



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



Renê Gonçalves da Silva Carneiro

**Biologia e desenvolvimento de galhas de
Neotrioza cf. tavaresi Crawf.
(Hemiptera: Psylloidea) na superhospedeira
Psidium myrsinoides O. Berg (Myrtaceae)**

Orientadora: Prof. Dr^a Rosy Mary dos Santos Isaias

Belo Horizonte – Minas Gerais
2011

Renê Gonçalves da Silva Carneiro

**Biologia e desenvolvimento de galhas de
Neotrioza cf. tavaresi Crawf. (Hemiptera: Psylloidea)
na superhospedeira *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae)**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosy Mary dos Santos Isaias

Carneiro, Renê Gonçalves da Silva.

Biologia e desenvolvimento de galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawford (Hemiptera: Psylloidea) na superhospedeira *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). [manuscrito] / Renê Gonçalves da Silva Carneiro. – 2011.

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

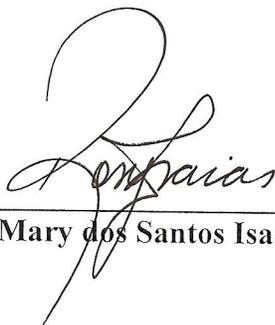
Orientadora: Rosy Mary dos Santos Isaias.

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

1. Galhas (Botânica) - Teses. 2. Anatomia vegetal - Teses. 3. Botânica – Teses. 4. Insetos galhadores – Teses. 5. Relação inseto-Planta – Teses. 6. Ecologia vegetal – Teses. 7. Ecofisiologia vegetal – Teses. 8. Fisiologia vegetal – Teses. 9. Plantas - Histoquímica – Teses. I. Isaias, Rosy Mary dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 581

Dissertação defendida e aprovada, em 18 de fevereiro de 2011, pela banca
examinadora constituída pelos professores:



Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias - Orientadora



Dra. Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira



Dra. Maria Zabelê Dantas Moura

Índice

Dedicatória	4
Agradecimentos.....	5
Epígrafe.....	7
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Introdução geral	10
Referências bibliográficas.....	14
Capítulo 1 - O sistema <i>Psidium myrsinoides</i> O. Berg (Myrtaceae) – <i>Neotrioza cf. tavaresi</i> Crawf. (Hemiptera: Psylloidae)	18
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	21
Material e métodos	22
Resultados	24
Figuras	28
Discussão	38
Referências bibliográficas.....	44
Capítulo 2 - Ontogênese das folhas de <i>Psidium myrsinoides</i> O. Berg (Myrtaceae) e galhas induzidas por <i>Neotrioza cf. tavaresi</i> Crawf. (Hemiptera: Psylloidae)	49
Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Material e métodos	53
Resultados	55

Figuras	61
Discussão	69
Referências bibliográficas.....	75
Capítulo 3 - Padrões químicos e fisiológicos em galhas de <i>Neotrioza cf. tavaresi</i> Crawf. (Hemiptera: Psylloidea), um sugador, em <i>Psidium myrsinoides</i> O. Berg (Myrtaceae)	79
Resumo	80
Abstract	81
Introdução	82
Material e métodos	83
Resultados	86
Figuras	90
Discussão	97
Referências bibliográficas.....	102
Conclusões finais	108

Dedico este trabalho à minha família...

Agradecimentos

Sou imensamente grato a Deus pela Sua onipresença no que somos e naquilo que nos rodeia. Pela vida e pela oportunidade de desvendar os pequenos mistérios que criaste na natureza, devo agradecer a Ti.

Agradeço também pela presença fundamental da família - Pedrão, Fafá, Bruno e Pedrinho (meus alicerces) - que sempre foram apoio, orgulho, retidão e amor.

À minha querida orientadora, Prof. Dr. Rosy Mary dos Santos Isaias, agradeço pelo conhecimento incomensurável passado a mim; pela companhia agradável durante o expediente e no “happy hour” pós-trabalho; pelos conselhos profissionais e pessoais. És um exemplo de conduta para mim!

À Anete, figura que personifica os melhores dos adjetivos possivelmente atribuídos a um ser humano, fica o meu “obrigado” especial. Minha amiga, mãe, irmã gêmea (quase siamesa), foi a responsável pela minha descoberta da Serra do Caraça como um local de trabalho. Fez com que as viagens ao campo se parecessem mais com festas do que trabalho. Sem você não teria sido tão bom!

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), agradeço pela ótima convivência, ensinamentos valiosos, gentileza ao sanar dúvidas e solucionar problemas. Especialmente aos professores Fernando Henrique Aguiar Vale, Élder Antônio Souza e Paiva e Denise Maria Trombert de Oliveira; assumidades em Anatomia vegetal e sempre prontos a ajudar.

Ao Grupo galhas (presentes ou não): Anete, Dênis, Graciela, Thiago, Graziela, Samuel, Flávia, Ana Carolina, Martinha, Bruno, Ariane, Cibele, Cristiane pelo crescimento profissional. Em especial à Flávia e ao Dênis por terem tido a paciência de me orientar ainda quando eu não sabia o que significava fazer ciência.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal (presentes ou não): Maria Tereza, Hanashiro, Lu Seabra, Sarinha, Natália, Lulu (nena), Vinicius, Lucimara, Advânio (ADV), Tia Paty, Marcinha, Marina Neiva (agregada), Ana Sílvia, Ernesto, Esmeire, Jôsie, Marquito, Priscila, Rafael (Stress), Rafinha, Rainna, Sara, Héliida pela convivência harmoniosa e amizade.

Aos alunos no PPGBV por todos os momentos, sejam eles sérios ou de descontração, em especial à Ariane Barbosa e Priscila Tolentino, colegas desde a graduação.

Aos técnicos Wagner e Socorro pelo auxílio nas análises e pela presteza em ajudar, sempre. Também às funcionárias do departamento Sara, Sônia, Terezinha e Selminha pelos favores prestados e conversas amigáveis.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, esta mãe que acolhe a tantos filhos, oferecendo-lhes sua estrutura e excelência sem nada exigir em troca e à CAPES pelos recursos revertidos em bolsas de estudo (sem os quais talvez eu não estivesse aqui).

Por fim, a título de agradecimento geral e, na impossibilidade de encaixar um texto científico completo sobre este “experimento”, disponibilizo o resumo de um artigo que avalia o período deste mestrado:

Análise qualitativa da vida de *Homo sapiens* var. “Carneiro” durante o desenvolvimento de mestrado em curso de pós graduação *strictu sensu*

Resumo

O período de mestrado constitui etapa decisiva na vida de biólogos bacharéis e licenciados. Ao optarem por este caminho, esses profissionais ingressam efetivamente no meio acadêmico científico. Durante os dois anos de mestrado, além de desenvolver um projeto de pesquisa, o estudante tem a oportunidade de avaliar sua atividade profissional, culminando na decisão do prosseguimento ou não da vida acadêmica. No caso descrito nesta pequena nota científica, o mestrando da variedade “Carneiro” apresentou características tipicamente relacionadas a mestrandos tais como confusão na elaboração e realização de experimentos, dependência crônica de professores e colegas de profissão e lentidão na realização de trabalhos relacionados a revisão e redação de textos científicos. Foi observado, entretanto, o estabelecimento de uma intrincada rede de colaborações além da consolidação de um grupo de pesquisa. A análise da variação do aprendizado e da curiosidade científica ao longo do tempo mostrou aumento significativo. A correlação entre a satisfação na escolha profissional e a vontade de continuar na vida acadêmica foi alta, indicando para o possível surgimento de um novo pesquisador na área de Biologia Vegetal.

“Of Science and the human heart

There is no limit...”

Trecho da música “Miracle drug” da banda “U2”

Tradução: “Não existe limite para a ciência e o coração humano”

Resumo

Galhas de insetos são resultantes da interação específica entre um indutor e seu hospedeiro, na qual o parasita obtém abrigo e nutrição. O crescimento da galha é coordenado pelo indutor, que manipula os tecidos da planta em seu próprio benefício. Durante este processo, pode haver acúmulo de substâncias dos metabolismos primário e secundário da planta nos tecidos da galha, sendo este acúmulo, produto do impacto fisiológico da ação alimentar do galhador nos tecidos hospedeiros. Na galha, estas substâncias são utilizadas para nutrição e defesa do galhador, bem como para a manutenção da estrutura neoformada. Para o sistema *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) – *Neotrioza* cf. *tavaresi* (Hemiptera: Psyllidae) foi notificada a diversidade de galhas associadas a *P. myrsinoides* e a biologia de *Neotrioza* cf. *tavaresi*, com enfoque na fenologia, relações com outros níveis tróficos e características macroscópicas das galhas. Ainda, foram reportadas as alterações estruturais decorrentes da indução das galhas, além de aspectos fisiológicos e histoquímicos. *Neotrioza* cf. *tavaresi* possui cinco estádios ninfais e ciclo de vida univoltino anual, apresentando alta sincronia com a fenologia de *P. myrsinoides*. O aumento do volume da galha foi proporcional ao crescimento do inseto, que, ao longo do ano, teve taxas de parasitismo e mortalidade de 15,7% e 29,8%, respectivamente. A cor vermelha da galha pôde ser relacionada à condição não parasitada do indutor, constituindo um importante caráter macroscópico de diagnose. As folhas não galhadas apresentaram desenvolvimento comum às folhas simples. Nas galhas, a epiderme interna e externa deriva da protoderme, o córtex interno do meristema adaxial, o córtex mediano deriva do meristema mediano e o córtex externo deriva do meristema abaxial. O aumento da espessura do mesofilo por hiperplasia e hipertrofia, assim como a lignificação, aumentam a proteção do galhador contra inimigos naturais. A neoformação de feixes vasculares próximos à câmara incrementa suas opções alimentares, enquanto que as glândulas de óleo essencial na parte externa possivelmente repelem a ação de patógenos, parasitóides ou cecidófagos. A direção de alongamento celular e os padrões de divisões celulares de cada camada na galha foram essenciais na determinação da forma final da estrutura. Ainda, as galhas apresentaram baixa concentração de clorofilas, antocianinas e carotenóides indicando um comprometimento do aparato fotossintético na estrutura, fato corroborado pelo baixo teor de nitrogênio total. O alto teor de carboidratos, por sua vez, valida a afirmativa de serem as galhas drenos fortes de fotoassimilados. Foi observada a formação de um *continuum* anatômico e fisiológico entre folha e galha, na medida em que ocorre o incremento das opções nutricionais do galhador e da sua proteção contra inimigos naturais. As características relatadas para o sistema *Psidium myrsinoides* – *Neotrioza* cf. *tavaresi* trazem novas perspectivas e abordagens passíveis de serem investigadas mais profundamente sob os âmbitos ecológico, anatômico, fisiológico e químico. Muitas das características encontradas corroboram padrões já estabelecidos para desenvolvimento e fisiologia de galhas neotropicais induzidas por sugadores, enquanto outras, por serem divergentes, revelam a unicidade e especificidade da relação entre inseto galhador e sua planta hospedeira.

Palavras chave: Anatomia, Ecologia, Fisiologia, Galha, Histoquímica, *Neotrioza*, *Psidium*.

Abstract

Insect galls are the result of specific interaction between an inducer and its host-plant, in which the parasite obtains shelter and nutrition. The growth of the structure is coordinated by the gall inducer, which manipulates plant tissues for their own benefit. During this process, there may be accumulation of substances from the primary and secondary metabolism in the tissues of the gall, being this accumulation the result of the physiological impact of the feeding action of the gall inducer on the host tissues. In the gall, these substances are used for nutrition and protection of the insect as well as to maintain the newly-formed structure. To the system *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) - *Neotrioza* cf. *tavaresi* (Hemiptera: Psyllidae) the diversity of galls associated with *P. myrsinoides* and the biology *Neotrioza* cf. *tavaresi* were notified, focusing on phenology, relations with other trophic levels and macroscopic characteristics of the galls. Still, we reported the structural changes resulting from the induction of galls, besides physiological and histochemical aspects. *Neotrioza* cf. *tavaresi* has five instars and univoltine annual life cycle, with high synchrony with the phenology of *P. myrsinoides*. The increase in volume of the galls was proportional to the gall insect growth, which, throughout the year, had parasitism and mortality rates of 15.7% and 29.8% respectively. The red color of the gall could be related to the non parasitized inducer being an important character of macroscopic diagnosis. The development of non galled leaves was common to simple leaves. In gall, the epidermis is derived from the inner and outer protoderm, the inner cortex from the adaxial meristem, the cortex is derived from the median meristem and outer cortex is derived from the abaxial meristem. The increased thickness of the mesophyll due to hyperplasia and hypertrophy, together with tissue lignification, increase the protection of the galler against natural enemies. The neo formation of vascular bundles near the gall chamber increases their feeding sites, while the essential oil glands on the outside possibly repel the action of pathogens, parasitoids or cecidophagus. The direction of cell elongation and cell division patterns of each layer in the gall were essential in determining the final shape of the structure. Still, the galls showed a low concentration of chlorophylls, carotenoids and anthocyanins indicating an impairment of the photosynthetic apparatus in the structure, a fact corroborated by the low total nitrogen content. The high carbohydrate content, in turn, validates the claim of being the galls stronger sinks of photoassimilates. It was observed the formation of an anatomical and physiological *continuum* between the leaf and the gall, as the nutritional options of the insect and its protection against natural enemies progressively increase from the leaves towards the gall. The features related to the system *Psidium myrsinoides* - *Neotrioza* cf. *tavaresi* bring new perspectives and approaches that can be investigated more deeply in the ecological, anatomical, physiological and chemical areas. Many of the characteristics found corroborate standards already set for development and physiology of Neotropical galls induced by sucking-insects, while others, because they are different, show the uniqueness and specificity of the relationship between the galling insect and its host plant.

Keywords: Anatomy, Ecology, Gall, Histochemistry, *Neotrioza*, Physiology, *Psidium*.

Introdução geral

Introdução geral

As plantas são os organismos autotróficos fotossintetizantes melhor conhecidos, apresentando alta diversidade e ampla ocorrência no mundo todo. No reino Plantae, a divisão Angiospermae é atualmente a mais diversa. Somente no Brasil, é reportada a ocorrência de 217 famílias de angiospermas (Souza e Lorenzi 2005), estimando-se que exista ainda um grande número de espécies a serem descritas devido à escassez de especialistas frente à grande diversidade. Associados a esta vegetação em relações de alta especificidade, estão os insetos, que podem representar até 57% das espécies conhecidas pelo homem (Price 1997). Dentre estes, os insetos galhadores se destacam por serem os únicos capazes de induzir e manter alterações morfológicas específicas em seus hospedeiros, alterações estas essenciais para seu ciclo de vida (Araújo *et al.* 1997). Estas alterações configuram verdadeiros órgãos neoformados, as galhas.

Galhas são estruturas complexas tanto no nível tissular quanto químico (Cornell 1983) e seu desenvolvimento depende da ação de um indutor que pode pertencer a diversos grupos taxonômicos. Elas representam crescimentos provenientes da hipertrofia celular e/ou hiperplasia (Mani 1964) induzidos pela ação alimentar, fisiologia e danos mecânicos promovidos pelo indutor (Hori 1992). Os estímulos oriundos dos diferentes *taxa* de galhadores resultam na enorme diversidade morfológica, anatômica e química das galhas. Além disso, são determinantes dos graus de complexidade dessas estruturas. Independentemente da natureza do indutor da galha, as vantagens adaptativas desse tipo de associação inseto-plantas favorecem o desenvolvimento e perpetuação do inseto uma vez que este obtém nutrição, abrigo e proteção contra inimigos naturais (Price *et al.* 1987).

Insetos galhadores são sensíveis a pequenas mudanças fisiológicas, químicas e fenológicas nas plantas hospedeiras (Floate *et al.* 1996). Estes fatores são especialmente importantes para uma etapa crítica na vida de insetos galhadores: a indução das galhas. O processo de escolha do órgão hospedeiro no ato da oviposição depende de reconhecimento químico e morfológico (Kolehmainen *et al.* 1994), sendo a escolha do local correto crucial para o bom desenvolvimento do indutor. A indução

depende também da sincronia das fenofases da planta hospedeira com o ciclo de vida do inseto, característica que determina a qualidade e quantidade de recursos disponíveis para o galhador (Yukawa 2000). Por apresentar tantas peculiaridades, afirma-se que interações inseto-planta que resultam na formação de galhas são espécie-específicas (Redfern e Askew 1992), sendo a estrutura final decorrente dessa relação entendida como o fenótipo estendido do galhador (Stone e Schönrogge 2003).

Estudos anatômicos com os diferentes morfotipos de galhas encontrados na natureza, especialmente os que abordam aspectos ontogênicos (Arduin e Kraus 1995, Kraus *et al.* 1996, Souza *et al.* 2000, Moura 2008, Oliveira e Isaias 2010), evidenciam a complexidade e unicidade das respostas das plantas hospedeiras aos galhadores. De maneira geral, o processo de desenvolvimento da galha pode ser dividido em quatro estágios: indução, crescimento e desenvolvimento, maturação e senescência (Rohfritsch 1992). Respectivamente, essas fases representam processos de reconhecimento entre inseto indutor e órgão hospedeiro; de hiperplasia e hipertrofia celular que resultam num aumento de biomassa da galha; da alimentação intensa do indutor quando este se encontra em sua principal fase trófica e, por fim, da deiscência da galha que coincide com o período de maiores mudanças fisiológicas e químicas da estrutura. Observar os eventos celulares que levam a estas respostas específicas pode constituir um passo importante para a determinação das alterações nas relações de forma e função dos tecidos da galha e, conseqüentemente, do valor adaptativo da estrutura neoformada para o galhador.

Além de todas as implicações estruturais, a complexidade química constitui outro aspecto importante na investigação das alterações induzidas pelo galhador nos tecidos da planta, especialmente sob a perspectiva do acúmulo de substâncias associadas à proteção e nutrição. A localização de compostos relacionados à nutrição como lipídios e carboidratos (Bronner 1992) e aqueles associados à defesa contra herbivoria, tais como derivados fenólicos e flavonoídicos (Drummond 2005, Formiga *et al.* 2009) pode ser realizada através de testes histoquímicos (Bronner 1992). A produção de compostos secundários em galhas é objeto de uma quantidade considerável de estudos (Raman 1991, Isaias *et al.* 2000, Oliveira *et al.* 2006, Moura

2007), podendo ser relacionada às fases de desenvolvimento da planta e à variáveis ambientais. A presença desses compostos pode reduzir a digestibilidade dos tecidos, bem como, ao serem manipulados pelo galhador, protegê-lo contra o ataque de seus inimigos naturais (Abrahamson e Weis 1997). Ainda assim, a presença desses compostos não é capaz de evitar a ocorrência de parasitóides associados aos sistemas galhador-planta hospedeira, sendo possível que essas relações existam como componentes da regulação *top-down* das populações de galhadores (Cuevas-Reyes *et al.* 2007).

Uma família botânica comumente associada a uma rica fauna de galhadores é Myrtaceae. Esta família tem grande diversidade estrutural, química e de distribuição, sendo portadora de inúmeros morfotipos de galhas. Trata-se da quarta maior família de plantas no Brasil (Giulietti *et al.* 2005), compreendendo cerca de 100 gêneros e 3000 espécies de árvores e arbustos com ocorrência predominantemente tropical. Na Austrália, onde ocorre um número expressivo de gêneros endêmicos de Myrtaceae, é reportada uma alta ocorrência de Eriococcidae galhadores associados a *Eucalyptus* (Cook e Gullan 2004). Em Taiwan, as Myrtaceae constituem a segunda família hospedeira mais representativa, abrigando 13 espécies de Psyllidae galhadores (Yang *et al.* 2006). Nieves-Aldrey *et al.* (2008) ressaltam situação semelhante em um levantamento de riqueza de galhadores no Panamá, onde as Myrtaceae apresentam grande diversidade de galhas induzidas por Diptera: Cecidomyiidae. Ainda, em estudo conduzido em savanas neotropicais, as Myrtaceae figuram entre as cinco famílias de plantas mais galhadas, corroborando os padrões reportados por Gonçalves-Alvim e Fernandes (2001). Os perfis químicos de diferentes Myrtaceae ilustram bem a diversidade química de compostos nessa família. A variedade de componentes encontrados nos óleos essenciais, por exemplo, pode compreender uma mistura complexa de terpenóides, particularmente monoterpenos e sesquiterpenos, além de fenóis, óxidos, éteres, alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas aromáticas (Chen *et al.* 2007, Batish *et al.* 2008, Kennington 2008). A mistura desses compostos pode conferir ação pesticida, antimicrobiana, antioxidante e anti-herbívora ao extrato dessas

plantas, implicando no seu uso para fins comerciais e médicos (Gutiérrez *et al.* 2008, Nuengchamnong e Ingkaninan 2009).

Dentre as Myrtaceae, destacam-se plantas do gênero *Psidium*, tipicamente neotropicais e frequentes portadoras de galhas, que ocorrem desde o sul do México até Argentina, contendo aproximadamente 100 espécies (Rotman 1976, Landrum e Kawasaki 1997). *Psidium myrsinoides* O. Berg é um arbusto tipicamente encontrado no Cerrado brasileiro, ao qual diversos galhadores se associam, destacando-se *Neotrioza* cf. *tavaresi* (Hemiptera: Psylloidea) pelo maior índice de infestação. A investigação do sistema *Psidium myrsinoides* – *Neotrioza* cf. *tavaresi* permitirá elucidar estratégias adaptativas de defesa da planta hospedeira quando da manipulação dos tecidos vegetais e dos compostos químicos armazenados. Para nortear as investigações conduzidas com este sistema, foram elaboradas seguintes hipóteses:

- As fenofases da planta afetam a dinâmica populacional de galhas, regulando o ciclo de desenvolvimento do inseto galhador e da guilda associada, de modo que os ciclos de brotação e indução tendem a ser coincidentes.
- A indução da galha modifica o programa padrão de desenvolvimento foliar, além de seu perfil químico, estando essas modificações ligadas à defesa contra inimigos naturais e nutrição do galhador.
- A galha possui um aparato fotossintético deficitário em relação ao tecido sadio e um valor nutricional superior, o que corrobora a premissa de que a galha constitui um dreno forte de fotoassimilados.

Os três capítulos que constituem esta dissertação foram redigidos em formato de artigos científicos, buscando responder questões levantadas a partir das hipóteses gerais supracitadas e abordando aspectos ecológicos, anatômicos e fisiológicos da interação entre *Psidium myrsinoides* e *Neotrioza* cf. *tavaresi*.

Referências

ABRAHAMSON WG e WEIS AE (1997) Evolutionary ecology across three trophic levels: goldenrods, gallmakers and natural enemies. New Jersey: Princeton University Press.

ARAÚJO MCP, COELHO GC e MEDEIROS L (orgs.)(1997) Interações Ecológicas e Biodiversidade. Ijuí: Ed. Unijuí.

ARDUIN M e KRAUS JE (1995) Anatomia e ontogenia de galhas foliares de *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 14: 109-130.

BATISH DR, SINGH HP, KOHLI RK e KAUR S (2008) Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecology and Management 256: 2166-2174.

BRONNER R (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In Biology of insect induced galls (eds J.D. Shorthouse e Rohfritsch O.), pp, 118-140. Oxford University Press, New York.

CHEN H, SHEU M, LIN L e WU C (2007) Chemical Composition of the Leaf Essential Oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. Journal of Essential Oil Research 19: 345-347.

COOK LG e GULLAN PJ (2004) The gall-inducing habit has evolved multiple times among the eriococcid scale insects (Sternorrhyncha: Coccoidea: Eriococcidae). Biological Journal of the Linnean Society 83: 441-452.

CORNELL HV (1983) The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipidae (Hymenoptera): why and how? American Midland Naturalist 110: 225-234.

CUEVAS-REYES P, QUESADA M, HANSON P e OYAMA K (2007) Interactions among three trophic levels and diversity of parasitoids: A case of top-down processes in Mexican tropical dry forest. Environmental Entomology 36(4): 792-800.

DRUMMOND MM (2005) Galhas entomógenas em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae): Estrutura anatômica, histoquímica e sazonalidade. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.

FLOATE KD, FERNANDES GW e NILSON J (1996) Distinguishing intrapopulacional categories of plants by their insect faunas: galls on rabbitbrush. Oecologia 105: 221-229.

FORMIGA AT, GONÇALVES SJDR, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2009) Relationships between phenolic contents and a Cecidomyiidae gall cycle in *Aspidosperma spruceanum* Müell. Arg. (Apocynaceae). Acta Botanica Brasilica, 23: 93-99.

GIULIETTI AM, HARLEY RM, DE QUEIROZ LP, WANDERLEY MGL e VAN DEN BERG C (2005) Biodiversity and conservation of plants in Brazil. Conservation Biology 19: 632-639.

GONÇALVES-ALVIM SL e FERNANDES GW (2001) Biodiversity of galling insects: historical, community and habitat effects in four Neotropical savannas. Biodiversity Conservation 10: 79-98.

- GUTIÉRREZ RMP, MITCHELL S e SOLIS RV (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 117: 1-27.
- HORI K (1992) Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In: Shorthouse, J. D. e Rohfritsch, O. (Eds.). *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, pp. 157-170.
- ISAIAS RMS, SOARES GLG, CHRISTIANO JCS e GONÇALVES SJMR (2000) Análise comparativa entre as defesas mecânicas e químicas de *Aspidosperma australe* Muëll. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Muëll. Arg. (Apocynaceae) contra herbivoria. *Floresta e Ambiente* 1: 11-18.
- KENNINGTON WJ (2008) Volatile leaf oil diversity in the narrow range endemic *Eucalyptus argutifolia* (Myrtaceae) and its widespread congener *Eucalyptus obtusiflora*. *Biological Journal of the Linnean Society* 96: 738-745.
- KOLEHMAINEN J, ROININEN H, JULKUNEN-TIITTO R e TAHVANAINEN J (1994) Importance of phenolic glucosides in host selection of shoot galling sawfly, *Euura amerinae*. *Journal of Chemical Ecology* 20: 2455-2466.
- KRAUS JE, SUGIURA HC e CUTRUPI S (1996) Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *Tuberculata* (Meliaceae). *Fitopatologia Brasileira* 21: 349-356.
- LANDRUM LR e KAWASAKI ML (1997) The genera of *Myrtaceae* in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49: 508-536.
- MANI MS (1964) *Ecology of plant galls*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- MOURA MZD, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2008) Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina: Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 32(2):271-282.
- MOURA MZD (2007) Padrões anatômicos relacionados a cecidogênese na multi-hospedeira *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Tese de doutorado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- NIEVES-ALDREY JL, IBAÑEZ A e MEDIANERO E (2008) Richness and composition of gall-inducing arthropods at Coiba National Park, Panama. *Revista de Biología Tropical* 56: 1269-1286.
- NUENGCHAMNONG N e INGKANINAN K (2009) On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family Myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT - Food Science and Technology* 42: 297-302.

- OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2010) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). South African Journal of Botany 76(2):239-248.
- OLIVEIRA DC, CHRISTIANO JCS, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2006) Reações de defesa e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). Revista Brasileira de Botânica 29(4): 657-667.
- PRICE PW, FERNANDES GW e WARING GL (1987) Adaptive nature of insect galls. Environmental Entomology 16: 15-24.
- PRICE PW (1997) General concepts on the evolutionary biology of parasites. Evolution 31: 405-420.
- RAMAN A (1991) Cecidogenesis of leaf galls on *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) induced by *Trioza jambolanae* Crawford (Homoptera: Psylloidea). Journal of Natural History 25: 653-663.
- REDFERN M e ASKEW RR (1992) Plant galls. Richmond Pub. Co.
- ROHFRI TSCH O (1992) Patterns in gall development. In: Shorthouse, J. D. e Rohfritsch, O. (Eds.). Biology of insect induced galls. Oxford University, Oxford, pp 60-86.
- ROTMAN A (1976) Revisión del género *Psidium* en la Argentina (Myrtaceae). Darwiniana 20: 418-444.
- SOUZA SCPM, KRAUS JE, ISAIAS RMS e NEVES LJ (2000) Anatomical and ultrastructural aspects of leaf galls in *Ficus microcarpa* L. F. (Moraceae) induced by *Gynaikothrips ficorum* Marchal (Thysanoptera). Acta Botanica Brasilica 14(1): 57-69.
- SOUZA VC e LORENZI H (2005) Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em AGP II. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 640 páginas. Nova Odessa – SP.
- STONE GN e SCHONRÖGGE K (2003) The adaptive significance of insect gall morphology. Trends in Ecology and Evolution 18(10): 512-522.
- YANG MM, LIAO LH, LOU MF, CHEN WC, HUANG SS, TUNG GS, WENG YC e SHEN CC (2006) Diversity, biology, and nutritional adaptation of Psyllids and their galls in Taiwan, pp. 33-42. In: Ozaki K, Yukawa J, Ohgushi T e Price PW (Eds.). Gallling arthropods and their associates. Ecology and Evolution, Springer – Verlag Tokyo. 308 pp.
- YUKAWA J (2000) Synchronization of gallers with host plant phenology. Population Ecology 42: 105-113.

Capítulo I

O sistema

Psidium myrsinoides O. Berg (Myrtaceae) –

Neotrioza cf. *tavaresi* Crawf.

(Hemiptera: Psylloidae)



**O sistema *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) –
Neotrioza cf. tavaresi Crawf. (Hemiptera: Psylloidae)**

Resumo

Galhas de insetos são resultantes da interação específica entre um indutor e seu hospedeiro, na qual o parasita obtém abrigo e nutrição ao regular finamente os processos de morfogênese da estrutura. Durante seu desenvolvimento, as galhas apresentam as fases de indução, crescimento e desenvolvimento, maturação e senescência, sendo este processo estritamente ligado ao estímulo do galhador. A entrada de outros níveis tróficos no sistema, entretanto, altera os padrões estruturais e fisiológicos da estrutura neoformada. *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) é uma superhospedeira de galhas que abriga o galhador *Neotrioza cf. tavaresi* (Hemiptera: Psylloidae). Para este sistema, foi notificada a diversidade de galhas associadas a *P. myrsinoides* e a biologia de *Neotrioza cf. tavaresi*, com enfoque na fenologia, relações com outros níveis tróficos e características macroscópicas das galhas. *Neotrioza cf. tavaresi* possui cinco estádios ninfais e ciclo de vida univoltino anual, apresentando alta sincronia com a fenologia de *P. myrsinoides*, sendo capaz de infestar, em média, 23% das folhas de sua hospedeira. O aumento do volume da galha foi proporcional ao crescimento do inseto, que, ao longo do ano, teve taxas de parasitismo e mortalidade de 15,7% e 29,8%, respectivamente. A cor vermelha da galha pôde ser relacionada à condição não parasitada do indutor, constituindo um importante caráter macroscópico de diagnose. O sistema *Psidium myrsinoides* - *Neotrioza cf. tavaresi* apresenta aspectos biológicos similares a outros sistemas envolvendo galhadores sugadores, se destacando, entretanto, pelo ciclo de vida univoltino associado a uma planta perene na região Neotropical.

Palavras-chave: Biometria, ecologia, galha, *Neotrioza*, *Psidium*

Abstract

Insect galls result from a specific interaction between a gall inducing organism and its host plant, in which the parasite obtains nutrition and shelter while finely regulates the morphogenetical processes of the structure. During its development, the galls pass through the phases of induction, growth and development, maturation and senescence, which are closely linked to the gall inducer stimuli. The entry of other trophic levels in the system, however, alters the structural and physiological patterns of the neoformed structure. *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) is a super-host of galls which shelters the gall inducer *Neotrioza* cf. *tavaresi* (Hemiptera: Psylloidae). For this system, the diversity of galls associated with *P. myrsinoides* was notified and the biology of *Neotrioza* cf. *tavaresi* described, focusing on the phenology, the relations with other trophic levels, and macroscopic characteristics of the galls. *Neotrioza* cf. *tavaresi* has five instars and an annual univoltine life cycle, with high synchrony with the phenology of *P. myrsinoides*. It parasitizes an average of 23% of the leaves of its host. The increase in size of the gall was proportional to the insect developmental stages, which had rates of parasitism and mortality of 15.7% and 29.8%, respectively. The red color of the gall could be related to the non parasitized state of the galling insect, being an important macroscopic diagnostical feature. The biological features presented by *Psidium myrsinoides* – *Neotrioza* cf. *tavaresi* system are similar to other systems involving sucking galling insects, however, it stood out by its univoltine life cycle associated with a perennial plant in the Neotropics.

Keywords: Biometry, ecology, gall, *Neotrioza*, *Psidium*

Introdução

As galhas de insetos são resultado de uma relação parasítica espécie-específica, a qual determina a morfogênese de estruturas simétricas e repetitivas (Raman 2007). Embora constituída inteiramente de tecidos vegetais, a estrutura da galha é finamente regulada pelo indutor (Redfern e Askew 1992) e, por isso, pode ser entendida como fenótipo estendido deste (*sensu* Dawkins 1982).

Classicamente, o desenvolvimento das galhas pode ser dividido em quatro estágios, segundo Rohfritsch (1992): indução, crescimento e desenvolvimento, maturação e senescência. Entretanto, para que este desenvolvimento tenha início, é necessário que co-ocorram temporalmente as formas infestantes do inseto e os sítios reativos de seus hospedeiros. Variações nos ciclos de vida dos insetos e das plantas acarretam em alterações na qualidade e quantidade dos recursos disponíveis para os galhadores, afetando diretamente a sua população (Yukawa 2000). O tempo despendido durante todo o processo é variável, dependendo, dentre outros fatores, da taxa de desenvolvimento e tipo de voltinismo apresentado pelo indutor (Hodkinson 2009). Em geral, em plantas caducifólias, os ciclos de vida são altamente sincrônicos e tendem ao univoltinismo (Gonçalves *et al.* 2005). Em plantas perenes por sua vez, a disponibilidade de recursos não constitui fator limitante ao estabelecimento de insetos com ciclos de vida multivoltinos.

Um fator fundamental para que a galha se desenvolva completamente, é o estímulo constante do galhador durante todo o período de seu desenvolvimento (Rohfritsch 1992). Esse processo pode ser alterado na medida em que outros níveis tróficos, como é o caso de parasitóides, entram no sistema, modificando ou interrompendo o estímulo do galhador e, conseqüentemente, o desenvolvimento padrão das galhas. Nesse sentido, é possível que essas relações existam como componentes da regulação *top-down* das populações de galhadores (Cuevas-Reyes *et al.* 2007).

Este trabalho aborda uma planta perene, superhospedeira de galhas, *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae), dando enfoque às relações ecológicas entre esta e *Neotrioza cf. tavaresi* (Hemiptera: Psylloidae), indutor de galhas foliares elipsóides. Tal

abordagem objetiva verificar o provável multivoltinismo e a influência da entrada de outros níveis tróficos no sistema, visando, além destes, (1) notificar a diversidade de galhas ocorrentes em *Psidium myrsinoides*, (2) elucidar o ciclo de vida de *Neotrioza* cf. *tavaresi*, relacionando ao volume das galhas em suas diferentes fases de desenvolvimento, (3) verificar a existência ou não de sincronia entre a fenologia das galhas e da planta hospedeira, (4) avaliar a taxa de mortalidade relacionada ao parasitoidismo e a influência desta na estrutura da galha e (5) avaliar características diagnósticas distintivas entre galhas parasitadas e não parasitadas.

Materiais e métodos

Área de estudo e coleta de insetos

A população de *Psidium myrsinoides*, estudada durante os anos de 2009 e 2010, porta galhas induzidas por *Neotrioza* cf. *tavaresi* e encontra-se na Reserva Privada do Patrimônio Natural Serra do Caraça (IBAMA Portaria 32/94N Decreto 98.914), no município de Catas Altas – MG. Os indivíduos se encontram ao longo de uma trilha distante cerca de 2km da sede do parque (20°06'22"S - 43°29'42"O) a 1290m de altitude.

Para a identificação do indutor e parasitóides associados, foram coletadas formas imaturas e adultas (n=10 por estágio) que, depois de fixadas em etanol 70%, foram acondicionadas em tubos de microcentrífuga. As amostras foram enviadas, respectivamente, ao Dr. Daniel Burckhardt, especialista em Hemiptera: Psylloidea, pesquisador do Naturhistorisches Museum, na Suíça, e ao Dr. Paul Hanson, pesquisador da Escuela de Biología na Universidad de Costa Rica.

Análises Fenológicas

O comportamento fenológico vegetativo das plantas foi observado utilizando-se o método descrito por Fournier e Charpantier (1975) em 12 indivíduos marcados por ordem de aparecimento dentro do transecto. Durante um ano, a área foi visitada mensalmente para se observar a presença e/ou ausência de atividades de brotação e senescência foliares. Estes dados foram transformados em índice de atividade de cada

uma das fenofases, a fim de se estimar a porcentagem de indivíduos da população que apresentasse sincronia de cada uma das fenofases (Bencke e Morellato 2002).

A fenologia das galhas foi observada mensalmente em cinco dos indivíduos, nos quais foram aleatoriamente escolhidos três ramos terminais para a contabilização do número de folhas não galhadas e número de folhas galhadas. Nas folhas galhadas, foi contabilizado o número de galhas nos diferentes estágios de desenvolvimento: indução, crescimento e desenvolvimento, maturação e senescência ao longo de um ano. Os dados de outubro de 2009 e 2010 foram utilizados para o cálculo dos níveis de infestação.

Análises biométricas

Para estudos relacionados à biologia da galha, foram coletadas aproximadamente 120 galhas por mês durante um ano (n=1339 galhas), sendo uma parte da amostra fixada em FAA (Johansen 1940) e a outra, analisada a fresco. Para a análise de relação entre o estágio de desenvolvimento do inseto e o tamanho da galha, estas tiveram seus maiores eixos, vertical e horizontal, medidos e, então, foram dissecadas sob estereomicroscópio para a coleta e identificação dos ínstares dos indutores. O volume das galhas foi estimado através das seguintes fórmulas do volume de um esferóide prolato (cujo maior semi-eixo é o vertical) e de um esferóide oblato (cujo maior semi-eixo é o horizontal), respectivamente, onde a = semi-eixo maior e b = semi-eixo menor:

$$V = \frac{4}{3}\pi ab^2 \quad e \quad V = \frac{4}{3}\pi a^2b$$

Paralelamente, foram contabilizadas a presença de parasitóides associados e a presença do exoesqueleto do indutor para se estimar as taxas de parasitismo e de mortalidade, respectivamente.

A fim de se verificar a relação entre a condição do indutor (não parasitado, parasitado e morto) e a cor das galhas (vermelha ou verde), as galhas referentes às coletas de maio, junho e julho de 2010 (n=360 galhas) foram abertas a fresco, possibilitando a observação de sua cor.

Análises estatísticas e representação gráfica

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa JMP (SAS Institute, US, 1989-2002). Foram feitos testes de normalidade (Teste de Shapiro Wilk) e, quando satisfatório, os dados foram comparados por ANOVA ou teste *t* de Student, seguidos por testes múltiplos de Tukey. Quando ao contrário, foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn. Para a análise da relação entre a cor das galhas e a condição do indutor, foi usado o teste de Qui-quadrado na comparação das frequências observadas. Em todos os testes utilizou-se $\alpha = 0,05$. Os gráficos foram gerados pelo programa GraphPad Prism® para Windows, versão 5.0 (Motulsky 1992-2009).

Resultados

Características Gerais

Psidium myrsinoides é uma planta de porte arbustivo a sub-arbóreo (Fig. 1a) cujas folhas são simples e de filotaxia oposta, emergindo aos pares a partir do meristema apical. Quando jovens, podem apresentar-se na cor vermelha a verde alaranjado. Na maturidade, são glabras, membranáceas, de bordo inteiro, limbo obovado a oblongo com ápice agudo, base cuneada e pecíolo curto (Berg 1857). Nas folhas e gemas de *P. myrsinoides* podem ser encontrados quatro morfotipos de galhas, induzidos por espécies ainda não identificadas de galhadores. São observadas uma galha de gema (Fig. 1b) e três foliares: cônica pilosa (Fig. 1c), de enrolamento (Fig. 1d) e elipsóide (Fig. 1e). Esta última constitui o mais abundante dos morfotipos encontrados em *P. myrsinoides* e, por isso, foi foco principal das análises conduzidas.

As galhas foliares elipsóides são induzidas pelas ninfas de primeiro instar de *Neotrioza* cf. *tavaresi* (Hemiptera: Psylloidea), quando estas se instalam em folhas jovens (fig. 2a, b). A indução ocorre na superfície adaxial das folhas e, com seu desenvolvimento, se projetam para a superfície abaxial assumindo forma elipsóide e coloração variando entre verde e vermelho independentemente das diferentes fases do seu desenvolvimento (Fig. 2c-f). Essas galhas são abertas e podem estar solitárias ou agrupadas em grande número, chegando a ocupar toda a superfície abaxial da folha

(Fig. 2g). Na senescência, apresentam um mecanismo de abertura por ruptura das paredes, permitindo a emergência dos adultos (Fig. 2h). Algumas das galhas podem apresentar-se necrosadas possivelmente pela interrupção do desenvolvimento do galhador (Fig. 2h).

O desenvolvimento de *Neotrioza cf. tavaresi* passa por cinco estádios ninfais, levando um ano para completar o ciclo. As fêmeas adultas ovipositam na margem das folhas jovens (Fig. 3a) de onde emergem as ninfas de primeiro ínstar, que migram para o limbo, onde se instalam e iniciam sua alimentação (Fig. 3b). Dentro da galha, as ninfas passam por mudas sucessivas até chegar ao quinto instar (Fig. 3c-f), sendo este o antecessor do inseto adulto. Os insetos adultos são caracterizados principalmente pela presença das asas já expandidas (Fig. 3g). As fêmeas podem ser distinguidas dos machos através da diferença morfológica do seu ovipositor curto (Fig. 3h) em relação ao edeagro do macho (Fig. 3i).

Ninfas de *Neotrioza cf. tavaresi* são parasitadas por uma espécie não descrita de *Galeopsomyia* (Hymenoptera: Eulophidae) (Fig. 4a). Ao puparem (Fig. 4b), estes parasitóides encerram suas atividades alimentares, tendo causado a morte do indutor. *Galeopsomyia* sp. utiliza a galha como abrigo durante o período de desenvolvimento até estágio adulto (Fig. 4c), quando escavam ativamente um canal de fuga através do qual alcançam o meio externo (Fig. 4d).

Análises Fenológicas

Psidium myrsinoides é uma planta perene que apresenta pouca demarcação das fenofases de brotação, maturação e senescência foliares (Fig. 5). Desta maneira, folhas maduras são encontradas ao longo de todo o ano em 100% dos indivíduos da população. As folhas maduras de uma quantidade variável de indivíduos da população passam por processo de senescência e abscisão ao longo de todo o ano. Em outubro de 2009, todos os indivíduos analisados apresentaram senescência foliar, evento que coincide com a atividade mais pronunciada da fenofase de brotação nesta população. Ainda em outubro, todos os indivíduos analisados apresentaram brotação, atividade esta que diminuiu ao longo do ano, mantendo-se em uma menor parcela da

população. Esta fenofase voltou a ser observada em 100% dos indivíduos analisados em agosto e setembro do ano seguinte.

O desenvolvimento das galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* teve início em outubro, se estendendo até o início de dezembro, período no qual foram observadas galhas no estágio de indução. A partir de novembro, foram observadas galhas na fase de crescimento e desenvolvimento que se fizeram presentes até o mês de setembro do ano seguinte. No mês de agosto, uma parcela das galhas já se encontrava na fase de maturação, e ocorreram até o mês de novembro, quando foi observado o pico de concentração de galhas senescentes (Fig. 6). A análise do conteúdo de galhas registra a presença de insetos adultos de agosto a outubro e picos sucessivos do segundo ao quinto estádios ninfais são observados de novembro a setembro do ano seguinte (Fig. 7).

Em outubro dos anos de 2009 e 2010, ocorreram picos de brotação e indução de galhas, tendo sido observados valores de 30,3% e 17,2% de infestação, respectivamente (Fig. 8).

Análises biométricas

As ninfas de segundo instar foram encontradas nas galhas de novembro de 2009 a fevereiro de 2010, em porcentagem acima de 90%, registrando-se queda para aproximadamente 80% em março e baixos percentuais até o mês de julho. O terceiro instar teve pico de distribuição no mês de abril (aproximadamente 80%), sendo seguido sucessivamente pelos quarto e quinto ínstars que tiveram os picos de distribuição de maio a junho e de julho a outubro, respectivamente. A partir de agosto, insetos adultos foram encontrados, característica ocorrente até o mês de outubro, quando o ciclo de vida desses insetos recomeçou (Fig. 7). As ninfas de primeiro instar não foram contabilizadas, pois, neste estágio, elas se encontravam sobre a superfície foliar e acabaram por se desprender durante o processo de manuseio e fixação das plantas.

Foi observada uma correlação positiva entre o volume das galhas e o estágio de desenvolvimento do galhador (Spearman, $r = 0,89$). O teste de médias do volume das

galhas nos diferentes ínstaros mostrou a formação de cinco grupos estatisticamente consistentes (Tab. 1).

Os indutores das galhas analisadas apresentaram 15,7% de parasitismo e de 29,8% de mortalidade. Os valores referentes a cada um dos estágios de desenvolvimento, excetuando as ninfas de primeiro instar, são discriminados na Figura 9. A frequência da associação entre a cor das galhas e a condição do indutor revelou uma relação estatisticamente significativa entre as galhas vermelhas e o indutor não parasitado (Fig. 10).

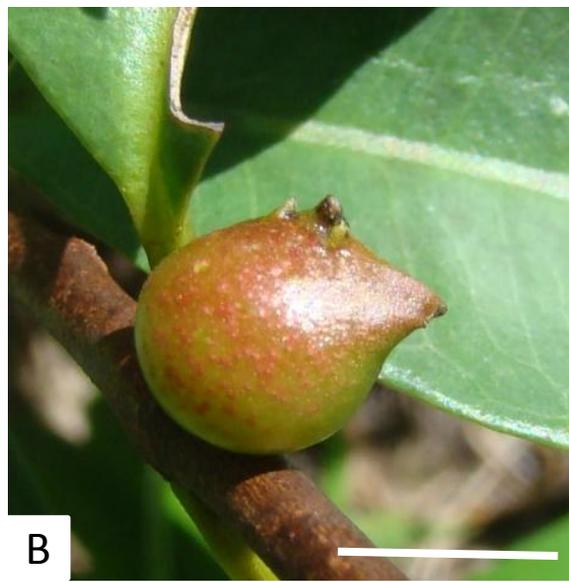
Tabela 1 – Relação entre o estágio de desenvolvimento de *Neotrioza cf. tavaresi* (Hemiptera: Psylloidea) e o volume das galhas (mm³) induzidas em *Psidium myrsinoides* (Myrtaceae)

Ínstar	Volume das galhas (Média ± Erro padrão)
2	10,4 ± 0,6 e
3	188,2 ± 20,8 d
4	803,1 ± 24,5 c
5	1394 ± 32,9 b
6	1578 ± 103,4 a

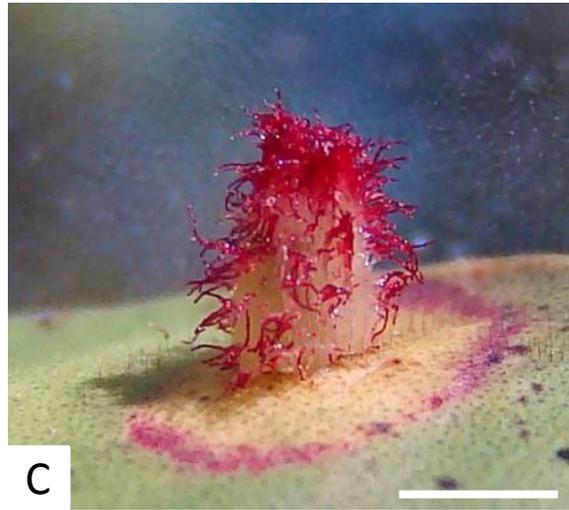
Valores seguidos por letras diferentes diferiram significativamente (Kruskal-Wallis seguido de testes múltiplos de Dunn).



A



B



C



D



E

Figura 1 – Diversidade de galhas em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). A- *Habitus* da planta hospedeira; B- Galha foliar cônica pilosa; C- Galha de gema; D- Galha foliar de enrolamento e E- Galha foliar elipsóide. Barras: A- 50cm; B- 0,25cm; C-E- 0,5cm.



Figura 2 – Ramos jovens e galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Cawf. (Hemiptera: Psylloidea) em *Psidium myrsinoides* Cawf. (Myrtaceae). A- Visão geral de ramos em brotação; B- Detalhe da fase de indução em folha jovem (setas); C-F- Detalhe das galhas evidenciando variação de coloração do verde ao vermelho; G- Agrupamento de galhas em uma mesma folha. H- Detalhe de galha deisciente (primeiro plano) e galha em processo de necrose (segundo plano). Barras: 0,5cm.

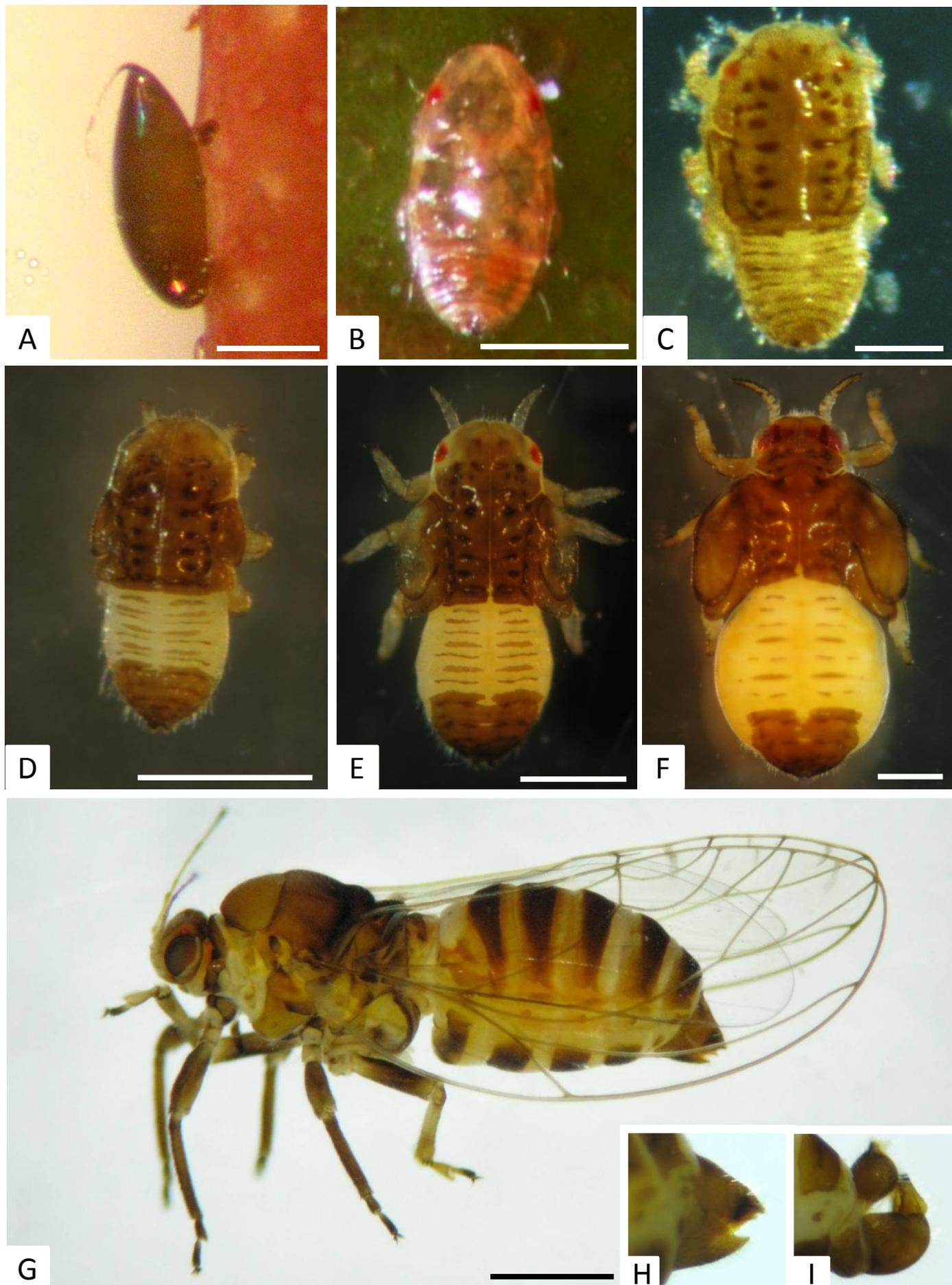
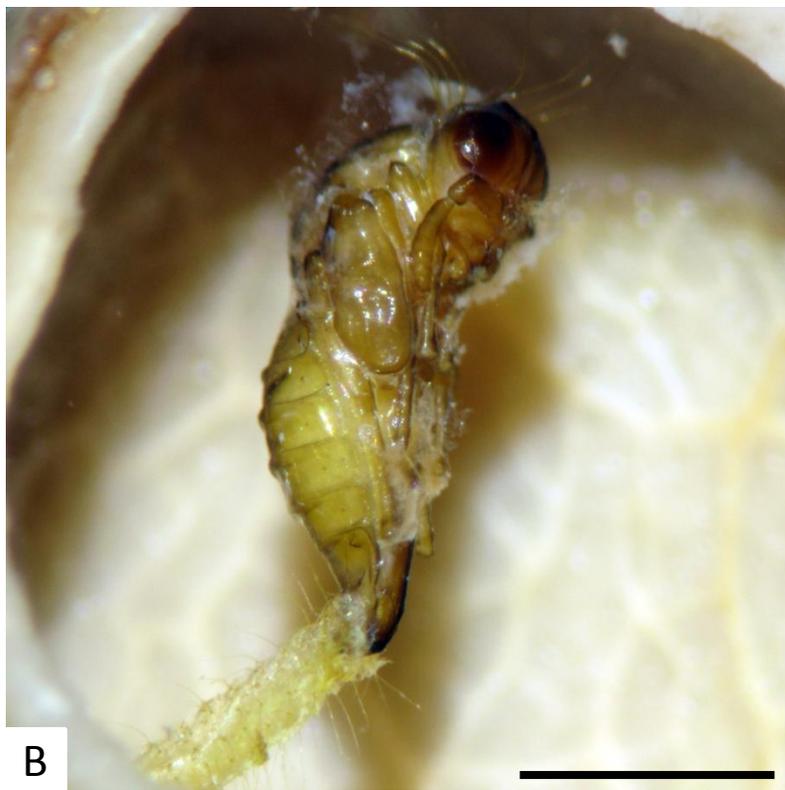


Figura 3 – Desenvolvimento de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawford (Hemiptera: Psylloidea). A- Detalhe de ovo no bordo foliar; B-F- Estádios ninfaís do primeiro ao quinto ínstar. G- Inseto adulto com detalhes do ovipositor da fêmea e eedeagro do macho. Barras: A-C- 100µm; D-F- 500µm; G- 1mm.



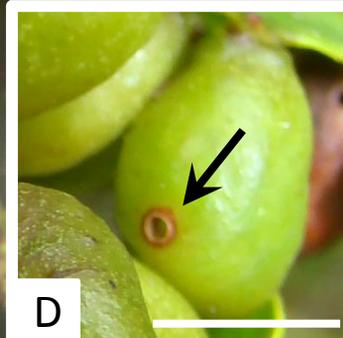
A



B



C



D

Figura 4 – Fases de desenvolvimento de *Galeopsomyia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), parasitóide de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf.. A- Ninfa de quarto ínstar de *Neotrioza* cf. *tavaresi* parasitada por larva de parasitóide (seta); B- Pupa do parasitóide ocupando a câmara ninfal. C- Parasitóide adulto; D- Detalhe da abertura do canal de fuga do parasitóide. Barras: A- 500 μ m; B- 1,5mm; C- 1mm; D- 1cm.

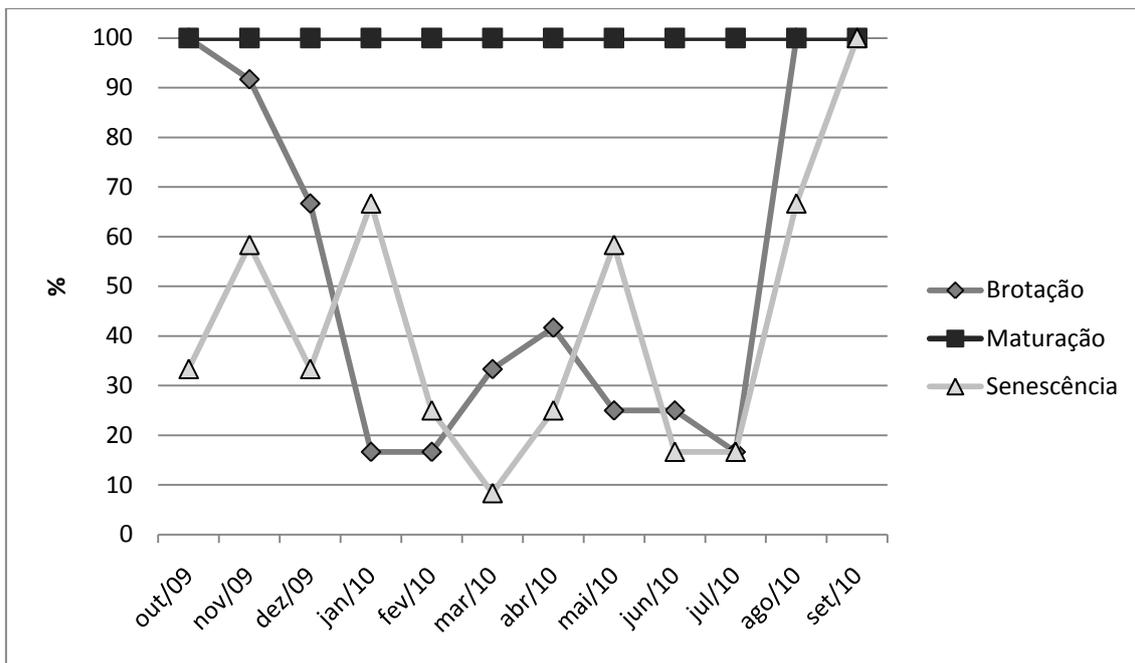


Figura 5 – Comportamento fenológico vegetativo da população de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) na Serra do Caraça – MG medido através do índice de atividade das diferentes fenofases ao longo de um ano.

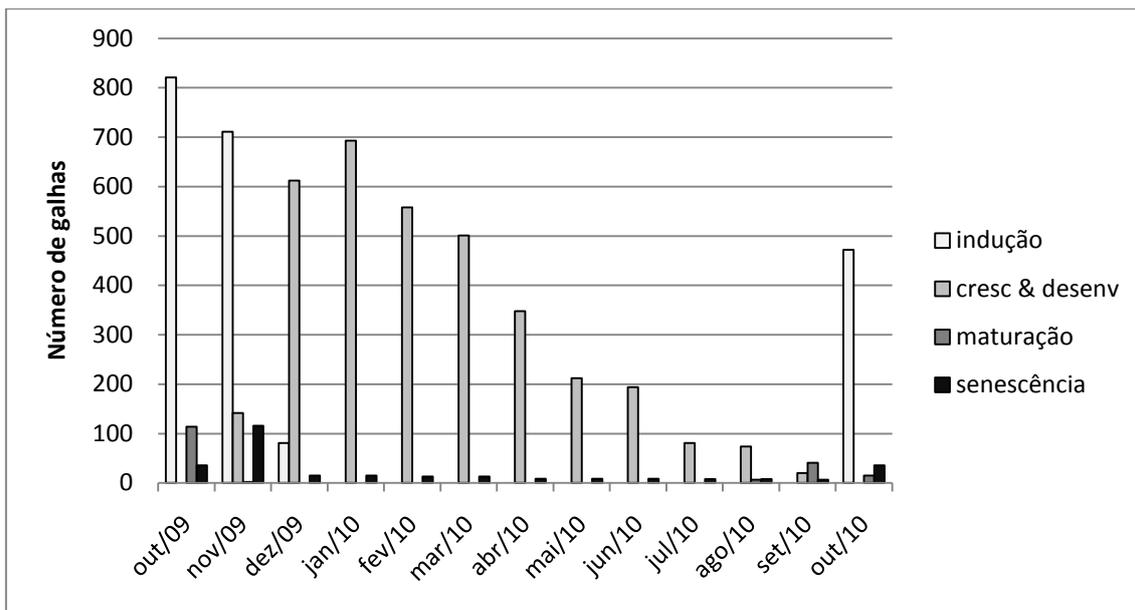


Figura 6 – Comportamento fenológico das galhas foliares de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) na Serra do Caraça – MG.

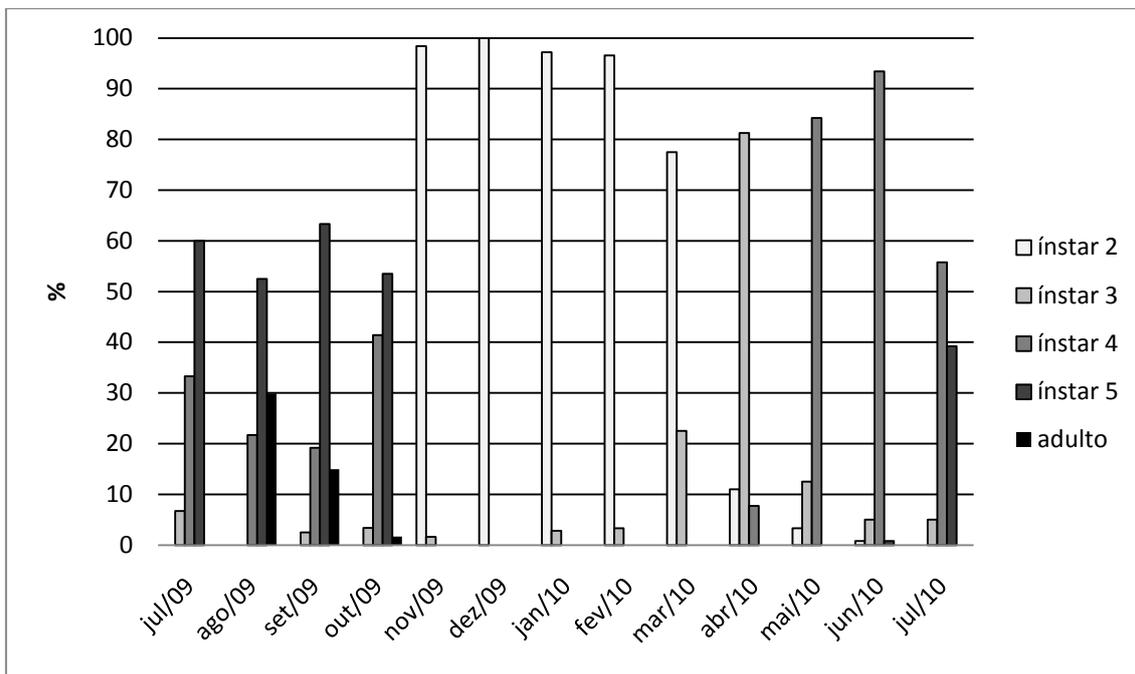


Figura 7 – Frequência dos estágios de desenvolvimento de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawl. (Hemiptera: Psylloidea) em galhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg na Serra do Caraça - MG ao longo de um ano. Frequência observada contabilizando-se os indutores não parasitados, parasitados e mortos.

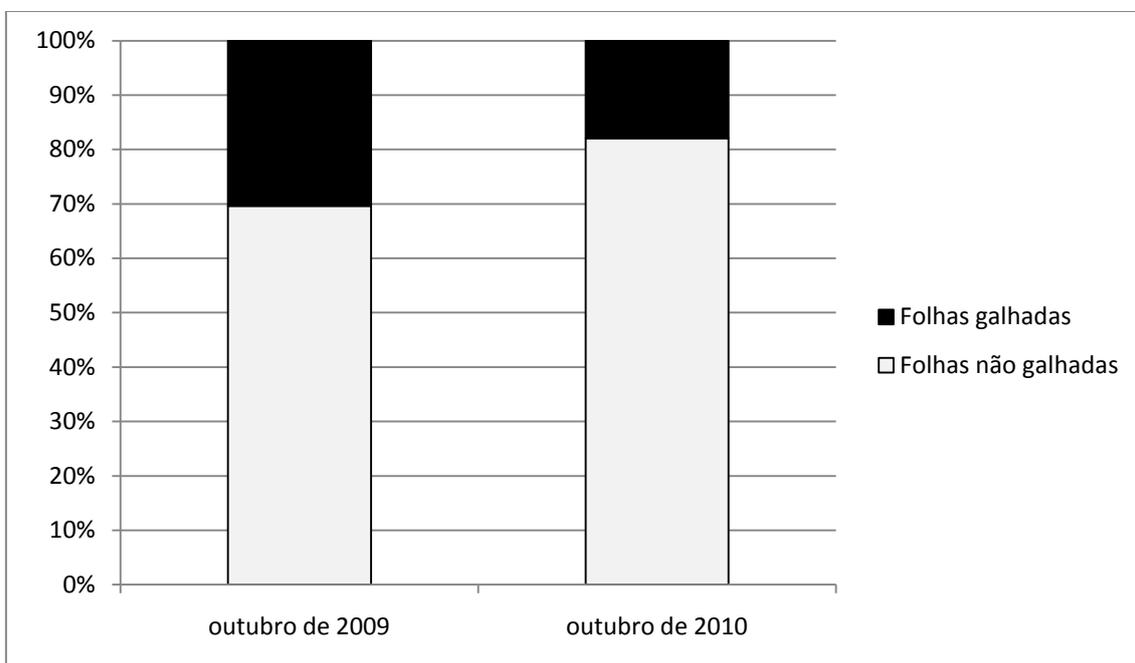


Figura 8 – Níveis de infestação por galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) em folhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) medidos em outubro de 2009 e outubro de 2010.

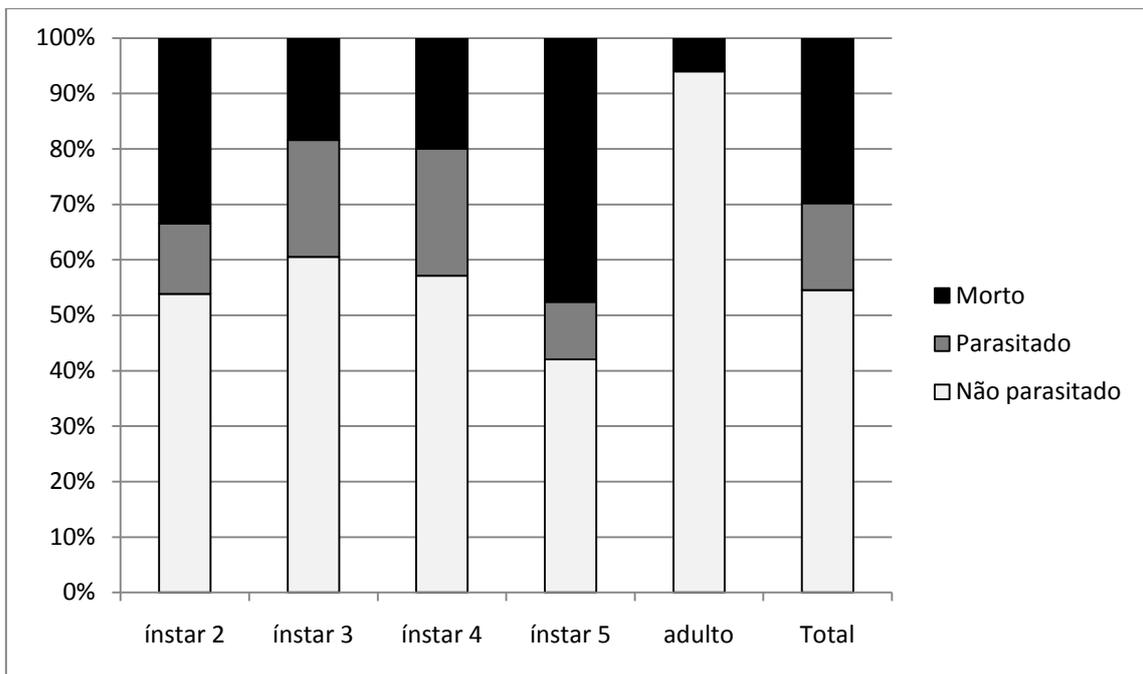


Figura 9 – Taxas de mortalidade e parasitoidismo por *Galeopsomyia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) em galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawford. (Hemiptera: Psylloidea) na Serra do Caraça – MG discriminadas para os diferentes estágios de desenvolvimento e os valores totais.

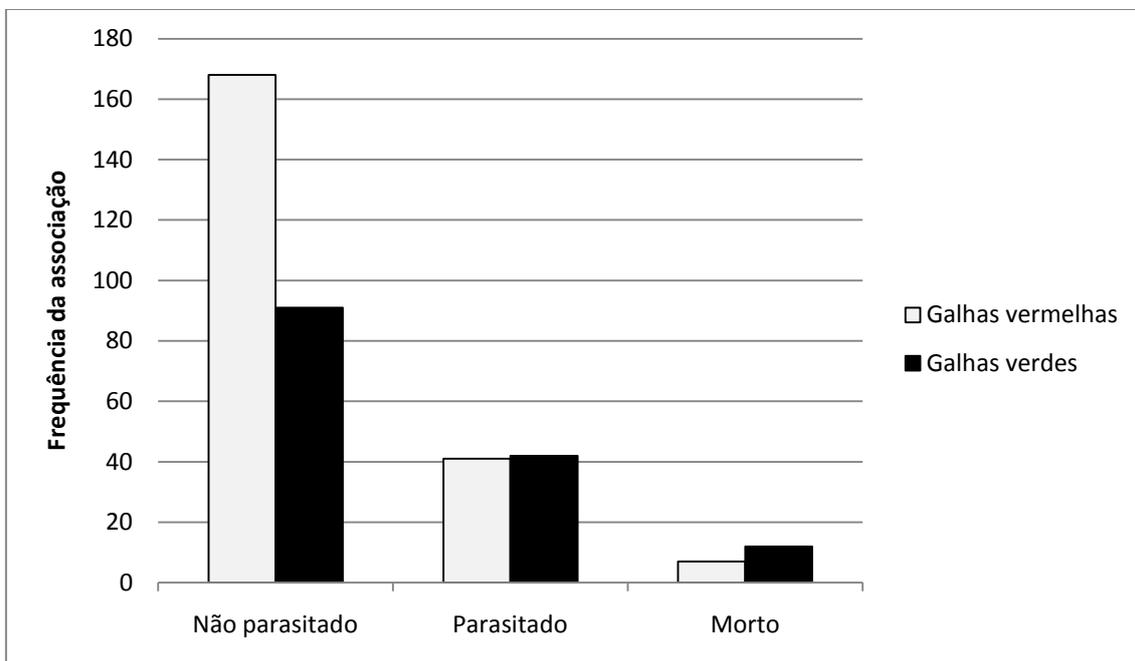


Figura 10 – Relação entre a cor das galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) em folhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) com a condição (não parasitado, parasitado e morto) do inseto indutor na Serra do Caraça – MG.

Discussão

Características gerais

Psidium myrsinoides possui características tipicamente relacionadas às Myrtaceae tais como porte arbustivo a sub-arbóreo, folhas simples, opostas e glabras na maturidade e glândulas de óleos essenciais subepidérmicas (Johnson e Briggs 1984). Os insetos galhadores alteram os tecidos da planta hospedeira em benefício próprio, induzindo a morfogênese de órgãos entendidos como o fenótipo estendido de seus indutores (*sensu* Dawkins 1982). Esta indução pode ocorrer por diferentes espécies de insetos em uma mesma planta, a qual se constituirá em uma superhospedeira. As superhospedeiras têm sido foco de trabalhos envolvendo aspectos ecológicos e anatômicos na região Neotropical (Moura *et al.* 2008, 2009; Oliveira e Isaias 2009, 2010). O seu estudo provê informações importantes acerca das intrincadas relações ecológicas entre insetos galhadores e plantas, tendo-se a vantagem da manutenção das variáveis dependentes da hospedeira. Por essa perspectiva, se torna interessante o estudo de processos morfogênicos específicos como fruto do impacto exercido pelo galhador e dos limites impostos pelas potencialidades dos tecidos da hospedeira (Moura *et al.* 2009).

As mudanças macroscópicas mais evidentes em galhas são variações de indumento, forma e coloração. Dentre estas, a mais notável no sistema *Neotrioza* cf. *tavaresi* - *P. myrsinoides* é a variação da cor entre o verde e o vermelho, muitas vezes tornando a galha uma estrutura aposemática. Neste caso, a cor, forma e tamanho das galhas podem ser analisados como características que alertam predadores sobre o conteúdo possivelmente tóxico dos seus tecidos (Inbar *et al.* 2010). A variação da cor, ou metacromatismo, pode ser um indicativo do estágio de desenvolvimento do órgão (Sáiz e Nuñez 1997), um sinalizador da efetividade da alimentação do indutor (Dias 2010) ou uma referência à idade e grau de maturação do tecido hospedeiro (Oliveira e Isaias 2009). Independentemente disso, pelo fato da cecidogênese depender diretamente da rediferenciação celular (Oliveira e Isaias 2010) e, portanto, da reaquisição da condição meristemática, a coloração dos tecidos das galhas pode ser

apenas um indicativo da sua juventude fisiológica, traduzido na baixa concentração de clorofilas (Yang *et al.* 2003).

A distribuição das galhas no limbo foliar de *P. myrsinoides* parece obedecer a um padrão randômico, variando entre galhas isoladas a intensamente agrupadas. A distribuição de galhas foliares pode depender de diversos aspectos ecológicos (Santos *et al.* 2010) e parâmetros tais como área foliar (Gonçalves *et al.* 2005) e desempenho fotossintético (Fleury 2009). Galhas são estruturas dependentes nutricionalmente de seus órgãos hospedeiros, constituindo drenos fortes de fotoassimilados (Weis *et al.* 1988, Motta *et al.* 2005). Dessa forma, seu agrupamento pode constituir uma desvantagem para seus indutores na medida em que estes estariam sujeitos à competição intraespecífica na partição de recursos realocados. Ainda, o agrupamento pode constituir fator importante no aumento do ataque de inimigos naturais específicos, uma vez que o grupo pode ser mais facilmente detectado (Edmunds 1974).

Apesar de não serem verdadeiramente fechadas, as galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* possuem um ostíolo pequeno e obliterado, que impede a comunicação direta com o meio externo. Características similares são reportadas na literatura para galhas de diferentes taxa indutores (Mani 1964), sistemas nos quais os galhadores apresentam diferentes estratégias para a emergência do inseto adulto. Insetos que induzem galhas fechadas, frequentemente são capazes de cavar um canal de fuga na parede do órgão que facilita a emergência do inseto adulto. Neste caso, as formas larvais, antes de pupar, lentamente escavam a parede da galha até que uma fina camada de tecido remanescente separe a câmara larval do meio externo (Meyer 1987). A sua saída se dá pelo canal produzido pela larva, com o rompimento das camadas de células restantes. Entretanto, esta é uma característica de insetos das ordens Hymenoptera e Lepidoptera, que possuem, quando larvas, aparelhos bucais mastigadores robustos, capacitados a escavar ativamente a parede da galha. No caso das galhas de *Neotrioza cf. tavaresi*, existe um impedimento anatômico à esta ação, tendo em vista o aparelho bucal do tipo sugador, típico de Psylloidea (Burckhardt 2005), que é incapaz de realizar o ato de triturar células. Portanto, as galhas induzidas por insetos dessa superordem, quando não são permanentemente abertas, devem possuir diversos mecanismos de abertura, variando desde a instalação de felogênio,

formando periderme (Dias 2010), até a necrose dos tecidos, como é observado neste caso.

Análises fenológicas

Psidium myrsinoides é uma planta perene, característica comumente relacionada à flora tropical, uma vez que as condições climáticas nesta região não constituem fatores limitantes à manutenção das folhas durante todo o ano (Fenner 1998). Entretanto, em locais onde existe a demarcação de estações secas e chuvosas, comumente as plantas apresentam picos de brotação, geralmente em um período imediatamente anterior à chegada das chuvas. Alguns trabalhos apontam para fatores como a irradiância (Wright e Van Schaik 1994), temperatura (Brooke *et al.* 1996) ou fotoperíodo (Loubry 1994) como preponderantes na determinação do período de brotação. De fato, o pico de brotação observado para *P. myrsinoides* se dá em agosto, mês no qual o índice pluviométrico não ultrapassa os 12 mm (dados não publicados), dois meses antes da chegada da estação chuvosa, em outubro. Este comportamento já foi reportado para diferentes biomas nos quais a estação seca é bem demarcada (Singh e Singh 1992, Frankie *et al.* 1974) e corrobora uma característica difundida entre as plantas que crescem sob essas condições específicas. Na maioria dos sistemas, o período de brotação corresponde à época preferencial à indução de galhas (Rohfritsch 1992, Gonçalves *et al.* 2005).

Além da idade dos tecidos da planta hospedeira, a escolha do local de indução constitui fator importante no sucesso de uma espécie galhadora uma vez que ela irá determinar as características desenvolvidas pela galha e, conseqüentemente, o *fitness* do galhador (Weis *et al.* 1988). Esta escolha por sua vez, é diretamente dependente da fenologia da planta hospedeira uma vez que esta variável determina a disponibilidade ou não dos sítios adequados para oviposição. As ninfas de primeiro instar de *Neotrioza* cf. *tavaresi* têm ação restrita às folhas jovens de *P. myrsinoides*, hábito comumente reportado na literatura, pelo fato de tecidos jovens serem mais responsivos à indução de galhas (Rohfritsch e Anthony 1992). Folhas jovens se encontram disponíveis em toda a população de *P. myrsinoides* durante os meses de agosto a outubro. Os adultos de *Neotrioza* cf. *tavaresi* emergem das galhas em período coincidente, fato que sugere

a existência da sincronia entre indutor e hospedeiro e que é fundamental para a manutenção da espécie galhadora. Esta característica parece ser especialmente importante para galhadores univoltinos, como reportado por Gonçalves *et al.* (2005) e Magalhães (2010), em estudos com galhas de Eriococcidae. Nestes casos, os insetos são altamente especializados e somente são capazes de induzir galhas em folhas jovens. Galhadores cujos ciclos de vida são multivoltinos, entretanto, tendem a ser mais flexíveis em relação aos sítios de indução, realizando a oviposição tanto em folhas jovens quanto maduras (Formiga *et al.* 2009, Oliveira e Isaias 2009, Dias 2010).

Estudos com galhadores da superfamília Psylloidea associados a *Richeria grandis* (Lima 2008) e a *Schinus polygamus* (Dias 2010), plantas perenes, assim como *P. myrsinoides*, relatam o multivoltinismo e a indução indiscriminada de galhas em folhas jovens e maduras. No presente estudo, muito embora o indutor disponha de sítios possivelmente reativos ao longo de todo o ano, o seu ciclo de vida anual impede a utilização desses sítios. Este tipo de comportamento fenológico pode constituir uma vantagem às plantas hospedeiras, uma vez que as folhas formadas nos meses de janeiro a setembro não são atacadas pelos galhadores, já que estes se encontram em suas formas ninfais (Agrawal 2000). Eventos semelhantes foram reportados para os sistemas *Pseudotectococcus rollinae* – *Rollinia laurifolia* (Gonçalves 2008) e *Eriogalococcus* sp. – *Pseudobombax grandiflorum* (Magalhães 2010), situações nas quais um mecanismo semelhante de escape fenológico da planta foi hipotetizado. Este mecanismo pode influenciar os parâmetros de infestação foliar (Pilson 2000), o que provavelmente, no caso em estudo, contribui para a determinação dos baixos níveis de infestação reportados. Este relato constitui um padrão comportamental divergente para os Psylloidea nos Neotrópicos (Brown e Hodkinson 1988, Weis *et al.* 1988, Lima 2008, Dias 2010), onde a disponibilidade de recursos e as condições ambientais favorecem ciclos de vida multivoltinos.

Análises biométricas

Sendo um inseto com ciclo de vida univoltino, *Neotrioza* cf. *tavaresi* apresenta uma distribuição temporal sucessiva dos estádios ninfais desde a indução, realizada pelas ninfas de primeiro instar, até a maturação, quando os insetos adultos emergem

das galhas. Como consequência disso, galhas de tamanhos crescentes são encontradas ao longo do ano. Segundo Rohfritsch (1992), o desenvolvimento da galha está fortemente ligado à efetividade dos estímulos criados pelo galhador. Ainda segundo esta autora, nos seus diferentes estágios de desenvolvimento (indução, crescimento e desenvolvimento, maturação e senescência), as galhas passam por mudanças estruturais e fisiológicas, sendo importante ressaltar o aumento de tamanho e biomassa durante a fase de crescimento e desenvolvimento. Nas galhas foliares de *Neotrioza* cf. *tavaresi* em *P. myrsinoides*, foi observada correlação positiva entre as ninfas de segundo a quinto ínstares e dos insetos adultos com o aumento gradativo do volume da galha, corroborando o exposto por Rohfritsch (1992). Resultados semelhantes foram registrados para os sistemas *Euphalerus ostreoides* – *Lonchocarpus guillerminianus* (Fabaceae) (Ferreira *et al.* 1990) e *Calophya* aff. *duvauae* – *Schinus polygamus* (Dias 2010).

A presença de outros níveis tróficos associados a insetos galhadores é usualmente reportada para diferentes taxa (Mani 1964) e seu papel ecológico tem sido discutido como componente importante das relações que regulam as populações desses insetos (Cueva-Reyes *et al.* 2007). No sistema *Neotrioza* cf. *tavaresi* – *P. myrsinoides*, os galhadores são parasitados por uma espécie não descrita de *Galeopsomyia* (Hymenoptera: Eulophidae). Eulophidae é uma família de grande representatividade na ordem Hymenoptera, com mais de 4000 espécies descritas em cerca de 290 gêneros (Noyes 2003). Segundo este mesmo autor, os membros desta família são geralmente, parasitóides, não somente de galhadores, mas também de insetos de vida livre.

O parasitoidismo pode ser responsável pelo aumento da taxa de mortalidade de insetos galhadores, uma vez que frequentemente, ao completar seu ciclo de vida, os parasitóides matam seus hospedeiros (Wiebes-Rijks e Shorthouse 1992, Noyes 2003). Abrahamson e Weis (1997) relatam altas taxas de mortalidades decorrentes da ação de parasitóides, que em alguns casos chegam a 96%. No sistema em estudo, entretanto, as taxas de parasitoidismo relativamente modestas assemelham-se àquelas expostas por Dias (2010) na relação de *Calophya* aff. *duvauae* com *Schinus polygamus*. A taxa de mortalidade, por vezes superior àquela de parasitismo, denota a

morte do indutor por motivos diversos àqueles referentes à ação de parasitóides, como por exemplo, predação e infecções de fungos e ou bactérias entomopatogênicos (Fernandes e Price 1992). De uma forma ou de outra, a morte ou parasitoidismo afetam diretamente os hábitos dos galhadores e causam mudanças nas características das galhas (Mani 1992, Abrahamson e Weis 1997). Nas galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* em *P. myrsinoides*, a cor vermelha foi associada à condição não parasitada do indutor, assim como reportado por Dias (2010) para *Calophya aff. duvauae* – *Schinus polygamus*. Esta alteração de cor é produto da influência dos galhadores nos níveis de clorofilas dos tecidos (Yang *et al.* 2003) que, ao diminuírem em relação à folha não galhada, deixam de mascarar o conteúdo de pigmentos vermelho-alaranjados como antocianinas e carotenóides. Isso corrobora a hipótese de que a cor vermelha possa estar ligada à condição não parasitada do indutor, sem descartar, entretanto, a possível ação de altas irradiâncias (Wool 2004) determinando o aparecimento dessa cor nas galhas de *Neotrioza cf. tavaresi*.

O sistema *Neotrioza cf. tavaresi* – *Psidium myrsinoides* possui características ecológicas distintivas em relação a outros galhadores de plantas perenes na região Neotropical, possuindo ciclo de vida univoltino. A sincronia entre a fenologia da planta e do inseto assegura a disponibilidade de sítios adequados à indução, no momento certo do ciclo de vida do inseto, contribuindo para o sucesso reprodutivo da espécie. A relação positiva entre o estágio de desenvolvimento do galhador e o volume da galha, por sua vez, indica o estímulo e desenvolvimento contínuos da galha. Ainda, possibilita a identificação das fases do desenvolvimento das galhas através do estabelecimento de classes de tamanho. O tamanho da população é controlada em menor grau pela ação de parasitóides, os quais não alteram a estrutura da galha, causando apenas a interrupção da morfogênese. Por fim, a cor vermelha da galha pôde ser considerada, na maioria das vezes, diagnóstica da condição não parasitada do indutor.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES pelo provimento de recursos revertidos em bolsa de estudos e aos professores Dr. Daniel Burckhardt e Dr. Paul Hanson pela identificação dos insetos galhadores e parasitóides, respectivamente.

Referências

ABRAHAMSON WG e WEIS AE (1997). Evolutionary ecology across three trophic levels: goldenrods, gall-makers and natural enemies. Monographs in population biology 29. Princeton University Press.

AGRAWAL AA (2000) Overcompensation of plants in response to herbivory and the by-product of mutualism. Trends in Plant Science 5: 309-313.

BENCKE CSA e MORELLATO LPC (2002) Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. Revista Brasileira de Botânica 25: 269-275.

BERG OK (1857) *Psidium myrsinoides*. In Flora brasiliensis (CFP Martius, AG Eichler e I Urban, eds.) F Fleischer, Lipsiae 14(1): 384.

BROOKE ML, JONES PJ, VICKERY JA e WALDREN S (1996) Seasonal patterns of leaf growth and loss, flowering and fruiting on a subtropical central Pacific island. Biotropica 28: 164–179.

BROWN RG e HODKINSON ID (1988) Taxonomy and ecology of the jumping plant-lice of Panama (Homoptera, Psylloidea). E.J. Brill, Leiden, The Netherlands. 304 p.

BURCKHARDT D (2005). Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Psyllids (Hemiptera: Psylloidea). In: Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods (Raman A, Schaefer CW e Withers TM, eds). Science Publishers, Plymouth, UK.

CUEVAS-REYES P, QUESADA M, HANSON P e OYAMA K (2007). Interactions among three trophic levels and diversity of parasitoids: a case of top-down processes in mexican tropical dry forest. Environmental Entomology 36(4): 792-800.

DAWKINS R (1982). The extended phenotype: the gene as the unit of selection. Oxford: Oxford University Press.

DIAS GG (2010) Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): alterações químicas e estruturais e interações com parasitoides e inquilinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

EDMUNDS M (1974) Defences in animals. A survey of anti-predator defences. Longman, Harlow, Essex e NY.

FENNER M (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 1: 78-91.

FERNANDES GW e PRICE PW (1992) The adaptive significance of insect gall distribution: survivorship of species in xeric and mesic habitats. Oecologia 90: 14-20.

FERREIRA SA, FERNANDES GW e CARVALHO LG (1990). Biologia e história natural de *Euphaleurus ostreoides* (Homoptera: Psyllidae) Cecidógeno de *Lonchocarpus guillerminianus* (Leguminosae). Revista Brasileira de Biologia 50(2): 417-423.

FLEURY G (2009). Reações estruturais, histoquímicas e fisiológicas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) a Cecidomyiidae galhadores. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

FORMIGA AT, GONÇALVES SJMR, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2009) Relações entre o teor de fenóis totais e o ciclo das galhas de Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* Müll. Arg. (Apocynaceae). Acta Botanica Brasilica 23(1): 93-99.

FOURNIER OLA e CHARPANTIER C (1975) El tamaño de la muestra y la frecuencia de las observaciones en el estudio de las características fenológicas de los arboles tropicales. Turrialba 25: 45-48.

FRANKIE GW, BAKER HG e OPLER PA (1974) Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. Journal of Ecology, 62: 881-913.

GONÇALVES SJMR (2008) Sincronia fenológica, dimorfismo sexual e ontogênese em galhas de *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson e Gonçalves (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae) em *Rollinia laurifolia* Schltldl (Annonaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

GONÇALVES SJMR, ISAIAS RMS, VALE FHA e FERNANDES GW (2005). Sexual dimorphism of *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson e Gonçalves 2004 (Hemiptera Coccoidea Eriococcidae) influences gall morphology on *Rollinia laurifolia* Schltldl. (Annonaceae). *Tropical Zoology* 18: 161-169.

HODKINSON ID (2009) Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History* 43: 65-179

INBAR M, IZHAKI I, KOPLOVICH A, LUPO I, SILANIKOVE N , GLASSER T, GERCHMAN Y , PEREVOLOTSKY A e LEV-YADUN S (2010) Why do many galls have conspicuous colors? A new hypothesis. *Arthropod - Plant interactions* 4(1): 1-6.

JOHANSEN DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.

JOHNSON LAS e BRIGGS BG (1984) *Myrtales and Myrtaceae – a phylogenetic analysis*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: 700-756.

LIMA FS (2008). Respostas estruturais e fisiológicas de *Richeria grandis* Vahl. (Phyllanthaceae) ao estabelecimento do Psyllidae galhador. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

LOUBRY D (1994) La phénologie des arbres caducifoliés en forêt guyanaise (5o de latitude nord): Illustration d'un déterminisme à composantes endogène et exogène. *Canadian Journal of Botany* 72: 1843–1857.

MAGALHÃES TA (2010) Influência da fenologia no desenvolvimento e fisiologia da galhas de *Eriogalococcus* gen. nov. Hodgson em *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

MANI MS (1964). *Ecology of plant galls*. The Hague (The Netherlands): *Dr. W. Junk Publishers*. The Netherlands.

MANI MS (1992). Introduction to Cecidology. In Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD e Rohfristsch O, eds). Oxford University Press, New York.

MEYER J (1987). Plant galls and Gall inducers. Gebrüder Bornträger. Berlin.

MOTTA LB, KRAUS JE, SALATINO A e SALATINO MLF (2005) Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. Biochemical Systematics and Ecology 33: 971-981.

MOTULSKY H (1992-2009). Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, GraphPad Software Inc.

MOURA MZD, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2008) Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina:Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Revista Brasileira de Botânica 32(2):271-282.

MOURA MZD, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2009) Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf gallers in *Lantana camara* (Verbenaceae). Australian Journal of Botany 56: 153-160.

NOYES JS (2003) World Wide Web electronic publication. The Natural History Museum, Grã-Bretanha. www.nhm.ac.uk.

OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2009). Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of the midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinioideae). Revista de Biologia Tropical 57(1-2): 293-302.

OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2010) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). South African Journal of Botany 76(2):239-248.

PILSON D (2000) Herbivory and natural selection on flowering phenology in wild sunflower, *Helianthus annuus*. Oecologia 122: 72-82.

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

REDFERN M e ASKEW RR (1992). Plant galls. Richmond Publishing Co Ltd.

ROHFRITSCH O e ANTHONY M (1992). Strategies on gall induction by two groups of homopterans. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD e Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.

ROHFRITSCH O (1992). Patterns in Gall Development. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD e Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.

SÁIZ F e NÚÑEZ C (1997). Estudio ecológico de las cecidias del género *Schinus*, especialmente las de hoja y de rama de *S. polygamus* y *Schinus latifolius* (Anacardiaceae), em Chile Central. *Acta Entomológica Chilena* 2: 39-59.

SANTOS JC, SILVEIRA FAO, PEREIRA EC e FERNANDES GW (2010) Pattern of attack of a galling insect reveals an unexpected preference-performance linkage on medium-sized resources. *Revista Brasileira de Entomologia* 54(1): 96–103.

SINGH JS e SINGH VK (1992) Phenology of seasonally dry tropical forest. *Current Science* 63: 684–689.

WEIS AE, WALTON R e CREGO C L (1988). Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology* 33: 467- 486.

WIEBES-RIJKS AA e SHORTHOUSE JD (1992). Ecological Relationships of Insects Inhabiting Cynipid Galls. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD e Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.

WOOL D (2004) Gallig aphids: Specialization, biological complexity, and variation. *Annual Review of Entomology* 49: 175–192.

WRIGHT SJ e VAN SCHAİK CP (1994) Light and the phenology of tropical trees. *American Naturalist* 143: 192–199.

YANG CM, YANG MM, HUANG MY, HSU JM e JANE WN (2003) Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44: 314-321.

YUKAWA J (2000) Synchronization of gallers with host plant phenology. *Population Ecology* 42: 105-113.

Capítulo II

**Ontogênese das folhas de
Psidium myrsinoides O. Berg (Myrtaceae) e
galhas induzidas por
Neotrioza cf. tavaresi Crawf.
(Hemiptera: Psylloidae)**

Ontogênese das folhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) e galhas induzidas por *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea)

Resumo

O crescimento da galha é coordenado pelo indutor, que manipula os tecidos da planta em seu próprio benefício. Desvendando o desenvolvimento do órgão hospedeiro e a morfogênese da galha é possível observar como o galhador manipula os tecidos vegetais e quais impactados são esses tecidos no campo cecidogênico. No sistema *Psidium myrsinoides* – *Neotrioza cf. tavaresi*, as mudanças estruturais encontradas foram relacionadas à melhoria da proteção, alimentação e aclimatização do galhador. As folhas não galhadas apresentam desenvolvimento comum às folhas simples. Nas galhas, a epiderme interna e externa deriva da protoderme, o córtex interno do meristema adaxial, o córtex mediano deriva do meristema mediano e o córtex externo deriva do meristema abaxial. O aumento da espessura do mesofilo por hiperplasia e hipertrofia, assim como a lignificação, aumenta a proteção do galhador contra inimigos naturais. A neoformação de feixes vasculares próximos à câmara incrementa suas opções alimentares, enquanto que as glândulas de óleo essencial na parte externa possivelmente repelem a ação de patógenos, parasitóides ou cecidófagos. A direção de alongamento celular e os padrões de divisões celulares de cada camada na galha foram essenciais na determinação da forma final da estrutura. No final do desenvolvimento, a galha apresenta um mecanismo de abertura que envolve morte celular, provocando rachaduras por onde sai o adulto. As alterações observadas corroboram o padrão de desenvolvimento apontado na literatura para galhas de Psylloidea na região Neotropical.

Palavras chave: Alongamento celular, anatomia, hiperplasia, hipertrofia

Abstract

The growth of the gall is coordinated by the gall inducer, which manipulates the plant tissues for its own benefit. The study of the development of the host organ and the morphogenesis of the gall reveals that the gall inducer manipulates and distinctly impacts plant tissues within a cecidogenic field. In the *Psidium myrsinoides* - *Neotrioza* cf. *tavaresi* system, structural changes are related to the improvement of protection, nutrition and microenvironment to the gall inducer. The development of the non-galled leaves is similar to that of other simple leaves. In the galls, five cell layers were distinguishable: outer and inner epidermis derived from the protoderm, inner cortex from the adaxial meristem, median cortex from the median meristem and outer cortex from the abaxial meristem, with hyperplastic and hypertrophic features. The increase in mesophyll thickness due to hyperplasy and hypertrophy, as well as lignification, improves the gall inducer protection against natural enemies. The neoformation of the vascular bundles near the nymphal chamber increases its feeding sites, while the essential oil glands on the outer cortex may repel pathogens, parasitoids or cecidophagous. The direction of cell elongation and the patterns of cell division of each layer in the gall were essential in determining the final shape of the structure. At the end of the development, the gall presents an opening mechanism that involves cell death, which causes cracks through which the adult emerges. The observed alterations corroborates the developmental pattern of Psylloidea galls in the Neotropics.

Key words: Anatomy, cell elongation, hyperplasia, hypertrophy

Introdução

As galhas são produto de conjunto de respostas anatômicas, químicas e fisiológicas de uma planta hospedeira à ação de um agente indutor (Mani 1964). Durante seu desenvolvimento, os estágios imaturos do galhador coordenam o crescimento e desenvolvimento da galha gerando estruturas complexas e simétricas (Raman 2007), processos estes que frequentemente envolvem hipertrofia celular e hiperplasia dos tecidos (Isaias 1998, Oliveira *et al.* 2006). Estes processos, entretanto somente ocorrem após a rediferenciação celular (Isaias e Oliveira 2010), processo através do qual as células do tecido hospedeiro retomam uma condição meristemática, diferenciando-se nos tecidos da galha em um momento subsequente. As relações inseto-planta que levam ao desenvolvimento de galhas são, comumente, espécie-específicas (Redfern e Askew 1992) e a forma final da estrutura é considerada como o fenótipo estendido do galhador (*sensu* Dawkins 1982).

Segundo Rohfritsch (1992), a determinação da forma da galha depende diretamente do modo como o galhador exerce suas atividades alimentares, sendo galhas esféricas, por exemplo, resultado de uma alimentação randômica dentro da câmara larval. Entretanto, galhadores com diferentes padrões alimentares geram galhas com formas similares, enquanto outros com padrões alimentares semelhantes geram formas distintas.

Estudos que envolvem a comparação entre o desenvolvimento padrão do vegetal e da galha vêm sendo conduzidos na flora neotropical (cf. Moura *et al.* 2008, Oliveira e Isaias 2010a). Estes estudos permitem utilizar as galhas como microlaboratórios naturais para análise de ciclos celulares e revelam a importância da detecção das origens e destinos das diferentes linhagens envolvidas na estrutura da galha. A partir dessas análises, é possível ainda, quantificar o grau de hipertrofia celular e sua direção de expansão, demonstrando como ocorre a definição da estrutura final da galha.

As galhas de insetos sugadores são sabidamente mais simples estruturalmente do que as galhas de insetos mastigadores e raspadores (Rohfritsch 1992), sendo estas diferenças atribuídas aos diferentes hábitos alimentares dos galhadores e à sua

fisiologia. Desta forma, torna-se interessante o estudo das diversas estruturas das galhas a fim de se elucidar o modo pelo qual o desenvolvimento padrão dos vegetais é alterado pelos seus galhadores.

O estudo do desenvolvimento das folhas de *Psidium myrsinoides* e galhas foliares elipsóides de *Neotrioza* cf. *tavaresi*, foi realizado para responder as seguintes questões: (1) Como a indução das galhas foliares afeta o desenvolvimento padrão do órgão hospedeiro em relação a formas e funções celulares? (2) Quais as variações volumétricas das linhagens celulares neoformadas e como elas contribuem para o crescimento das galhas e novas funções de seus tecidos? (3) Como as direções de divisão e alongamento celulares determinam o formato final da galha?

Materiais e métodos

Área de estudo

A população de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) estudada no período de 2009 e 2010 se encontra ao longo de uma trilha a 1290m de altitude, cerca de 2km da sede do parque da Serra do Caraça (20°06'22"S - 43°29'42"O), uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (IBAMA Portaria 32/94N Decreto 98.914), localizada do município de Catas Altas, MG. Indivíduos (n=12) foram marcados para a coleta de folhas não galhadas (FNG) e galhas (G), com periodicidade mensal.

Análises estruturais

Para a preparação de lâminas permanentes, galhas e folhas não galhadas (n = 5) em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas aleatoriamente entre os indivíduos e fixadas em Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (O'Brien e McCully 1981). Parte deste material foi desidratado em série butílica crescente (Johansen 1940), incluído em Paraplast® (Kraus e Arduin 1997) em estufa a 60°C e cortado em micrótomo rotatório (Jung biocut). Outra parte foi desidratada em série etílica crescente (Johansen 1940) e incluída em glicolmetacrilato (Leica®) segundo especificação do fabricante. Para destacamento de epidermes, porções de 0,5 cm² de

folhas sadias e de galhas foram cortadas e colocadas para dissociação em solução de Jeffrey (ácido nítrico 10% e ácido crômico 10%, 1:1, v/v) (Johansen 1940).

Folhas jovens portando ovos e estágios iniciais de desenvolvimento de galhas foram coletadas, fixadas em Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH7,2) (O'Brien e McCully 1981), lavadas em tampão fosfato, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2h, lavadas em água destilada e desidratadas em série etílica crescente (Johansen 1940). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (BAL-TEC® CPD030), montado em *stubs* de alumínio e coberto com 30nm de ouro em metalizador (BAL-TEC® SCD050) para observação em microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO® 40).

Citometria e histometria

As análises citométricas e histométricas foram feitas a partir de imagens digitais obtidas em fotomicroscópio óptico Zeiss Primo Star. Nestas, foram medidas as áreas celulares da protoderme nas faces adaxial e abaxial, dos meristemas adaxial, mediano e abaxial, bem como dos tecidos derivados destes quando da formação da galha, com auxílio do programa AxioVision, Zeiss Imaging Systems, versão 4.7.2 (Zeiss 2008). O número de cavidades secretoras por área (0,37 mm²) bem como sua área total (lume + epitélio secretor) foram avaliados em folhas não galhadas e galhas maduras.

Análises estatísticas e representação gráfica

Análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa JMP (SAS Institute, US, 1989-2002). Foram feitos testes de normalidade (Teste de Shapiro Wilk) e, quando satisfatório, os dados foram comparados por ANOVA ou teste *t* de Student, seguido de testes múltiplos de Tukey. Dados não normais foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn. Em todos os testes utilizou-se $\alpha = 0,05$. Os gráficos foram gerados pelo programa GraphPad Prism® para Windows, versão 5.0 (Motulsky 1992-2009).

Resultados

Características Gerais

Psidium myrsinoides é uma planta de porte arbustivo a sub-arbóreo cujas folhas são simples e de filotaxia oposta, emergindo aos pares a partir do meristema apical (Fig. 1). Na maturidade, elas são glabras, membranáceas, de bordo inteiro, limbo obovado a oblongo com ápice agudo, base cuneada e pecíolo curto. No mesofilo, as glândulas subepidérmicas são conspícuas, visualizadas como pontos verde-claros no limbo. Ninfas de primeiro ínstar de *Neotrioza* cf. *tavaresi* induzem galhas abertas na superfície adaxial de folhas jovens (Fig. 1b). Com o seu desenvolvimento, as galhas evaginam, projetando-se para a superfície abaxial e assumindo forma elipsóide (Fig. 1c). Sua parede é relativamente fina e a câmara ampla, abrigando um único indutor (Fig. 1d).

Ontogenia das folhas de Psidium myrsinoides

Os cortes transversais e longitudinais do ápice caulinar revelam o padrão de diferenciação e desenvolvimento das folhas, órgãos hospedeiros das galhas. O promeristema apresenta um esquema de organização com túnica composta de três camadas de células (C1, C2 e C3) e corpo caracterizado por um conjunto de células localizado abaixo da túnica (Fig. 2a). As células da túnica na zona central tipicamente apresentam divisões anticlinais enquanto que no corpo essas divisões ocorrem em diversos planos. Os primórdios foliares emergem aos pares a partir das zonas periféricas (Fig. 2a), revestidos por protoderme na qual se diferenciam tricoblastos que, por sua vez, originam tricomas tectores unicelulares nos bordos da lâmina foliar. Abaixo da protoderme é possível distinguir o meristema fundamental e um cordão procambial que originará a nervura de primeira ordem (Fig. 2b). Na região proximal aos bordos, se diferenciam as iniciais marginais e submarginais que dão origem, nos primórdios foliares, à protoderme e ao meristema fundamental e procâmbio, respectivamente (Fig. 2c, d).

O desenvolvimento da lâmina foliar, no primeiro e segundo nós, se dá através do incremento de divisões celulares em linhagens de células vindas das iniciais

marginais e submarginais. No meristema fundamental, nota-se a formação de três zonas distintas entre si, denominadas: meristema adaxial (MAD) constituído de uma camada de células, meristema mediano (MED) constituído de três camadas de células e meristema abaxial (MAB) constituído de duas camadas de células. Os meristemas adaxial e abaxial possuem características semelhantes, com células maiores e citoplasma menos denso, quando comparado ao meristema mediano (Fig. 2e). A partir deste, se diferenciam cordões procambiais que dão origem às nervuras de segunda ordem.

No terceiro nó, as folhas já não envolvem o ápice e os primórdios em desenvolvimento, e perdem os tricomas tectores marginais. O mesofilo apresenta uma camada adicional de células, proveniente de divisões periclinais do MAD. As células do MED e MAB se expandem, mantendo o número de camadas (Fig. 2f). O procâmbio das nervuras de primeira e segunda ordem está em processo de diferenciação. No quarto nó, o MAB passa por divisões periclinais, originando uma nova camada de células, enquanto que as células do MAD se expandem. Neste estágio, são observados os primeiros elementos de protoxilema maduros nas nervuras de primeira ordem. No quinto nó, ocorre uma nova divisão periclinal das células do MAD, o que faz com que o mesofilo seja formado por nove camadas, igualmente distribuídas em número pelas três diferentes zonas (Fig. 2g). As nervuras de primeira ordem já apresentam xilema e floema maduros. No sexto nó, a lâmina foliar completa seu desenvolvimento com a diferenciação do parênquima paliçádico com duas camadas celulares em posição adaxial derivadas do MAD. A camada interna do MAD, juntamente com MED e MAB, originam o parênquima lacunoso em posição abaxial (Fig. 2h). A epiderme completamente diferenciada possui maior espessamento da parede periclinal externa, com estômatos tipicamente paracíticos localizados exclusivamente em sua face abaxial (Fig. 3a-c). A nervura de primeira ordem apresenta crescimento secundário, arranjo biclateral, fibras perivasculares, parênquima cortical e colênquima subepidérmico desenvolvido (Fig. 3d, e).

A diferenciação de glândulas subepidérmicas ocorre ao longo do desenvolvimento em ambas as faces foliares, apresentando diversos estágios em um mesmo órgão independente do seu grau de diferenciação. Sua formação tem início

quando uma célula protodérmica de citoplasma mais denso do que as demais se alonga (Fig. 3f) em direção ao mesofilo e passa por uma divisão periclinal mediana. A célula filha basal passa por uma segunda divisão periclinal, desta vez desigual. Neste ponto, a estrutura é constituída por uma célula apical, uma célula mediana pequena e achatada e uma célula basal (Fig. 3g). A célula basal passa, então, por sucessivas divisões, expandindo-se e aumentando o número de células, que se afastam umas das outras (Fig. 3h). As células do MAD e/ou do MAB são estimuladas a diferenciarem-se, acompanhando o crescimento das células de origem protodérmica, formando uma bainha. No estágio final de desenvolvimento, as células de origem protodérmica se afastam, caracterizando o processo esquizógeno de formação da cavidade (Fig. 3i).

Ontogenia das galhas de Neotrioza cf. tavaresi

As fêmeas adultas de *Neotrioza cf. tavaresi* põem seus ovos ornamentados com um grande flagelo nos bordos de folhas jovens (Fig. 4a). Este ovo apresenta um pedúnculo, estrutura esta que é inserida por entre as células da folha, assegurando a sua afixação. O ato da oviposição desencadeia o acúmulo de fenólicos na região próxima ao pedúnculo e, por vezes, morte de algumas células (Fig. 4b). Após eclodirem, as ninfas de primeiro ínstar deixam o bordo foliar e se instalam na superfície adaxial dando início à atividade alimentar, estímulo o qual desencadeia a indução da galha (Fig. 4c, d). Nesse estágio, é possível observar o estilete da ninfa inserido no tecido vegetal em direção aos feixes vasculares (Fig. 4e). O tecido foliar responde à atividade do inseto iniciando a formação de emergências derivadas da epiderme da face adaxial e da primeira camada de células do MAD ao redor da ninfa. Estas células, que apresentam acúmulo diferencial de fenólicos quando comparados às células subjacentes, se alongam anticlinalmente e dividem-se periclinalmente. Na epiderme, as células conservam sua forma, a despeito da ocorrência de divisões periclinais, não usuais nesta camada de células (Fig. 4f).

Em um estágio subsequente, as emergências crescem sobre o corpo da ninfa de primeiro ínstar, obliterando o ostíolo da galha (Fig. 5a, b). Em corte transversal, é possível observar a ninfa de primeiro instar rodeada pelos tecidos vegetais, com a fenda do ostíolo voltada para a superfície adaxial (Fig. 5c). Frequentemente, neste

local, as células derivadas da epiderme e da primeira camada do MAD se lignificam (Fig. 5d). As duas outras camadas do MAD se dividem periclinalmente e se alongam anticlinalmente (Fig. 5e). Forma-se, por consequência, uma protuberância na folha que se projeta em direção à superfície abaxial. Concomitantemente, as células derivadas do MED e MAB dividem-se em diversos planos, resultando em um parênquima homogêneo que compõe o córtex da galha (Fig. 5f). Na periferia da câmara ninfal, a epiderme se divide e se alonga apenas acompanhando o crescimento do órgão. Da mesma forma, o fazem as células derivadas do MAD que, nesta região, não apresentam características hiperplásicas e/ou hipertróficas pronunciadas. Desta forma, o mesofilo da galha essencialmente deriva dos tecidos advindos do MAD, que origina o córtex interno; do MED, que origina o córtex mediano próximo à câmara ninfal e onde se diferenciam os feixes vasculares; e do MAB que origina o córtex externo, onde se diferenciam as glândulas de óleo essencial (Fig. 5f).

Na sequência do seu desenvolvimento, a galha de *Neotrioza* cf. *tavaresii* aumenta gradativamente de tamanho, concomitantemente ao desenvolvimento das ninfas do indutor, formando uma câmara ampla, que ocupa a maior parte da secção transversal da estrutura. Esse crescimento implica no aumento na espessura do córtex da galha, aumento este que se dá pela expansão celular, mantendo um número fixo de camadas. Estas camadas celulares se tornam gradativamente mais longas, se dividem anticlinalmente, acompanhando o crescimento do órgão. Durante o período de transição entre as fases de crescimento e desenvolvimento e maturação, quando o inseto está prestes a atingir a fase adulta, são notadas mudanças no parênquima cortical da galha. A primeira delas, e mais evidente, é a formação de uma capa de parênquima esclerificado subepidérmico composto por cinco a seis camadas de células. Abaixo desta capa, as camadas celulares passam por processo de vacuolização (Fig. 6a, b).

No último estágio do desenvolvimento da galha, o indutor está adulto e a estrutura apresenta eventos celulares que possibilitam a sua abertura. Primeiramente, ocorre um acúmulo diferencial de substâncias fenólicas no córtex externo do topo da galha com sinais de desorganização celular (Fig. 6c). Essas células, então, entram em processo de morte, no qual seu protoplasto é consumido, culminando na colabação

das paredes celulares. Na sequência, as camadas subjacentes passam por processo de morte celular semelhante (Fig. 6d). Este processo é cadenciado e ocorre do topo da galha em direção à sua base. Os tecidos mortos na porção apical externa não suportam a tensão exercida pelos tecidos vivos e túrgidos adjacentes e se racham, formando a abertura necessária para a emergência do inseto adulto (Fig. 6e).

Observando o desenvolvimento desde a folha jovem não galhada, é possível traçar as origens dos tecidos que compõem a galha. A epiderme adaxial é derivada da face adaxial da epiderme da folha não galhada, o córtex interno é derivado do MAD, o córtex mediano é derivado do MED, o córtex externo é derivado do MAB e a epiderme abaxial é derivada da face abaxial da epiderme da folha não galhada (Fig. 7).

Citometria e histometria

A epiderme que reveste a câmara e a galha externamente mantém-se unisseriada. Suas células se expandem e alongam-se periclinalmente para acompanhar o crescimento da galha (Fig. 7). Essa expansão é tênue na fase de indução, chegando a valores aproximadamente três vezes maiores na fase de maturação quando comparados à folha não galhada (Tab. 1). O córtex interno mantém-se com duas camadas, cujas células se expandem isodiametricamente (Fig. 7). Inicialmente a expansão é discreta, dobrando o volume na fase de crescimento e desenvolvimento, chegando a ser seis vezes maior na fase de maturação (Tab. 1). Os córtices mediano e externo se expandem isodiametricamente (Fig. 7), mas em diferentes proporções. O primeiro tem seu volume aumentado em 50% na fase de indução, valor este que é aproximadamente dobrado na fase de crescimento e desenvolvimento, e triplicado na fase de maturação (Tab. 1). Já o córtex externo apresenta aumento discreto de volume na fase de indução, sendo triplicado na fase de crescimento e desenvolvimento e novamente na fase de maturação (Tab. 1). A espessura total do mesofilo apresenta aumento discreto na fase de indução, valor que é dobrado na fase de crescimento e desenvolvimento, tendo acréscimo de 50% na fase de maturação (Tab. 1). A hipertrofia dos tecidos é acompanhada pelo aumento significativo em número e em área das glândulas de óleo essencial subepidérmicas (Fig. 9a, b).

Tabela 1. Citometria e histometria das folhas não galhadas (FNG) e galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidae) em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) nas fases de indução (I), crescimento e desenvolvimento (CeD) e maturação (M) (n = 30; média \pm erro padrão; μm^2).

Amostras	Epiderme adaxial	MAD; Córtex interno	MED; Córtex mediano	MAB; Córtex externo	Epiderme abaxial	Espessura total do mesofilo (μm)
FNG	110,6 \pm 1,57c	142,2 \pm 2,48d	185,1 \pm 2,76d	136,3 \pm 2,44d	67,37 \pm 1,30d	136,5 \pm 0,52d
I	130,6 \pm 2,43b	198,8 \pm 3,65c	237,1 \pm 4,16c	194,3 \pm 3,49c	93,28 \pm 1,88c	163,8 \pm 1,63c
CeD	132,8 \pm 3,11b	335,5 \pm 7,15b	445,9 \pm 8,61b	606,2 \pm 8,18b	127,8 \pm 2,19b	372,0 \pm 4,09b
M	306,6 \pm 5,86a	907,9 \pm 15,63a	1340 \pm 23,83a	1772 \pm 27,45a	199,5 \pm 5,02a	558,9 \pm 8,30a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn) ($\alpha = 0,05$).

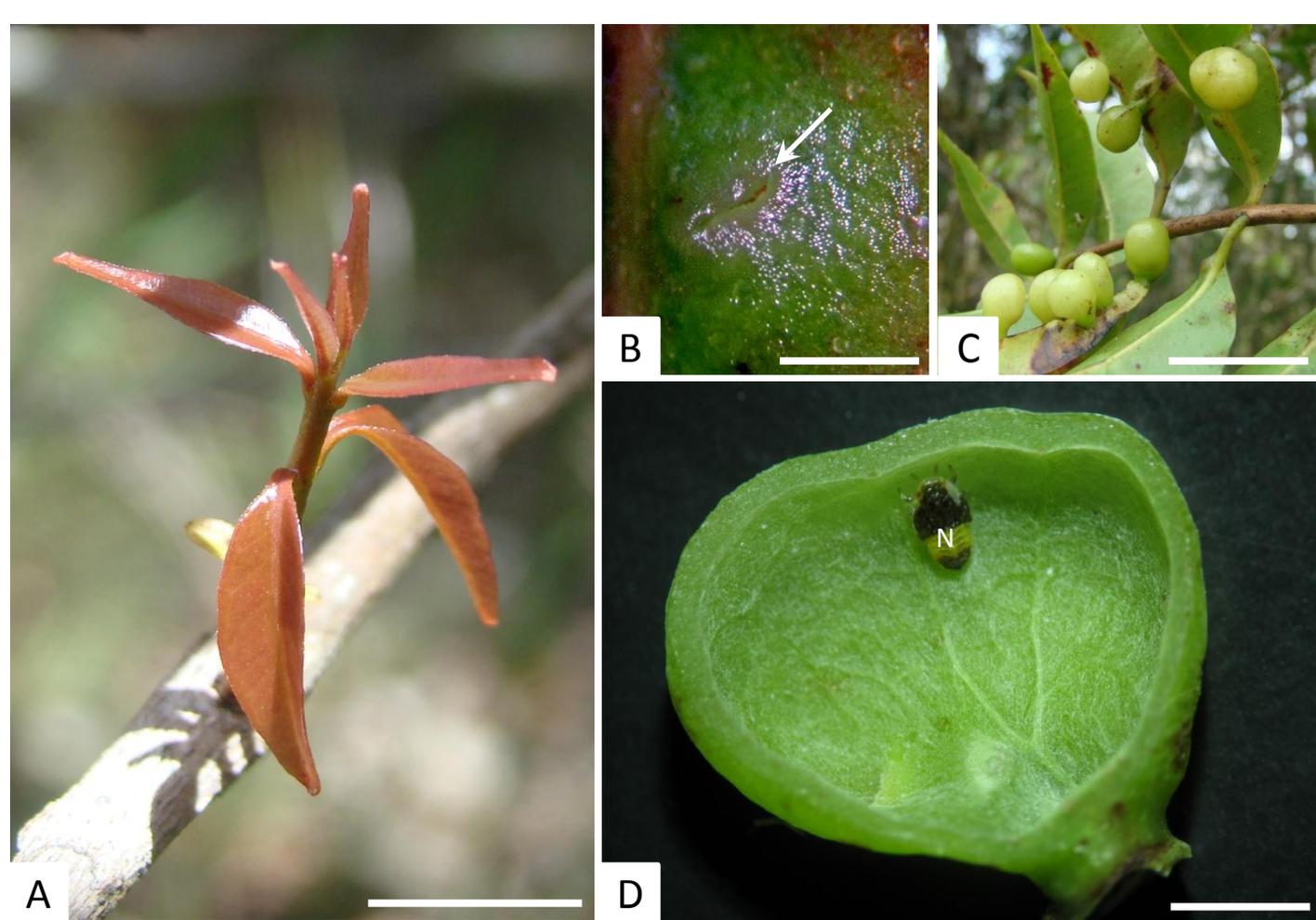
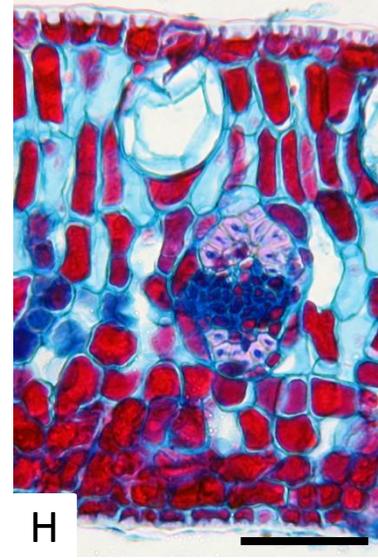
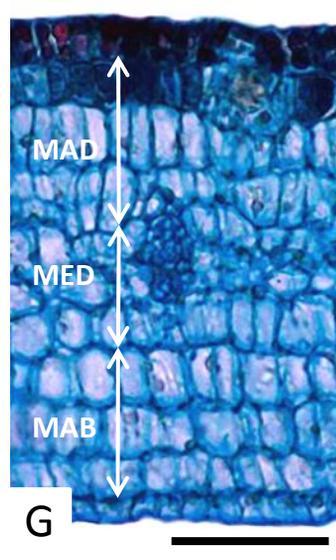
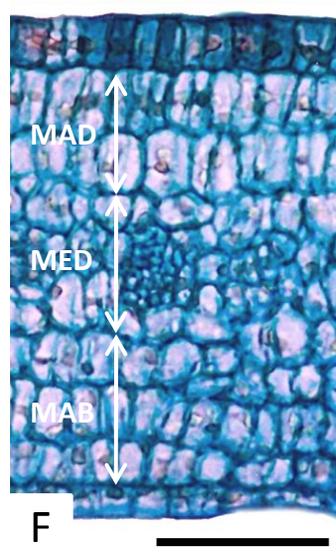
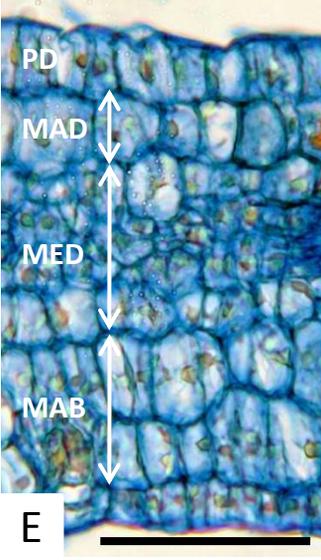
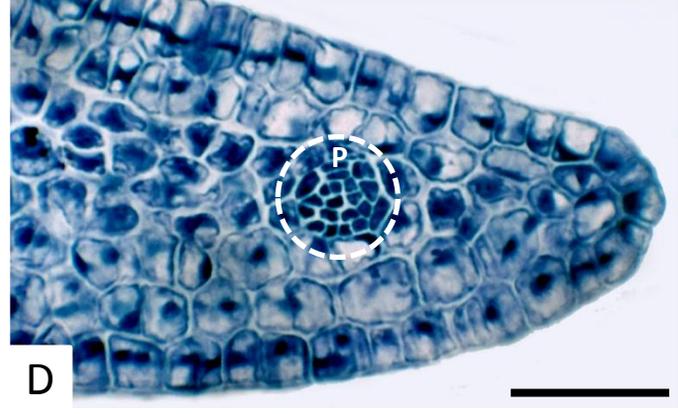
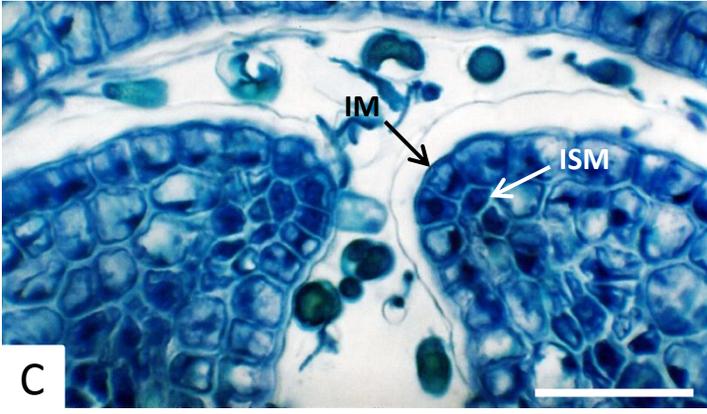
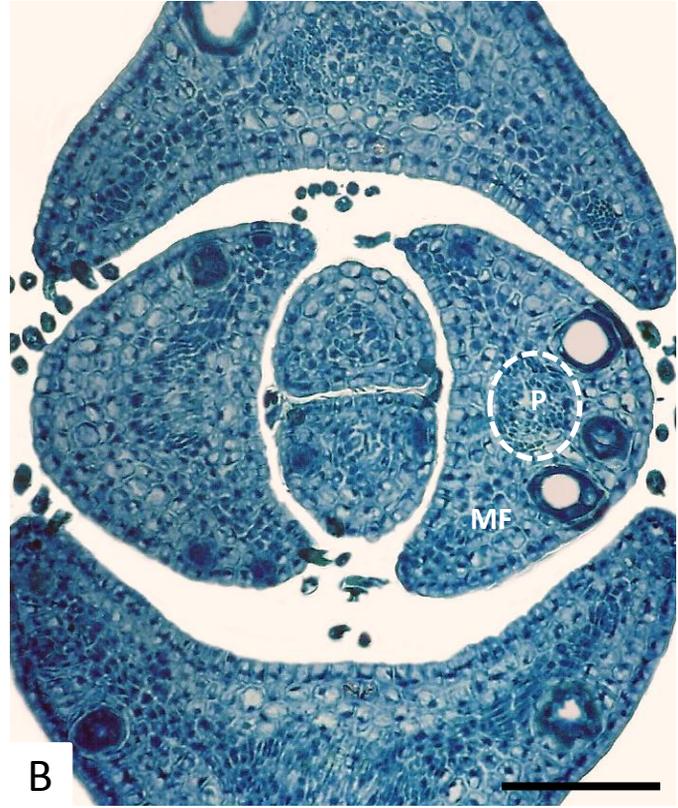
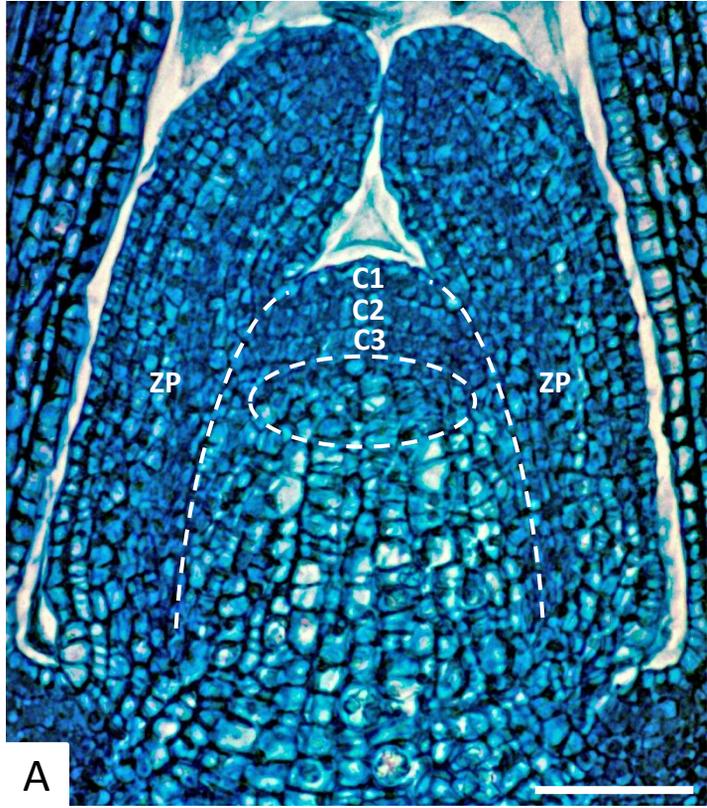


Figura 1- Aspectos gerais do sistema *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) – *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf.. A- Detalhe de folhas jovens, evidenciando formato e filotaxia; B- Detalhe de galha em fase de indução com ostíolo parcialmente fechado (seta); C- Vista geral de galhas na superfície abaxial das folhas; D- Secção transversal de galha evidenciando espessura das paredes, dimensões da câmara ninfal e ninfa do indutor. Barras: A, C- 1cm; B- 200 μ m; D- 1mm. N – Ninfa.

Figura 2- Ontogenia das folhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). A- Visão geral do corte longitudinal do ápice caulinar destacando túnica com três camadas (C1, C2, C3) e corpo (pontilhado); B- Visão geral do corte transversal do ápice caulinar evidenciando as folhas jovens opostas, protoderme com tricomas, meristema fundamental, cordões procambiais e estruturas secretoras diferenciadas a partir do segundo par de folhas; C- Detalhe das células iniciais marginais e submarginais (setas); D- Detalhe do procâmbio diferenciado a partir do meristema mediano em folíolo jovem; E-G- Detalhe do desenvolvimento de folíolos imaturos, evidenciando protoderme, meristemas adaxial, mediano e abaxial e cordões procambiais; H- Detalhe do limbo foliar maduro. Barras – A = 25 μ m; B = 50 μ m; C, D = 10 μ m; E-H = 50 μ m. IM – Iniciais marginais, ISM – Iniciais submarginais, MAD – Meristema adaxial, MAB – Meristema abaxial, MED – Meristema mediano MF – Meristema fundamental, P – Procâmbio, PD – Protoderme, ZP – Zonas periféricas.



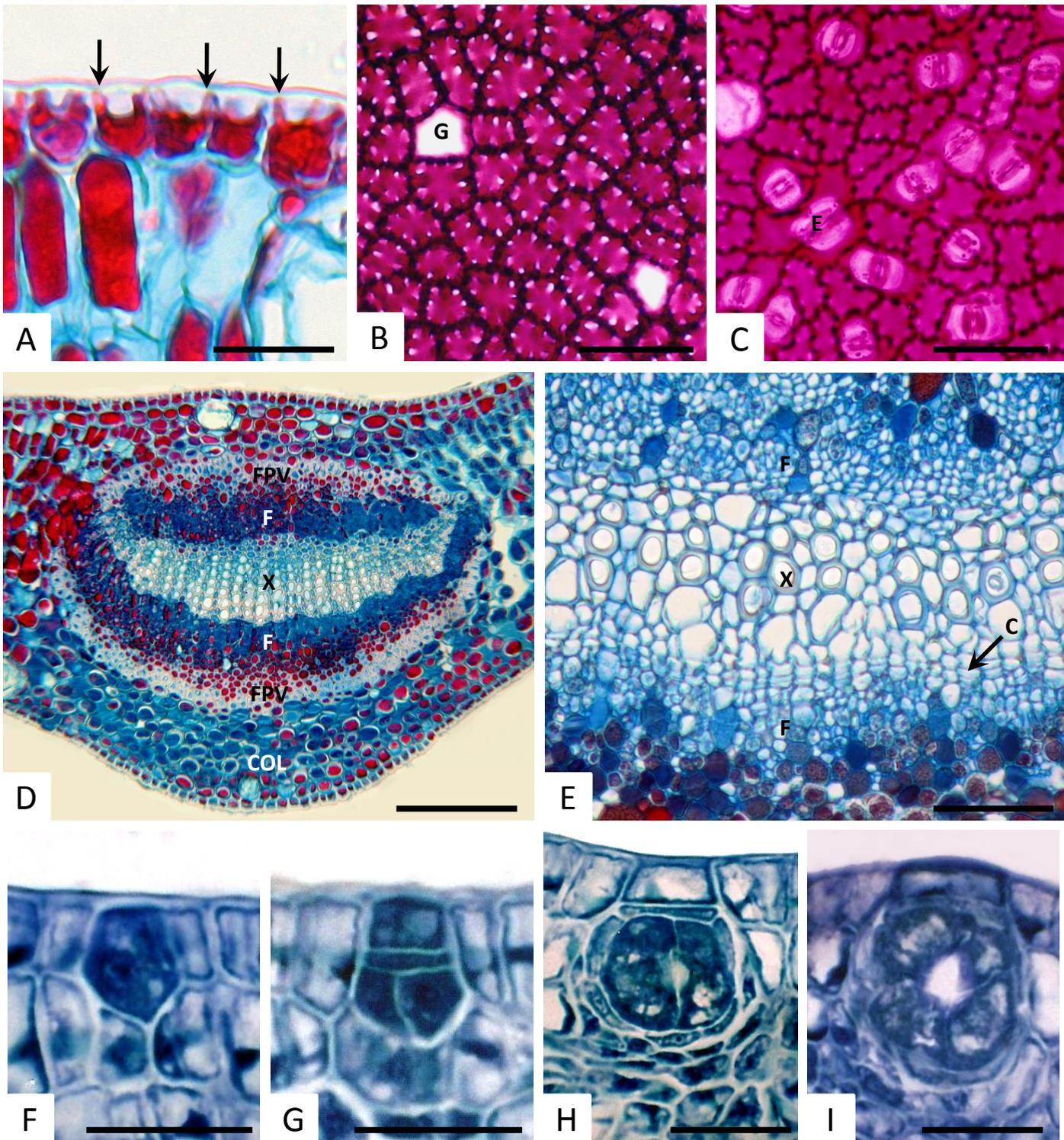


Figura 3- Ontogenia das folhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). A- Corte transversal da folha madura evidenciando espessamento parietal desigual nas células epidérmicas (setas); B- Vista frontal da face adaxial da epiderme evidenciando células do topo das glândulas de óleo essencial; C- Vista frontal da face abaxial da epiderme evidenciando estômatos paracíticos; D- Nervura principal madura evidenciando arranjo bicolateral, epiderme com paredes espessadas, colênquima subepidérmico, fibras perivasculares; E- Detalhe do sistema vascular da nervura principal em início de crescimento secundário; F-I- Detalhes do desenvolvimento das glândulas de óleo essencial evidenciando processo esquizógeno. Barras – A, B, C, E = 25µm; D = 100µm, F-I = 10µm. COL – Colênquima, E – Estômato, F – Floema, FPV – Fibras perivasculares, G – Glândula de óleo essencial, X – Xilema.

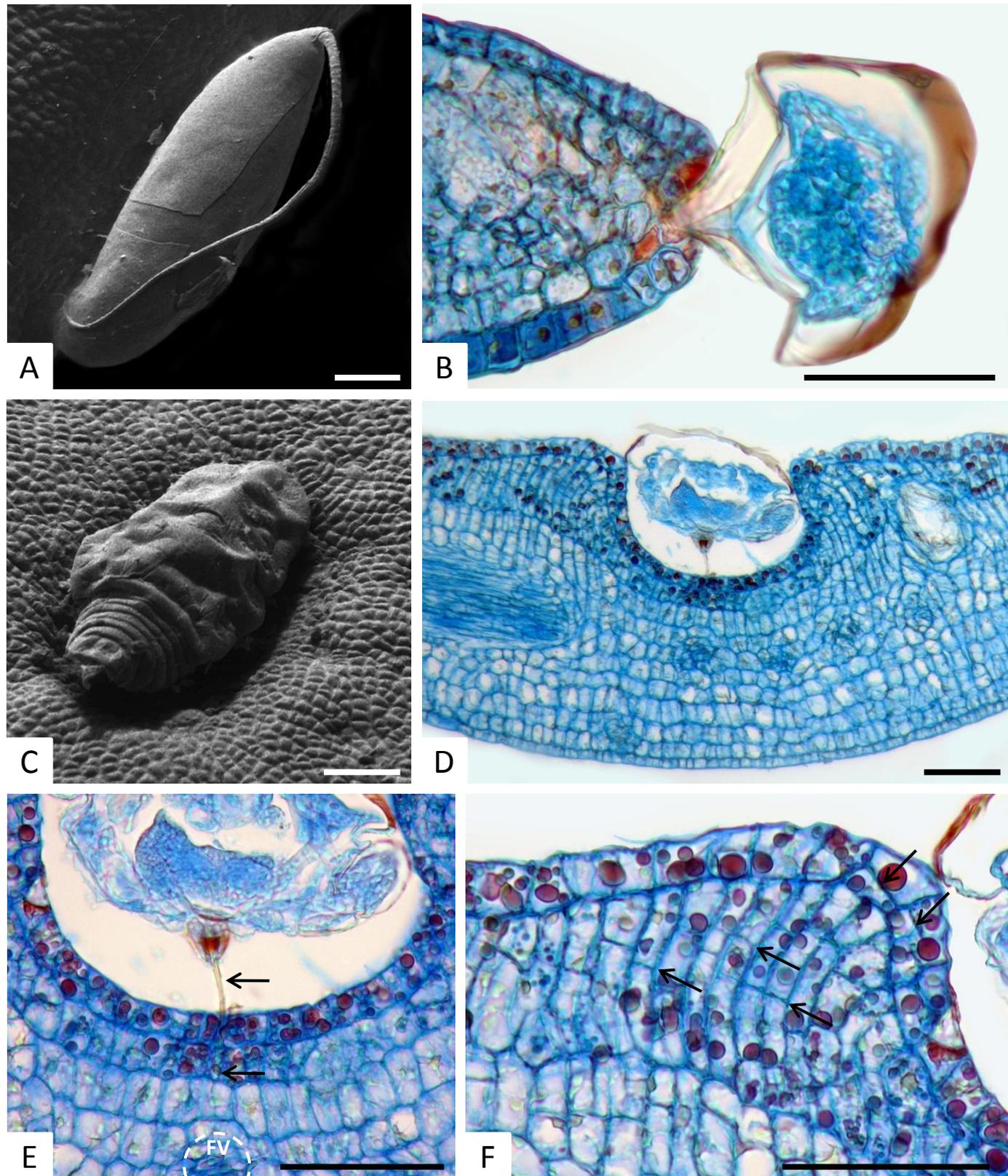


Figura 4- Ontogenia das galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf. em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). A- Micrografia eletrônica de varredura do ovo no bordo foliar; B- Corte transversal do ovo inserido na folha através de pedúnculo; C- Micrografia eletrônica de varredura evidenciando ninfa de primeiro ínstar na superfície da folha jovem; D- Corte transversal da galha em fase de indução. E- Detalhe do estilete da ninfa de primeiro ínstar inserido no tecido vegetal em direção ao feixe vascular (setas); F- Detalhe de células da face adaxial da epiderme e do meristema adaxial com divisões periclinais (setas). Barras = 50µm. FV – Feixe vascular.

Figura 5- Ontogenia das galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). A, B- Micrografia eletrônica de varredura de estágios sucessivos da obliteração do ostíolo; C- Corte transversal da galha em estágio de crescimento e desenvolvimento evidenciando a obliteração do ostíolo; D- Detalhe da lignificação nos tecidos na região do ostíolo vista em luz polarizada; E- Detalhe do alongamento anticlinal da células derivadas do MAD na região lateral ao ostíolo; F- Corte transversal do mesofilo da galha com as regiões do córtex externo, córtex mediano e córtex interno. Barras: A = 30 μ m; B, E = 50 μ m; C, D, F = 100 μ m. CE- Córtex externo, CI- Córtex interno, CM- Córtex mediano, FV- Feixe vascular, G- Glândula de óleo essencial, N- Ninfa.

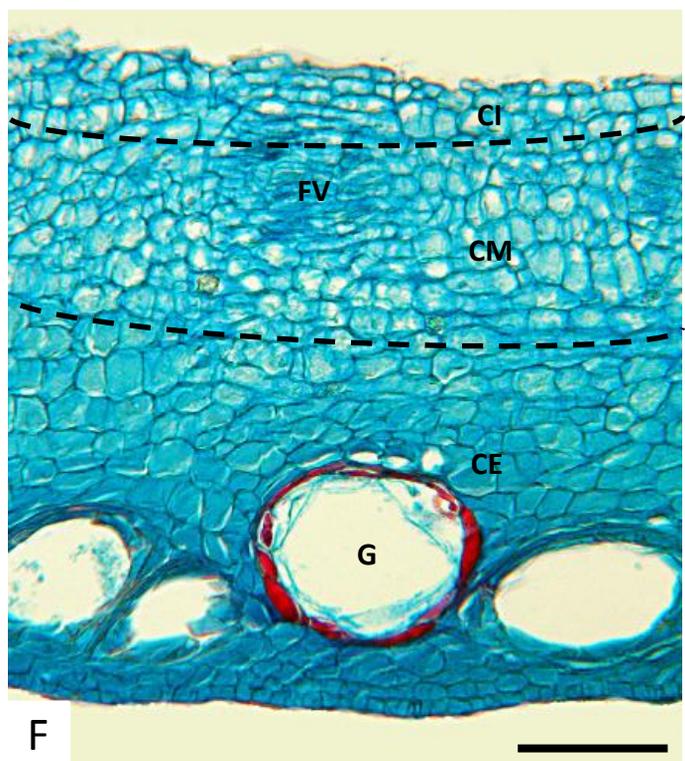
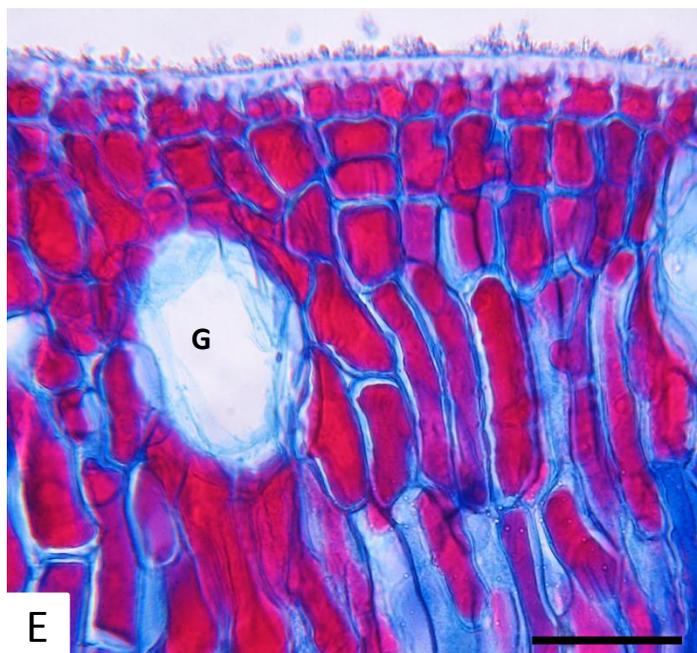
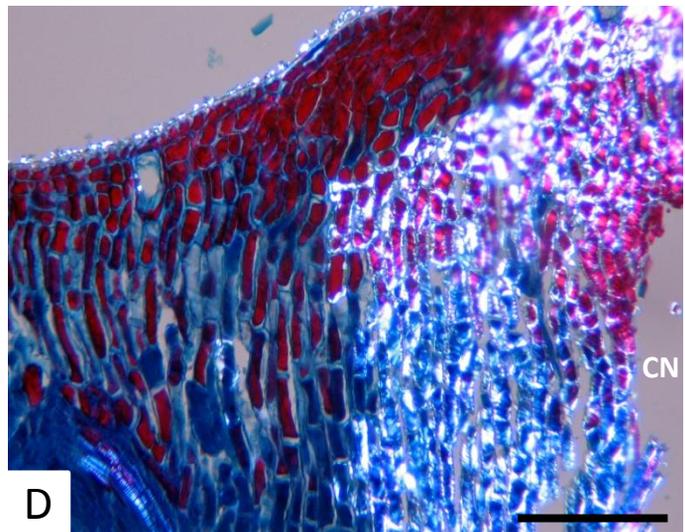
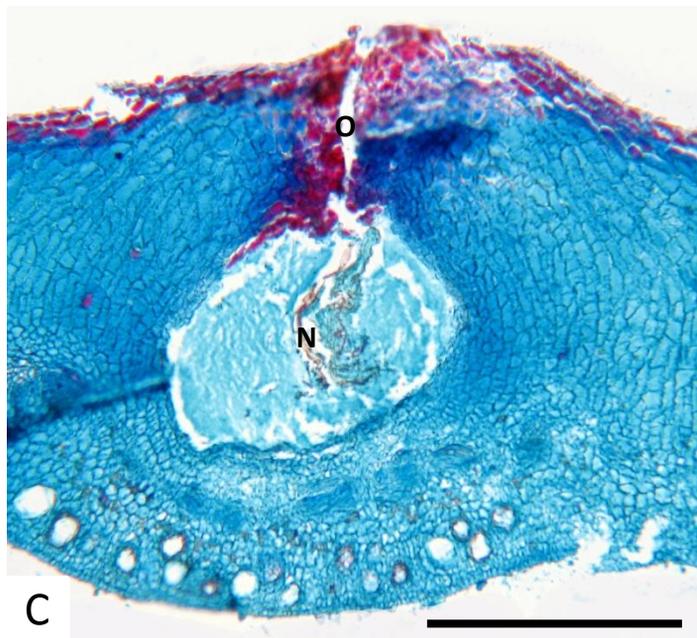
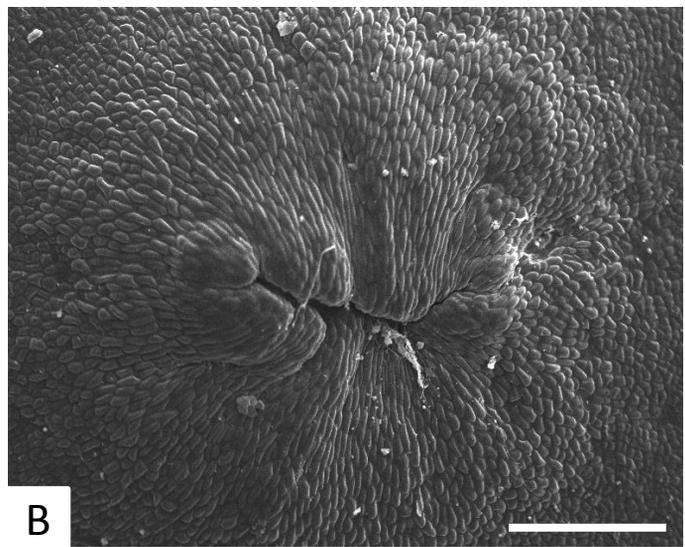
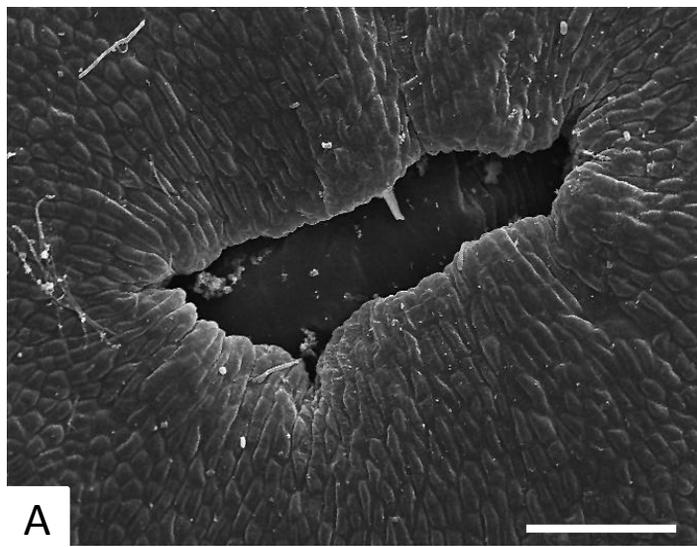
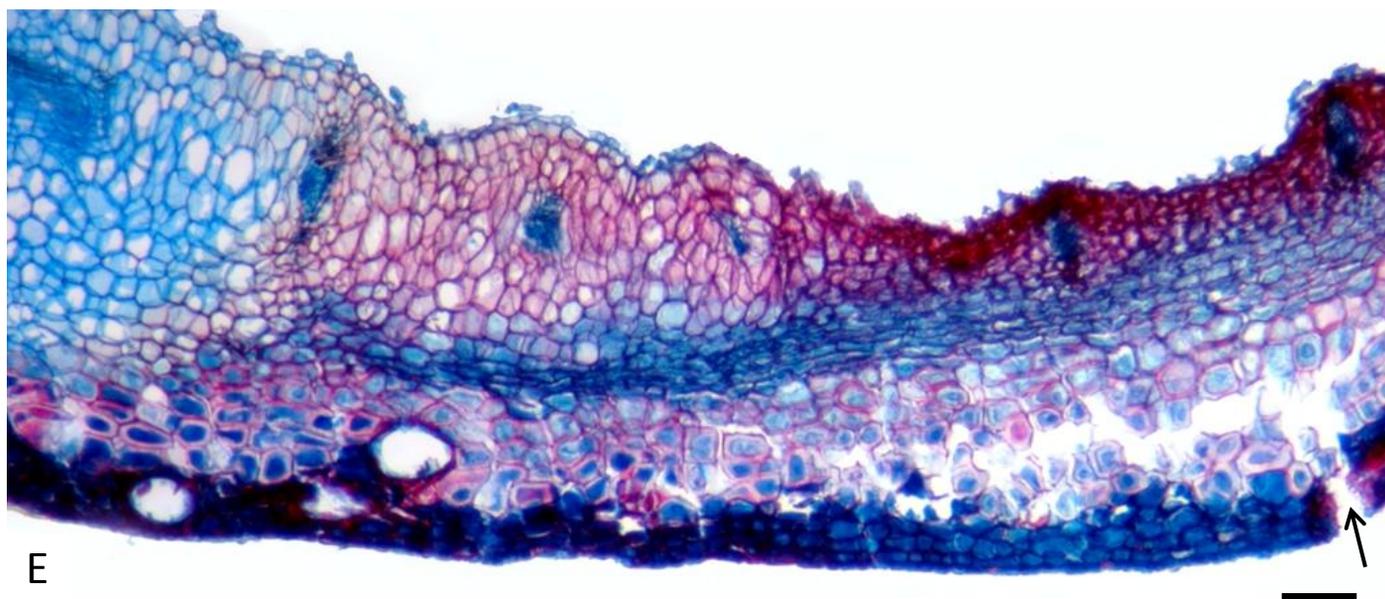
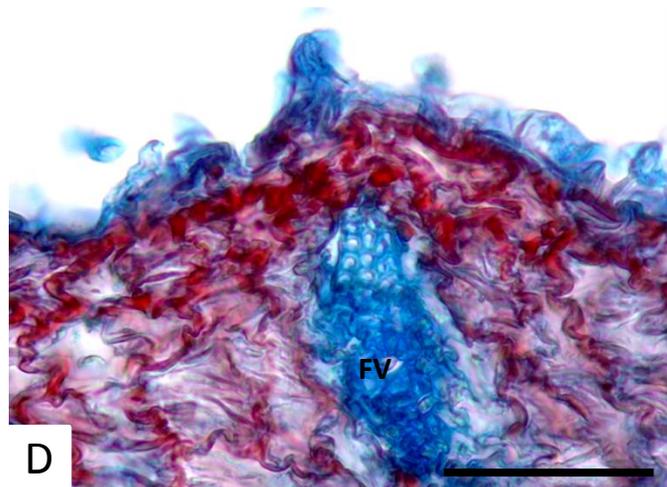
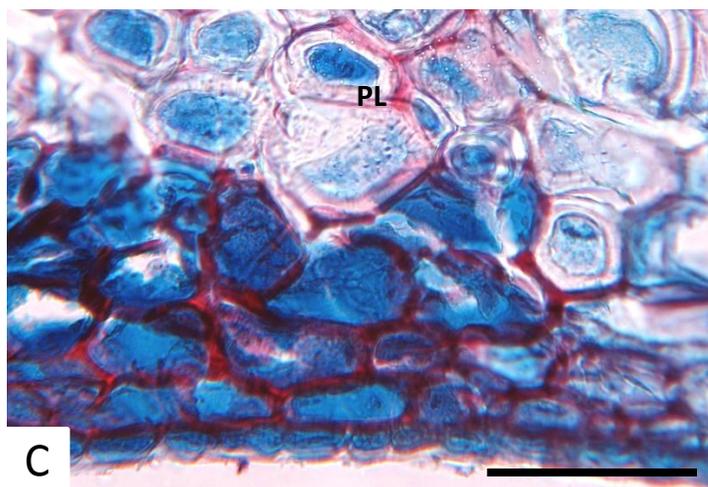
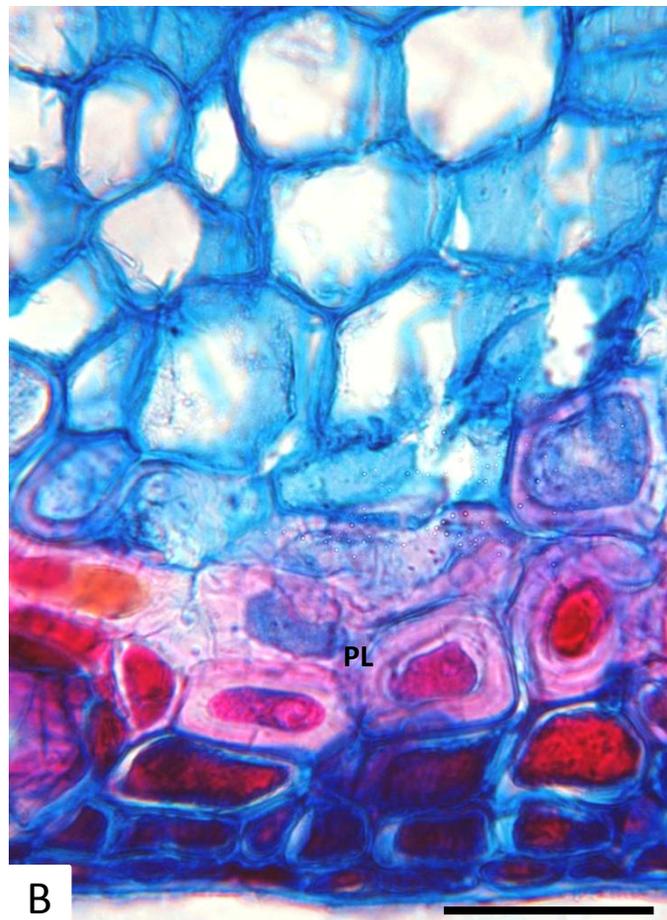


Figura 6- Ontogenia das galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf.. A- Corte transversal do mesofilo da galha madura; B- Detalhe do córtex externo da galha madura evidenciando capa esclerenquimática e vacuolização do parênquima adjacente; C- Detalhe do início de acúmulo de fenólicos e desorganização celular no córtex externo da galha senescente; D- Detalhe das células colabadas no córtex interno da galha senescente resultante de morte celular; E- Corte transversal do mesofilo da galha senescente evidenciando a concentração gradual de fenólicos e eventos de morte celular culminando em rachaduras (seta) na parede da galha. Barras: A, E = 100µm; B, C, D = 50µm. CE- Córtex externo, CI- Córtex interno, CM- Córtex mediano, FV- Feixe vascular, G- Glândula de óleo essencial, N- Nínfa, PL- Parênquima lignificado.



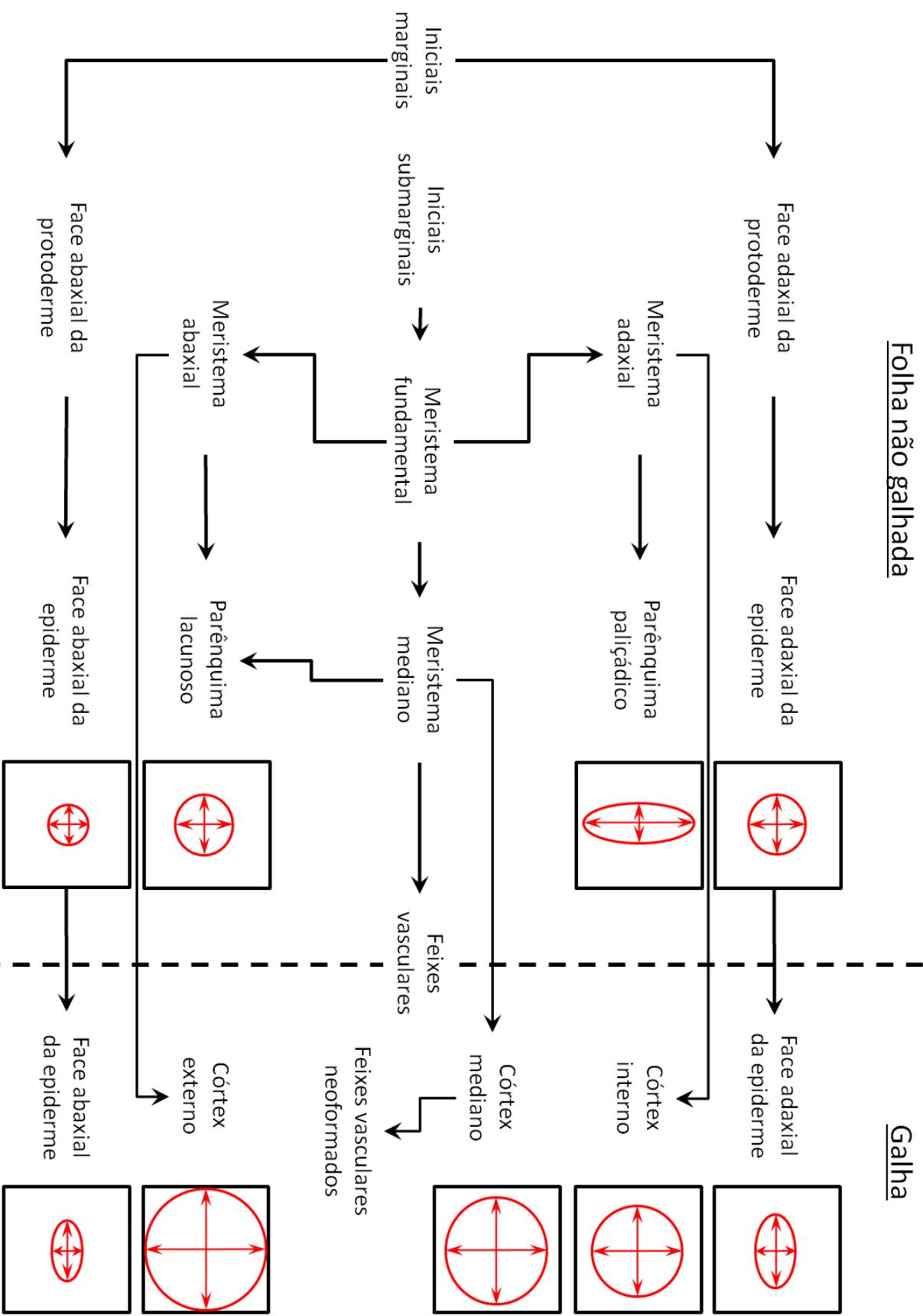
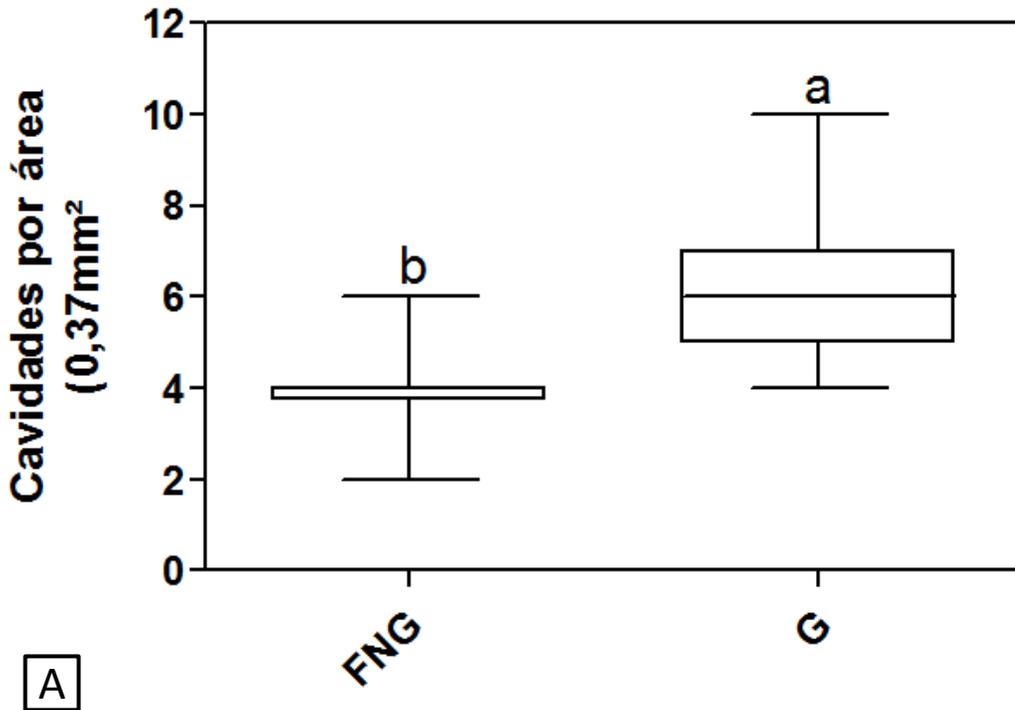


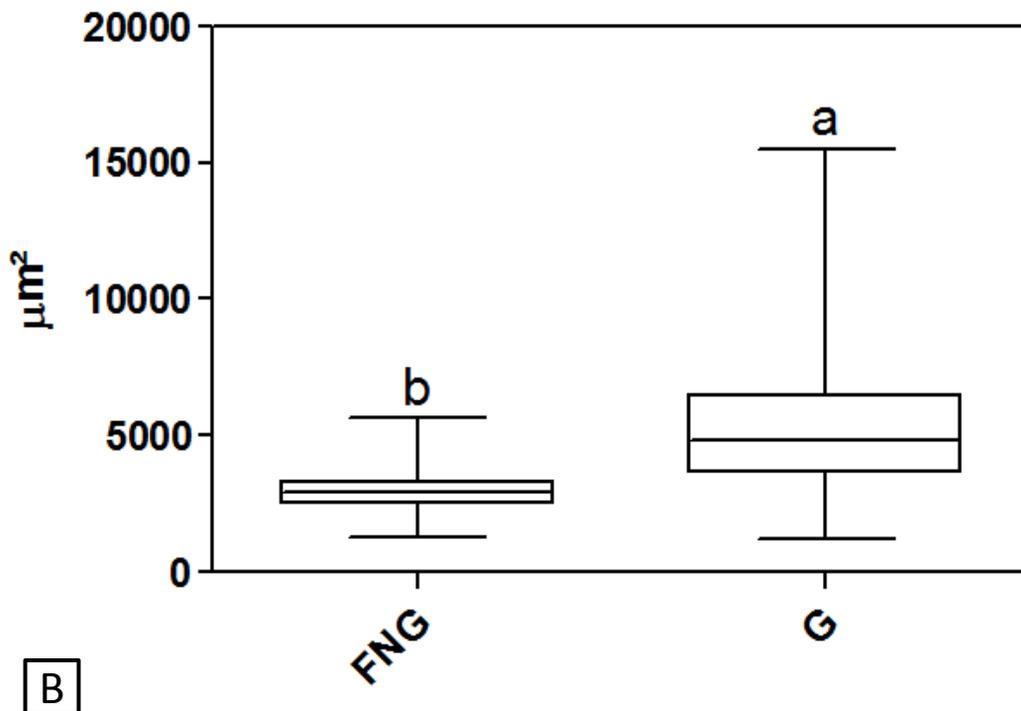
Figura 7- Diagrama da ontogenia das folhas de *Psidium myrsinooides* O. Berg (Myrtaceae) e galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. mostrando as origens e destinos celulares e as direções de alongamento em cada camada celular (caixas).

Número de glândulas de óleo essencial



A

Área de glândulas de óleo essencial



B

Figura 8- Aspectos histométricos das glândulas de óleo essencial das folhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) e das galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf.. A – Número de glândulas de óleo essencial por campo de 0,37 mm² em folhas não galhadas e galhas; B – Área das glândulas de óleo essencial (células secretoras e lume) em folhas não galhadas e galhas. As caixas rotuladas com letras iguais não diferiram significativamente pelo teste *t* de Student, $P < 0,05$. FNG- Folha não galhada, G- Galha.

Discussão

Características gerais

Neotrioza cf. tavaresi altera o desenvolvimento padrão das folhas hospedeiras de *Psidium myrsinoides* com a indução de galhas abertas por ninfas de primeiro ínstar. Ao contrário de insetos galhadores cujos ovos constituem o primeiro fator determinante da cecidogênese, as galhas de psiloídeos são induzidas por ninfas de primeiro instar, o que é relatado por Burckhardt (2005) como típico dos sistemas envolvendo psiloídeos. O fato de serem abertas, entretanto, é uma característica reportada na literatura também para diversos outros *taxa* de galhadores (Mani 1964, Gonçalves *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2006, Moura *et al.* 2008, Oliveira e Isaias 2009), havendo diferentes estratégias para a manutenção de um microclima dentro da estrutura.

Ontogenia das folhas de Psidium myrsinoides e galhas de Neotrioza cf. tavaresi

O promeristema apical de *P. myrsinoides* é similar ao de outras espécies relatadas por Fahn (1990) que apresentam túnica e corpo com zonação específica e dinâmica similar de divisões celulares. O desenvolvimento foliar segue o padrão de folhas simples opostas, que é característica da família botânica à qual pertence e a diferenciação dos tecidos primários é similar ao proposto por Foster (1936) para *Pelargonium zonale*. Mais recentemente, estudos ontogênicos da flora neotropical obtiveram resultados similares para os folíolos de *Copaifera lagsdorffii* (Oliveira e Isaias 2010a), folhas de *Schinus polygamus* (Dias 2009) e de *Lantana camara* (Moura *et al.* 2008). Nestes modelos, a protoderme origina a epiderme; o MAD, o parênquima paliçádico; o MED origina o tecido vascular e parte do parênquima lacunoso, o qual é também parcialmente originado também pelo MAB.

O recrutamento de tricoblastos e diferenciação de tricomas ocorrem precocemente na morfogênese das folhas de *P. myrsinoides*. Essa é uma característica comum de tecidos jovens, seja para proteção mecânica contra agentes externos, bióticos e abióticos, ou química, no caso de tricomas glandulares (van Dam e Hare 1998). Quando a folha inicia sua expansão e altera sua posição de ereta para

perpendicular ao eixo caulinar, os tricomas caem, assim como descrito por Oliveira e Isaias (2010a) em *Copaifera langsdorffii*.

As glândulas subepidérmicas secretoras de óleos essenciais constituem uma característica típica das Myrtaceae. Em *Psidium myrsinoides*, estas têm origem na protoderme, com processo esquisógeno de desenvolvimento, reiterando o padrão da família (Brocheriou e Belin-Depoux 1974). A presença das glândulas desde as folhas jovens até a maturidade pode estar ligada à proteção contra agentes patogênicos e herbivóricos, uma vez que essas estruturas podem produzir, armazenar e secretar diversas substâncias do metabolismo secundário (Apel *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010, Vila *et al.* 2010). De forma semelhante, a presença de idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio pode representar uma forma adicional de defesa contra herbivoria (Fernandes 1994) ao diminuir a palatabilidade dos tecidos. Ainda, estas estruturas podem desempenhar importante papel na regulação do cálcio livre, além de proporcionar suporte ou mesmo um mecanismo de desintoxicação ao armazenar oxalato de cálcio (Nakata 2003).

Apesar desses componentes antiherbivóricos, as fêmeas de *Neotrioza cf. tavaresi* são capazes de ovipositar com sucesso nos bordos, possivelmente porque o fazem externamente aos tecidos foliares. No processo de inserção do pedúnculo do ovo por entre as células do mesofilo, ocorrem reações de hipersensibilidade à oviposição, evento caracterizado pela necrose dos tecidos adjacentes ao agente estressante (Fernandes *et al.* 2003, Hilker e Meiners 2006). Estas alterações, no entanto, não constituem o início da cecidogênese, uma vez que não é este o sítio de desenvolvimento da galha, ao contrário do observado por Dias (2009) em estudo conduzido com uma espécie de Psylloidea em *Schinus polygamus* e em outros sistemas galhador-planta hospedeira (Rohfritsch 1992, Hilker e Meiners 2006).

No início da formação da galha, os tecidos primariamente responsivos, ou seja, epiderme e MAD, apresentam maior concentração de substâncias fenólicas quando comparados aos adjacentes. Possivelmente, esses compostos cumprem papel importante na fisiologia das células em questão, e conseqüentemente na morfogênese

da galha. Fenóis são sabidamente reguladores de AIA oxidases, enzimas estas que modulam a concentração de hormônios de crescimento (Hori 1992).

O fechamento da galha com a formação do ostíolo envolve processos já reportados na literatura para galhas de Psilóideos (Oliveira *et al.* 2006), com algumas variações. Dias (2009) observou o recrutamento de tricoblastos na região do ostíolo de galhas de *Schinus polygamus*, resultando na neoformação de tricomas que obliteram a passagem estreita. Neste sistema, a folha hospedeira é pilosa, sendo esta característica potencializada no campo cecidogênico. Similarmente, a condição glabra das folhas maduras de *P. myrsinoides* é conservada durante o desenvolvimento da galha, o que constitui um limite morfogênico imposto pela planta hospedeira, como proposto por Weis *et al.* (1988). Ainda nesta fase inicial do desenvolvimento, é notada a perda da orientação das divisões celulares da epiderme, anteriormente estritamente anticlinais, passando também a ocorrerem divisões periclinais. Isso determina o aparecimento de sítios discretos de hiperplasia epidérmica como observado por Moura *et al.* (2008) em *Lantana camara* e Gonçalves (2003) em *Rollinia laurifolia*. A alteração deste tipo de padrão fortemente conservado nos vegetais, suplantando os limites impostos pela planta hospedeira, revela o galhador como o causador de estresse biótico de grande amplitude, capaz de alterar um caráter vegetal bem fixado. Ademais, a galha pode ser vista como o fenótipo estendido do galhador (Weis *et al.* 1988, Stone e Schönrogge 2003).

Muito embora a indução ocorra na face adaxial, ao desenvolver-se, a galha se projeta em direção à superfície abaxial devido à hiperplasia, hipertrofia, alongamento e divisões celulares das camadas remanescente do MAD. A lignificação do ostíolo constitui um mecanismo de proteção mecânica, além de garantir a manutenção do microambiente e impedir o acesso de possíveis inimigos naturais, o que reforça o proposto por Price *et al.* (1987) e Hawkins *et al.* (1997).

O padrão dorsiventral das folhas sadias é alterado pela ação alimentar de *Neotrioza cf. tavaresi* havendo a formação de um parênquima homogêneo entremeado por feixes vasculares neoformados próximos à câmara a partir do MED e MAB. Esse tipo de organização tecidual é típico de galhas induzidas por sugadores,

tendo sido reportada por diversos autores (Oliveira *et al.* 2006, Álvarez *et al.* 2008, Moura *et al.* 2008, Oliveira e Isaias 2010b). A presença de feixes vasculares abundantes é importante para prover sítios adequados de alimentação ao galhador, incrementando suas opções nutricionais (Mani 1964, Rohfritsch 1992). Além disso, são essenciais para o desenvolvimento e manutenção do órgão neoformado (Ullrich e Aloni 2000) e para seu estabelecimento como um dreno forte no que se refere à mobilização de nutrientes (Motta *et al.* 2005).

A epiderme adaxial, que reveste a câmara, permanece unisseriada durante todo o processo de cecidogênese, apenas se dividindo anticlinalmente e alongando-se no sentido periclinal, a fim de acompanhar o crescimento da estrutura. Entretanto, no campo cecidogênico, a competência de originar cavidades secretoras é parcialmente suprimida, mantendo sua expressão somente a partir das células epidérmicas da superfície abaxial. Como resultado disso, as glândulas de óleos essenciais se concentram somente no córtex externo da galha. Considerando que os óleos essenciais podem ter atividade antimicrobiana e antiherbívora, a posição distal das glândulas em relação à câmara beneficia o indutor de duas maneiras. Primeiramente, pode evitar que herbívoros generalistas ataquem a galha e, possivelmente, repele parasitóides, aumentando a proteção do galhador. Secundariamente, evita que o próprio indutor entre em contato com essas substâncias, por vezes tóxicas e/ou impalatáveis, ao exercer sua atividade alimentar. Dessa forma, os benefícios se traduzem no abrigo contra inimigos naturais e na melhoria da qualidade das opções nutricionais para o galhador, aumentando o valor adaptativo da galha (Weis e Abrahamson 1986).

A fase de maturação da galha coincide com a principal fase trófica do indutor (Rohfritsch 1992), as células atingem o grau máximo de hipertrofia e a galha, de um modo geral, seu maior tamanho. Nesta fase, ocorre a formação de uma faixa esclerificada interiormente às glândulas de óleo essencial neoformadas, em posição mediana no córtex externo. Essa camada é originária de células do parênquima que iniciam um processo de espessamento parietal seguido de impregnação por lignina. A lignificação é uma resposta comum das plantas a diversos tipos de estresse, seja de origem biótica ou abiótica (Lee *et al.* 2007), logo sua associação com a sustentação da

estrutura e proteção do galhador (Kraus 1997, Oliveira e Isaias 2010a, Oliveira *et al.* 2010) pode ser um efeito secundário. Nas galhas de *P. myrsinoides*, o estresse biótico reponsável pela lignificação parece ser o hábito alimentar de *Neotrioza cf. tavaresi*. Segundo Gottlieb *et al.* (1995), radicais de oxigênio, formados pelo estresse da alimentação do inseto, influenciam diretamente a lignificação. Nas galhas, esses compostos são agentes que aumentam o estresse oxidativo local (Harkin e Obst 1973, Lange *et al.* 1995), possivelmente constituindo um gatilho que desencadeia tal processo.

As análises cito e histométricas corroboram o aumento gradativo do volume celular das diferentes camadas teciduais, bem como da espessura do mesofilo. Esse tipo de resposta é esperada, sendo a hipertrofia celular uma das características mais comuns entre as galhas (Mani 1964, Isaias 1998, Moura *et al.* 2008, Moura *et al.* 2009, Oliveira e Isaias 2010a). No sistema em questão, o aumento de volume ocorreu principalmente devido à hiperplasia e hipertrofia das células dos córtices externo e mediano. Muito provavelmente, essa resposta está ligada às novas funções desempenhadas pelo mesofilo, tais como barreira protetora e local de alimentação do galhador (Mani 1964, Rohfritsch 1992). O padrão de alongamento anticlinal e divisões periclinais das células do córtex interno, próximo à base, permitem a protrusão da galha, configurando-se num mecanismo eficiente para o desenvolvimento de um órgão extralaminar de grandes proporções. A ausência de características hiperplásicas pronunciadas no córtex interno assegura o acesso do galhador aos feixes vasculares, uma vez que esses se diferenciam no córtex mediano. Ainda, o aumento em número e área das glândulas de óleo essencial no córtex externo provavelmente repele cecidófagos, parasitóides ou patógenos devido à ação da secreção, aumentando a proteção do galhador.

Uma vez completo o seu desenvolvimento, os adultos de *Neotrioza cf. tavaresi* precisam sair do interior da galha para encontrar um parceiro do sexo oposto e dar continuidade à espécie, completando seu ciclo de vida. Entretanto, como são insetos sugadores, estes não estão capacitados a transpor ativamente a parede da galha, seja comendo-a ou triturando-a (Mani 1964, Rohfritsch 1992). Ao invés disso, as galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* apresentam um mecanismo de deiscência que culmina na

abertura passiva da estrutura. Neste sistema, a deiscência da galha se inicia pelo acúmulo de fenólicos, primeiramente na porção interna do córtex externo, seguido de todo o córtex. Possivelmente essas substâncias atuam como sinalizadores celulares determinantes de necrose tecidual e morte celular, como proposto por Beckman (2000). De fato, essas células entram em morte celular fazendo com que o tecido se torne seco e amarronzado. Esse processo é gradual, começando na porção distal da galha em direção à proximal, em relação à lâmina foliar. Com isso, rachaduras surgem na porção distal, provavelmente devido à tensão exercida pelas células ainda vivas e túrgidas sobre as células mortas. Essas rachaduras aumentam até que permitam a passagem do inseto adulto. Processos de deiscência com algumas similaridades foram descritos por Lima (2008) para galhas de um psiloídeo em *Richeria grandis*, por Dias (2009) em estudo com galhas de *Calophya* aff. *duvauae* em *Schinus polygamus* e por Espírito-Santo e Fernandes (2002) para *Neopelma baccharidis* em *Baccharis dracunculifolia*, o que leva a crer que exista um padrão de estímulo-reposta nos processos de deiscência de galhas induzidas por psiloídeos.

A morfogênese da galha de *Neotrioza* cf. *tavaresi* altera o padrão de desenvolvimento das folhas de *Psidium myrsinoides*, sendo caracterizada pela manipulação dos tecidos jovens em prol da melhor proteção, nutrição e aclimatização do galhador. A direção de alongamento e das divisões celulares de cada camada, bem como a sua expansão, são essenciais na determinação da forma final do órgão. Esses resultados corroboram o padrão de desenvolvimento de galhas de Psiloídeos na região Neotropical.

Agradecimentos

Os autores expressam seus agradecimentos a CAPES pelo provimento de recursos revertidos em bolsa de estudos.

Referências

- ÁLVAREZ R, ENCINA A e PÉREZ HIDALGO N (2008) *Pistacia terebinthus* L. leaflets: an anatomical study. *Plant Systematics and Evolution*, 272: 107–118.
- APEL MA, RIBEIRO VLS, BORDIGNON SAL, HENRIQUES AT e VON POSER G (2009) Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. *Parasitology Research* 105(3): 863-868.
- BECKMAN CH (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 101-110.
- BROCHERIOU J e BELIN-DEPOUX M (1974) Contribution à l'étude ontogénique des poches sécrétrices des feuilles dês quelques Myrtacées. *Phytomorphology* 24: 321–338.
- BURCKHARDT D (2005). Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Psyllids (Hemiptera: Psylloidea). *In: Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods* (Raman A, Schaefer CW e Withers TM, eds). Science Publishers, Plymouth, UK.
- DAWKINS R (1982). The extended phenotype: the gene as the unit of selection. Oxford: Oxford University Press.
- DIAS GG (2009) Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): alterações químicas e estruturais e interações com parasitoides e inquilinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- ESPÍRITO-SANTO MM e FERNANDES GW (2002) Host plant effects on the development and survivorship of the galling insect *Neopelma baccharidis* (Homoptera : Psyllidae). *Austral Ecology* 27(3): 249-257.
- FAHN A (1990). Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- FERNANDES GW (1994). Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Revista Brasileira de Entomologia* 38(2): 421-433.
- FERNANDES GW, DUARTE H e LUTTGE U (2003) Hypersensitivity of *Fagus sylvatica* L. against leaf galling insects. *Trees – Structure and Function* 17(5): 407-411.
- FOSTER AS (1936). Leaf differentiation in angiosperms. *Botanical Review* 2: 349-372.

GONÇALVES SJMR (2003) Dimorfismo Sexual em galhas foliares de *Pseudotectococcus* sp. Hempel (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae) em *Rollinia laurifolia* Schlttdt (Annonaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.

GONÇALVES SJMR, ISAIAS RMS, VALE FHA e FERNANDES GW (2005). Sexual dimorphism of *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson e Gonçalves 2004 (Hemiptera Coccoidea Eriococcidae) influences gall morphology on *Rollinia laurifolia* Schlttdt. (Annonaceae). *Tropical Zoology* 18: 161-169.

GOTTLIEB OR, BORIN MRDB e KAPLAN MAC (1995) Biosynthetic Interdependence of Lignins and Secondary Metabolites in Angiosperms. *Phytochemistry* 40(1): 99-113.

HARKIN JM, OBST JR (1973) Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180:266-198.

HAWKINS BA, CORNELL HV e HOCHBERG ME (1997) Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology* 78(7): 2145–2152.

HILKER M e MEINERS T (2006). Early Herbivore Alert: Insect Eggs Induce Plant Defense. *Journal of Chemical Ecology* 32: 1379–1397.

HORI K (1992). Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD e Rohfristsch O, eds). Oxford University Press, New York.

ISAIAS RMS (1998). Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

JOHANSEN DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.

KRAUS JE e ARDUIN M (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica RJ, EDUR.

KRAUS JE (1997) Respostas morfogenéticas de plantas a indutores galhadores. *In* Interações ecológicas e biodiversidade. Araújo MCP, Coelho GC, Medeiros I. (ed). Unijui, Ijuí, pp 59-76

LANGE BM, LAPIERRE C e SANDERMANN HJr (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin. *Plant Physiology* 108: 1277-1287

LEE BR, KIM KY, JUNG WJ, AVICE JC, OURRY A e KIM TH (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1271–1279.

LIMA FS (2008). Respostas estruturais e fisiológicas de *Richeria grandis* Vahl. (Phyllanthaceae) ao estabelecimento do Psyllidae galhador. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

MANI MS (1964). Ecology of plant galls. The Hague (The Netherlands): *Dr. W. Junk Publishers*. The Netherlands.

MOTTA LB, KRAUS JE, SALATINO A e SALATINO MLF (2005) Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 971-981.

MOTULSKY H (1992-2009). Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, GraphPad Software Inc.

MOURA MZD, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2008) Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina:Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 32(2):271-282.

MOURA MZD, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2009) Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany* 56: 153-160.

NAKATA PA (2003). Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164: 901-909.

O'BRIEN TP e MCCULLY ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Termarcaphi Pty, Melbourne.

OLIVEIRA DC, CHRISTIANO JCS, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2006). Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus mulherbergianus* (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica* 29(4): 657-667.

OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2009). Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of the midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista de Biologia Tropical* 57(1-2): 293-302.

OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2010a) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 76(2):239-248.

OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2010b) Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Müell (Apocynaceae). *Plant Science* 178(4):350-358.

OLIVEIRA DC, MAGALHÃES TA, CARNEIRO RGS, ALVIM MN e ISAIAS RMS (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns?. *Protoplasma* 242(1-4):81-93.

PRICE PW, FERNANDES GW e WARING GL (1987). Adaptive nature of insect gall. *Environment Entomology* 16: 15-24.

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

REDFERN M e ASKEW RR (1992). *Plant galls*. Richmond Publishing Co Ltd.

ROHFRITSCH O (1992). Patterns in Gall Development. *In* *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD e Rohfritsch O, eds). Oxford University Press, New York.

SILVA CJ, BARBOSA LCA, DEMUNER AJ, MONTANARI RM, PINHEIRO AL, DIAS I e ANDRADE NJ (2010) Chemical Composition and Antibacterial Activities from the Essential Oils of Myrtaceae Species Planted in Brazil. *Química Nova* 33(1): 104-108.

STONE GN e SCHÖNROGGE K (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18(10): 512-522.

ULLRICH CI e ALONI R (2000) Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *Journal of Experimental Botany* 51: 1951-1960.

VAN DAM NM e HARE JD (1998) Differences in distribution and performance of two sap-sucking herbivores on glandular and non-glandular *Datura wrightii*. *Ecological Entomology* 23(1): 22-32.

VILA R, SANTANA AI, PEREZ-ROSES R, VALDERRAMA A, CASTELLI MV, MENDONCA S, ZACCHINO S, GUPTA MP e CANIGUERAS S (2010) Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerocampanensis*, a new source of alpha-bisabolol. *Bioresource Technology* 101(7): 2510-2514.

WEIS AE e ABRAHAMSON WG (1986). Evolution of host-plant manipulation by gallmakers: ecological and genetic factors in the *Solidago-Eurosta* system. *The American Naturalist* 127: 681-95.

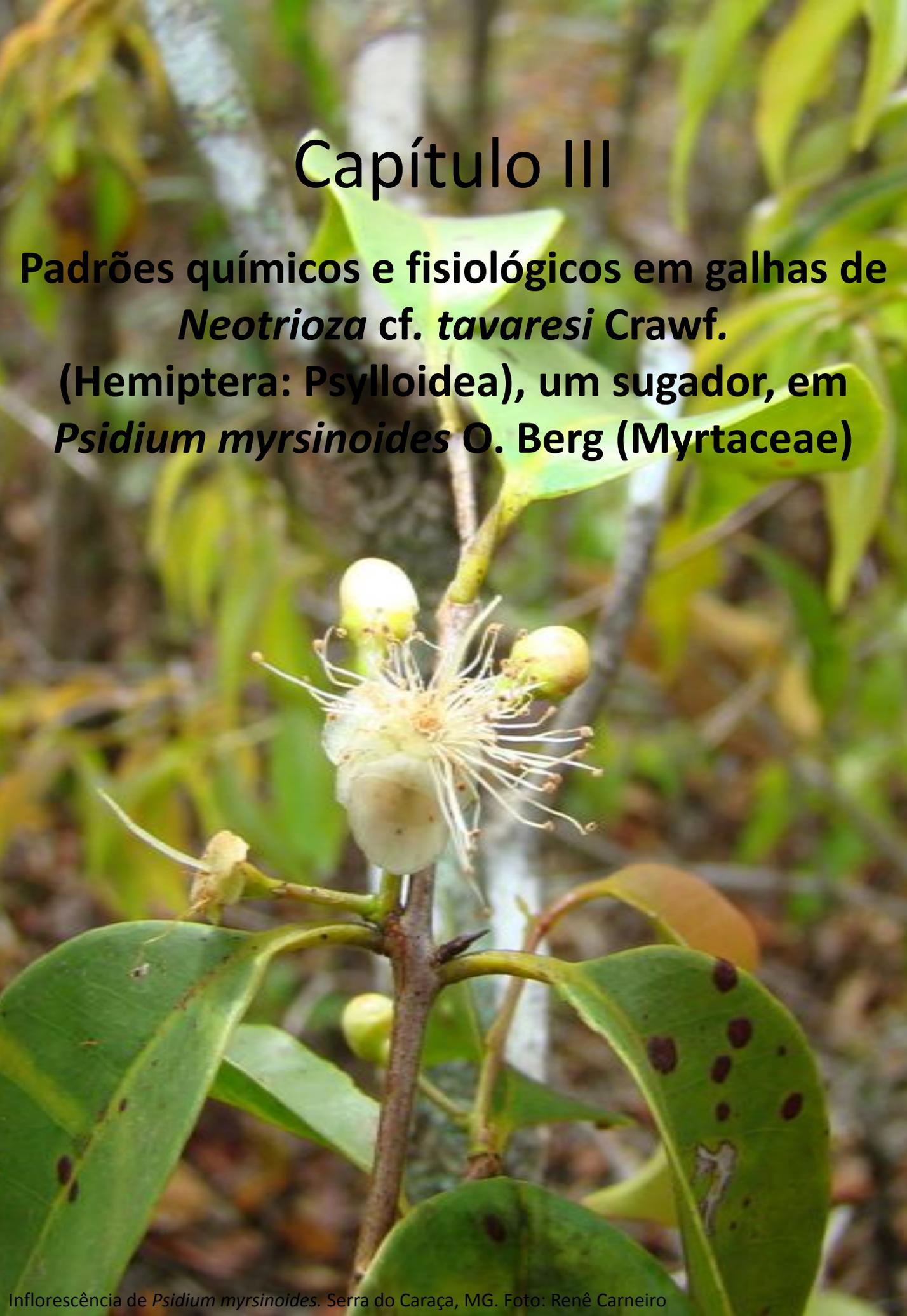
WEIS AE, WALTON R e CREGO C L (1988). Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology* 33: 467- 486.

ZEISS C (2008). *Carl Zeiss Imaging Systems – 32 Software Release 4.7.2*. USA. Carl Zeiss MicroImaging Inc.

Capítulo III

**Padrões químicos e fisiológicos em galhas de
Neotrioza cf. tavaresi Crawf.**

**(Hemiptera: Psylloidea), um sugador, em
Psidium myrsinoides O. Berg (Myrtaceae)**



Padrões químicos e fisiológicos em galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea), um sugador, em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae)

Resumo

As galhas resultam de interações mecânicas e químicas entre indutores e plantas hospedeiras em uma relação parasítica singular. O acúmulo de substâncias dos metabolismos primário e secundário da planta nos tecidos da galha é produto do impacto fisiológico da ação alimentar do galhador nos tecidos hospedeiros. No sistema *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) – *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) foram observadas mudanças na intensidade de reações histoquímicas que estão tipicamente relacionadas à proteção do indutor, sua nutrição e à manutenção do órgão neoformado. A baixa concentração de clorofilas, antocianinas e carotenóides indica um comprometimento do aparato fotossintético na estrutura, fato corroborado pelo baixo teor de proteínas totais. Entretanto, o alto teor de carboidratos valida a afirmativa de serem as galhas drenos fortes de fotoassimilados. Esses resultados contribuem para o entendimento da dinâmica fisiológica da galha enquanto fator preponderante do aumento do *fitness* do galhador. É observada a formação de um *continuum* anatômico e fisiológico entre folha e galha, na medida em que ocorre o incremento das opções nutricionais do galhador e da sua proteção contra inimigos naturais. As mudanças observadas corroboram as hipóteses relacionadas a nutrição e proteção do inseto indutor. O perfil histoquímico está ligado a características intrínsecas da planta hospedeira, com mobilização de substâncias para a manutenção da maquinaria celular da galha. Os estresses bióticos e abióticos são fortes o bastante para gerar a deficiência fotossintética das galhas. As análises nutricionais corroboram o *continuum* e as peculiaridades das relações forma e função nas células de folhas e galhas.

Palavras-chave: Concentração de nutrientes, histoquímica, pigmentos fotossintetizantes.

Abstract

Insect galls result from mechanical and chemical interactions between an herbivore and its host plants in a singular parasitic relationship. The accumulation of substances from primary and secondary plant metabolism in gall tissues is a product of the physiological impact of the feeding activity of the gall inducer in the host tissues. In the system *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) - *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawford (Hemiptera: Psylloidea), changes in the intensity of histochemical reactions were observed. These are typically related to protection of the insect, its nutrition and the maintenance of the neoformed organ. The low concentration of chlorophylls, carotenoids and anthocyanins indicates an impairment of the photosynthetic apparatus in the structure, which is corroborated by the low protein content. However, the high carbohydrate contents corroborate the gall as a strong sink for photoassimilates. These findings contribute to the understanding of the physiological dynamics of the gall as a major factor in increasing the fitness of the gall inducer. The establishment of a physiological and anatomical *continuum* between leaves and galls guaranteed the enhancement of nutritional choices of the gall inducer and its protection against natural enemies. The changes observed corroborate the hypotheses related to nutrition and protection of the inducer. The histochemical profile is linked to intrinsic characteristics of the host plant, with mobilization of substances for the maintenance of the cellular machinery of the gall. The biotic and abiotic stresses are strong enough to generate the photosynthetic deficiency of the galls. The nutritional analysis corroborates the *continuum* and the peculiarities of the relationships between form and function of the cells from leaves and galls.

Key words: Histochemistry, nutrients concentration, photosynthetic pigments.

Introdução

Galhas são estruturas resultantes da relação específica entre organismos indutores e plantas hospedeiras (Mani 1964), frequentemente apresentando alta complexidade química e estrutural (Cornell 1983), além de simetria e crescimento coordenado (Raman 2007). Mais do que somente dotadas de peculiaridades anatômicas, as galhas apresentam perfis fisiológicos, nutricionais e histoquímicos por vezes muito diferentes dos seus órgãos hospedeiros. Estas características são preponderantes na determinação do valor adaptativo das galhas e, conseqüentemente, do *fitness* do galhador (Weis e Abrahamson 1986).

A localização de compostos relacionados à nutrição e à defesa contra herbivoria, tais como carboidratos, lipídeos, derivados fenólicos e flavonoídicos (Drummond 2005, Formiga *et al.* 2009) pode ser observada através de testes histoquímicos (Bronner 1992). A determinação de pigmentos, por sua vez, constitui ferramenta importante na avaliação do *status* fisiológico geral da planta hospedeira e do órgão neoformado, sendo complementada pela quantificação de nutrientes. Juntas, essas análises fornecem dados que possibilitam a formulação e discussão de hipóteses a cerca das relações fonte-dreno estabelecidas quando da formação da galha, dos impactos histoquímicos exercidos pelo galhador sobre os tecidos do órgão hospedeiro e do modo como este manipula todas essas mudanças em benefício próprio. Dentro desse âmbito, este trabalho teve como objetivos: (1) avaliar histoquimicamente compostos dos metabolismos primário e secundário de galhas e de folhas de *Psidium myrsinoides*, e (2) hipotetizar as causas e estimar conseqüências do impacto da ação do galhador sobre a concentração de pigmentos fotossintetizantes, proteínas e carboidratos. Os resultados encontrados são discutidos sob a perspectiva do estabelecimento da galha como um dreno forte de fotoassimilados, cuja estrutura nutre e protege o indutor. As análises buscam documentar as mudanças histoquímicas e fisiológicas, de modo a confrontar o padrão estabelecido para galhas de insetos sugadores.

Materiais e Métodos

Área de estudo

A população de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) estudada se encontra na Serra do Caraça, uma Reserva Particular do Patrimônio Natural (IBAMA Portaria 32/94N Decreto 98.914), localizada do município de Catas Altas, MG. Indivíduos (n=12) se localizam ao longo de uma trilha (20°06'22"S 43°29'42"O) a 1290m de altitude, a cerca de 2km da sede do parque, nos quais foram coletadas folhas não galhadas (FNG) e galhas maduras (G) para realização das análises.

Testes histoquímicos

Testes histoquímicos foram realizados no intuito de evidenciar a presença de metabólitos primários [açúcares redutores (1), amido (2), lipídios (3) e proteínas (4)], secundários [substâncias fenólicas (5), Flavanóis (6), terpenóides (7), alcalóides (8) e ligninas (9)] e espécies reativas de oxigênio (ROS) (10) nos tecidos não galhados (FNG) e nas galhas (G), utilizando os seguintes reagentes e métodos abaixo enumerados:

- 1- Reagente de Fehling (Sass 1951): Utilizando-se material recém-coletado, cortes transversais foram imersos em solução composta de parcelas iguais das soluções A (sulfato de cobre II 6,93%, m/v) e B (tartarato sódico de potássio 34,6% e hidróxido de sódio 12%, m/m/v) e aquecidos à temperatura de pré-ebulição.
- 2- Reagente de Lugol (Johansen 1940): Cortes transversais obtidos de material recém-coletado ou fixado em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50% e ácido acético, 1:1:18, v/v) foram imersos em solução de iodo-iodeto de potássio 1% por cerca de 5 minutos.
- 3- Vermelho B do Sudão (Brundett *et al.* 1991): Material recém-coletado ou fixado em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50% e ácido acético, 1:1:18, v/v) foi seccionado transversalmente e imerso em solução saturada com vermelho B do Sudão em etanol 70°GL por 5 minutos.

- 4- Azul brilhante de Coomassie (Dunn 1993): Material recém-coletado foi seccionado transversalmente e submerso em solução de azul de Coomassie 0,25% por 5 minutos.
- 5- Cloreto férrico (Johansen 1940): Secções transversais de material fresco ou fixado em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50% e ácido acético, 1:1:18, v/v) foram imersas em solução de cloreto férrico 1% por 5 minutos.
- 6- DMACA (Feucht *et al.* 1986): Cortes frescos foram fixados em cafeína-benzoato de sódio 0,5% em butanol 90% e imersos em solução etílica de *p*-dimetilaminacinaldeído 1%.
- 7- NADI (David e Carde 1964): Cortes transversais obtidos de material fresco foram imersos em solução contendo α -naftol 1%, dimetil-*p*-fenilenodiamina 1% e tampão fosfato 0,01M, pH 7,2 (1:1:98, v/v).
- 8- Mistura de Jeffrey (Johansen 1940): Secções transversais de material fresco ou fixado foram imersas em solução composta de ácido nítrico 10% e ácido crômico 10% (1:1, v/v) por cerca de 5 minutos.
- 9- Reagente de Wiesner (Lin e Dence 1992): Cortes a fresco ou fixados em FAA₅₀ (formaldeído, etanol 50% e ácido acético, 1:1:18, v/v) foram imersos em solução acidificada com HCl 6N e floroglucinol 2% por cerca de 5 minutos.
- 10- Espécies reativas de oxigênio (ROS) (Rosseti e Bonnatti 2001): Cortes a fresco foram submetidos à reação com DAB (3,3'-diaminobenzidina – Sigma®) a 0,5% por 15 a 60 minutos, sendo a intensidade da reação checada a cada 15 minutos.

Testes-controle foram realizados segundo procedimentos descritos nas referências supracitadas e comparados com cortes branco, não submetidos a quaisquer tratamentos. Todo o material utilizado foi transportado em caixas de isopor com gelo até o laboratório, onde foi fixado ou submetido diretamente aos testes no intervalo máximo de 24h. Todos os cortes produzidos à mão livre foram montados em lâminas histológicas com gelatina glicerizada de Kaiser (Kraus e Arduin 1997) e imediatamente fotografados em fotomicroscópio óptico (Olympus BH-2).

Dosagem de pigmentos

Folhas maduras (n=30) e galhas maduras (n=60) foram coletadas no mês de agosto de 2009. Cada amostra de FNG constituiu-se de quatro discos de 0,44cm² e de G, quatro metades, todas devidamente pesadas. Na sequência, as mesmas amostras foram submetidas ao processo de extração de clorofilas em acetona 80% seguida de maceração e centrifugação, leitura em espectrofotômetro e quantificação segundo as equações propostas por Lichtenthaler e Wellburn (1983).

Para a quantificação do teor de antocianinas totais, foram amostradas porções similares às aquelas submetidas à análise dos demais pigmentos, colocadas em frascos âmbar contendo 5 ml de solução extratora (etanol 95%: HCl 1,5N) (99:1, v/v) e mantidas sob refrigeração. Após cinco dias, as amostras foram maceradas e centrifugadas como realizado para a extração de clorofilas e carotenóides. O teor de antocianinas totais foi quantificado utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Antocianinas totais} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{\text{absorbância} \times \text{fator de diluição}}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

O valor $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ utilizado foi de 98,2, conforme estabelecido por Lees e Francis (1972). Os dados foram ajustados para a obtenção dos resultados em $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$.

Dosagem de nitrogênio e carboidratos

Amostras de FNG e G foram secas em estufa de circulação forçada, maceradas em almofariz e armazenadas livres de umidade. A quantificação dos teores de nitrogênio foi obtida pelo método de Kjeldahl (Tedesco *et al.* 1995). Para tal, o material foi digerido em ácido sulfúrico concentrado e o resíduo destilado (destilador Tecnal TE-0363). A amônia liberada sob a forma de NH₄OH foi recolhida em solução de ácido bórico 2% e titulada com ácido clorídrico 0,02 N previamente padronizado.

A dosagem de três classes de carboidratos – açúcares solúveis totais (AST), polissacarídeos solúveis em água (PSA) e amido – baseou-se no método de Dubois *et al.* (1956), modificado por Chow e Landhäusser (2004). O material foi mantido resfriado até a secagem em microondas por três minutos, sendo posteriormente transferido para estufa de circulação forçada, macerado e armazenado livre de

umidade para análise posterior. Para a extração dos AST, foi utilizada solução de metanol:clorofórmio:água (12:5:3); para PSA, etanol 10%; e para amido, ácido perclórico 30%. As soluções foram levadas para a reação com fenol-sulfúrico e armazenadas em ambiente escuro para posterior leitura em espectrofotômetro.

Análises estatísticas e representação gráfica

Análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa JMP (SAS Institute, US, 1989-2002). Foram feitos testes de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e, quando satisfatório, os dados foram comparados por ANOVA, seguido de teste t de Student ou testes múltiplos de Tukey. Quando ao contrário, foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn. Em todos os testes utilizou-se $\alpha = 0,05$. Os gráficos foram gerados pelo programa GraphPad Prism® para Windows, versão 5.0 (Motulsky 1992-2009).

Resultados

Características Gerais

Psidium myrsinoides é uma planta de porte arbustivo a sub-arbóreo (Fig. 1a) cujas folhas são simples e de filotaxia oposta, emergindo aos pares a partir do meristema apical. Quando jovens, podem apresentar-se na cor vermelha a verde alaranjado (Fig. 1b). A indução das galhas pelas ninfas de primeiro ínstar de *Neotrioza* cf. *tavaresi* ocorre em folhas jovens, e o desenvolvimento leva a formação de uma câmara ninfal ampla (Fig. 1c).

Histoquímica das folhas não galhadas

As análises histoquímicas de FNG revelaram a presença de açúcares redutores distribuídos nos feixes vasculares, especialmente em sua porção floemática. Estes compostos foram detectados também nas células epidérmicas, em células esparsas do parênquima clorofiliano, bem como nas células secretoras das glândulas que tiveram seu conteúdo corado em cor acastanhada (Fig. 2a, b). Coloração azul escuro ou preto pelo reagente de Lugol foi observada em todo o mesófilo foliar, indicando a presença

de amido nas células do parênquima paliçádico mais intensamente que nas células do parênquima lacunoso (Fig. 2c). O conteúdo das cavidades secretoras também foi corado pelo reagente de Lugol. Proteínas foram evidenciadas nas células do floema e muito discretamente no parênquima clorofiliano (Fig. 2d). Os lipídios foram revelados na cutícula da folha, além do conteúdo das cavidades secretoras subepidérmicas (Fig. 2e). Óleos essenciais foram revelados pelo NADI na composição deste mesmo conteúdo, além da porção floemática dos feixes vasculares principal e secundários, resultado evidenciado pela cor azul arroxeadada gerada na reação (Fig. 2f, g).

Fenólicos totais foram revelados por todo o mesofilo foliar, com maior intensidade de coloração na dupla camada paliçádica e de forma mais esparsa no parênquima lacunoso (Fig. 3a, b). Flavanóis foram revelados pelo DMACA, resultando em coloração azul escura nas células epidérmicas, na primeira camada do parênquima paliçádico, além de células esparsas no parênquima lacunoso. A epiderme sobre a nervura central apresentou conteúdo fortemente corado, bem como algumas células do colênquima subepidérmico (Fig. 3c-e). Os alcalóides foram fracamente corados na epiderme, mesofilo e córtex da nervura mediana. Algumas fibras associadas ao floema da nervura principal, no entanto, tiveram seu conteúdo corado mais intensamente (Fig. 3f, g). Ligninas foram localizadas na parede das células do xilema maduro dos feixes vasculares e das fibras associadas, enquanto ROS foram localizadas fracamente nas paredes e protoplastos de células de todos os tecidos.

Histoquímica das galhas de Neotrioza cf. tavaresi

Açúcares redutores foram revelados por todo o parênquima da galha, especialmente nas células do epitélio das cavidades secretoras de óleo essencial, bem como nos córtices mediano e interno, próximos aos feixes vasculares neoformados (Fig. 4a, b). Proteínas foram encontradas em todo o parênquima da galha, especialmente no epitélio das cavidades secretoras e no floema (Fig. 4c, d). De modo semelhante à folha não galhada, os lipídios foram detectados como parte do conteúdo das cavidades secretoras, na cutícula, e também em gotículas esparsas no mesofilo da galha (Fig. 4e-g). Os óleos essenciais foram revelados em gotículas esparsas no

mesofilo e nos córtices interno e mediano, especialmente na porção floemática dos feixes vasculares (Fig. 4h).

Fenólicos totais foram revelados principalmente em células dos córtices mediano e interno e menos intensamente na porção subepidérmica do córtex externo (Fig. 5a, b). Flavanóis foram encontrados nos córtices externo, mediano e interno, com maior intensidade de coloração nas células que revestem as cavidades secretoras, em células do parênquima externo em início de lignificação e mais internamente, em células esparsas (Fig. 5c-e). Alcalóides foram precipitados exclusivamente nas células que revestem as cavidades secretoras (Fig. 5f). As ROS foram encontradas nas camadas subepidérmicas e no epitélio secretor das glândulas (Fig. 5g), reduzindo gradualmente em direção ao córtex interno. Abaixo das cavidades secretoras, no córtex externo, uma capa de parênquima apresentou coloração rosada pelo reagente de Wiesner, indicando lignificação (Fig. 5h).

Dosagem de pigmentos

O teor de clorofilas totais em FNG foi de $1062 \pm 43,96 \mu\text{g/g}$, enquanto que em G foi de $79,24 \pm 4,74 \mu\text{g/g}$. Os teores de pigmentos fotoprotetores, antocianinas e carotenóides, foram significativamente maiores em FNG do que em G (Tab. 1).

Tabela 1. Teor de pigmentos em folhas não galhadas (FNG, n = 30) e galhas (G, n = 60) de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) (média \pm erro padrão; $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MF}$).

Amostras	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila a/b	Clorofilas totais	Carotenóides	Antocianinas
FNG	$734,9 \pm 30,3\text{a}$	$315,9 \pm 13,9\text{a}$	$2,34 \pm 0,03\text{a}$	$1062 \pm 43,9\text{a}$	$10,9 \pm 0,33\text{a}$	$24,1 \pm 0,6\text{a}$
G	$44,4 \pm 2,9\text{b}$	$28,8 \pm 1,7\text{b}$	$1,56 \pm 0,06\text{a}$	$79,2 \pm 4,7\text{b}$	$5,9 \pm 0,37\text{b}$	$3,4 \pm 0,2\text{b}$

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn) ($\alpha = 0,05$).

Dosagem de nitrogênio e carboidratos

Os valores encontrados para as diferentes classes de carboidratos foram significativamente diferentes entre FNG e G quando analisados os açúcares solúveis totais (AST) ($182,25 \pm 29,88 \text{ mg/g MS}$ para FNG e $101,99 \pm 41,70 \text{ mg/g MS}$ para G) e polissacarídeos solúveis em água (PSA) ($16,57 \pm 2,63 \text{ mg/g MS}$ para FNG e $22,19 \pm 2,61 \text{ mg/g MS}$ para G), diferentemente da dosagem de amido, que não apresentou

diferenças significativas entre os tratamentos analisados ($35,94 \pm 10,03$ mg/g MS para FNG e $30,67 \pm 2,98$ mg/g MS para G) (Fig. 6).

A análise do teor de nitrogênio, por sua vez, apresentou valores significativamente diferentes, sendo $1,04 \pm 0,14$ para FNG contra $0,62 \pm 0,05$ para G, expressos em porcentagem de massa seca (Fig. 7).

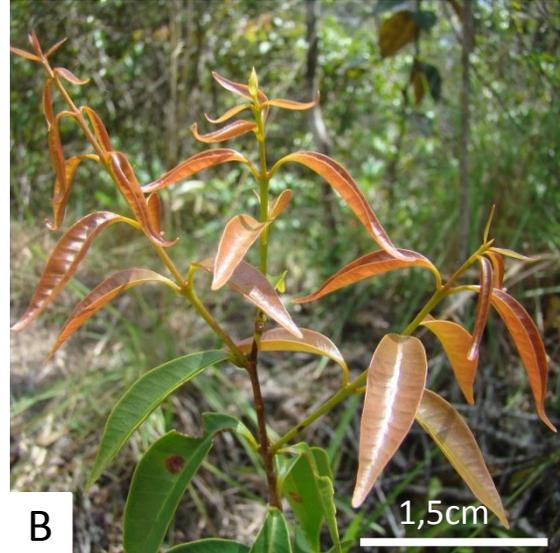


Figura 1 – Sistema *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) – *Neotrioza* cf. *tavaresi* Cawf. (Hemiptera: Psylloidea). A- *Habitus* da planta hospedeira; B- Detalhe de ramo com folhas maduras e jovens; C- Detalhe da galha elipsóide em secção transversal com ninfa parasitada ocupando a câmara ampla.

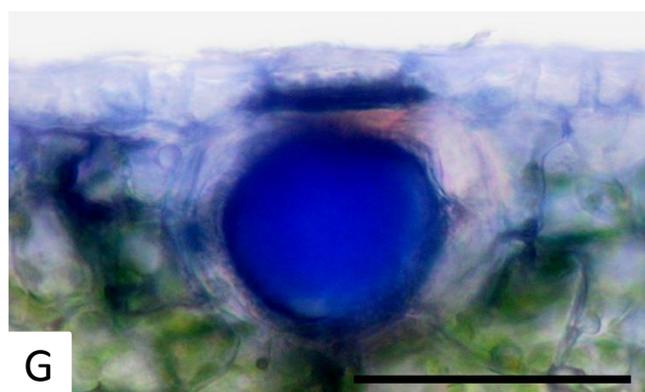
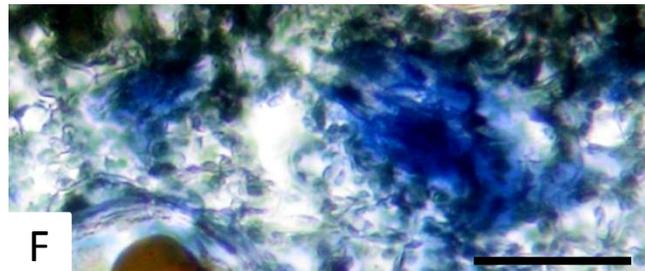
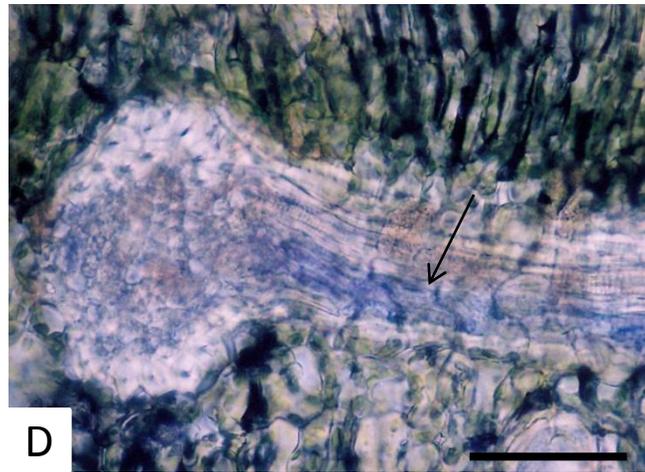
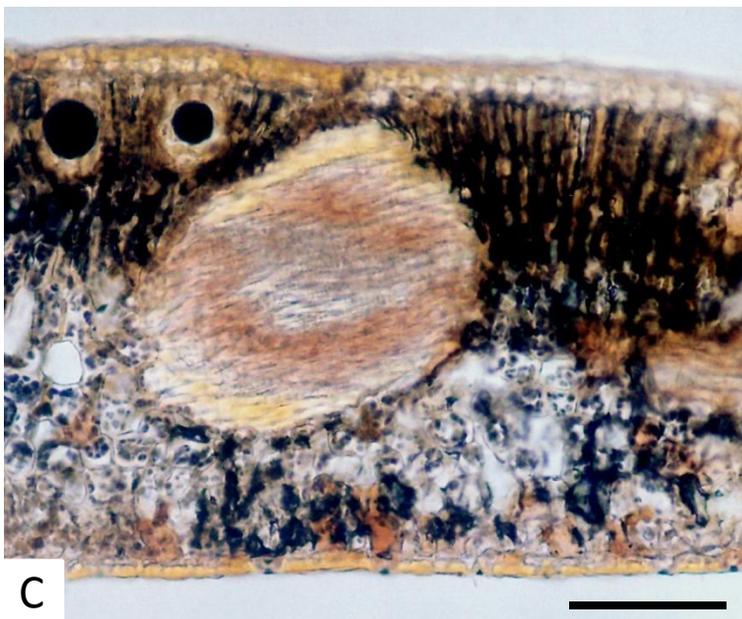
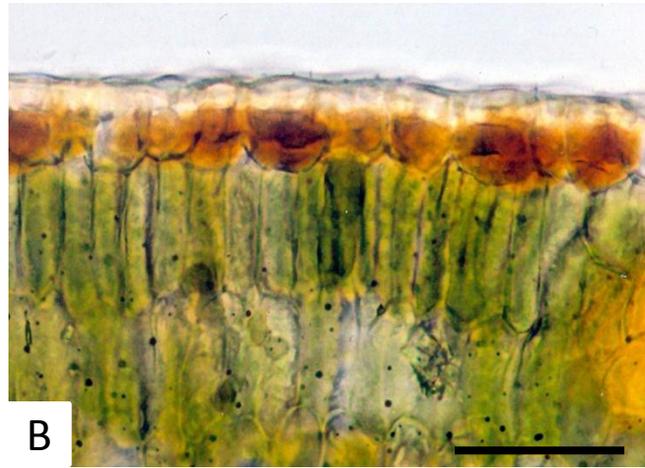
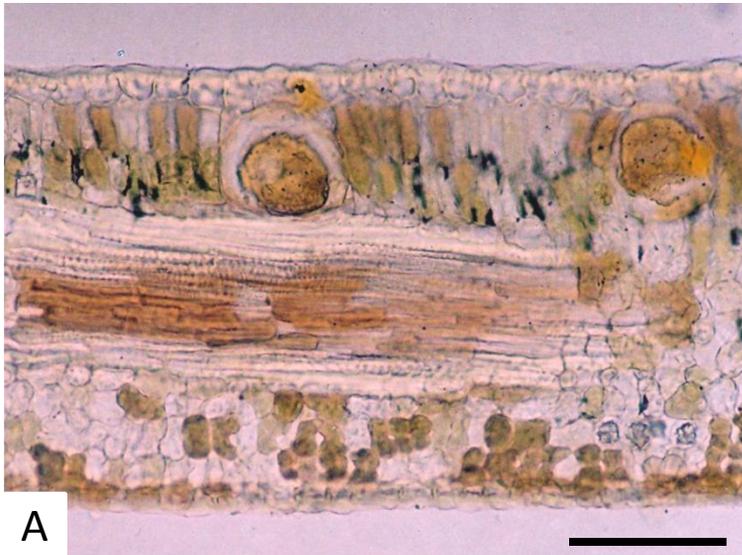


Figura 2 – Testes histoquímicos de folhas não galhadas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) em secção transversal. A- Reação de Fehling evidenciando ampla localização de açúcares redutores; B- Detalhe de açúcares redutores nas células epidérmicas; C- Reação de Lugol evidenciando amido nas células do mesofilo e glândulas; D- Azul de Coomassie revelando proteínas principalmente no floema (seta); E- Vermelho do Sudão evidenciando a natureza lipídica da secreção das glândulas de óleo essencial; F,G- NADI (α -naftol-p-fenilenodiamina) evidenciando terpenóides em células do parênquima lacunoso e glândula de óleo, respectivamente. Barras: A, C, F – 50 μ m; B, D, E, G - 25 μ m.

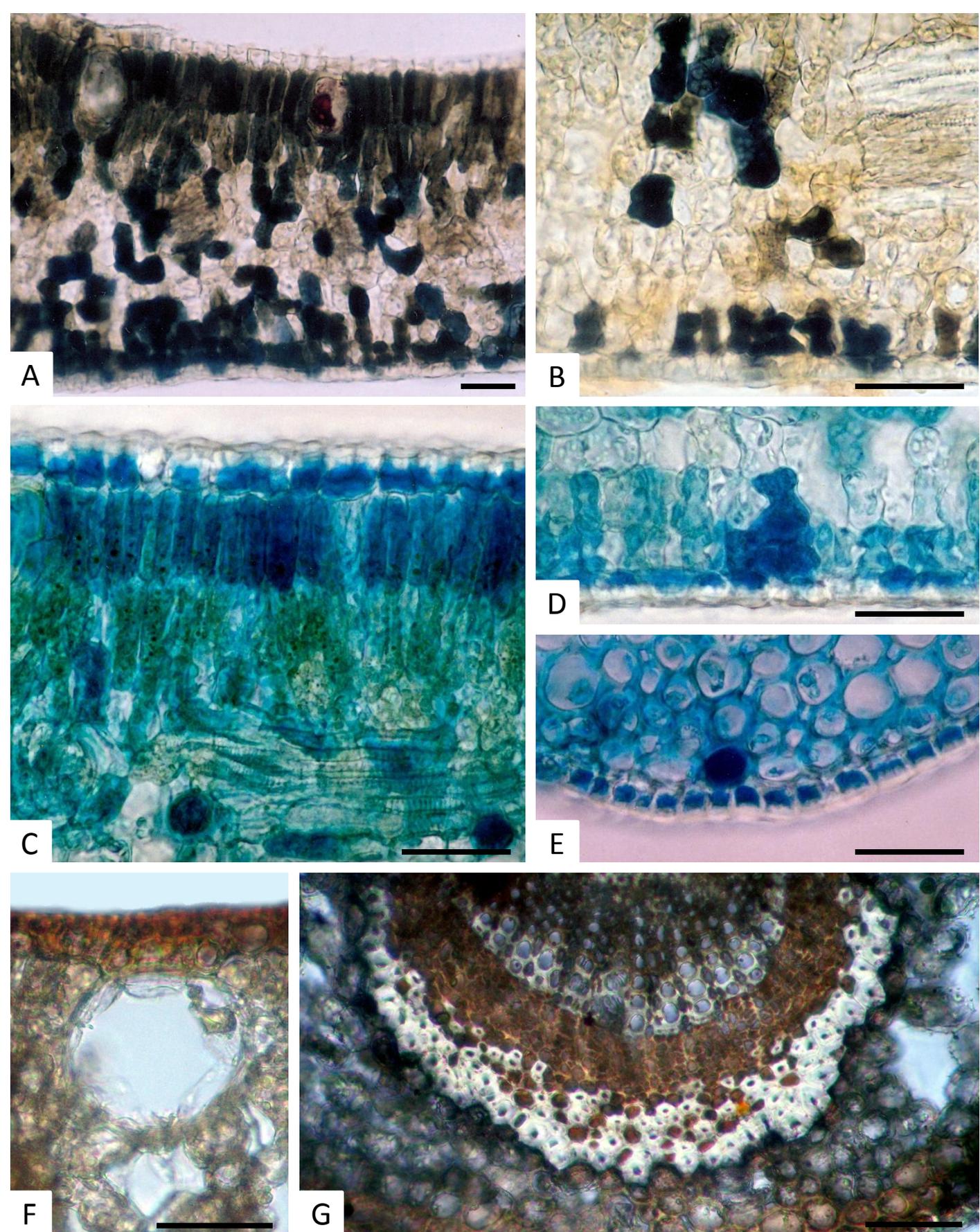


Figura 3 – Testes histoquímicos de folhas de *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). A- Cloreto férrico evidenciando ampla distribuição de polifenóis; B- Detalhe de polifenóis no parênquima lacunoso; C- p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) evidenciando distribuição de flavanóis pelo tecido; D, E- Detalhes da detecção de flavanóis no parênquima lacunoso, na epiderme e colênquima adjacente, respectivamente; F,G- Teste de Jeffrey evidenciando alcalóides em células epidérmicas e fibras perivasculares, respectivamente. Barras: 25µm.

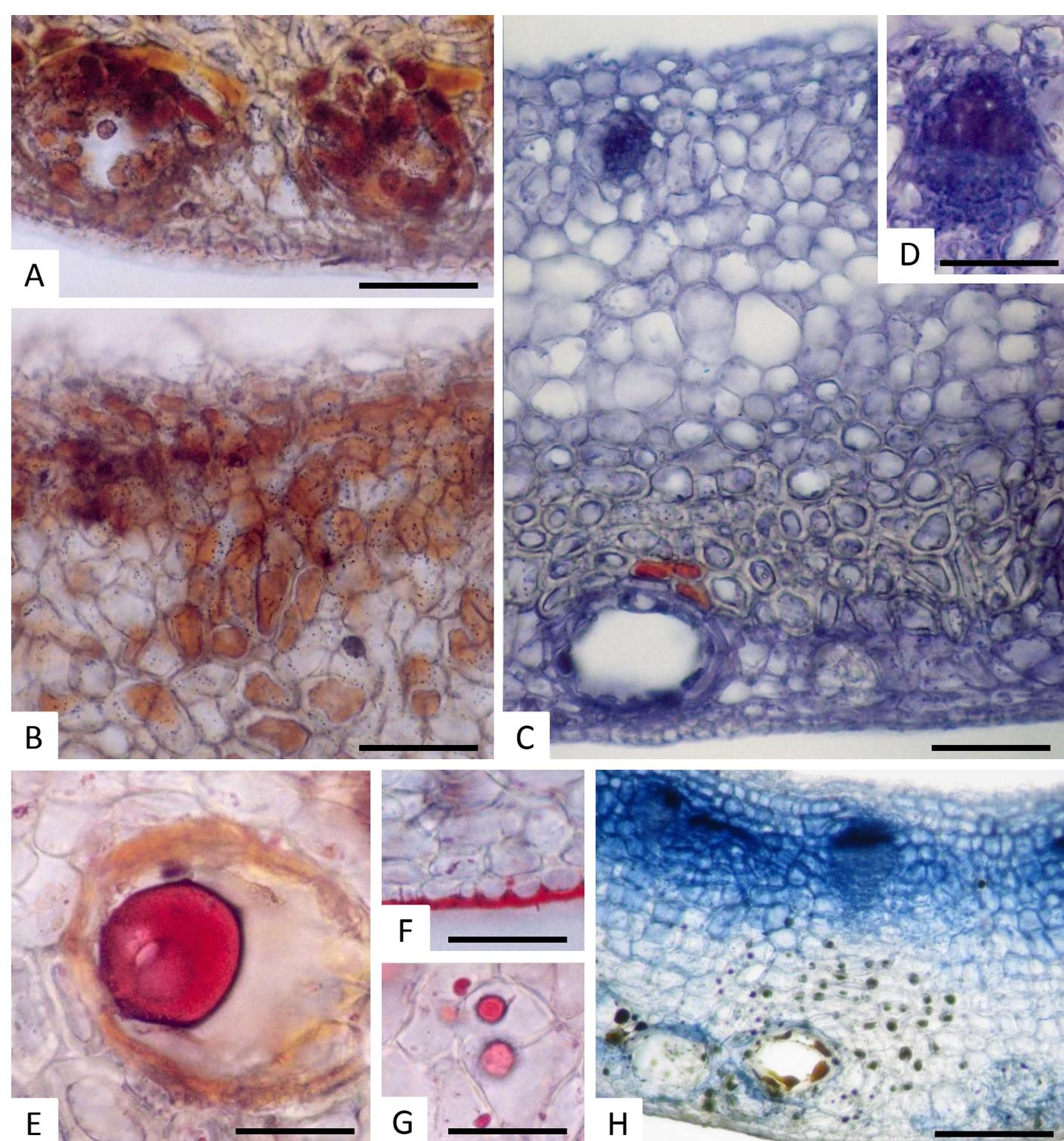


Figura 4 – Testes histoquímicos de galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). A, B- Reação de Fehling A- Açúcares redutores precipitados no epitélio glandular; B- Detalhe das células do córtex interno e mediano; C, D- Azul de Coomassie evidenciando proteínas pelo mesofilo, floema e epitélio glandular, respectivamente; E, F, G- Vermelho do Sudão evidenciando a natureza lipídica da secreção das glândulas de óleo essencial, da cutícula e gotículas dispersas no mesofilo, respectivamente; H- α -naftol-p-fenilenodimamina (NADI) evidenciando terpenóides em células dispersas no mesofilo, principalmente no córtex mediano e feixes vasculares. Barras: A, B - 50 μ m; C, H - 100 μ m; D-G - 25 μ m.

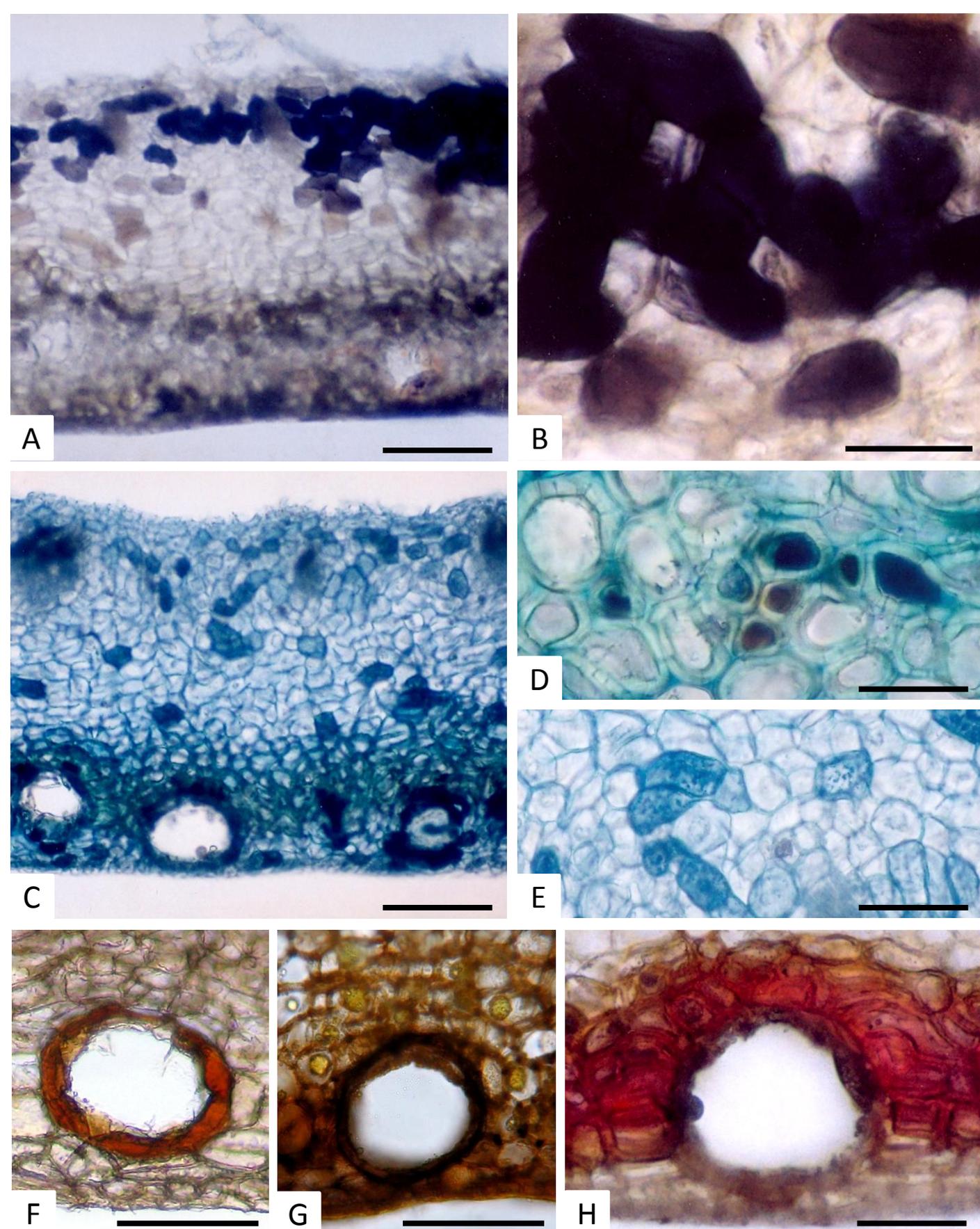


Figura 5— Testes histoquímicos de galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* em *Psidium myrsinoides* . A- Cloreto férrico evidenciando polifenóis no córtices externo e mediano; B- Detalhe de polifenóis no córtex mediano; C- p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) evidenciando flavanóis no tecido; D, E- Detalhes de flavanóis no parênquima lignificado e no córtex mediano, respectivamente; F- Reação de Jeffrey evidenciando alcalóides no epitélio glandular; G- 3,3'-diaminobenzidina (DAB) evidenciando espécies reativas de oxigênio (ROS) próximas à epiderme e glândula; H- Reagente de Wiesner evidenciando paredes lignificadas no parênquima subepidérmico. Barras: A, C- 100µm; B, D, E- 25µm; F-G- 50µm.

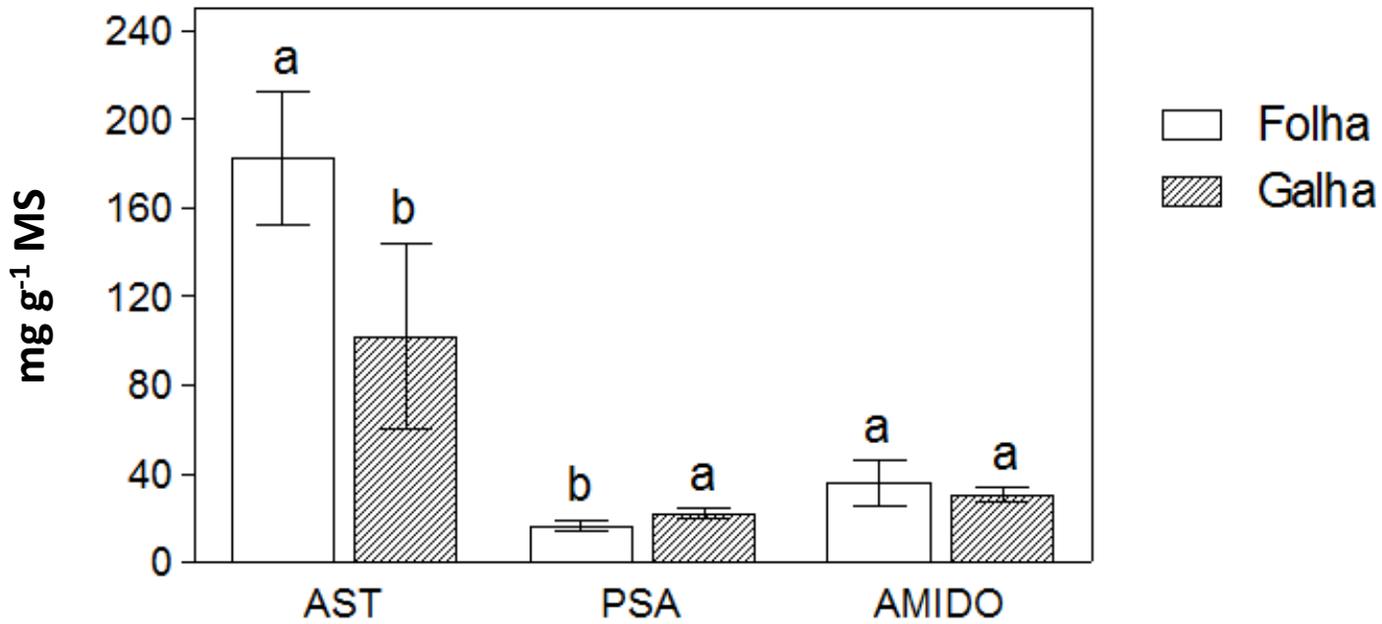


Figura 6- Concentração de carboidratos em folhas e galhas de *Neotrioza cf. tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). Os pares de colunas com letras iguais não diferem significativamente pelo teste *t* de Student, $P < 0,05$. AST- Açúcares solúveis totais, PSA- Polissacarídeos solúveis em água.

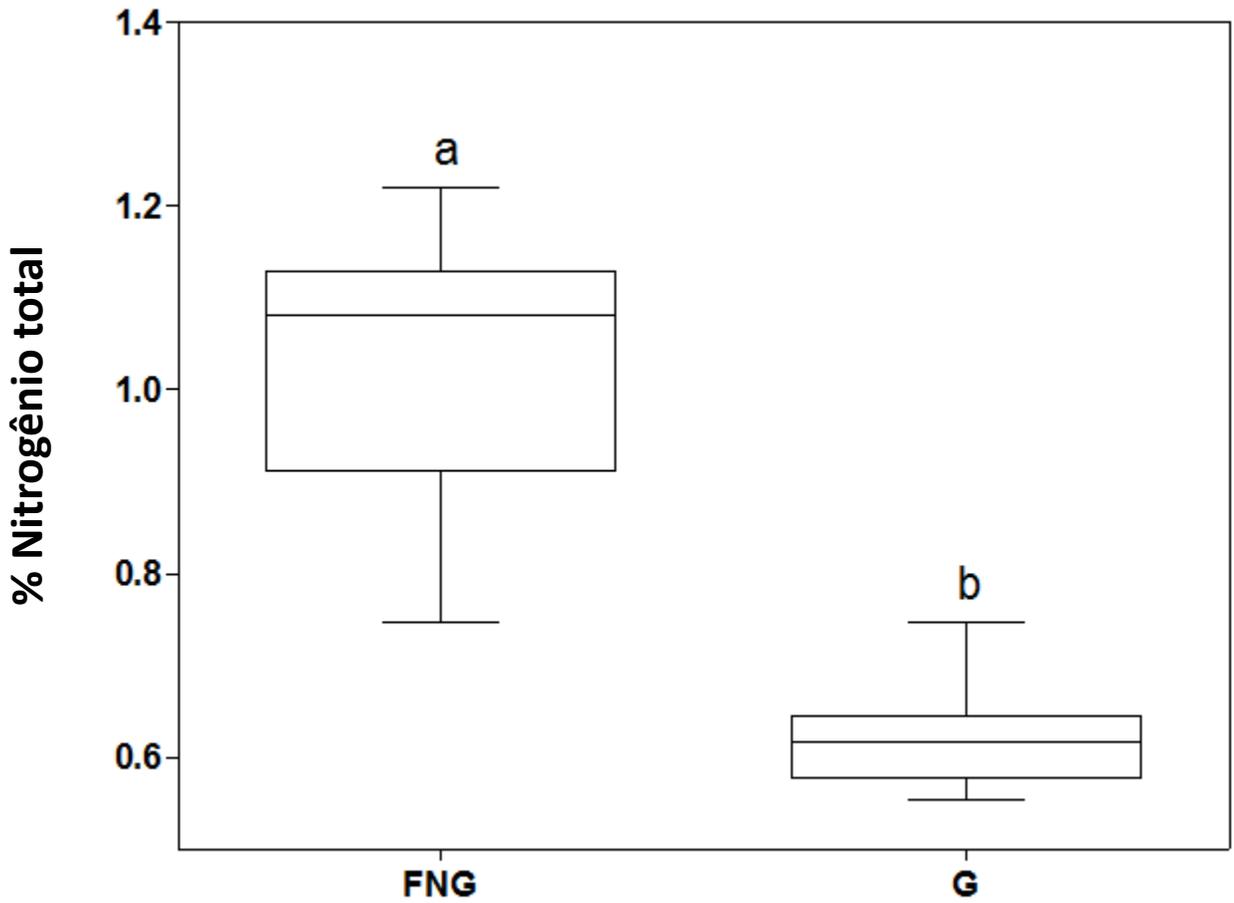


Figura 7- Teores de nitrogênio em folhas não galhadas e galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) em *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes pelo teste *t* de Student, $P < 0,05$. FNG- Folha não galhada, G- Galha.

Discussão

Histoquímica de folhas não galhadas e galhas

Açúcares redutores foram revelados com maior intensidade de coloração em G do que em FNG, principalmente nas glândulas de óleo essencial e células próximas à câmara ninfal. Este resultado constitui indicativo da condição de dreno forte de fotoassimilados imposta pela galha (Burstein *et al.* 1994, Raman *et al.* 2006, Álvarez *et al.* 2009), que possivelmente utiliza estes recursos para a manutenção dos seus requisitos energéticos. A detecção de amido pelo reagente de Lugol, no entanto, foi diferente, sendo positiva em FNG e negativa em G. Sendo um órgão deficiente em maquinaria fotossintética quando comparado a FNG (Yang *et al.* 2003, Fleury 2009), a ausência de amido em G é um resultado esperado. Como um inseto sugador, o impacto alimentar de *Neotrioza cf. tavaresi* não é capaz de determinar a diferenciação de um tecido de reserva rico em amido como nas galhas de Cecidomyiidae (Rohfritsch 1992).

Lipídios foram encontrados principalmente no conteúdo das glândulas subepidérmicas e cutícula, tanto em FNG quanto em G, e mais raramente em células esparsas do córtex de G. Como um componente intrínseco ao perfil químico da planta hospedeira, espera-se que os lipídios estejam presentes em todos os órgãos da mesma. Apesar de ser um órgão neoformado, cujos aspectos morfológicos são entendidos como fenótipo estendido do galhador (*sensu* Dawkins 1982), que age coordenando seu crescimento (Raman 2007), a galha está submetida aos limites impostos pela planta hospedeira. Moura *et al.* (2009) reportaram a presença de lipídios nas galhas de *Aceria lantanae* em *Lantana camara*, sendo este achado, atribuído às características do vegetal hospedeiro. Oliveira e Isaias (2010) atribuem a presença de lipídios em galhas de sugadores como uma forma de armazenagem de energia utilizada no metabolismo da estrutura. De maneira similar, a presença de terpenóides revelados pelo reagente de NADI foi atribuída à característica do vegetal, uma vez que essa classe de compostos ocorre amplamente nas Myrtaceae (Ramos *et al.* 2010).

Substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas também são bastante estudadas dentro do âmbito histoquímico, contribuindo para a elucidação das estratégias de plantas e insetos na guerra química de suas relações (Mani 1964, Price *et al.* 1987). Em galhas, a manipulação não somente da síntese, mas também da alocação desses compostos por parte dos indutores influencia principalmente na defesa contra inimigos naturais (Abrahamson e Weis 1997) e na melhoria da qualidade da sua alimentação (Nyman e Julkunen-Tiitto 2000).

Dentre estas substâncias, os polifenóis talvez sejam os mais estudados (Kraus e Spiteller 1997, Hartley 1998, Roininen *et al.* 1999, Pascual-Alvarado *et al.* 2008). Essas substâncias foram reveladas por todo o mesofilo de FNG e no córtex interno de G. Esses compostos são frequentemente associados à defesa da planta contra herbivoria (Álvarez *et al.* 2008) por diminuírem a palatabilidade dos tecidos. A sua presença, entretanto, não impede o estabelecimento do galhador nem tão pouco seu desenvolvimento, visto que estão presentes desde as fases iniciais da indução. Possivelmente insetos especialistas, como os galhadores, possuem mecanismos refinados para burlar a ação destes compostos, uma vez que em suas salivas podem se encontrar polifenol-oxidases (Hori 1992) que prontamente degradam os fenóis. De fato, Formiga *et al.* (2009) observaram que, a despeito da alta concentração de fenólicos nos tecidos sadios de *Aspidosperma spruceanum*, os Cecidomyiidae galhadores foram capazes de se estabelecer com sucesso, infestando cerca de 87% das folhas desses vegetais.

Mais do que apenas inibidores de herbivoria, os fenóis participam de diversos processos celulares, desde os mais básicos até os mais complexos. A lignificação, por exemplo, é um processo que depende de um pool de intermediários de sua síntese, os quais prontamente reagem ao teste de polifenóis com o cloreto férrico (Beckman 2000). A sua presença em galhas pode ser, portanto, um fator determinante da formação de tecidos lignificados que conferem proteção ao indutor e sustentação à estrutura. Por outro lado, os fenólicos participam de processos de crescimento, regulando expansão e divisão celulares, na medida em que inibem a ação de AIA oxidases (Hori 1992). Ainda, são essenciais à diferenciação de tecido vascular, atuando,

portanto, na neoformação de feixes condutores (Aloni 2001) que nutrem e ajudam no estabelecimento da galha como um dreno.

Flavanóis foram detectados como componentes naturalmente abundantes de FNG, sendo encontrados em menor intensidade nas galhas de *Neotrioza cf. tavaresi*. Em ambos os casos, a presença desses compostos é relacionada à proteção contra estresse oxidativo e radiação ultravioleta, uma vez que esses compostos apresentam propriedades antioxidantes (Bouaziz *et al.* 2005). Apesar de serem frequentes em galhas (Castro 2007, Lima 2008, Fleury 2009, Dias 2010), seu papel ainda é pouco explorado, podendo estar relacionado com proteção contra patógenos (Zuanazzi 2000) e processos de sinalização que influenciam o comportamento de insetos fitopatogênicos (Simmonds 2001, 2003).

À semelhança dos flavanóis, os alcalóides foram observados tanto em FNG quanto em G, em diferentes intensidades. A presença de alcalóides precipitados na epiderme e fibras perivasculares de FNG pode representar uma estratégia antiherbívora devido à repelência desses compostos sobre insetos (Henriques *et al.* 2000), tanto mastigadores quanto sugadores de floema. Em G, tanto a lignificação perivascular quanto o acúmulo de alcalóides é suprimido, permitindo o acesso do inseto galhador aos feixes vasculares neoformados na galha. O acúmulo de alcalóides nas glândulas subepidérmicas pode proteger contra o ataque de eventuais cecidófagos.

A detecção histoquímica de espécies reativas de oxigênio pode evidenciar o estabelecimento de gradientes centrípetos em galhas (Oliveira e Isaias 2010, Oliveira *et al.* 2010). O acúmulo destes compostos está associado a situações de estresse nos vegetais e, em galhas, possivelmente desempenham papel importante na sinalização que desencadeia todo o processo de mudanças histoquímicas observadas (Oliveira *et al.* 2010). O aumento na intensidade de reação é provavelmente produto do impacto alimentar do galhador e pode também ser responsável por eventos de lignificação (Stone e Schönrogge 2003, Formiga *et al.* 2009, Oliveira e Isaias 2009). Contudo, no sistema *P. myrsinoides* – *Neotrioza cf. tavaresi* observou-se um gradiente centrífugo, o que indica o baixo impacto alimentar deste galhador sobre os tecidos de seu

hospedeiro. Segundo Prado e Tjallingii (1994), durante a alimentação de alguns sugadores, seus aparelhos bucais permeiam as células, via apoplasto, em busca do sítio adequado de alimentação, sugerindo baixo impacto sobre os tecidos. Dessa maneira, a maior intensidade de reação observada nas camadas externas de G ocorre devido às maiores taxas metabólicas dessa região, especialmente percebida nas glândulas de óleo essencial.

Os perfis histoquímicos revelados em FNG e G no sistema *Psidium myrsinoides* – *Neotrioza* cf. *tavaresi* são bastante similares entre si, divergindo apenas quanto à intensidade das reações e o local em que estas foram observadas. Diferentemente de insetos que se alimentam do tecido que reveste a câmara larval, os Psilóideos têm por hábito sugar compostos diretamente do floema (Burckhardt 2005), sendo provavelmente menos influenciados pela concentração de metabólitos armazenados no córtex das galhas, como proposto por Larson e Whitham (1997). Ao se alimentarem, os insetos ativamente procuram pelos feixes floemáticos, onde mantêm inserido o seu aparelho bucal pela maior parte do tempo (Prado e Tjallingii 1994). Sendo assim, é plausível supor que a realocação de substâncias observada esteja ligada à proteção do indutor contra inimigos naturais, quando do acúmulo de metabólitos secundários tóxicos. Uma vez que o galhador se alimenta diretamente do floema, os compostos energéticos do metabolismo primário estão ligados muito provavelmente, à manutenção da estrutura neoformada.

Dosagem de pigmentos, carboidratos e nitrogênio

Os resultados obtidos demonstram uma drástica diminuição do teor de clorofilas totais quando comparadas FNG e G. Estudos anteriores demonstraram que esta resposta é comum durante a formação de galhas (Yang *et al.* 2003, Khattab e Khattab 2005, Castro 2007, Fleury 2009, Dias 2010, Magalhães 2010) sendo hipotetizadas diversas causas, tais como a supressão de síntese de proteínas do aparato fotossintético ou mesmo estresse oxidativo causado pela ação do galhador.

A razão clorofilas *a/b* revelou-se um parâmetro abaixo do esperado para folhas, aproximadamente 3 (Lichtenthaler 1987), tanto em FNG quanto em G. Esse resultado indica uma deficiência do aparato fotossintético provavelmente devido a baixos teores

de clorofila *a*. A redução da razão clorofila *a/b* pode indicar que as folhas estão em processo de envelhecimento (Wolf 1956, Goodwin 1958) ou estresse lumínico (Yang *et al.* 1998) devido a proteólise no complexo antena do fotossistema II. Uma vez que FNG e G estão sujeitas a condições intensas de luz ao longo do ano podemos inferir que seja o estresse lumínico, adicionalmente ao fator biótico em G, os responsáveis pelas baixas razões clorofila *a/b*.

Para que haja o desenvolvimento de um aparato fotossintético funcional são necessárias fontes de nitrogênio e carbono em quantidades substanciais (Taiz e Zeiger 2004). O teor de nitrogênio nas galhas, bastante abaixo daquele encontrado para as folhas, sugere a sua natureza pouco protéica. Isso, muito provavelmente, se deve ao subdesenvolvimento dos fotossistemas I e II, complexos que normalmente abarcam uma grande quantidade de proteínas. Yang *et al.* (2003) observaram que mutações durante o desenvolvimento de galhas causam diminuições na produção de pigmentos e proteínas. Essa redução requer que a galha funcione como um dreno, de modo a garantir o aporte de açúcares a serem utilizados na manutenção da estrutura e nutrição do galhador em detrimento do desenvolvimento de um aparato fotossintético eficiente. De fato, a análise de carboidratos revelou que, a despeito da sua deficiência fotossintética, as G acumulam amido tanto quanto FNG. O fato desta substância não ter sido histoquimicamente detectada provavelmente se deve às flutuações as quais o acúmulo de amido está sujeito nos tecidos da planta. A diferença discreta na concentração de PSA pode ser explicada pelo *continuum* anatômico e metabólico entre folha e galha, que atinge por vezes, um equilíbrio. Açúcares solúveis totais, por sua vez, estão em quantidade significativamente menor do que a encontrada em FNG, o que pode ser explicado pela diferença na densidade e volume celulares nos dois órgãos (*cf.* Carneiro 2011, cap.2).

As mudanças observadas corroboram as hipóteses relacionadas à nutrição e proteção do inseto indutor (Price *et al.* 1987). Ainda, o perfil histoquímico foi atribuído a características intrínsecas da espécie hospedeira, podendo haver a mobilização de substâncias para a manutenção da maquinaria celular da galha. A deficiência fotossintética é produto da associação dos estresses bióticos e abióticos impactantes sobre FNG e G. As análises nutricionais corroboram o *continuum* e as peculiaridades

das relações forma e função nas folhas e galhas. O sistema estudado é condizente com o padrão de mudanças químicas e fisiológicas para galhas de insetos sugadores na região Neotropical.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a CAPES e FAPEMIG pelo provimento de recursos revertidos em bolsas e ao Professor Marcel França Giovanni pela gentileza ao ceder para uso o destilador de nitrogênio e espectrofotômetro.

Referências

ABRAHAMSON WG e WEIS AE (1997) Evolutionary ecology across three trophic levels: goldenrods, gall-makers and natural enemies. Monographs in population biology 29. Princeton University Press.

ALONI R (2001) Foliar and axial aspects of vascular differentiations: Hypotheses and evidence. Journal of Plant Growth and Regulation 20: 22-34.

ÁLVAREZ R, ENCINA A e PÉREZ HIDALGO N (2008) *Pistacia terebinthus* L. leaflets: an anatomical study. Plant Systematics and Evolution 272: 107–118.

ÁLVAREZ R, ENCINA A e PÉREZ HIDALGO N (2009) Histological aspects of three *Pistacia terebinthus* galls induced by three different aphids: *Paracletus cimiciformis*, *Forda marginata* and *Forda formicaria*. Plant Science 176: 303-314.

BECKMAN CH (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiological and Molecular Plant Pathology 57: 101-110.

BOUAZIZ M, GRAYER RJ, SIMMONDS MSJ, DAMAK M e SAYADI S (2005) Identification and Antioxidant Potential of Flavonoids and Low Molecular Weight Phenols in Olive Cultivar Chemlali Growing in Tunisia. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53: 236-241.

BRONNER R (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD e Rohfristsch O, eds). Oxford University Press, New York.

BRUNDETT MC, KENDRICK B e PETERSON CA (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic e Histochemistry* 66: 111-116.

BURCKHARDT D (2005) Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Psyllids (Hemiptera: Psylloidea). In: Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods (Raman A, Schaefer CW e Withers TM, eds). Science Publishers, Plymouth, UK.

BURSTEIN M, WOOL D e ESHEL A (1994) Sink strength and clone-size of sympatric, gall-forming aphids. *European Journal of Entomology* 91: 57-61.

CASTRO ACR (2007) Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

CHOW PS e LANDHÄUSSER SM (2004) A method for routine measurements of total and starch content in woody plant tissue. *Tree Physiology* 24: 1129-1136.

DAVID R e CARDE JP (1964) Coloration defférentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 258: 1338-1340.

DAWKINS R (1982) The extended phenotype: the gene as the unit of selection. Oxford: Oxford University Press.

DIAS GG (2010) Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): alterações químicas e estruturais e interações com parasitoides e inquilinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

DRUMMOND MM (2005) Galhas entomógenas em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae): estrutura anatômica, histoquímica e sazonalidade. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS P.A. e SMITH F (1956) Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

DUNN MJ (1993) Gel Electrophoresis: Proteins. Bios Scientific Publishers, Oxford.

FEUCHT W, SCHMID PPS e CHRIST E (1986) Distribution of flavonols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *Journal of Plant Physiology* 125: 1-8.

FLEURY G (2009) Reações estruturais, histoquímicas e fisiológicas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) a Cecidomiidae galhadores. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

FORMIGA AT, GONÇALVES SJMR, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2009) Relações entre o teor de fenóis totais e o ciclo das galhas de Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* Müll. Arg. (Apocynaceae). Acta Botanica Brasilica 23(1): 93-99.

GOODWIN TW (1958) The changes in carotenoid and chlorophyll pigments in the leaves of deciduous trees during autumn necrosis. Biochemistry Journal 68(3): 503-511.

HARTLEY SE (1998) The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? Oecologia 113: 492-501.

HENRIQUES AT, KERBER VA e MORENO PRH (2000) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In Farmacognosia: da planta ao medicamento (CMO Simões, EP Schenkel, G Gosmann, JCP Mello, LA Mentz e PR Petrovik, eds.). 2ª ed. Editora da UFSC, Santa Catarina.

HORI K (1992) Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD e Rohfristsch O, eds). Oxford University Press, New York.

JOHANSEN DA (1940) Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc..

KHATTAB H e KHATTAB I (2005) Responses of eucalypt trees to the insect feeding (gall-forming psyllid). International Journal of Agriculture and Biology 7(6): 979-984.

KRAUS C e SPITELLE G (1997) Comparison of Phenolic Compounds from Galls and Shoots of *Picea glauca*. Phytochemistry 44(1): 59-67.

KRAUS JE e ARDUIN M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica RJ, EDUR.

LARSON KC e WHITHAM TG (1997) Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. Oecologia 109: 575-582.

LEES DH e FRANCIS FJ (1972) Standardization of pigment analyses in cranberries. HortScience 7(1): 83-84.

LICHTENTHALER HK (1987) Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

LICHTENTHALER HK, WALLBURN AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions 11: 591-592.

LIMA FS (2008). Respostas estruturais e fisiológicas de *Richeria grandis* Vahl. (Phyllanthaceae) ao estabelecimento do Psyllidae galhador. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

LIN SY e DENCE CW (1992) Methods in lignin chemistry. Berlim: Spring-Verlag, 568p.

MAGALHÃES TA (2010) Influência da fenologia no desenvolvimento e fisiologia da galhas de *Eriogalococcus* gen. nov. Hodgson em *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

MANI MS (1964) Ecology of plant galls. The Hague (The Netherlands): Dr. W. Junk Publishers. The Netherlands.

MOTULSKY H (1992-2009) Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, GraphPad Software Inc.

MOURA MZD, SOARES GLG e ISAIAS RMS (2009) Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* (Verbenaceae). Australian Journal of Botany 56: 153-160.

NYMAN T e JULKUNEN-TIITTO R (2000) Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America 97(24): 13184-13187.

OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2009) Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of the midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinioideae). Revista de Biologia Tropical 57(1-2): 293-302.

OLIVEIRA DC e ISAIAS RMS (2010) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). South African Journal of Botany 76(2):239-248.

OLIVEIRA DC, MAGALHÃES TA, CARNEIRO RGS, ALVIM MN, ISAIAS RM (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns?. Protoplasma 242(1-4): 81-93.

PASCUAL-ALVARADO E, CUEVAS-REYES P, QUESADA M E OYAMA K (2008) Interactions between galling insects and leaf-feeding insects: the role of plant phenolic compounds and their possible interference with herbivores. Journal of Tropical Ecology 24: 329-336.

PRADO E e TJALLINGII WF (1994) Aphid Activities During Sieve Element Punctures. Entomologia Experimentalis et Applicata 72(2): 157-165.

PRICE PW, FERNANDES GW e WARING GL (1987) Adaptive nature of insect gall. *Environment Entomology* 16: 15-24.

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

RAMAN A, MADHAVAN S, FLORENTINE SK e DHILEEPAN K (2006) Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema strenuana* inferred from the signatures of isotopic carbon and nitrogen and concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119: 101-107.

RAMOS MFD, MONTEIRO SD, DA SILVA VP, NAKAMURA MJ, SIANI AC (2010) Essential Oils From Myrtaceae Species of the Brazilian Southeastern Maritime Forest (Restinga). *Journal of Essential Oil Research* 22(2): 109-113.

ROHFRITSCH O (1992) Patterns in Gall Development. In *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD e Rohfritsch O, eds). Oxford University Press, New York.

ROININEN H, PRICE PW, JULKUNEN-TIITTO R, TAHVANAINEN J e IKONEN A (1999) Oviposition Stimulant for a Gall-inducing Sawfly, *Euura lasiolepis*, on Willow is a Phenolic Glucoside. *Journal of Chemical Ecology* 25(4): 943-953.

ROSSETI S, BONNATTI PM (2001) In situ histochemical monitoring of ozone-and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 433-442.

SASS JE (1951) *Botanical Microtechnique*. 2ª ed. Ames: Iowa State College Press.

SIMMONDS MSJ (2001) Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56: 245-252.

SIMMONDS MSJ (2003) Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* 64: 21-30

STONE GN e SCHÖNROGGE K (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18(10): 512-522.

TAIZ L e ZEIGER E (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed.

TEDESCO MJ, GIANELLO C, BISSANI CA, BOHNEN H e VOLKWEISS SJ (1995) *Análise de solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 174p.

WEIS AE e ABRAHAMSON WG (1986) Evolution of host-plant manipulation by gallmakers: ecological and genetic factors in the *Solidago-Eurosta* system. *The American Naturalist* 127: 681-95.

WOLF FT (1956) Changes in chlorophyll a and b in autumn leaves. *American Journal of Botany* 43: 714-718.

YANG CM, YANG MM, HUANG MY, HSU JM e JANE WN (2003) Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44: 314-321.

YANG D, WEBSTER J, ADAM Z, LINDAHL M E ANDERSSON B (1998) Induction of Acclimative Proteolysis of the Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein of Photosystem II in Response to Elevated Light Intensities. *Plant Physiology* 118: 827–834.

ZUANAZZI JAS (2000) Flavonóides. In *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (CMO Simões, EP Schenkel, G Gosmann, JCP Mello, LA Mentz e PR Petrovik, eds.). 2ª ed. Editora da UFSC, Santa Catarina.

Conclusões finais



Conclusões finais

O estudo do sistema *Psidium myrsinoides* O. Berg (Myrtaceae) – *Neotrioza* cf. *tavaresi* Crawf. (Hemiptera: Psylloidea) revelou características que enriquecem o conhecimento a cerca da biologia de galhas neotropicais. Ao ser comparado a outros modelos previamente estudados, possibilitou a avaliação de alguns aspectos ecológicos, estruturais, fisiológicos e químicos similares e outros peculiares. Estes foram discutidos dentro da perspectiva da manipulação dos tecidos do hospedeiro enquanto fator preponderante para o sucesso reprodutivo destes parasitas altamente especializados.

As galhas de *Neotrioza* cf. *tavaresi* possuem formato elipsóide, com uma grande variação de cor, que vai do vermelho intenso ao verde claro. Seu tamanho considerável e cores chamativas as tornam uma estrutura bastante conspícua e, possivelmente aposemática. *Psidium myrsinoides* é uma planta perene cujas fenofases de brotação, maturação e senescência foliar possuem pouca demarcação. Apesar de folhas estarem sempre disponíveis ao longo do ano, somente as jovens são atacadas pelo galhador no momento da indução. Este evento é único e ocorre somente quando todos os indivíduos da população de *P. myrsinoides* estão brotando. Dessa maneira, *Neotrioza* cf. *tavaresi* apresenta ciclo de vida univoltino, fato pouco usual para insetos galhadores associados a espécies perenes na região tropical. Seu desenvolvimento passa por cinco estádios ninfais e o adulto, estando de acordo com o padrão descrito para a superfamília Psylloidea. Os níveis de infestação de *Neotrioza* cf. *tavaresi* em *Psidium myrsinoides* são baixos quando comparados a outros sistemas. Com a análise fenológica da planta hospedeira e do inseto indutor fica clara a existência de uma sincronia entre estes, característica que afeta diretamente a dinâmica populacional dos galhadores e, possivelmente, da guilda associada.

O desenvolvimento padrão do órgão hospedeiro, a folha, é similar a outros anteriormente descritos, apresentando características típicas das Myrtaceae. A morfogênese da galha, no entanto, é fruto de processos citológicos complexos ocorrentes nas diferentes camadas de seus tecidos, sendo finamente regulados pelo galhador. As faces adaxial e abaxial da epiderme das folhas originam as faces interna e externa da epiderme da galha, respectivamente. O meristema adaxial contribui para a formação e obliteração do ostíolo, local onde este tecido possui características hiperplásicas. No córtex da galha, entretanto, ele apenas se divide para acompanhar o crescimento da estrutura, possibilitando o acesso do galhador aos feixes vasculares que se diferenciam a partir do córtex mediano adjacente. No

córtex externo, mais hiperplásico e hipertrófico, há incremento de camadas celulares, além de diferenciação de muitas glândulas de óleo essencial subepidérmicas. Na maturidade, a porção mediana do córtex externo se lignifica, conferindo sustentação à estrutura e proteção mecânica ao inseto. A produção do canal de fuga do inseto adulto é passiva, envolvendo processos de morte celular, processo ainda não descrito para outras galhas. Dessa maneira, é plausível supor que, apesar da especificidade e unicidade dos processos morfogênicos observados, estes corroboram a premissa clássica de que a galha constitui uma estrutura que incrementa a proteção e os sítios de alimentação do galhador.

As análises de pigmentos, histoquímicas e nutricionais revelaram diferenças bem definidas entre os tecidos não galhados e as galhas. Os tecidos das galhas se mostraram deficitários em pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores em relação às folhas não galhadas, sendo esta uma resposta amplamente notificada. Isso denota a natureza da galha como dreno de fotoassimilados, bem como sua dependência do órgão hospedeiro, tendo em vista o acúmulo de substâncias tanto do metabolismo primário, quanto do secundário, visualizados por técnicas histoquímicas. As análises dos teores de carboidratos e nitrogênio corroboram essa hipótese, uma vez que as galhas apresentam menor teor de nitrogênio, possivelmente pelo subdesenvolvimento do seu aparato fotossintético, e teores de carboidratos similares às folhas não galhadas. Isso evidencia a complexa dinâmica envolvida na morfogênese e manutenção da estrutura neoformada, a galha, somente possível pela formação de um *continuum* anatômico-fisiológico estabelecido entre esta e o órgão hospedeiro. Essa característica garante o aporte e concentração de substâncias que protegem quimicamente o galhador contra inimigos naturais e suprem os custos energéticos da manutenção da estrutura da galha.

Os estudos conduzidos com o sistema *Psidium myrsinoides* – *Neotrioza* cf. *tavaresi* evidenciam a multiplicidade de abordagens aplicáveis a estes verdadeiros microlaboratórios naturais, as galhas. Tendo em vista a alta diversidade vegetal e animal da região Neotropical, estudos como este revelam aspectos únicos, não conhecidos, tanto no âmbito ecológico quanto no anatômico, fisiológico e químico das galhas.

Como perspectivas futuras, há a descrição de uma nova espécie de inseto galhador, além de estudos químicos e citológicos que permitirão aprimorar a visão funcional e definição da forma em estruturas neoformadas repetitivamente na natureza, as galhas.