



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



THIAGO ALVES MAGALHÃES

Respostas subcelulares a indução de galhas por
Baccharopelma dracunculifoliae (Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia*
(Asteraceae) e por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em
Pseudobombax grandiflorum (Malvaceae)

**Tese 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 Doutor em Biologia Vegetal.**

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e
Diversidade Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



THIAGO ALVES MAGALHÃES

Respostas subcelulares a indução de galhas por
Baccharopelma dracunculifoliae (Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia*
(Asteraceae) e por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em
Pseudobombax grandiflorum (Malvaceae)

Tese 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 Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal

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

Coorientador: Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia

BELO HORIZONTE – MG

2014

Magalhães, Thiago Alves.

Respostas subcelulares a indução de galhas por *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudolombax grandiflorum* (Malvaceae) [manuscrito] / Thiago Alves Magalhães. – 2014.

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

Orientadora: Rosy Mary dos Santos Isaias. Co-orientador: Denis Coelho de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica.

Sumário

Dedicatória	V
Agradecimentos	VI
Lista abreviaturas	VII
Resumo	01
Abstract	02
Introdução geral	03
CAPÍTULO I - Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of <i>Baccharopelma dracunculifoliae</i> (Psyllidae) on <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Asteraceae)	14
Abstract.....	15
Introduction.....	15
Material and methods.....	16
Results.....	16
Discussion.....	18
References.....	20
CAPÍTULO II - Are the sites of reactive oxygen species production and programmed cell death related during the development of <i>Baccharopelma dracunculifoliae</i> (Psyllidae) gall on <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Asteraceae)?	22
Abstract.....	25
Introduction.....	26
Material and methods.....	27
Results.....	29
Discussion.....	31
Conclusion.....	34
References.....	35
Figures.....	42
CAPÍTULO III - Variação na estrutura péctica da parede celular durante o desenvolvimento da galha induzida por <i>Eriogallococcus isaias</i> (Eriococcidae) em <i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Malvaceae)	48
Resumo.....	49
Introdução.....	50
Material e métodos.....	52
Resultados.....	54
Figuras.....	57
Discussão.....	61
Referências bibliográficas.....	65

CAPÍTULO IV - Impacto citológico decorrente do alto estresse oxidativo causado pelo desenvolvimento da galha de <i>Eriogallococcus isaias</i> (Eriococcidae) em <i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Malvaceae)	71
Resumo.....	72
Introdução.....	73
Material e métodos.....	75
Resultados.....	77
Figuras.....	79
Discussão.....	85
Referências bibliográficas.....	88
Considerações finais.....	94

Dedico aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

A Deus que pela força e saúde para realizar este trabalho.

Em especial a Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias pela orientação e confiança nestes quase sete anos. Obrigado pela sinceridade, disponibilidade, puxões de orelha e por todo conhecimento que me foi passado. É muito bom ter uma pessoa como você pra se espelhar.

Ao Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira pela coorientação, amizade e dedicação. Pelas acolhidas em sua casa, muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Fenando Vale pela tutoria no REUNI. Pelos ensinamentos na sala de aula e pelos bons papos compartilhados.

À Capes pela bolsa, ao departamento de Botânica e a Pós-graduação em Biologia Vegetal da UFMG pela oportunidade. A Fapemig e ao CNPq que tem financiado os projetos do nosso grupo de pesquisa. Ao IEF e aos funcionários da Gruta da Lapinha pelo auxílio nas coletas de campo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves, a técnica Eloisa e a Claudia Labory do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA pela ajuda durante com as análises de microscopia eletrônica. Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, em especial a Roberta por toda ajuda com a preparação de amostras. Ao CAPI UFMG pelo uso do Confocal. Aos professores Geraldo Wilson Fernandes e Maria de Fátima Horta pelas contribuições para desenvolvimento da tese.

Aos professores Elder, Denise do laboratório de Anatomia Vegetal e aos professores e funcionários (Selminha, Terezinha, Sonia, Denise, Sara, Márcia) do Departamento de Botânica da UFMG por toda ajuda dispensada quando foi preciso.

Ao Wagner pelas inúmeras ajudas prestadas nos experimentos. Muito obrigado por sua disponibilidade e pelos cafés compartilhados.

A Marina Neiva pela ajuda com as análises de confocal. A Jarina da Mata pela ajuda com as análises de morte celular programada e dicas sobre os experimentos de pectinas.

Aos colegas da Pós e do laboratório de Anatomia pela ótima convivência durante esses 7 anos. Denis, Ana Sílvia, Grazi, Renê, Graci, Anete, Marina Neiva, Bruno, Ariane, Cibele, André, Marcinha, Marquito, Marcão, Luiza, Maria Tereza, Priscila, Wagner, Patrícia, Ana Paula, Rafaela, Maria Olívia, Carol, Sarinha, Vinícius,

Lu Seabra, Advânio, Lucimara, Matheus, Sofia, Carol Marques, Deborah, Marcia Bacelar, Camila, Poliana e Nara foi muito bom conviver com todos vocês.

Ao grupo galhas (Rosy, Denis, Anete, Renê, Ariane, Cibele, Bruno, Cris, Aline, Gracielle, André, Priscila, Grazi, Graci) pela parceria de trabalho, pela convivência. Aprendi muito com todos vocês. Agradeço a Ariane, Aline e Bruno por terem participado diretamente do meu trabalho.

Gostaria de agradecer em especial a cada um que nesta reta final esteve ao meu lado e que muito me ajudou a finalizar esta tese. Muito obrigado por toda ajuda, pelos incentivos e conselhos, por terem me ensinado a ter paciência e principalmente por terem tido paciência comigo. É muito importante pra mim ter pessoas assim, ESPECIAIS, ao meu lado. Isso faz com que eu tenha cada vez mais certeza das minhas escolhas.

Aos amigos de Bom Sucesso pela confiança e pelo incentivo nessa caminhada. Ao Hugo, Júlio, Matheus, Hebert, Thalles, Ivan e Waguinho pelas cervejas, prosas e convivência durante esses anos.

Em especial aos meus pais Júlio e Ednéa que me apoiaram, incentivaram e acreditaram na minha escolha. A minha avó Elza pelo carinho, aos meus irmãos Hugo e Júlio pela amizade e exemplo. A toda a minha família que sempre acreditou nessa conquista.

Lista de Abreviaturas

AGP – arabinogalactanos

DAB - 3,3'-Diaminobenzidine

ERO – espécies reativas de oxigênio

HGA- homogalacturonanos

HR – reação de hipersensibilidade / hypersensitivity reaction

MCP – morte celular programada

MG – mature gall

NGL – non galled leaf

PBS – phosphate saline buffer

PCD – programmed cell death

PG - poligalacturonases

PI – propidium iodide

PME – pectinas metil-esterases

RG-I – ramnogalacturonanos I

RG-II – ramnogalacturonanos II

ROS – reactive oxygen species

YG – Young gall

Resumo geral

Galhas apresentam tecidos típicos que se formam por rediferenciação celular através de hiperplasia dos tecidos, hipertrofia e variação na direção da divisão e alongamento das células. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) na parede celular causa sua acidificação e, conseqüentemente, o afrouxamento das microfibrilas de celulose que podem se reorientar e modificar os padrões de alongamento celular. Além das microfibrilas, pectinas e arabinogalactanos-proteínas (AGPs) afetam a forma das células e morfogênese dos tecidos. Os AGPs podem também atuar no controle da morte celular programada (MCP). Neste trabalho foram estudados o sistema *Baccharis dracunculifolia* - *Baccharopelma dracunculifoliae* e o sistema *Pseudobombax grandiflorum* - *Eriogallococcus isaias* com o objetivo de avaliar se o estresse gerado nos tecidos das galhas pode causar: alterações na estrutura do tecido e da parede celular nas células da planta hospedeira, alterações citológicas que levariam à morte celular programada e ao conseqüente controle da resposta de hipersensibilidade (HR) e, por fim, avaliar o efeito destas alterações na geração das formas das galhas. Foi observado no primeiro sistema que as microfibrilas de celulose e o grau de expansão e direção do alongamento celular são importantes para determinar a forma final da galha. No segundo sistema, ocorrem variações na estrutura péctica da parede e estas implicam em características favoráveis ao desenvolvimento das galhas como extensibilidade, elasticidade e rigidez da parede. O acúmulo de ERO nas duas galhas afeta a estrutura da parede celular e dos cloroplastos, mas não é um fator determinante para causar MCP, que só ocorreu na fase final do desenvolvimento nos dois sistemas.

Palavras-chave: Desenvolvimento de galhas, espécies reativas de oxigênio, microfibrilas de celulose, morte celular programada, pectinas.

Abstract

Plant galls have typical tissues originated through cell redifferentiation, hyperplasia, cell hypertrophy, and changes in the patterns of cell division and elongation. These phenomena are important to determine the size and shape of the galls. The variation in the patterns of cell elongation occurs due to changes in the orientation of the microfibrils of cellulose, which is influenced by the acidification of the cell wall. Moreover, pectins and arabinogalactan-proteins (AGPs) influence the cell shape and the tissue morphogenesis. The AGPs may control programmed cell death (PCD). In this work the systems *Baccharopelma dracunculifoliae* – *Baccharis dracunculifolia* and the system *Pseudobombax grandiflorum* – *Eriogallococcus isaias* were studied in order to check if the stress generated in the gall tissues could cause changes in the structure of the cell walls in the host plants, if the cytological alterations could lead to programmed cell death and subsequent control of the hypersensitive response (HR), and finally to evaluate the effect of these changes in the generation of the final gall shape. In the first system, the orientation of the cellulose microfibrils, the degree of cell expansion and direction of cell elongation are important on the determination of the final shape of the gall. Both galls present variations in the pectic structure of their cell walls and these variations imply in favorable features to gall development, such as elasticity, extensibility and wall stiffness. The accumulation of ROS in gall tissues affects the structure of the cell wall and chloroplasts, but do not cause MCP, which occurs only during the senescent phase of both galls.

Key-words: Cellulose microfibrils, gall development, pectins, programmed cell death, reactive oxygen species.

Introdução Geral

Insetos indutores de galhas representam fatores bióticos que modificam o crescimento normal dos vegetais, através de alterações nos padrões morfogênicos (Mani 1964, Meyer & Maresquelle 1983, Oliveira & Isaias 2010b, Dias et al. 2013, Ferreira & Isaias 2013). As galhas apresentam tecidos típicos e organizados (Mani 1964, Raman 2007, Oliveira & Isaias 2010b) formados por rediferenciação celular (*sensu* Lev- Yadun 2003, Oliveira & Isaias 2010b, Vecchi et al. 2013) e são consideradas novos órgãos vegetais (Shorthouse et al. 2005). Nos últimos anos, alguns trabalhos avaliaram a rediferenciação celular (Moura et al. 2008, Oliveira & Isaias 2010b, Dias et al. 2013) e as variações nos padrões de expansão celular (Oliveira & Isaias 2010b, Isaias et al. 2011, Ferreira & Isaias 2013) durante a morfogênese em galhas.

A partir desses estudos, torna-se relevante aprofundar o conhecimento sobre como o estresse causado pelo galhador afeta a estrutura da parede celular e do protoplasto durante o desenvolvimento das galhas, e como isso implica na determinação de sua forma final. Para o presente trabalho, foram escolhidos dois sistemas de galhas induzidas por insetos sugadores. O primeiro sistema é constituído pela galha foliar reniforme induzida por *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). Trata de um dos sistemas planta hospedeira–inseto galhador mais bem estudado nos Neotrópicos nos aspectos ecológicos, da biologia do inseto (Lara & Fernandes 1994, Araújo et al. 1995, Sperber & Collevatti 1996, Espírito Santo & Fernandes 2002) e anatômicos (Arduin et al. 2005, Magalhães et al. 2013). O segundo sistema consiste da galha foliolar, intralaminar, cônica, induzida por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). Este sistema teve o indutor descrito recentemente revelando gênero novo e espécie nova

para os Neotrópicos (Hodgson et al. 2011), servindo ainda como modelo para estudos fenológicos (Magalhães et al. submetido ao Journal of Natural History) e anatômicos (Magalhães 2010).

Durante o desenvolvimento da maioria das galhas, hipertrofia celular e hiperplasia dos tecidos são os fatores que definem o tamanho e a forma da estrutura (Kraus et al. 1996, Isaias 1998, Souza et al. 2000, Oliveira et al. 2006, Moura et al. 2008, Oliveira e Isaias 2010b, Isaias et al. 2011, Magalhães et al. 2013). Como em outros órgãos (Obroucheva 2008), os padrões de alongamento celular, assim como os de divisão celular são importantes na determinação do tamanho e forma final da galha (Oliveira & Isaias 2010b, Magalhães et al. 2013).

Para melhor entendimento destes processos, é necessário avaliar os padrões de orientação das microfibrilas de celulose que, segundo Baskin (2001, 2005), afetam diretamente o alongamento celular. Em células isodiamétricas, com crescimento isotrópico, as microfibrilas de celulose se orientam em vários sentidos, enquanto nas células alongadas, com crescimento anisotrópico, as microfibrilas estão orientadas perpendicularmente ao maior eixo de alongamento celular (Baskin 2005, Magalhães et al. 2013). A orientação das microfibrilas de celulose é influenciada pela acidificação da parede celular (Cosgrove 1998, 1999), sendo este processo diretamente relacionado ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas paredes, causando o afrouxamento das microfibrilas e permitindo assim o alongamento celular (Del Rio & Pupo 2009, Swanson & Gilroy 2010). Espécies reativas de oxigênio são produzidas normalmente no metabolismo vegetal durante a fotossíntese e respiração (Del Río & Pupo 2009, Heldt & Piechulla 2011), mas também podem ser produzidas como resposta ao ataque de patógenos ou injúrias mecânicas nos tecidos (Doke et al. 1996, Maffei et al. 2007, Bolwell & Daudi 2010, Torres 2010). Estas moléculas tem sido detectadas em galhas

nos tecidos clorofilianos, feixes vasculares e nos tecidos próximos à câmara larval (Oliveira & Isaias 2010a, Oliveira et al. 2010, Isaias et al. 2011), indicando que o estresse oxidativo pode ser um fator que desencadeia a indução e controla o desenvolvimento das galhas ao atuar diretamente no processo de hipertrofia. Entretanto, o acúmulo de ERO nos tecidos pode levar a morte celular (Doke et al. 1996) e causar alterações citológicas, como visto em alguns sistemas de galhas (Oliveira & Isaias 2010a, Oliveira et al. 2010, Oliveira et al. 2011a, b, Isaias et al. 2011). O estresse oxidativo pode levar à morte celular programada (MCP) e, com isso, interromper o desenvolvimento da galha. Por outro lado, o acúmulo de ERO nos tecidos afeta o desenvolvimento da parede e, conseqüentemente, a forma final da galha. Nesse contexto, torna-se importante compreender as alterações celulares causadas pelas ERO, se e quando ocorre MCP nas galhas e a relação do acúmulo de ERO nos tecidos com a MCP.

Entre outros fatores, o estresse gerado nos tecidos da galha pode provocar alterações na composição e distribuição de substâncias da parede celular e, conseqüentemente, alterar a morfogênese (Rose 2003, Albersheim et al. 2011, Wolf & Greiner 2012). Nas galhas, são esperadas, principalmente, alterações na extensibilidade, rigidez e elasticidade da parede durante o desenvolvimento, permitindo assim a expansão celular. A variação dessas características na parede, durante as fases da galha, determina o crescimento celular e influencia na determinação da forma da galha. Dentre estas substâncias, podemos destacar as pectinas que tem importante papel na adesão celular, expansão das células, porosidade, rigidez e estrutura da parede celular, defesa, sinalização celular, entre outras (Ridley et al. 2001, Willats et al. 2001, Rose 2003, Albersheim et al. 2011). A classe das pectinas é composta por polissacarídeos complexos e diversos. Esses polímeros são classificados em três principais domínios:

homogalacturonanos (HGA), o mais abundante polissacarídeo péctico (~65% das pectinas); os ramnogalacturonanos I (RG-I) que são formas alternativas de HGAs e apresentam muitas cadeias laterais com arabinose e resíduos de galactose, e ramnogalacturonanos II (RG-II), pectina estruturalmente mais complexa e que compreende aproximadamente 10% da pectina existente na matriz da parede (Ridley et al. 2001). Geralmente, as pectinas são sintetizadas em uma forma altamente metil-esterificada (Micheli 2001) e mudanças nesse grau de esterificação e na molécula péctica são importantes por definir as propriedades funcionais da parede, principalmente durante o crescimento e desenvolvimento dos tecidos (Knox 1997).

Além das pectinas, a composição da parede celular também conta com arabinogalactanos – proteínas (AGPs) (Pennel et al. 1989), que são proteínas estruturais solúveis e altamente glicosiladas (Showalter 1993). Os AGPs tem aspecto mucilaginoso, apresentam interação com pectinas e estão envolvidos no processo de adesão celular (Cosgrove 1997), crescimento, nutrição, desenvolvimento vegetal e proliferação celular (Pennel & Roberts 1990, Majewska-Sawka & Nothnagel 2000). Alguns estudos indicam que os AGPs podem atuar no controle da MCP (Mastroberti & Mariath 2008, Gao & Schowalter 1999). A MCP é um importante fenômeno presente em diversas fases de desenvolvimento das plantas, incluindo senescência foliar, embriogênese somática (Pennell & Lamb 1997) e zigótica (Giuliani et al. 2002). É um evento caracterizado como suicídio celular, no qual a célula ativa mecanismos específicos que acarretam em sua morte de maneira organizada. Possui como características bioquímicas influxo de cálcio, ativação de proteases específicas, fragmentação do DNA nuclear nas regiões internucleossômicas, liberação de citocromo *c* pela mitocôndria e alteração na função de cloroplastos (Lam et al. 2001, Khurana et al. 2005). Dentre as características morfológicas, podemos destacar a condensação da

cromatina nuclear, formação de corpos apoptóticos e perda estrutural da mitocôndria (Lam et al. 2001, Sun et al. 1999).

O presente trabalho utiliza os dois sistemas planta hospedeira-inseto galhador supracitados, *Baccharis dracunculifolia* - *Baccharopelma dracunculifoliae* e *Pseudobombax grandiflorum* - *Eriogallococcus isaias*, como modelos para avaliar as variações na estrutura da parede celular e do protoplasto das camadas celulares das galhas. O hábito alimentar similar dos insetos indutores e as dissimilaridades das duas plantas hospedeiras, uma Asteraceae e uma Malvaceae, visam verificar se as galhas podem ser consideradas como fenótipo estendido dos insetos mesmo em nível subcelular.

O estresse gerado pelo acúmulo de ERO nos tecidos vegetais afeta a composição e a estrutura da parede celular e do protoplasto das células envolvidas no processo cecidogênico. Partindo dessa premissa, espera-se: (1) que as alterações na organização das microfibrilas de celulose determinem novos padrões de alongamento celular os quais serão marcantes nos estágios iniciais de desenvolvimento da forma da galha; (2) que as variações nas pectinas e AGPs favoreçam a expansão e crescimento da parede celular principalmente nas fases iniciais de formação das galhas; e (3) que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) seja o fator desencadeador de morte celular programada (MCP) afetando aspectos subcelulares das células das galhas.

A presente tese é dividida em quatro capítulos:

1 - Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae);

2- Are the sites of reactive oxygen species production and programmed cell death related during the development of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) gall on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae)?

3- Variação na estrutura pécica e proteica da parede celular durante o desenvolvimento da galha induzida por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae);

4- Impacto citológico decorrente do alto estresse oxidativo causado pelo desenvolvimento da galha de *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae).

Referências bibliográficas

Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2011) Plant cell walls.

Garland Science, Taylor and Francis Group, New York.

Araújo AM, Fernandes GW, Bede LC (1995) Influência do sexo e fenologia de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) sobre insetos herbívoros. Rev Bras Entomol 39:347-353.

Arduin M, Fernandes GW, Kraus JE (2005) Morphogenesis of gall induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) leaves. Braz J Biol 65:559-571.

Baskin TI (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. Protoplasma 215:150-171.

Baskin TI (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. Annu Rev Cell Dev Biol 21:203-222.

- Bolwell GP, Daudi A (2010) Reactive oxygen species in Plant-Pathogen Interaction. In: Del Río LA, Puppo A, editors. Reactive oxygen species in plant signaling, p. 113-134.
- Cosgrove DJ (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants, *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 71-201.
- Cosgrove DJ (1998) Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol* 118:333-339.
- Cosgrove DJ (1999) Enzymes and Other Agents That Enhance Cell Wall Extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:391-417.
- Del Río LA, Puppo A (2009) Reactive oxygen species in plant signaling. Springer.
- Dias GC, Moreira GRP, Ferreira BG, Isaias RMS (2013) Contrasting developmental pathways for leaves and galls induced by a sap-feeding insect on *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). *An Acad Bras Cienc* 85:187-200.
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence a review. *Gene* 179:45-5.
- Espírito-Santo MM, Fernandes GW (2002) Host plant effects on the development and survivorship of the galling insect *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae). *Aust Ecol* 27:249-257.
- Ferreira BG, Isaias RMS (2013) Developmental stem anatomy and tissue redifferentiation induced by a galling Lepidoptera on *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Botany* 91:752-760.
- Gao M, Showalter AM (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J* 19:21-331.

- Giuliani C, Consonni G, Gavazzi G, Colombo M, Dolfini S (2002) Programmed Cell Death During Embryogenesis of Maize. *Ann Bot* 90:287-292.
- Heldt H, Piechulla B (2011) *Plant Biochemistry*. Academic Press, London.
- Hodgson C, Magalhães TA, Miller D (2011) Two new gall-inducing genera and species of Eriococcidae (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) off Malvaceae from the neotropics. *Lundiana* 10:53-72. <http://www.icb.ufmg.br/~lundiana/full/vol1012009/Hodgson.pdf>
- Isaias RMS (1998) Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS (2011) Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* 89:581-592.
- Khurana SMP, Pandey SK, Sarkar D, Chanemougasoundharam A (2005) Apoptosis in plant disease response: A close encounter of the pathogen kind. *Curr Sci* 88:740-752.
- Knox JP (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int Rev Cytol* 171:79-120
- Kraus JE, Sugiura HC, Cutupri S (1996) Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *tuberculata*. *Fitopatol Bras* 21:349-356.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853.
- Lara ACF, Fernandes GW (1994) Distribuição de Galhas de *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Rev Bras Biol* 54:661-668.
- Lev-Yadun S (2003) Stem cells plants are differentiated too. *Curr Top Plant Biol* 4:93-100.

- Maffei ME, Mithifer A, Boland W (2007) Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci* 12:1360-1385.
- Magalhães TA (2010) Influência da fenologia no desenvolvimento e fisiologia das galhas de *Eriogalococcus* gen. nov. em *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
- Magalhães TA, Oliveira DC, Suzuki AYM, Isaias RMS (2013) Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Protoplasma* (online). DOI 10.1007/s00709-013-0574-z
- Mani MS (1964) *Ecology of Plant Galls*. Dr. W. Junk Pub. The Hague.
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA (2000) The multiple roles of arabinogalactan protein in plant development. *Plant Physiol* 122:3-9.
- Mastroberti AA, Mariath JEA (2008) Developmental of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma* 232:233-245.
- Meyer J, Maresquelle HJ (1983) *Anatomie des galles*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Micheli F (2001) Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6:414–419.
- Moura MZD, Soares GLG, Isaias RMS (2008) Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Aust J Bot* 56:153-160.
- Obroucheva NV (2008) Cell Elongation as an inseparable componente of growth in terrestrial plants. *Russ J Develop Biol* 39:13-24.
- Oliveira DC, Christiano JCS, Soares GLG, Isaias RMS (2006) Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do

- galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). Rev Bras Bot 29:657-667.
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010a) Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). Plant Sci 178:350-358.
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010b) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). S Afr J Bot 76:239-248.
- Oliveira DC, Magalhães TA, Carneiro RGS, Alvim MN, Isaias RMS (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? Protoplasma 242:81-93.
- Oliveira DC, Carneiro RGS, Magalhães TA, Isaias RMS (2011a). Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) - Cecidomyiidae gall systems. Protoplasma 248:829-837.
- Oliveira DC, Moreira ASFP, Magalhães TA, Lemos-Filho JP (2011b) Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis? Plant Sci. 180:489-495.
- Pennel RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR, Roberts K (1989) A Family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. J Cell Biol 108:1967-1977.
- Pennel RI, Roberts K (1990) Sexual developmental in pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. Nature 344:547-549.
- Pennell RI, Lamb C (1997) Programmed cell death in plants. Plant Cell 9:1157-1168.
- Raman A (2007) Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. Curr Sci 92:748-757.

- Ridley B, O'Neil MA, Mohnen D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967.
- Rose JC (2003) *The plant cell wall*. Blackwell Publishing, Garsington Road, Oxford.
- Shorthouse JD, Wool D, Raman A (2005) Gall-inducing insects – Nature's most sophisticated herbivores. *Basic Appl Ecol* 6:407-411.
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9-23.
- Souza SCPM, Kraus JE, Isaias RMS, Neves LJ (2000) Anatomical and ultrastructural aspects of leaf galls in *Ficus microcarpa* L. F. (Moraceae) induced by *Gynaikothrips ficorum* Marchal (Thysanoptera). *Acta Bot Bras* 14:57-69.
- Sperber CZ, Collevatti RG (1996) The gall maker *Neopelma baccharidis* Burck. (Homoptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): success and parasitoidism density dependence. *An Soc Entomol Bras* 25:59-63.
- Sun Y, Zhao Y, Hong X, Zhai Z (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters* 462:317-321.
- Swanson S, Gilroy S (2010) ROS in plant development. *Physiol Plant* 138: 384-392.
- Torres MAM (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* 138:414-429.
- Vecchi C, Menezes NL, Oliveira DC, Ferreira BG, Isaias RMS (2013) The redifferentiation of nutritive cells in galls induced by Lepidoptera on *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. reveals predefined patterns of plant development. *Protoplasma* 250:1363-1368.
- Willats WGA, McCartney L, Mackie L, Knox P (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47:9-27.
- Wolf S, Greiner S (2012) Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249:169-175.

CAPÍTULO I

Patterns of cell elongation in the determination of the final shape
in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae)
on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)

Artigo publicado (Magalhães et al. Protoplasma (2014) 251:747–753)

Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)

Thiago Alves Magalhães · Denis Coelho de Oliveira ·
Aline Yasko Marinho Suzuki · Rosy Mary dos Santos Isaias

Received: 5 August 2013 / Accepted: 17 October 2013 / Published online: 10 November 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract Cell redifferentiation, division, and elongation are recurrent processes, which occur during gall development, and are dependent on the cellulose microfibrils reorientation. We hypothesized that changes in the microfibrils orientation from non-galled tissues to galled ones occur and determine the final gall shape. This determination is caused by a new tissue zonation, its hyperplasia, and relative cell hypertrophy. The impact of the insect's activity on these patterns of cell development was herein tested in *Baccharopelma dracunculifoliae*—*Baccharis dracunculifolia* system. In this system, the microfibrils are oriented perpendicularly to the longest cell axis in elongated cells and randomly in isodiametric ones, either in non-galled or in galled tissues. The isodiametric cells of the abaxial epidermis in non-galled tissues divided and elongated periclinally, forming the outer gall epidermis. The anticlinally elongated cells of the abaxial palisade layer and the isodiametric cells of the spongy parenchyma originated the gall outer cortex with hypertrophied and periclinally elongated cells. The anticlinally elongated cells of the adaxial palisade layer originated the inner cortex with hypertrophied and periclinally elongated cells in young and mature galls and isodiametric cells in senescent galls. The isodiametric cells of the adaxial epidermis elongated periclinally in the inner gall epidermis. The current investigation demonstrates the role of cellulose

microfibril reorientation for gall development. Once many factors other than this reorientation act on gall development, it should be interesting to check the possible relationship of the new cell elongation patterns with the pectic composition of the cell walls.

Keywords Cellulose microfibrils · Cell responses · Hyperplasia · Hypertrophy · Gall-inducing insect

Introduction

Gall development changes the morphogenetic patterns (Mani 1964; Meyer and Maresquelle 1983; Rohfritsch 1992; Oliveira and Isaias 2010b) and the cytological features of the host organs (Oliveira and Isaias 2010a; Oliveira et al. 2010; Oliveira et al. 2011a, b; Isaias et al. 2011), leading to the redifferentiation (sensu Lev-Yadun 2003) of cell types with different functions and characteristics. In many galls, cell hypertrophy and tissue hyperplasia determine new cell lineages, whose distribution along the structure define their peculiar sizes and shapes (Kraus et al. 1996; Isaias 1998; Souza et al. 2000; Oliveira et al. 2006; Moura et al. 2008; Oliveira and Isaias 2010b; Isaias et al. 2011).

Some important factors in the development of galls are the patterns of cell division and the directions of cell elongation (Oliveira and Isaias 2010b). The latter is defined by the relationship between the orientation of the cytoskeleton and of the cellulose microfibrils (Baskin 2005) and is influenced by the acidification of cell walls, which increases their extensibility (Cosgrove 1998, 1999). While for isotropic cell growth, the expansion rate is similar in all directions; for anisotropic cell growth, which generates elongated cells, the direction of maximum expansion rate is generally perpendicular to the net orientation of the microfibrils

Handling Editor: Friedrich W. Bentrup

T. A. Magalhães · A. Y. M. Suzuki · R. M. S. Isaias (✉)
Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte,
MG, Brazil
e-mail: rosy@icb.ufmg.br

D. C. Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia,
Uberlândia, MG, Brazil

(Baskin 2005). Another factor that influences cell and tissue morphogenesis is the distribution of the pectins in cell walls (Rose 2003; Albersheim et al. 2011; Wolf and Greiner 2012), which influences intercellular adhesion, cell expansion, and cell wall porosity, among others (Ridley et al. 2001; Willats et al. 2001; Rose 2003; Albersheim et al. 2011). Recently, this pectin dynamics was demonstrated in three gall morphotypes on the superhost *Baccharis reticularia* (Formiga et al. 2013).

During the course of the morphogenesis in galls, cell cycles are dynamic and repetitive, which generates good models for studies on cell transformations. These models have been previously addressed in terms of patterns of cell expansion and their importance in the determination of gall shapes (Moura et al. 2008; Oliveira and Isaias 2010b; Isaias et al. 2011). Current approach presents the labeling of the reorientation of cellulose microfibrils and the patterns of cell elongation during the developmental process of a simple gall morphotype (*sensu* Isaias et al. 2013), the leaf-folding gall induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). This gall system was previously studied in its ecological aspects, insect biology (Lara and Fernandes 1994; Araújo et al. 1995; Sperber and Collevatti 1996; Espírito-Santo and Fernandes 2002; Arduin et al. 2005), and anatomical development (Arduin et al. 2005), configuring the best studied host plant-galling insect system in the Neotropics. Currently, we focus on the alterations in size and shape and the relative reorientation of the microfibrils to verify: (1) whether the patterns of microfibrils deposition in the non-galled tissues are similar to the galled ones, (2) which roles microfibrils play during tissue changes along gall development, (3) how the variation in cellular shapes and sizes in each tissue layer influences the final gall shape, and finally (4) how the reorientation of cellulose microfibrils is related to the new structure and functional design defined in this leaf-folding gall morphotype.

Material and methods

Samples of non-galled leaves of *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) and galls induced by *B. dracunculifoliae* (Psyllidae) on young, mature, and senescent stages were collected, from January to June 2012, at Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil (19°17'57" S/43°35'58" W). Fragments of leaves and galls (0.5 cm²) were fixed in 4 % Karnovsky in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) (O'Brien and McCully 1981), dehydrated in *n*-butyl series (Johansen 1940), and embedded in Paraplast® (Kraus and Arduin 1997). Transverse and longitudinal sections (10–14 µm) were obtained in a rotatory microtome (Leica® BIOCUT 2035), stained with safranin and Astra blue (2:8) (Bukatsch 1972) modified to 0.5 %, and mounted on colorless glass varnish Acrilex™ (Paiva et al. 2006). In transverse sections, the median region of both non-

galled leaves and galls ($n=5$) at each developmental stage was measured. Measurements ($n=50$) were made on images obtained with a digital camera (Canon A650) coupled to a light microscope (ZEISS Primo Star) using the AxioVision™ (ZEISS) software (Zeiss 2008). The results were analyzed by ANOVA followed by Tukey test, using the Graphpad Prism™ 5.0 software (Motulsky 1992–2009).

Free hand transverse and longitudinal sections of non-galled leaves and galls in the three stages of development were stained with Calcofluor White Stain (stock solution, 0.5 g/l) in distilled water for 30 min in the dark (Herth and Sghnepf 1980) for labeling the cellulose microfibrils. The sections were analyzed and photographed in a fluorescence microscope (Olympus BX51) coupled to a DP70 camera (Olympus).

Results

Anatomical features

B. dracunculifoliae induces leaf-folding, glabrous, and green to reddish-brown galls on leaves of *B. dracunculifolia* (Fig. 1). Young galls are defined as the initial lateral leaf folding along the midrib. Mature galls are defined by the complete marginal rolling with an increase in thickness and size, whereas the senescent galls are unfolded.

The leaves of *B. dracunculifolia* (Fig. 2a) have uniseriate epidermis, isobilateral mesophyll with 2–3 layers of palisade

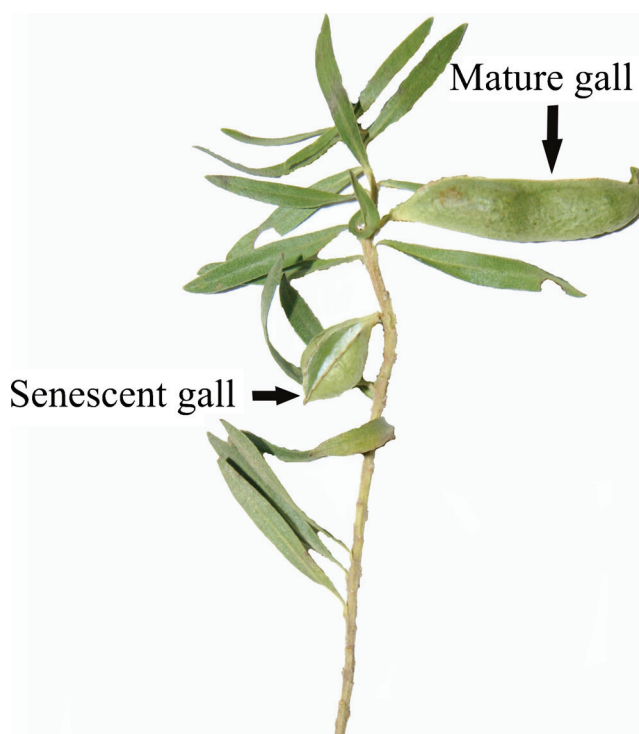
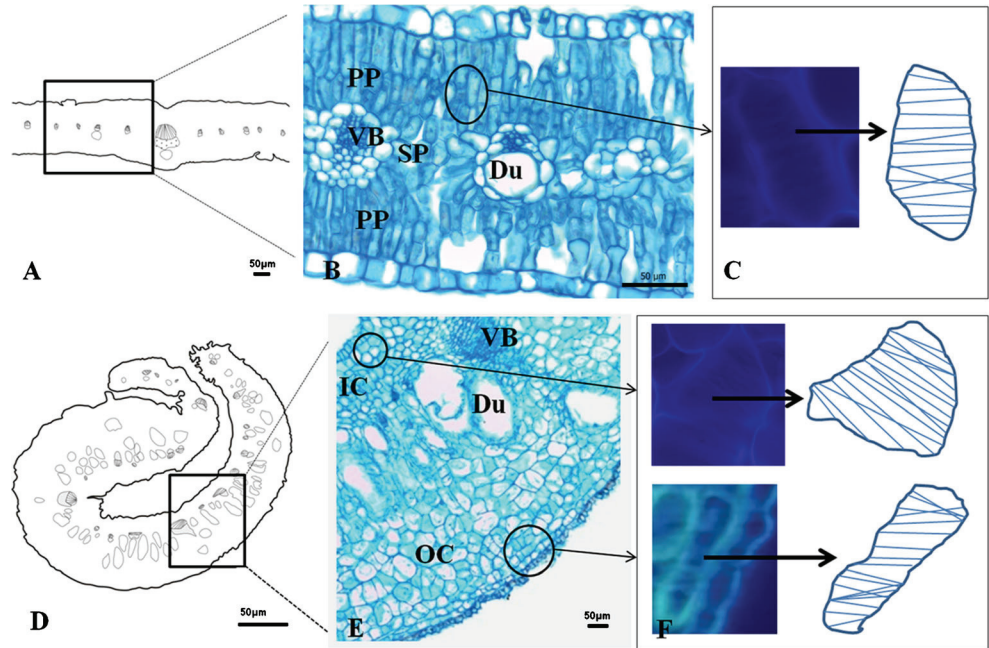


Fig. 1 Branch with mature and senescent galls induced by *B. dracunculifoliae* on *B. dracunculifolia*

Fig. 2 Diagrams, anatomy, and cellulose microfibril arrangement of non-galled leaves and young galls induced by *B. dracunculifolia* on *B. dracunculifolia*. **a** Diagram of a leaf in transverse section (TS). **b** Non-galled leaf anatomy (TS). **c** Cellulose microfibril arrangement in non-galled leaf cells. **d** Diagram of a young gall (TS). **e** Detail of the anatomy of a young gall wall (TS). **f** Cellulose microfibril arrangement in cells of a young gall. *Du* duct, *IC* inner cortex, *OC* outer cortex, *PP* palisade parenchyma, *SP* spongy parenchyma, *VB* vascular bundle

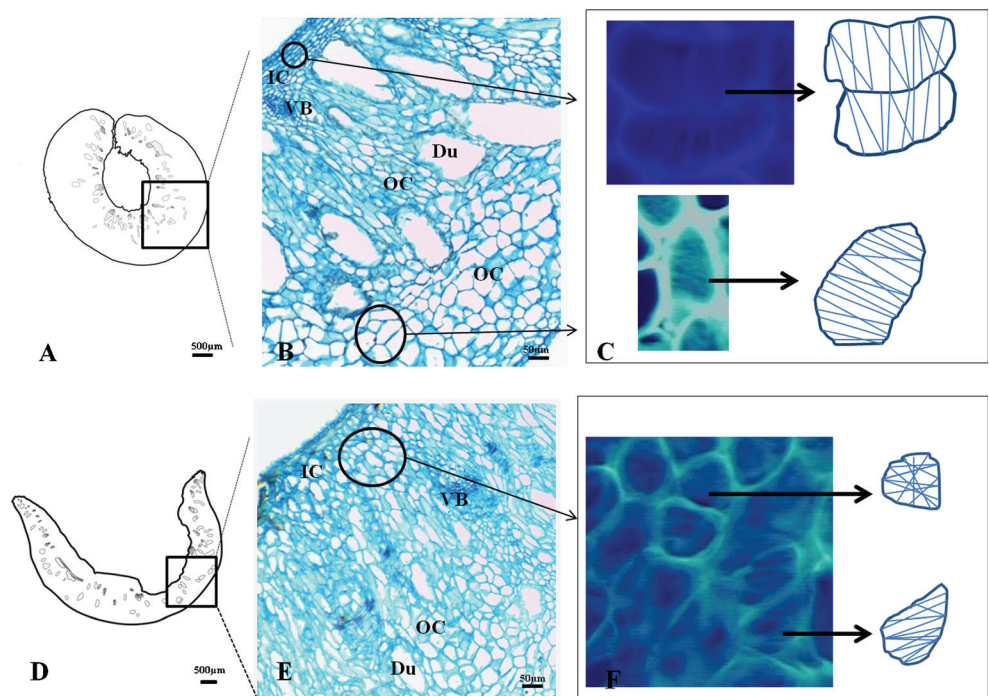


parenchyma in the abaxial and adaxial positions, 2–3 layers of spongy parenchyma, and collateral vascular bundles associated with secretory ducts toward the abaxial position (Fig. 2b). The cellulose microfibrils in the epidermal and parenchymatic cell walls of non-galled leaves are perpendicular to the longest cell axis in elongated cells (Fig. 2c) and randomly arranged in isodiametric cells.

The young galls (Fig. 2d) have uniseriate epidermis in the inner and outer surfaces, multilayered outer cortex with secretory ducts, hypertrophied vascular bundles, and 4–5

layered parenchymatic inner cortex (Fig. 2e). Due to cell elongation, the cellulose microfibrils are oriented perpendicularly to the longest cell axis in inner and outer cortices (Fig. 2f). The number of layers of the epidermis and outer cortex does not change toward gall maturation (Fig. 3a) and senescence. The secretory ducts hypertrophy and the cells of the inner cortex divide up to 8–9 layers, remaining parenchymatic (Fig. 3b). The cellulose microfibrils are oriented perpendicularly to the longest cell axis of the elongated cells either in the inner or the outer cortex

Fig. 3 Diagrams, anatomy, and cellulose microfibril arrangement of mature and senescent galls induced by *B. dracunculifolia* on *B. dracunculifolia*. **a** Diagram of a mature gall in transverse section (TS). **b** Mature gall anatomy (TS). **c** Cellulose microfibril arrangement in cells of a mature gall. **d** Diagram of a senescent gall (TS). **e** Detail of the anatomy of a senescent gall wall. **f** Cellulose microfibril arrangement in cells of a senescent gall. *Du* duct, *IC* inner cortex, *OC* outer cortex, *VB* vascular bundle



(Fig. 3c). In senescent galls (Fig. 3d), cell division results in a homogeneous cortex (Fig. 3e) accompanied by the reorientation (randomly) of the microfibrils (Fig. 3f). The cellulose microfibrils show the same arrangement either in transverse or longitudinal sections.

Non-galled leaves and gall histometry

The cells of the abaxial epidermis in non-galled tissues are isodiametric (cell area=403 μm^2). During gall development, they divide anticlinally and elongate periclinally forming the gall outer epidermis (cell area in mature gall=1,231 μm^2). The cells of the abaxial palisade layer are anticlinally elongated (cell area=213 μm^2), and the cells of the spongy parenchyma are isodiametric (cell area=199 μm^2). These two tissue layers originate the gall outer cortex with hypertrophied and periclinally elongated or isodiametric cells (cell area in mature gall=7,016 μm^2). The cells of the adaxial palisade layer are anticlinally elongated (cell area=236 μm^2) and originate the inner cortex with hypertrophied and periclinally elongated cells in young (cell area=452 μm^2) and mature galls (cell area=1,640 μm^2). These cells become isodiametric in senescent galls (cell area=2,560 μm^2). The cells of the adaxial epidermis are isodiametric (cell area=366 μm^2) and elongate periclinally in the inner gall epidermis (cell area in mature gall=750 μm^2). The cell area decreases in the abaxial and adaxial epidermis and outer cortex but increases in the inner cortex in the senescent gall.

Tissue redifferentiation vs. tissue histometry

The non-galled leaf tissues redifferentiate into neofomed gall tissues, with significant modifications in cell area. The main alterations responsible for gall shape determination are general tissue hyperplasia and the great hypertrophy of the cells of the abaxial epidermis, abaxial palisade parenchyma layer, and spongy parenchyma. The hyperplasia of the abaxial leaf epidermis results in a 50 % reduction in cell area in young galls. During gall maturation, this tissue layer elongates periclinally and becomes 3-fold larger when compared to non-galled leaf epidermis (Fig. 4a, b). The gall cortex has a mixed origin. The outer layers come either from the abaxial palisade layers or from the spongy parenchyma. Its cells are anticlinally elongated or isodiametric, 33-fold larger in mature galls than in their precursor non-galled leaf cells (Fig. 4c, d). The secretory ducts hypertrophy (45-fold larger in mature galls) and anticlinally elongate in the galls (Fig. 4e, f). The gall inner cortex originates from the adaxial palisade parenchyma and has periclinally elongated cells, 2-fold larger in young galls and 7-fold larger in mature galls, when compared to their correspondent non-galled leaf cells. The cells of the gall inner cortex are isodiametric and 11-fold larger in senescent galls (Fig. 4g, h), when the gall opens. The adaxial leaf

epidermis, whose cells are originally isodiametric in non-galled leaves, originates the 2-fold larger (mature galls) and periclinally elongated cells of the inner epidermis (Fig. 4i, j).

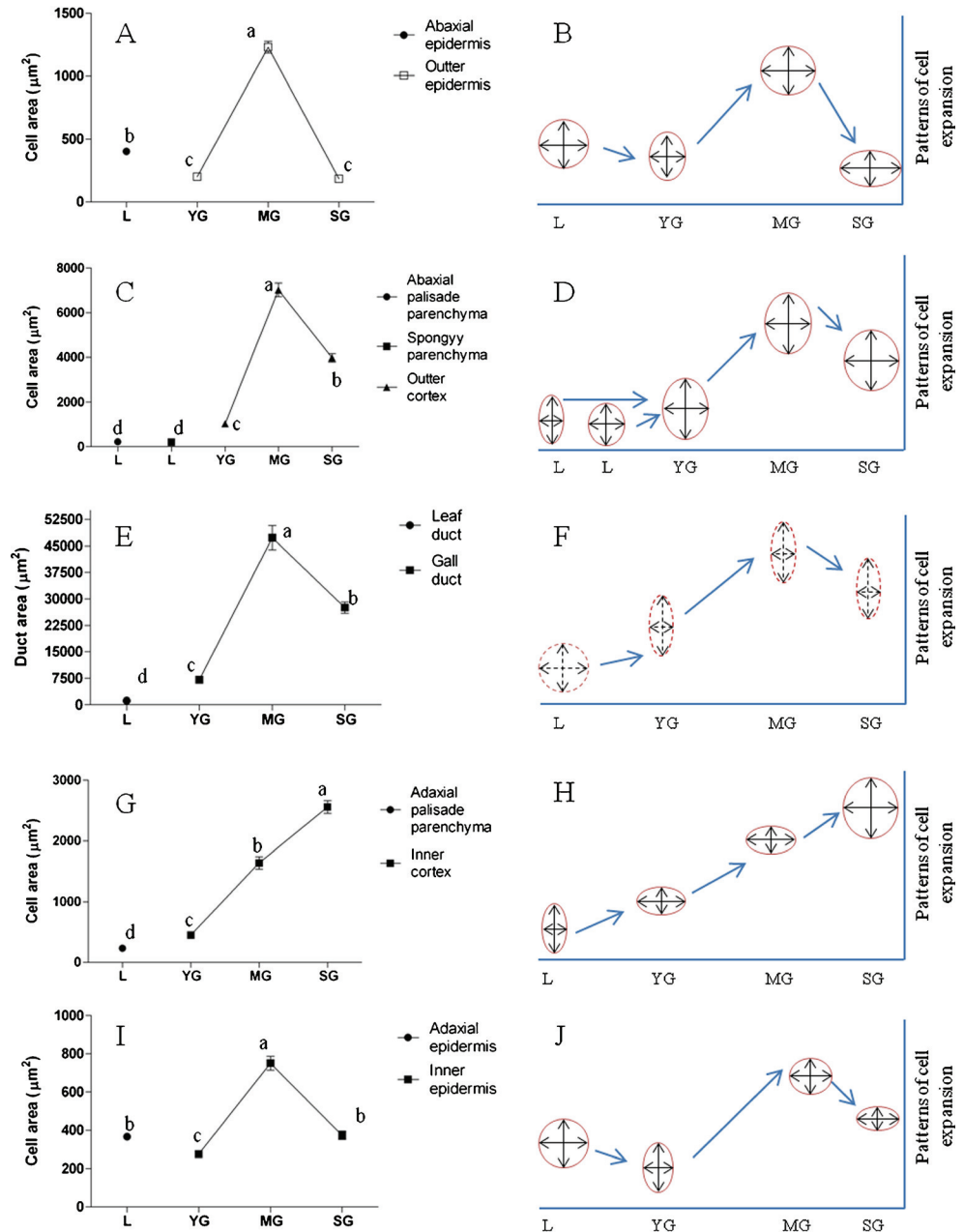
Discussion

The process of gall induction by *Baccharopelma dracunculifoliae* on the leaves of *B. dracunculifolia* completely alters the fates of its host leaf tissues. The microfibril orientation in gall tissues accompanies the new patterns of cell expansion and elongation. The epidermal cells elongate periclinally as a consequence of the reorientation of the microfibrils, which are perpendicular to the longest cell axis in gall cortex. Together with these new patterns, new cell sizes, the establishment of the inner and outer cortices, and the hypertrophy of the ducts determine the final gall shape.

The reorganization of tissues during gall development occurs due to tissue hyperplasia and cell hypertrophy, especially observed in the 35-fold larger cortical cell layers of the leaf-folding gall of *B. dracunculifolia*. These two processes are common in arthropod-induced galls (Souza et al. 2000; Oliveira et al. 2006; Moura et al. 2008, 2009; Álvarez et al. 2009; Raman 2011; Oliveira and Isaias 2010b; Isaias et al. 2011), which indicates a pattern of cell responses to such biotic stimuli. During the development of the gall on *B. dracunculifolia*, hyperplasia and hypertrophy are equally evidenced in the young stage, while the great hypertrophy predominates at maturation. While on non-galled organs, cell hypertrophy follows cell divisions (Obroucheva 2008), our results demonstrate that both cell division and expansion contribute to the determination of gall structure, similarly to the assumption of Meijer and Murray (2001). In addition to hyperplasia and hypertrophy, changes in cell elongation were observed in the cells of epidermis and cortex. Cytometric data clearly show that the patterns of cell expansion and elongation are modified during gall development, mainly in the inner cortex, and are determinant for the new shape assumed by the gall. These new cell developmental patterns are directly linked to the reorientation of cellulose microfibrils redirected by the microtubule cytoskeleton, as described by Baskin (2001) and Wasteneys (2004).

Microfibril orientation influences the isotropic or anisotropic patterns of cell expansion. Anisotropic cell expansion requires cellulose synthesis enough to achieve parallel microfibril ordering and microtubules aligning in the same direction as nascent microfibrils, (Wasteneys 2004) especially in rapidly elongating cells (Sugimoto et al. 2000). These redirections of microfibrils should occur in short periods of time since fast cell hypertrophy has been observed in several gall systems (Kraus et al. 1996; Isaias 1998; Souza et al. 2000; Oliveira et al. 2006; Moura et al. 2008, 2009; Oliveira and Isaias 2010b; Isaias et al. 2011). The alterations

Fig. 4 Histometric analysis (a, c, e, g, i) and diagrams (b, d, f, h, j) evidencing the patterns of cell expansion on non-galled leaves of *B. dracunculifolia* and on galls induced by *B. dracunculifoliae*. a, b Abaxial epidermis of non-galled leaves and gall outer epidermis. c, d Abaxial palisade and spongy parenchyma of non-galled leaves and gall outer cortex. e, f Ducts on non-galled leaves and galls. g, h Adaxial palisade parenchyma of non-galled leaves and gall inner cortex. i, j Adaxial epidermis of non-galled leaves and gall inner epidermis. L leaf, YG young gall, MG mature gall, SG senescent gall. Tukey's test was applied to the cell area measurements. Results followed by different letters differ statistically at 0.05 %



in the patterns of microfibrils deposition in cells of *B. dracunculifolia* elegantly indicate the formation of relatively short microfibrils, which directs the isodiametric expansion of cortical cells observed in the non-galled tissues and in senescent galls. Our results also demonstrated the anisotropic perpendicular organization of the elongated ones. This behavior corroborates Baskin's (2005) proposal that the direction of maximal expansion rate is generally perpendicular to the net orientation among microfibrils. This net reorientation requires the acidification of cell walls and the loosening of the cellulose microfibrils, which allow cell growth and the increase of reactive oxygen species (ROS) in the cell walls (Del Río and Puppo 2009; Swanson and Gilroy

2010). This proposal was reinforced by the histochemical detection of ROS in chlorophyllous parenchyma of gall cortices and in tissue layers next to the larval chamber (Oliveira et al. 2010, 2011a, b; Isaias et al. 2011).

The stimuli of *B. dracunculifoliae* within the host tissues of *B. dracunculifolia* result in the folding of the host leaf and the development of a morphologically simple gall morphotype. The distinct tissue layers are product of cell redifferentiation, with the reorientation of microfibrils in expected patterns either for isodiametric or axially elongated cells. We can conclude that the folding of the host leaves on *B. dracunculifolia* was defined mainly by the periclinal elongation of cells in all tissue layers from induction to

maturation and by the hypertrophy of the cells of the outer cortex and of the outer epidermis. The differentially expanded cells in each tissue layer together with the low number of cell layers in the inner cortex were determinant for the final shape of the gall.

The current investigation demonstrates the role of cellulose microfibril reorientation for gall development. As many factors, other than this reorientation, can act on gall development, it should be interesting to check the possible relationship of the new cell elongation patterns with the pectic composition of the cell walls. The dynamics of pectin in the cell wall has been proved to influence cell expansion (Willats et al. 2001). More, specifically, arabinans and galactans influence the rigidity of cell wall (Jones et al. 1997) and should be associated to the mechanical properties of cell wall for expansion (McCartney et al. 2000; McCartney and Knox 2002) as well as on its elasticity (McCartney et al. 2003). Nevertheless, Wolf and Greiner (2012) proposed that the variation of methyl esterification in homogalacturonans is associated to reduced cell wall extensibility and cessation of growth. Gall development, due to its repetitive and determined patterns, has been proved to be elegant models for helping in the elucidation of the dynamics of pectin domains in the mechanisms of cell growth and expansion (Formiga et al. 2013).

Acknowledgments The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (303352/2010-8, 307488/2009-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES, and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais—FAPEMIG (APQ-04105-10; APQ-01801-09) for scholarships and financial support

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interest in this manuscript.

References

- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2011) Plant cell walls. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York
- 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 Sci* 176:303–314
- Araújo AM, Fernandes GW, Bede LC (1995) Influência do Sexo e Fenologia de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) Sobre Insetos Herbívoros. *Rev Bras Entomol* 39:347–353
- Arduin M, Fernandes GW, Kraus JE (2005) Morphogenesis of gall induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Homoptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) leaves. *Braz J Biol* 65:559–571
- Baskin TI (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215:150–171
- Baskin TI (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:203–222
- Bukatsch F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61:255
- Cosgrove DJ (1998) Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol* 118:333–339
- Cosgrove DJ (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:391–417
- Del Río LA, Puppo A (2009) Reactive oxygen species in plant signaling. Springer, Berlin
- Espírito-Santo MM, Fernandes GW (2002) Host plant effects on the development and survivorship of the galling insect *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae). *Aust Ecol* 27:249–257
- Formiga AT, Oliveira DC, Ferreira BG, Magalhães TA, Castro AC, Fernandes GW, Isaias RMS (2013) The role of pectic composition of cell walls in the determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma* 250:899–908
- Herth W, Sghnef E (1980) The fluorochrome, Calcofluor White, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma* 105:129–133
- Isaias RMS (1998) Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica. PhD thesis. Department of Botany, Universidade de São Paulo
- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS (2011) Role of *Euphalerus ostreoides* (Homoptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* 89:581–592
- Isaias RMS, Carneiro RGS, Oliveira DC, Santos JC (2013) Annotated and illustrated checklist of Brazilian gall morphotypes. *Neotrop Entomol* 42:230–239
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York
- Jones L, Seymour GB, Knox JP (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1 → 4) β-D-galactan. *Plant Physiol* 113:1405–1412
- Kraus JE, Sugiura HC, Cutupri S (1996) Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *tuberculata* (Meliaceae). *Fitopatol Bras* 21:349–356
- Kraus JE, Arduin M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Seropédica
- Lara ACF, Fernandes GW (1994) Distribuição de Galhas de *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Rev Bras Biol* 54:661–668
- Lev-Yadun S (2003) Stem cells plants are differentiated too. *Curr Top Plant Biol* 4:93–100
- Mani MS (1964) Ecology of plant galls. Dr. W. Junk Publish, The Hague
- McCartney L, Knox JP (2002) Regulation of pectic polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa. *J Exp Bot* 53:707–713
- McCartney L, Ormerod AP, Gidley MJ, Knox JP (2000) Temporal and spatial regulation of pectic (1-4)-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons implications for mechanical properties. *Plant J* 22:105–113
- McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox JP (2003) Cell wall pectin (1-4)-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J* 33:447–454
- Meijer M, Murray JAH (2001) Cell cycle controls and the development of plant form. *Curr Opin Plant Biol* 4:44–49
- Meyer J, Maresquelle HJ (1983) Anatomie des galles. Gebrüder Borntraeger, Berlin
- Motulsky H (1992-2009) Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, GraphPad Software Inc.
- Moura MZD, Soares GLG, Isaias RMS (2008) Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf gallers in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Aust J Bot* 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). *Rev Bras Bot* 32:271–282
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. *Terrestrial Arthropods* Pty, Melbourne

- Obroucheva NV (2008) Cell elongation as an inseparable component of growth in terrestrial plants. *Russ J Develop Biol* 39:13–24
- Oliveira DC, Christiano JCS, Soares GLG, Isaias RMS (2006) Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawl. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev Bras Bot* 29:657–667
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010a) Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Sci* 178:350–358
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010b) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *S Afr J Bot* 76:239–248
- Oliveira DC, Magalhães TA, Carneiro RGS, Alvim MN, Isaias RMS (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma* 242:81–93
- Oliveira DC, Carneiro RGS, Magalhães TA, Isaias RMS (2011a) Cytological and histochemical gradients in two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)—Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma* 248:829–837
- Oliveira DC, Moreira ASFP, Magalhães TA, Lemos-Filho JP (2011b) Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis? *Plant Sci* 180:489–495
- 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 Bot Bras* 20:257–264
- Raman A (2011) Morphogenesis of insect-induced plant galls: facts and questions. *Flora* 206:517–533
- Ridley B, O'Neil MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929–967
- Rohfritsch O (1992) Patterns in gall development. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of Insect-Induced Galls*. Oxford University, Oxford, pp 60–86
- Rose JC (2003) *The plant cell wall*. Blackwell, Garsington Road, Oxford
- Souza SCPM, Kraus JE, Isaias RMS, Neves LJ (2000) Anatomical and ultrastructural aspects of leaf galls in *Ficus microcarpa* LF (Moraceae) induced by *Gynaikothrips ficorum* Marchal (Thysanoptera). *Acta Bot Bras* 14:57–69
- Sperber CZ, Collevatti RG (1996) The gall maker *Neopelma baccharidis* Burck. (Homoptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): success and parasitoidism density dependence. *An Soc Entomol Bras* 25:59–63
- Sugimoto K, Williamson RE, Wasteneys GO (2000) New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124:1493–1506
- Swanson S, Gilroy S (2010) ROS in plant development. *Physiol Plant* 138:384–392
- Wasteneys GO (2004) Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 7:651–660
- Willats WGT, McCartney L, Mackie L, Knox P (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47:9–27
- Wolf S, Greiner S (2012) Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249:169–175
- Zeiss C (2008) *Carl Zeiss Imaging Systems – 32 Software Release 4.7.2*. USA. Carl Zeiss MicroImaging Inc

CAPÍTULO II

Are the sites of reactive oxygen species production and programmed cell death related during the development of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) gall on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae)?

Manuscrito submetido (Magalhães et al. Botany)



Are the sites of reactive oxygen species production and programmed cell death related during the development of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) gall on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae)?

Journal:	<i>Botany</i>
Manuscript ID:	cjb-2014-0130
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	30-Jun-2014
Complete List of Authors:	Magalhães, Thiago; Federal University of Minas Gerais, Botany Oliveira, Denis; Federal University of Uberlândia, Institute of Biology Ferreira, Bruno; Universidade Federal de Minas Gerais, Botânica DaMata, Jarina; Federal University of Uberlândia, Institute of Biology Horta, Maria de Fátima; Federal University of Uberlândia, Institute of Biology Isaias, Rosy; Universidade Federal de Minas Gerais, Botânica
Keyword:	Cell redifferentiation, cell wall responses, cytology, PCD, TUNEL

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Are the sites of reactive oxygen species production and programmed cell death related**
4 **during the development of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) gall on *Baccharis***
5 ***dracunculifolia* (Asteraceae)?**
6
7
8
9

10
11 Thiago Alves Magalhães¹, Denis Coelho de Oliveira², Bruno Garcia Ferreira¹, Jarina Pena
12 DaMata³, Maria de Fátima Martins Horta³, Rosy Mary dos Santos Isaias^{1*}
13
14
15

16
17
18 ¹Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Biológicas,
19 Departamento de Botânica, Av. Antônio Carlos 6627, caixa postal 486, Pampulha, 31270-
20 901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
21
22
23

24
25
26 ²Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Instituto de Biologia (INBIO), Campus
27 Umuarama, 38400-902, P.O. Box: 593, Uberlândia, MG, Brasil.
28
29

30
31 ³Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Biológicas,
32 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Av. Antônio Carlos 6627, caixa postal 486,
33 Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
34
35
36
37

38
39
40
41 ***Author for correspondence:** Rosy Mary dos Santos Isaias (rosy@icb.ufmg.br). Phone:
42 +553134092687. Fax: +553134092671. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
43 Ciências Biológicas, Departamento de Botânica. Av. Antônio Carlos 6627, caixa postal 486,
44 Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Galls develop under the process of cell redifferentiation, in which neither new cellular nor metabolic processes are distinct from those occurring on the normal pathways of the host plant morphogenesis. Common events to normal morphogenesis such as generation of Reactive Oxygen Species (ROS) and Programmed Cell Death (PCD) may occur in similar or distinct sites and are determinant from induction until gall senescence. Current research deals with *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) – *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) system to check if the accumulation of ROS and events of PCD are concomitant or consecutive during gall development, especially in mature and senescent gall tissues. The hypothesis herein proposed is rejected for PCD and ROS did not strictly accumulate in similar sites of gall tissues. The PCD is not crucial for gall development but it is a consequence of the end of cell cycles during gall senescence. Due to the death of the companion cells and the collapse of the sieve tube elements, the nutrition of the gall tissues ceases, and, as a consequence, the chloroplasts, the membrane systems, and the cell walls also enter senescence process.

Keywords: Cell redifferentiation, cell wall responses, cytology, PCD, TUNEL

Introduction

Galling herbivores alter the morphogenetic patterns of the host plant organ (Mani 1964, Meyer and Maresquelle 1983, Rohfritsch and Anthony 1992, Oliveira and Isaias 2010a) in a process of cell redifferentiation (*sensu* Lev-Yadun 2003, Oliveira and Isaias 2010a, Vecchi et al. 2013). The redifferentiated cells and tissues have functions and characteristics distinct from those of the non-galled organs (Oliveira and Isaias 2010b), which reinforce the assumption that galls are true organs attached to the original host plant organ (Shorthouse et al. 2005, Ferreira and Isaias 2014). Among the most common processes involved in the gall formation, the cell hypertrophy and the tissue hyperplasia can be highlighted (Kraus et al. 1996, Isaias 1998, Souza et al. 2000, Oliveira et al. 2006, Oliveira and Isaias 2009, 2010a, Magalhães et al. 2014), but no new metabolic or cytological processes occur (Vecchi et al. 2013). Nevertheless, recurrent events such as Programmed Cell Death (PCD) in specific sites within gall tissues may occur. These PCD sites are crucial to sculpt the gall shape, by eliminating some cells, avoiding the hypersensitive responses (HR), and improving the health and quality of the remaining cells (Breusegem and Dat 2006). These authors presented a review on the events of ROS homeostasis and cell death in plants, highlighting the importance of ROS signaling during plant PCD. However, the relation between PCD and ROS production during gall development is yet to be addressed.

One of the causes of cell death may be the overproduction of reactive oxygen species (ROS) (Doke et al. 1996), as a possible plant response to pathogen attack or to mechanical injuries (Doke et al. 1996, Maffei et al. 2007, Bolwell and Daudi 2009, Torres 2010). In galls, ROS have been already histochemically detected by Oliveira and Isaias (2010b), Oliveira et al. (2010, 2011a), and Isaias et al. (2011). These authors indicated that ROS can trigger gall induction and development, and not simply induce cell death. PCD can be detected by

1
2
3 ultrastructural features such as the formation of large autophagic vacuoles containing the
4
5 organelles and chromatin condensation (Van Doorn et al. 2011). The cytological responses
6
7 can also include DNA fragmentation detected by The DeadEnd™ Fluorometric TUNEL assay
8
9 (Promega, DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Madison, WI, USA), and the presence
10
11 of arabinogalactan proteins (AGPs) in cell walls (Gao and Showalter 1999, Mastroberti and
12
13 Mariath 2008). The histochemical detection of the precise sites of ROS accumulation
14
15 associated with the sites of fragmented DNA may elucidate the functionality and regulation of
16
17 the PCD during insect-plant interactions. These associated analyses in gall tissues may set
18
19 light on the comprehension of defensive mechanisms of plants, the establishment of the gall
20
21 inducing organisms within plant tissues, and the steps of gall development, which are herein
22
23 addressed in *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) – *Baccharis dracunculifolia* DC
24
25 (Asteraceae) system. This is one of the best studied host plant-galling herbivore systems of
26
27 the Neotropical region, contemplating structural (Arduin et al. 2005, Magalhães et al. 2014),
28
29 immunocytochemical (Oliveira et al 2014), and ecological studies (Lara and Fernandes 1994,
30
31 Araújo et al. 1995, Sperber and Collevatti 1996, Espírito-Santo and Fernandes 2002).

32
33
34
35
36 The sites of accumulation of ROS are supposedly linked to the sites of PCD in this
37
38 gall, and should be crucial for the sculpturing of the kidney-shaped gall morphotype. To
39
40 validate this proposal, (i) the histochemical detection of sites of ROS accumulation, and (ii)
41
42 the detection of PCD by the TUNEL assay in non-galled and galled tissues were performed.
43
44 The evaluation of cytological alterations during gall formation complements these analyses.

45 46 47 48 49 **Material and Methods**

50 51 *Sampling and gall characterization*

52
53
54 Samples of non-galled leaves (NGL) of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) ($n \geq$
55
56 15) and galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) in distinct
57
58
59
60

1
2
3 developmental stages ($n \geq 15$) were collected at Serra do Cipó, between the kilometer 110-
4
5 112 of the MG 10 highway (19° 17'57 "S / 43 ° 35'58" W), Minas Gerais state, Brazil.
6

7 The galls were separated in young, mature and senescent stages (Magalhães et al.
8
9 2014). Young galls (YG) are discrete leaf intumescences, folded along the midrib and open
10
11 along the leaf margins, with one or few individuals of *B. dracunculifoliae* inside the chamber.
12
13 In mature galls (MG), the leaf margins touch each other. Senescent galls (SG) are empty and
14
15 totally open by the separation of the leaf margins.
16
17
18
19

20 *Histochemical detection of Reactive Oxygen Species (ROS)*

21

22 Hand-made sections of fresh material (NGL, YG, MG and SG) ($n = 5$) were incubated
23
24 in 0.5% 3,3'-diaminobenzidine (DAB - Sigma[®]), according to manufacturer instructions and
25
26 kept in the dark (Rosseti and Bonatti 2001). The intensity of the reaction was examined every
27
28 15 minutes in a light microscope.
29
30
31
32
33

34 *Evaluation of Programmed Cell Death (PCD)*

35

36 The kit used for the TUNEL assay (Promega, DeadEnd[™] Fluorometric TUNEL
37
38 System, Madison, WI, USA) detects nuclear DNA fragmentation. The protocol for *in situ*
39
40 labeling of PCD was performed according to the manufacturer with some alterations, herein
41
42 indicated. NGL, YG, MG and SG ($n = 5$) were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4.5%
43
44 formaldehyde in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.2) (Karnovsky 1965), embedded in
45
46 Paraplast[®], sectioned in a rotary microtome, deparafinized, post-fixed in 4% formalin, rinsed
47
48 with PBS buffer, and permeate with Proteinase K (2 µg/ml) for 15 minutes at 37°C. The
49
50 slides were incubated with Equilibration Buffer [potassium cacolidate (200 mM, pH 6.6),
51
52 Tris-HCl (25mM, pH 6.6), DTT (0.2mM), BSA (0,25 mg/ml) and cobalt chloride (2.5mM)]
53
54 for 10 minutes, then moved to a solution containing rTdT Enzyme and dUTP conjugated with
55
56
57
58
59
60

1
2
3 FITC (nucleotide mix) at 37°C in a dark moist chamber, in a CO₂ incubator, for 1 hour. The
4
5 reaction was stopped by incubating the slides in 2X SSC for 15 minutes, followed by PBS
6
7 washing. The sections were then counterstained with propidium iodide (PI), and washed with
8
9 deionized water to remove unincorporated PI. The plates were sealed and immediately
10
11 analyzed in a fluorescence microscope (Olympus BX51) coupled to a DP 70 camera
12
13 (Olympus).
14

15 16 17 18 *Cytological analyses*

19
20 Samples of NGL, YG, MG and SG (n = 5) were fixed in the solution of Karnovsky
21
22 (1965) for 24h, post-fixed in osmium tetroxide (1%) in 0.1M phosphate buffer for 2h.
23
24 (O'Brien and McCully 1981), dehydrated in ethanol series (Johansen 1940), and embedded in
25
26 Spurr[®] (Spurr 1969). The material was sectioned in a Reichert-Jung ultramicrotome -
27
28 Ultracut, contrasted in uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963), and analyzed on a
29
30 Transmission Electron Microscope (Zeiss EM 109).
31
32
33
34
35

36 **Results**

37 38 *General features of the galls*

39
40 *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) induces kidney-shaped galls (*sensu* Isaias
41
42 et al. 2013) on leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). These galls are green,
43
44 glabrous and completely closed at maturity; they reach up to 14-16mm in length, and usually
45
46 occur in the sub-apical portion of the host stem (Fig. 1).
47
48
49
50

51 52 *Detection of Reactive Oxygen Species (ROS)*

53
54 The accumulation of ROS is histochemically detected throughout the mesophyll of
55
56 NGL, with greater intensity in the palisade parenchyma (PP) (Fig. 2a). In the vascular bundles
57
58
59
60

1
2
3 of the leaf, there is accumulation of ROS in both xylem and phloem (Fig. 2b). In all stages of
4
5 the gall development, the higher intensity of histochemical reactions for ROS is observed in
6
7 the cells of the outer cortex, adjacent to the outer epidermis (Fig. 2c), inner cortex next to the
8
9 larval chamber (Fig. 2c-d), and more intense in xylem and weakly in phloem (Fig. 2e). The
10
11 senescent galls show the same patterns than the mature galls (Fig. 2f). The dark brown
12
13 histochemical detection of ROS accumulation in the galls is more intense in the cell walls of
14
15 the tissues layers adjacent of the nymphal chamber (Fig. 2c, f) when compared to the non-
16
17 galled tissues.
18
19

20 21 22 23 *Detection of Programmed Cell Death (PCD)*

24
25 The TUNEL assay allows the visualization of DNA single-strand breaks, where dUTP
26
27 conjugated with fluorescein is incorporated in these fragmentation regions. To visualize all
28
29 nuclei, with or without DNA fragmentation, the cells are counterstained with propidium
30
31 iodide.
32

33
34 In the mesophyll of NGL, the nuclei integrity is maintained, i.e., the green
35
36 fluorescence characteristic of the fragmented DNA when subjected to the TUNEL assay was
37
38 not detected (Fig. 3a-b). There is no sign of PCD in the transition from YG to MG (Fig. 3c-d),
39
40 but in the transition from MG to SG, TUNEL-positive apoptotic nuclei are detected
41
42 exclusively in phloem region (Fig. 3e-f), and spread all over gall tissues by the time of
43
44 senescence.
45
46
47
48

49 50 *Cytological features*

51
52 The NGL has a typical chlorophyllous parenchyma, with chloroplasts close to the cell
53
54 walls, mitochondria, large nuclei with non-condensed chromatin, and large electron dense
55
56 oleosomes (Fig. 4a). The cell walls and middle lamellae are intact and some chloroplasts
57
58
59
60

1
2
3 have starch grains. Electron-dense corpuscles may occur either free in the cytoplasm or
4
5 associated to chloroplasts (Fig. 4b). The stroma lamellae predominate over the granal lamellae
6
7 in the chloroplasts (Fig. 4c).
8

9
10 The parenchymatic cells of the YG have chloroplasts with plastoglobules associated to
11
12 the thylakoids, and many mitochondria (Fig. 4d). These cells have larger vacuoles when
13
14 compared to the cells of the NGL (Fig. 4e); the cell walls have lost their integrity and/or have
15
16 their matrix composition altered, and the middle lamella is thicker than in the NGL (Fig. 4d-
17
18 e). The nucleus is large with conspicuous nucleoli and the tissues are hyperplastic (Fig. 4f). In
19
20 MG, the major alterations are observed. The cells and vacuoles are hypertrophied (Fig. 5a),
21
22 the chloroplasts have granal and stromal lamellae with disorganized thylakoid, associated
23
24 starch grains (Fig. 5b), and many plastoglobules associated to disorganized thylakoid
25
26 membranes (Fig. 5c). The cell walls are thin (Fig. 5d), polylamellated, and have symptoms of
27
28 degradation in some parenchymatic cells. In SG, the degradation of the membrane systems
29
30 and organelles (Fig. 5 e-f), the collapse and increase in the sinuosity of the cell walls (Fig. 5
31
32 g-h), as well as the detachment of the plasma membrane (Fig. 5h) are observed.
33
34
35
36
37

38 **Discussion**

39
40 The anatomical structure of the kidney-shaped galls induced by *B. dracunculifoliae* on
41
42 *B. dracunculifolia* is simple, and was divided into four stages of development by Arduin et al.
43
44 (2005). The stages of folding, swelling, dehiscence and senescence previously proposed are
45
46 herein considered as young (YG), mature (MG), and senescent galls (SG), regrouping the
47
48 dehiscence and senescence (Magalhães et al. 2014). From the cytological point of view, there
49
50 are differences between these three phases, especially in the chloroplasts and cell wall
51
52 structure.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Cytological consequences of the accumulation of ROS*
4
5
6

7 The phloem cells are under the impact of the feeding apparatus of *Baccharopelma*
8 *dracunculifoliae*, which may be the cause of the oxidative stress as well as other cytological,
9 histochemical, and physiological alterations observed during gall development, and widely
10 reported in literature (Bayer 1992, Schönrogge et al. 2000, Oliveira et al. 2006, Oliveira and
11 Isaias 2010, Oliveira et al. 2011b). The loss of the integrity of the cell walls is a cytological
12 symptom of this oxidative stress evidenced by the histochemical detection of ROS
13 accumulation.
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 In galls induced by some sucking insects, *Euphalerus ostreoides* on *Lonchocarpus*
24 *muhelbergianus* (Isaias et al. 2011), and *Pseudophacopteron* sp. on *Aspidosperma australe*
25 (Oliveira and Isaias 2010b) for instance, the cytological features of the cells around the larval
26 chamber are very similar to those described by Bronner (1992) for the nutritive tissues of
27 galls induced by Cecidomyiidae. The formation of the cytological and histochemical gradients
28 in cells around the larval chamber is said to be triggered by the local high oxidative stress
29 (Oliveira and Isaias 2010b). In galls induced by *B. dracunculifoliae* on *B. dracunculifolia*,
30 ROS accumulation was particularly observed in the cell walls next to the nymphal chamber,
31 in the xylem, and in the cell layers of the outer cortex next to epidermis. The increase of ROS
32 accumulation in the cell walls may cause the loosening of the cellulose microfibrils, which
33 allows cell growth (Del Río and Puppo 2009, Swanson and Gilroy 2010). The cascade of
34 symptoms of oxidative stress continues with the cellulose microfibril reorientation observed
35 by Magalhães et al. (2014) in the same gall morphotype. The loosening and reorientation of
36 cellulose microfibrils allows cell growth, the hypertrophy on the cells of the outer cortex, and
37 the periclinal elongation of the cells of the inner cortex. The differential expansion of cells in
38 each gall tissue determines the kidney-shaped gall structure.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The ROS production due to the photosynthetic and respiratory activities in the
4 chlorophyllous parenchyma of NGL reflects the intrinsic metabolism of the host plant (Del
5 Rio and Puppo 2009, Heldt and Piechulla 2011). As well, in the cells of the gall inner cortex,
6
7 the higher accumulation of ROS has also been associated to the metabolism and structure of
8
9 the gall (Oliveira and Isaias 2010b, Oliveira et al. 2010, 2011a). The most conspicuous
10
11 cytological responses in the kidney-shaped gall of *B. dracunculifolia* occur during the
12
13 maturation stage which corresponds to the major trophic phase of the galling insect and
14
15 consequently to the higher metabolism of the gall (Rohfritsch 1992).
16
17
18
19

20
21 The oxidative stress affects not only the cell wall, but also chloroplast structure
22
23 observed mainly by the formation of plastoglobules in YG and MG. Zentgraf (2007)
24
25 considered the formation of these corpuscles as a symptom of legitimate cytological stresses.,
26
27 Oliveira et al. (2011b) was the first to associate the high oxidative stress with the formation of
28
29 plastoglobules in plastids in the cells of galls. The degradation of the plasmalemma and of the
30
31 membrane systems of the thylakoids should lead to cell death, with the interruption of gall
32
33 development. The formation of the plastoglobules imbalances these negative effects of the
34
35 oxidative burst for their antioxidant contents are involved in the regeneration of the thylakoid
36
37 membrane system (Lichtenthaler 1968, Hopkins et al. 2007), on top of eliminating ROS in the
38
39 chloroplasts (Asada 2006, Moller et al. 2007). The cytological responses of *B. dracunculifolia*
40
41 to *B. dracunculifoliae* seem to follow a pattern for insect galls, and corroborate the previous
42
43 observation on other Neotropical galls (Oliveira et al. 2010, 2011a).
44
45
46
47
48

49 *The TUNEL - reactive sites and the functionality of gall tissues*

50
51
52 PCD is an intrinsic cell response to plant metabolism which occurs during the
53
54 formation of various organs (Heldt and Piechulla 2011, Fahn 1990). One of the main
55
56
57
58
59
60

1
2
3 characteristics of PCD is DNA fragmentation, which was detected by TUNEL in the cells of
4
5 the phloem of the kidney-shaped gall during the transition from maturation to senescence.
6

7 The site and time of PCD occurrence in this gall coincides with the end of the feeding
8
9 activity of *B. dracunculifoliae*. The TUNEL-positive nuclei restrict to the phloem evidence
10
11 the death of the companion cells and the consequent collapse of the sieve tubes. The
12
13 association of companion cells and sieve tubes is namely vital for phloem functionality (Esau
14
15 1939), and protein contents, as studied by Fukuda et al. (2005) for rice plants. With no
16
17 nucleus, the transport of proteins in the companion cells-sieve elements system fails, the
18
19 proteins inside the sieve elements degrade, and the whole phloem transport at gall site ceases.
20
21

22 In YG and MG, arabinogalactan proteins (AGPs) were detected in the phloem of the galls of
23
24 *B. dracunculifolia* (Oliveira et al. 2014); which is another evidence of the avoidance of PCD
25
26 as proposed by Gao and Showalter (1999), and Mastroberti and Mariath (2008). Formiga et
27
28 al. (2013) immunocytochemically detected the AGPs exclusively in the cell walls of the
29
30 secretory ducts of a similar kidney-shaped gall morphotype induced on *Baccharis reticularia*,
31
32 and associated the AGPs location to the prevention of PCD, as well. The absence of AGPs in
33
34 the SG of *B. dracunculifolia* (Oliveira et al. 2014) strongly indicates the changing in
35
36 cytological conditions, which permits PCD events to occur, and reinforces the role of AGPs
37
38 in galls. Current analyses indicate that the time of cell death coincides with the end of the gall
39
40 cycle, also configuring that it is neither a cause of cell and tissue reorganization, nor a crucial
41
42 event for gall development, but a consequence of the gall developmental cycle.
43
44
45
46
47
48

49 *Conclusion*

50
51
52 Current analysis did not co-localize the sites of ROS accumulation and of PCD events.
53
54 DNA fragmentation was strictly related to the feeding sites of the insect in mature-senescent
55
56 gall transition. The accumulation of ROS was related to the photosynthetic metabolism in the
57
58
59
60

1
2
3 outer cortex, and to the stress generated by the insect in the cell layers next to the nymphal
4
5 chamber.
6

7 The hypothesis herein proposed is rejected for the events of PCD and ROS did not
8
9 strictly accumulate in similar sites along the four stages of development of the kidney-shaped
10
11 gall of *B. dracunculifoliae*. In terms of cell biology, these two events are crucial for the
12
13 establishment of the structure, but independent during cell cycles. The absence of PCD in
14
15 young and mature galls demonstrates that one of the cell responses to the feeding activity of
16
17 *Baccharopelma dracunculifoliae* is the blockage of PCD during gall establishment to avoid
18
19 hypersensitive responses. In *Baccharis dracunculifolia* – *Baccharopelma dracunculifoliae*
20
21 system, the detection of PCD in the transition from maturation to senescence coincides with
22
23 the end of the feeding activity of the insect. Due to the death of the companion cells and to the
24
25 collapse of the sieve tubes, the nutrition of overall tissues terminates. As the gall ends its
26
27 cycle, chloroplasts, membrane systems, and cell walls also enters senescence processes.
28
29
30
31
32
33

34 **Acknowledgments**

35
36 The authors thank FAPEMIG (APQ-01801-09, APQ-04105-10), CNPq and CAPES for
37
38 scholarships and financial support; the Laboratory of Electronic Microscopy of the
39
40 Universidade Federal de Lavras, Prof. Dr. Eduardo Alves and MSc. Eloisa A. G. Leite for
41
42 helping with TEM analyses.
43
44
45
46

47 **References**

48
49 Araújo, A.M., Fernandes, G.W., and Bede, L.C. 1995. Influência do sexo e fenologia de
50
51 *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) sobre insetos herbívoros. Rev. Bras. Entomol.
52
53 **39**: 347-353.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Arduin, M., Fernandes, G.W., and Kraus, J.E. 2005. Morphogenesis of galls induced by
4
5 *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia*
6
7 (Asteraceae) leaves. *Braz. J. Biol.* **65**: 559-571.
8
9
10 Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and
11
12 their functions. *Plant Physiol.* **14**: 391-396.
13
14 Bayer, M.H. 1992. Biochemical modification of the phenotype in cynipid galls. *In* *Plant*
15
16 *Galls: Organisms, Interactions, Populations.* Edited by M.C.J. Williams. Clarendon Press,
17
18 Oxford, pp. 429-446.
19
20
21 Bolwell, G.P., and Daudi, A. 2009. Reactive oxygen species in Plant-Pathogen Interaction. *In*:
22
23 *Reactive oxygen species in plant signaling.* Edited by L.A. Del Río and A. Puppo.
24
25 Springer, Berlin, pp. 113-134.
26
27
28 Breusegem, F., and Dat, J.F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.*
29
30 **141**: 384-390.
31
32
33 Bronner, R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. *In*
34
35 *Biology of insect induced galls.* Edited by J.D. Shorthouse and O. Rohfritsch. Oxford
36
37 University Press, New York, pp. 118-140.
38
39
40 Del Río, L.A., and Puppo, A. 2009. *Reactive oxygen species in plant signaling.* Springer,
41
42 Berlin.
43
44
45 Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L.M., Park, H.J., Noritake, T., Yoshioka, H., and Kawakita, K.
46
47 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as
48
49 an emergency signal for plant bio-defence – a review. *Gene* **179**: 45-50.
50
51
52 Esau, K. 1939. Development and structure of the phloem tissue. *Bot. Rev.* **5**(7): 373-432.
53
54
55 Espírito-Santo, M.M., and Fernandes, G.W. 2002. Host plant effects on the development and
56
57 survivorship of the galling insect *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae). *Aust.*
58
59 *Ecol.* **27**: 249–257.
60

- 1
2
3 Fahh, A. 1990. Plant Anatomy. Pergamon Press, Oxford.
- 4
5 Ferreira, B.G., and Isaias, R.M.S. 2014. Floral-like destiny induced by a galling
6
7 Cecidomyiidae on the axillary buds of *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Flora* 209(8):
8
9 *in press*.
- 10
11 Formiga, A.T., Oliveira, D.C., Ferreira, B.G., Magalhães, T.A., Castro, A.C., Fernandes,
12
13 G.W., and Isaias, R.M.S. 2013. The role of pectic composition of cell walls in the
14
15 determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia*
16
17 (Asteraceae). *Protoplasma* **250**: 899–908.
- 18
19 Fukuda, A., Fujimaki, S., Mori, T., Suzui, N., Ishiyama, K., Hayakawa, T., Yamaya, T.,
20
21 Fujiwara, T., Yoneyama, T., and Hayashi, H. 2005. Differential distribution of proteins
22
23 expressed in companion cells in the sieve element-companion cell complex of rice plants.
24
25 *Plant Cell Physiol.* **460**: 1779-1786.
- 26
27
28
29 Gao, M., and Showalter, A.M. 1999. Yariv reagent treatment induces programmed cell death
30
31 in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J.*
32
33 **19**: 321-331.
- 34
35
36 Heldt, H., and Piechulla, B. 2011. Plant Biochemistry. Academic Press, London.
- 37
38 Hopkins, M., McNamara, L., Taylor, C., Wang, T., and Thompson, J. 2007. Membrane
39
40 dynamics and regulation of subcellular changes during senescence. *In Annual Plant*
41
42 *Reviews Volume 26: Senescence processes in plants. Edited by S. Gan. Blackwell*
43
44 *Publishing Ltd., Oxford, pp. 39-68.*
- 45
46
47 Isaias, R.M.S. 1998. Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae):
48
49 anatomia e histoquímica. PhD Thesis, Dept. Botânica, Universidade de São Paulo, São
50
51 Paulo, Brazil.
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Isaias, R.M.S., Oliveira, D.C., and Carneiro, R.G.S. 2011. Role of *Euphalerus ostreoides*
4 (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus*
5 *muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* **89**: 581-592.
6
7
8
9 Isaias, R.M.S., Carneiro, R.G.S., Oliveira, D.C., and Santos, J.C. 2013. Illustrated and
10 annotated checklist of brazilian gall morphotypes. *Neotrop. Entomol.* **42**: 230-239.
11
12
13
14 Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
15
16
17 Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in
18 electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**: 137-138.
19
20
21 Kraus, J.E., Sugiura, H.C., and Cutupri, S. 1996. Morfologia e ontogenia em galhas
22 entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *Tuberculata*. *Fitopatol. Bras.* **21**: 349-356.
23
24
25 Lara, A.C.F., and Fernandes, G.W. 1994. Distribuição de Galhas de *Neopelma baccharidis*
26 (Homoptera: Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Rev. Bras. Biol.* **54**:
27 661-668.
28
29
30
31
32 Lev-Yadun, S. 2003. Stem cells plants are differentiated too. *Curr. Top. Plant Biol.* **4**: 93-100.
33
34
35 Lichtenthaler, H.K. 1968. Plastoglobuli and fine structure of plastids. *Endeavour* **27**:82-88.
36
37
38 Maffei, M.E., Mithifer, A., Boland, W. 2007. Before gene expression: early events in plant-
39 insect interaction. *Trends Plant Sci.* **12**: 1360-1385.
40
41
42 Magalhães, T.A., Oliveira, D.C., Suzuki, A.Y.M., and Isaias, R.M.S. 2014. Patterns of cell
43 elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma*
44 *dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Protoplasma*
45 doi 10.1007/s00709-013-0574-z
46
47
48
49
50 Mani, M.S. 1964. *Ecology of Plant Galls*. Dr. W. Junk Pub, The Hague.
51
52
53 Mastroberti, A.A., and Mariath, J.E.A. 2008. Immunocytochemistry of the mucilage cells of
54 *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). *Rev. Bras. Bot.* **31**: 1-13.
55
56
57
58
59
60 Meyer, J., and Maresquelle, H.J. 1983. *Anatomie des galles*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

- 1
2
3 Moller, I.M., Jensen, P.E., and Hanson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular
4 components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 459-481.
5
6
7 O'Brien, T.P., and McCully, M.E. 1981. The study of plant structure principles and selected
8 methods. Termarcarphi Pty, Melbourne.
9
10
11 Oliveira, D.C., and Isaias, R.M.S. 2009. Influence of leaflet age in anatomy and possible
12 adaptive values of midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Rev.*
13 *Biol. Trop.* **57**: 293-302.
14
15
16 Oliveira, D.C., and Isaias, R.M.S. 2010a. Redifferentiation of leaflet tissues during midrib
17 gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *S. Afr. J. Bot.* **76**: 239-248.
18
19
20 Oliveira, D.C., and Isaias, R.M.S. 2010b. Cytological and histochemical gradients induced by
21 a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Sci.*
22 **178**: 350-358.
23
24
25 Oliveira, D.C., Christiano, J.C.S., Soares, G.L.G., and Isaias, R.M.S. 2006. Reações de
26 defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação
27 do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev. Bras. Bot.* **29**: 657-
28 667.
29
30
31 Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Carneiro, R.G.S., Alvim, M.N., and Isaias, R.M.S. 2010. Do
32 Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established
33 cytological and histochemical patterns? *Protoplasma* **242**: 81-93.
34
35
36 Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S., Moreira, A.S.F.P., Magalhães, T.A., and Lemos-Filho, J.P.
37 2011b. Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf
38 photosynthesis? *Plant Sci.* **180**: 489-495.
39
40
41 Oliveira, D.C., Carneiro, R.G.S., Magalhães, T.A., and Isaias, R.M.S. 2011a. Cytological and
42 histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) - Cecidomyiidae
43 gall systems. *Protoplasma* **248**: 829-837.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Oliveira, D.C., Magalhães, T.A., Fernandes, G.W., Formiga, A.T., Teixeira, C.T., Ferreira,
4 B.G., and Isaias, R.M.S. 2014. Variation in the degree of pectin methylesterification during
5 the development of *Baccharis dracunculifolia* kidney-shaped gall. PlosOne **9**: e54988.
6
7
8
9
10 Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron
11 microscopy. J. Cell Biol. **17**: 208-212.
12
13
14 Rohfritsch, O. 1992. Patterns in Gall Development. *In* Biology of insect-induced galls. *Edited*
15 *by* J.D. Shorthouse and O. Rohfritsch. Oxford University Press, New York, pp. 157-170.
16
17
18 Rohfritsch, O., and Anthony, M. 1992. Strategies on gall induction by two groups of
19 homopterans. *In* Biology of insect induced galls. *Edited by* J.D. Shorthouse and O.
20 Rohfritsch. Oxford University Press, New York, pp. 102-117.
21
22
23
24 Rosseti S., and Bonatti, P.M. 2001. *In situ* histochemical monitoring of ozone-and TMV-
25 induced reactive oxygen species in tobacco leaves. Plant Physiol. Biochem. **39**: 433-442.
26
27
28
29 Schönrogge, K., Harper, L.J., and Lichtenstein, C.P. 2000. The protein content of tissue in
30 cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): similarities between cynipid galls and seeds.
31 Plant Cell Environ. **23**: 215-222.
32
33
34
35
36 Shorthouse, J.D., Wool, D., and Raman, A. Gall-inducing insects - Nature's most
37 sophisticated herbivores. Basic Appl. Ecol. **6**: 407-411.
38
39
40
41 Souza, S.C.P.M., Kraus, J.E., Isaias, R.M.S., and Neves, L.J. 2000. Anatomical and
42 ultrastructural aspects of leaf galls in *Ficus microcarpa* L. F. (Moraceae) induced by
43 *Gynaikothrips ficorum* Marchal (Thysanoptera). Acta Bot. Bras. **14**: 57-69.
44
45
46
47 Sperber, C.F., and Collevatti, R.G. 1996. The gall maker *Neopelma baccharidis* Burck.
48 (Homoptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): success and
49 parasitoidism density dependence. Nat. Soc. Entomol. Bras. **25**: 59-63.
50
51
52
53
54 Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.
55 J. Ultrastruct. Res. **26**: 31-43.
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Swanson, S., Gilroy, S. 2010. ROS in plant development. *Physiol. Plant.* **138**: 384-392.
4
5 Torres, M.A. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiol. Plant.* **138**(4): 414-429.
6
7 Van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura,
8 I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A.J., Petersen, M.,
9 Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E.,
10 Zhivotovsky, B., and Bozhkov, P.V. 2011. Morphological classification of plant cell
11 deaths. *Cell Death Differ.* **18**: 1241-1246.
12
13 Vecchi, C., Menezes, N.L., Oliveira, D.C., Ferreira, B.G., and Isaias, R.M.S. 2013. The
14 redifferentiation of nutritive cells in galls induced by Lepidoptera on *Tibouchina pulchra*
15 (Cham.) Cogn. reveals predefined patterns of plant development. *Protoplasma* **250**: 1363-
16 1368.
17
18 Zentgraf, U. 2007. Oxidative stress and leaf senescence. *In* *Senescence Processes in Plants.*
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Figure 1. Stem branch of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) with galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae). Arrow = mature galls.

Figure 2. Histochemical test for reactive oxygen species (ROS) demonstrated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in non-galled leaves of *Baccharis dracunculifolia* and galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. **a-b** – Non-galled leaf. a – accumulation of ROS in the palisade parenchyma (PP). b – detail of the vascular bundle, with accumulation of ROS in the phloem (PH) and xylem (XY). **c-e** – Mature gall. c – ROS is observed in the outer cortex (OC), next to the outer epidermis, in the inner cortex (IC) next to the larval chamber and in the vascular bundles. d – detail of the inner cortex, with accumulation of ROS in the plastids. e – detail of the vascular bundle, with accumulation of ROS in the xylem (XY). **f** – Senescent gall. IC – inner cortex, OC – outer cortex, SP – spongy parenchyma.

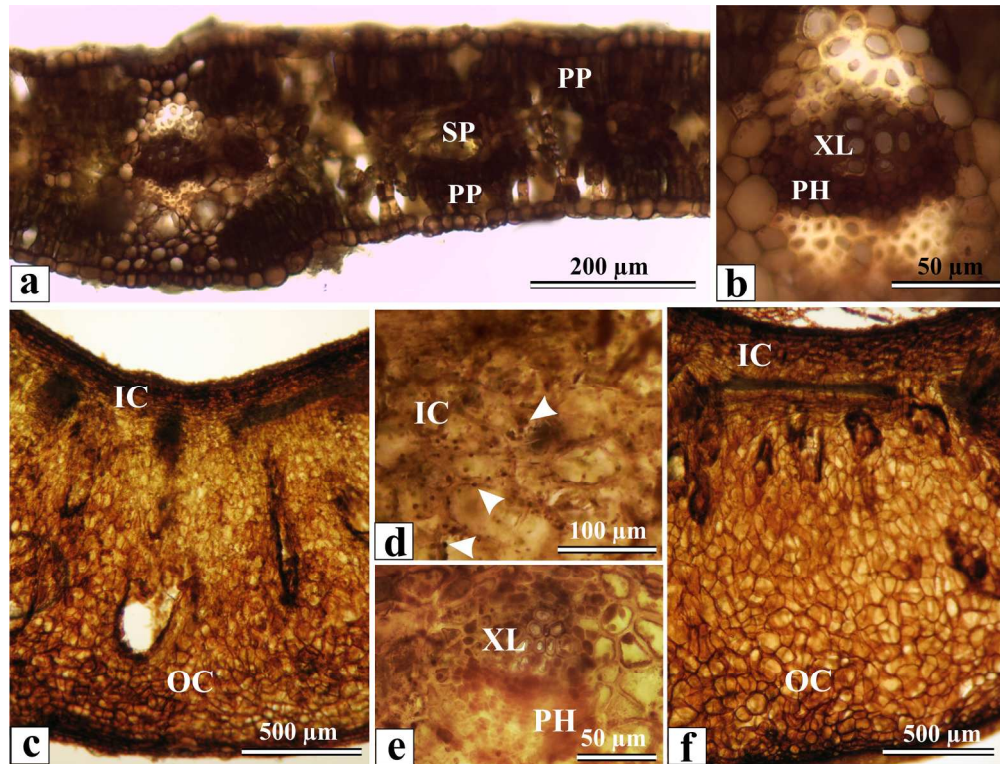
Figure 3. TUNEL assay for evaluation of programmed cell death (PCD) on non-galled leaves (NGL) of *Baccharis dracunculifolia* and galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. Red nuclei are not apoptotic. **a, b** – Non-galled leaf have non-apoptotic nuclei. **c, d** – Transition from young to mature gall with non-apoptotic nuclei. **e, f** – Transition from mature to senescent gall with apoptotic nuclei (green fluorescence). ApN = apoptotic nuclei, IC – inner cortex, NApN – non-apoptotic nuclei, OC – outer cortex, PP – palisade parenchyma, SP – spongy parenchyma, VB – vascular bundle.

Figure 4. Cytological aspects of parenchymatic cells of non-galled leaf of *Baccharis dracunculifolia* and of young galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. **a-c** Non-galled leaf (NGL), chlorophyllous parenchyma with cell wall and the middle lamella intact, many chloroplasts, mitochondria, large nuclei with non-condensed chromatin and large electron dense oleosomes (a), detail of starch grains and electron-dense corpuscles associated with the thylakoid membrane (b), the stroma lamellae predominant over the granal lamellae in the chloroplast (c). **d-f** Young galls, chloroplasts with plastoglobules associated and many mitochondria (d), large vacuoles, the cell walls have lost the integrity with middle lamella thicker than cells of NGL, large nuclei with conspicuous nucleoli. Cl = chloroplast, M = mitochondria, N = nuclei, Pl = plastoglobuli, S = starch, Vac = vacuole.

Figure 5. Cytological aspects of parenchymatic cells of mature and senescent galls of *Baccharis dracunculifolia* induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. **a-d** Mature gall, hypertrophied cells and hypertrophied vacuole (a), chloroplast have granal and stromal lamellae with disorganized thylakoid membranes (c), cell walls are thin. **e-h** Senescent gall, there are degradation of organelles (e, f), collapsed and sinuous cell walls (g) and detachment of the plasma membrane (h). AVac = autophagic vacuole, Cit = cytoplasm, Cl = chloroplast, CW = cell wall, Pl = plastoglobules, S = starch, Vac = vacuole.

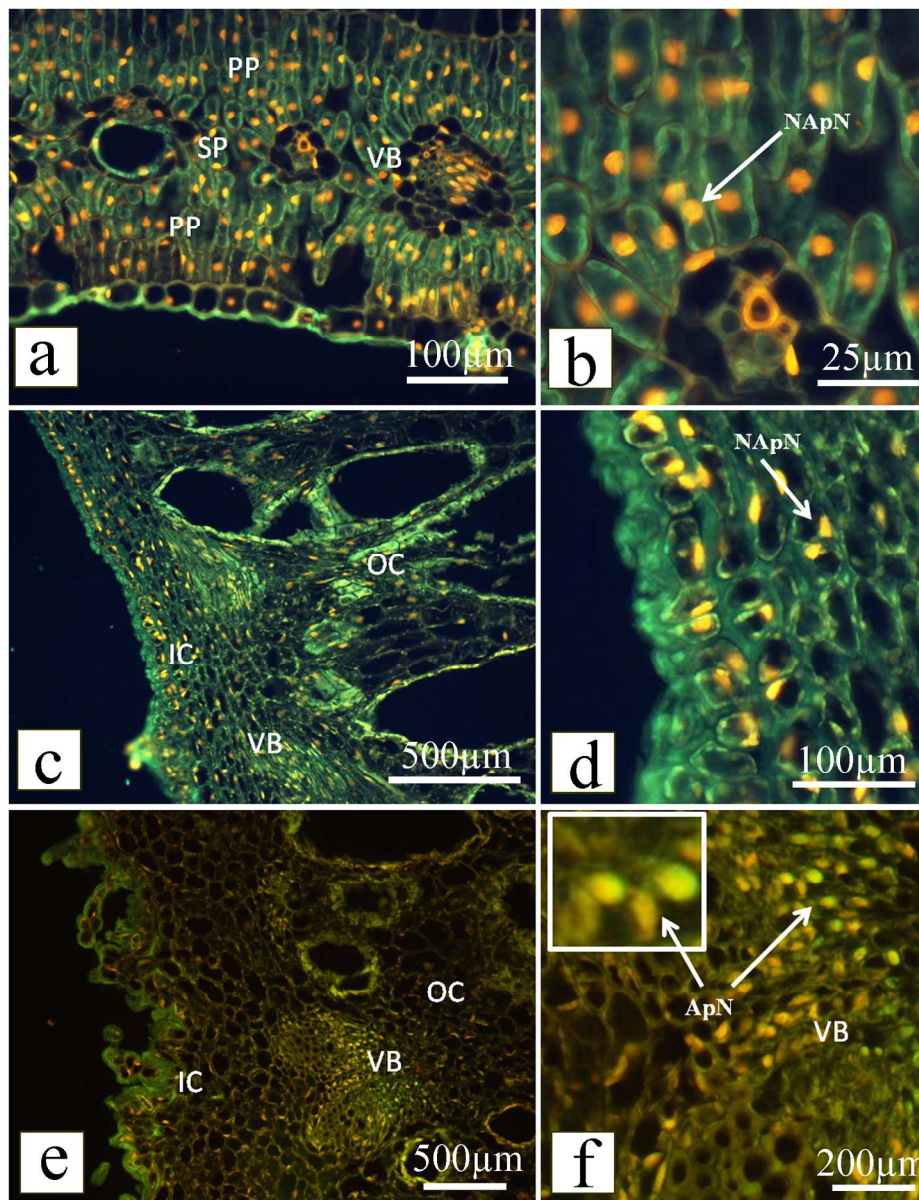


40 Stem branch of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) with galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*
41 (*Psyllidae*). Arrow = mature galls.
42 99x99mm (300 x 300 DPI)
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

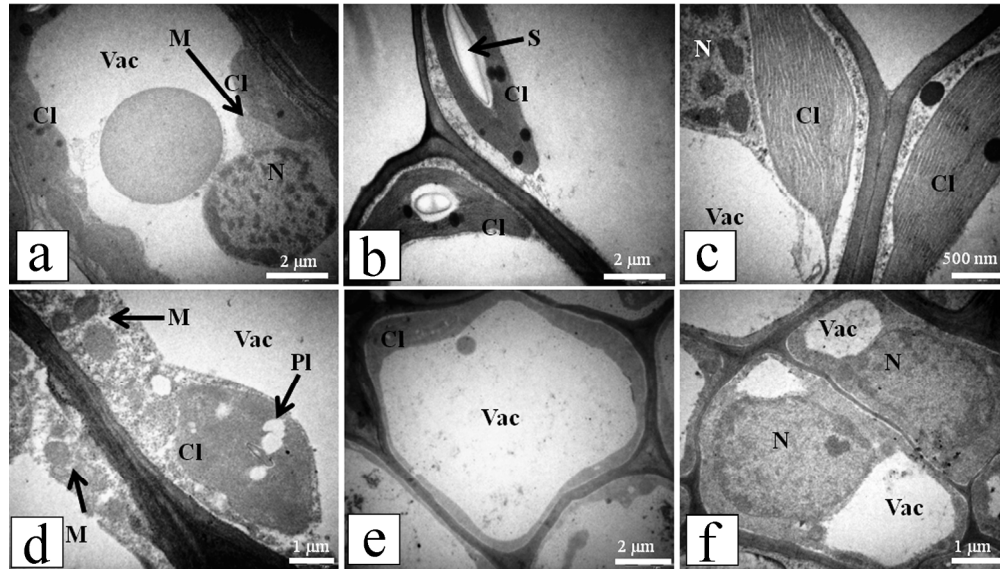


Histochemical test for reactive oxygen species (ROS) demonstrated with 3-3'diaminobenzidine (DAB) in non-galled leaves of *Baccharis dracunculifolia* and galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. a-b – Non-galled leaf. a – accumulation of ROS in the palisade parenchyma (PP). b – detail of the vascular bundle, with accumulation of ROS in the phloem (PH) and xylem (XY) c-e – Mature gall. c – ROS is observed in the outer cortex (OC), next to the outer epidermis, in the inner cortex (IC) next to the larval chamber and in the vascular bundles. d – detail of the inner cortex, with accumulation of ROS in the plastids. e – detail of the vascular bundle, with accumulation of ROS in the xylem (XY). f – Senescent gall. IC – inner cortex, OC – outer cortex, SP – spongy parenchyma.

199x151mm (300 x 300 DPI)

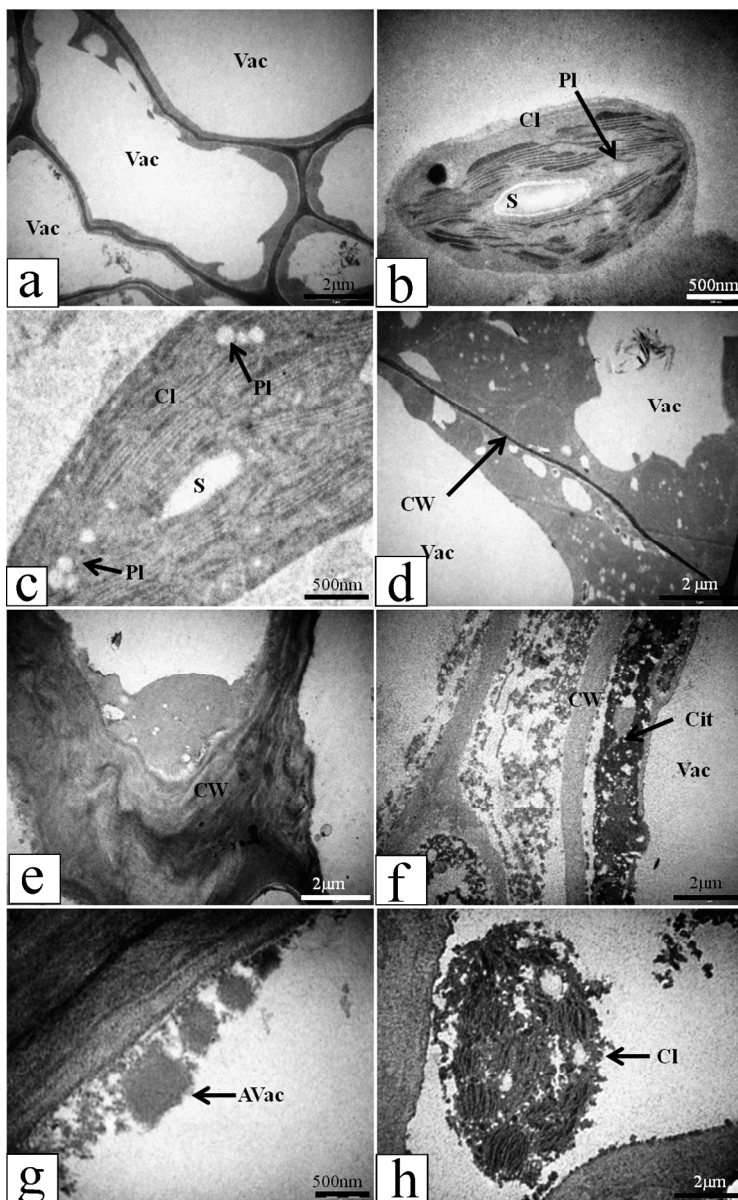


TUNEL assay for evaluation of programmed cell death (PCD) on non-galled leaves (NGL) of *Baccharis dracunculifolia* and galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. Red nuclei are not apoptotic. a, b – Non-galled leaf have non-apoptotic nuclei. c, d – Transition from young to mature gall with non-apoptotic nuclei. e, f – Transition from mature to senescent gall with apoptotic nuclei (green fluorescence). ApN = apoptotic nuclei, IC – inner cortex, NApN – non-apoptotic nuclei, OC – outer cortex, PP – palisade parenchyma, SP – spongy parenchyma, VB – vascular bundle.
150x194mm (300 x 300 DPI)



Cytological aspects of parenchymatic cells of non-galled leaf of *Baccharis dracunculifolia* and of young galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. a-c Non-galled leaf (NGL), chlorophyllous parenchyma with cell wall and the middle lamella intact, many chloroplasts, mitochondria, large nuclei with non-condensed chromatin and large electron dense oleosomes (a), detail of starch grains and electron-dense corpuscles associated with the thylakoid membrane (b), the stroma lamellae predominant over the granal lamellae in the chloroplast (c). d-f Young galls, chloroplasts with plastoglobules associated and many mitochondria (d), large vacuoles, the cell walls have lost the integrity with middle lamella thicker than cells of NGL, large nuclei with conspicuous nucleoli. Cl = chloroplast, M = mitochondria, N = nuclei, Pl = plastoglobuli, S = starch, Vac = vacuole.

199x113mm (300 x 300 DPI)



Cytological aspects of parenchymatic cells of mature and senescent galls of *Baccharis dracunculifolia* induced by *Baccharopelma dracunculifoliae*. a-d Mature gall, hypertrophied cells and hypertrophied vacuole (a), chloroplast have granal and stromal lamellae with disorganized thylakoid membranes (c), cell walls are thin. e-h Senescent gall, there are degradation of organelles (e, f), collapsed and sinuous cell walls (g) and detachment of the plasma membrane (h). AVac = autophagic vacuole, Cit = cytoplasm, Cl = chloroplast, CW = cell wall, Pl = plastoglobules, S = starch. 150x242mm (300 x 300 DPI)

CAPÍTULO III

Varição na estrutura péctica da parede celular durante o desenvolvimento da galha induzida por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae)

Resumo

Durante o desenvolvimento das galhas ocorrem alterações anatômicas e na estrutura da parede celular. A composição pécica da parede influencia a forma celular, a adesão intercelular, a expansão celular, a porosidade da parede, entre outras características. Em galhas as fases de desenvolvimento são bem características, sendo assim, compreender a estrutura pécica da parede celular é importante para o entendimento do processo de desenvolvimento e determinação de sua forma final. Neste estudo foi usado o sistema *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae) - *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) para testar se a composição pécica da parede celular nos tecido da galha varia de acordo com o desenvolvimento da galha e quais as implicações destas variações. Para responder essa questão a composição pécica da parede celular no folíolo e na galha em suas fases de desenvolvimento foi comparada utilizando técnicas de imunocitoquímica. A galha apresenta variação na composição pécica da parede celular. Foi observado que a dinâmica das pectinas afeta a flexibilidade, rigidez e elasticidade da parede celular.

Palavras-chave: Arabinogalctanos, desenvolvimento de galhas, pectinas.

Introdução

Estudos anatômicos e de desenvolvimento de galhas nas últimas décadas têm focado no impacto gerado pelo galhador nos tecidos da planta hospedeira, principalmente em relação à hipertrofia celular e hiperplasia dos tecidos, além de análise dos destinos celulares que levam a formação de tecidos típicos e com funções características deste novo órgão, a galha (Kraus et al. 1996, Isaias 1998, Souza et al. 2000, Shorthouse et al. 2005, Oliveira et al. 2006, Oliveira & Isaias 2009, 2010b). Recentemente Oliveira & Isaias (2010a), Oliveira et al. (2010) e Isaias et al. (2011) avaliaram o efeito do estresse e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) no protoplasto e na parede celular nos tecidos da galha. Segundo Magalhães et al. (2013), o acúmulo de ERO e o estresse gerado nas células podem provocar alterações na orientação das microfibrilas de celulose o que seria determinante para gerar a forma da galha.

Além das alterações na matriz celulósica, alterações na composição pectínica e proteica da parede celular foram detectadas por Formiga et al. (2013) em galhas maduras induzidas em *Baccharis reticularia*. Estas alterações na distribuição dos epítopos estariam relacionadas à funcionalidade dos tecidos da galha. Além da influência nas funções, a composição da parede pode ser determinante para gerar a forma das células (Rose 2003, Albersheim et al. 2011, Wolf & Greiner 2012) refletindo diretamente na estrutura da parede, na sinalização celular, na capacidade de adesão e expansão das células, na porosidade e rigidez da parede, na defesa contra patógenos, dentre outras características (Ridley et al. 2001, Willats et al. 2001, Rose 2003, Albersheim et al. 2011).

As pectinas constituem uma classe funcional e estruturalmente diversa de polissacarídeos que podem ser classificados em três domínios principais: os homogalacturonanos (HGAs), os ramnogalacturonanos I (RG-I), e os ramnogalacturonanos II (RG-II) (Ridley et al. 2001, Pérez et al. 2003, Albersheim et al. 2011). Os RG-I são formas alternativas de HGAs e apresentam muitas cadeias laterais com arabinose e resíduos de galactose e os RG-II são estruturalmente mais complexos e menos abundantes na matriz da parede celular. A variação na metil-esterificação destas pectinas altera as propriedades funcionais da parede, especialmente durante o crescimento e desenvolvimento dos tecidos (Knox 1997, Wolf & Greiner 2012). Nas galhas, a variação no grau de metil-esterificação pode ser um reflexo do estresse gerado nos tecidos que determina a atividade das metil-esterases pécticas. A composição da parede celular vegetal também conta com arabinogalactanos (AGPs) (Pennel et al. 1989), proteínas estruturais solúveis e altamente glicolisadas (Showalter 1993). Os AGPs têm consistência mucilaginosa e estão envolvidos nos processos de adesão celular (Cosgrove 1997), crescimento, nutrição, desenvolvimento vegetal, proliferação celular (Pennel & Roberts 1990, Majewska-Sawka & Nothnagel 2000) e controle de morte celular programada (Gao & Showalter 1999, Mastroberti & Mariath 2008)

Tendo em vista seu desenvolvimento constante e repetitivo na natureza, as galhas configuram-se como excelentes microlaboratórios para estudos de anatomia vegetal por apresentarem desenvolvimento controlado por um indutor, na maioria das vezes, insetos. Neste estudo, o sistema *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae) - *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) foi usado para testar se a composição péctica e proteica da parede celular nos tecidos varia ao longo do desenvolvimento da galha e quais as implicações destas variações. *Pseudobombax grandiflorum* é uma espécie arbórea decídua comum em áreas de afloramento rochoso. Apresenta uma galha foliolar

intralaminar abundante, que é induzida por um gênero novo e uma espécie nova de Eriococcidae, *Eriogallococcus isaias* Hodgson & Magalhães (Hodgson et al. 2011).

Material e Métodos

Amostragem e análises anatômicas

Amostras de folíolos de *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae) e galhas induzidas por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em diferentes fases de desenvolvimento foram coletadas em uma população localizada nos afloramentos acima da Gruta da Lapinha (19°33'67" S; 043°57'54" W), Parque Estadual do Sumidouro, Município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil. A galha jovem se caracteriza pela suave projeção dos tecidos foliares ao redor do corpo da ninfa e crescimento de uma projeção para a face adaxial. Na fase madura, o crescimento da galha estabiliza e esta assume a forma aciculada. A fase de senescência caracteriza-se pela saída do inseto macho e pela liberação das ninfas quando ocorre o rompimento do abdômen das fêmeas, cessando o estímulo.

Para análises histológicas, o material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940) e incluído em Paraplast[®] (Kraus & Arduin 1997). Cortes transversais dos folíolos (n = 5) e galhas (n = 5) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica[®] 2035 BIOCUT). Os cortes foram corados com a mistura de azul de Astra-safranina 8:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%) e montadas em verniz vitral incolor Acrilex[®] (Paiva et al. 2006).

Análises de imunocitoquímica

Amostras de folíolos (n = 5) e galhas (n = 5) em diferentes fases de desenvolvimento foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 (Roland & Vian 1991), desidratadas em etanol (50, 60, 70, 90, 95 e 100%) e infiltradas em historesina Leica[®]. Seções (5µm) obtidas em micrótomo foram incubadas com anticorpos monoclonais JIM5, JIM7, LM2, LM5 e LM6 (Centre for Plant Science, University of Leeds, UK) para avaliar a composição pécica e proteica (Tabela 1). As lâminas foram incubadas em solução de leite/PBS para evitar ligações cruzadas, seguida de incubação com anticorpo primário (diluição 1:10 em proteína de leite/PBS) por 2 horas, lavagem em PBS e incubação com anticorpo secundário FITC Goat anti-rat (Sigma) (diluição 1:100 em proteína de leite/PBS) por 2 horas e posterior lavagem em PBS. As lâminas foram montadas em glicerina (50%) e mantidas no escuro. Para controle negativo, o anticorpo primário foi suprimido. Os testes foram realizados em duplicatas para confirmação dos resultados. As imagens foram obtidas em Microscópio Confocal Zeiss 510META no Centro de Processamento de Imagens da UFMG (CAPI – UFMG).

Tabela 1. Descrição e reconhecimento dos anticorpos monoclonais.

Anticorpos monoclonais	Epitopo	Referências
JIM 5	HGA (metil-esterificação até 40%)	Clausen et al. (2003)
JIM 7	HGA (metil-esterificação entre 15 – 80 %)	Clausen et al. (2003)
LM2	AGP	Yates et al. 1996; Smallwood et al. 1996
LM 5	(1→ 4) β-D-galactano (RGI)	Jones et al. (1997)
LM 6	(1 → 5) α-L-arabinano (RGI)	Willats et al. (1998)

Resultados

Características gerais dos folíolos e das galhas

O folíolo é verde, glabro, tem em média 20-30 cm de comprimento e 10-20 cm de largura (figura 1a). As galhas são intralaminares, verdes e glabras (figura 1a-b), com o ostíolo voltado para a superfície abaxial e uma câmara ninfal alongada contendo apenas um indutor.

O folíolo apresenta na nervura mediana, um feixe vascular principal em forma de arco aberto, arranjo colateral, xilema abundante e fibras associadas ao floema (figura 2a). A epiderme é unisseriada, o mesofilo dorsiventral com parênquima paliçádico (2-3 camadas de células) e parênquima lacunoso (6-8 camadas de células) (figura 2b). A galha jovem, tem uma pequena projeção voltada para a face adaxial (figura 2c), córtex parenquimático, epiderme unisseriada e a câmara larval com um formato ovoide (figura 2d). Na galha madura (figura 2e), observa-se a epiderme unisseriada e o córtex parenquimático, com feixes vasculares desorganizados, dividido em córtex interno, mediano e externo (clorofiliano) (figura 2f).

Imunocitoquímica de pectinas e proteínas

As pectinas e os AGPs foram detectados nos folíolos não galhados e nas galhas com variações observadas nas fases de desenvolvimento, na localização e na intensidade da marcação (Tabela 2).

Epitopos de HGAs com baixa metil-esterificação marcados com anticorpo JIM5 foram detectados nos folíolos com marcação moderada no parênquima (figura 3a) e fraca no feixe vascular (figura 3b). Na galha jovem, este anticorpo, JIM5, apresentou marcação forte no parênquima (figura 3c) e fraca no feixe vascular (figura 3d); na galha

madura (figura 3e) e na senescente (figura 3f) observou-se marcação fraca no parênquima. HGAs com alta metil-esterificação, marcados com o anticorpo JIM7, foram observados com marcação moderada no parênquima (figura 3g) e fraca no feixe vascular nos folíolos não galhados (figura 3h). Na galha jovem, marcação forte foi observada no parênquima (figura 3i), fraca no parênquima da galha madura (figura 3j). Na galha senescente marcação moderada foi observada no feixe vascular (figura 3k). AGPs, marcados pelo anticorpo LM2, apresentaram marcação muito fraca no feixe vascular dos folíolos não galhados (figura 3l), no parênquima da galha jovem (figura 3m), no parênquima da galha madura (figura 3n) e no feixe vascular da galha senescente (figura 3o).

Epitopos de galactanos, marcados com o anticorpo LM5, apresentaram marcação forte na epiderme, parênquima (figura 4a) e feixe vascular (figura 4b) do folíolo não galhado. Na galha jovem, marcação moderada foi observada no parênquima (figura 4c); na galha madura foi observada marcação fraca na epiderme e parênquima (figura 4d); na galha senescente marcação fraca foi observada no parênquima (figura 4e) e no feixe vascular (figura 4f). Epitopos de arabinanos, marcados com o anticorpo LM6, apresentaram marcação fraca na epiderme, parênquima (figura 4g) e feixe vascular (figura 4h) do folíolo não galhado. Na galha senescente, o anticorpo LM6 apresentou marcação fraca na epiderme e no parênquima (figura 4i).

Tabela 2. Marcação com anticorpos monoclonais para pectinas em folhas não galhadas e galhas (jovem, madura e senescente) de *Eriogallococcus isaias* em *Pseudobombax grandiflorum*.

Anticorpo monoclonal*	Tecidos	Epiderme	Parênquima	Feixe Vascular
JIM5	Folha não galhada	-	++	+
	Galha jovem	-	+++	+
	Galha madura	-	+	-
	Galha senescente	-	+	-
JIM7	Folha não galhada	-	++	+
	Galha jovem	-	+++	-
	Galha madura	-	+	-
	Galha senescente	-	-	++
LM2	Folha não galhada	-	-	+
	Galha jovem	-	+	-
	Galha madura	-	+	-
	Galha senescente	-	-	+
LM5	Folha não galhada	+++	+++	+++
	Galha jovem	-	++	-
	Galha madura	++	+	-
	Galha senescente	-	+	+
LM6	Folha não galha	+	+	+
	Galha jovem	-	-	-
	Galha madura	-	-	-
	Galha senescente	+	+	-

*O numero de sinais indica a intensidade da reação: (-) ausente, (+) fraca, (++) moderada, (+++) alta.

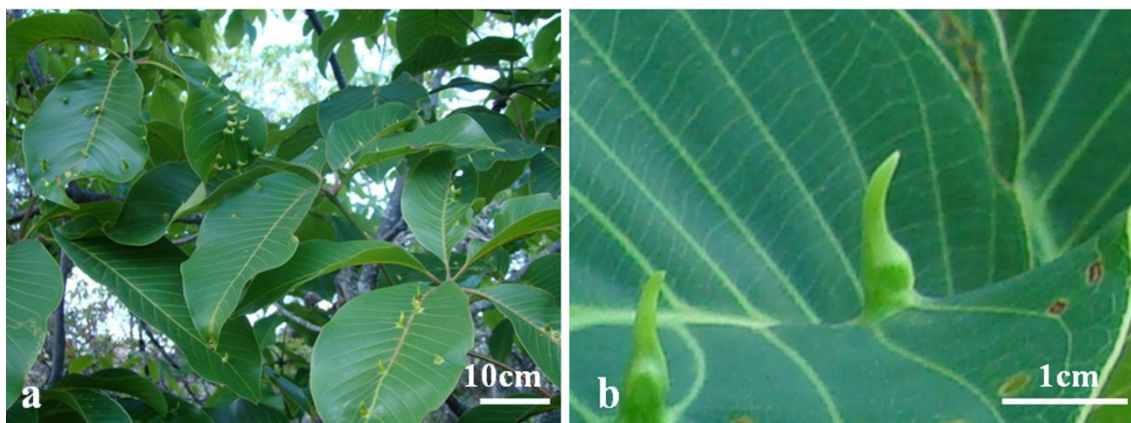


Figura 1. Foliolos galhados e galhas maduras induzida por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). **a** – Aspecto geral de folha com galhas. **b** – Detalhe de galhas maduras evidenciando a projeção acicular para face adaxial.

Figura 2. Diagramas e secções transversais do folíolo não galhado e galhas jovem e madura induzidas por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). **a** – Diagrama do folíolo. **b** – Secção transversal do folíolo mostrando a organização do mesofilo. **c** – Diagrama da galha jovem. **d** – Secção transversal evidenciando epiderme, córtex parenquimático com ductos secretores e feixe vascular. **e** – Diagrama da galha madura. **f** – Secção transversal evidenciando epiderme, córtices interno parenquimático, mediano com esclerênquima e feixes vasculares e externo com ductos secretores em meio as células parenquimáticas. ce = córtex externo; ci = córtex interno; cn = câmara ninfal; cm = córtex mediano; pc = córtex parenquimático; pl = parênquima lacunoso; pp = parênquima paliçádico.

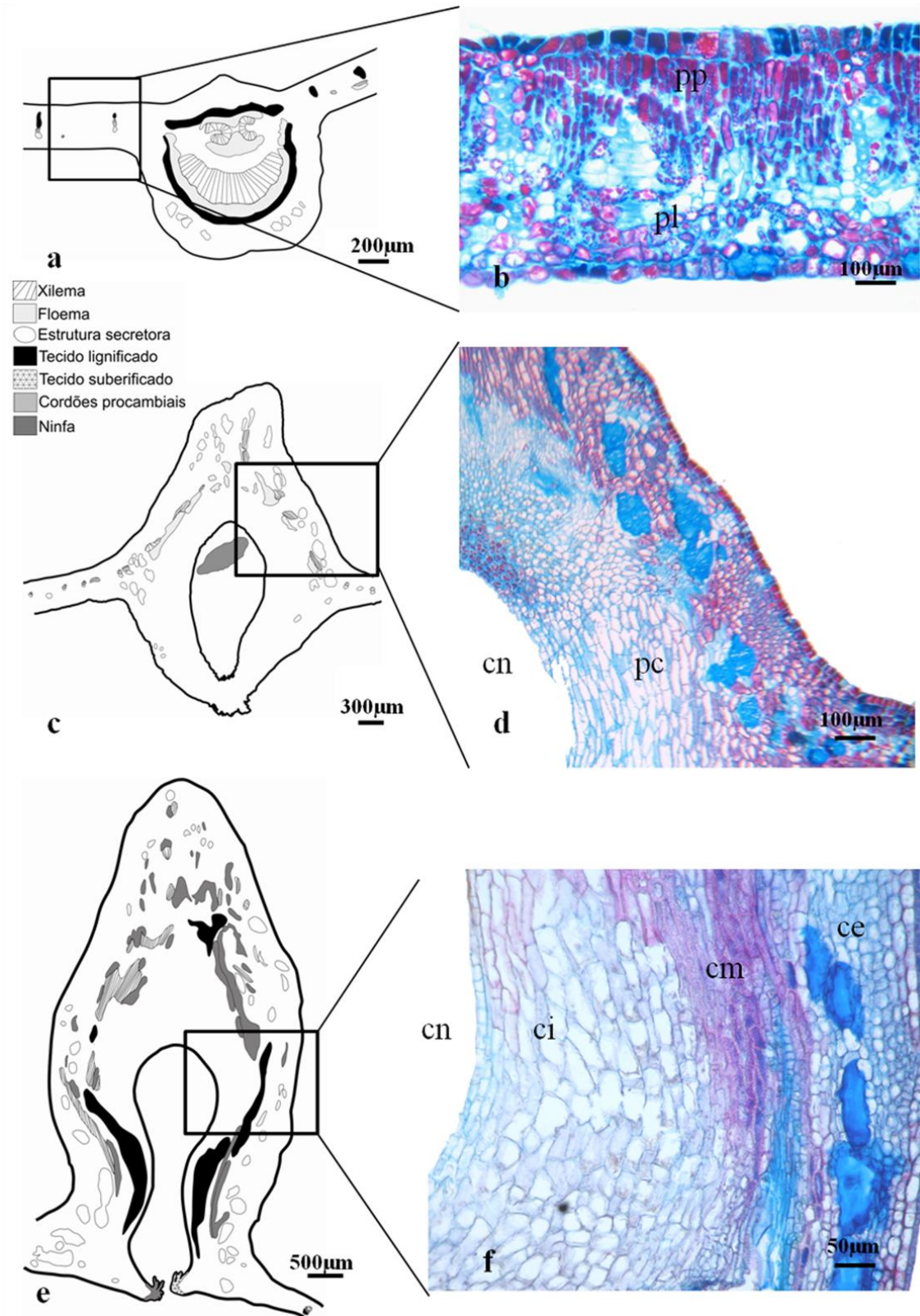
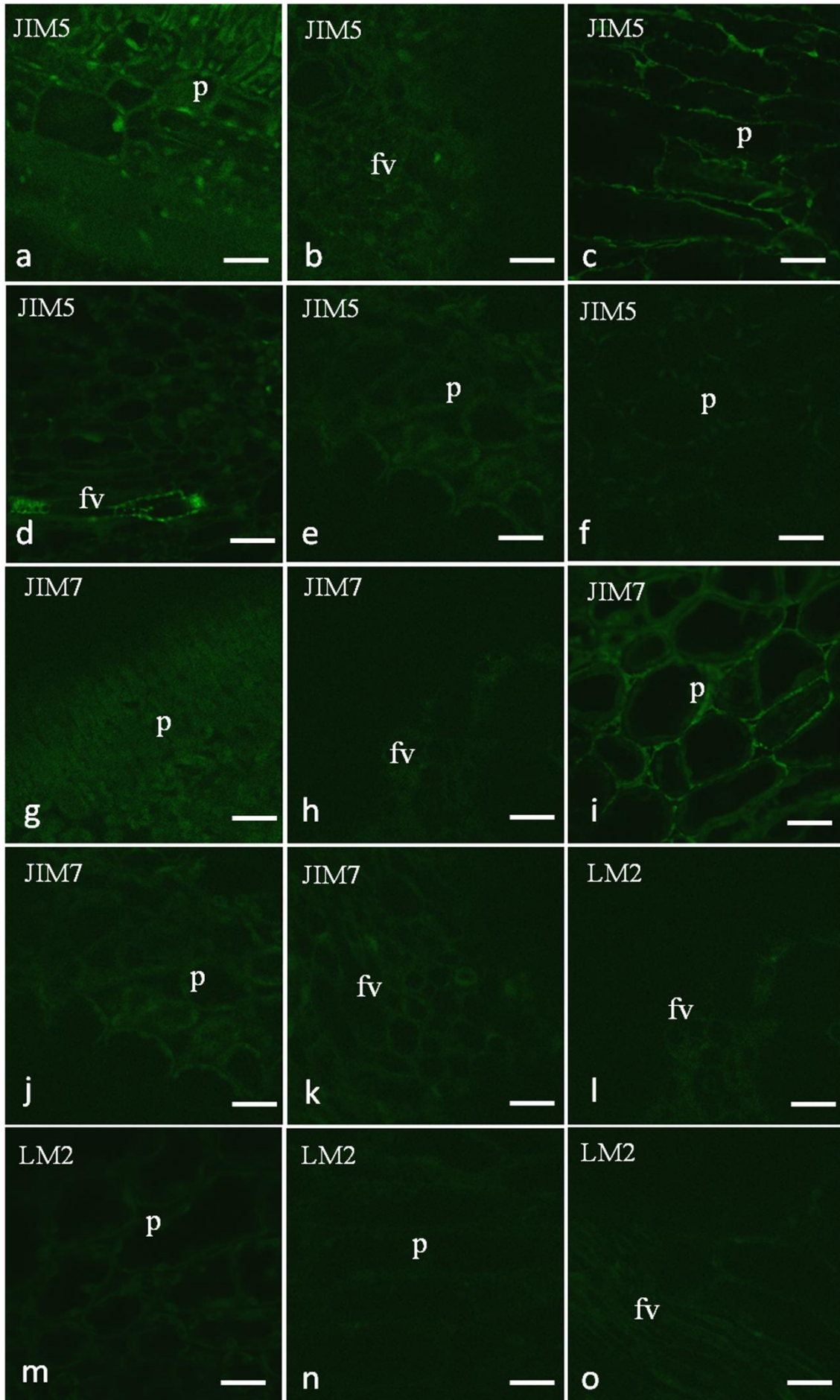


Figura 3. Secções transversais de folíolo não galhado e galhas jovem, madura e senescente induzidas por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae) incubados com os anticorpos monoclonais JIM5, JIM7 e LM2. **a, b, g, h, l** – Folíolo não galhado. **c, d, i, m** – Galha jovem. **e, j, n** – Galha madura. **f, k, o** – Galha senescente. **a** – Marcação moderada no parênquima. **b** – Marcação fraca no feixe vascular. **c** – Marcação forte no parênquima. **d** – Marcação fraca no feixe vascular, com uma célula marcada forte. **e** – Marcação fraca no parênquima. **f** - Marcação fraca no parênquima. **g** – Marcação moderada no parênquima. **h** – Marcação fraca no feixe vascular. **i-j** – Marcação forte no parênquima. **k** – Marcação moderada no feixe vascular. **l** – Marcação fraca no feixe vascular. **m-n** – Marcação fraca no parênquima. **o** – Marcação fraca no feixe vascular. fv = feixe vascular, p = parênquima. Barras = 20µm.



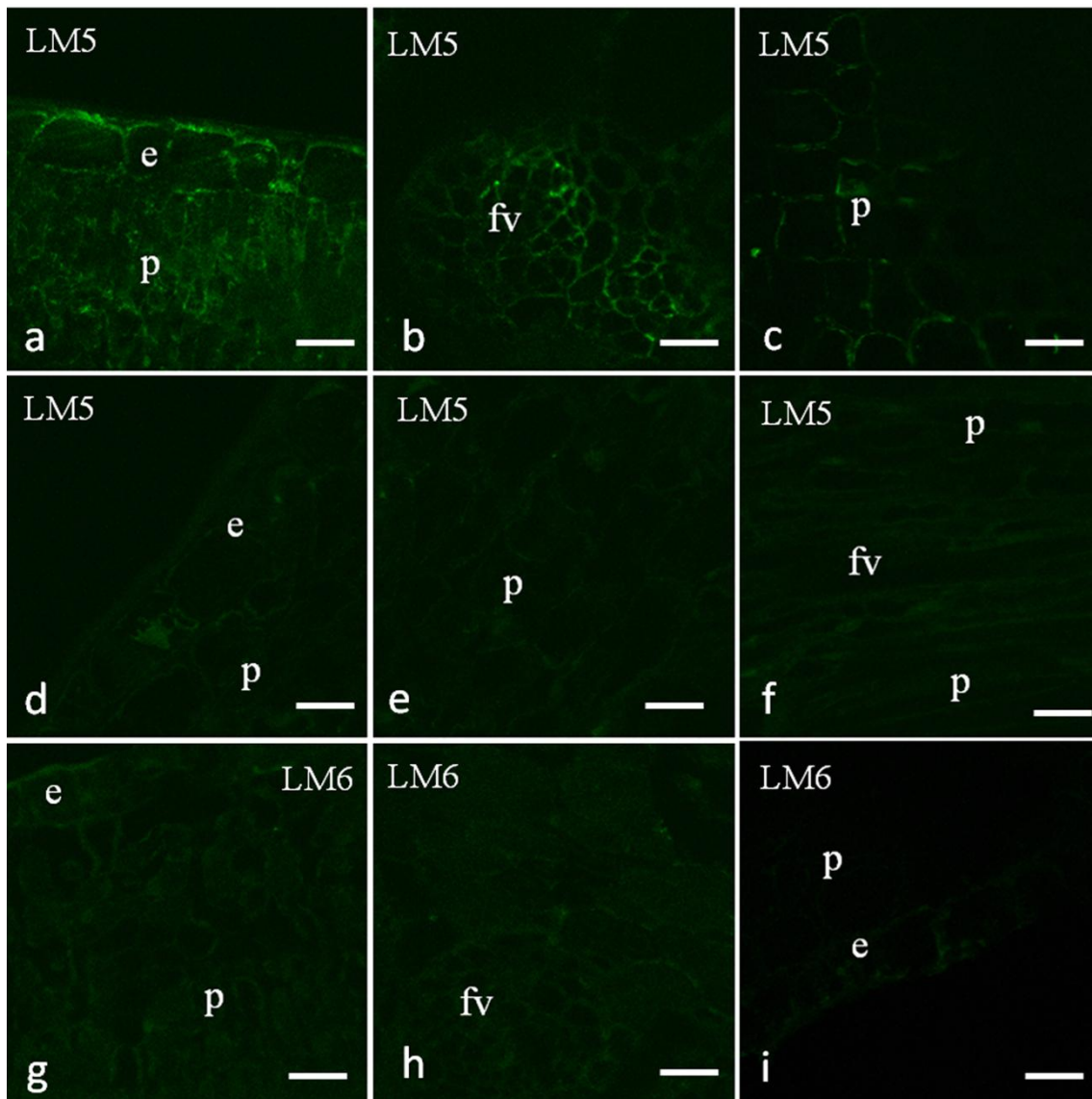


Figura 4. Secções transversais de folíolo não galhado e galhas jovem, madura e senescente induzidas por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae) incubados com os anticorpos monoclonais LM5 e LM6. **a, b, g, h** – Folíolo não galhado. **c** – Galha jovem. **d, e** – Galha madura. **e, i** – Galha senescente. **a** – Marcação forte na epiderme e no parênquima. **b** – Marcação forte no feixe vascular. **c** – Marcação moderada no parênquima. **d** - Marcação fraca na epiderme e parênquima. **e** – Marcação fraca no parênquima. **f** – Marcação fraca no feixe vascular. **g** – Marcação fraca na epiderme e parênquima. **h** – Marcação fraca no feixe vascular. **i** – Marcação fraca na epiderme e no parênquima. e = epiderme, fv = feixe vascular, p = parênquima. Barras = 20µm.

Discussão

A galha, induzida por *Eriogallococcus isaias* em *Pseudobombax grandiflorum*, apresentou variação na composição pécica da parede celular durante seu desenvolvimento quando comparada com os tecidos do folíolo não galhado para os epitopos analisados. Merecem destaque as diferenças encontradas na distribuição dos HGAs, pectinas mais abundantes na parede, que influenciam a rigidez da parede (Jones et al. 1997), propriedades mecânicas da expansão celular (McCartney et al. 2000, McCartney & Knox 2002), elasticidade (McCartney et al. 2003) e regulação da extensibilidade (Wolf & Greiner 2012) por variações no grau de metil-esterificação (Knox 1997).

Os HGAs de alto grau de metil-esterificação foram detectados nas galhas jovens, maduras e senescentes em diferentes graus. Esta diferença de intensidade de marcação nos mesmos tecidos em galhas de estágios de desenvolvimento diferentes reflete o dinamismo da estrutura da galha. Na parede celular de uma mesma célula, microdomínios pécticos com alto e baixo grau de metil-esterificação podem ser observados (Willats et al. 2001). Formiga et al. (2013), estudando dinâmica de pectinas e proteínas em galhas maduras em *Baccharis reticularia*, observaram que os HGAs de alta e baixa metil-esterificação ocorreram na maioria dos tecidos simultaneamente. Essa observação reforça o balanço de extensibilidade e rigidez da parede durante o desenvolvimento celular. A presença de HGAs com alto grau de metil-esterificação no parênquima das galhas jovem e madura mantém a estabilidade mecânica da parede celular, conforme proposto por Albersheim et al. (2011). Esta estabilidade aliada à formação do esclerênquima no córtex mediano confere o valor adaptativo da galha para proteção contra inimigos naturais nas fases em que o galhador está jovem e vulnerável.

No parênquima da galha senescente, os HGAs de alto grau de metil-esterificação estão ausentes, o galhador abandonou a câmara, denotando a desestruturação da galha, fim do estímulo do galhador e não localização dos epitopos, além da perda do investimento em defesa mecânica.

Os HGAs geralmente são sintetizados em uma forma altamente metil-esterificada (Micheli 2001) e mudanças no grau de esterificação alteram propriedades funcionais da parede, principalmente durante o crescimento e desenvolvimento dos tecidos (Knox 1997). A mudança no grau de metil-esterificação das pectinas pode ocorrer pela ação de pectinas metil-esterases (PME) (Lord & Mollet 2002) ou poligalacturonases (PG) (Willats et al. 2000). Na de-metil-esterificação resíduos de ácido galacturônico podem interagir com íons de cálcio causando rigidez da parede celular (Jiang et al. 2005). Como os HGAs afetam a estabilidade e rigidez da parede, o balanço entre HGAs de alto e baixo grau de metil-esterificação e a atividade da PME e da PG vão alterar a rigidez da parede e afetar a adesão celular. Este balanço é crucial pois permite que a lâmina foliar seja alterada e assumida, no caso da galha de *E. isaias* em *P. grandiflorum*, as expansões e a projeção aciculada, gerando o morfotipo peculiar que categoriza este sistema. Os sítios de marcações fracas destes epitopos nos tecidos da galha madura e senescente podem indicar aumento do estresse oxidativo em virtude do metabolismo celular intrínseco (Del Río & Pupo 2009), no caso das camadas celulares externas, ou da atividade do inseto (Oliveira & Isaias 2010 a, Oliveira et al. 2010), no caso das camadas internas.

Formiga et al. (2013) propuseram a relação entre o decréscimo no grau de metil-esterificação e as respostas celulares ao estresse oxidativo gerado na galha. Tal proposta foi corroborada no sistema em estudo, no qual foi evidenciado o acúmulo de espécies reativas de oxigênio nos tecidos das galhas (Magalhães 2014, capítulo 4). O estresse

oxidativo causa acidificação e altera a extensibilidade (Cosgrove 2005) e a ultraestrutura da parede (Bestwick et al. 1997, Oliveira et al. 2010). A ocorrência de pectinas com baixo grau de metil-esterificação nas paredes das células parenquimáticas das galhas jovem e madura podem ser relacionadas à hipertrofia celular, como observado por Sala et al. (2013) em embriões somáticos da *Arabidopsis thaliana*. A alteração em questão permite que a parede celular responda ao carregamento do vacúolo gerando a hipertrofia, um dos sintomas-padrão reportado em diversas galhas de insetos (Souza et al. 2000, Oliveira & Isaias 2010b, Magalhães et al. 2013). A marcação fraca ou ausência de epitopos de HGAs com baixa metil-esterificação nos tecidos vasculares das galhas e marcação fraca no parênquima das galhas madura e senescente confirma a afirmação de Wolf & Greiner (2012). Neste caso, a morfogênese das galhas assemelha-se àquela dos demais órgãos vegetais, nos quais tanto a redução da extensibilidade da parede quanto à interrupção do crescimento ocorre primeiro nas células vasculares e em seguida nos outros tecidos vegetais. A redução de HGAs de baixo grau de metil-esterificação nas galhas madura e senescente pode ser um fator que diminui a extensibilidade da parede, principalmente quando a rigidez da parede é aumentada pelo influxo de cálcio na célula (Jiang et al. 2005, Maffei et al. 2007) que pode ocorrer pela ligação de HGAs com baixo grau de metil-esterificação ao Ca^{2+} (Albersheim et al. 2011).

Além dos HGAs, os AGPs podem afetar a expansão celular (Willats et al. 2001) e geralmente, estão presentes em tecidos meristemáticos e em desenvolvimento (Herman & Lamb 1992, Albersheim et al. 2011, Formiga et al. 2013). Entretanto, alguns trabalhos (Gao & Showalter 1999, Letarte et al. 2006, Mastroberti & Mariath 2008) relacionam a presença de AGPs nos tecidos ao controle da morte celular programada (MCP), podendo evitar assim reações de hipersensibilidade (HR). No

sistema estudado, à presença de AGPs ainda que pouca, no parênquima das galhas jovem e madura pode ser interpretada como um indício de controle da MCP. A não observação de AGPs nas galhas senescentes, coincide com as evidências de MCP (Magalhães 2014, capítulo 4).

Epitopos de (1→4) β-D-galactanos e (1 → 5) α-L-arabinanos foram observados na epiderme, parênquima e feixe vascular dos folíolos. Nas galhas jovem, madura e senescente induzidas por *E. isaias*, a ocorrência de galactanos e arabinanos foi independente. Galactanos e arabinanos podem ocorrer na parede celular como polissacarídeos independentes ou associados como arabinogalactanos I (O'Donoghue & Sutherland 2012). Como observado por Formiga et al. (2013) para galhas de *B. reticularia*, no sistema *P. grandiflorum* – *E. isaias*, a independência temporal e espacial dos sítios de ocorrência de galactanos e arabinanos pode ser explicada pela estabilidade mecânica da parede celular que a associação entre HGA e galactanos proporciona (McCartney et al. 2000, McCartney & Knox 2002). Os arabinanos, por sua vez, estão associados à flexibilidade da parede (Jones et al. 1997, McCartney et al. 2000, McCartney & Knox 2002) e sua ausência nas galhas jovem e madura deixa as paredes celulares mais rígidas.

Considerações finais

O balanço entre alto e baixo grau de metil-esterificação, que é controlado pela ação das PME's, pode influenciar na adesão celular e na determinação da forma da galha. Este balanço seria reflexo do estresse oxidativo gerado nos tecidos. A alteração nos padrões de distribuição dos arabinanos e galactanos e a associação de galactanos com HGA pode aumentar a estabilidade mecânica da parede celular. A ausência de arabinanos na galha senescente, por sua vez, pode aumentar a rigidez da parede. Os

AGPs mesmo em baixa quantidade no tecido podem evitar a HR devido ao seu potencial para controlar a MCP. A análise da composição das paredes celulares em tecidos não galhados e galhados do sistema *P. grandiflorum* - *E. isaias* mostrou que a dinâmica das pectinas e proteínas pode afetar a estrutura da parede e que as variações observadas podem influenciar características importantes para o desenvolvimento levando alterações como a rigidez, a flexibilidade e a estabilidade mecânica da parede celular.

Referências bibliográficas

Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2011) Plant cell walls. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York.

Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Cell 9:209-221.

Bukatsch F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos 61:255.

Clausen MH, Willats WGT, Knox JP (2003) Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of antihomogalacturonan monoclonal antibodies LM5, JIM5 and JIM7. Carbohydr Res 338:1797-1800.

Cosgrove DJ (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants, Annu Rev Cell Dev Biol 13: 71-201.

Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. Nat Rev Mol Cell Biol 6:850-861.

Del Río LA, Puppo A (2009) Reactive oxygen species in plant signaling. Springer.

- Formiga AT, Oliveira DC, Ferreira BG, Magalhães TA, Castro AC, Fernandes GW, Isaias RMS (2013) The role of pectic composition of cell walls in the determination of the new shape-functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma* 250:899–908.
- Gao M, Showalter AM (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J* 19:21-331.
- Herman EM, Lamb CJ (1992) Arabinogalactanrich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiol* 98:264-272.
- Hodgson C, Magalhães TA, Miller D (2011) Two new gall-inducing genera and species of Eriococcidae (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) off Malvaceae from the neotropics. *Lundiana* 10:53-72.
- Isaias RMS (1998) Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS (2011) Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* 89:581-592.
- Jiang L, Yang SL, Xie LF, Pua CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D (2005) VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell* 17:584–596.
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- Jones L, Seymour GB, Knox JP (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4) β-D-galactan. *Plant Physiol* 113:1405-1412.

- Knox JP (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology* 171:79-120.
- Kraus JE, Sugiura HC, Cutupri S (1996) Morfologia e ontogenia em galhas entomógenas de *Guarea macrophylla* subsp. *tuberculata*. *Fitopatol Bras* 21:349-356.
- Kraus JE, Arduin M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Seropédica.
- Letarte J, Simion E, Miner M, Kasha KJ (2006) Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep* 24:691–698.
- Lord EM, Mollet JC (2002) Plant cell adhesion: a bioassay facilitates discovery of the first pectin biosynthetic gene. *PNAS* 99:15843-15845.
- Maffei ME, Mithifer A, Boland W (2007) Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci.*12:1360-1385.
- Magalhães TA, Oliveira DC, Suzuki AYM, Isaias RMS (2013) Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-013-0574-z
- Majewska-Sawka A, Nothnagel EA (2000) The multiple roles of arabinogalactan protein in plant development. *Plant Physiol* 122:3-9.
- Mastroberti AA, Mariath JEA (2008) Developmental of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma* 232:233-245.
- McCartney L, Ormerod AP, Gidley MJ, Knox JP (2000) Temporal and spatial regulation of pectic (1-4) - D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons implications for mechanical properties. *Plant J* 22:105-113.

- McCartney L, Knox JP (2002) Regulation of pectic polysaccharide domains in relation to cell development and cell properties in the pea testa. *Journal of Experimental Botany* 53:707-713.
- McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox JP (2003) Cell wall pectin (1-4)-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J* 33:447-454.
- Micheli F (2001) Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6:414–419.
- O’ Donoghue EM, Sutherland PW (2012) Cell wall polysaccharide distribution in *Sandersonia aurantiaca* flowers using immunodetection. *Protoplasma* 249:843-849
- Oliveira DC, Christiano JCS, Soares GLG, Isaias RMS (2006) Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). *Rev Bras Bot* 29:657-667.
- Oliveira DC, Isaias RMS (2009) Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *Rev Biol Trop* 57:293-302.
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010a) Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). *Plant Sci* 178:350-358.
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010b) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *S Afr J Bot* 76:239-248.
- Oliveira DC, Magalhães TA, Carneiro RGS, Alvim MN, Isaias RMS (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? *Protoplasma* 242:81-93.

- 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 Bot Bras* 20:257–264.
- Pennel RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR, Roberts K (1989) A Family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *J Cell Biol* 108:1967-1977.
- Pennel RI, Roberts K (1990) Sexual developmental in pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature* 344:547-549.
- Pérez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T (2003) A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85:109-121.
- Ridley B, O'Neil MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967.
- Roland JC, Vian B (1991) General preparation and staining of thin sections. In: Hall JL, Hawes E (eds), *Electron Microscopy of Plant Cells*. Academic Press, London: 2-26.
- Rose JC (2003) The plant cell wall. Blackwell Publishing, Garsington Road, Oxford.
- Sala K, Potocka I, Kurczynska E (2013) Spatio-temporal distribution and methylesterification of pectic epitopes provide evidence of development regulation of pectins during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant*. DOI: 10.1007/s10535-013-0304-6
- Shorthouse JD, Wool D, Raman A (2005) Gall-inducing insects – Nature's most sophisticated herbivores. *Basic Appl Ecol* 6:407-411.
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9-23.

- Smallwood M, Yates EA, Willats WGT, Martin H, Knox JP (1996) Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* 198:452-459.
- Souza SCPM, Kraus JE, Isaias RMS, Neves LJ (2000) Anatomical and ultrastructural aspects of leaf galls in *Ficus microcarpa* L. F. (Moraceae) induced by *Gynaikothrips ficorum* Marchal (Thysanoptera). *Acta Bot Bras* 14:57-69.
- Willats WGA, Marcus SE, Knox JP (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1-5)- α -L-arabinan. *Carboh Res* 308:149-152.
- Willats WGA, Limberg G, Buchholt HC, VanAlebeeck GJ, Benen J, Christensen TMIE, Visser J, Voragen A, Mikkelsen JD, Knox JP (2000) Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defines oligossaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohyd Res* 327:309-320.
- Willats WGA, McCartney L, Mackie L, Knox P (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47:9-27.
- Wolf S, Greiner S (2012) Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249:169-175.
- Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6:131-139.

CAPÍTULO IV

Impacto citológico decorrente do alto estresse oxidativo causado pelo desenvolvimento da galha de *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae)

Resumo

O desenvolvimento em galhas induzidas por insetos leva a formação de morfotipos espécie-específico através da rediferenciação celular dos tecidos da planta hospedeira. Hipertrofia, hiperplasia e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) são importantes na determinação da forma final da galha. Acreditamos que o aumento no estresse causado pela atividade alimentar do galhador provoque alterações no sistema de membranas das células, e que o excesso de ERO pode levar as células a morte celular programada (MCP). Como modelo de estudo foi escolhido o sistema *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae) - *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae). Para avaliar nossa proposta foram feitas: (1) análises citológicas, (2) histoquímica para detecção do acúmulo de ERO nos tecidos, (3) detecção de MCP utilizando o ensaio de TUNEL, na folha e na galha em suas fases de desenvolvimento. O acúmulo de ERO causa alterações na estrutura e organização do sistema de membrana nas células, notado principalmente nos cloroplastos. O estresse oxidativo ainda pode provocar alterações na estrutura da parede celular. Estas alterações levam ao afrouxamento das microfibrilas e consequente hipertrofia das células. A MCP ocorre somente na fase de senescência indicando fim do estímulo e controle do galhador sobre o tecido da planta hospedeira. A ausência da MCP nas fases jovem e madura da galha pode ter relação com a presença de arabinogalactanos (AGPs) na parede celular.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, morte celular programada, parede celular.

Introdução

A interação entre plantas e insetos que leva a formação de galhas gera morfotipos espécie-específicos (Isaias et al. 2013). Estas galhas apresentam tecidos típicos, organizados, com características e funções distintas (Mani 1964, Raman 2007, Oliveira & Isaias 2010a), formados por rediferenciação celular (*sensu* Lev Yadun 2003) a partir dos tecidos da planta hospedeira (Oliveira & Isaias 2010b, Dias et al. 2013, Ferreira & Isaias 2013, Vecchi et al. 2013). Durante o desenvolvimento das galhas, ocorrem alterações anatômicas, citológicas e histoquímicas nos tecidos deste novo órgão (Oliveira et al. 2006, Moura et al. 2008, Oliveira & Isaias 2010 a, b, Oliveira et al. 2010, Isaias et al. 2011, Dias et al. 2013, Ferreira & Isaias 2013). Dentre estas alterações, destacam-se os processos de hipertrofia e hiperplasia que têm sido recentemente quantificados e avaliados quanto a importância para a formação do corpo final da galha (Moura et al. 2008, Oliveira & Isaias 2010b, Ferreira & Isaias 2013, Magalhães et al. 2013). Além destas quantificações, análises histoquímicas em galhas buscam compreender a dieta alimentar do galhador (Oliveira et al. 2006, Moura et al. 2009, Oliveira & Isaias 2010a, Oliveira et al. 2010, Oliveira et al. 2011a) e o impacto gerado pelo estresse nos tecidos da planta hospedeira e da galha (Oliveira e Isaias 2010a, Isaias et al. 2011, Oliveira et al. 2011b). A detecção histoquímica de espécies reativas de oxigênio (ERO) é uma das formas de se avaliar e localizar o estresse gerado pelo inseto indutor de galhas (Oliveira et al. 2010, Isaias et al. 2011, Oliveira et al. 2011b). Associado aos testes histoquímicos, análises citológicas também se configuram como geradoras de parâmetros para avaliar os níveis de estresse gerado pelo galhador.

A presença de ERO em galhas detectada por Oliveira & Isaias (2010a), Isaias e al. (2011) e Oliveira et al. (2010, 2011b) indica que o estresse oxidativo pode

desencadear a indução e o seu desenvolvimento. Esse acúmulo de ERO nas paredes das células pode provocar afrouxamento das microfibrilas de celulose e permite assim o alongamento celular (Del Rio & Pupo 2009, Swanson & Gilroy 2010) por alterações na extensibilidade da parede (Cosgrove 2005). Magalhães et al. (2013) observaram que a reorientação das microfibrilas de celulose em galhas induzidas por *Baccharopelma dracunculifoliae* em *Baccharis dracunculifolia* é um fator importante para a determinação da forma final da galha. Além disso, a geração de ERO é uma das respostas das plantas ao ataque de patógenos ou a injúrias mecânicas (Doke et al. 1996, Maffei 2007, Bolwell & Daudi 2009, Torres 2010) e o estresse oxidativo nos tecidos pode causar morte celular programada (MCP) (Doke et al. 1996), processo pouco estudado em galhas. A MCP possui como características citológicas, a condensação da cromatina nuclear, a formação de corpos apoptóticos e a desorganização estrutural das mitocôndrias (Lam et al. 2001, Sun et al. 1999). Como características bioquímicas marcantes, destacam-se o influxo de cálcio, a ativação de proteases específicas, a liberação de citocromo c pela mitocôndria, a alteração na função de cloroplastos e a fragmentação do DNA nuclear nas regiões internucleossômicas (Khurana et al. 2005, Lam et al. 2001), que pode ser detectada pelo ensaio de TUNEL deadend™ fluorométrico (Promega).

Compreender como a produção de ERO pode modificar as características citológicas nos tecidos da galha e se estes processos estariam envolvidos em prováveis eventos de MCP podem configurar passos importantes para entender os mecanismos de reconhecimento e controle do estresse nos tecidos da galha. Acreditamos que o estresse causado pela atividade alimentar do galhador provoque alterações no sistema de membranas das células e acúmulo excessivo de ERO, o qual pode levar as células a MCP. Como modelo de estudo foi escolhido o sistema *Pseudobombax grandiflorum*

(Malvaceae) - *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae). Para avaliar nossa proposta foram feitas: (1) análises citológicas, (2) detecção histoquímica do acúmulo de ERO nos tecidos, e (3) detecção de MCP utilizando o ensaio de TUNEL, em folhas não galhadas e em galhas em três fases de desenvolvimento.

Material e Métodos

Amostragem

A coleta de folíolos não galhados (n = 15) de *Pseudobombax grandiflorum* (Cav.) A. Robyns (Malvaceae) e galhas (n = 15 de cada) jovens, maduras e senescentes induzidas por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) foram feitas em uma população localizadas na Gruta da Lapinha (19°33'67" S; 43°57'54" W), Parque Estadual do Sumidouro, Município de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil, de agosto a dezembro de 2012. A galha jovem se caracteriza pela projeção dos tecidos foliares ao redor da ninfa e crescimento de uma projeção para a face adaxial. Na madura, o crescimento estabiliza e esta assume a forma cônica. A fase de senescência se caracteriza pela ausência do macho ou liberação das ninfas de 1º instar pelas fêmeas, cessando o estímulo.

Análise histoquímica para espécies reativas de oxigênio (ERO)

Secções de material fresco, feitas à mão livre, de folhas (n = 5) e galhas (n = 5) nas 3 fases de desenvolvimento foram incubadas em 3,3'diaminobenzidina 0,5% (DAB - Sigma®) e mantidas no escuro (Rossetti & Bonatti 2001). A intensidade da reação foi examinada em microscópio de luz a cada 15 minutos até a estabilização da reação.

Análises citológicas

Amostras (n = 5) de folíolos não galhados e galhas jovens, maduras e senescentes foram fixadas em Karnovsky 4% (pH 7,2) durante 24 horas (Karnovsky 1965, modificado para 0,5), pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0.1M durante 2 horas (O'Brien & McCully 1981). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em etanol (Johansen 1940) e infiltradas em Spurr[®] (Spurr 1969). O cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo Leica- UC6, coletados em telinhas de cobre (300 Mesh), contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds 1963) e analisados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Teste de TUNEL - Avaliação de morte celular programada (MCP)

Para avaliação de morte celular programada (MCP) foi aplicado o ensaio de TUNEL (Promega[®]) que detecta fragmentação do DNA nuclear. O protocolo para marcação *in situ* com o kit TUNEL foi realizado de acordo com o fabricante. Folíolos e galhas nas 3 fases de desenvolvimento (n = 5) foram fixados em Karnovsky (1965, modificado para 0,5), infiltrados em Histo-resina Leica, seccionados em micrótomo (5µm), pós-fixados em formalina 4%, lavados em tampão PBS e permeabilizados com Proteinase K (2 µg/ml) por 10 min. As lâminas foram incubadas por 10 min com tampão de equilíbrio [cacodilato de potássio (200 mM, pH 6,6), Tris-HCl (25 mM, pH 6,6), DTT (0,2 mM), BSA (0,25 mg/ml) e cloreto de cobalto (2,5 mM)] e em seguida incubadas em solução contendo a enzima rTdT, dUTP (mix de nucleotídeos) conjugados com FITC por 1 hora a 37°C, no escuro, em estufa de CO₂. A reação foi interrompida com incubação das lâminas em SSC 2X por 15 minutos, seguida de

lavagens com PBS. As lâminas foram coradas com iodeto de propídeo (PI) e lavadas com água deionizada para retirar o PI não incorporado. As lâminas foram seladas e as imagens foram obtidas utilizando o Microscópio Confocal Zeiss 510 META no Centro de Processamento de Imagens da UFMG (CAPI – UFMG).

Resultados

Características gerais das galhas

As galhas de *Eriogallococcus isaias* em *Pseudobombax grandiflorum* são induzidas na face adaxial de folíolos jovens, apresentam uma câmara ninfal alongada contendo apenas um indutor. O folíolo apresenta muitas galhas (figura 1a) verdes, glabras, intralaminares, com projeção aciculada para a face adaxial (figura 1b), ostíolo voltado para a face abaxial, em média $7,80 \pm 2,10$ mm (altura) X $2,05 \pm 1,00$ mm (diâmetro) quando maduras. Na senescência, não ocorre mudança de forma da galha.

Detecção histoquímica de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Nos folíolos, as ERO foram detectadas com alta intensidade (forte coloração marrom) na epiderme, nos feixes vasculares, principalmente no floema; e com baixa intensidade (fraca coloração marrom) no parênquima clorofiliano (figuras 2a-b). Em todas as fases da galha, foi observada a alta intensidade de reação para ERO nas camadas corticais próximas a epiderme e no topo da câmara e nas camadas próximas a câmara ninfal, no revestimento da câmara e nos feixes vasculares (figuras 2c-d).

Características citológicas

O folíolo não galhado apresenta parênquima clorofiliano típico com espaços intercelulares, grandes vacúolos (figura 3a), mitocôndrias, cloroplastos com amido e lamelação com organização nos grana (figura 3b). Nas galhas jovens, observa-se hiperplasia do tecido parenquimático, paredes finas e sinuosas, muitas mitocôndrias e compostos fenólicos no vacúolo (figura 3c). O citoplasma é periférico, a parede celular se encontra com aspecto estriado (figura 3d), os cloroplastos apresentam amido, com sistema de membranas desorganizado (figura 3d) e grande quantidade plastoglóbulos associados aos tilacóides (figuras 3d-e). Nesta fase, as células apresentam núcleo volumoso com nucléolo conspícuo (figura 3f). A galha madura apresenta células parenquimáticas hipertrofiadas com citoplasma periférico e compostos fenólicos no vacúolo (figura 4a). A parede celular encontra-se estriada e com aparente perda de adesão da lamela mediana (figura 4b). Os cloroplastos apresentam lamelas desorganizadas, poucos tilacóides associados com numerosos plastoglóbulos de grandes dimensões (figura 4c). Na galha senescente, observa-se degradação de organelas (figura 4d-e) e do núcleo (figura 4e), a parede celular aparenta estar em estágio avançado de degradação (figura 4e) e ocorre perda de adesão citoplasmática com formação de pequenos vacúolos no citoplasma (figura 4f).

Avaliação de morte celular programada (MCP)

Nos folíolos foram observados apenas núcleos não apoptóticos (figuras 5a-b), corados com iodeto de propídeo, emitindo fluorescência vermelha. Nas galhas jovem e madura, os núcleos se mantiveram não apoptóticos (figura 5c). Nas galhas senescentes,

foram observados núcleos apoptóticos emitindo fluorescência verde com a sonda FITC, principalmente nas células parenquimáticas do córtex externo (figura 5d).

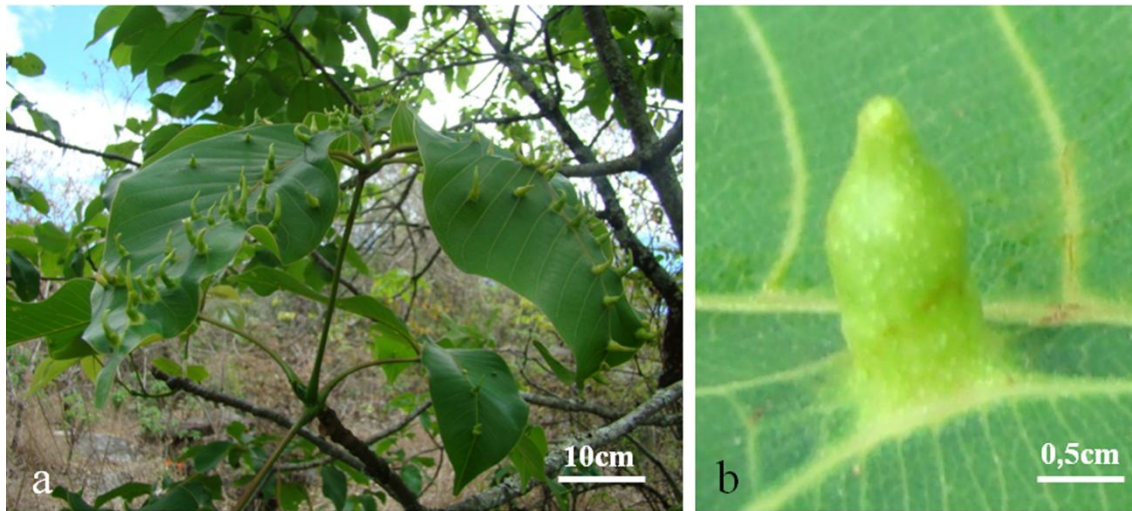


Figura 1. Folíolos galhados e galha induzida por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). a – Aspecto geral de folíolos galhados. b – Detalhe da projeção da galha para a face adaxial.

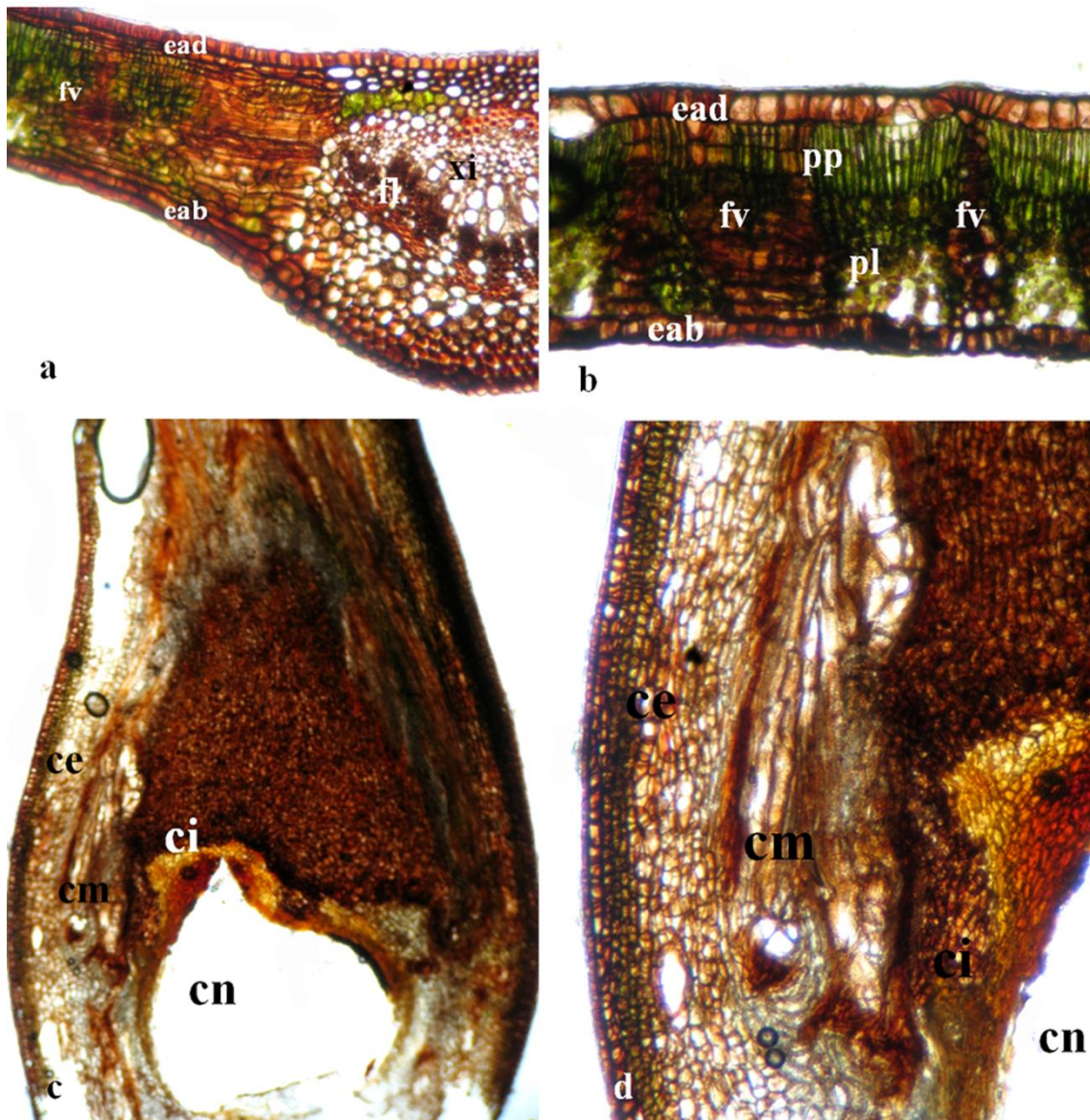


Figura 2. Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) com 3-3'diaminobenzidina (DAB) em folíolos não galhados e galhas induzidas por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). **a-b** – Secções transversais de folíolo não galhado evidenciando intensa reação para ERO feixes vasculares de menor calibre principalmente no floema, epiderme e fraca reação no parênquima clorofiliano. **c-d** – Secções transversais de galhas maduras evidenciando intensa reação para ERO nas camadas do córtex externo próximas a epiderme, nas camadas do córtex interno próxima a câmara larval e no topo da câmara e nos feixes vasculares do córtex mediano. ce = córtex externo; ci = córtex interno; cn = câmara ninfal; cm = córtex mediano; eab = face abaxial da epiderme; ead = face adaxial da epiderme; fv = feixe vascular; pl = parênquima lacunoso; pp = parênquima paliçádico.

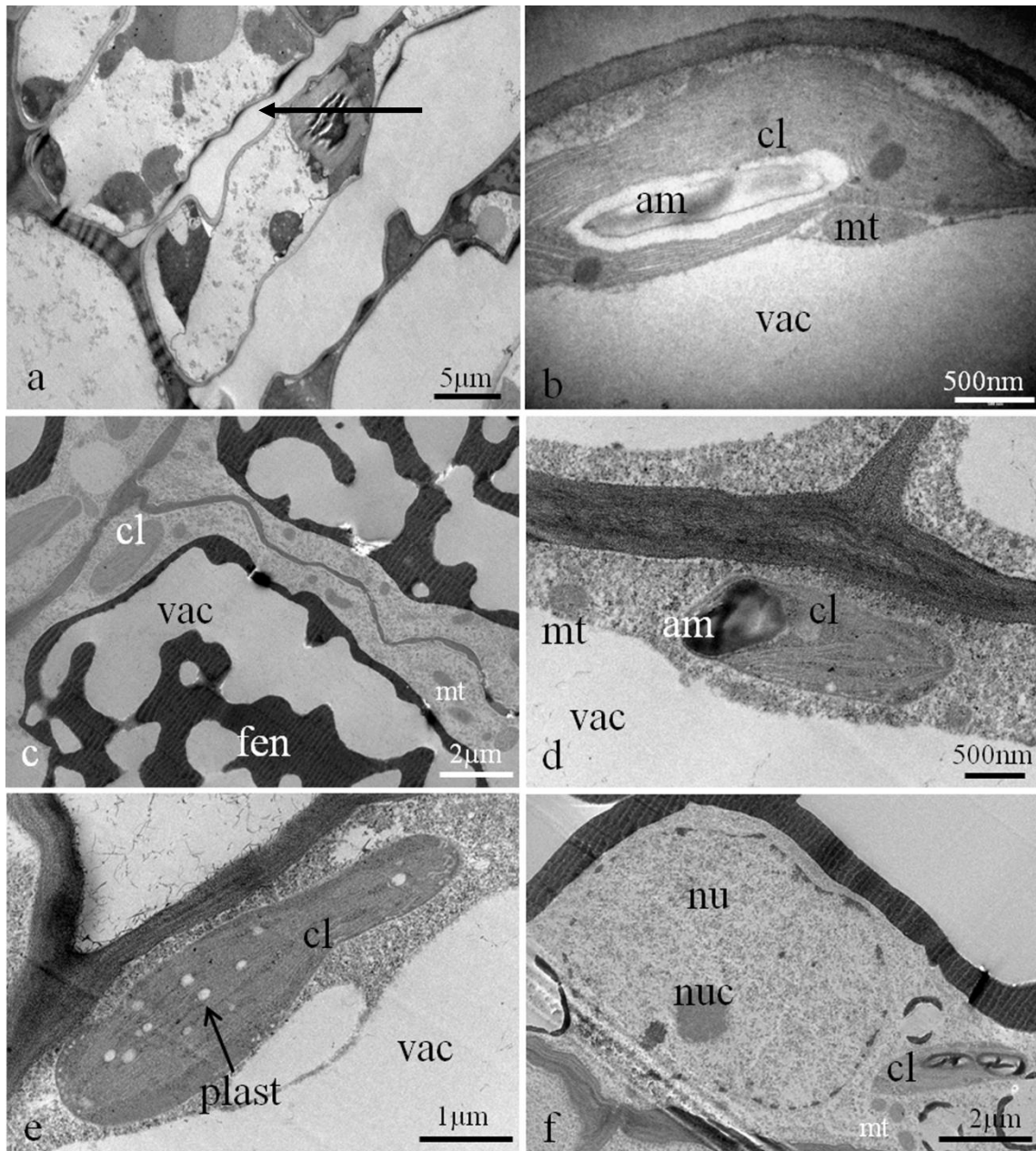


Figura 3. Aspectos citológicos de folíolos não galhados e galha jovem induzida por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). **a-b** – Parênquima clorofiliano típico do folíolo com espaços intercelulares (seta figura a), grandes vacúolos, mitocôndrias e cloroplastos com amido apresentando lamelação dos grana. **c** – Células parenquimáticas de galha jovem com paredes finas e sinuosas, muitas mitocôndrias, cloroplastos e compostos fenólicos no vacúolo. **d-e** – Células parenquimáticas de galha jovem com parede eletrodensa, citoplasma periférico, cloroplastos com amido, menor lamelação dos grana e plastoglóbulo associados aos tilacóides. **f** – Núcleo volumoso com nucléolo conspícuo indicando intensa divisão celular em galha jovem. am = amido; cl = cloroplasto; fen = fenólicos; mt = mitocôndria; nu = núcleo; nuc = nucléolo; plast = plastoglóbulo; vac = vacúolo.

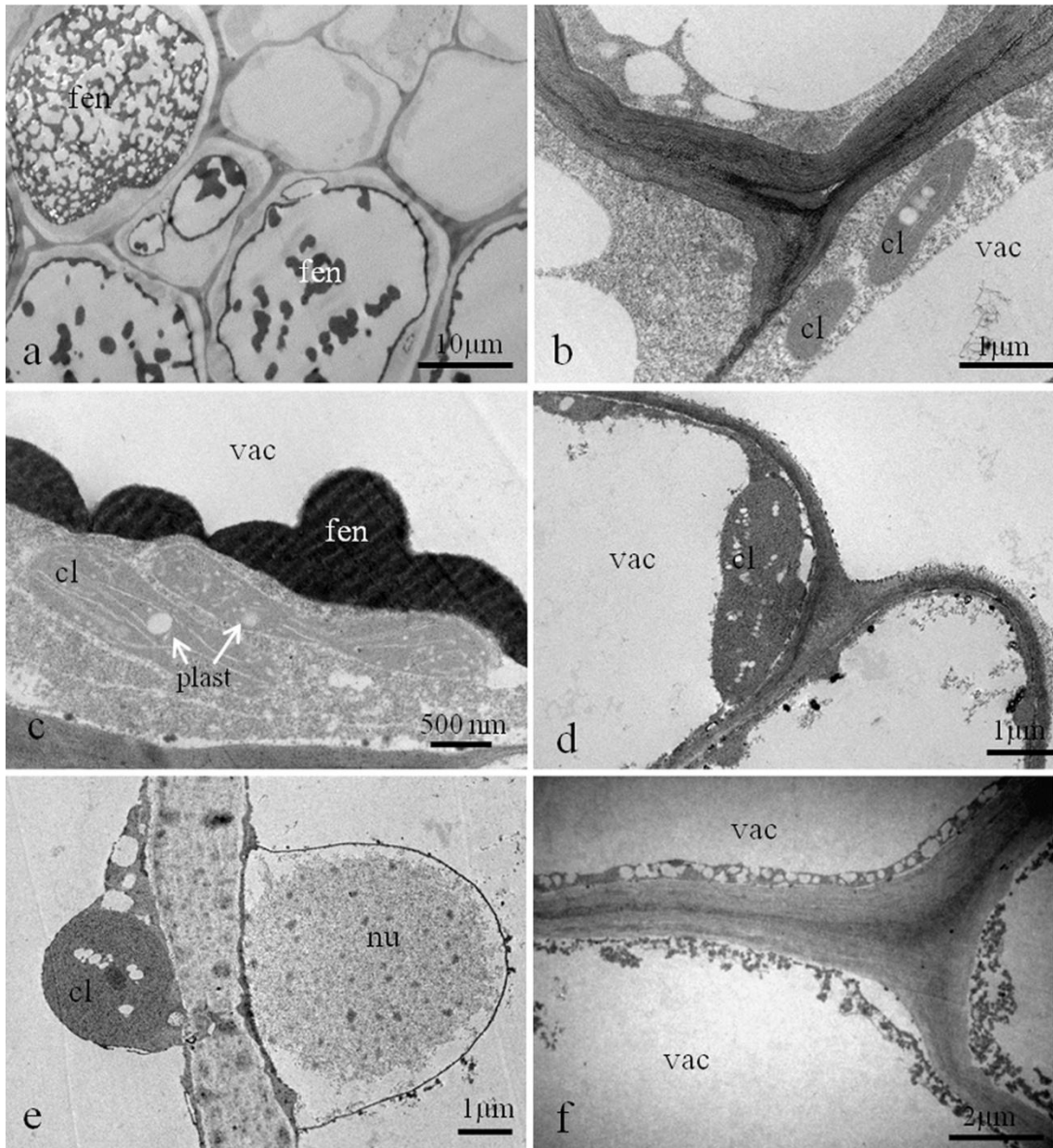


Figura 4. Aspectos citológicos de galhas madura e senescente induzida por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). **a-c** – Galha madura **a** – Células parenquimáticas hipertrofiadas, citoplasma periférico e compostos fenólicos no vacúolo. **b** – Células parenquimáticas evidenciando parede celular eletrodensa e perda de adesão da lamela mediana. **c** – Cloroplastos com lamelação desorganizada, poucos tilacóides associados com numerosos plastoglóbulos de grandes dimensões. **d-f** – Galha senescente. **d-e** – Degradação de organelas e núcleo. **f** – Células parenquimáticas com perda de adesão citoplasmática e com formação de pequenos vacúolos no citoplasma. cl = cloroplasto; fen = fenólicos; nu = núcleo; plast = plastoglóbulo; vac = vacúolo.

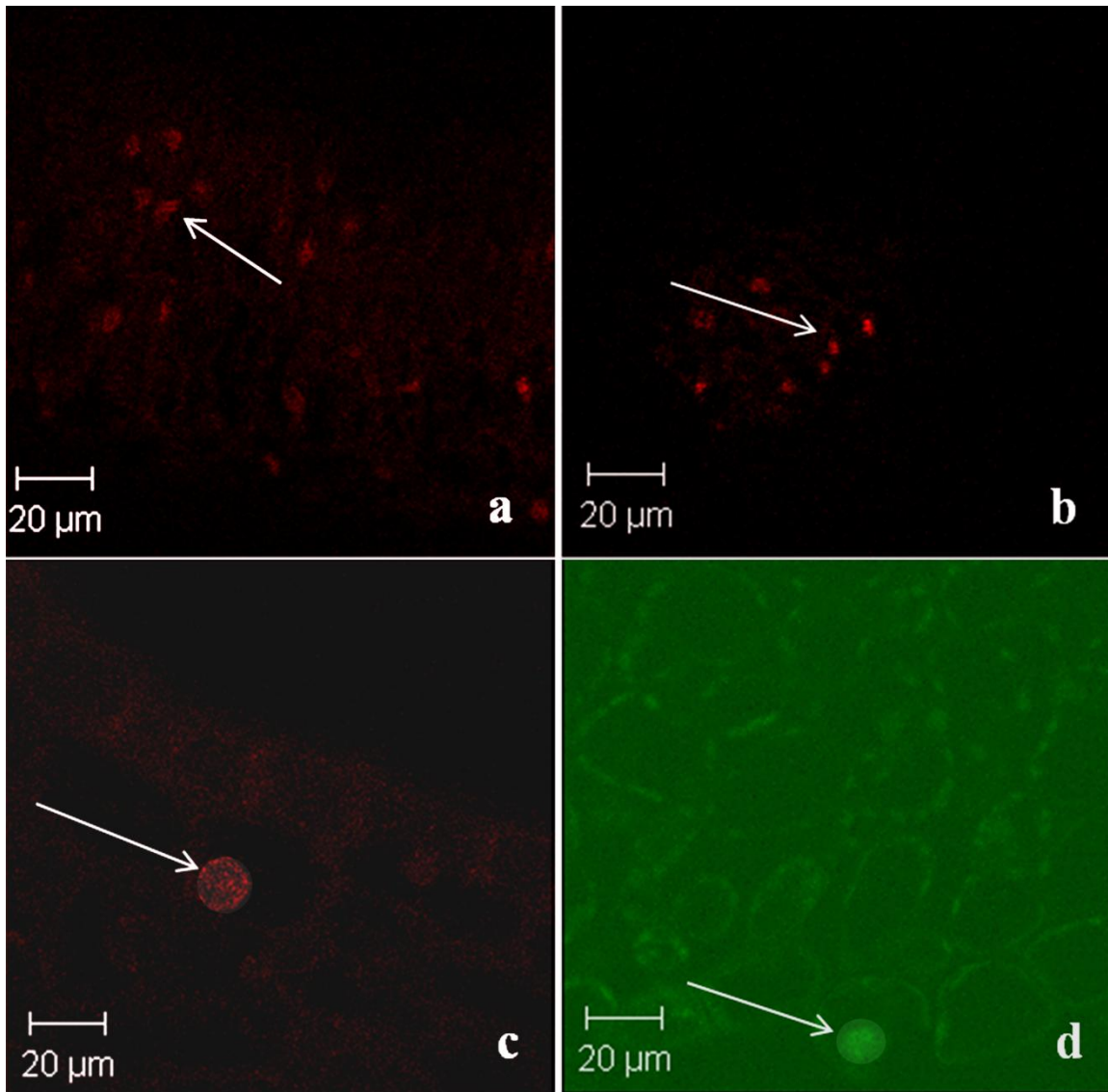


Figure 5. Ensaio de TUNEL para avaliação de morte celular programada (MCP) em folíolos não galhados e galhas induzidas por *Eriogallococcus isaias* (Eriococcidae) em *Pseudobombax grandiflorum* (Malvaceae). Núcleos não apoptóticos com fluorescência vermelha. Núcleos apoptóticos com fluorescência verde. **a** – Folíolo não galhado com núcleos não apoptóticos no mesofilo. **b** - Folíolo não galhado com núcleos não apoptóticos na região do feixe vascular. **c** – Galha madura com núcleos não apoptóticos em células parenquimáticas do córtex externo. **d** – Galha senescente com núcleo apoptótico em célula parenquimática do córtex externo. Os núcleos são indicados pelas setas.

Discussão

A ação de *Eriogallococcus isaias* em *Pseudobombax grandiflorum* durante o processo de indução e estabelecimento da galha provoca alto estresse oxidativo nos tecidos. Este alto estresse provoca alterações citológicas e estruturais nas células e tecidos das galhas (Oliveira et al. 2010, Oliveira et al. 2011a, Magalhães et al. 2013). A principal característica observada no sistema *Pseudobombax grandiflorum*-*Eriogallococcus isaias* é a desorganização do sistema de membranas. A MCP aparece somente na fase de senescência quando cessa o estímulo do galhador e os ciclos celulares se encerram.

Na galha estudada, as espécies reativas de oxigênio acumuladas na parede das células do córtex externo localizadas logo abaixo da epiderme pode ser inerente ao metabolismo fotossintético e a atividade respiratória do vegetal, conforme proposto por Del Río & Pupo (2009) e Heldt & Piechulla (2011). Nos feixes vasculares e nas camadas do córtex interno, no topo e no revestimento da câmara, o acúmulo de ERO seria creditado à atividade alimentar do galhador (Oliveira & Isaias 2010a, Oliveira et al. 2010, Isaias et al. 2011). Essa alta concentração de ERO observado nas células próximas a câmara ninfal já foi observada para outros sistemas que apresentam galhadores com aparelho bucal sugador (Oliveira & Isaias 2010a, Isaias et al. 2011), semelhante aquele de *E. isaias*. Segundo Oliveira et al. (2010), a formação de um gradiente de ERO pode ser uma das forças geradoras de gradientes citológicos e histoquímicos na galha responsáveis pelo papel nutricional das células proximais à câmara larval e pelos padrões de divisões e consequente forma da galha.

O acúmulo de ERO pode causar a acidificação da parede celular, que por sua vez pode provocar o afrouxamento das microfibrilas de celulose permitindo assim o

crescimento da célula (Del Río & Pupo 2009, Swanson & Gilroy 2010), seja alterando a extensibilidade da parede (Cosgrove 2005) ou pela reorientação das microfibrilas de celulose (Baskin 2005). Em galhas induzidas por *Baccharopelma dracunculifoliae* em *Baccharis dracunculifolia*, as camadas de tecido com acúmulo de ERO (Magalhães et al. 2014, capítulo 2) apresentam o padrão de deposição das microfibrilas de celulose alterado durante seu desenvolvimento, conforme demonstrado por Magalhães et al. (2013). Neste sistema, podemos dizer que a hipertrofia celular e a perda de adesão da lamela mediana pode estar ligada ao acúmulo de ERO na parede celular. Padrões distintos de alongamento e crescimento celular durante o processo de hipertrofia podem ser um dos mecanismos responsáveis pela geração da forma da galha, assim como relatado por Baskin (2005) para outros órgãos vegetativos. A extensibilidade da parede é o parâmetro responsável pelo controle da expansão celular, mas a pressão de turgescência é a força que gera esse o crescimento (Baskin 2005, Geitmann & Ortega 2009, Boudaoud 2010). Portanto a expansão celular observada nos tecidos da galha esta relacionada ao aumento do volume do vacúolo, o que é sintoma do processo hipertrófico.

Além de alterar a estrutura da parede celular, o alto estresse oxidativo nos tecidos da galha causa desorganização do sistema de membranas, em especial da estrutura dos cloroplastos, causando perda de lamelação, e formação de plastoglóbulos. Como todas as galhas foram coletadas sob as mesmas condições, a ausência de amido nos cloroplastos das galhas madura e senescente é um indício que há redução no rendimento fotossintético e/ou grande consumo de açúcares para respiração e crescimento celular. A formação de plastoglóbulos, por sua vez, é uma resposta ao estresse oxidativo (Zentgraf 2007). Estes corpúsculos apresentam conteúdo antioxidante, tocoferol e carotenóides, envolvidos na regeneração do Fotossistema I na

membrana dos tilacóides (Lichtenthaler 1968, Hopkins et al. 2007) e atuam na eliminação de ERO (Asada 2006, Moller et al. 2007). Oliveira et al. (2011b) observaram manutenção do rendimento fotossintético nos tecidos de dois morfotipos de galhas induzidos em duas espécies do gênero *Aspidosperma*. A manutenção do rendimento fotossintético nestas galhas se deve a presença de plastoglóbulos nos cloroplastos. No sistema estudado, mesmo com a presença de plastoglóbulos a estrutura dos cloroplastos nos tecidos da galha se apresenta bastante alterada quando comparada aos tecidos não galhados. Desta forma, futuros trabalhos podem avaliar se mesmo com alto grau de alteração estes cloroplastos manteriam o rendimento quântico fotossintético.

Muito embora o grande acúmulo de ERO nas células possa levar a morte celular programada - MCP (Doke et al. 1996), no sistema *P. grandiflorum* – *E. isaias* esta só foi observada na fase de senescência, indicando fim dos ciclos celulares. O fim destes ciclos ocorre porque o estímulo do galhador deixa de existir no sítio da galha. De alguma forma, mesmo com o alto estresse oxidativo, há um controle da MCP nos tecidos jovens e maduros da galha. Este controle certamente deve evitar uma resposta de hipersensibilidade (HR) e conseqüentemente eliminar o estímulo da galha. A presença de arabinogalactanos proteínicos (AGPs) podem ser um dos fatores que controla a MCP segundo Gao & Showalter (1999), Letarte et al. (2006), Mastroberti & Mariath (2008). As AGPs foram observados nos tecidos parenquimáticos das galhas jovem e madura (Magalhães 2014, capítulo 3). A proposição do controle da MCP por parte das AGPs, é reforçado pela presença constante destas pectinas em tecidos jovens e meristemáticos (Herman & Lamb 1992, Albersheim et al 2011).

Considerações finais

O acúmulo de ERO causa alterações na estrutura e organização do sistema de membranas nas células, notado principalmente nos cloroplastos. Nesta organela, a formação de plastoglobulos é um clássico sintoma de alto estresse oxidativo. Este estresse oxidativo detectado nos tecido da galha pode ainda provocar alterações na estrutura da parede celular, levando ao afrouxamento das microfibrilas e consequente hipertrofia das células. A MCP ocorre somente na fase de senescência indicando fim do estímulo e controle do galhador sobre o tecido da planta hospedeira e que, mesmo em condições de alto impacto, o tecido não entra em MCP. A MCP não é observada durante as fases jovem e madura da galha e essa ausência pode estar relacionada à presença de AGP na parede celular.

Referências bibliográficas

- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2011) Plant cell walls. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York.
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 14:391-396.
- Baskin TI (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:203-222.
- Bolwell GP, Daudi A (2009) Reactive oxygen species in Plant-Pathogen Interaction. In: Del Río LA, Puppo A, editors. *Reactive oxygen species in plant signaling*, p. 113-134.

- Boudaoud A (2010) An introduction to the mechanics of morphogenesis for plant biologists. *Trends Plant Sci* 15:353-360.
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850-861.
- Del Río LA, Puppo A (2009) Reactive oxygen species in plant signaling. Springer.
- Dias GC, Moreira GRP, Ferreira BG, Isaias RMS (2013) Contrasting developmental pathways for leaves and galls induced by a sap-feeding insect on *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). *An Acad Bras Ciências* 85:187-200.
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence a review. *Gene* 179: 45-5.
- Ferreira BG, Isaias RMS (2013) Developmental stem anatomy and tissue redifferentiation induced by a galling Lepidoptera on *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Botany* 91:752-760.
- Gao M, Showalter AM (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J* 19:21-331.
- Geitmann A, Ortega JK (2009) Mechanics and modeling of plant cell growth. *Trends Plant Sci* 14:467-478.
- Heldt H, Piechulla B (2011) *Plant Biochemistry*. Academic Press, London.
- Herman EM, Lamb CJ (1992) Arabinogalactanrich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiology* 98:264-272.
- Hopkins M, McNamara L, Taylor C, Wang T, Thompson J (2007) Membrane dynamics and regulation of subcellular changes during senescence. In: Gan S, editor. *Senescence processes in plant*. Annual Plant Reviews, Blackwell Publishing Ltd, p. 39-68.

- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS (2011) Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany* 89:581-592.
- Isaias RMS, Carneiro RGS, Oliveira DC, Santos JC (2013) Annotated and illustrated checklist of Brazilian gall morphotypes. *Neotrop Entomol* 42:230–239.
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138.
- Khurana SMP, Pandey SK, Sarkar D, Chanemougasoundharam A (2005) Apoptosis in plant disease response: A close encounter of the pathogen kind. *Curr Sci* 88:740-752.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853.
- Letarte J, Simion E, Miner M, Kasha KJ (2006) Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Rep* 24:691–698.
- Lev-Yadun S (2003) Stem cells plants are differentiated too. *Curr Top Plant Biol* 4:93-100.
- Lichtenthaler HK (1968) Plastoglobuli and fine structure of plastids. *Endeavour* 27:82-88.
- Maffei ME, Mithifer A, Boland W (2007) Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci.*12:1360-1385.
- Magalhães TA, Oliveira DC, Suzuki AYM, Isaias RMS (2013) Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma dracunculifoliae* (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-013-0574-z

- Mani MS (1964) Ecology of Plant Galls. Dr. W. Junk Pub. The Hague.
- Mastroberti AA, Mariath JEA (2008) Developmental of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). Protoplasma 232: 233-245.
- Moller IM, Jensen PE, Hanson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu Rev Plant Biol 58:459-481.
- Moura MZD, Soares GLG, Isaias RMS (2008) Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Aust J Bot 56:153-160.
- Moura MZD, Soares GLG, Alves TMA, Isaias RMS (2009) Intra-specific phenotypic variations in *Lantana camara* leaves affect host selection by the gall maker *Aceria lantanae*. Bioch Syst Ecol 37:541-548.
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi Pty, Melbourne.
- Oliveira DC, Christiano JCS, Soares GLG, Isaias RMS (2006) Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). Rev Bras Bot 29:657-667.
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010a) Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). Plant Sci 178: 350-358.
- Oliveira DC, Isaias RMS (2010b) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). S Afr J Bot 76:239-248.
- Oliveira DC, Magalhães TA, Carneiro RGS, Alvim MN, Isaias RMS (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns? Protoplasma 242:81-93.

- Oliveira DC, Carneiro RGS, Magalhães TA, Isaias RMS (2011a) Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) - Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma* 248:829-837.
- Oliveira DC, Moreira ASFP, Magalhães TA, Lemos-Filho JP, Isaias RMS (2011b) Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis? *Plant Sci* 180:489-495.
- Promega. DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System. Technical Bulletin. Madison, WI, USA.
- Raman A (2007) Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Curr Sci* 92:748–757.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- Rosseti S, Bonnatti PM (2001) *In situ* histochemical monitoring of ozone-and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiol Biochem* 39:433-442.
- Spurr AR (1969) A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy *J Ultrastruct Res* 26:31-43.
- Sun Y, Zhao Y, Hong X, Zhai Z (1999) Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters* 462:317-321.
- Swanson S, Gilroy S (2010) ROS in plant development. *Physiol Plant* 138: 384-392.
- Torres MAM (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* 138:414-429.
- Vecchi C, Menezes NL, Oliveira DC, Ferreira BG, Isaias RMS (2013) The redifferentiation of nutritive cells in galls induced by Lepidoptera on *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. reveals predefined patterns of plant development. *Protoplasma* 250:1363-1368.

Zentgraf U (2007) Oxidative stress and leaf senescence. In: Susheng G, editor. Senescence Processes in Plants, Blackwell Publishing Ltd, CRC Press, New York, p. 69-86.

Considerações finais

Os dois sistemas estudados, *Baccharis dracunculifolia* - *Baccharopelma dracunculifoliae* e *Pseudobombax grandiflorum* - *Eriogallococcus isaias*, permitiram evidenciar que a produção de espécies reativas de oxigênio durante o estabelecimento dos insetos galhadores na formação da galha foi potencial sinalizador para o afrouxamento e reorientação das microfibrilas de celulose e alterações na composição pectínica da parede. Contudo, embora o acúmulo de ERO tenha sido detectado histoquimicamente em diferentes intensidades de reação nos sítios das galhas, este acúmulo não é determinante para a morte celular programada em nenhum dos sistemas estudados, pois os dois processos ocorrem em sítios distintos e após a saída do galhador.

Nas galhas induzidas por *Baccharopelma dracunculifoliae* em *Baccharis dracunculifolia* foi observado que a reorientação da microfibrilas de celulose determina mudanças na direção do alongamento e nos padrões de expansão celular, com grande impacto na geração da forma galha. As mudanças detectadas são dinâmicas permitindo o dobramento da folha ao longo da nervura mediana na fase jovem e a abertura total da galha na fase senescente.

A distribuição das pectinas e proteínas nas paredes celulares foi alterada pela ação alimentar de *Eriogallococcus isaias* nos sítios de indução das galhas em *Pseudobombax grandiflorum* através do estresse gerado nos tecidos. Nas fases jovem e madura, a variação na distribuição dos HGAs e nos seus graus de metil-esterificação, e na distribuição dos arabinanos e galactanos alterou principalmente a rigidez e flexibilidade da parede permitindo a expansão celular. As AGPs, mesmo não sendo abundantes nas galhas jovem e madura, podem ter evitado a ocorrência de MCP. É importante ressaltar que essas variações ocorrem pelo estímulo do inseto galhador mas

dentro dos limites da planta hospedeira. Como as fases de desenvolvimento em galhas são bem marcadas, o estudo sobre a dinâmica da parede celular em mais sistemas pode responder se os padrões de desenvolvimento são iguais em galhas que apresentam formas semelhantes.

Nos dois sistemas estudados, foi observado que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode ser um dos fatores que causa hipertrofia nos tecidos, pelo aumento da acidez na parede e conseqüente afrouxamento das microfibrilas de celulose. O acúmulo de ERO altera a estrutura dos cloroplastos, que perdem lamelação e apresentam muitos plastoglobulos como forma de capturar os radicais livres. Entretanto, o acúmulo de ERO nos tecidos não desencadeou morte celular programada (MCP) durante as fases jovem e madura das duas galhas, com esta ocorrendo apenas na senescência. A partir destes resultados, pode-se concluir que embora induzidas em plantas de famílias distintas, as duas galhas conseguem suportar o estresse causado pelo acúmulo de ERO sem que ocorra MCP, sendo este um indício de que o fenótipo estendido dos insetos é determinado também em nível subcelular.

O estudo das variações subcelulares em galhas de insetos sugadores permitiu demonstrar que as galhas são modelos eficientes para o entendimento da dinâmica das paredes celulares durante o desenvolvimento vegetal. Os processos de rediferenciação celular registrados neste trabalho contribuem para o entendimento do estresse oxidativo como causador de alteração da estrutura celulósica e pectínica na parede celular durante o desenvolvimento de galhas. Além das técnicas utilizadas, técnicas que englobem a parte química e bioquímica podem auxiliar no entendimento destas variações.