



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



UFMG

THIAGO ALVES MAGALHÃES

**INFLUÊNCIA DA FENOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO E
FISIOLOGIA DAS GALHAS DE *Eriogallococcus* gen. nov.
EM *Pseudobombax grandiflorum* (CAV.) A. ROBYNS
(MALVACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



UFMG

THIAGO ALVES MAGALHÃES

**INFLUÊNCIA DA FENOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO E
FISIOLOGIA DAS GALHAS DE *Eriogallococcus* gen. nov.
EM *Pseudobombax grandiflorum* (CAV.) A. ROBYNS
(MALVACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal

Orientador: Prof. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias

Universidade Federal de Minas Gerais

**BELO HORIZONTE – MG
2010**

043 Magalhães, Thiago Alves.
Influência da fenologia no desenvolvimento e fisiologia das galhas de *Eriogallococcus* gen. nov. em *Pseudolombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae) [manuscrito] / Thiago Alves Magalhães. – 2010.

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

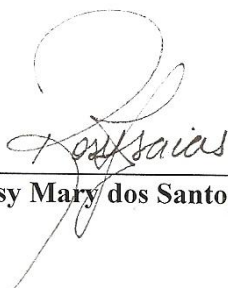
Orientadora: Rosy Mary dos Santos Isaias.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica.

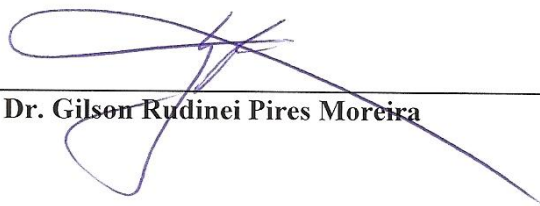
1. Galhas (Botânica) - Teses. 2. Anatomia vegetal - Teses. 3. Análise foliar - Teses. 4. Sincronia fenológica. 5. Fenologia vegetal - Teses. 6. Clorofila - Análise - Teses. 7. Botânica - Teses. I. Isaias, Rosy Mary dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. III. Título.

CDU: 581

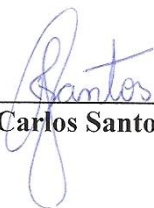
Dissertação defendida e aprovada, em 26 de fevereiro de 2010, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias - Orientador



Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira



Dr. Jean Carlos Santos

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	01
ABSTRACT	02
INTRODUÇÃO GERAL	03
CAPÍTULO I - Sincronia fenológica e ausência de dimorfismo fenotípico em galhas de <i>Eriogalococcus</i> gen. nov. em <i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Cav.) A. Robyns (Malvaceae)	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
RESULTADOS	16
FIGURAS	19
DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO II - Reflexos do dimorfismo sexual na anatomia e histoquímica das galhas de <i>Eriogalococcus</i> gen. nov. em <i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Cav.) A. Robyns (Malvaceae)	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS	42
FIGURAS	46
DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO III - Teores de clorofilas no sistema <i>Eriogalococcus</i> gen. nov. - <i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Cav.) A. Robyns (Malvaceae)	61
RESUMO	62
ABSTRACT	63
INTRODUÇÃO	64
MATERIAL E MÉTODOS	65
RESULTADOS	66

FIGURAS	68
DISCUSSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78

Dedico aos meus Pais...

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e saúde para realizar este trabalho.

Em especial a Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias pela orientação e confiança. Obrigado pela sinceridade, disponibilidade e por todo conhecimento que me foi passado.

À Capes pela bolsa, ao departamento de Botânica e a Pós-graduação em Biologia Vegetal da UFMG pela oportunidade.

Ao Denis Coelho de Oliveira pelas inúmeras ajudas durante as coletas, análises dos dados e redação da dissertação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves e a técnica Eloisa do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA pela disponibilidade.

Aos professores do Laboratório de Anatomia Vegetal, Profa Denise, Prof. Élder e Prof. Fernando sempre disponíveis e prontos a ajudar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Botânica da UFMG, por toda ajuda dispensada quando foi preciso.

Aos funcionários da Gruta da Lapinha, onde sempre fui muito bem recebido.

Ao Prof. Marcos Sobral pela identificação da espécie botânica e ao PhD. C. Hodgson pela identificação do inseto.

Ao Wagner pelas inúmeras ajudas prestadas nos experimentos.

Aos colegas Ana Sílvia, Denis, Grazi, Renê, Graci, Anete, Marina Neiva, Bruno, Ariane, Cibelli, Marcinha, Marquito, Marcão, Luiza, Maria Tereza, Rainna, Martha, Gigio, Priscila, Wagner, Ana Paula, Rafaela, Marina Luscher, Maria Olívia e a todos os colegas do laboratório de Anatomia e da Pós pela ótima convivência durante esses dois anos.

Ao Marcão, Marquito, Fernandinho, Marina Neiva, Marininha e Denis pelas ajudas com as coletas de campo.

Aos amigos Rosy, Denis, Ana Sílvia e Marina Neiva pelas boas conversas e cervejadas compartilhadas.

Aos grandes amigos de Bom Sucesso, pela confiança e que sempre foram presentes pelo incentivo nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao Ivan, Hugo, Waguinho e Matheus pelas cervejas, prosas e convivência durante esse todo esse tempo.

Em especial ao meu pai Júlio e minha mãe Ednéa que me apoiaram, incentivaram e principalmente sempre respeitaram as minhas decisões. A minha avó Elza pelo carinho,

aos meus irmãos Hugo e Júlio pelo amor e exemplo. A toda a minha família que sempre esteve do meu lado.

RESUMO GERAL

Um dos fatores importantes nas interações que levam ao desenvolvimento das galhas é a adequação do ciclo de vida do herbívoro ao ciclo de vida da planta hospedeira. Esta adequação é especialmente importante quando o sistema envolve plantas decíduas, como é o caso do sistema *Eriogalococcus-Pseudobombax grandiflorum*. O estudo deste sistema permitiu verificar a existência de sincronia fenológica entre o galhador e a planta hospedeira, sincronia esta vital para a manutenção da espécie do galhador. Diferentemente do comumente encontrado nos Eriococcidae, o dimorfismo sexual dos galhadores não é refletido nas galhas em termos morfológicos, sendo tênues as características anatômicas diferenciais entre galhas induzidas por machos e fêmeas, detectadas no formato da câmara ninfal e nas células do revestimento desta. Independente do sexo dos indutores, as galhas são verdes, glabras, intralaminares, com projeção aciculada para a face adaxial e ostíolo voltado para a abaxial. Pela avaliação estrutural, pode-se concluir que há influência da forma na função fotossintética dos tecidos, uma vez que o percentual de tecido clorofiliano e o teor de clorofilas são menores nas galhas, e não diferem entre folíolos galhados e não galhados. Os galhadores manipulam a constituição química dentro dos limites metabólicos da planta hospedeira, o que é inferido pela similaridade entre os perfis histoquímicos dos tecidos não galhados e das galhas.

Palavras chave: anatomia foliar, desenvolvimento de galhas, sincronia fenológica, teores de clorofilas

ABSTRACT

One of the important factors in the interactions that ends up in the development of galls is the adjustment of the herbivore life cycle to that of its host plant. This adjustment is especially important when the system involves deciduous plants, such as that of *Eriogalococcus-Pseudobombax grandiflorum* system. The study of this system revealed the existence of phenological synchrony between the host plant and the galling herbivore, which is vital to the maintenance of the galling species. Unlike commonly found in Eriococcidae, the sexual dimorphism of the galling herbivores is not reflected in gall morphotype, also there are subtle anatomical differences between galls induced by male and female, namely, the shape of the nymphal chamber and the cells of its dermal system. Regardless the sex of the inducers, the galls are green, glabrous, intralaminar, with a needle-like projection to the adaxial surface, and an ostiole facing the abaxial surface. By structural evaluation, we could conclude that there is an influence of the shape on the function of photosynthetic tissues, since the percentage of chlorophyllous tissue and chlorophyll content were lower in galls, and did not differ between galled and non galled leaflets. The galling herbivore manipulate the chemical composition of its host plant within its metabolic limits, which is inferred by the similarity between the histochemical profiles of non galled tissues and galls.

Keywords: chlorophyll contents, gall development, leaf anatomy, phenological synchrony

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas representam aproximadamente 20% do número de espécies de organismos vivos já descritos, sendo de extrema importância por ocuparem o primeiro nível trófico na teia alimentar. A importância ecológica das plantas é também evidenciada pela sua diversidade e complexidade estrutural, o que lhes permite oferecer abrigo e proteção a diversos organismos, dentre os quais se destacam os insetos que representam cerca de 57% das espécies de seres vivos (Araújo 1997, Price 1997). Uma importante interação entre as plantas e insetos do ponto de vista ecológico é a formação de galhas (Kraus 1997).

Galhas são estruturas simétricas induzidas em plantas pela ação alimentar de insetos (Raman 2007) e possuem tecidos com características e funções típicas (Oliveira & Isaias 2009); se originam por meio de hipertrofia celular e hiperplasia dos tecidos vegetais, inibição do desenvolvimento ou modificação citológica em resposta ao ataque do galhador (Mani 1964). A interação que leva a formação de galhas é altamente específica e permite tanto a identificação do indutor quanto do hospedeiro no qual se aloja (Redfern & Askew 1992), tendo por base os caracteres morfológicos e anatômicos gerados.

Os insetos galhadores são sensíveis a pequenas mudanças fisiológicas, químicas e fenológicas nas plantas hospedeiras (Floate *et al.* 1996), podendo desta forma perceber peculiaridades entre hospedeiras co-ocorrentes na mesma região (Cook & Gullan 2008). A ação dos insetos galhadores resulta em profundas alterações estruturais e modificações bioquímicas, notadas tanto em relação aos metabólitos primários quanto aos secundários, nos tecidos das plantas hospedeiras (Arduin *et al.* 1989, 1994; Arduin & Kraus 1995, 2001; Kraus *et al.* 1996; Hartley 1998, Oliveira *et al.* 2006, Moura *et al.* 2008, Oliveira & Isaias 2009). O acúmulo de substâncias é influenciado pelo *taxa* indutor, mas ocorre dentro de limites metabólicos da planta hospedeira (Moura 2008). Nas folhas, mudanças decorrentes da formação de galhas podem ocasionar modificações estruturais do tecido clorofiliano, alterar a quantidade pigmentos (Yang *et al.* 2003; Castro 2007; Yang *et al.* 2007, Fleury 2009) e conseqüentemente afetar a síntese de clorofila, produto do metabolismo primário do vegetal (Taiz & Zeiger 2004; Lüttge 1997).

A interação inseto-planta tem início com a escolha do sítio de indução, que relacionado ao desenvolvimento da galha e a capacidade dos indutores de deixarem descendentes tornam-se essenciais para a compreensão da evolução da interação entre

insetos herbívoros e sua planta hospedeira (Thompson & Pellmyr 1991). Em geral, há preferência do herbívoro galhador por tecidos jovens, devido principalmente a sua capacidade de reação ao estímulo e formação da galha (Rohfritsch & Anthony 1992). Entretanto, outro fator como a maior qualidade nutricional pode influenciar na preferência pelo sítio de oviposição (Coley & Barone 1996), contudo, esta pode ocorrer tanto em tecidos jovens quanto em maduros (Oliveira & Isaias 2009, Arduin & Kraus 1995). A capacidade de o tecido jovem e maduro reagir ao estímulo do galhador pode conferir diferentes valores adaptativos, tecidos jovens podem conferir maior valor nutricional e tecidos maduros proteger contra dessecação e contra inimigos naturais (Oliveira & Isaias 2009). As hipóteses, nutricional, microambiental e de proteção, são extremamente relevantes para a discussão do valor adaptativo em termos da morfologia da galha (Price *et al.* 1986, Stone & Schönrogge 2003).

Além da escolha adequada do sítio de oviposição, a adequação do ciclo de vida do herbívoro ao ciclo de vida da planta hospedeira é crucial. Por parte do vegetal, a época e a duração do rompimento dos brotos, expansão, maturidade além da senescência das folhas, são cruciais para seu bom desempenho (Fenner 1998). Em florestas tropicais secas, a senescência foliar pode ser favorecida por fatores tais como o declínio do fotoperíodo, aumento do estresse hídrico e envelhecimento (Borchert *et al.* 2002). A época de brotação parece conciliar condições ambientais favoráveis, maximizando o ganho de carbono, a eficiência da planta no uso de recursos e o escape da ação de herbívoros (Fenner 1998). Variações nas condições climáticas afetam a fenologia da planta hospedeira e podem alterar o ciclo de vida e a distribuição de insetos galhadores, além do mais, a sincronia das fenofases da planta hospedeira com o ciclo de vida do herbívoro é um evento crítico que determina a quantidade e qualidade de recursos nutricionais juntamente com a abundância de indivíduos (Yukawa 2000). Quando induzidas em tecidos jovens, a sincronia entre a fenologia da planta hospedeira e o ciclo de vida do inseto é necessária para o sucesso reprodutivo dos galhadores (Yukawa 2000; Weis *et al.* 1988), exigência que gera uma forte tendência para o univoltinismo (Weis *et al.* 1988).

Galhadores univoltinos podem ser comum em plantas decíduas. Uma espécie arbórea comum em matas semidecíduas é *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns que apresenta de 15 a 25 m de altura, tronco com 50 a 80 cm de diâmetro, folhas compostas, decíduas, com folíolos glabros e coriáceos (Lorenzi 1998), e é altamente infestada por galhas de Eriococcidae (obs. pess.). O estímulo para a indução das galhas,

nesse grupo, é a saliva do inseto que entra em contato com os tecidos vegetais através do estilete (Gullan *et al.* 2005). Os Eriococcidae apresentam dois instares imaturos nas fêmeas e quatro nos machos, sendo o primeiro instar chamado de *crawler* (Gullan *et al.* 2005). Uma peculiaridade dos Eriococcidae é que o dimorfismo sexual dos insetos pode ser refletido no fenótipo das galhas (Gullan *et al.* 2005). Analisando as galhas de Eriococcidae em *P. grandiflorum* os objetivos deste trabalho são avaliar: se existe sincronia fenológica entre o galhador e planta hospedeira; se o dimorfismo sexual dos galhadores é refletido nas galhas em termos morfológicos e anatômicos; e se há as alterações anatômicas, histoquímicas e fisiológicas causadas pela ação do galhador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo MCP. 1997. Aspectos ecológicos e evolutivos da interação entre animais e plantas, 11-48. In: Araújo MCP, Coelho GC & Medeiros I. Interações ecológicas e biodiversidade. UNIJUI, Ijuí.
- Arduin M, Kraus JE & Montenegro G. 1994. Morfologia e fenologia de galhas foliares de *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). Revista Brasileira Entomologia 38:79-89.
- Arduin M & Kraus JE. 1995. Anatomia e ontogenia de galhas foliares de *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). Boletim. Botânica, Universidade de São Paulo 14:109-130.
- Arduin M & Kraus JE. 2001. Galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concinna* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). Revista Brasileira Botânica 24:64-71
- Arduin M, Kraus JE, Otto P & Venturelli M. 1989. Caracterização morfológica de biométrica de galhas foliares em *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). Revista Brasileira Botânica 14:147-156.
- Borchert R, Rivera G & Hagnauer W. 2002. Modification of vegetative phenology in a tropical semi-deciduous forest by abnormal drought and rain. Biotropica 34: 27-39.
- 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, Brasil.

- Coley PD & Barone JA. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forest. *Annual Review Ecology and Systematics* 27:305-335.
- Cook LG & Gullan PJ. 2008. Insect, not plant, determines gall morphology in the *Apiomorpha pharetrata* species-group (Hemiptera: Coccoidea). *Australian Journal of Entomology* 47:51-57.
- Fenner M. 1998. The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1:78-91.
- 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, Brasil.
- Floate KD, Fernandes GW & Nilson J. 1996. Distinguishing intrapopulacional categories of plants by their insect faunas: galls on rabbitbrush. *Oecologia* 105:221-229.
- Gullan PJ, Miller DR & Cook LG. 2005. Gall-inducing scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea), 159–229. *In*: Raman A, Schaefer CW, Withers TM. *Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods*. Enfield (UK): Science Publishers.
- 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.
- Kraus JE. 1997. Respostas morfo genéticas de plantas a indutores galhadores. 59-76. *In*: Araújo MCP, Coelho GC & Medeiros I. *Interações ecológicas e biodiversidade*. UNIJUI, Ijuí.
- Kraus JE, Sugiura HC & Cutrupi S. 1996. Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *tuberculata* (Meliaceae). *Fitopatologia brasileira* 21:349-356.
- Lorenzi H. 1998. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivos de Plantas Arbóreas do Brasil*. Ed. Plantarum. V1. Nova Odessa, SP.
- Lüttge U. 1997. *Physiological Ecology of Tropical Plants*. Springer Verlag, Berlin.
- Mani MS. 1964. *Ecology of plant galls*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Moura MZD, Isaias RMS & Soares GLG 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Journal of Botany* 56:153-160.
- Oliveira DC, Christiano JCS, Soares GLG & Isaias RMS. 2006. Reações estruturais e químicas de defesa de *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae) e ação do

- gallador *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera, Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica* 29:657-667.
- Oliveira DC & Isaias RMS. 2009. Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Revista de Biologia Tropical* 57:293-302.
- Oliveira DC & Isaias RMS. 2009. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *South African Journal of Botany* *in press*.
- Price PW. 1997. General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution* 31:405-420.
- Price PW, Waring GL & Fernandes GW. 1986. Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88:361-363.
- Raman A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92:748-757.
- Redfern M & Askew RR. 1992. *Plant galls*. Richmond Publishing Co. England.
- Rohfritsch O & Anthony M. 1992. Strategies on gall induction by two groups of homopterans. 102-117. *In: Shorthouse JD & Rohfritsch O. Biology of insect induced galls*. Oxford University, Oxford.
- Stone GN & Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18:512-522.
- Taiz L & Zeiger E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Ed. Artmed.
- Thompson JN & Pellmyr O. 1991. Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 36:65-89.
- Yang CM, Yang MM, Huang MY, Hsu JM & Jane WN. 2003. Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leaf. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44:314-321.
- Yang CM, Yang MM, Huang MY, Hsu JM & Jane WN. 2007. Life time deficiency of photosynthetic pigment-protein complexes CP1, A1, AB1, and AB2 in two cecidomyiid galls derived from *Machilus thunbergii* leaves. *Photosynthetica* 45:589-593.
- Yukawa J. 2000. Synchronization of gallers with host plant phenology. *Population Ecology* 42:105-113.

Weis AE, Walton R & Crego CL. 1988. Reactive plant tissue and the population biology of gall makers. *Annual Review of entomology* 33:467-486.

Capítulo I

**Sincronia fenológica e ausência de dimorfismo fenotípico
em galhas de *Eriogallococcus* gen. nov. (Hemiptera:Eriococcidae)
em *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae)**

RESUMO

Galhas são estruturas simétricas induzidas por insetos e com alto grau de especificidade, em Eriococcidae há preferência do herbívoro galhador por tecidos jovens e relação do fenótipo das galhas ao sexo do indutor, sendo a sincronia fenológica com a planta hospedeira de fundamental importância para a manutenção da população desses herbívoros. Duas hipóteses foram testadas no sistema *Eriogallococcus* - *Pseudobombax grandiflorum*: (1) existe sincronia fenológica entre hospedeiro e galhador e (2) o dimorfismo sexual dos galhadores é refletido na forma das galhas. Estas foram testadas a partir de análises fenológicas, caracterização das galhas e avaliação dos níveis de infestação. *Pseudobombax grandiflorum* é caducifólia, com brotação antes do início da estação chuvosa, e a indução de galhas sincrônica ao brotamento. A maturação das galhas é concomitante a maturação foliar e a senescência destas precede a caducifolia. As galhas são verdes, glabras, imersas no limbo foliolar, com projeção aciculada para a face adaxial medindo $7,82 \pm 2,13$ mm X $3,05 \pm 0,50$ mm quando maduras e com ostíolo voltado para a abaxial. O ciclo das galhas induzidas pelos machos dura de 40 a 50 dias e o das fêmeas de 75 a 100 dias. O galhador é univoltino, induz galhas morfológicamente similares independente do sexo, diferindo na maturação quanto ao formato da câmara. A sincronia fenológica entre os organismos denota especificidade do sistema. Para os galhadores, o alto investimento na prole mantém os altos níveis de infestação. Para as hospedeiras, há possibilidade de escape fenológico da planta verificada pela variação dos níveis de infestação em ciclos subseqüentes.

Palavras chave: Eriococcidae, galhas, insetos galhadores, interação inseto-planta, sincronismo

ABSTRACT

Galls are symmetrical structures induced by insects with a high degree of specificity. In Eriococcidae, there is usually a preference for oviposition in young tissues, and gall phenotype is related to the sex of the galling insect. The phenological synchrony between these insects and their host plant is fundamental for the maintenance of the population of herbivores. Two hypotheses have been tested in the *Eriogallococcus - Pseudobombax grandiflorum* system, (1) that there is phenological synchrony between the host plant and the galling insect, and (2) that the sexual dimorphism of the insects is reflected in gall morphotype. These hypotheses were tested by phenological analyses, gall characterization, and evaluation of the infestation levels. *Pseudobombax grandiflorum* is deciduous, with sprouting occurring just before the beginning of the rainy season, and the induction of galls synchronous with the sprouting. The maturation of the galls is concomitant to leaf maturation and senescence is just prior to leaf falling. Mature galls are green, glabrous, immersed in leaflet lamina, measuring 7.82 ± 2.13 mm vs. 3.05 ± 0.50 mm, with a projection to the adaxial surface and the ostiole are opened towards the abaxial surface. The cycle of galls induced by males is 40 to 50 days long, and that of the females is 75 to 100 days long. The galling herbivore is univoltine, and it induces morphologically similar galls regardless the sex. They differ at maturity by the shape of the nymphal chamber. The phenological synchrony between the two organisms indicates specificity of the system. For galling insects, the high investment in offspring maintains the high levels of infestation, while for the host plants, there is a possibility of phenological escape verified by the variation in levels of infestation in subsequent cycles.

Key words: Eriococcidae, galls, insect galls, insect-plant interaction, synchronization.

INTRODUÇÃO

Os insetos galhadores são sensíveis a pequenas mudanças fisiológicas, químicas e fenológicas nas plantas hospedeiras (Floate *et al.* 1996), podendo desta forma perceber peculiaridades entre hospedeiras co-ocorrentes na mesma região (Cook & Gullan 2008). A especificidade das interações inseto-planta implica não somente na localização da planta hospedeira, mas na sua seleção, experimentação e adequação do inseto ao microambiente vegetal (Araújo 1997).

Muitas vezes percebe-se uma preferência do herbívoro galhador por tecidos jovens (Rohfritsch & Anthony 1992), em outros casos, a oviposição pode ocorrer tanto em tecidos jovens quanto em maduros (Arduin & Kraus 1995, Oliveira & Isaias 2009). Esta adaptação a oviposição independentemente a idade dos tecidos pode ser um dos determinantes no valor adaptativo das galhas, especialmente em nível anatômico (Oliveira & Isaias 2009). Outro fator determinante do fenótipo das galhas, especialmente em Eriococcidae, é o sexo do indutor, sendo possível distinguir galhas induzidas por machos daquelas induzidas por fêmeas com base na forma externa (Linsenmaier 1972, Meyer 1987, Gullan and Kosztarab 1997, Gullan and Martin 2003, Gonçalves *et al.* 2005, Gullan *et al.* 2005).

Independentemente do fenótipo final das galhas, o estabelecimento dos indutores depende, muitas vezes, da época e da duração da brotação, da expansão, maturidade e senescência das folhas. Estes eventos também são importantes para o bom desempenho das plantas hospedeiras, pois a época de brotação parece conciliar condições ambientais favoráveis, maximizando o ganho de carbono, a eficiência da planta no uso de recursos e o escape da ação de herbívoros (Fenner 1998). A senescência foliar por sua vez pode ser favorecida por fatores tais como a alteração do fotoperíodo, o aumento do estresse hídrico e o envelhecimento como relatado por Borchert *et al.* (2002) para florestas tropicais secas.

Variações nas condições climáticas, além de afetar a fenologia da planta hospedeira (Borchert *et al.* 2002) podem alterar o ciclo de vida e a distribuição de insetos galhadores (Pilson 2000). Portanto, a sincronia entre as fenofases da planta hospedeira e o ciclo de vida do herbívoro é crítica e determina a quantidade e qualidade de recursos nutricionais ofertados ao galhador (Yukawa 2000). Quando a indução de galhas ocorre em tecidos jovens, esta sincronia é necessária para o sucesso reprodutivo dos galhadores (Yukawa 2000; Weis *et al.* 1988) e gera uma forte tendência para o univoltinismo (Weis

et al. 1988). Ambas as estratégias de sincronia e univoltinismo são comuns em habitats de mata seca onde as taxas de herbivoria são grandes (Fernandes & Price 1991, Coley & Barone 1996), a população de herbívoros é reduzida nas estações secas (Coley 1996) e as folhas de espécies decíduas apresentam menor grau de defesa (Coley & Aide 1989).

Pseudobombax grandiflorum (Cav.) A. Robyns é uma espécie arbórea comum em matas semidecíduas, com 15 a 25 m de altura e tronco de 50 a 80 cm de diâmetro, folhas compostas, decíduas, com folíolos glabros e coriáceos (Lorenzi 1998). Esta espécie apresenta infestação por Eriococcidae galhadores tanto em ambientes urbanos quanto em áreas de matas (obs. pess.). O sistema *Eriogallococcus* - *P. grandiflorum* foi estudado de modo a testar: (1) se existe sincronia fenológica entre a planta hospedeira e o galhador, sincronia esta crucial para a manutenção do sistema ao longo do tempo e (2) se o dimorfismo sexual dos galhadores é refletido no fenótipo final das galhas, como comumente relatado para Eriococcidae.

Para testar estas perguntas, os seguintes objetivos foram traçados: (1) analisar o ciclo dos galhadores (machos e fêmeas) e o nível de infestação em relação a fenologia da planta hospedeira de modo a verificar se há sincronia fenológica e (2) verificar se o dimorfismo sexual dos galhadores é refletido na forma das galhas;

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A população de *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae) estudada situa-se em área de afloramento calcário na Gruta da Lapinha, em floresta estacional semidecidual (IBGE, 1992) a 746m de altitude (19°33'67" S; 043°57'54" W), localizada no Parque Estadual do Sumidouro, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. O material vegetal fértil está depositado no herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais (Nº registro - 133730).

Análises fenológicas

A população de *Pseudobombax grandiflorum* foi acompanhada durante os anos de 2008 e 2009. A amostragem para estudos fenológicos seguiu o modelo sugerido por Fournier

e Charpantier (1975), sendo doze indivíduos marcados por ordem de aparecimento dentro da parcela. Durante um ano em visitas quinzenais à área, utilizando ficha fenológica, anotou-se para cada planta marcada a presença ou ausência de brotação, floração e frutificação, sendo calculado o índice de atividade destas fenofases, de modo a estimar a porcentagem de indivíduos da população que apresentam sincronia em determinada estação do ano (Bencke & Morellato 2002). A fenofase de brotação foi considerada desde o início do aparecimento das primeiras folhas até sua expansão (Peroni *et al.* 2002).

Para acompanhar a fenologia da galha, foram escolhidos cinco indivíduos na população, marcados quatro ramos em cada, num total de 20 ramos e 613 folíolos. Em visitas quinzenais, o desenvolvimento das galhas foi acompanhado contando-se o número de galhas por fase: crescimento e desenvolvimento, maturação e senescência. A fase de indução não foi estimada em campo devido as características microscópicas desta.

O desenvolvimento do galhador foi avaliado no segundo ano, foram escolhidos seis indivíduos na população e em cada um destes foi marcado um ramo. Em intervalos de três dias, 12 folíolos foram coletados, sendo 2 em cada ramo; as galhas foram separadas, fixadas em Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (O'Brien & McCully 1981) e posteriormente dissecadas sob estereomicroscópio para separação dos insetos por instar e por sexo. Foram realizadas 33 coletas periódicas, totalizando 641 galhas coletadas e dissecadas. A brotação foi definida como T_0 (tempo zero), a 1ª coleta foi realizada três dias após a brotação, e a última, 33ª coleta, 97 dias após a brotação. A duração dos ciclos de vida dos insetos foi estimada tendo como T_0 o início da fase de indução das galhas e como T_{final} o aparecimento dos *crawlers* para as fêmeas e das primeiras galhas senescentes para os machos.

Sabe-se que estruturas fortemente esclerotinizadas não aumentam de tamanho dentro mesmo instar (Daly 1985) por essa razão a medida linear do fêmur e descrições morfológicas de Eriococcidae galhadores (Gullan *et al.* 2005) foram utilizados para identificação dos instares.

Caracterização morfológica das galhas, níveis de infestação e coleta do indutor

As galhas foram caracterizadas em campo observando-se cor, indumento, forma, localização no folíolo e dimensões. Para quantificar a infestação de galhas, foram contados o número de folíolos galhados e não galhados em cada um dos ramos

marcados e o número de galhas por folíolo. Os dados foram aplicados na seguinte equação:

$$\text{Infestação} = \frac{n^{\circ} \text{ folíolos galhados} \times 100}{n^{\circ} \text{ total de folíolos}}$$

Para identificação do inseto indutor em nível específico, galhas em vários estágios de desenvolvimento foram dissecadas sob estereomicroscópio (Olympus SHZ) e destas retiradas formas imaturas e insetos adultos. Folíolos portando galhas maduras foram acondicionados em armadilhas constituídas de algodão umedecido com água em frascos maiores fechados com tecido de malha fina (voal). As armadilhas foram checadas diariamente. Machos adultos eclodiram nas armadilhas e foram coletados. Ninfas e adultos fixados em etanol 70% foram enviados ao Dr. Christopher Hodgson, especialista em Eriococcidae, para identificação da espécie.

RESULTADOS

Pseudobombax grandiflorum apresentaram fenofases morfológicamente bem definidas (figuras 1A-G). O período vegetativo vai do início de agosto ao final de março (figura 2A). A brotação (figura 1A) ocorre de agosto a outubro com pico de atividade em setembro (figura 2A). Em outubro, praticamente todos os indivíduos apresentam folhas maduras (figuras 1B, 2A). No final de fevereiro, as folhas começam a ficar amareladas (figura 1C) e entrar em senescência (figura 2A) culminando em abril com 100% de caducifolia (figuras 1D e 2A). O período reprodutivo ocorre do início de abril até o final de outubro (figura 2B), coincidindo com o período de caducifolia. Botões florais (figura 1E) começam a se desenvolver no início de abril (figura 2B) e, de maio a agosto, observam-se flores (figuras 1F, 2B). O período de frutificação vai de junho a outubro (figuras 1G, 2B). O período de caducifolia coincide com a diminuição da precipitação na região (figura 3).

As galhas foliolares em *P. grandiflorum* são induzidas em folíolos jovens, apresentam apenas um indutor por câmara ninfal, são verdes, glabras, intralaminares, com projeção aciculada para a face adaxial (figuras 4A e 4B) e ostíolo voltado para a abaxial (figura 4C), medindo $7,82 \pm 2,13$ mm (projeção) x $3,05 \pm 0,50$ mm (diâmetro) quando maduras. O galhador pertence a um gênero não descrito de Eriococcidae, é

univoltino, induz galhas morfológicamente similares independente do sexo, diferindo na maturação quanto ao formato da câmara.

A infestação dos folíolos foi de 98,2% em 2008 e de 79,7% em 2009. No primeiro ano, o ciclo das galhas foi avaliado quinzenalmente, contando em média 870 galhas a cada visita (mínimo de 225 e máximo de 1443 galhas). Em outubro de 2008, observou-se um decréscimo no número de galhas (figuras 4B-C) contabilizadas devido a uma rigorosa chuva de granizo que atingiu a área em setembro (figura 4C), e ao ataque de um Lepidoptera folhívoro de vida livre (figura 4D), que acabaram danificando consideravelmente os folíolos da planta hospedeira.

Galhas em fase de crescimento e desenvolvimento (figuras 5 e 6A) são observadas no intervalo de 6 a 14 dias após o início da brotação. Esta fase (figuras 6A-C) dura aproximadamente 54-67 dias (figura 5). A fase de maturação ocorre entre 27 e 39 dias de desenvolvimento, sendo o pico de galhas maduras (figura 6D) observado no intervalo de 54 a 69 dias (figura 5). Galhas em fase de senescência (figura 6E) foram observadas entre 60 e 72 dias de desenvolvimento e a senescência total de 112 a 115 dias após o início do ciclo (figura 5).

Todo o ciclo do galhador ocorre durante a fase vegetativa da planta hospedeira, sendo que as fases de indução e de crescimento e desenvolvimento ocorrem simultaneamente ao período de brotação e expansão foliar. As galhas maduras e senescentes ocorrem no final do período de brotação, ficando associadas ao período em que a hospedeira apresenta folíolos maduros (figura 7). Os indutores foram identificados como *Eriogallococcus* gen. nov. (Hodgson 2010, unpublished data).

A indução das galhas é feita por insetos em 2º instar, o que pode ser confirmado pela comparação com os *crawlers* coletados na saída das galhas induzidas pelas fêmeas. O tamanho médio do fêmur dos *crawlers* é $48,09 \pm 1,03 \mu\text{m}$ e dos insetos de 2º instar é de $64,21 \pm 0,75 \mu\text{m}$.

Analisando o ciclo de desenvolvimento do galhador (figuras 8A-H), observa-se que nas coletas de 1 a 4 (figura 8A), as amostras apresentaram quase em sua totalidade insetos em 2º instar (98%). No intervalo entre as coletas 5 e 8 (figura 8B), a proporção de insetos em 2º instar foi de 75%, de machos em 3º e 4º instares foi de 11,25% e 6,25% respectivamente; as fêmeas adultas corresponderam a 5% das amostras e as galhas vazias, 2%. Já no intervalo entre as coletas 9 e 12 (figura 8C), todos os instares foram observados na seguinte proporção: 20% em 2º instar, 18,75% e 13,75% de machos em 3º e 4º instares, respectivamente, 5% de machos adultos (figura 9A),

13,75% de fêmeas adultas, 8,75% de fêmeas ovadas (figura 9B), e 20% de galhas vazias. No intervalo entre as coletas 13 e 16 (figura 8D), os instares imaturos representaram menos de 10% das amostras, os machos adultos representaram 6,3%, as fêmeas adultas 34,2%, as fêmeas ovadas 13,9% e as galhas vazias 36,7%, proporção semelhante à encontrada entre as coletas 17 e 20 (figura 8E). Nas coletas de 21 a 24 (figura 8F), os machos adultos representaram 10,25% das amostras, as fêmeas ovadas aumentaram, a sua proporção para 35,9% e as galhas vazias representaram 41%. Nas coletas de 25 a 28 (figura 8G), as amostras foram de 14% de machos adultos, 12,7% de fêmeas ovadas, 12,6% de fêmeas com *crawlers* (figuras 9C-D) e 52% de galhas vazias. Nas coletas de 29 a 33 (figura 8H), a proporção de machos adultos é de 3%, a de fêmeas adultas é de 9,5 %, a de fêmeas ovadas é de 4,2%, as fêmeas com *crawlers* corresponderam 30% das amostras e as galhas vazias 52%. O ciclo das galhas induzidas pelos machos durou cerca de 40 a 50 dias e o das fêmeas de 75 a 100 dias, considerando desde a indução até a senescência.

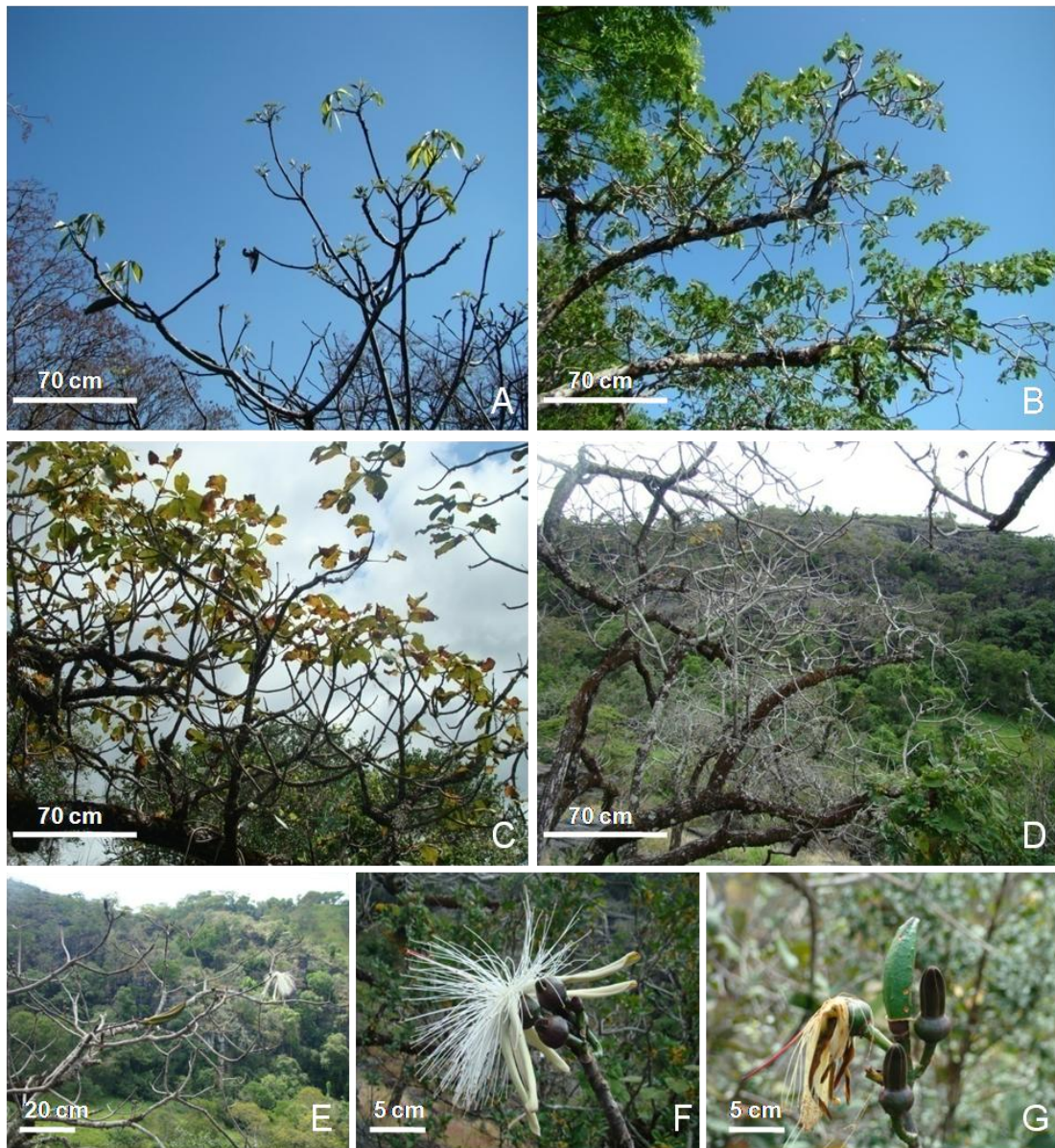


Figura 1. Fases fenológicas de *Pseudobombax grandiflorum*. A – Brotação. B – Folhas maduras. C – Folhas senescentes. D – Caducifolia. E,F,G – Fase reprodutiva com botões florais, flores e frutos.

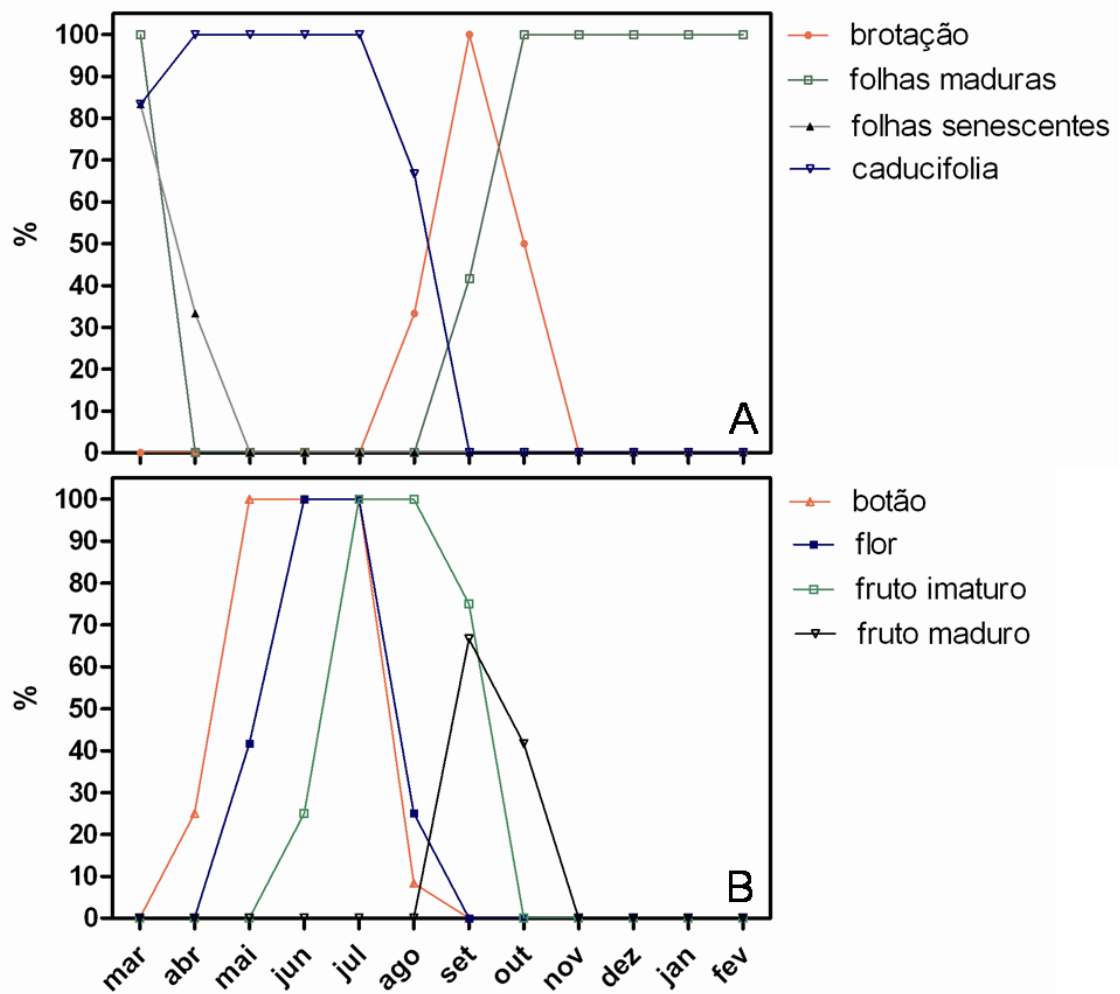


Figura 2. Índice de atividade fenológica em *Pseudobombax grandiflorum*. A- Fase vegetativa. B - Fase reprodutiva.

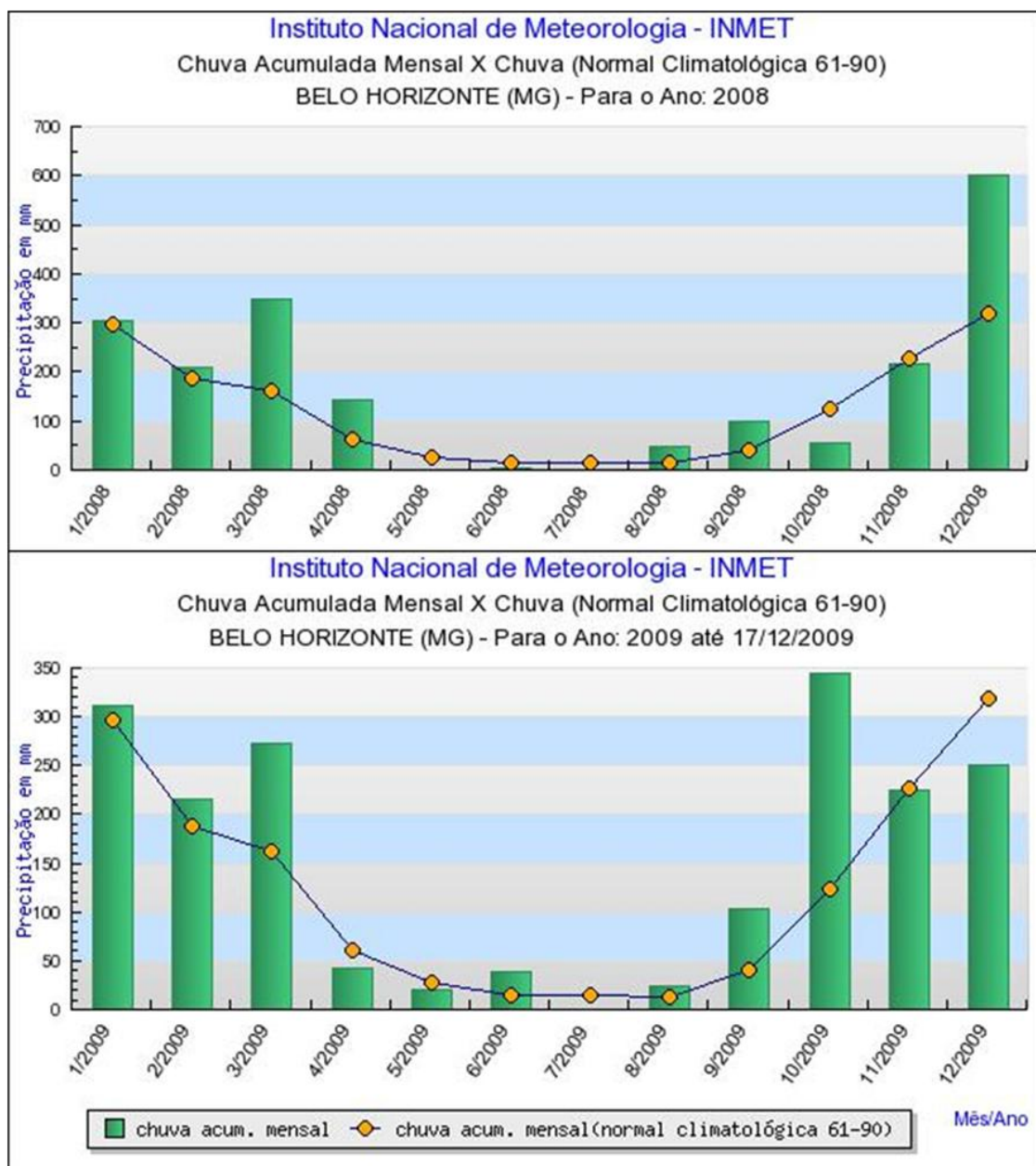


Figura 3. Precipitação mensal para os anos de 2008 e 2009. Gráficos retirados do site <http://www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?lnk=Gráficos>, dia 17/12/2009 às 10:25h.

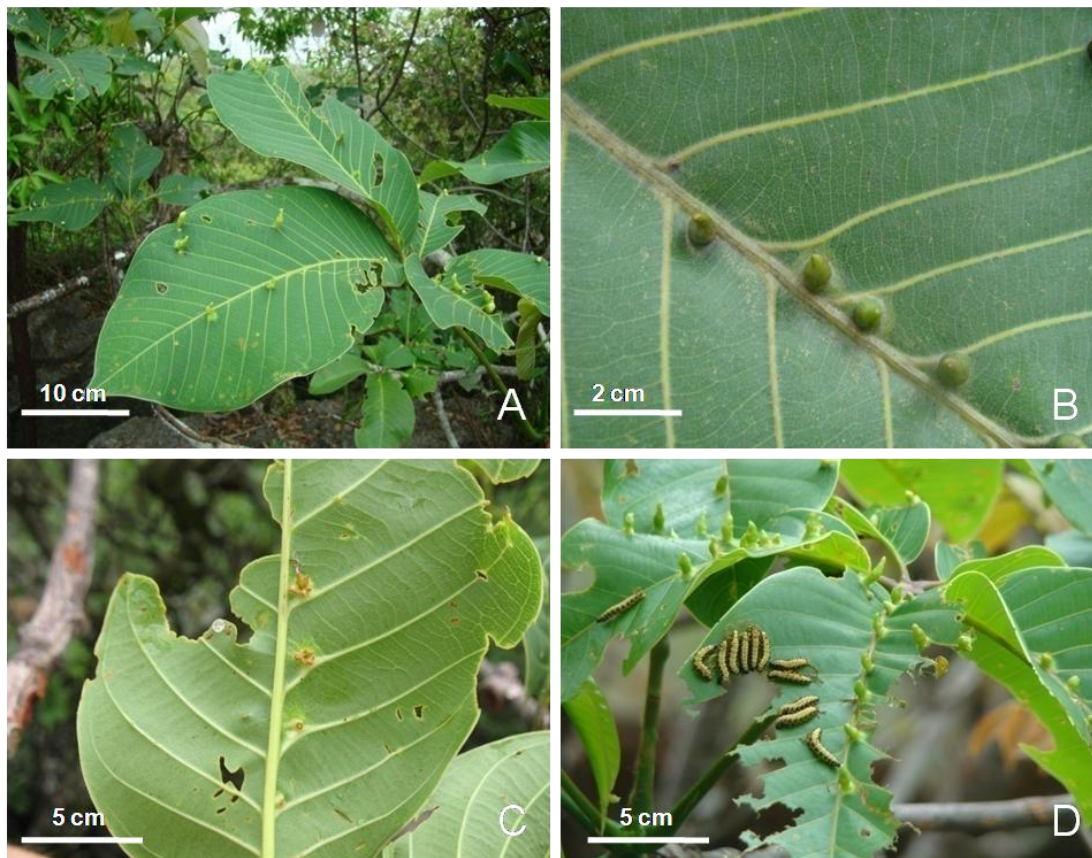


Figura 4. Galhas induzidas por *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*. A – Aspecto geral de folha com galhas na região internervural. B – Galhas localizadas ao lado da nervura principal. C – Abertura das galhas voltada para a face abaxial de folíolo danificado por chuva de granizo. D – Folíolos sendo atacados por larvas de Lepidoptera não identificados.

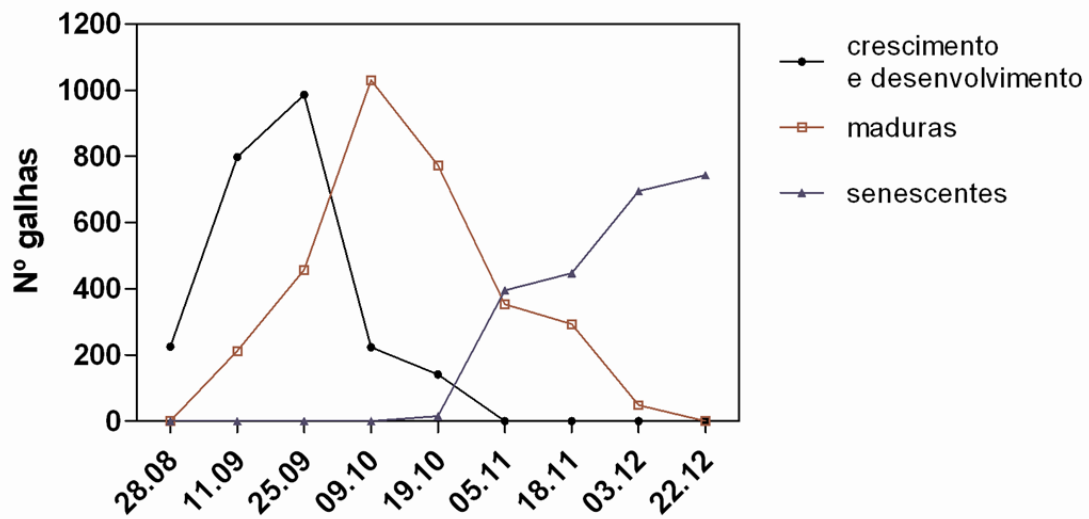


Figura 5 . Ciclo fenológico da galha induzida por *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*.

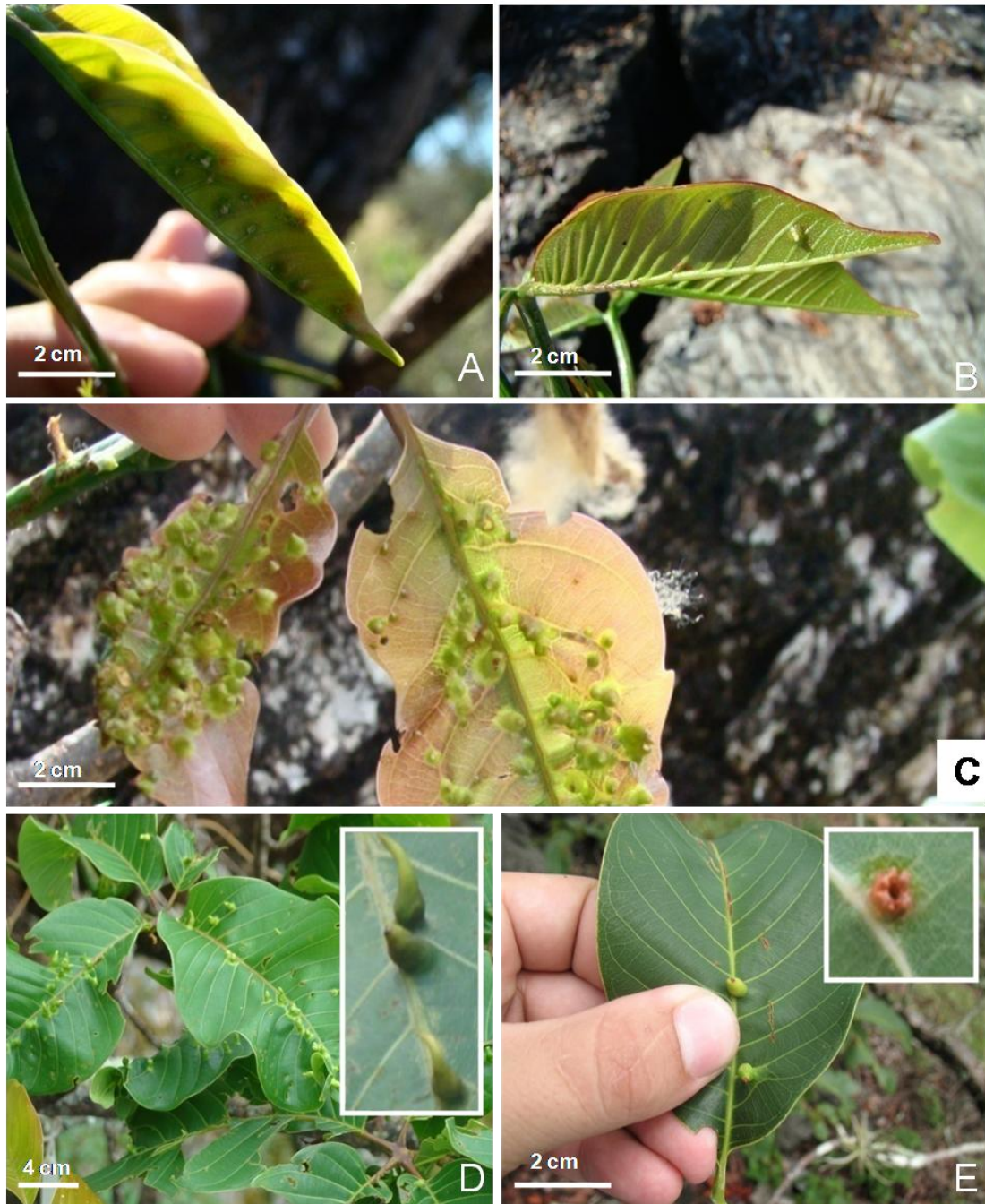


Figura 6. Fenologia da galha induzida por *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*. A – Foliolos jovens com galhas em início de fase de crescimento e desenvolvimento. B – Foliolo em expansão com galhas em fase intermediária de crescimento e desenvolvimento. C – Foliolos jovens com alto índice de infestação por galhas em fase avançada de crescimento e desenvolvimento. D – Foliolos maduros com galhas em fase de maturação. No detalhe sua forma final com projeção aciculada voltada para a face adaxial. E – Foliolo maduro com galhas senescentes. Em detalhe abertura da galha voltada para a face abaxial.

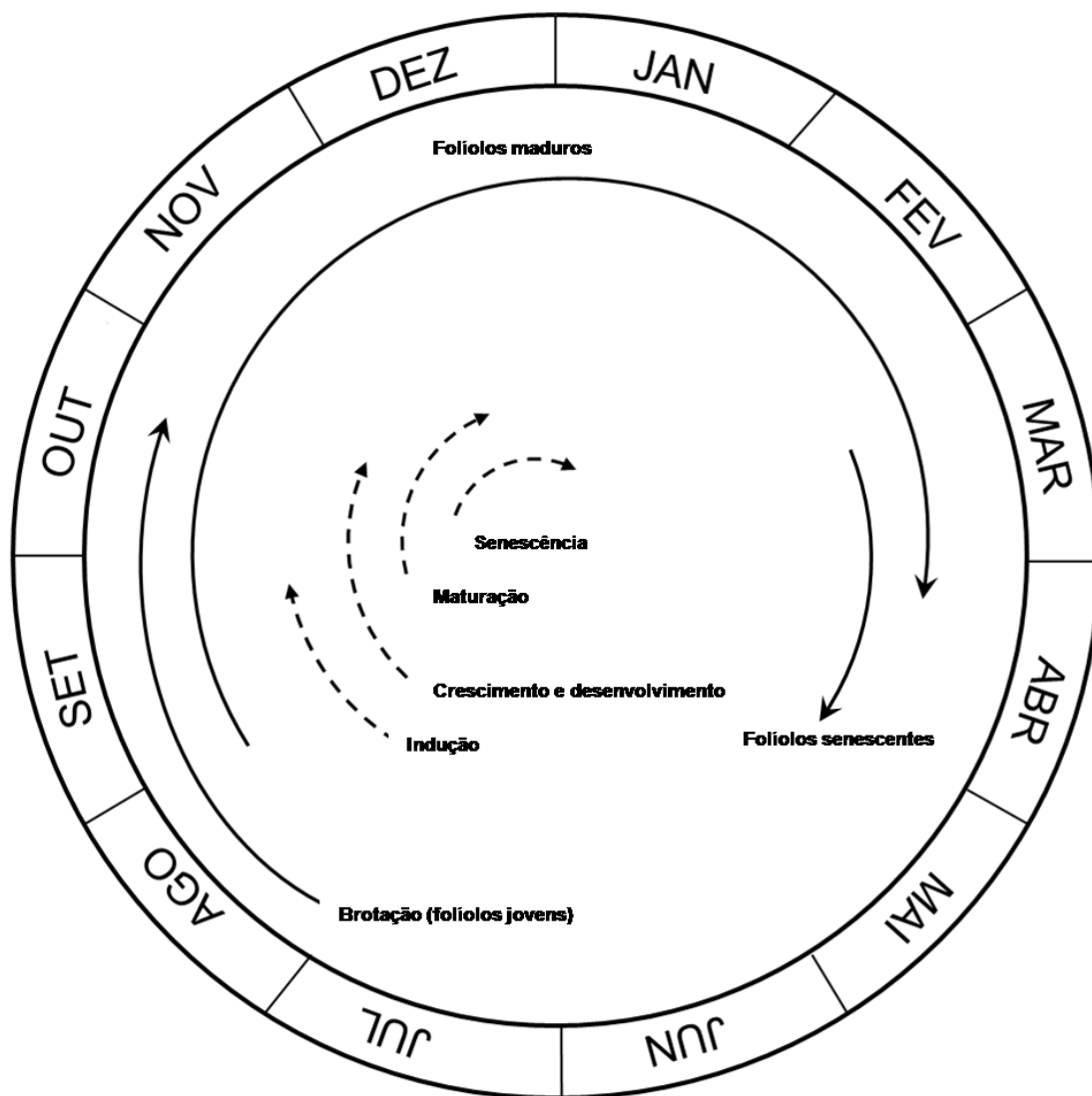


Figura 7. Diagrama representativo da sincronia galha – órgão hospedeiro no sistema *Eriogalococcus* – *Pseudobombax grandiflorum*. — Fenofases do órgão hospedeiro; - - - - fenofases da galha.

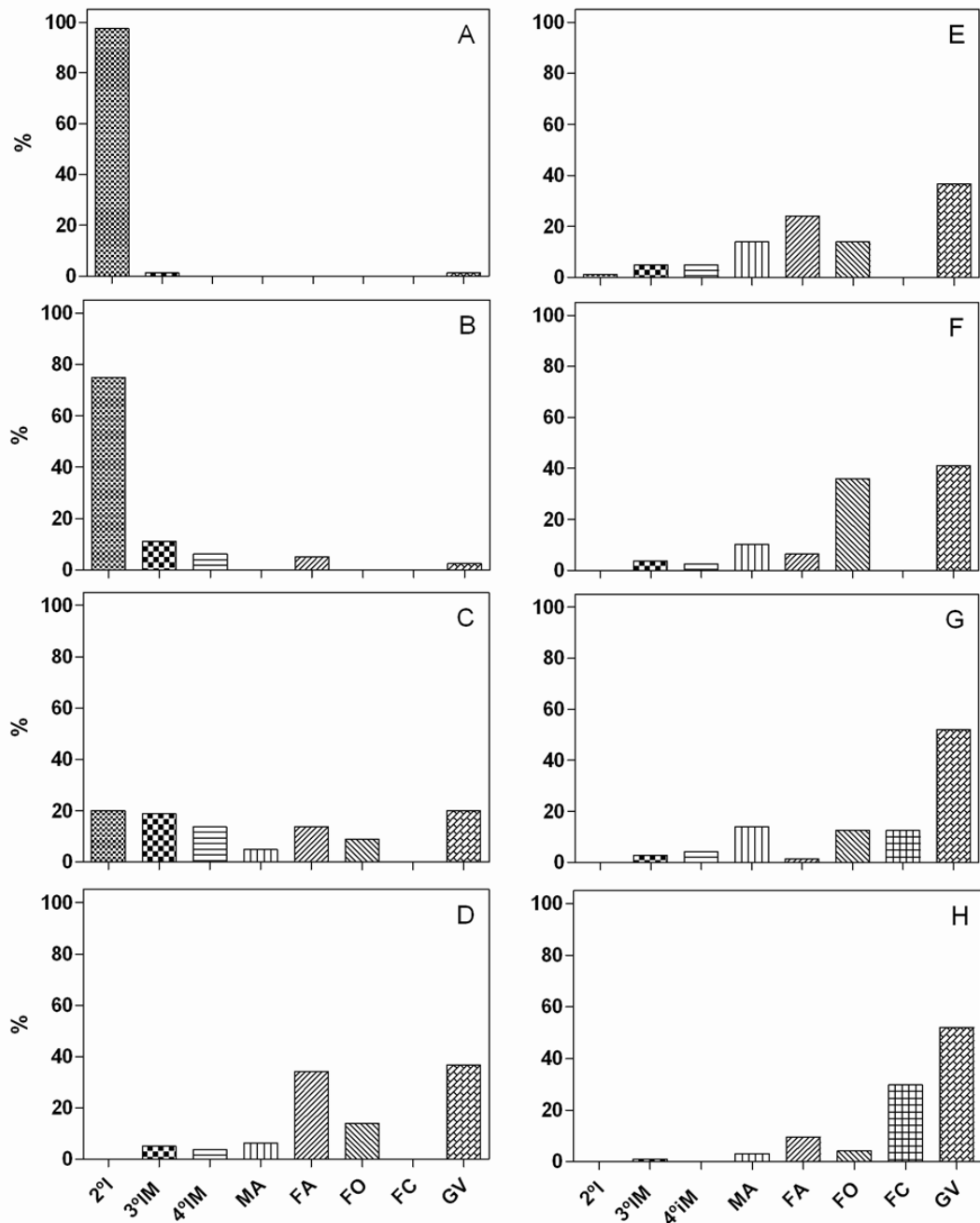


Figura 8. Flutuação da população de *Eriogalococcus* em folíolos de *Pseudobombax grandiflorum* ao longo de um ciclo das galhas. Em cada gráfico estão plotadas quatro coletas de galhas (intervalo de 3 dias entre as coletas), exceto no gráfico H onde são plotadas 5 coletas. A – Coletas 1 a 4 (n = 80 galhas); B – Coletas 5 a 8 (n = 80 galhas); C – Coletas 9 a 12 (n = 80 galhas); D – Coletas 13 a 16 (n = 79 galhas); E – Coletas 17 a 20 (n = 79 galhas); F – Coletas 21 a 24 (n = 78 galhas); G – Coletas – 25 a 28 (n = 71 galhas); H – Coletas 29 a 33 (n = 94 galhas). Coleta 1 realizada 3 dias após a brotação; Coleta 33 realizada 97 dias após a brotação. 2ºI (2º instar), 3ºIM (3º instar macho), 4ºIM (4º instar macho), MA (macho adulto), FA (fêmea adulta), FO (fêmea ovada), FC (fêmea com *crawlers*), GV (galha vazia).

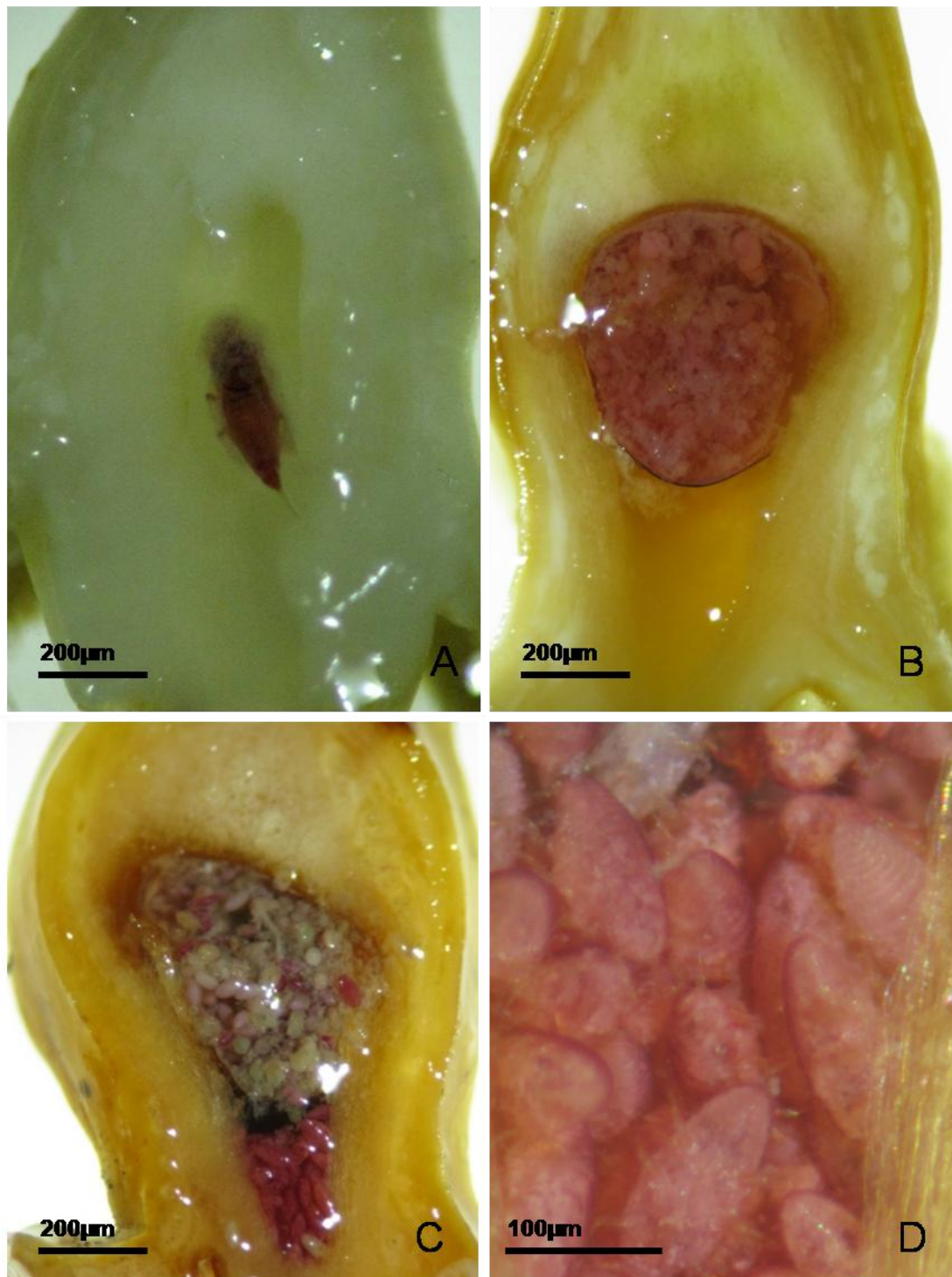


Figura 9. Galhas foliares de *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*. A – Galha com macho adulto. B – Galha com fêmea ovada. C – Galha com fêmea ovada e *crawlers* saindo dos ovos; D – Detalhe dos *crawlers* .

DISCUSSÃO

Pseudobombax grandiflorum é uma espécie arbórea decídua, que segundo Lorenzi (1998) tem início da fase reprodutiva em junho e término em outubro. Na população em estudo, diferentemente do relatado na literatura, a floração iniciou-se em abril. A queda foliar ocorreu em março-abril, coincidentemente com a diminuição da precipitação na região. Tal coincidência entre os eventos de diminuição da disponibilidade de água e a senescência foliar foi relatada por Lers (2007) para muitos ecossistemas. Já a floração e a brotação em *P. grandiflorum* ocorrem no período de seca e podem ser consideradas um aparente paradoxo (Sarmiento 1984, Borchert 1994), haja vista não serem limitadas pela disponibilidade de água, podendo ser moduladas por outros fatores ambientais como o fotoperíodo, o termoperíodo ou o fogo, que também variam sazonalmente (Huxley & Van Eck 1974, Seghieri *et al.* 1995).

A população de *P. grandiflorum* estudada é altamente infestada por galhas de *Eriogallococcus*, e como no sistema *Pseudotectococcus rollinae* – *Rollinia laurifolia* (Gonçalves *et al.* 2005), essa alta infestação pode ser consequência da baixa mobilidade das ninfas de primeiro instar, comportamento também observado por Vitorino *et al.* (2000) para galhas de *Tectococcus ovatus* em *Psidium cattleianum*. No sistema em estudo, as galhas apresentam mecanismo de indução similar a outros sistemas com espécies de Eriococcidae, envolvendo a atividade alimentar do galhador na superfície do órgão hospedeiro (Meyer 1987). Este comportamento foi anteriormente relatado na região Neotropical para o sistema *Pseudotectococcus rollinae* - *Rollinia laurifolia* (Gonçalves *et al.* 2005). Contudo, embora as espécies de Coccoidea geralmente apresentem reflexos do dimorfismo sexual no fenótipo de suas galhas (Linsenmaier 1972, Dregger-Jauffret & Shorthouse 1992, Meyer 1987, Gullan & Kosztarab 1997, Gullan & Martin 2003, Gonçalves *et al.* 2005), em *P. grandiflorum* as galhas induzidas tanto pelos insetos machos quanto aquelas induzidas pelas fêmeas são morfológicamente similares, apresentando pequena variação no formato da câmara ninfal. Resta verificar a possível influência do dimorfismo sexual em nível anatômico.

Os Eriococcidae apresentam dois instares imaturos nas fêmeas e quatro nos machos (Gullan *et al.* 2005). O dimorfismo sexual é acentuado nos adultos, sendo que muitas vezes no primeiro e segundo ínstares, as ninfas do sexo masculino são morfológicamente semelhantes ou idênticas às ninfas do sexo feminino (Gullan &

Kosztarab 1997), como observado nos indutores de galhas em *P. grandiflorum*. Os machos abandonam as galhas quando adultos, já as fêmeas são sésseis e completam a maturação dentro da galha onde são inseminadas pelos machos (Gullan *et al.* 2005, Gonçalves *et al.* 2009). Em *P. grandiflorum*, as ninfas de primeiro instar foram observadas dentro do abdômen do inseto-mãe, o que parece ser um indício de viviparidade pseudoplacental já relatada para Stictococcidae e *Apiomorpha* (Eriococcidae) (Gullan & Kosztarab 1997).

Em *P. grandiflorum*, a indução de galhas é sincrônica com a emissão de novos folíolos e o inseto galhador apresenta ciclo de vida univoltino, como observado na região Neotropical em galhas de *Pseudotectococcus rollinae* (Ericoccidae) em *Rollinia laurifolia* (Annonaceae) (Gonçalves *et al.* 2009). Outros estudos já evidenciaram a sincronia galhador - hospedeiro (Ozaki 1998, Akimoto 1998 e Arduin *et al.* 1994), a qual é particularmente importante para galhadores univoltinos. Tal importância se deve a capacidade da planta de reagir ao estímulo dos galhadores (Hodkinson 1984, Weis *et al.* 1988, Gonçalves *et al.* 2009) e da qualidade e quantidade de recursos nutricionais que são críticos para estes (Yukawa 2000). No presente estudo, o galhador se beneficia desta sincronia, uma vez que se utiliza de tecidos jovens altamente reativos, que funcionam naturalmente como drenos de fotoassimilados.

Tecidos jovens costumam ser sítios preferenciais e mais reativos à indução de galhas (Rohfritsch & Anthony 1992, Weis *et al.* 1988) e as folhas jovens, devido à maior qualidade nutricional, apresentam de 5-25 vezes mais danos causados por herbivoria do que folhas maduras (Coley & Barone 1996). Sendo assim, o passo mais importante na vida de insetos galhadores é a escolha do sítio reativo para indução de galhas (Mendonça Jr. 2001), visto que as galhas propiciam disponibilidade de recursos para o galhador e podem conferir proteção contra inimigos naturais (Price *et al.* 1986; Stone & Schönrogge 2003). Além disso, como demonstrado por Oliveira e Isaias (2009) em um dos sistemas Cecidomyiidae - *Copaifera langsdorffii*, a escolha entre tecidos jovens e maduros resulta em variações na adaptabilidade da galha para o galhador. Estes autores relatam que galhas induzidas em tecidos jovens apresentam maior quantidade de tecidos de reserva e nutritivo enquanto aquelas induzidas em tecidos maduros têm maior adaptabilidade para defesa contra inimigos naturais.

Além de sua maior reatividade, as partes jovens em crescimento são drenos fisiológicos (Taiz & Zeiger 2004), com isso, galhas induzidas nesses locais podem alterar o padrão de translocação do floema, estabelecendo-se como drenos adicionais,

altamente competitivos, o que resulta em perdas de crescimento para o vegetal (Mani 1964; MacCrea *et al.* 1985; Larson & Whitham 1991; Inbar *et al.* 1995). Se para as plantas hospedeiras, a sincronia com os galhadores pode levar à queda no crescimento e na reprodução sexuada (Price *et al.* 1987), para os galhadores essa sincronia garante sucesso reprodutivo e pequenas taxas de mortalidade (Rehill & Schultz 2002). No sistema estudado, como observado por Gonçalves *et al.* (2005) no sistema *Pseudotectococcus rollinae* – *Rollinia laurifolia*, os altos níveis de infestação denotam grande especificidade do galhador pela planta hospedeira. Tanto *R. laurifolia* quanto *P. grandiflorum* são plantas caducifólias, que permanecem totalmente sem folhas de junho a setembro-outubro e de março-abril a agosto, respectivamente, o que torna a sincronia fenológica por parte dos herbívoros galhadores fundamental para a sobrevivência destes.

Além da sincronia com a brotação do hospedeiro, o galhador necessita de uma estratégia para sobreviver nos meses em que não existem sítios de oviposição. Em *Pseudotectococcus rollinae*, Gonçalves *et al.* (2009) relataram um segundo morfotipo de galha induzida no caule de *R. laurifolia*, onde os indutores de primeiro instar entram em dormência e sobrevivem ao período de ausência de brotação. Muito embora tal fato não tenha sido detectado no sistema *Eriogallococcus* - *Pseudobombax grandiflorum*, o alto índice de reinfestação sincrônica ao brotamento em agosto e a indução de novas galhas por insetos de 2º instar pressupõe a existência de um mecanismo equivalente ao descrito no sistema *P. rollinae* – *R. laurifolia*.

Outro fator marcante para Coccoidea é o alto investimento quantitativo na prole, o abdômen da fêmea se distende e se torna um verdadeiro saco de ovos (Meyer 1987). Tal fato denota uma das estratégias de manutenção dos sistemas, estratégia esta que aliada à sincronia fenológica com as plantas hospedeiras é vital para a sobrevivência dos galhadores. Ademais, herbívoros galhadores podem ser susceptíveis a variações temporais na fenologia do hospedeiro, aumentando ou diminuindo a infestação e assim relativizando a abundância de galhas (Pilson 2000). Algumas plantas, por sua vez, podem atrasar os processos fenológicos para um momento no qual não existam mais herbívoros ativos (Agrawal 2000). Em *Rollinia laurifolia*, foi relatado um escape fenológico por uma segunda emissão de folhas em um mesmo ano (Gonçalves 2008). Em *P. grandiflorum*, no segundo ano de estudos, os primeiros folíolos a brotarem tiveram baixo nível de infestação ou apresentaram-se totalmente livres de galhas, indicando um provável mecanismo de escape fenológico por parte da planta.

No sistema *Eriogallococcus* - *Pseudobombax grandiflorum*, há sincronia fenológica entre a brotação e a indução de novas galhas, denotando uma grande especificidade do sistema. Muito embora o ciclo de vida dos insetos-fêmea seja mais longo do que aquele dos machos, as galhas não são morfologicamente dimórficas, sendo observada nas galhas maduras uma pequena variação no formato da câmara ninfal. O nível de infestação é alto e possivelmente garantido pelo alto investimento na prole, havendo possibilidade de escape fenológico por parte da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal AA. 2000. Overcompensation of plants in response to herbivory and the by-product benefits of mutualism. *Trends in Plant Science* 5:309-313.
- Akymoto SI. 1998. Heterogeneous selective pressures on egg-hatching time and the maintenance of its genetic variance in a *Tetraneura* gall-forming aphid. *Ecological Entomology* 23:229-237.
- Araújo MCP. 1997. Aspectos ecológicos e evolutivos da interação entre animais e plantas, 11-48. *In*: Araújo MCP, Coelho GC & Medeiros I. Interações ecológicas e biodiversidade. UNIJUI, Ijuí.
- Arduin M, Kraus JE & Montenegro G. 1994. Morfologia e fenologia das galhas foliares em *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 38:79-89.
- Arduin M & Kraus JE. 1995. Anatomia e ontogenia de galha foliares de *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). *Boletim de Botânica Universidade de São Paulo* 14:109-130.
- Bencke CSA & Morellato LPC. 2002. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista brasileira de botânica* 25:269-275.
- Borchert R. 1994. Soil and stem water storage determine phenology and distribution of tropical dry forest trees. *Ecology* 75:1437-1449.
- Borchert R, Rivera G & Hagnauer W. 2002. Modification of vegetative phenology in a tropical semi-deciduous forest by abnormal drought and rain. *Biotropica* 34:27-39.

- Coley PD & Aide TM. 1989. Red coloration of tropical young leaves: a possible anti fungal defense? *Journal of Tropical Ecology* 5:293-300.
- Coley PD. 1996. Effects of climate change on plant-herbivory interactions in moist tropical forests. *Climatic Change* 39:455-472.
- Coley PD & Barone JA. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forest. *Annual Review Ecology and Systematics* 27:305-335.
- Cook LG & Gullan PJ. 2008. Insect, not plant, determines gall morphology in the *Apiomorpha pharetrata* species-group (Hemiptera: Coccoidea). *Australian Journal of Entomology* 47:51-57.
- Daly HV. 1985. Insect morphometrics. *Annual Review Entomology* 30:415-438.
- Dregger-Jauffret F & Shorthouse JD. 1992. Diversity of gall-inducing insects and their galls, 8-33. *In: Shorthouse JD & Rohfritsch O. Biology of insect-induced galls.* Oxford: Oxford University Press.
- Floate KD, Fernandes GW & Nilson J. 1996. Distinguishing intrapopulacional categories of plants by their insect faunas: galls on rabbitbrush. *Oecologia* 105:221-229.
- Fenner M. 1998. The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1:78-91.
- Fernandes GW & Price PW. 1991. Comparison of tropical and temperate galling species richness: the roles of environmental harshness and plant nutrients status. 91-115. *In: Price PW, Lewinsohn TM, Fernandes GW & Benson WW. Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions.* Wiley, New York.
- Fournier OLA & Charpantier C. 1975. El tamaño de la muestra y la frecuencia de las observaciones en el estudio de las características fenológicas de los árboles tropicales. *Turrialba* 25:45-48.
- Gonçalves SJMR, Isaias RMS, Vale FHA & Fernandes GW. 2005. Sexual dimorphism of *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson & Gonçalves (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae) influences gall morphology on *Rollinia laurifolia* Schltdl. (Annonaceae). *Tropical Zoology* 18:161-169.
- Gonçalves SJMR. 2008. Sincronia fenológica, dimorfismo sexual e ontogênese em galhas de *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson & Gonçalves (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae) em *Rollinia laurifolia* Schltdl (Annonaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

- Gonçalves SJMR, Moreira GRP & Isaias RMS. 2009. A unique seasonal cycle in a leaf gall-inducing insect: the formation of stem galls for dormancy. *Journal of Natural History* 43:843-854.
- Gullan PJ & Kosztarab M. 1997. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology* 42:23-50.
- Gullan PJ & Martin JH. 2003. Sternorrhyncha (jumping plant-lice, whiteflies, aphids, and scale insects), 1079-1089. *In: Resh VH, Carde' RT. Encyclopedia of insects.* Amsterdam (The Netherlands): Academic Press.
- Gullan PJ, Miller DR & Cook LG. 2005. Gall-inducing scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea), 159-229. *In: Raman A, Schaefer CW, Withers TM. Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods.* Enfield (UK): Science Publishers.
- Hodgson ID. 1984. The biology and ecology of the gall-forming Psylloidea (Homoptera), 59-77 *In: Ananthakrishman N. Biology of gall insect* Oxford & IBH, New Delhi.
- Huxley PA & Van Eck WA. 1974. Seasonal changes in growth and development of some woody near Kampala, Uganda. *Journal of Ecology* 62:579-592.
- IBGE. 1992. Mapa de vegetação do Brasil - escala 1:5.000.000. Rio de Janeiro.
- Inbar M, Eshel A & Wool D. 1995. Interspecific competition among phloem-feeding insects mediated by induced host-plant sinks. *Ecology* 76:1506-1515.
- Larson KG & Whitham TG. 1991. Manipulation of food resources by a gall-forming aphid: the physiology of sink-source interactions. *Oecologia* 88:15-21.
- Lers A. 2007. Environmental regulation of leaf senescence, 108-144. *In: Gan S. Senescence processes in plants.* Blackwell Publishing Ltd.
- Linsenmaier W. 1972. *Insects of the world.* New York: McGraw-Hill Book Co.
- Lorenzi H. 1998. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivos de Plantas Arbóreas do Brasil.* Ed. Plantarum. V1. Nova Odessa, SP.
- MacCrea KD, Abrahamson WG & Weis AE. 1985. Goldenrod ball gall effects on *Solidago altissima*: ¹⁴C translocation and Growth. *Ecology* 66:1902-1907.
- Mani MS. 1964. *Ecology of Plant Galls.* Dr. W. JunkPublis. The Hague.
- Mendonça Jr MS. 2001. Gall-forming insects diversity patterns: the resource synchronisation hypothesis. *Oikos* 95:171-176.
- Meyer J. 1987. *Plant galls and galls inducers.* Gebrüder Borntraeger, Berlin.

- O'brien TP & McCully ME. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi Pty, Melbourne.
- Oliveira DC & Isaias RMS. 2009. Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Revista de Biologia Tropical* 57:293-302.
- Ozaki K. 1998. Inter-specific difference em budburst time and its consequence on egg hatch time and survival of the gall-making adelgid *Adelges japonicas* (Monzen) (Homoptera, Adelgidae). *Journal of Applied Entomology* 122:483-486.
- Peroni F, Sanchez M & Santos FAM. 2002. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae, Caesalpinoideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Revista brasileira de botânica* 25:183-194.
- Pilson D. 2000. Herbivory and natural selection on flowering phenology in wild sunflower, *Helianthus annuus*. *Oecologia* 122:72-82.
- Price PW, Waring GL, & Fernandes GW. 1986. Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88:361-363.
- Price PW, Fernandes GW & Waring GL. 1987. Adaptive nature of insect galls. *Environmental Entomology* 16:15-24.
- Rehill B & Schultz J. 2002. Opposing survivorship and fecundity effects of host phenology on the gall-forming aphid *Hormaphis hamamelidis*. *Ecological Entomology* 27:475-483.
- Rohfritsch O & Anthony M. 1992. Strategies on gall induction by two groups of homopterans. 102-117. *In*: Shorthouse JD & Rohfritsch O. *Biology of insect induced galls*. Oxford University, Oxford.
- Sarmiento G. 1984. *The ecology of neotropical savannas*. Harvard University Press, Cambridge.
- Seghieri J, Floret CH & Pontanier R. 1995. Plant phenology in relation to water availability: herbaceous and woody species in the savannas of northern Cameroon. *Journal of Tropical Ecology* 11:237-254.
- Stone GN & Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18:512-522.
- Taiz L & Zeiger E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Ed. Artmed.
- Vitorino MD, Pedrosa-Macedo JH & Smith CW. 2000. The biology of *Tectococcus ovatus* Hempel (Heteroptera: Eriococcidae) and its potential as a biocontrol agent of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae), 651-657. *In*: Spencer NR.

Proceedings of the International Symposium on Biological Control of Weeds.
Bozeman: Montana State University.

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

Weis AE, Walton R & Crego CL. 1988. Reactive plant tissue and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology* 33:467-486.

www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?lnk=Gráficos. Acesso dia 17/12/2009 as 10:25h.

Capítulo II

**Reflexos do dimorfismo sexual na anatomia e histoquímica das galhas
de *Eriogalococcus* gen. nov. em
Pseudobombax grandiflorum (Cav.) A. Robyns (Malvaceae)**

RESUMO

Galhas são estruturas induzidas em plantas pela ação alimentar de insetos, possuindo tecidos com características e funções típicas. Insetos galhadores destacam-se por serem capazes de manipular os tecidos vegetais dando origem a morfotipos altamente específicos. A ação destes herbívoros pode resultar em profundas alterações estruturais e bioquímicas, notadas tanto em relação aos metabólitos primários quanto aos secundários, nos tecidos das plantas hospedeiras. As vantagens da associação da qual resulta a galha são direcionadas ao herbívoro pelo aumento da qualidade nutricional dos tecidos modificados pelo efeito do galhador, e fornecimento de abrigo e proteção contra inimigos naturais. Nas galhas de *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*, o ciclo de vida dos machos é consideravelmente menor que o das fêmeas, contudo, as galhas são morfologicamente similares. Deste modo, este trabalho utiliza análises anatômicas e histoquímicas para testar as hipóteses de que estas galhas podem apresentar dimorfismo sexual em nível anatômico e alterações nos perfil histoquímico em relação aos tecidos não galhados. Os objetivos deste trabalho são: (1) descrever o desenvolvimento anatômico das galhas foliolares de *Eriogalococcus* em *P. grandiflorum* e (2) avaliar possíveis alterações histoquímicas nos tecidos das galhas em relação aos tecidos não galhados. O marcante dimorfismo sexual dos indutores neste sistema resulta em tênues diferenças anatômicas, percebidas no formato da câmara e nas células do sistema de revestimento desta. Nas galhas induzidas pelas fêmeas, o maior desenvolvimento do corpo dos insetos gera uma pressão mecânica na epiderme causando obliteração celular e reação de cicatrização. Devido as menores dimensões dos machos, o revestimento da câmara de suas galhas permanece íntegro. Pela similaridade entre os perfis histoquímicos dos tecidos não galhados e das galhas pode-se inferir que o galhador manipula a constituição química dos tecidos de *P. grandiflorum* dentro dos limites metabólicos desta espécie vegetal.

Palavras chave: anatomia, dimorfismo, Eriococcidae, galhas, histoquímica

ABSTRACT

Galls are induced by the feeding activity of the insects, and their tissues present typical features and functions. Gall-forming insects are able to manipulate the potentialities of the host plant tissues giving rise to highly specific morphotypes. The action of these herbivores can result in structural and biochemical alterations in relation to primary and secondary metabolites. The advantages of the interaction that results in the gall are directed to the herbivore by increasing the nutritional quality of plant tissues, and providing shelter and protection against natural enemies. In galls of *Eriogalococcus* in *Pseudobombax grandiflorum*, the life cycle of the males is considerably shorter than that of the females, however, their galls are morphologically similar. Thus, this study uses anatomical and histochemical analysis to test the hypothesis that the galls may have sexual dimorphism in anatomical level and that the histochemical profiles are distinct between the non-galled and galled tissues. The objectives are: (1) to describe the anatomical development of leaflet galls and (2) to evaluate possible histochemical alterations in gall tissues in comparison to non-galled ones. The conspicuous sexual dimorphism of the gall-forming insects in this system results in subtle anatomical differences, namely, the format of the nymphal chamber and the cells which limit it. In galls induced by the females, the larger dimensions of insect body mechanically pressure the epidermis causing cell obliteration and cicatrization. Because the males are smaller, the cells that limit their galls chamber remain intact. The similarity between the histochemical profiles of non-galled and galled tissues can indicate that the gall-forming insect manipulates the chemical composition of *P. grandiflorum* within its metabolic limits.

Key words: anatomy, dimorphism, Eriococcidae, galls, histochemistry

INTRODUÇÃO

Galhas são estruturas induzidas em plantas pela ação alimentar de insetos, (Raman 2007), com tecidos cujas características e funções típicas são produto da manipulação coordenada por parte destes herbívoros (Oliveira & Isaias 2009a). As estruturas formadas são altamente específicas e permitem tanto a identificação do indutor quanto do hospedeiro no qual se alojam (Redfern & Askew 1992; Raman 2007), tendo por base os caracteres morfológicos e anatômicos gerados. A ação dos herbívoros galhadores nos tecidos da planta hospedeira pode resultar tanto em alterações estruturais quanto bioquímicas, notadas em relação aos metabólitos primários e aos secundários (Arduin *et al.* 1989, 1994; Arduin & Kraus 1995, 2001; Kraus *et al.* 1996; Hartley 1998, Oliveira *et al.* 2006, Moura *et al.* 2008, Oliveira & Isaias 2009b).

As vantagens da associação da qual resulta a galha são direcionadas ao herbívoro pelo aumento dos nutrientes disponíveis nos tecidos modificados pelo efeito do galhador, e pelo fornecimento de abrigo e proteção contra inimigos naturais (Price *et al.* 1986, Stone & Schönrogge 2003). A hipótese nutricional postula que a galha proporciona boa quantidade e qualidade de nutrientes ao galhador (Price *et al.* 1986, Stone & Schönrogge 2003). Segundo Bronner (1992), galhas de cynipídeos e de cecidomyídeos acumulam lipídios e carboidratos, respectivamente, enquanto galhas de insetos sugadores em geral armazenam poucas substâncias de reserva (Rohfritsch & Anthony 1992), já que estes galhadores se alimentam diretamente do floema, (Gullan & Kosztarab 1997, Burckhardt 2005) e não há diferenciação de um tecido nutritivo típico.

De modo geral, as galhas de Cecidomyiidae são as mais estudadas em todo o mundo e não obstante serem numerosas na região neotropical, as galhas induzidas por insetos sugadores (Espírito-Santo & Fernandes 2007) são comparativamente pouco estudadas. Em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae), um sugador pertencente à família Eriococcidae induz galhas em tecidos jovens cujo dimorfismo sexual não é refletido no fenótipo da galha (cf. Magalhães 2010, Cap. 1), contradizendo uma peculiaridade comum aos Eriococcidae (Linsenmaier 1972, Meyer 1987, Dregger-Jauffret & Shorthouse 1992, Gullan & Martin 2003, Gullan *et al.* 2005, Gonçalves *et al.* 2005). No sistema *Pseudotectococcus rollinae* – *Rollinia laurifolia*, Gonçalves *et al.* (2005) atribuíram o dimorfismo morfológico observado a diferença na duração dos ciclos de vida de fêmeas e machos. Nas galhas de *Eriogalococcus* gen. nov. (Hodgson 2010, unp. data) em *Pseudobombax grandiflorum*, o ciclo de vida dos machos é

consideravelmente menor que o das fêmeas (cf. Magalhães 2010, cap. 1). Deste modo, este trabalho utiliza análises anatômicas e histoquímicas para testar as hipóteses de que as galhas podem apresentar dimorfismo sexual em nível anatômico e alterações no perfil histoquímico em relação aos tecidos não galhados.

Os objetivos deste trabalho são: (1) descrever o desenvolvimento anatômico das galhas foliolares de *Eriogalococcus* em *P. grandiflorum* de modo a verificar se há dimorfismo sexual em nível anatômico e (2) avaliar possíveis alterações histoquímicas nos tecidos das galhas em relação aos tecidos não galhados.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A população de *Pseudobombax grandiflorum* (CAV.) A. Robyns (Malvaceae) estudada situa-se em área de afloramento calcário na Gruta da Lapinha, em floresta estacional semidecidual (IBGE, 1992) a 746m de altitude (19°33'67" S; 043°57'54" W), localizada no Parque Estadual do Sumidouro, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. O material vegetal fértil está depositado no herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais (Nº registro - 133730).

Análises estruturais

Galhas de *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum* em sucessivos estágios de desenvolvimento foram coletadas e fixadas em Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (O'Brien & McCully 1981) e dissecadas para retirada dos galhadores e sua separação em machos e fêmeas a partir do terceiro instar.

Para a preparação de lâminas permanentes, o material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940) e incluído em Paraplast[®] (Kraus & Arduin 1997) em estufa a 60°C. Cortes transversais dos folíolos galhados, não galhados e galhas (10-14 µm) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica[®] 2035 BIOCUT). Os cortes histológicos foram afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing 1974). Após a retirada do Paraplast[®] com acetato de butila a 56°C, em banho-maria, as amostras foram desidratadas em série etílica e coradas com a mistura de azul de astra- safranina 8:1

(v/v) (Bukatsch 1972, modificado) e montadas em verniz vitral incolor Acrilex[®] (Paiva *et al.* 2006).

Amostras de folíolos jovens e galhas em diversos estágios de desenvolvimento foram fixadas em Karnovsky em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (O'Brien & McCully 1981), lavadas em tampão fosfato, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (2h), lavadas em água destilada e desidratadas em série etílica (Johansen 1940). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (BAL-TEC[®] CPD030), montado em *stubs* e coberto com 30 nm de ouro em metalizador (BAL-TEC[®] SCD 050) para a observação ao microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO[®] 40).

Análises histoquímicas - metabolismo primário

Para detecção de substâncias lipídicas, as seções foram submetidas diretamente ao vermelho B do Sudão (C.I. 26050) em etanol (Brundett *et al.* 1991). O reagente de Lugol (Johansen 1940) foi utilizado para detecção de amido. O teste para açúcares redutores foi feito com reagente de Fehling (Sass 1951) e, para detecção de proteínas, foram utilizados o azul mercúrico de bromofenol (Mazia *et al.* 1953) e o azul brilhante de Coomassie (Dunn 1993).

Análises histoquímicas - metabolismo secundário

Para detecção de fenólicos, as amostras foram incubadas em cloreto férrico e em sulfato ferroso em formalina - (Johansen 1940). Para detecção de pectinas foi usado vermelho de rutênio (Jensen 1962). A presença de proantocianidinas foi testada pela fixação dos cortes histológicos em cafeína/benzoato de sódio em butanol e imersão em solução etílica de *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) (Feucht *et al.* 1986). Derivados flavonoídicos foram testados pela reação com ácido sulfúrico (Zuanazzi 2000). Reagente de Dragendorff (Yoder & Mahberg 1976), mistura de Jeffrey (Johansen 1940) e ácido pícrico (Faure 1914) foram utilizados para detecção de alcalóides. Terpenos foram testados com solução de alfa-naftol em etanol + cloridrato de dimetil-parafenilenodiamina (NADI) (David & Carde 1964) e triterpenos pelo reagente de Lieberman-Buchard (Wagner *et al.* 1984).

Os testes-controle foram realizados conforme sugerido nas respectivas referências bibliográficas, os quais também foram comparados a cortes-branco. As

seções submetidas às reações histoquímicas foram montadas em lâminas com água e analisadas em microscópio óptico (Olympus® BHS).

RESULTADOS

Anatomia do folíolo não galhado

O folíolo jovem apresenta-se dobrado (figura 1A) ao longo da nervura mediana, onde muitas células mucilaginosas estão presentes (figura 1B), ficando exposta apenas a face abaxial. A protoderme é unisseriada com células alongadas no sentido anticlinal na face adaxial e isodiamétricas na face abaxial em secção transversal. O meristema fundamental apresenta-se dividido em quatro camadas, uma adaxial, uma mediana e duas abaxiais com conteúdo fenólico nas camadas adaxial e abaxial (figura 1C). Cordões procambiais se localizam nas camadas medianas.

O folíolo maduro apresenta epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral com parênquima paliádico apresentando 2-3 camadas de células e parênquima lacunoso, com poucos espaços intercelulares e 6-8 camadas (figura 1D). Na nervura mediana se observa um feixe vascular principal com forma de arco aberto, arranjo colateral, xilema abundante e fibras associadas ao floema. Células parenquimáticas com conteúdo fenólico estão dispersas na região cortical em meio às células condutoras. Dois feixes em forma de C estão localizados acima do feixe vascular principal. Os feixes de menor calibre encontram-se imersos no mesofilo.

Desenvolvimento das galhas

As galhas são induzidas na face abaxial em folíolos jovens, no início da brotação (figura 2A) resultando em folíolos expandidos altamente infestados (figura 2B). Estas galhas se localizam na região internervural, são intralaminares, com forma aciculada, maior crescimento voltado para a face adaxial e ligeiro abaulamento na face abaxial (figura 2C). São verdes, glabras, permanentemente abertas, com a presença de câmara larval central única alongada, contendo um indutor.

O primeiro estágio de formação da galha, a fase de indução, é iniciado pela atividade alimentar do galhador na superfície abaxial do folíolo jovem que apresenta

densa cobertura de tricomas (figura 3A). Substâncias fenólicas acham-se concentradas nas camadas da protoderme e do meristema fundamental adaxial e abaxial (figura 4A-B). No sítio de indução adjacente ao corpo da ninfa de 2º instar, a camada abaxial externa apresenta células em divisão e um cordão procambial diferenciado a partir da camada mediana.

Os estágios iniciais da fase de crescimento e desenvolvimento se caracterizam pela ligeira projeção dos tecidos foliares ao redor do corpo da ninfa (figura 3B). Nessa fase, há o incremento de divisões celulares nas camadas do meristema fundamental abaxial (figura 4C). A projeção que se iniciou após a indução aumenta de tamanho, apresenta de 8-10 camadas provenientes do meristema abaxial, 5-6 camadas do meristema mediano e início de diferenciação de tricomas no bordo (figura 4D). Com o avanço da fase de crescimento e desenvolvimento, há incremento de divisões celulares no meristema fundamental adaxial resultando em 4-5 camadas de células de seção transversal isodiamétrica e pequenas dimensões (figura 4E). No bordo da galha, os tricomas acham-se maiores e mais numerosos (figuras 3C, 4E). Ainda nesta fase, ocorre a expansão das células dos tricomas que se entrelaçam e obliteram a abertura (ostíolo) da galha (figura 3D). A câmara larval assume formato ovóide, apresenta-se revestida por epiderme unisseriada (figura 4F).

Na fase de maturação, tanto as galhas induzidas pelos insetos machos quanto aquelas induzidas pelas fêmeas em 3º instar apresentam epiderme unisseriada, córtex formado por parênquima homogêneo com feixes floemáticos desorganizados e células mucilaginosas que se diferenciam na porção adaxial. O córtex se divide em três regiões, o córtex externo (Ce), o mediano (Cm) e o interno (Ci). O Ce é diferenciado a partir do meristema fundamental adaxial, o Cm do meristema fundamental mediano e o Ci do meristema fundamental abaxial. O corpo do inseto se localiza na porção apical da câmara (figura 5A) a qual é revestida por células contínuas a epiderme abaxial do folíolo. No topo da câmara, células do Ci apresentam conteúdo fenólico denso (figura 5B) e nas laterais estas são parenquimáticas, alongadas e sem conteúdo evidente. As células mucilaginosas localizam-se exclusivamente no Ce e são de grandes dimensões comparativamente as demais células parenquimáticas (figura 5C). Ao redor da abertura da galha, as células do Ci apresentam conteúdo fenólico granuloso (figura 5D).

Na fase de maturação, as galhas apresentam peculiaridades anatômicas relacionadas ao sexo dos indutores. O conjunto de células do Ci, com substâncias fenólicas localizado no topo da câmara, apresenta maior dimensão nas galhas induzidas

por fêmeas (figura 6A) quando comparado àquele nas galhas de machos (figura 6B). Percebe-se que a câmara ninfal é mais arredondada nas galhas induzidas pelas fêmeas, acompanhando a forma do corpo do inseto (figura 6A) e alongada nas galhas induzidas pelos machos (figura 6B). O revestimento nas galhas induzidas pelas fêmeas apresenta células obliteradas com indício de cicatrização (figura 6C) e naquelas induzidas pelos machos apresentam-se íntegras (figura 6D). No Cm, os feixes floemáticos diversamente orientados são abundantes em ambas as galhas (figuras 6E-F). A abertura de ambas é similarmente obliterada por tricomas (figuras 6G-H).

Perfil histoquímico

A tabela 1 mostra os resultados obtidos nas análises histoquímicas em folíolos e galhas.

Tabela 1 – Testes histoquímicos realizados para folíolos e galhas de *Eriogalococcus* gen. nov. (Hodgson 2010 un. data) em *Pseudobombax grandiflorum*

Testes	Substância	Folíolo	Galha jovem	Galha madura	Galha Senescente
Vermelho B do Sudão	<i>Lipídios</i>	+	-	-	-
Lugol	<i>Amido</i>	-	-	-	-
Fehling	<i>Açúcares redutores</i>	+	++	++	-
Azul de Coomassie	<i>Proteínas</i>	+	++	++	+
Azul mercúrico de bromofenol	<i>Proteínas</i>	+	++	++	+
Cloreto férrico	<i>Fenólicos</i>	++	+++	+++	++
Sulfato ferroso	<i>Fenólicos</i>	++	+++	+++	++
Vermelho de rutênio	<i>Pectinas</i>	++	+++	+++	+
DMACA	<i>Proantocianidina</i>	-	-	-	-
Ácido Sulfúrico	<i>Derivados flavonoídicos</i>	-	-	-	-
Jeffrey	<i>Alcalóides</i>	-	-	-	-
Dragendorff	<i>Alcalóides</i>	-	-	-	-
Ácido Pícrico	<i>Alcalóides</i>	-	-	-	-
NADI	<i>Terpenos</i>	-	-	-	-
Lieberman-Buchard	<i>Triterpenos</i>	-	-	-	-

(-) reação negativa; (+) reação positiva. A quantidade de sinais (+) indica intensidade da reação.

Gotículas lipídicas foram detectadas em pequenas quantidades dispersas no mesofilo dos folíolos não galhados, estando ausentes nos tecidos das galhas. A reação para açúcares redutores foi fraca nos parênquimas lacunoso e paliçádico dos folíolos e intensa no Ci, nas células do topo da câmara ninfal em galhas jovens e maduras. Em galhas senescentes, os açúcares redutores não foram detectados. Proteínas foram fracamente detectadas nos mesmos sítios de reação dos açúcares redutores. Amido não foi detectado em nenhuma das amostras.

Fenólicos foram detectados como conteúdo enegrecido nas células da epiderme, do mesofilo e do parênquima vascular dos folíolos não galhados. Nas galhas jovens, maduras e senescentes, os fenólicos foram detectados na epiderme, no Ce e no Ci nas células do topo da câmara ninfal e naquelas próximas a abertura da galha. A reação para pectinas foi positiva nas células da nervura mediana do folíolo não galhado e nas células mucilaginosas de todas as amostras. Flavonóides, alcalóides, terpenos e triterpenos não foram detectados em nenhuma das amostras.

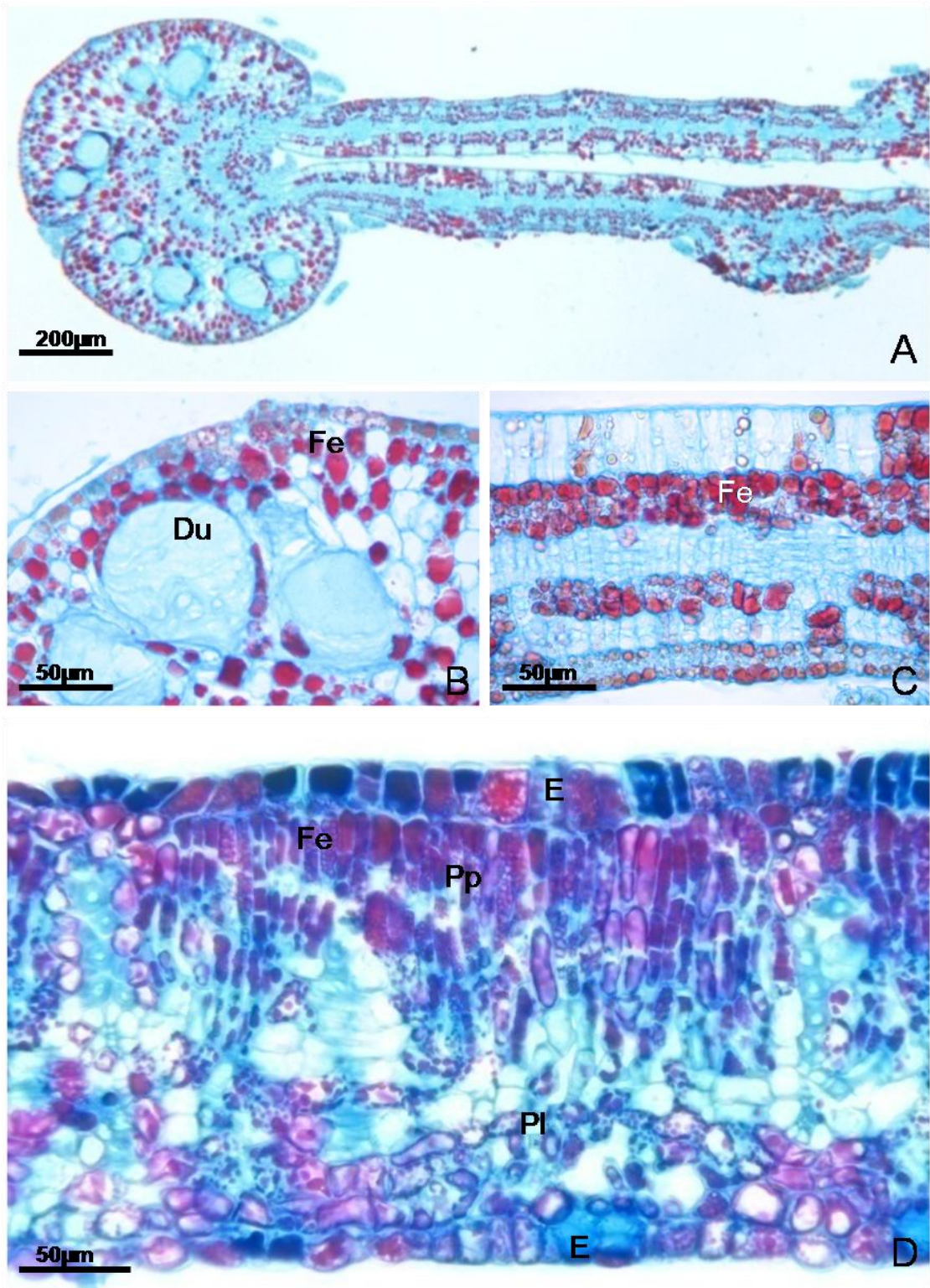


Figura 1. Secções transversais de folíolos de *Pseudobombax grandiflorum*. A – Folíolo jovem dobrado ao longo da nervura mediana. B – Detalhe de ductos mucilaginosos na região da nervura mediana de folíolo jovem C – Limbo foliolar jovem com tecidos ainda meristemáticos. D – Limbo do folíolo maduro. Ductos mucilaginosos (Du), epiderme (E), parênquima paliçádico (Pp), parênquima lacunoso (Pl), conteúdo fenólico (Fe).

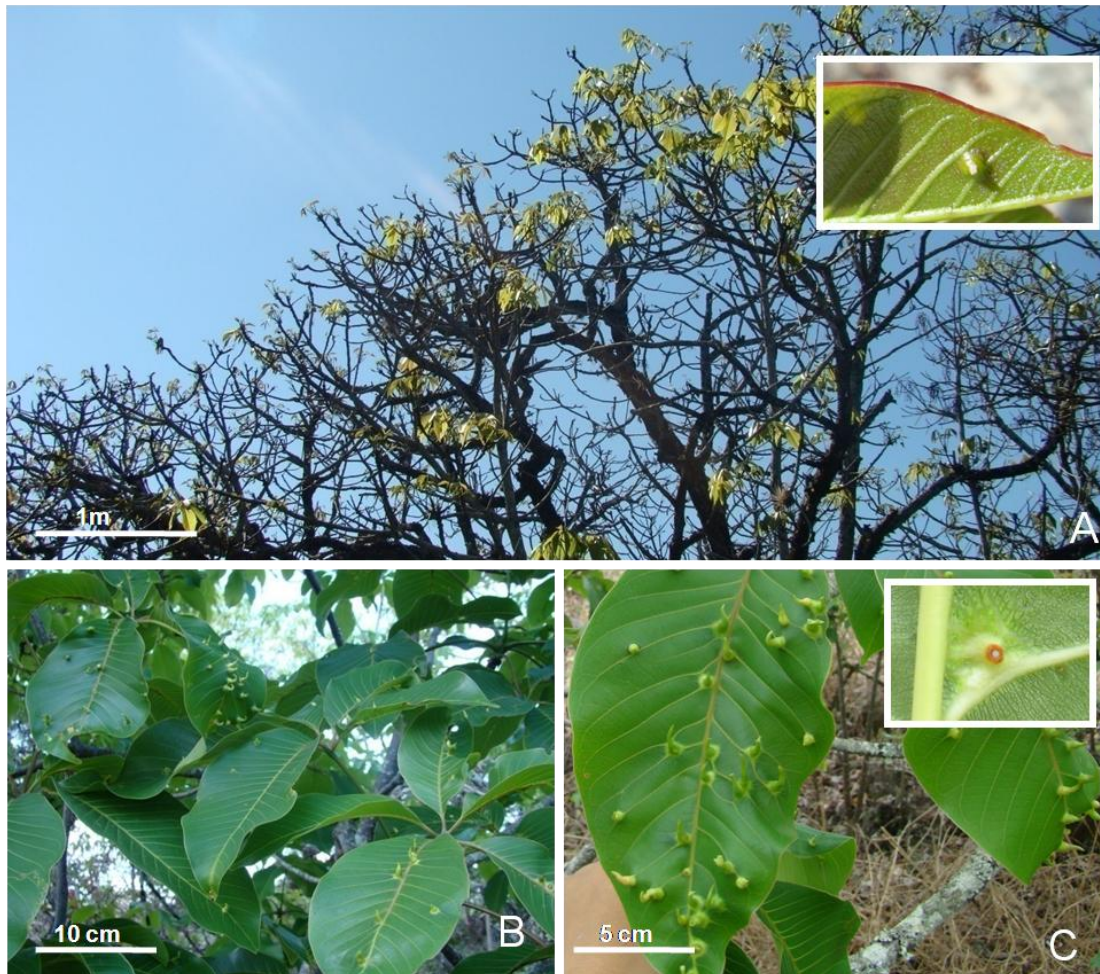


Figura 2. Galhas induzidas por *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*. A – Aspecto geral de ramos com folhas jovens e galhas em estágio de crescimento e desenvolvimento, no detalhe uma galha em fase de crescimento e desenvolvimento. B – Aspecto geral de folhas expandidas com galhas maduras. C – Galhas maduras localizadas ao lado das nervuras principal e secundárias, no detalhe abertura da galha voltada para a face abaxial do folíolo.

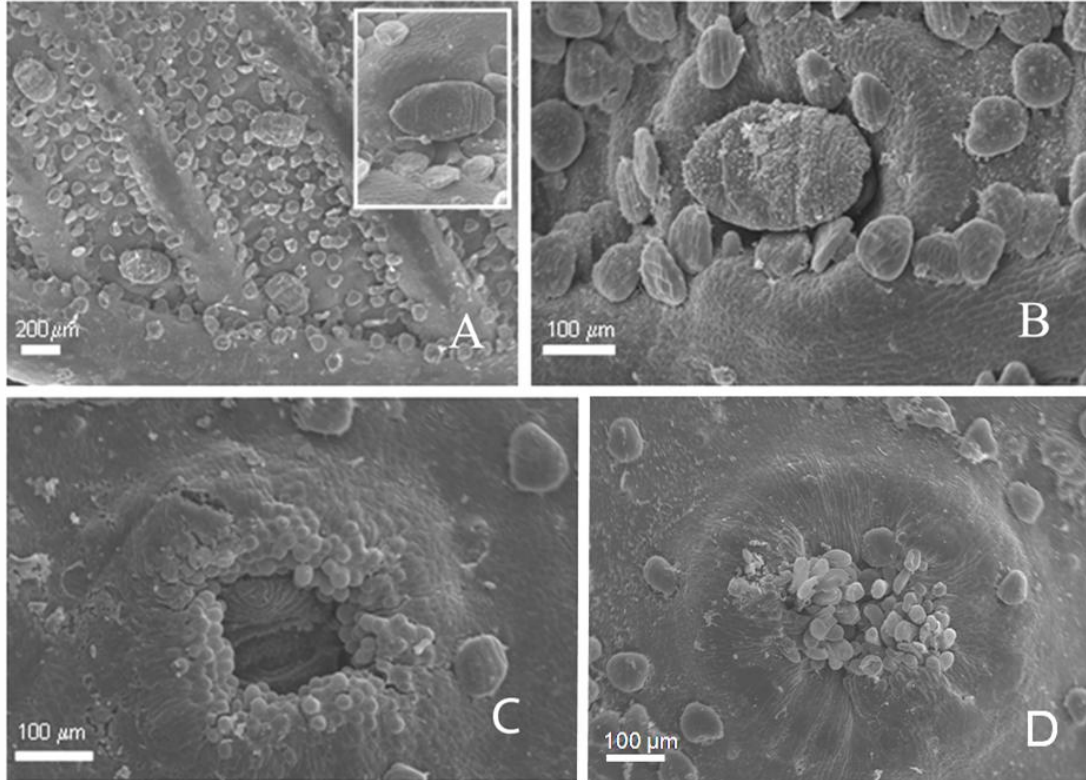


Figura 3. Fotomicrografias (MEV) de galhas induzidas por *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*. A – Ninfas na face abaxial do folíolo jovem, no detalhe uma ninfa de 2º instar. B – Detalhe do intumescimento da epiderme ao redor da ninfa. C – Tricomas em crescimento no bordo da galha. D – Abertura da galha voltada para a face abaxial do folíolo obliterada pelos tricomas.

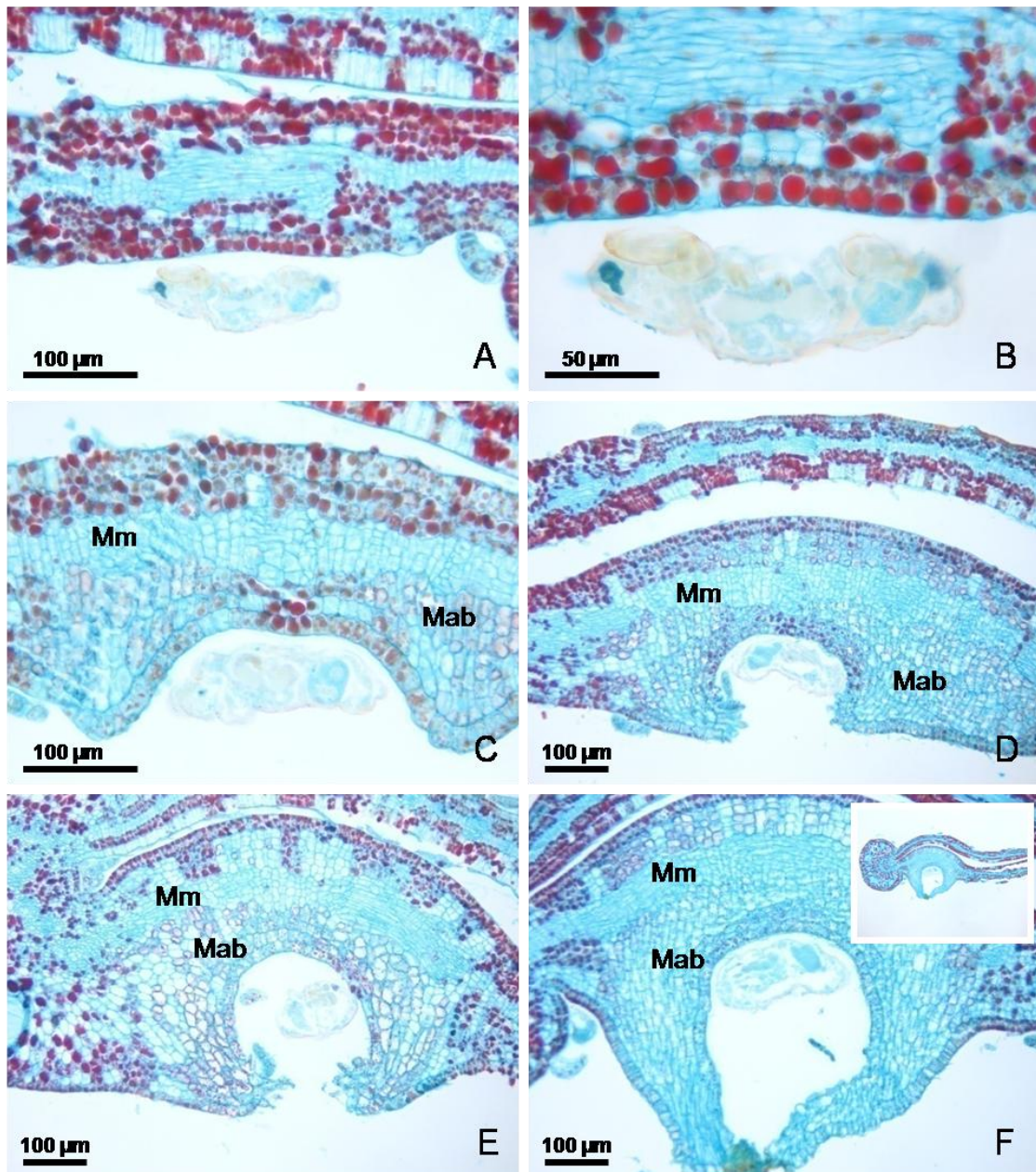


Figura 4. Secções transversais de galhas induzidas por *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum*. A – Nínta de 2º instar na face abaxial de folíolo jovem. B – Detalhe da nínta na face abaxial do folíolo; células do meristema fundamental abaxial (Mab) em divisões periclinais e feixe procambial nas camadas do meristema mediano em secção longitudinal. C-F – Fase de crescimento e desenvolvimento. C-D – Divisões periclinais das camadas (Mm) medianas e abaxiais do meristema fundamental. E-F – Divisões periclinais e anticlinais das células do meristema fundamental envolvendo o corpo da nínta. Desenvolvimento dos tricomas ao redor do ostíolo. No detalhe, aspecto geral da posição da galha no folíolo jovem.

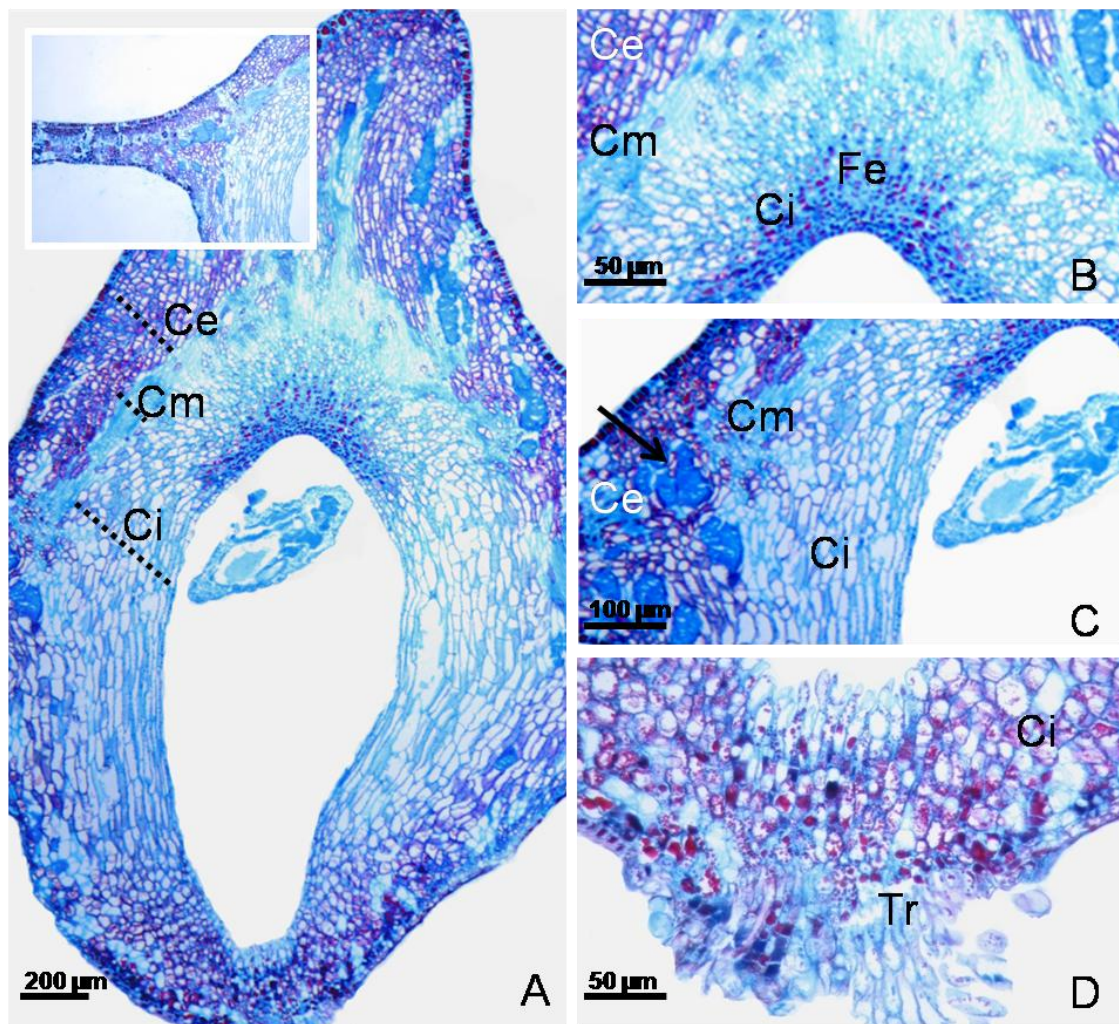
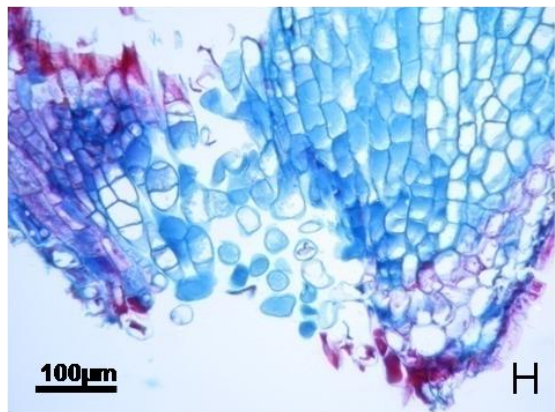
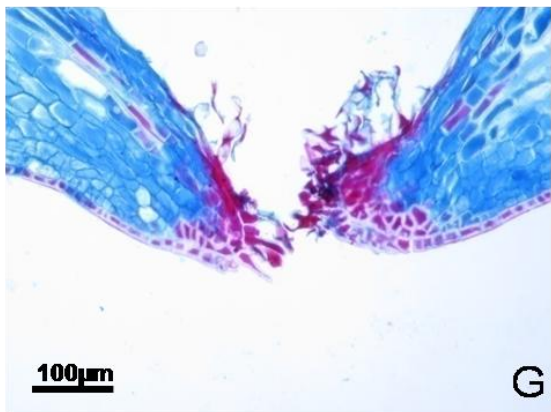
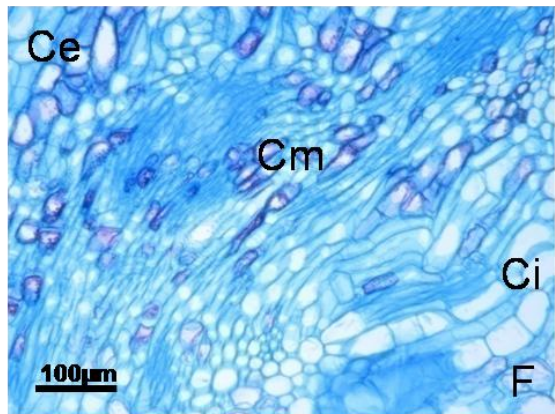
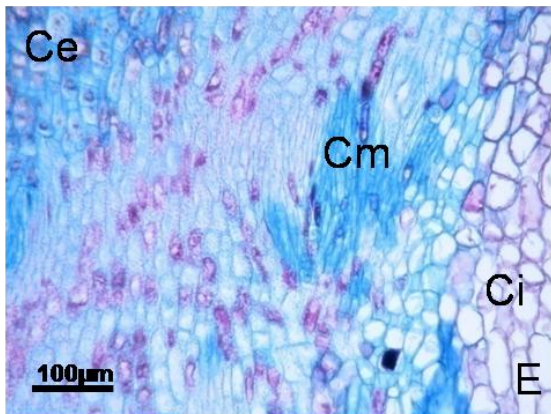
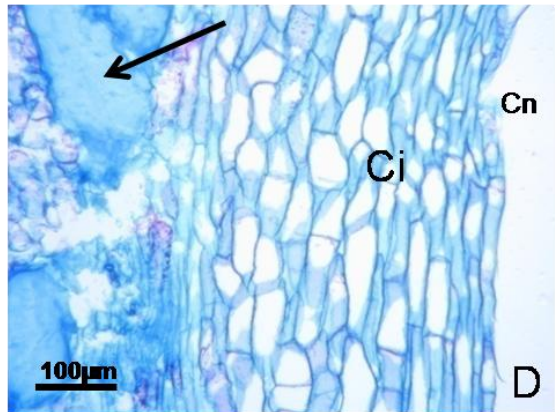
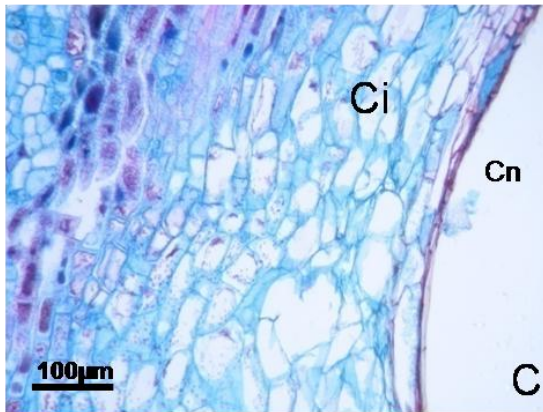
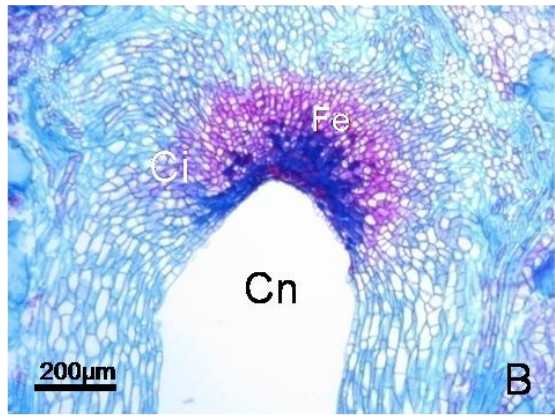
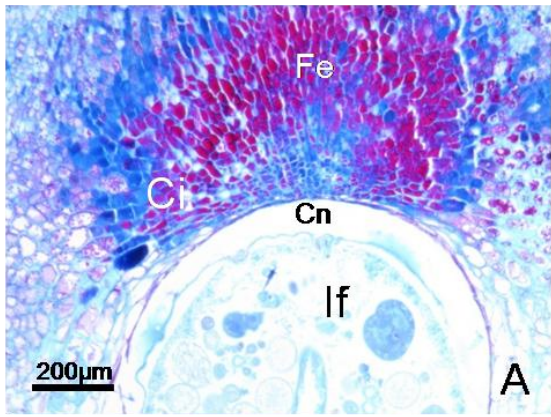


Figura 5. Secções transversais de galhas induzidas Eriococcidae em *Pseudobombax grandiflorum*. A-D – Galha madura com ninfa de 3º instar. A – Aspecto geral do córtex interno (Ci), córtex mediano (Cm) e córtex externo (Ce). Detalhe da continuidade do parênquima da galha com o mesofilo. B – Detalhe de células do Ci no topo da câmara ninfal com acúmulo de compostos fenólicos (Fe). Feixes vasculares no Cm. C – Detalhe de células mucilaginosas (seta) no Ce. D – Detalhe dos tricomas (Tr) na abertura da galha.

Figura 6. Secções transversais de galhas induzidas por Eriococcidas em *Pseudobombax grandiflorum*. A, C, E, G – Galhas induzidas por fêmeas. B, D, F, H – Galhas induzidas por macho. A-B – Detalhe de células no córtex interno (Ci) localizadas no topo da câmara ninfal com acúmulo de fenólicos (Fe). A – O formato da câmara ninfal (Cn) acompanha o corpo do inseto fêmea (If). B – Menor quantidade de células com fenólicos e formato alongado da Cn. C-D – Detalhe da porção lateral das galhas com córtex externo (Ce) com células mucilaginosas (seta) e Ci parenquimático. E-F – Feixes floemáticos no córtex mediano (Cm). E – Células obliteradas com indicio de cicatrização no revestimento da Cn. F – Revestimento da Cn com células íntegras. Parênquima na galha induzida por macho. G-H – Tricomas obliterando a saída das galhas.



DISCUSSÃO

Anatomia do folíolo não galhado

Solereider (1908) e Metcalfe & Clalk (1950) citam para Malvaceae a ocorrência de grande número de células especializadas na secreção de mucilagem. Em *Pseudobombax grandiflorum* essas células estão presentes tanto em folíolos jovens quanto maduros, sendo mais abundantes na região da nervura mediana. A estrutura dorsiventral encontrada em *P. grandiflorum* é comum a família Malvaceae (Solereider 1908 & Metcalfe & Chalk 1950,1979) e já foi relatada para o gênero *Hibiscus sp.* (Rocha *et al.* 2000). A organização colateral dos feixes vasculares também é comum na família (Solereider 1908, Metcalfe & Chalk 1950, Rocha *et al.* 2000).

Desenvolvimento das galhas

As galhas de *Eriogalococcus* em *Pseudobombax grandiflorum* apresentam indução similar a outras espécies de Eriococcidae, a qual ocorre pela atividade alimentar do galhador na superfície do órgão hospedeiro (Meyer 1987, Gonçalves *et al.* 2005). A indução das galhas em *P. grandiflorum* ocorre em folíolos jovens ainda com tecidos meristemáticos, como nas galhas de *Pseudotectococcus rolliniae* em *Rollinia laurifolia* (Gonçalves *et al.* 2005). Esses tecidos jovens são sítios preferenciais e mais reativos a indução de galhas (Rohfritsch & Anthony 1992, Weis *et al.* 1988), além de apresentarem maior qualidade nutricional (Coley & Barone 1996).

O primeiro contato dos indivíduos de Eriococcidae com as folhas hospedeiras, assim como aquele de muitos outros organismos galhadores se dá pelo sistema de revestimento (Meyer 1987, Gonçalves *et al.* 2005, Moura *et al.* 2009, Oliveira & Isaias 2009b). Em diversos sistemas, superfícies pilosas podem servir como pontos de fixação para os indutores ou ainda como barreira a oviposição ou alimentação. No caso de *P. grandiflorum*, os tricomas presentes na superfície abaxial dos folíolos jovens não representam uma barreira ao galhador, nem tampouco foram evidenciados pontos de apoio.

Embora variações em resposta a indução de galhas, com mudanças no tamanho e sinuosidade das células epidérmicas e a hipertrofia e hipotrofia sejam comuns (Isaias 1998), em *P. grandiflorum* a epiderme de modo similar ao encontrado nos folíolos não

galhados se mantém unisseriada no revestimento da galha e da câmara ninfal. Tricomas exclusivamente observados nos folíolos não galhados jovens se desenvolvem nas células epidérmicas da abertura da galha. Tricomas e estruturas secretoras formadas durante o desenvolvimento de galhas podem representar estratégias de defesa contra inimigos naturais e serem plásticas aos fatores de estresse ambientais (Kraus *et al.* 2003).

Os inúmeros tricomas que obliteram a abertura das galhas de *Eriogalococcus* em *P. grandiflorum* são neoformados, como já relatado para a galha de *Euphalerus ostreoides* em *Lonchocarpus muehlbergianus* (Oliveira *et al.* 2006). Em outros casos podem ser remanescentes da fase jovem dos folíolos como observado por Álvarez *et al.* (2009) nas galhas de *Forda formicaria* em *Pistacia terebinthus*. Os tricomas ao obliterarem a abertura da galha em *P. grandiflorum* provavelmente mantém a câmara ninfal em condições microambientais estáveis conforme proposto por Stone & Schönrogge (2003), e como já observado para outras galhas de Eriococcidae por Granett *et al.* (2001), Gonçalves *et al.* (2005) e Gullan *et al.* (2005). Além disso, pelo fato de insetos sugadores possuírem um aparelho bucal não apropriado para cavar um canal de fuga, a obliteração da abertura da galha por tricomas facilita a saída dos machos e permite a inserção do aparelho copulador nas galhas induzidas pelas fêmeas.

Após o estabelecimento do galhador, as etapas seguintes, ou seja, o desenvolvimento das galhas envolve hiperplasia e homogeneização do parênquima com hipertrofia já observada em outros sistemas com galhas foliares (Isaias 1998, Oliveira & Isaias 2009b e Moura *et al.* 2008). No sistema em estudo o desenvolvimento das galhas envolve quase que exclusivamente hiperplasia. As células envolvidas no processo de formação das galhas apresentam conteúdo fenólico, substâncias que segundo Hori (1992), bloqueiam a atividade das AIA-oxidases nos tecidos das galhas, aumentando a concentração de auxinas que levaria a hipertrofia celular. Os sítios de acúmulo de fenólicos e os planos das divisões celulares podem indicar diferentes status hormonais no corpo da galha, sendo estes os responsáveis pelos padrões morfogênicos observados.

O desenvolvimento de parênquima homogêneo nas galhas finda por trazer benefícios para os insetos galhadores, sendo comumente associado à proteção contra a dessecação (Meyer & Maresquelle 1983, Mendonça Jr. *et al.* 1997). Nas galhas em estudo o incremento nas células mucilaginosas também se configura numa proteção adicional à dessecação.

Galhas induzidas por Eriococcidae apresentam-se morfologicamente distintas em função do dimorfismo sexual dos indutores (Linsenmaier 1972, Meyer 1987, Dregger-Jauffret & Shorthouse 1992, Gullan & Martin 2003, Gonçalves *et al.* 2005). Estas diferenças são consequências das peculiaridades dos ciclos de vida de machos e fêmeas. Enquanto as galhas induzidas por fêmeas de *Pseudotectococcus rollinae* em *Rollinia laurifolia* são esféricas, aquelas induzidas por machos são cônicas. Há grande desenvolvimento do parênquima nas galhas induzidas por fêmeas e formação de duas câmaras, ficando a fêmea restrita a superior; a galha do macho é menor e apresenta uma única câmara (Gonçalves *et al.* 2005). No sistema *Eriogalococcus* - *Pseudobombax grandiflorum*, tanto as galhas de macho quanto as galhas de fêmeas apresentam uma única câmara ninfal e o mesmo desenvolvimento de feixes vasculares, células mucilaginosas no Ce e tricomas obliterando o ostíolo. O marcante dimorfismo sexual dos indutores neste sistema resulta em tênues diferenças anatômicas, percebidas no formato da câmara e nas células do sistema de revestimento desta. Nas galhas induzidas pelas fêmeas o maior desenvolvimento do corpo dos insetos gera uma pressão mecânica na epiderme causando obliteração celular e reação de cicatrização. Devido às menores dimensões dos machos, o revestimento da câmara de suas galhas permanece íntegro.

Em Eriococcidae, apenas os machos saem da galha para copular, pois as fêmeas são neotênicas e sésseis (Gullan *et al.* 2005). Em sendo sésseis, os galhadores necessitam de sítios de alimentação no próprio corpo da galha, e comumente um tecido nutritivo é diferenciado. No caso das galhas de Coccoidea, assim como naquelas dos demais grupos de insetos sugadores, a diferenciação deste tipo de tecido não é esperada, apesar de alguns estudos citológicos mostrarem a indução de um tecido nutritivo de reserva em galhas de sugadores (Meyer 1987, Oliveira *et al.* 2006). Nas galhas de Eriococcidae, os galhadores se alimentam nos feixes floemáticos ou ainda no parênquima da galha (Gullan *et al.* 2005), o que parece ocorrer no sistema em estudo no qual os feixes são exclusivamente floemáticos e as células do Ci são parenquimáticas. A vascularização por feixes floemáticos nas galhas faz com que o galhador se beneficie dos nutrientes e água que são conduzidos para as proximidades da câmara ninfal (Rohfritsch & Anthony 1992) e já foi observada em galhas de *Baccharopelma dracunculifolia* por Arduin *et al.* (2005) e de *Pseudotectococcus rollinae* por Gonçalves *et al.* (2008).

Perfis Histoquímicos

O perfil histoquímico detectado nas galhas de *Eriogalococcus* em *P. grandiflorum* é similar aquele do folíolo não galhado, diferindo apenas ao conteúdo lipídico presente apenas em folíolos. Das demais substâncias do metabolismo primário testadas, as reações foram positivas para açúcares redutores e proteínas, tanto nos folíolos quanto nas galhas. Nestas, o sítio de reação foi exclusivamente em células do Ci localizadas no topo da câmara ninfal, denotando ser produto direto do dreno gerado pelo estímulo alimentar do galhador (Weis *et al.* 1988, Schrönrogge *et al.* 2000, Raman *et al.* 2006, Álvarez *et al.* 2009). Tal inferência é proposta devido a localização restrita destes sítios de reação quando comparados a amplitude dos locais de armazenagem de amido em galhas de sugadores detectados por Oliveira *et al.* (2006) e Álvarez *et al.* (2009).

Nas galhas senescentes, com o fim do estímulo do galhador e consequente diminuição no metabolismo da galha, açúcares redutores não são observados e proteínas são bastante escassas.

A reação ao vermelho de rutênio foi detectada exclusivamente nas células mucilaginosas tanto dos folíolos não galhados quanto das galhas em suas diferentes fases, indicando a natureza péctica do conteúdo celular. Em geral, pectinas contribuem para a hidratação da parede celular, garantem força e flexibilidade a órgãos não-lignificados, participam da adesão intercelular e no controle de feridas e agentes patogênicos (Mastroberti & Mariath 2008).

Com relação aos compostos do metabolismo secundário, a reação para compostos fenólicos foi positiva nos folíolos e em todas as fases da galha, e pode estar associado a tecidos com intensa divisão celular (Abrahamson *et al.* 1991) ou a defesa contra inimigos naturais (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000). Desde a fase de indução das galhas de *P. grandiflorum*, os fenólicos são detectados em sítios proximais ao ponto de estímulo. Tendo em vista que essas substâncias participam da inibição das AIA oxidases (Hori 1992), parece coerente relacioná-las aos sítios de incremento de divisões celulares. Outro aspecto relevante é o papel dos fenólicos na defesa das plantas contra herbivoria. Contudo, para os Eriococcidae de *P. grandiflorum*, a concentração de fenólicos parece não oferecer resistência haja vista a alta taxa de infestação e a capacidade de estabelecimento em tecidos jovens ricos em fenólicos. Pela similaridade entre os perfis histoquímicos dos tecidos não galhados e das galhas em termos de lipídios, açúcares, proteínas, pectinas e fenólicos, pode-se inferir que o galhador

manipula a constituição química dos tecidos de *P. grandiflorum* dentro dos limites metabólicos desta espécie vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamson WG, McCrea KD, Whitwell AJ & Vernier LA. 1991. The role of phenolic compounds in goldenrod ball resistance and formation. *Biochemical Systematics and Ecology* 19:615-622.
- Álvarez R, Encina A & 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.
- Arduin M, Kraus JE, Otto P & Venturelli M. 1989. Caracterização morfológica de biométrica de galhas foliares em *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). *Revista Brasileira Botânica* 14:147-156.
- Arduin M, Kraus JE & Montenegro G. 1994. Morfologia e fenologia das galhas foliolares em *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 38:79-89.
- Arduin M & Kraus JE. 1995. Anatomia e ontogenia de galhas foliares de *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). *Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo* 14:109-130.
- Arduin M & Kraus JE. 2001. Galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concinna* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Revista Brasileira Botânica* 24:64-71.
- Arduin M, Fernandes GW & Kraus JE. 2005. Morphogenesis of galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) leaves. *Brazilian Journal of Biology* 65:559-571.
- Bissing DR. 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain technology* 49:116-117.
- Bronner R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids, 118-140. *In*: Shorthouse JD & Rohfritsch O. *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press, New York.
- Brundett MC, Kendrick B & Peterson CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* 66:111-116.

- Bukatsch F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61:255.
- Burckhardt D. 2005. Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Psyllids (Hemiptera: Psylloidea). *In*: Raman A, Schaefer CW & Withers TM. Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods. Science Publishers, Plymouth, UK.
- Coley PD & Barone JA. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forest. *Annual Review Ecology and Systematics* 27:305-335.
- David R & Carde JP. 1964. Coloration différentielle 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.
- Dregger-Jauffret F & Shorthouse JD. 1992. Diversity of gall-inducing insects and their galls, 8-33. *In*: Shorthouse JD & Rohfritsch O. Biology of insect-induced galls. Oxford: Oxford University Press.
- Dunn MJ. 1993. Gel Electrophoresis: Proteins. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Espírito-Santo MM & Fernandes GW. 2007. How many species of galling insects are there on earth and where they are? *Annals of the Entomological Society of América* 100:637-646.
- Faure G. 1914. *Manuale di micrografia vegetale*. Roma: Medico Farmacológico Ed.
- Feucht W, Schmid PPS & Christ E. 1986. Distribution of flavonols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *Journal of Plant Physiology* 125:1-8.
- Gonçalves SJMR, Isaias RMS, Vale FHA & Fernandes GW. 2005. Sexual dimorphism of *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson & Gonçalves (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae) influences gall morphology on *Rollinia laurifolia* Schltdl. (Annonaceae). *Tropical Zoology* 18:161-169.
- Gonçalves SJMR. 2008. Sincronia fenológica, dimorfismo sexual e ontogênese em galhas de *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson & Gonçalves (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae) em *Rollinia laurifolia* Schltdl (Annonaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.
- Granett J, Walker MA, Kocsis L & Omer AD. 2001. Biology and management of grape *Phylloxera*. *Annual Review of Entomology* 46:387-412.
- Gullan PJ & and Kosztarab M. 1997. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology* 42:23-50.

- Gullan PJ & Martin JH. 2003. Sternorrhyncha (jumping plant-lice, whiteflies, aphids, and scale insects), 1079-1089. *In*: Resh VH; Carde' RT. Encyclopedia of insects. Amsterdam (The Netherlands): Academic Press.
- Gullan PJ, Miller DR & Cook LG. 2005. Gall-inducing scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea), 159-229. *In*: Raman A; Schaefer CW and Withers TM. Biology, Ecology, and Evolution of Gall-Inducing Arthropods. Science Publishers, Inc., Enfield, USA, Plymouth, UK.
- Hartley SE. 1998. Are gall insects large rhizobia? *Oikos* 84:333-342.
- Hartley SE. 1999. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall former? *Oecologia* 113:492-501.
- Hori K. 1992. Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans, 157-170. *In*: Shorthouse JD & Rohfrisch O. Biology of insect-induced galls. Oxford University Press, New York.
- IBGE. 1992. Mapa de vegetação do Brasil - escala 1:5.000.000. Rio de Janeiro.
- Isaias RMS. 1998. Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry. WH Freeman and Company, San Francisco.
- Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book, New York.
- Kraus JE, Sugiura HC & Cutupri S. 1996. Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *tuberculata* (Meliaceae). *Fitopatologia brasileira* 21:349-356.
- Kraus JE & Arduin M. 1997. Manual Básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica: EDUR.
- Kraus JE, Isaias RMS, Vecchi C & Fernandes GW. 2003. Structure of insect galls on two sympatric subspecies of *Chrysothamnus nauseosus* (Pall. Ex Pursh) Britton (Asteraceae). *Boletim de Botânica Universidade de São Paulo* 21:251-263.
- Linsenmaier W. 1972. Insects of the world. New York: McGraw-Hill Book Co.
- Mastroberti AA & Mariath JEA. 2008. Imunocitochemistry of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). *Revista Brasileira Botânica* 31:1-13.
- Mazia D, Breger PA & Alfert M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull* 104:57-67.

- Mendonça Jr MS, Romanowski HP & Kraus JE. 1997. Broad overview of a gall-system: from plant anatomy to ecological interactions, 327-328. *In*: Symposium on the Biology of Gall-Inducing Arthropods. St. Paul, Minnesota, USA.
- Meyer J. 1987. Plant galls and Gall inducers. *Gebrüder Bornträger*. Berlin.
- Metcalfé CR & Chalk L. 1950. Anatomy of the dicotyledons. Oxford, Claredon Press.
- Metcalfé CR & Chalk L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. 2 ed. Oxford, Claredon Press.
- Meyer J & Maresquelle HJ. 1983. Anatomie des galles. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Moura MZD, Soares GLG & Isaias RMS. 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany* 56:153-160.
- Moura MZD, Soares GLG & Isaias RMS. 2009. Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina:Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 32:271-282.
- Nyman T & Julkunen-Tiitto R. 2000. Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13184-13187.
- Oliveira DC, Christiano JCS, Soares GLG & Isaias RMS. 2006. Reações estruturais e químicas de defesa de *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae) e ação do galhador *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera, Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica* 29:657-667.
- Oliveira DC & Isaias RMS. 2009. Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Revista de Biologia Tropical* 57:293-302.
- Oliveira DC & Isaias RMS. 2009. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *South African Journal of Botany in press*.
- O'brien TP & McCully ME. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi Pty, Melbourne.
- Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP & Graciano-Ribeiro D. 2006. Verniz vitral incolor 500[®]: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasilica* 20:257-264.
- Price PW, Waring GL & Fernandes GW. 1986. Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88:361-363.

- Raman A, Madhavan S, Florentine SK & Dhileepan K. 2006. Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema strenuana* inferred from signatures of isotopic carbon and nitrogen and concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119:101-107.
- Raman A. 2007. Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science* 92:748-757.
- Redfern M & Askew RR. 1992. *Plant galls*. Richmond Publishing Co. England.
- Rocha JF & Neves LJ. 2000. Anatomia Foliar de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae). *Rodriguésia* 51:113-132.
- Rohfritsch O & Anthony M. 1992. Strategies on gall induction by two groups of homopterans, 102-117. *In: Shorthouse JD & Rohfritsch O. Biology of insect induced galls* Oxford University, Oxford.
- Sass JE. 1951. *Botanical Microtechnique*. 2 ed. Ames: Iowa State College Press.
- Schrönrogge K, Harper LJ & Lichtenstein CP. 2000. The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment* 23:215-222.
- Solereder, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon press. V1.
- Stone GN & Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18:512-522.
- Wagner H, Bladt S & Zgainski EM. 1984. *Plant drug analysis*. Berlin: Springer-Verlag.
- Weis AE, Walton R & Crego CL. 1988. Reactive plant tissue and the population biology of gall makers. *Annual Review of entomology* 33:467-486.
- Yoder LR & Mahlberg PG. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63:1167-1173.
- Zuanazzi JAS. 2000. Flavonóides, 489-516. *In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA & Petrovik PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2^a ed. Editora da UFSC, Santa Catarina.

Capítulo III

**Teores de clorofilas no sistema *Eriogalococcus* gen. nov. -
Pseudobombax grandiflorum (Cav.) A. Robyns (Malvaceae)**

RESUMO

Herbívoros galhadores manipulam a morfogênese dos tecidos atacados e alteram o funcionamento do órgão hospedeiro de modo a garantir abrigo, alimento e proteção contra inimigos naturais. Além da morfogênese, modificações químicas e fisiológicas ocorrem devido à formação de galhas. Nas folhas, destacam-se modificações no tecido clorofiliano e a quantidade de clorofilas presentes. Espera-se que em galhas intralaminares, os teores de clorofilas sejam similares àqueles do mesofilo adjacente. Utilizando dois métodos de quantificação de clorofilas - extração química e medições com clorofilômetro - no sistema *Eriogalococcus* - *P. grandiflorum*, o objetivo do trabalho é comparar os teores de clorofilas nos tecidos de folíolos jovens e maduros e de galhas jovens e maduras, de modo a responder as seguintes perguntas: (1) há correlação entre os valores de clorofilas expressos em $\mu\text{g/g}$ e em SPAD? (2) Há diferenças nos teores de clorofilas entre folíolos não galhados e galhas? (3) A presença de galhas altera o teor de pigmentos nos folíolos hospedeiros em relação aos não galhados? (4) As diferenças e/ou similaridades encontradas estão relacionadas ao grau de maturidade dos tecidos ou a aspectos morfológicos? Muito embora seja intralaminar, a galha de *Eriogalococcus* apresenta teores de clorofilas distintos daqueles do mesofilo adjacente e independentes do grau de maturidade dos tecidos. Pela avaliação estrutural, pode-se concluir que há influência da forma na função fotossintética dos tecidos, pois o percentual de clorofilas e tecido clorofiliano é menor nas galhas, e não difere entre folíolos galhados e não galhados.

Palavras chave: clorofilas, galhas, interação inseto-planta, SPAD

ABSTRACT

Galling herbivores manipulate the normal morphogenesis of their host plant tissues, and alter their functions so as to ensure shelter, food and protection against natural enemies. In leaves, the formation of galls can cause structural changes in chlorophyllous parenchyma, and alter the amount of photosynthetic pigments, as well. It is expected that in intralaminar galls, chlorophyll contents should be similar to those of adjacent mesophyll. Using two methods of quantification of chlorophylls – chemical extraction and measurements with a chlorophyllometer – the system *Eriogalococcus* - *P. grandiflorum* was addressed with the objective of comparing the chlorophyll content in the tissues of young and mature non galled leaflets, and of young and mature galls, to answer the following questions: (1) is there any correlation between the values of chlorophyll in $\mu\text{g/g}$ and in SPAD? (2) Are there any differences in chlorophyll contents between non galled leaflets and galls? (3) Does the presence of galls alter the pigment contents in the host leaflets when compared to the non galled ones? And (4) are the differences and/or similarities related to the age of the samples or to their morphology? Although the gall of *Eriogalococcus* is intralaminar, chlorophyll contents is distinct from that of adjacent mesophyll, and independent of the degree of maturity of the tissues. By structural evaluation, we could conclude that there is an influence of the shape in the function of photosynthetic tissues, because the percentage of chlorophyll and chlorophyllous tissue are lower in galls than in non galled tissues, and did not differ between non galled and galled leaflets.

Palavras chave: chlorophyll, galls, insect-plant interaction, SPAD

INTRODUÇÃO

Herbívoros galhadores manipulam a morfogênese dos tecidos atacados (Isaias 1998; Moura *et al.* 2008, Oliveira & Isaias 2009) o que pode alterar o funcionamento do órgão hospedeiro, mesmo que localmente. Esta manipulação influencia a arquitetura, a reprodução (Silva *et al.* 1996) e também aspectos da fisiologia da planta hospedeira (Larson 1998; Aldea *et al.* 2006; Raman *et al.* 2006).

Nas folhas, a formação de galhas pode ocasionar modificações estruturais no tecido clorofiliano e alterar a quantidade pigmentos (Yang *et al.* 2003; Castro 2007; Yang *et al.* 2007, Fleury 2009). Tais modificações podem ser devidas ao fato de o nitrogênio e o carbono, importantes na construção do aparato fotossintético, serem realocados para o metabolismo secundário (Gottlieb *et al.* 1996) o que afeta a síntese de clorofila, produto do metabolismo primário do vegetal (Taiz & Zeiger 2004, Lüttge 1997).

Em geral, a razão entre as clorofilas *a* e *b* é 3 (Lichtenthaler 1987), e a variação dessa proporção gera maior ou menor eficiência na absorção de energia (Lüttge 1997). O que pode ser avaliado pela quantificação de clorofilas. Nas folhas, esta é usualmente determinada por extração química seguida de leitura em espectrofotômetro (Lichtenthaler & Wellburn 1983) ou ainda, com uso de medidores portáteis (clorofilômetro) que permitem medições instantâneas do valor correspondente ao teor de clorofilas totais (Dwyer *et al.* 1991, Argenta *et al.* 2001a). Os valores são calculados pelo equipamento com base na quantidade de luz transmitida pela folha, em dois comprimentos de onda com diferentes absorbâncias da clorofila (Minolta 1989). Para utilizar um medidor portátil e expressar os resultados em $\mu\text{g/g}$ é necessário calcular a correlação entre os valores obtidos com a extração química e com o aparelho (Xu *et al.* 2000, Argenta *et al.* 2001b, Yamamoto *et al.* 2002, Esposti *et al.* 2003, Wang *et al.* 2004). As regressões lineares estabelecidas indicam relação proporcional entre a concentração de pigmentos e a absorbância prevista pela Lei de Beer, a qual postula que a absorbância é proporcional ao coeficiente de absorção molar, ao trajeto da luz através do tecido e a concentração uniforme de tecido (Eisenberg e Crothers 1979).

A quantificação dos pigmentos pode gerar informações a respeito do estado fisiológico dos tecidos (Sims & Gamon 2002), bem como esta relacionada a parâmetros morfológicos. Os teores de clorofilas totais, por exemplo, estão relacionados à área relativa ocupada por parênquima clorofiliano nos órgãos analisados. Muitas galhas

apresentam coloração verde, podendo se estabelecer como órgãos adventícios ou imersos no limbo foliar, como observado nas galhas de *Eriogalococcus* gen. nov. (Hodgson 2010, unp. data) em *Pseudobombax grandiflorum* (Magalhães 2010, cap. 1). Espera-se que em galhas intralaminares, os teores de clorofilas sejam similares àqueles do mesófilo adjacente. Utilizando dois métodos de quantificação de clorofilas - extração química e medições com clorofilômetro - no sistema *Eriogalococcus* - *P. grandiflorum*, o objetivo do trabalho é comparar os teores de clorofilas nos tecidos de folíolos jovens e maduros e de galhas jovens e maduras, e responder as seguintes perguntas: (1) há correlação entre os valores de clorofilas expressos em $\mu\text{g/g}$ e em SPAD? (2) Há diferenças nos teores de clorofilas entre folíolos não galhados e galhas? (3) A presença de galhas altera o teor de pigmentos nos folíolos hospedeiros em relação aos não galhados? (4) As diferenças e/ou similaridades encontradas estão relacionadas à idade das amostras ou a aspectos morfológicos?

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

A população de *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae) estudada situa-se em área de afloramento calcário na Gruta da Lapinha, uma floresta estacional semidecidual (IBGE, 1992) a 746m de altitude ($19^{\circ}33'67''$ S; $043^{\circ}57'54''$ W), localizada no Parque Estadual do Sumidouro, município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. O material vegetal fértil está depositado no herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais (Nº registro - 133730).

Dosagem de pigmentos

Folíolos jovens (n=20) e galhas jovens (n=20) foram coletados de 10 indivíduos em Setembro de 2008. Folíolos maduros (n=20) e galhas maduras (n=20) foram coletados de 10 indivíduos em Outubro de 2008. Cada amostra de tecido não galhado consistiu de cinco discos e cada amostra de galha, de três galhas inteiras, ambas com peso conhecido. O teor de clorofilas em cada disco e em cada galha foi medido com o clorofilômetro SPAD-502 (Konica Minolta), que mede a transmitância da radiação

vermelha (650 nm) e infravermelha (940 nm) direto da folha e calcula o valor de SPAD (Soil Plant Analytical Development) (Minolta 1989). As mesmas amostras foram submetidas à extração das clorofilas em acetona 80% seguida de maceração e centrifugação, leitura em espectrofotômetro e quantificação segundo as equações propostas por Lichtenthaler & Wellburn (1983), com os valores expressos em $\mu\text{g/g}$ de massa fresca (MF). Com os valores obtidos da extração química e da leitura com o clorofilômetro foi padronizada uma regressão linear.

O teor das clorofilas também foi medido em folíolos não galhados ($n=20$) e galhados ($n=20$) durante o desenvolvimento das galhas.

Quantificação da área ocupada por tecido fotossintetizante

Para quantificar a área de tecido clorofiliano foram obtidos cortes a mão livre do terço médio de folíolos maduros e da região mediana de galhas maduras. Para tanto foram coletados nove folíolos e nove galhas em três indivíduos de *P. grandiflorum*, e feitas três repetições por amostra. Os cortes foram montados em glicerina 50% para realização de medidas com o *software* AxioVision 4.7[®] (Zeiss 2008).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa JMP[®] (SAS Institute, US, 1989-2002). Foram feitos testes de normalidade e homogeneidade. Para os dados normais e homogêneos aplicaram-se testes ANOVA/Tukey, e para os dados não paramétricos os testes de Kruskal-Wallis. Os gráficos foram feitos com o *software* Graph Pad Prism[®] 5.0 (Motulsky 1992-2009).

RESULTADOS

A correlação entre os teores de clorofilas expressos em $\mu\text{g/g}$ e SPAD mostrou-se significativa para os folíolos (figura 1A) e não significativa para as galhas (figura 1B). Nas equações obtidas nessas correlações, o valor de p foi menor que 0,001 para os folíolos. Contudo, nas galhas, o valor de p foi 0,17 (não significativo).

Os teores de clorofila *a* e clorofilas totais são maiores nos folíolos maduros enquanto que os teores de clorofila *b* são iguais em folíolos jovens e maduros. Não se observam diferenças entre os teores de clorofilas *a*, *b* e totais entre galhas jovens e maduras. A razão clorofila *a* / *b* foi maior no folíolo jovem, e similar no folíolo maduro, galha jovem e galha madura nas amostras submetidas à extração química (tabela 1).

Tabela 1. Teores de clorofilas obtidos por extração química em folíolos e galhas no sistema *Eriogalococcus* - *P. grandiflorum*. Valores expressos em $\mu\text{g/g}$ (MF).

	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Clorofila a/b
Folíolo jovem	1025,05 \pm 134,63 b	266,16 \pm 39,69 a	1265,60 \pm 200,01 b	3,80 \pm 0,37 a
Galha jovem	93,03 \pm 33,66 c	43,50 \pm 16,83 b	136,59 \pm 45,5 c	2,35 \pm 0,95 b
Folíolo maduro	1308,16 \pm 115,00 a	359,70 \pm a	1640,40 \pm 198,26 a	2,71 \pm 0,16 b
Galha madura	89,63 \pm 25,86 c	31,00 \pm b	122,30 \pm 36,05 c	3,01 \pm 0,54 b

Resultados seguidos pela mesma letra na vertical não diferem significativamente (ANOVA, seguido por testes múltiplos de Tukey; $\alpha = 0,05$).

Já na quantificação de clorofilas totais usando o clorofilômetro SPAD-502, o valor de SPAD foi menor no folíolo jovem do que no maduro e nas galhas o valor de SPAD foi menor na galha jovem do que na galha madura (figura 2).

Os valores de SPAD em folíolos não galhados e galhados são iguais entre as amostras ao longo do ciclo fenológico da galha. Os menores valores foram encontrados na primeira amostragem que corresponde ao início do ciclo, seguido por um aumento significativo nas duas amostragens subsequentes e um novo aumento significativo na quarta amostragem a partir da qual os valores estabilizam (figura 3).

A área relativa ocupada por tecido clorofiliano foi de 61,8% nos folíolos não galhados, 64,3% em regiões não galhadas de folíolos galhados e de 30,1% nas galhas (figura 4). A distribuição do parênquima clorofiliano nos folíolos é uniforme ocupando todo o mesofilo (figura 5A), entretanto nas galhas apenas as camadas do córtex externo apresentam clorofilas (figura 5B).

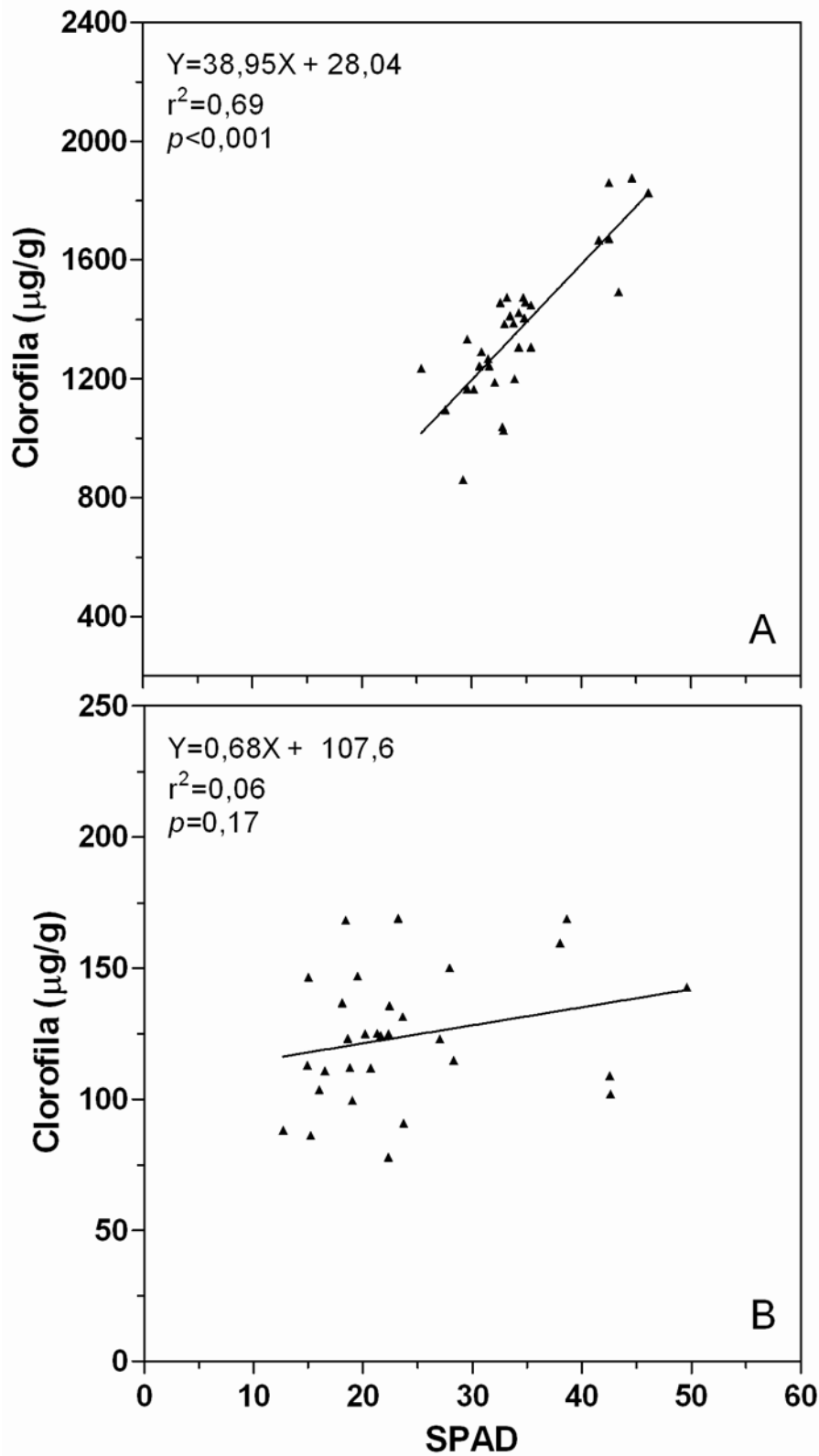


Figura 1. Sistema *Eriogalococcus – Pseudobombax grandiflorum*. Correlação entre os teores de clorofilas obtidas pelos métodos de extração química (µg/g) e leitura pelo clorofilômetro SPAD-502 (SPAD). A – Foliolo. B – Galha. SPAD (Soil Plant Analytical Development).

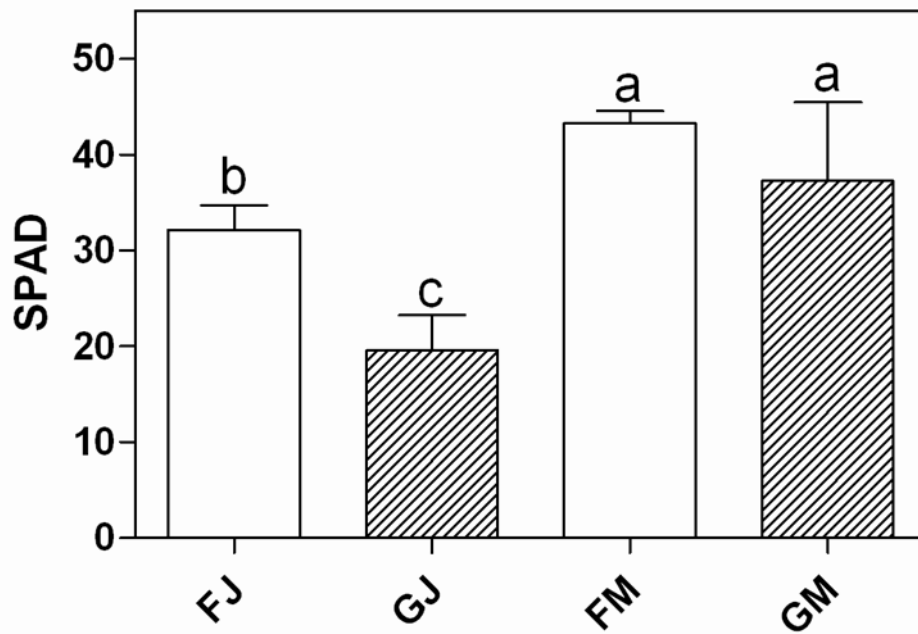


Figura 2. Sistema *Eriogalococcus* – *Pseudobombax grandiflorum*. Teores de clorofila obtidos pelo clorofilômetro SPAD-502 em folíolos jovens (FJ), galhas jovens (GJ), folíolos maduros (FM) e galhas maduras (GM). Resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P=0,05$). SPAD(Soil Plant Analytical Development).

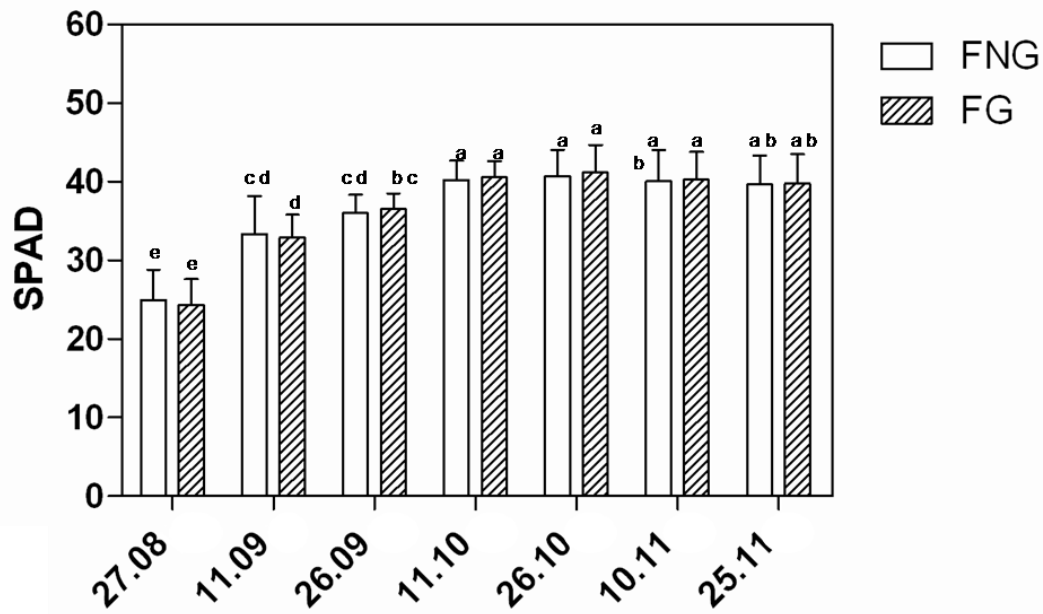


Figura 3. Sistema *Eriogalococcus* – *Pseudobombax grandiflorum*. Teores de clorofila obtidos pelo clorofilômetro SPAD-502 em folíolos não galhados (FNG) e galhados (FG), em 2009. Resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P=0,05). FNG (folíolos não galhados), FG (folíolos galhados) e SPAD (Soil Plant Analytical Development).

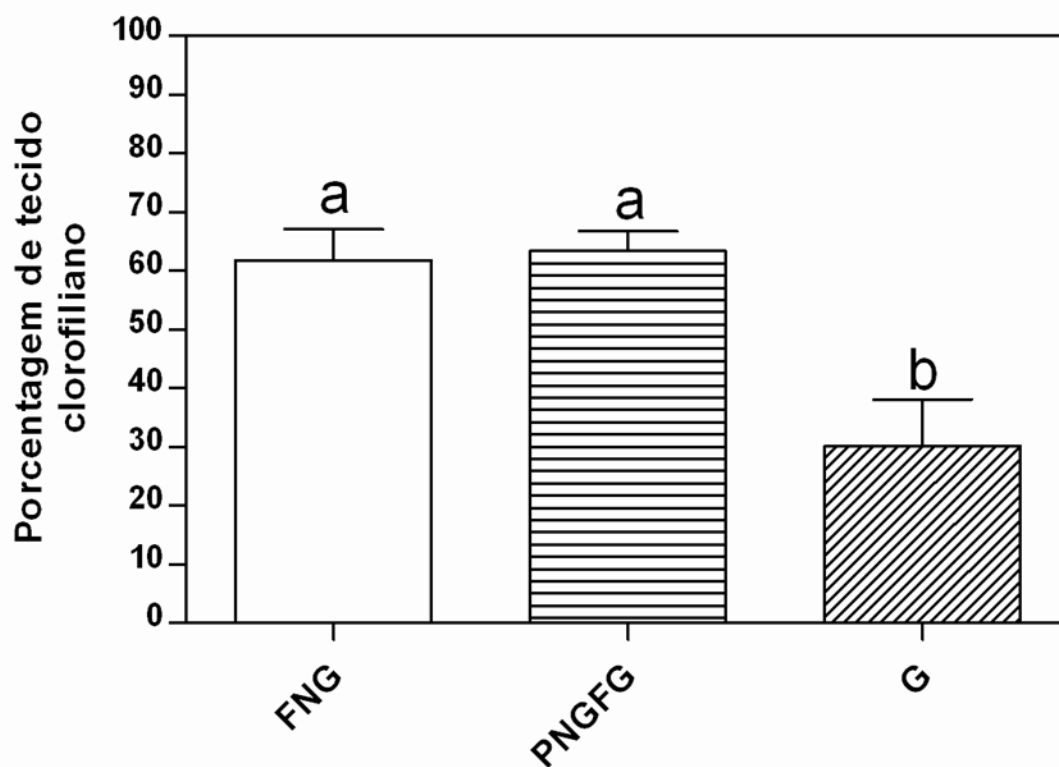


Figura 4. Sistema *Eriogalococcus* – *Pseudobombax grandiflorum*. Área relativa ocupada por parênquima clorofiliano em folíolos e galhas. Resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P=0,05$). FNG (folíolo não galhado), PNGFG (parte não galhada de folíolo galhado), G (galha).

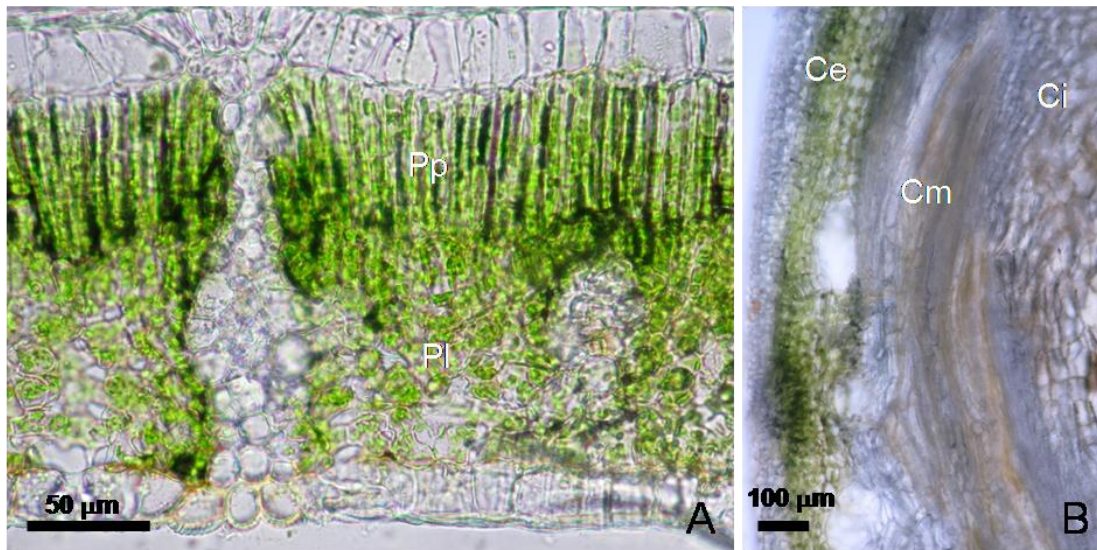


Figura 5. Sistema *Eriogalococcus* – *Pseudobombax grandiflorum*. A – Secção transversal de folíolo. B – Secção transversal de galha. Parênquima paliçadico (Pp), parênquima lacunoso (Pl), córtex externo (Ce), córtex mediano (Cm), córtex interno (Ci).

DISCUSSÃO

A correlação significativa entre o método convencional de extração de clorofilas (Lichtenthaler & Wellburn 1983) e as leituras obtidas com o uso do SPAD-502 (Minolta 1989) mostra a aplicabilidade deste aparelho para a análise de folíolos, todavia seu uso não foi eficiente para as galhas de *Eriogalococcus* em *P. grandiflorum*. A correlação não significativa encontrada nas amostras de galhas pode estar relacionada à distribuição diferencial das clorofilas ou a reflexão dos fótons (Monje & Bugbee 1992, Markwell *et al.* 1995). Até agora, nenhum estudo quantitativo investigou como esses desvios das hipóteses subjacentes a Lei de Beer podem influenciar a correlação entre clorofilas e as leituras pelo SPAD (Uddling *et al.* 2007). No sistema em estudo, pressupõe-se que a não significância dos valores encontrados para as galhas esteja relacionada às características morfológicas da estrutura.

Apesar da não significância observada para as amostras de galhas, a determinação do teor de clorofilas pelo clorofilômetro apresenta algumas vantagens sobre o método de extração. A leitura é realizada em poucos minutos; o aparelho tem baixo custo de manutenção e não são utilizados reagentes químicos (Piekielek & Fox, 1992). No estudo de galhas, somam-se as vantagens da amostragem ser não destrutiva, as medidas serem feitas no campo e a viabilidade de avaliações sazonais. Contudo, levando-se em consideração que nas amostras de galhas jovens os teores de clorofilas encontrados sejam iguais ao de galhas maduras pelo método de extração química e diferentes pela leitura do SPAD, o uso deste aparelho requer recomendações. Tal uso depende de no sistema a ser estudado, a correlação entre os dados obtidos pelos métodos de extração ser significativa, garantindo a confiabilidade dos resultados.

A similaridade entre os teores de clorofilas totais obtidos pelo clorofilômetro entre folíolos maduros e galhas maduras pode ser considerada incorreta uma vez que os valores obtidos pelo método de extração química foram cerca de 10 vezes maiores nos folíolos maduros do que nas galhas maduras. Sabe-se que a formação de galhas leva a um tipo de mutação na produção de pigmentos fotossintéticos, com alterações em proteínas do PS1 e do PS2 (Yang *et al.* 2007) e diminuição no teor de pigmentos (Yang *et al.* 2003; Castro 2007; Yang *et al.* 2007, Fleury 2009). No sistema estudado, é observada uma diminuição do teor de clorofilas e menos da metade da área relativa ocupada por tecido clorofiliano nas galhas quando comparadas a tecidos não galhados, o que provavelmente irá refletir na eficiência fotossintética. Este pode, a princípio, ser um

padrão decorrente da indução de galhas, pois mesmo em projeções foliares de galhas de *Pisphondyllia brasiliensis* em *Guapira opposita*, com altos níveis de similaridade com a folha tanto em termos anatômicos quanto em aparato fotossintético, o teor de pigmentos foi menor (Fleury 2009).

A presença de galhas comumente afeta a expansão das folhas hospedeiras (Gonçalves *et al.* 2005, Castro 2007, Lima 2008) e conseqüentemente a área fotossintetizante final. Pode-se, portanto supor que os danos fisiológicos aos folíolos hospedeiros atinjam também o teor de pigmentos. A comparação entre os teores de clorofilas nos folíolos galhados e não galhados indica que a presença de galhas não influencia no teor destas nos folíolos de *P. grandiflorum*, pois não há aumento do teor de clorofilas nos folíolos galhados a fim de compensar a área perdida para as galhas.

Em geral, as clorofilas *a* e *b* ocorrem em razão aproximada de 3 (Lichtenthaler 1987). Em situações de baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ou baixas intensidades luminosas, o aumento de clorofila *b* garante uma eficiência maior na absorção de energia (Lüttge 1997). Esta parece ser a estratégia adotada pelos folíolos maduros e pelas galhas jovens. Nas galhas maduras, por sua vez, a razão clorofila *a/b* é igual a 3. Embora a razão das clorofilas nas galhas de *Eriogalococcus* em *P. grandiflorum* esteja dentro do padrão, os baixos teores de clorofilas em $\mu\text{g/g}$ podem limitar a eficiência fotossintética.

Muito embora seja intralaminar, a galha de *Eriogalococcus* apresenta teores de clorofilas distintos daqueles do mesofilo adjacente e independentes do grau de maturidade dos tecidos. Pela avaliação estrutural, pode-se concluir que há influência da forma na função fotossintética dos tecidos, pois o percentual de clorofilas e tecido clorofiliano é menor nas galhas, e não difere entre folíolos galhados e não galhados. A alteração dos teores de clorofilas nestas galhas provavelmente afeta a fotossíntese, mas somente pesquisas futuras poderão comprovar queda no rendimento fotossintético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldea M, Hamilton J, Resti J, Zangerl AR, Berenbaum MR, Frank TD & DeLucia EH. 2006. Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia* 149:221-232.

- Argenta G, Silva PRF & Bortolini CG. 2001. Teor de clorofila na folha como indicador do nível de N em cereais. *Ciência Rural* 31:715-722.
- Argenta G, Silva PRF, Bortolini CG, Forsthofer EL & Strieder ML. 2001. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13:158-167.
- 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, Brasil.
- Dwyer LM, Tollenaar M & Houwing L. 1991. A nondestructive method to monitor leaf greenness in corn. *Canadian Journal of Plant Science* 71:505-509.
- Eisenberg D & Crothers D. 1979. Physical chemistry with applications to the life sciences. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, USA.
- Esposti MDD, Sequeira DL, Pereira PRG, Venegas VHA, Salomao LCC & Filho JAM. 2003. Assessment of nitrogenized nutrition of citrus rootstocks using chlorophyll concentrations in the leaf. *Journal of Plant Nutrition* 26:1287-1299.
- 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, Brasil.
- Gonçalves SJMR, Isaias RMS, Vale FHA & Fernandes GW. 2005. Sexual dimorphism of *Pseudotectococcus rolliniae* Hodgson & Gonçalves (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae) influences gall morphology on *Rollinia laurifolia* Schldt. (Annonaceae). *Tropical Zoology* 18:161-169.
- Gottlieb OR, Kaplan MAC & Borin MRMB. 1996. Biodiversidade um enfoque químico-biológico. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro.
- IBGE. 1992. Mapa de vegetação do Brasil - escala 1:5.000.000. Rio de Janeiro.
- Isaias RMS. 1998. Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Pappilonoideae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Larson KG. 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. *Oecologia* 115:161-166.
- Lichtenthaler HK 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:331-382.

- Lichtenthaler HK & Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoides, 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, Brasil.
- Lüttge U. 1997. *Physiological Ecology of Tropical Plants*. Springer Verlag, Berlin.
- Markwell J, Osterman JC & Mitchell JL. 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research* 46:467-472.
- Minolta Camera Co. Ltda. 1989. Manual for chlorophyll meter SPAD 502. Osaka, Minolta, Radiometric Instruments divisions.
- Monje OA & Bugbee B. 1992. Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters – a comparison of 2 types of meters. *Hortscience* 27:69-71.
- Motulsky H. 1992-2009. Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, GraphPad Software Inc.
- Moura MZ, Soares GLG & Isaias RMS. 2008. Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany* 56:153-160.
- Oliveira DC & Isaias RMS. 2009. Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Revista de Biologia Tropical* 57:293-302.
- Piekielek WP & Fox RH. 1992. Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. *Agronomy Journal* 84:59-65.
- Price PW, Waring GL & Fernandes GW. 1986. Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88:361-363.
- Raman A, Madhavan S, Florentine SK & Dhileepan K. 2006. Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema strenuana* inferred from signatures of isotopic carbon and nitrogen and concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119:101-107.
- Silva IM, Andrade GI, Fernandes GW & Lemos-Filho JP. 1996. Parasitic relationships a gall-forming insect *Tomoplagia Rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its host plant (*Vernonia polyanthes*, Asteraceae). *Annals of Botany* 78:45-48.

- Sims DA & Gamon JA. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81:337-354.
- Stone GN & Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18:512-522.
- Taiz L & Zeiger E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. Ed. Artmed.
- Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K & Pleijel H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91:37-46.
- Wang QB, Chen MJ & Li YC. 2004. Nondestructive and rapid estimation of leaf chlorophyll and nitrogen status of peace lily using a chlorophyll meter. *Journal of Plant Nutrition* 27:557-569.
- Xu W, Rosenow DT & Nguyen HT. 2000. Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breeding* 119:365-367.
- Yamamoto A, Nakamura T, Adu-Gyamfi JJ & Saigusa M. 2002. Relationship between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeonpea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). *Journal of Plant Nutrition* 25:2295-2301
- Yang CM, Yang MM, Huang MY, Hsu JM & Jane WN. 2003. Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leave. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44:314-321.
- Yang CM, Yang MM, Huang MY, Hsu JM & Jane WN. 2007. Life time deficiency of photosynthetic pigment-protein complexes CP1, A1, AB1, and AB2 in two cecidomyiid galls derived from *Machilus thunbergii* leaves. *Photosynthetica* 45:589-593.
- Zeiss C. 2008. Carl Zeiss Imaging Systems – 32 Software Release 4.7.2. USA. Carl Zeiss MicroImaging Inc.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de galhas em *Pseudobombax grandiflorum* contribui para o conhecimento da dinâmica dos sistemas galhador-planta hospedeira envolvendo espécies caducifólias na região neotropical. Ademais, este estudo permitiu a descoberta de um novo gênero *Eriogalococcus* gen. nov. (Hodgson 2010, unp. data) ressaltando a importância das galhas como microambientes ainda pouco explorados em termos de biodiversidade.

Em se tratando de uma espécie caducifólia, a associação com *P. grandiflorum* requer que o galhador apresente sincronia fenológica com a planta hospedeira, o que pode ser um padrão haja visto tal fenômeno ter sido previamente detectado em outro sistema envolvendo outra espécie de Eriococcidae.

Muito embora seja comum que o dimorfismo sexual dos Eriococcidae reflita no fenótipo das galhas, no sistema *Eriogalococcus* - *P. grandiflorum* tal fato não foi morfológicamente registrado. Do ponto de vista anatômico, as variações se restringem ao formato da câmara ninfal e ao sistema de revestimento desta. As similaridades são portanto numerosas, ressaltando-se o caráter exclusivamente parenquimático do corpo das galhas, a abundância de feixes floemáticos e células mucilaginosas. Com relação aos mecanismos de emergência dos adultos, a galha em estudo tem sua abertura obliterada por tricomas neoformados diferenciados a partir de células protodérmicas. Tanto a natureza parenquimática da galha quanto a sua abertura relativamente pouco protegida confrontam a quase ausência de ataque por inimigos naturais evidenciado em galhas de Eriococcidae e corroborado neste sistema. Este tópico merece maiores esforços do ponto de vista ecológico, de modo a elucidar os mecanismos de controle da população destes galhadores.

Outro aspecto relevante do sistema em estudo advém da avaliação estrutural, pela qual se pode concluir que há influência da forma na função fotossintética dos tecidos. O percentual de clorofilas e tecido clorofiliano foi menor nas galhas e *Eriogalococcus* em comparação aos folíolos galhados e não galhados, mesmo a galha sendo intralaminar e apresentar coloração similar àquela das lâminas não galhadas. Além dos teores de pigmentos, os perfis histoquímicos dos tecidos não galhados e das galhas mostraram-se similares, denotando que os galhadores manipulam a constituição

química dos tecidos de *P. grandiflorum* dentro dos limites metabólicos desta espécie vegetal.

As galhas de Eriococcidae revelam-se como laboratórios interessantes para estudos ecológicos, estruturais, químicos e citológicos. Além das estruturas de defesa relativamente escassas e as baixas taxas de mortalidade, o sistema *Eriogalococcus-P. grandiflorum* poderá ser objeto de estudos futuros relativos, por exemplo, às estratégias de sobrevivência das ninfas de 1^o instar nos momentos da caducifolia total das plantas hospedeiras. Ademais, face ao conhecimento sobre o ciclo destas galhas, e em sendo este restrito a poucos meses no ano, há viabilidade da realização de estudos citológicos, histoquímicos e imunocitoquímicos os quais gerarão conhecimentos inéditos sobre os mecanismos de desenvolvimento das galhas.