the**  
2 **leaflet and of leaflet gall on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae)**

3 Aline Yasko Marinho Suzuki<sup>A</sup>, Rosy Mary dos Santos Isaias<sup>A\*</sup>

4

5 <sup>A</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento  
6 de Botânica, Laboratório de Anatomia Vegetal. Avenida Antônio Carlos, 6627,  
7 Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 31270-901. Caixa postal  
8 486.31270-901. Phone: +55(31)34092687. Fax: +55(31)34092671.  
9 aline\_suzuki@yahoo.com.br.

10 \*Corresponding author: rosy@icb.ufmg.br

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **Abstract**

2 Galls are product of an intimate host plant-insect interaction with specific structural and  
3 functional features. Current model of study is a Cecidomyiidae leaflet gall induced on  
4 *Lonchocarpus cultratus*, assessed to investigate how the diversity and distribution of  
5 cell walls pectins and proteins affect the functionality of gall tissue layers. Non-galled  
6 leaflets and galls of *Lonchocarpus cultratus* at different developmental stages were  
7 analyzed using anatomical and immunocytochemical approaches. The detection of high  
8 methyl-esterified homogalacturonans (HGAs) and arabinogalactan-proteins (AGPs) in  
9 leaflet primordia, young leaflets, and young galls evidenced cell youth and flexibility.  
10 The labeling of low methyl-esterified HGAs in mature leaflets and senescent galls  
11 demonstrated cell structural stability. In mature galls, AGPs were labeled in the cell  
12 walls of the adaxial outer cortex, which was related to gall growth, and avoidance of  
13 cell death. Neo-functionalities were observed mainly in nutritive cells, where the co-  
14 occurrence of arabinans and galactans enhanced the cell wall porosity, facilitating  
15 insect`s nutrition. The detected epitopes indicated flexibility and porosity in the walls of  
16 redifferentiating cells, and stiffness in the walls of cells at the end of their cycles.  
17 Besides the stimuli of gall inducing and establishment, the age of the host plant organ  
18 also influenced the pectin and protein composition of the cell walls.

19

20 **Keywords:** cell wall composition, immunocytochemistry, insect galls, plant  
21 development.

22

23

24

25

26

27

28

29

## 1 **Introduction**

2           The components of the cell walls are highly dynamic and throughout  
3 development undergo changes in their composition and configuration in response to the  
4 functional needs of plant organs (Rose 2003). Among the factors that contribute to the  
5 development of galls, changes in pectins and proteins of cell walls allow the redirection  
6 of cellular functions leading to the formation of a new structural and functional design  
7 of the neoformed organ (Formiga *et al.* 2013; Carneiro *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2014).  
8 One of the components of the cell wall, the pectins, are classified into three main  
9 domains: rhamnogalacturonans I (RG-I), rhamnogalacturonans II (RG-II), and  
10 homogalacturonans (HGAs) (Ridley *et al.* 2001; Mohnen 2008; Albersheim *et al.* 2010)  
11 that comprise 20-35%, 10%, and 65% of pectins in cell walls, respectively (Ridley *et al.*  
12 2001, Mohnen 2008). The RG-I are alternative forms of HGAs composed of side chains  
13 of rhamnose linked to galacturonic acid (Moore *et al.* 2008; Albersheim *et al.* 2010),  
14 while the RG-II are structurally more complex and predominate in the primary cell  
15 walls (O'Neill *et al.* 2004). The lateral chains of RG-I may be replaced by arabinans and  
16 galactans (Albersheim *et al.* 2010), with arabinans contributing to the flexibility of the  
17 walls, and their absence conferring loss of cell adhesion (O'Donoghue and Sutherland  
18 2012). Mastroberti and Mariath (2008) suggested that the galactans are indirectly  
19 responsible for cell growth, since they bind to RGs and reduce the availability of free  
20 esterification sites. In the presence of galactans, calcium ions do not bind to such sites  
21 and the stiffness of the walls is reduced (Jones *et al.* 1997).

22           The HGAs are synthesized in highly methyl-esterified state, ensuring flexibility  
23 to the structure (Knox *et al.* 1990). These pectins are produced in the Golgi apparatus  
24 and transported to the cell walls forming a three-dimensional network (Willats *et al.*  
25 2001). Changes in the degree of methyl-esterification of HGAs may occur by the action  
26 of pectin methyl-esterases (PMEs), which release the sites to interact with calcium ions,  
27 and promote the increased stiffness of the structure (Knox *et al.* 1990). Besides the  
28 pectins, the arabinogalactan-proteins (AGPs) and the extensins are part of the  
29 composition of the walls (Showalter 1993). The AGPs are characterized by a large  
30 proportion of carbohydrates, mainly arabinoses and galactoses, and a just 5-10% of  
31 proteins (Showalter 1993). The AGPs are found in practically all plant organs,  
32 associated with several aspects of development, being involved in the processes of cell  
33 division (Rumyantseva 2005), expansion (Willats and Knox 1996), and in the control of

1 programmed cell death (PCD) (Mastroberti and Mariath 2008). Another component of  
2 cell walls, often evident at the end of cell expansion, is the extensin (Cassab 1998). This  
3 glycoprotein provides stability and rigidity to the structure decreasing the growth of the  
4 walls (Brett and Waldron 1996). Such components of cell walls has been recently  
5 studied in three gall morphotypes on *Baccharis reticularia* (Formiga *et al.* 2013) in  
6 mature stage, during the development of the globoid galls on *Psidium myrtoides*  
7 (Carneiro *et al.* 2014), and of the kidney-shaped galls on *B. dracunculifolia* (Oliveira *et*  
8 *al.* 2014).

9 The pectins and proteins of the cell walls vary temporally and spatially during  
10 the development both of the host organ, and of the gall (Formiga *et al.* 2013; Oliveira *et*  
11 *al.* 2014). On time basis, it is expected that the composition of the cell walls should be  
12 similar between the early stages of leaflet and gall development. On spatial basis, a  
13 remodeling of the components of the cell walls towards the new functionalities assumed  
14 by the gall tissue layers is predicted. To check these assumptions, current study labels  
15 the pectin and protein epitopes on cell walls of leaflets and galls with monoclonal  
16 antibodies (MAbs). The role of each investigated epitope in its specific sites is  
17 discussed based on to their primary functions on the leaflets, towards the new functions  
18 of the gall tissue layers of the galls on *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) Azevedo and  
19 Lima (Fabaceae).

## 21 **Materials and methods**

### 22 ***Study area***

23 Samples of leaflet primordia of the first node (LP), young leaflets (YL), mature  
24 leaflets (ML), and young (YG), mature (MG) and senescent galls (SG) were collected  
25 from individuals of *Lonchocarpus cultratus* (n = 10). The sites of sampling were the  
26 Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais (EEUFMG), *campus*  
27 Pampulha (19°53'02.4"S, 43°58'09.8"W), and the Parque Estadual Serra Verde (PESV)  
28 (19°47'22.47"S, 43°57'32.35"W), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The voucher  
29 specimens of fertile material were deposited in the BHC B Herbarium under the  
30 registration number 155.758 (EEUFMG) and 169.410 (PESV).

## 1 ***Fixation and preparation of sample***

2 For anatomical analyzes ( $n \geq 10$  per sample) and immunocytochemistry ( $n \geq 3$   
3 per sample), portions of the LP, YL, ML, YG, MG and SG were fixed in 4.5%  
4 formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (PBS) (pH 7.2)  
5 (Karnovsky 1965, modified), dehydrated in *n*-butyl series (Johansen 1940), and  
6 embedded in Paraplast<sup>®</sup> (Kraus and Arduin 1997). Cross sections (12 $\mu$ m) were  
7 performed in a rotary microtome (Jung Leica<sup>®</sup> Biocut 2035). The sections were  
8 deparaffinized in butyl acetate at 40 °C, and dehydrated in ethanol series. For  
9 anatomical observations, the samples were stained with Astra blue and safranin 9:1  
10 (v/v) (Bukatsch 1972, modified to 0.5%), and mounted in clear varnish (Paiva *et al.*  
11 2006).

## 12 ***Immunocytochemistry***

13 For immunocytochemical analysis, the samples ( $n \geq 3$  per stage) were incubated  
14 in blocking solution with 3% powdered milk in PBS for 30 minutes, followed by  
15 incubation for 2h in monoclonal antibodies (MAbs) JIM5, JIM7, LM1 , LM2, LM5 and  
16 LM6 (table 1) (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK). For the negative  
17 control, the MAbs were suppressed. The sections were washed in PBS, and then  
18 incubated in FITC Goat anti-rat (Sigma<sup>®</sup>) diluted in 3% powdered milk in PBS (1:10),  
19 and kept for 2h in the dark. Slides were washed three times in PBS, and mounted with  
20 50% glycerin. The analyses were performed in a Zeiss 510 META confocal microscope,  
21 with the excitation Argon laser wavelength of 488 nm, and emission of 505-530 nm.

22

## 23 **Results**

### 24 ***General features***

25 *Lonchocarpus cultratus* (Leguminosae: Papilionoideae) is an arboreal-shrub  
26 species (Fig. 1A). The fusiform galls are intralaminar, hairy, with similar color on both  
27 surfaces of leaflets (Fig. 1B-C), and a spherical larval chamber (Fig. 1D). The SG have  
28 an escape channel (Fig. 1E) digged by the galling Diptera: Cecidomyiidae, whose larva  
29 is translucent (Fig. 1F).

30

## 1 *Anatomical features of leaflets and galls*

2 The leaflet primordia (LP) have uniseriate protoderm, and ground meristem  
3 subdivided into three regions: one-layered adaxial meristem, two-layered median  
4 meristem, and one-layered abaxial meristem (Fig. 2A). The young leaflets (YL) have  
5 uniseriate epidermis and four-layered mesophyll (Fig. 2B). The epidermis of the mature  
6 leaflets (ML) is uniseriate, and the mesophyll is 4-6 layered (Fig. 2C). The vascular  
7 bundles are collateral and surrounded by sclerenchymatic sheath (Fig. 2D). During all  
8 phases of gall development, epidermis remains uniseriate. The YG is formed by an  
9 outer cortical parenchyma, and a differentiating nutritive tissue (Fig. 2E). The MG have  
10 sclerenchymatic cells surrounding the nutritive tissue (Fig. 3A). Suberization of some  
11 cells of the nutritive tissue and adaxial outer cortex are observed in the SG (Fig. 3B).

## 12 *Immunocytochemistry*

13 The LP, the YL and ML, and the YG, MG and SG have temporal and spatial  
14 variations in the distribution of pectin and protein epitopes, as well as differences in the  
15 intensity of labeling (Fig. 2-3). The diversity of the compounds of the LP is higher than  
16 those of the YL and ML (Fig. 2A-D). An increasing diversity of pectin and protein  
17 domains is observed from the ML towards the YG (Fig. 2C-E). During the transition  
18 from the YG to MG, no variation occurs in pectin and protein composition of the cell  
19 walls (Fig. 2E; 3A). Nevertheless, the epitopes vary in intensity and site of detection  
20 (Fig. 2E; 3A). From MG towards SG, there is a decrease in epitopes diversity (Fig. 3A-  
21 B).

22 The JIM 7 antibody labels moderately the epitopes of high methyl-esterified  
23 HGAs in the cell walls of the protoderm, ground meristem (Fig. 2A; 4A), midrib  
24 collenchyma (Fig. 2A; 4B), and in the inner walls of procambial cells of the LP (Fig.  
25 2A; 4C). Weak labeling by the JIM 5 antibody occurs at the junctions of the cells in the  
26 collenchyma (Fig. 2A). Moderate labeling of the epitopes of AGPs by LM2 antibody is  
27 observed in the anticlinal cell walls of the ground meristem (Fig. 2A; 4D), a weak  
28 labeling occurs in the cell walls of the collenchyma (Fig. 2A; 4E), and of the midrib  
29 procambium (Fig. 2A; 4F). The LM6 antibody moderately labels the epitopes of the  
30 arabinans in the cell walls of the protoderm, ground meristem (Fig 2A; 4G),  
31 collenchyma (Fig 2A; 4H), and midrib procambium (Fig. 2A). The detection of the  
32 epitopes of galactans by the LM5 antibody occurs moderately in the cell walls of the



1 procambium (Fig. 2A; 4I), and in the midrib collenchyma (Fig. 2A; 4J), while the cell  
2 walls of the adaxial, median, and abaxial meristem have less intense labeling (Fig. 2A;  
3 4K).

4 In the YL, the cell walls of the epidermis, parenchyma, xylem, phloem, and  
5 collenchyma have strong labeling of high methyl-esterified HGAs by the JIM7 antibody  
6 (Fig. 2B; 4L-M). These epitopes are also detected at the junctions of the collenchyma  
7 cells (Fig. 4M). The low methyl-esterified HGAs are labeled by the JIM5 antibody with  
8 lower intensity in the cell walls of the epidermis, and parenchyma (Fig 2B; 4N). The  
9 AGPs are weakly labeled by the LM2 antibody in the cell walls of the epidermis and  
10 parenchyma (Fig 2B; 4O). In the cell walls of the collenchyma cells, of the xylem, and  
11 phloem, the galactans are weakly labeled by the LM5 antibody (Fig. 2B; 4P). More  
12 expressive labeling of galactans occurs in the junctions of the collenchyma cells (Fig.  
13 4P).

14 In ML, the epitopes of the low methyl-esterified HGAs are moderately labeled  
15 by the JIM5 antibody in the outer periclinal walls of the adaxial epidermis (Fig. 5A),  
16 and intensely labeled in the outer periclinal walls of abaxial epidermis (Fig. 5B).  
17 Moderately labeling occurs in the cell walls of the adaxial, paravenal and abaxial  
18 palisade parenchyma (Fig. 2C; 5A). In the midrib, these epitopes are moderately labeled  
19 at the junctions of the collenchyma cells (Fig. 2D; 5B). The high methyl-esterified  
20 HGAs are weakly labeled by the JIM 7 antibody in the cell walls of the epidermis and  
21 parenchyma (Fig. 2C; 5C). These epitopes are intensely labeling in the outer periclinal  
22 walls of the abaxial epidermis of the midrib (Fig. 5D). The cell walls of xylem and  
23 phloem are weakly labeled for high methyl-esterified HGAs, while moderate labeling is  
24 observed at the junctions of the collenchyma cells (Fig. 2D; 5D). The LM5 antibody  
25 moderately labels the epitopes for galactans in the cell walls of the phloem (Fig. 2D;  
26 5E) and weakly labeled in the cells of the adaxial epidermis, adaxial and paravenal  
27 palisade parenchyma, and xylem (Fig. 2C-D). The AGPs are weakly labeled by the  
28 LM2 antibody in the outer periclinal walls of the epidermis (Fig. 2C-D).

29 A great diversity of pectin and protein epitopes is observed in the YG (Fig. 2E;  
30 5F-T). Weak labeling of low methyl-esterified HGAs by the JIM5 antibody occurs in  
31 the cell walls of the epidermis, parenchyma cells of the adaxial outer cortex (Fig. 2E;  
32 5F), differentiating nutritive tissue (Fig. 2E; 5G), and parenchyma cells of the abaxial  
33 outer cortex (Fig. 2E; 5H). Moderate labeling occurs at the junctions of these cells (Fig.  
34 5F-H), and in the cell walls of the phloem (Fig. 2E; 5I). The JIM 7 antibody labeled

1 more intensely the epitopes of the high methyl-esterified HGAs in the inner cell walls of  
2 the differentiating nutritive tissue (Fig. 5J), at the junctions of the adaxial outer cortical  
3 cells (Fig. 5K), and in the outer periclinal walls of the abaxial epidermis (Fig. 5L), when  
4 compared to the moderate labeling in the cell walls (Fig. 2E; 5J-L). These epitopes are  
5 moderately labeled in the cells walls of the phloem, and weakly labeled in the inner cell  
6 walls of the sclerenchymatic sheath (Fig. 5M). Less expressive labeling of the AGPs by  
7 the LM2 antibody occurs in the adaxial epidermis, in the parenchyma cells of the  
8 adaxial outer cortex (Fig. 2E; 5N), and in the cell walls of the differentiating nutritive  
9 tissue (Fig. 2E; 5O). The cell walls of the nutritive tissue (Fig. 2E; 5P) and parenchyma  
10 cells of the abaxial outer cortex have weak labeling for the epitopes of galactans by the  
11 LM5 antibody (Fig. 2E). The LM6 antibody moderately labels the epitopes of arabinans  
12 in the cell walls of the adaxial epidermis, adaxial outer cortical parenchyma (Fig. 2E;  
13 5Q), nutritive tissue (Fig. 2E; 5R), and abaxial outer cortical parenchyma (Fig. 2E; 5S).  
14 LM6 antibody labels more intensely the cell junctions of the abaxial outer cortex (Fig.  
15 5S). Weak labeling is observed in the cell walls of the abaxial epidermis by the LM6  
16 antibody (Fig. 2E; 5T).

17 The epitopes for low methyl-esterified HGAs are moderately labeled by the  
18 JIM5 antibody in the cell walls of the adaxial epidermis and of the adaxial outer cortical  
19 parenchyma of the MG (Fig. 3A; 6A). A weak labeling is observed in the cell walls of  
20 the nutritive tissue (Fig. 3A; 6B), while in the abaxial outer cortical parenchyma and  
21 abaxial epidermis, a moderate labeling occurs (Fig. 3A; 6C). The epitopes for low  
22 methyl-esterified HGAs are intensely labeled by the JIM5 antibody in the outer  
23 periclinal walls of the abaxial epidermis (Fig. 6C). The high methyl-esterified HGAs are  
24 moderately labeled by the JIM7 antibody in the cell walls of the adaxial outer cortical  
25 parenchyma (Fig. 3A; 6D), nutritive tissue (Fig. 3A; 6E), abaxial outer cortical  
26 parenchyma cells (Fig. 3A; 6F), and phloem (Fig. 3A; 6G), while weakly labeling  
27 occurs in the cell walls of the xylem (Fig. 3A; 6G). The arabinans are weakly labeled by  
28 the LM6 antibody in the cell walls of the adaxial outer cortical parenchyma (Fig. 3A,  
29 6H), and nutritive tissue (Fig. 3A; 6I). The AGPs are weakly detected by the LM2  
30 antibody in the cell walls of the adaxial outer cortical parenchyma (Fig. 3A; 6J). The  
31 LM5 antibody weakly labels the epitopes of galactans in the cell walls of the nutritive  
32 tissue (Fig. 3A; 6K), and of the abaxial outer cortical parenchyma (Fig. 3A).

33 In SG, the low methyl-esterified HGAs are weakly labeled by the JIM5 antibody  
34 in the cell walls of the nutritive tissue (Fig. 3B; 6L), while on the adaxial and abaxial

1 outer cortices, and in the outer periclinal walls of the epidermis, the labeling is intense  
2 (Fig. 3B; 6M-N). The high methyl-esterified HGAs are weakly labeled in the cell walls  
3 of the adaxial epidermis, adaxial outer cortical parenchyma (Fig. 3B; 6O-P), nutritive  
4 tissue (Fig. 3B; 6Q), and phloem (Fig. 3B). These epitopes are moderately labeling in  
5 the external periclinal walls of the adaxial epidermis (Fig. 6O). In the adaxial outer  
6 cortical parenchyma, the LM5 antibody weakly labels the epitopes of galactans (Fig.  
7 3B; 6R), while at the junctions of these cells moderate labeling occurs (Fig. 6R). In the  
8 cell walls of the abaxial epidermis, the galactans are moderately labeled (Fig. 3B; 6S),  
9 and intense labeling occurs in the cell walls of the abaxial outer cortical parenchyma  
10 (Fig. 3B; 6S-T). In the lignified cells that surround the nutritive tissue, the extensins are  
11 weakly labeled by the LM1 antibody (Fig. 3B).

12

## 13 **Discussion**

### 14 ***Maintenance of flexibility from young to mature tissues***

15 During gall formation, cell redifferentiation (*sensu* Lev Yadun 2003) leads to the  
16 development of new tissues with different functionalities (Oliveira *et al.* 2010). The  
17 redirection of cell functions requires alterations in the pectin and protein composition of  
18 the cell walls, which influences their extensibility, adhesion, porosity and stiffness, as  
19 observed in recent studies on Neotropical galls (Formiga *et al.* 2013; Carneiro *et al.*  
20 2014; Oliveira *et al.* 2014).

21 In the cell walls of the leaflet primordia (LP), young leaflet (YL), and young gall  
22 (YG) of *L. cultratus*, the HGAs are detected in their high degree of methyl-  
23 esterification, ensuring youth and flexibility to the cell walls (Knox *et al.* 1990). The  
24 maintenance of the extensibility of the cell walls in YG allows that the stretching, cell  
25 redifferentiation, and cell divisions occur. Furthermore, the lower rigidity of the cell  
26 walls next to the larval chamber, conferred by these high methyl-esterified HGAs (Knox  
27 *et al.* 1990), may facilitate the crashing of the nutritive cells by the larva of the  
28 Cecidomyiidae (Dreger-Jauffret and Shorthouse 1992). This structural peculiarity of the  
29 nutritive cells is related to the nutritional hypothesis proposed by Price *et al.* (1987),  
30 whose premise is that the gall-inducing insects is able to manipulate the host plant  
31 tissues for obtaining their food.

32 The maintenance of the extensibility of the cell walls of the LP, YL and YG is  
33 also guaranteed by the AGPs, which allows the redifferentiating cells to expand (Willats  
34 *et al.* 2001). The detection of the AGPs in the initial and intermediate developmental

1 stages of the leaflets and of the galls reinforces the involvement of these wall  
2 components in cell elongation and proliferation, and in the avoidance of the  
3 programmed cell death (PCD) (Mastroberti and Mariath 2008). Along with the  
4 arrangement of the cellulose microfibrils, the AGPs take part in directing cell growth,  
5 which influences their final shape (Cassab 1998; Magalhães *et al.* 2014).

6 The most expressive labeling of arabinans by the LM6 antibody, when compared  
7 to that of galactans by the LM5 antibody, demonstrates that the control of cell turgor  
8 and the maintaining of the state of hydration of the cell walls are maintained in LP, and  
9 YG (Moore *et al.* 2008). During gall development, the maintenance of the flexibility of  
10 the cell walls of the outer cortical parenchyma, guaranteed by the presence of the  
11 arabinan epitopes, is essential for cell elongation to occur without cell disruption (Jones  
12 *et al.* 1997; Formiga *et al.* 2013). The arabinans and the galactans may be present in the  
13 cell walls as independent or associated polysaccharides (O'Donoghue and Sutherland  
14 2012). During the developmental stages of the leaflets and galls on *L. cultratus*, these  
15 polysaccharides are observed in different tissues, similarly to the three gall morphotypes  
16 on *B. reticularia* (Formiga *et al.* 2013). In the LP, the arabinans are associated with the  
17 galactans in the ground meristem, collenchyma and procambial cells. In the nutritive  
18 cells of the YG and MG the arabinans are associated with the galactans, ensuring  
19 porosity to the cell walls (Zykwinska *et al.* 2005). Also, these results corroborate that  
20 the pectin composition of the nutritive cells of Cecidomyiidae galls ensures a greater  
21 flow of nutritive macromolecules to the gall-inducing insects, as proposed by Oliveira *et*  
22 *al.* (2010).

### 23 ***Acquisition of stiffness from mature to senescent tissues***

24 The most significant detection of the low methyl-esterified HGAs in the tissues  
25 of the ML and SG indicates the maturity of their cells, since the HGAs are synthesized  
26 in the high methyl-esterified form, and are subsequently de-methyl-esterified by the  
27 action of the pectin-methyl-esterases (PMEs) (Lord and Mollet 2002). The PMEs  
28 expose the carboxyl groups linked to the calcium ions, forming pectic gels, responsible  
29 for the stiffening of cell wall (Pelloux *et al.* 2007). The process of de-methyl-  
30 esterification can be either linear or randomic. In the first case, all cell walls are  
31 degraded by the action of endopolygalacturonases (Micheli 2001; Oliveira *et al.* 2014).  
32 In the linear de-methyl-esterification, the galacturonic acid residues interact with  
33 calcium ions, stiffening the cell walls (Knox *et al.* 1990; Oliveira *et al.* 2014). As

1 observed by Oliveira *et al.* (2014) on galls of *B. dracunculifolia*, in SG on *L. cultratus*,  
2 the randomic de-methyl-esterification does not occur, since cell lysis is not observed.

3 The AGPs and the arabinans are not detected in the tissues of the SG, and  
4 consequently, cell wall loose adhesion (Zykwinska *et al.* 2005; O'Donoghue and  
5 Sutherland 2012), which should facilitate the digging of the escape channel by the  
6 galling Cecidomyiidae. The weak labeling of the high methyl-esterified HGAs in ML  
7 and SG demonstrates the limited flexibility of the cell walls. From mature to senescent  
8 cell walls are rigid and their functions are well established (Knox *et al.* 1990). These  
9 characteristics together with the absence of the epitopes of AGPs in detectable  
10 quantities in the SG indicate the end of cell expansion at this final developmental stage  
11 on *L.cultratus* galls. Bao *et al.* (1992) detected extensins in the secondary walls of pine  
12 wood (*Pinus taeda*). In *L. cultratus*, the strengthening conferred by the extensins is  
13 restricted to secondary cell walls.

14 In *L. cultratus* galls, the intensity and location of pectins and proteins vary both  
15 temporally and spatially, proving the influence of these compounds in the new  
16 functional design assumed by the cells of the gall. The highest diversity of epitopes  
17 detected in the cell walls of the YG when compared to the ML, sustained the  
18 assumption that galls exhibit characteristics of a new plant organ (Shorthouse *et al.*  
19 2005, Raman 2007).

## 21 **Final considerations**

22 Current study demonstrates that in the initial and intermediate developmental  
23 stages of the leaflets and of the galls (LP, YL, YG and MG), pectin and protein  
24 composition of the cell walls guarantees elasticity and porosity, allowing cell  
25 redifferentiation, and elongation. In the final stages of the development of leaflets and  
26 galls (ML, SG), the pectin composition guarantees stiffness. The YG induced in ML  
27 exhibit greater diversity of pectins and proteins when compared to the host organ, which  
28 reinforces the new functional design of the gall. The greatest diversity of compounds  
29 was detected in the cell walls of the nutritive tissue, demonstrating its uniqueness on the  
30 gall neo-ontogenetic basis. The high diversity of the cell wall compounds is similar  
31 between the initial stages of the leaflet and gall development, and a decrease of diversity  
32 occurs when both organs mature. As far as we are concernec, current observations  
33 demonstrate for the first time that beyond the stimuli generated by Cecidomyiidae, the

1 age of the host organs directly influences the dynamics of the pectins and proteins in the  
2 cell walls, and corroborate their relation with the distinct functions of plant tissues.

3

#### 4 **Acknowledgments**

5 The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
6 Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
7 (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for  
8 scholarships and financial support, and the Centro de Aquisição e Produção de Imagens  
9 (CAPI) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) for support in Confocal  
10 Analyses.

11

#### 12 **References**

- 13 Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A. 2010. Plant cell walls:  
14 from chemistry to biology. *Garland Science*. Taylor and Francis Group, New York.
- 15 Bao W, O'Malley DM, and Sederoff RR. 1992. Wood contains a cell-wall structural  
16 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **89**(14): 6604-6608.
- 17 Brett C, Waldron K. 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls. 2 ed.  
18 Chapman & Hall. UK.
- 19 Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*.  
20 **61**: 255.
- 21 Carneiro RG, Oliveira DC, and Isaias RM. 2014. Developmental anatomy and  
22 immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium*  
23 *myrtoides* (Myrtaceae) towards the globoid galls of *Nothotrioza myrtoidis*  
24 (Triozidae). *Plant Cell Reports*. pp. 1-14.
- 25 Cassab GI. 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and*  
26 *Plant Molecular Biology*. **49**: 281-309.
- 27 Clausen MH, Ralet MC, Willats WGT, McCartney L, Marcus SE, Thibault JF, Knox  
28 JP. 2004. A monoclonal antibody to feruloylated-(1→4)-β-D-galactan. *Planta*. **219**:  
29 1036-1041.
- 30 Dreger-Jauffret F, Shorthouse JD. 1992. Diversity of gall-inducing insects and their  
31 galls. *In* Biology of Insect-Induced Galls. *Edited by* Shorthouse JD, Rohfritsch O.  
32 Oxford University, Oxford. pp. 8-33.

- 1 Formiga AT, Oliveira DC, Ferreira BG, Magalhães TA, Castro AC, Fernandes GW,  
2 Isaias RMS. 2013. The role of pectic composition of cell walls in the determination  
3 of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia*  
4 (Asteraceae). *Protoplasma*. **250**(4): 899-908.
- 5 Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- 6 Jones L, Seymour GB, Knox, J.P. 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell  
7 walls using a monoclonal antibody specific to (1-4)-[beta]-D-galactan. *Plant*  
8 *Physiology*. **113**(4): 1405-1412.
- 9 Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for  
10 use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. **27**: 137-138.
- 11 Knox JP, Linstead PJ, King J, Cooper C, Roberts K. 1990. Pectin esterification is  
12 spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root  
13 apices. *Planta*. **181**: 512-521.
- 14 Kraus JE, Arduin M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora  
15 da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- 16 Lev-Yadun S. 2003. Stem cells plants are differentiated too. *Current Topics in Plant*  
17 *Biology*. **4**: 93-100.
- 18 Lord EM, Mollet JC. 2002. Plant cell adhesion: a bioassay facilitates discovery of the  
19 first pectin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of*  
20 *Sciences*. **99**(25): 15843-15845.
- 21 Magalhães TA, Oliveira DC, Suzuki AYM, Isaias RMS. 2014. Patterns of cell  
22 elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma*  
23 *dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae).  
24 *Protoplasma*. **251**: 747-753. doi: 10.1007/s00709-013 0574-z.
- 25 Mani MS. 1964. Ecology of plant galls. Dr. Junk Publishers, The Hague.
- 26 Mastroberti AA, Mariath JEA. 2008. Developmental of mucilage cells of *Araucaria*  
27 *angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma*. **232**: 233-245.
- 28 Micheli F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant  
29 physiology. *Trends Plant Science*. **6**: 414-419.
- 30 Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant*  
31 *Biology*. **11**(3): 266-277.
- 32 Moore JP, Farrant JM, Driouich A. 2008. A role for pectin-associated arabinans in  
33 maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit  
34 stress. *Plant Signaling and Behavior*. **3**(2): 102-104.

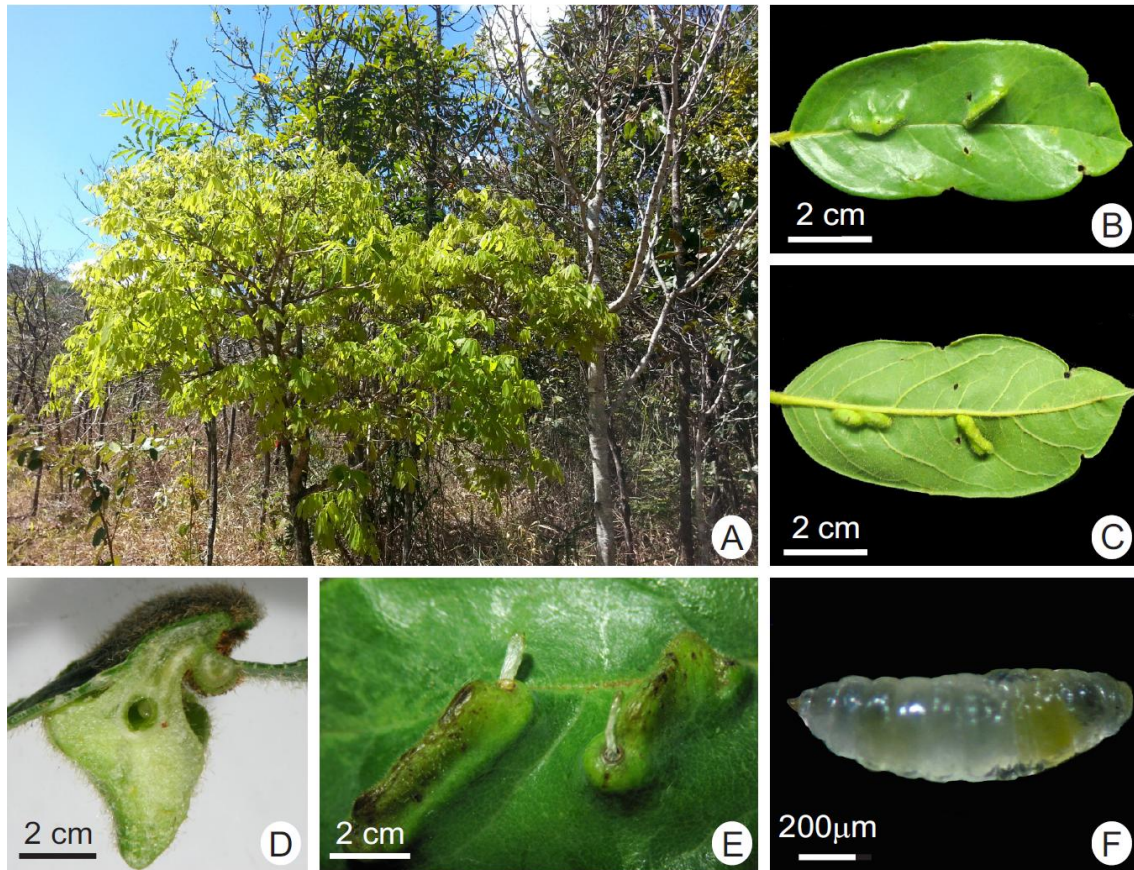
- 1 O'Donoghue EM, Sutherland PW. 2012. Cell wall polysaccharide distribution in  
2 *Sandersonia aurantiaca* flowers using immunedetection. *Protoplasma*. **249**(3): 843-  
3 849.
- 4 O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill, G. 2004. Rhamnogalacturonans II:  
5 structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide.  
6 *Annual Review of Plant Biology*. **55**: 109-139.
- 7 Oliveira DC, Magalhães TA, Carneiro RGS, Alvim MN, Isaias RMS. 2010. Do  
8 Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-  
9 established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma*. **242**: 81-93.
- 10 Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira, CT, Formiga AT, Fernandes GW,  
11 Isaias RMS. 2014. Variation in the Degree of Pectin Methylesterification during the  
12 Development of *Baccharis dracunculifolia* Kidney-Shaped Gall. *PloS one*. **9**(4): 1-8
- 13 Paiva JGA, Frank-de-Carvalho S, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro. 2006. Verniz vitral  
14 incolor 500<sup>®</sup>: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta*  
15 *Botania Brasiliaca*. **20**(2): 257-264.
- 16 Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz, EJ. 2007. New insights into pectin methylesterase  
17 structure and function. *Trends in Plant Science*. **12**(6): 267-277.
- 18 Price PW, Fernandes GW, Waring GL 1987. Adaptive nature of insect galls.  
19 *Environmental Entomology*. **16**: 15-24.
- 20 Raman, A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Curr. Sci*.  
21 **92**: 748-757. Ridley B, O'Neil MA, Mohnen D. 2001. Pectins: structure,  
22 biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. **57**: 929-967.
- 23 Rose JC. 2003. The plant cell wall. Blackwell Publishing, Garsington Road, Oxford.
- 24 Rumyantseva NI. 2005. Arabinogalactan proteins: Involvement in plant growth and  
25 morphogenesis. *Biochemistry*. **70**: 1073-1085.
- 26 Shorthouse, J.D., Wool, D., Raman, A. 2005. Gall-inducing insects–Nature's most  
27 sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology*. **6**(5): 407-411.
- 28 Showalter AM. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*.  
29 **5**(1): 9.
- 30 Smallwood M, Yates EA, Willats WG, Martin H, Knox JP. 1996. Immunochemical  
31 comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice  
32 and carrot. *Planta*. **198**(3): 452-459.



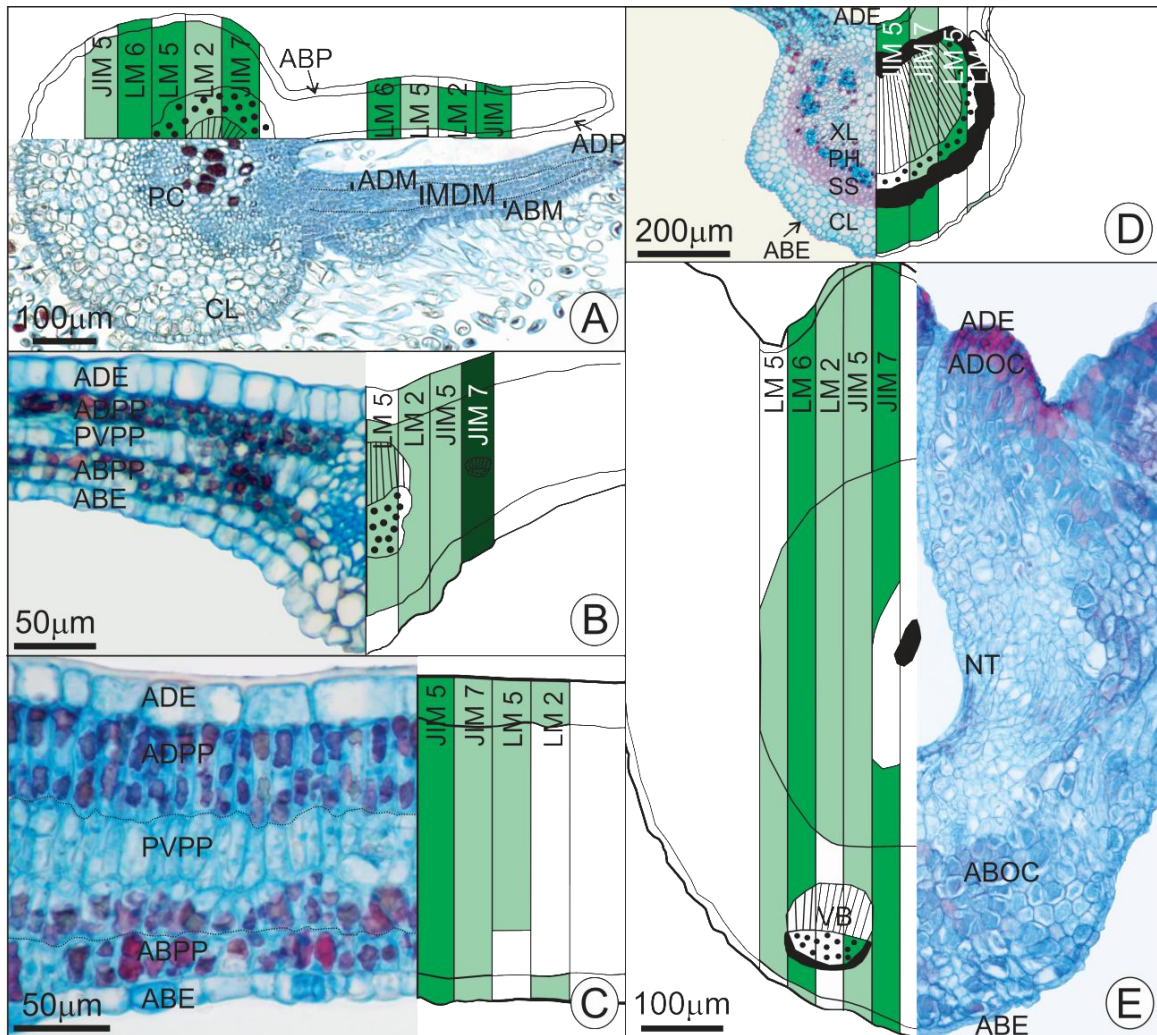
- 1 Willats W, Knox JP. 1996. Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Analytical*  
2 *Biochemistry*. **268**: 143-146.
- 3 Willats WG, Marcus SE, and Knox JP. 1998. Generation of a monoclonal antibody  
4 specific to (1→5)  $\alpha$ -L-arabinanos. *Carbohydrate Research*. **308**(1): 149-152.
- 5 Willats WGT, Mc cartney L, Mackie L, Knox P. 2001. Pectin: cell biology and  
6 prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. **47**: 9-27.
- 7 Zykwinska AW, Ralet MCJ, Garnier CD, Thibault JFJ. 2005. Evidence for in vitro  
8 binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology*. **139**(1): 397-407.

**Table 1. Description of the monoclonal antibodies used for the labelling of the epitopes in the cell walls**

<b>Monoclonal antibodies</b>	<b>Epitopes</b>	<b>References</b>
JIM 5	HGA methyl-esterified (until 50%)	Knox <i>et al.</i> (1990), Clausen <i>et al.</i> (2004).
JIM 7	HGA methyl-esterified (35%-90%)	Knox <i>et al.</i> (1990), Clausen <i>et al.</i> (2004).
LM 1	Extensins	Clausen <i>et al.</i> (2004).
LM 2	Arabinogalactan-proteins (AGPs)	Smallwood <i>et al.</i> (1996).
LM 5	(1→4) $\beta$ -D-galactan	Jones <i>et al.</i> (1997).
LM 6	(1 → 5) $\alpha$ -L-arabinans	Willats <i>et al.</i> (1998).

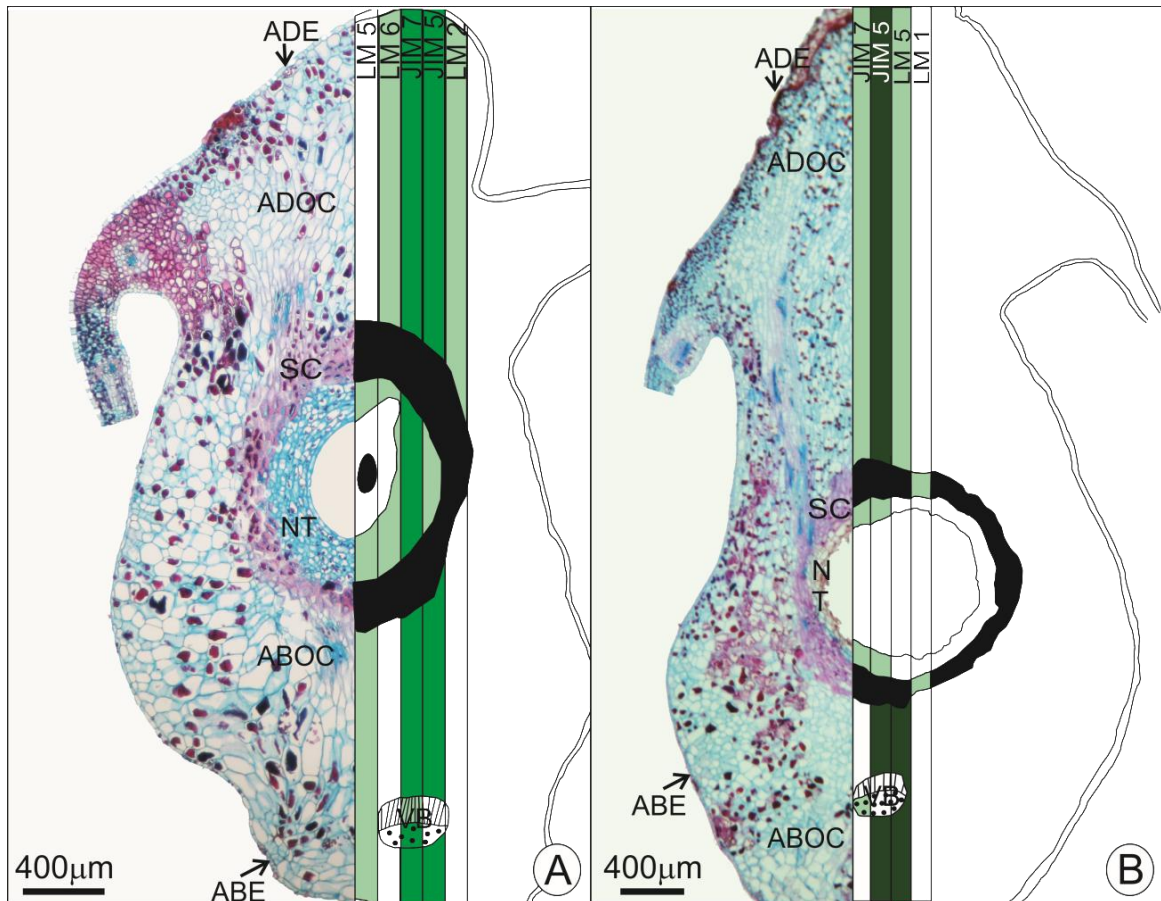


**Fig. 1. General aspects of the leaflets and galls on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae).** **A.** Arboreal-shrub species with young leaflets. **B-D.** Mature galls (MG). **B.** Adaxial surface. **C.** Abaxial surface. **D.** Gall in hemi-section. **E.** Senescent galls(SG) with the exuviae on the gall opening. **F.** Larva of the galling Diptera: Cecidomyiidae.

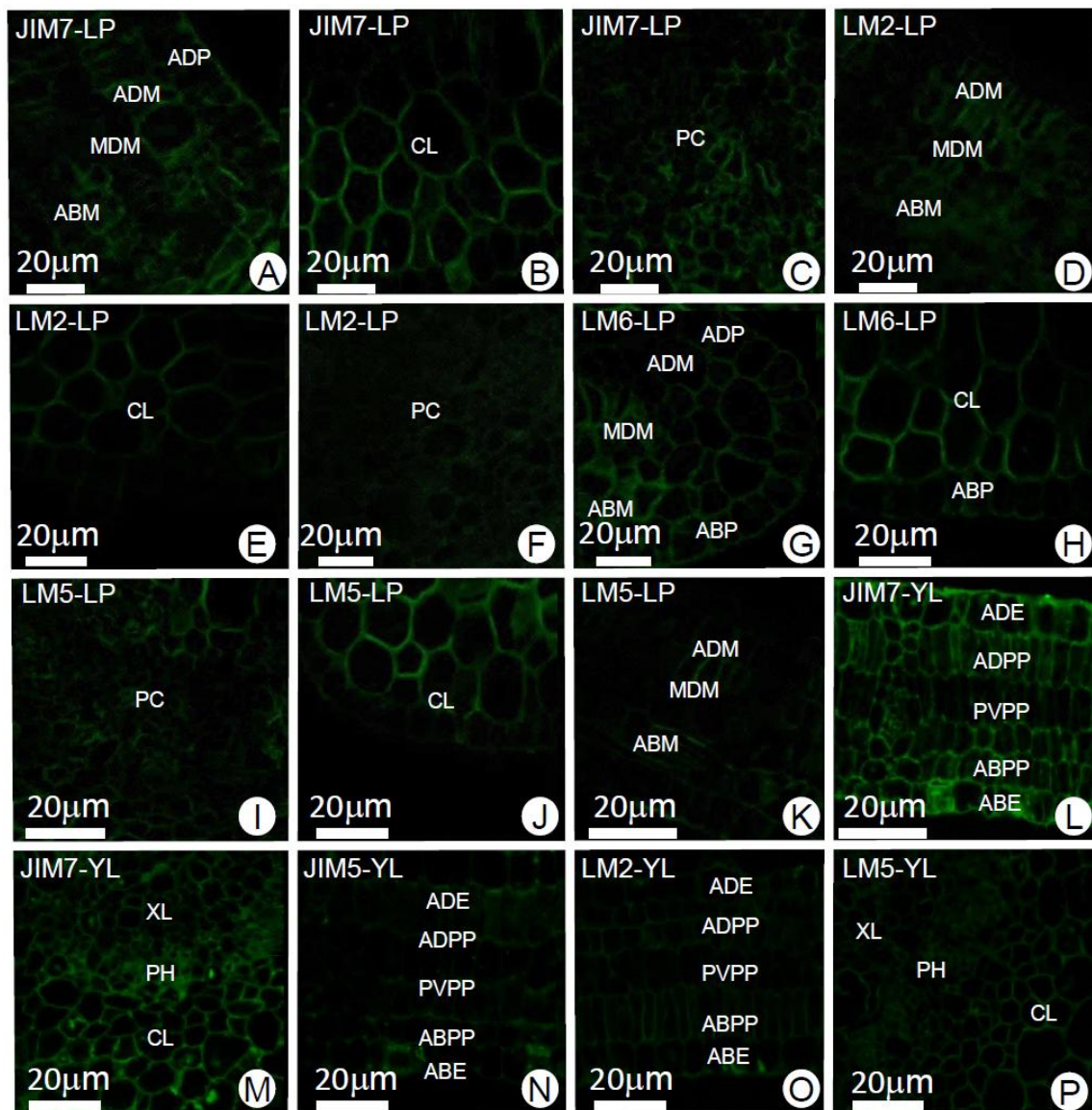


**Fig. 2. Distribution of pectins and proteins in the cell walls of the leaflet primordia (LP), young leaflets (YL), mature leaflets (ML), and young galls (YG) on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). A. LP. B. YL. C-D. ML. C. Mesophyll. D. Midrib. E. Young gall (YG). ADP: Adaxial protoderm. ADM: Adaxial meristem. MDM: Median meristem. ABM: Abaxial meristem. ABP: Abaxial protoderm. PC: Procambium. ADE: Adaxial epidermis. ADPP: Adaxial palisade parenchyma. PVPP: Paravenal palisade parenchyma. ABPP: Abaxial palisade parenchyma. ABE: Abaxial epidermis. ADOC: Adaxial outer cortex. NT: Nutritive tissue. SS: Sclerenchymatic sheat. ABOC: Abaxial outer cortex. VB: Vascular bundle. XL: Xylem. PH: Phloem. CL: Collenchyma. **Antibodies and their relative epitopes: LM2:**Arabinogalactan-proteins (AGPs). **LM5:** Galactans. **LM6:** Arabinans. **JIM5:** Low methyl-esterified homogalacturonans (HGAs). **JIM7:** High methyl-esterified HGAs. ■ Strong labeling. ■ Moderate labeling. ■ Weak labeling. ▨ Phloem. ▨ Xylem.**

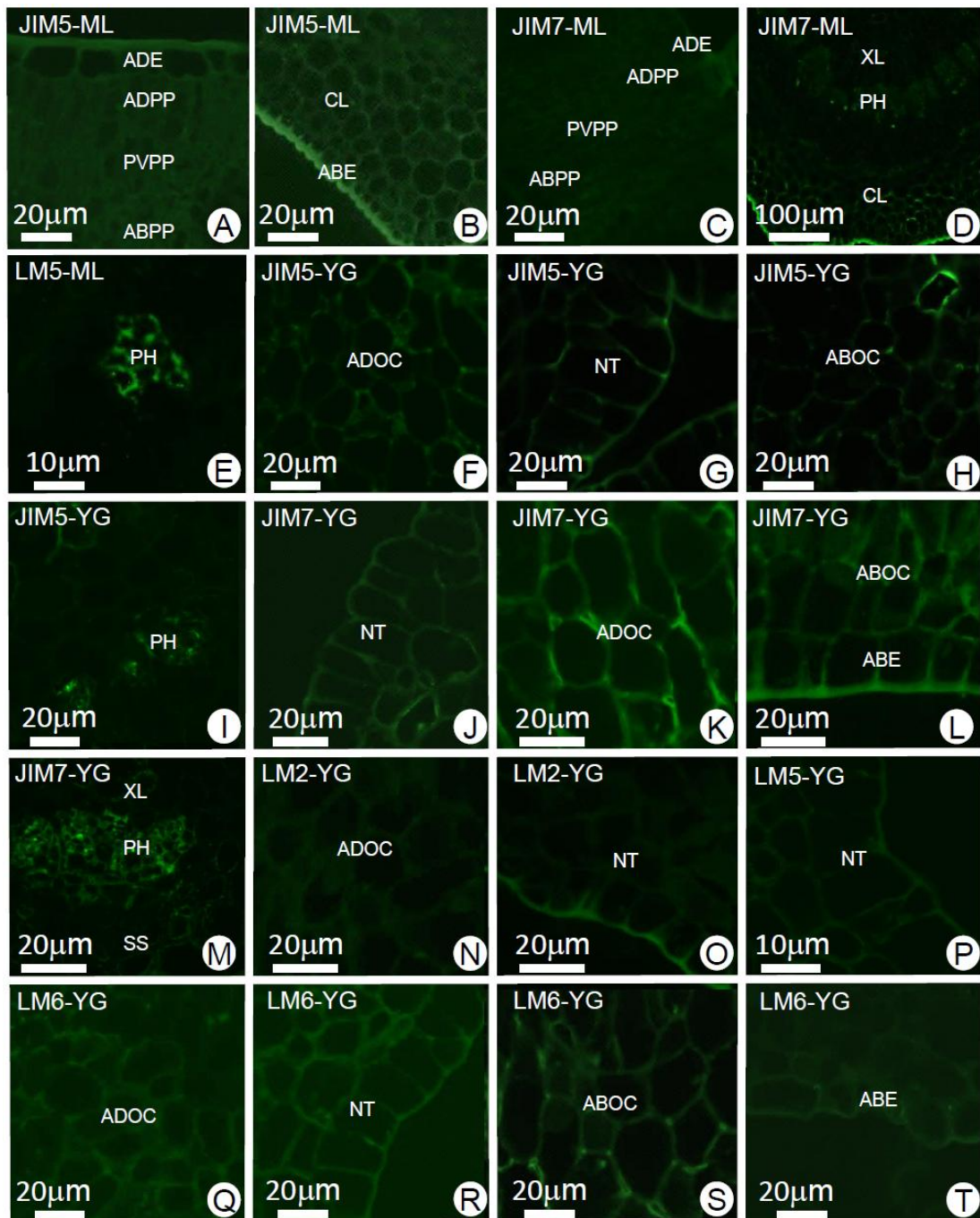




**Fig. 3. Distribution of pectins and proteins in the cell walls of mature (MG) and senescent galls (SG) on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). A. MG. B. SG. ADE:** Adaxial epidermis. **ADOC:** Adaxial outer cortex. **NT:** Nutritive tissue. **SC:** Sclereids. **ABOC:** Abaxial outer cortex. **ABE:** Abaxial epidermis. **VB:** Vascular bundle. **Antibodies and their relative epitopes: LM1:** Extensins, **LM2:** Arabinogalactan-proteins (AGPs). **LM5:** Galactans. **LM6:** Arabinans. **JIM5:** Low methyl-esterified homogalacturonans (HGAs). **JIM7:** High methyl-esterified HGAs. ■ High labeling. ■ Moderate labeling. ■ Weak labeling. ▨ Phloem. ▨ Xylem.

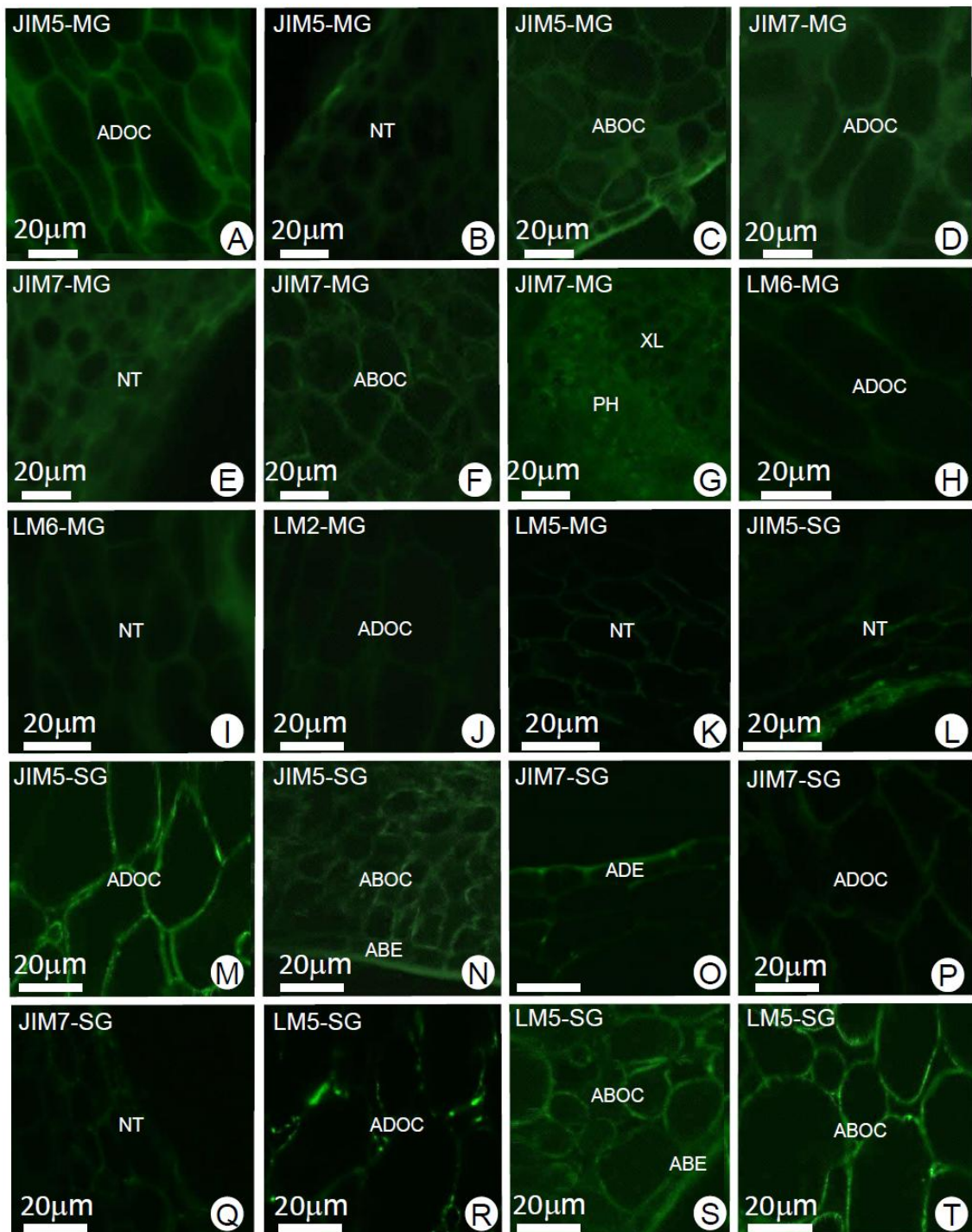


**Fig. 4. Immunocytochemistry of pectins and proteins in the cell walls of leaflet primordia (LP) and young leaflets (YL) on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). A-K. LP. L-P. YL. A-C. High methyl-esterified homogalacturonans (HGAs). D-F. Arabinogalactan-proteins (AGPs). G-H. Arabinans. I-K. Galactans. L-M. High methyl-esterified homogalacturonans (HGAs). N. Low methyl-esterified homogalacturonans (HGAs). O. Arabinogalactan-proteins (AGPs). P. Galactans. ADP: Adaxial protoderm. ADM: Adaxial meristem. MDM: Median meristem. ABM: Abaxial meristem. ABP: Abaxial protoderm. PC: Procambium. ADE: Adaxial epidermis. ADPP: Adaxial palisade parenchyma. PVPP: Paravenal palisade parenchyma. ABPP: Abaxial palisade parenchyma. ABE: Abaxial epidermis. XL: Xylem. PH: Phloem. CL: Collenchyma.**



**Fig. 5. Immunocytochemistry of pectins and proteins in the cell walls of mature leaflets (ML) and young galls (YG) on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). A-E. ML. F-T. YG. A-B. Low methyl-esterified homogalacturonans (HGAs). C-D. High methyl-esterified HGAs. E. Galactans. F-I. Low methyl-esterified HGAs. J-M. High methyl-esterified HGAs. N-O. Arabinogalactan-proteins (AGPs). P. Galactans. Q-T. Arabinans. ADE: Adaxial epidermis. ADPP: Adaxial palisade parenchyma. PVPP: Paravenal palisade parenchyma. ABPP: Abaxial palisade parenchyma. ABE: Abaxial epidermis. ADOC: Adaxial outer cortex. NT: Nutritive tissue. SS: Sclerenchymatic sheath. ABOC: Abaxial outer cortex. XL: Xylem. PH: Phloem. CL: Collenchyma.**





**Fig. 6. Immunocytochemistry of pectins and proteins in the cell walls of mature (MG) and senescent galls (SG) on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). A-K. MG. L-T. SG. A-C. Low methyl-esterified homogalacturonans (HGAs). D-G. High methyl-esterified HGAs. H-I. Arabinans. J. Arabinogalactan-proteins (AGPs). K. Galactans. L-N. Low methyl-esterified HGAs. O-Q. High methyl-esterified HGAs. R-T. Galactans. ADE: Adaxial epidermis. ABE: Abaxial epidermis. ADOC: Adaxial outer cortex. NT: Nutritive tissue. ABOC: Abaxial outer cortex. XL: Xylem. PH: Phloem.**

## **Considerações finais**

O estudo das galhas fusiformes em *Lonchocarpus cultratus* permitiu avaliar os impactos estruturais e metabólicos induzidos pelo Cecidomyiidae galhador no órgão hospedeiro. Ao ser comparado a outros modelos previamente estudados, a presente dissertação revelou a existência de características relevantes dentro da perspectiva de estudo em galhas da região Neotropical.

O design estrutural e funcional das galhas de *L. cultratus* corrobora o padrão proposto para galhas de Cecidomyiidae, contudo, as análises de imunocitoquímica de parede no presente modelo de estudo demonstram, pela primeira vez, que além do impacto ocasionado pelo galhador, à idade do órgão hospedeiro influência diretamente a dinâmica péctica e proteica nas paredes celulares.

A compartimentalização de metabólitos primários, como as proteínas, detectadas nas células nutritivas e de metabólitos secundários, como os terpenoides, neo-sintetizados nas células do córtex externo foram relacionadas à dieta do galhador e a proteção química. Adicionalmente, uma nova interpretação sobre a funcionalidade do AIA e das espécies reativas de oxigênio foi proposta, pela co-ocorrência destes compostos nos sítios de alongamento celular. Tal co-ocorrência pode permitir a acidificação das paredes celulares, e a reorientação das microfibrilas de celulose, que influenciaram o sentido de expansão celular crucial para o desenvolvimento das expansões adaxial e abaxial da galha.

Como perspectivas futuras, o estudo do metabolismo de açúcares, via detecção de atividades de diferentes enzimas nos tecidos da galha poderá elucidar se as proteínas são de fato o único recurso nutricional direcionado a alimentação do galhador, ou se há disponibilização de carboidratos no tecido nutritivo das galhas de *L. cultratus*. É provável que sejam evidenciados sítios de atividade distintos, para enzimas mediadoras de carboidratos e de proteínas. Deste modo, a análise da atividade da protease poderá elucidar características importantes da dieta do galhador associado a *L. cultratus*, um Cecidomyiidae, tido como utilizador de carboidratos em sua dieta.

## **Lista de abreviaturas**

### ***Português***

**AGPs:** Arabinogalactano-proteínas

**AIA:** Àcido-Indol-3-Àcético



**AM:** Amido

**ANOVA:** Análise de Variância

**BE:** Bainha Esclerenquimática

**CEAB:** Córtex Externo Abaxial

**CEAD:** Córtex Externo Adaxial

**DMACA:** *p*-dimetilaminocinamaldeído

**EAB:** Epiderme Abaxial

**EABF:** Epiderme Abaxial do Folíolo

**EABG:** Epiderme Abaxial da Galha

**EAD:** Epiderme Adaxial

**EADG:** Epiderme Adaxial da Galha

**EC:** Esclereides

**EEUFMG:** Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio

**FAA:** Formaldeído Àcido Acético glacial

**FDH:** Formato Desidrogenase

**FE:** Fenóis

**FJ:** Folíolo Jovem

**FM:** Folíolo Maduro

**FNG:** Folíolo Não Galhado

**FV:** Feixe Vascular

**GJ:** Galha Jovem

**GM:** Galha Madura

**GS:** Galha Senescente

**HGAs:** Homogalacturonanos

**LM:** Lomassomas

**MA:** Meristema Apical

**MAB:** Meristema Abaxial

**MAD:** Meristema Adaxial

**MCP:** Morte Celular Programada  
**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura  
**MF:** Meristema Fundamental  
**MMD:** Meristema Mediano  
**NADI:**  $\alpha$ -naftol e dimetil-*p*- fenilenodiamina  
**PC:** Parede Celular  
**PC:** Procâmbio  
**PD:** Protoderme  
**PESV:** Parque Estadual Serra Verde  
**PF:** Primórdio Foliolar  
**PMEs:** Pectina Metil-Esterases  
**PPAB:** Parênquima Paliçádico Abaxial  
**PPAD:** Parênquima Paliçádico Adaxial  
**PPPV:** Parênquima Paliçádico Paravenal  
**RG:** Ramnogalacturonanos  
**TN:** Tecido Nutritivo  
**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais  
**XGAs:** Xilogalacturonanos  
**ZC:** Zona Central  
**ZN:** Zona de Nervura  
**ZP:** Zona Periférica

***Inglês***

**ABE:** Abaxial Epidermis  
**ABM:** Abaxial Meristem  
**ABOC:** Abaxial Outer Cortex  
**ABP:** Abaxial Parenchyma  
**ABP:** Abaxial Protoderm  
**ABPP:** Abaxial Palisade Parenchyma

**ADE:** Adaxial Epidermis  
**ADM:** Adaxial Meristem  
**ADOC:** Adaxial Outer C6rtez  
**ADP:** Adaxial Parenchyma/Adaxial protoderm  
**ADPP:** Adaxial Palisade Parenchyma  
**AGPs:** Arabinogalactan-proteins  
**ANOVA:** Analysis of Variance  
**DAB:** Diaminobenzidine  
**DMACA:** Dimethylaminocinnamaldehyde  
**FV:** Flavonoids  
**HGAs:** Homogalacturonans  
**IAA:** Indole-3-Acetic Acid  
**LC:** Larval Chamber  
**LP:** Leaflet Primordia  
**MAbs:** Monoclonal Antibodies  
**MDM:** Median Meristem  
**MG:** Mature Galls  
**ML:** Mature Leaflets  
**MP:** Mesophyll  
**NGL:** Non-Galled Leaflets  
**NT:** Nutritive Tissue  
**P:** Phloem  
**PBS:** Phosphate Buffer  
**PC:** Procambium  
**PCD:** Programmed Cell Death  
**PH:** Phloem  
**PMEs:** Pectin Methyl-Esterases  
**PPH:** (Poly)phenols  
**PVPP:** Paravenal Palisade Parenchyma

**RG:** Rhamnogalacturonans

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**SC:** Sclereids

**SG:** Senescent Galls

**SS:** Sclerenchymatic Sheath

**VB:** Vascular Bundle

**X:** Xylem

**YG:** Young Galls

**YL:** Young Leaflets