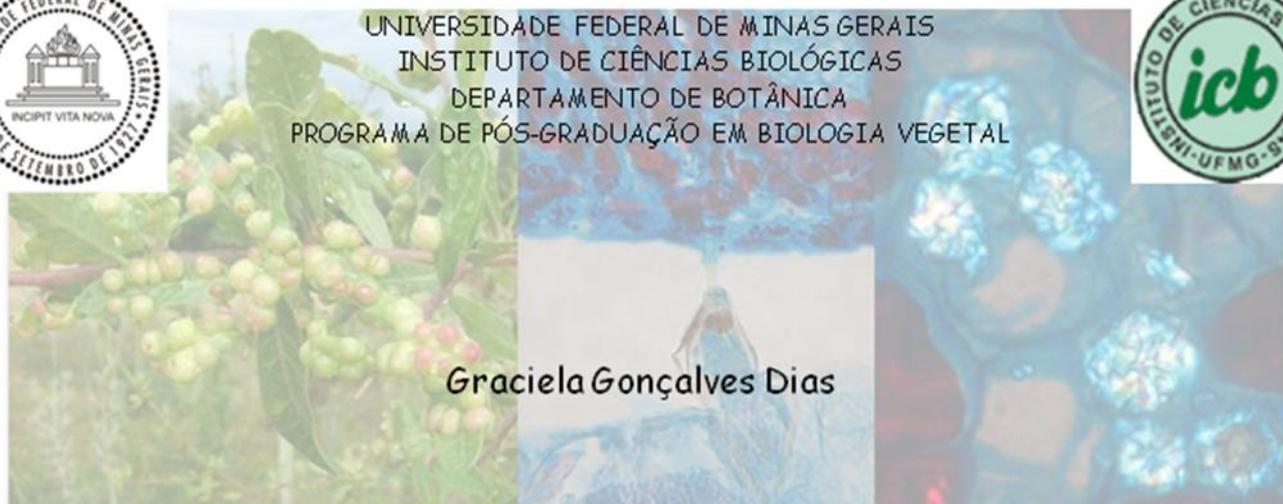
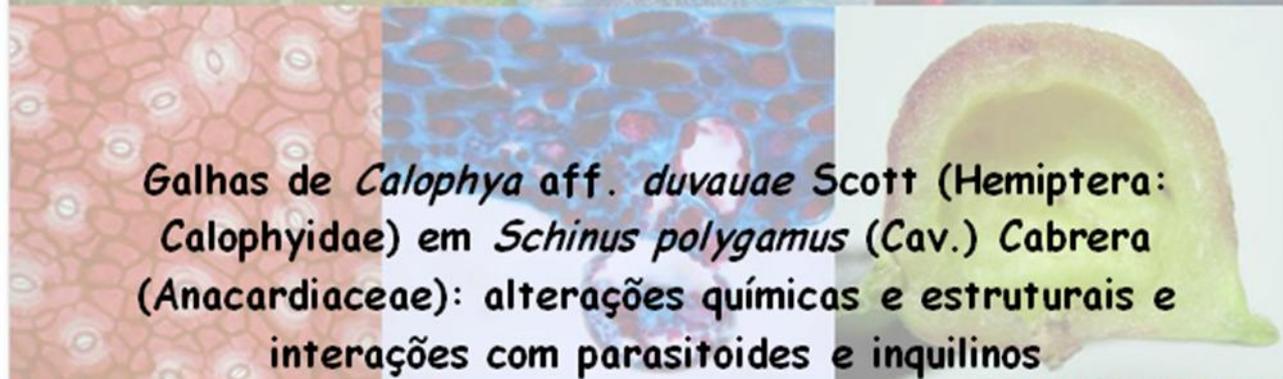




UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



Graciela Gonçalves Dias

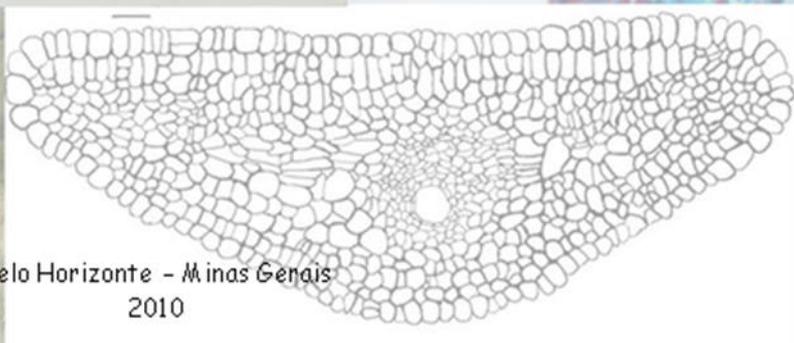


***Galhas de Calophya aff. duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): alterações químicas e estruturais e interações com parasitoides e inquilinos**



Orientadora: Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaías

Co-orientador: Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira



Belo Horizonte - Minas Gerais
2010

Graciela Gonçalves Dias

Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): alterações químicas e estruturais e interações com parasitoides e inquilinos

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias

Co-orientador: Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira

Dias, Graciela Gonçalves

Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): alterações químicas e estruturais e interações com parasitoides e inquilinos. [manuscrito] / Graciela Gonçalves Dias. – 2010.

116 f. : il. ; 219,5 cm.

Orientadora: Rosy Mary dos Santos Isaias. Co-orientador: Gilson Rudinei Pires Moreira.

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

1. Anatomia vegetal – Teses. 2. Insetos galhadores – Teses. 3. Botânica – Teses. 4. Anacardiaceae. I. Isaias, Rosy Mary dos. II. Moreira, Gilson Rudinei Pires. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581.4

Índice

Dedicatória.....	VI
Agradecimentos.....	VII
Epígrafe.....	VIII
Resumo Geral.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
Referências bibliográficas.....	8
Capítulo 1 - O sistema <i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-<i>Calophya</i> aff. <i>duvauae</i> Scott (Hemiptera: Calophyidae).....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e métodos.....	19
Resultados.....	22
Figuras.....	27
Discussão.....	32
Referências bibliográficas.....	37
Capítulo 2 - Desenvolvimento das folhas e das galhas induzidas por <i>Calophya</i> aff. <i>duvauae</i> Scott (Hemiptera: Calophyidae) em <i>Schinus polygamus</i> (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) ...	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Material e métodos.....	47
Resultados.....	50
Figuras.....	55
Discussão.....	65

Referências bibliográficas	69
----------------------------------	----

Capítulo 3 - Influência de Parasitoides e Inquilinos na Estrutura das Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera

(Anacardiaceae)	74
------------------------------	-----------

Resumo	75
--------------	----

Abstract	76
----------------	----

Introdução.....	77
-----------------	----

Material e métodos	79
--------------------------	----

Resultados.....	81
-----------------	----

Figuras.....	85
--------------	----

Discussão	91
-----------------	----

Referências bibliográficas	94
----------------------------------	----

Capítulo 4 - Impacto de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) e demais habitantes da galha nos perfis histoquímicos das folhas de *Schinus polygamus* (Cav.)

Cabrera (Anacardiaceae)	98
--------------------------------------	-----------

Resumo	99
--------------	----

Abstract	100
----------------	-----

Introdução.....	101
-----------------	-----

Material e métodos	101
--------------------------	-----

Resultados.....	103
-----------------	-----

Discussão	106
-----------------	-----

Referências bibliográficas	110
----------------------------------	-----

Considerações finais	115
-----------------------------------	------------

Dedico este trabalho à minha mãe...

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, família, sustento e oportunidade de estudar um pouco da maravilhosa vida que ele criou.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias, pela orientação, confiança e paciência nestes anos. Obrigada por acreditar e investir em minha formação.

Ao meu co-orientador Gilson Rudinei Pires Moreira pela orientação, oportunidade de estudar este sistema galhador-planta hospedeira tão fascinante, pelas discussões interessantes e pela hospitalidade em Canguçu. Aos colegas do Departamento de Ecologia e Comportamento Animal da UFRGS pelo auxílio na triagem das coletas e pelo chimarrão. Ao professor Geraldo Luiz Gonçalves Soares pela hospitalidade quando fomos a Porto Alegre.

Aos queridos colegas do Grupo Galhas: Anete, Renê, Dênis, Thiago e Graziela, professores Élder e Denise e demais colegas do Laboratório de Anatomia vegetal, pelo crescimento profissional e pessoal, toda a ajuda que recebi e os inúmeros cafezinhos no fim de tarde. Realmente este é o melhor laboratório do mundo! Aos colegas Ana Paula de Faria, Giovanni, Marina Neiva, Dra. Ana Sílvia Moreira e ao Prof. Dr. Fernando Henrique Aguiar Vale pela amizade e conversas produtivas.

Aos técnicos Wagner e Socorro pelo auxílio nas análises histométricas e de pigmentos, respectivamente. Ao estagiário Bruno Garcia, pelo auxílio na confecção e análise das lâminas. Muito obrigada por ser mais do que um estagiário, mas um verdadeiro amigo.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela estrutura oferecida e ao curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade. A CAPES pela bolsa e apoio financeiro no primeiro ano deste mestrado.

À minha querida família e amigos, que suportaram (não sem reclamar...) minha ausência. Minha mãe, por ser exemplo de força e perseverança, e pelos chazinhos à noite. Meu irmão, primos, tios, amigos da igreja e da vida: sem o apoio de vocês não teria conseguido passar pelos momentos difíceis pelos quais passei. Graças a Deus por vocês!

Agradeço ao Gleider pelo apoio, amor, paciência e incentivo, apesar do pouco tempo. Você é muito especial para mim.

“ – Esta é a maravilha e a aventura da exploração, uma parte do que vocês chamam de Ciência: discernir e descobrir o que nós escondemos – (disse Deus).

– Então por que esconderam?

– Por que as crianças adoram brincar de esconde-esconde? Pergunte a qualquer pessoa que tenha paixão por explorar, descobrir e criar. Escolhemos esconder tantas maravilhas de vocês como um ato de amor, um verdadeiro presente dentro do processo da vida.”

Trecho do livro “A cabana”, de William P. Young (pág. 120)

Resumo Geral

Galhas entomógenas são estruturas compostas de tecidos vegetais diferenciados que fornecem abrigo, proteção e nutrição ao indutor e seus descendentes. A relação entre a planta hospedeira e o galhador é geralmente espécie-específica, havendo para cada morfotipo de galha um único inseto indutor relacionado. No entanto, uma mesma planta hospedeira pode responder a estímulos de galhadores diferentes, como é verificado nas chamadas super-hospedeiras, ou apresentar modificações nestas estruturas em resposta aos estímulos de outros organismos, como inquilinos. *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) é uma super-hospedeira de herbívoros galhadores, dentre os quais destaca-se *Calophya* aff. *duvauae* Scott, o qual induz galhas foliares cuja coloração varia de vermelho vivo a verde na superfície adaxial e que apresentam um endoparasitoide Hymenoptera sp. 1 (H1) e dois inquilinos, um Hymenoptera sp. 2 (H2) e um Lepidoptera sp. (LP) associados. Coletas trimestrais foram realizadas entre junho de 2008 e março de 2009 em uma população localizada na cidade de Canguçu, Rio Grande do Sul, Brasil. A maioria das galhas ocorreu na região mediana da folha, havendo um predomínio de galhas vermelhas em relação às verdes. Por ser a maioria destas últimas portadora de indutores com malformações ou outros níveis tróficos, conclui-se que a cor vermelha decorre do estímulo constante do indutor. Há uma redução expressiva do teor de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores nas galhas, redução esta, no caso de antocianinas totais, maior nas galhas verdes. A indução ocorre preferencialmente em folhas jovens, podendo também se dar em folhas maduras, havendo rediferenciação dos tecidos em decorrência da indução. A galha madura caracteriza-se pela homogenização do parênquima, neoformação de feixes vasculares, hipertrofia e hiperplasia teciduais e ausência de tecido nutritivo e lignificação, alterações relacionadas ao hábito alimentar sugador do calofídeo. A presença de H1 não causou alterações anatômicas ou, alternativamente, induziu o crescimento de células nutritivas isoladas, projetadas para o interior da câmara ninfal. H2 induz a formação de tecido nutritivo abundante, enquanto LP não provoca alterações teciduais, além dos vestígios de sua atividade alimentar nas células epidérmicas da câmara ninfal. Galhas com o indutor ou contendo H1 ou H2 provocam alterações na localização de substâncias dos metabolismos primário ou secundário, mas não provocam nem suprimem a síntese destes compostos.

Abstract

Insect galls are structures composed of different plant tissues that provide shelter, protection and nourishment to the inducer and their descendants. The relationship between host plant and gall inducer is usually species-specific, with each gall morphotype being related to a single galling insect. However, a host plant can respond to different insect stimuli, as it is found in so-called super-host, or it may present variations in these structures in response to the action of an inquiline. *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) is a super-host of galling herbivores, among which *Calophya* aff. *duvauae* Scott stands out by inducing leaf galls whose color varies from red to green in the adaxial surface. These galls may have a Hymenoptera sp. 1 (H1) endoparasitoid and two associated inquilines, a Hymenoptera sp. 2 (H2) and Lepidoptera sp. (LP). Samples were collected quarterly, between June 2008 and March 2009, in a population in the city of Canguçu, Rio Grande do Sul, Brazil. Most galls occurred in the median part of the leaf, with a predominance of red galls in relation to the green ones. The red color is presumably due to the constant stimulus of the healthy gall inducer since the rate of malformed galls inside green gall was high. There is a notable reduction in the content of photosynthetic and photoprotective pigments in the galls when compared to ungalled leaves, especially for total anthocyanins of the green galls. The induction occurs preferentially in young leaves, but it may also take place in mature leaves with the redifferentiation of the tissues. The mature gall is characterized by the homogenization of the parenchyma, neo-formed vascular bundles, hypertrophy and hyperplasia of the tissues and absence of nutritive tissue and lignification, features which are related to feeding habit of the sucking calophyd. The presence of H1 did not cause any anatomic changes or, alternatively, induced the growth of isolated nutritious cells inside the nymph chamber. H2 induces the formation of abundant nutritive tissue, while LP does not cause tissue damage besides the vestiges of its feeding activity in epidermal cells of the nymphal chamber. Galls containing the inducer, H1 or H2 induced changes in the allocation of substances from primary and secondary metabolism, but did not cause or suppress the synthesis of these compounds.

Introdução Geral

Introdução Geral

Segundo uma definição mais generalista, o conceito de galha aborda variadas estruturas vegetais geradas como resultado de hipertrofia e hiperplasia celulares sob a influência de um organismo parasita (Mani 1964, Isaias 1998). Estas estruturas incluem crescimentos indiferenciados causados por insetos, fungos, bactérias, nematódios, ácaros, algas verdes e até algumas plantas (Mani 1964, 1992; Roskam 1992). As galhas entomógenas, no entanto, são notadamente distintas dos crescimentos amorfos induzidos por fungos e bactérias, pois constituem estruturas altamente simétricas e complexas (Abrahamson & Weis 1997, Raman 2007).

A relação entre galhadores e plantas hospedeiras é essencialmente parasítica, uma vez que não há benefícios conhecidos para estas últimas (Abrahamson & Weis 1997, Schrönrogge *et al.* 2000). A galha só beneficia o galhador, e muito embora estudos sugiram que originalmente estas estruturas tenham sido primeiramente formadas como defesa da planta, que isolaria um parasita danoso a ela, dentro da galha, os insetos rapidamente conseguiram direcionar este crescimento em seu próprio benefício (Price *et al.* 1986).

Diversas hipóteses têm sido levantadas para explicar as pressões seletivas responsáveis pela manutenção do hábito galhador (Schrönrogge *et al.* 2000). Dentre elas destacam-se as hipóteses da nutrição, do microambiente e de proteção contra inimigos naturais, cujos valores adaptativos foram discutidos por Price *et al.* (1987). A hipótese da nutrição sugere que a manipulação dos tecidos da planta por parte do galhador otimiza a obtenção de recursos alimentares, geralmente sendo os tecidos da galha mais nutritivos e com menos compostos defensivos que as demais regiões da planta (Price *et al.* 1987, Hartley 1998). A hipótese do microambiente propõe a existência de benefícios para o galhador por ser o interior da galha um ambiente controlado, protegendo-o contra condições abióticas desfavoráveis, especialmente dessecação (Price *et al.* 1987, Fernandes & Price 1992, Crespi *et al.* 1997). A hipótese do inimigo, por sua vez, se concentra na possível proteção do galhador contra seus inimigos naturais, por estar protegido dentro da galha (Hawkins *et al.* 1997, Stone & Cook 1998, Stone & Schrönrogge 2003). No entanto, esta hipótese é bastante controversa, uma vez que é grande a frequência de predadores, inquilinos e parasitoides nos sistemas galhador-planta hospedeira (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992, Abrahamson & Weis 1997, Cuevas-Reyes *et al.* 2007).

Galhas são induzidas em quase todos os grupos vegetais, mas predominam em Angiospermas, das quais cerca de 93% ocorrem em eudicotiledôneas (Mani 1964). Estudos sobre diversidade de insetos galhadores apontam famílias de eudicotiledôneas com uma maior riqueza destas interações que outras. No Brasil, podemos citar como exemplo o estudo conduzido por Gonçalves-Alvim e Fernandes (2001) que apontou as famílias Leguminosae, Asteraceae, Myrtaceae, Malpighiaceae e Rubiaceae como as de maior riqueza de galhadores no bioma cerrado e o de Mendonça Jr. (2007) na Floresta Atlântica do Rio Grande do Sul, na qual Fabaceae, Asteraceae e Myrtaceae constituem-se as famílias com maior diversidade. Em contrapartida, o estudo conduzido por Raman *et al.* (2005) no subcontinente indiano destaca as famílias Leguminosae, Moraceae, Lauraceae, Combretaceae e Anacardiaceae. Esta última inclui 875 espécies, distribuídas em 70 gêneros (Simpson 2006) e é uma família de pouco destaque nos levantamentos de biodiversidade de galhas, embora responda por 9,2% de todos os tipos de galhas descritas na flora chilena (Núñez & Sáiz 1994). Nesta família, o gênero *Schinus* L. compreende cerca de 30 espécies de árvores e arbustos nativos da América do Sul (Peru, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina, Chile e Região Sul do Brasil). Nestes países, é grande o registro de ataques por insetos (Burckhardt & Basset 2000), sendo alguns destes restritos a *Schinus* ou a Anacardiaceae. As galhas destas plantas chamam a atenção pela variedade de formas, sendo conhecidas desde o século XIX.

O gênero *Schinus* como um todo é conhecido pela considerável variabilidade morfológica, o que dificulta a definição taxonômica de algumas espécies (Sáiz & Núñez 1997, Burckhardt & Basset 2000). Esta indefinição também ocorre para *S. polygamus*, devido a diferenças no formato, tamanho e indumento das folhas. Desde a primeira descrição desta espécie, com o nome de *Amyris polygama* (Cavanilles 1795, *apud* Barkley 1944), muitos foram os sinônimos, até Cabrera (1938, 1939) classificar todas as espécies de *Schinus* próximas como *Schinus polygamus*, dada a extensa variabilidade fenotípica destas e por não apresentarem caracteres diferenciais suficientes. Fleig (1985, 1987, 1989) examinou tal questão e, com base em comparações estatísticas de várias características morfológicas, não encontrou diferenças suficientes para a definição de novas espécies. *Schinus polygamus* é a única espécie deste gênero que apresenta folha simples e ramos espinescentes, tornando-se de fácil reconhecimento no campo (Fleig 1979, 1985). Portanto, embora controversa, no presente trabalho a posição taxonômica dessa espécie é considerada no *sensu lato*, seguindo a argumentação de Cabrera (1938, 1939) e Fleig (1985, 1987, 1989).

A espécie considerada neste estudo, *Schinus polygamus* (Cavanilles) Cabrera é um arbusto polimórfico, perene, com tamanho variando de 1-2,5 m de altura, sendo encontrado isoladamente ou como indivíduos agregados em pequenos grupos (Caballero & Lorini 2000). Segundo Oliveira (2005), a distribuição de *S. polygamus* (assobieira) para a América Latina é vasta, ocorrendo no Brasil desde o sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, tendo sido em muitos países introduzida como planta ornamental. Em alguns países, como o Chile, é utilizada na medicina local, como combustível ou plantada para cercamento (Burckhardt & Basset 2000). De acordo com Erazo *et al.* (2006), a infusão das folhas é utilizada para a limpeza de feridas e como antipirético e anti-inflamatório, a essência obtida do cozimento da casca para o tratamento de artrite e dores nos pés e a resina extraída da casca no alívio de dores musculares e nos tendões, fraturas e irritações da pele. Os autores atribuem estas propriedades farmacológicas a compostos secundários, tais como flavonóides, mono e sesquiterpenos. Sabe-se que vários destes compostos possuem atividade antimicrobiana e anti-herbivoria.

Os insetos indutores de galhas em *Schinus polygamus* pertencem à superfamília Psylloidea (Hemiptera) e às famílias Cecidomyiidae (Diptera) e Cecidosidae (Lepidoptera) (Sáiz & Núñez 1997). As galhas foliares de *Schinus* são induzidas por psiloídeos (Sáiz & Núñez 1997) e pertencem a dois gêneros, *Calophya* (Calophyidae) e *Tainarys* (Psyllidae: Rhinocolinae), sendo as espécies relacionadas a *Schinus polygamus*: *C. andina*, *C. duvauae*, *C. rubra*, *C. scrobicola*, *C. mammifex*, *Tainarys maculipectus*, *T. schini* e *T. venata* (Burckhardt & Basset 2000).

Dentre as ordens de insetos galhadores, grande destaque tem sido dado a Hymenoptera e Diptera. Os Hemiptera, por sua vez, aparecem em um número relativamente menor de investigações, principalmente na região neotropical (Gonçalves-Alvim & Fernandes 2001, Maia & Fernandes 2004, Oliveira & Maia 2005). As espécies de Hemiptera com hábito galhador estão distribuídas em quatro superfamílias: Aphidoidea, Psylloidea, Coccoidea e Aleyrodoidea (Raman 2003). Psylloidea compreende cerca de 3000 espécies descritas, sendo mais abundante nos trópicos e em regiões temperadas do hemisfério sul; a região Neotropical é, provavelmente, a mais rica em espécies de psiloídeos de todas as regiões biogeográficas (Burckhardt 2005). Os Psylloidea são geralmente específicos ao hospedeiro, particularmente durante sua fase ninfal, composta de cinco instares. As ninfas de psiloídeos galhadores apresentam modificações morfológicas em relação àqueles de vida livre, como formato corporal mais arredondado e patas mais curtas. Muitas ninfas são recobertas total ou parcialmente por ceras e sua

atividade alimentar é responsável pela indução da maioria das galhas de psiloídeos. (Burckhardt 2005). Raramente o adulto causa deformações na planta hospedeira (Burckhardt 2005).

Sendo portadores de aparelho bucal perfurador-sugador, que é inserido no tecido vegetal, os Hemiptera induzem uma variedade de tipos de galhas, das mais simples as mais complexas (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992). O seu aparelho bucal é constituído por uma probóscide contendo dois pares de estiletos: um injeta saliva e outro suga os fluidos de uma planta ou animal (Gullan & Martin 2003). A glândula salivar destes insetos tem função excretora e contém altos níveis de enzimas, dentre outras substâncias, que podem estar relacionadas com a sua fitopatogenicidade (Ribeiro 1995, Hori 1992). A maioria dos hemípteros é sugadora de floema e xilema (Rodrigues *et al.* 2007), embora algumas espécies se alimentem no parênquima cortical ou no mesófilo (Meyer 1987, Rohfritsch & Anthony 1992, Burckhardt 2005).

Associados à relação espécie-específica que se estabelece entre galhador e planta hospedeira muitos outros níveis tróficos ocorrem, sendo freqüente nestes sistemas a presença de parasitoides e inquilinos (Wiebes-Rijks & Shorthouse, 1992, Abrahamson & Weis 1997, László & Tóthmérész 2006). Estes alteram a dinâmica populacional dos indutores, por provocarem sua mortalidade (Ferreira *et al.* 1990, Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992, László & Tóthmérész 2006). A presença de outros integrantes nas galhas de *Schinus* é descrita na literatura (Burckhardt & Basset 2000), havendo relatos, inclusive, de endoparasitoides em *S. polygamus* (Sáiz & Núñez 1997).

O fato da morfologia da galha refletir a filogenia dos galhadores e não a filogenia das plantas hospedeiras, em muitos dos casos estudados (Abrahamson & Weis 1997, Crespi & Worobey 1998, Nyman 2000) demonstra que a localização e a forma da galha são determinadas pelo galhador, sendo, portanto, a galha um fenótipo estendido deste (Dawkins 1982). A maioria das cerca de 13000 espécies de insetos capazes de induzir galhas em plantas (Stone & Schrönrogge 2003) é estritamente específica a sua planta hospedeira (Meyer 1987, Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992), sendo cada morfotipo de galha típico da espécie que o induziu (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992, Redfern & Askew 1992, Cuevas-Reyes *et al.* 2007, Raman 2007). Esta especificidade, no entanto, parece ser restritiva apenas em relação ao inseto, uma vez que uma mesma planta hospedeira pode responder a estímulos de galhadores diferentes, como é verificado nas chamadas super-hospedeiras. Além disso, podem existir limites filogenéticos impostos pela planta, como é observado no fato de, além de responder a estímulos de galhadores

diferentes, a planta ser capaz de responder a estímulos de organismos que modificam estas estruturas, como é o caso dos inquilinos (Ferraz & Monteiro 2003, László e Tóthmérész 2006).

A definição destes limites face à entrada no sistema de parasitoides e predadores torna a questão das respostas morfogênicas nos sistemas planta hospedeira-guilda associada um amplo laboratório vivo a ser explorado. Além disso, as alterações estruturais e químicas decorrentes do processo de formação das galhas têm grande influência na manutenção do ciclo de vida dos galhadores, e conseqüentemente, dos demais herbívoros associados.

Sendo assim, este trabalho tem por objetivos gerais:

- 1) Caracterizar o sistema *Calophya* aff. *duvauae* Scott-*Schinus polygamus*, identificando possíveis sítios preferenciais de indução, alterações na área foliar, estágios de desenvolvimento do indutor e da galha e alterações nos pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores;
- 2) Traçar a ontogenia da folha e da galha de *Calophya* aff. *duvauae* Scott em *Schinus polygamus*;
- 3) Identificar alterações anatômicas provocadas nos tecidos da galha por inquilinos e parasitoides, além de alterações populacionais entre estes insetos em relação à cor da galha e ao longo do tempo e;
- 4) Verificar alterações histoquímicas decorrentes da indução e da entrada de inquilinos e parasitoides no sistema.

Referências bibliográficas

- ABRAHAMSON WG & WEIS AE (1997). Evolutionary ecology across three trophic levels: goldenrods, gall-makers and natural enemies. Monographs in population biology 29. Princeton University Press.
- BARKLEY FA (1944). *Schinus* L. *Brittonia* 5: 160–198.
- BURCKHARDT D & BASSET Y (2000). The jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): systematics, biogeography and host plant relationships. *Journal of Natural History*, 34: 57–155.
- BURCKHARDT D (2005). Biology, ecology, and evolution of gall-inducing Psyllids (Hemiptera: Psylloidea). In Biology, ecology, and evolution of gall-inducing

- arthropods (Raman, A., Schaefer, C.W. & Withers, T.M., eds). *Science Publishers*, Plymouth, UK.
- CABALLERO PP & LORINI H (2000). Does resource concentration affect attack by galling and folivorous insects on *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr. (Anacardiaceae)? *Revista Chilena de Entomología*, 26: 89-92.
- CABRERA AL (1938). Revisión de las Anacardiáceas austroamericanas. *Revista de lo Museu de La Plata*, 2: 1-64.
- CABRERA AL (1939). Sinopsis de las Anacardiáceas Argentinas. *Revista Argentina del Agronomía*, 6: 85-113.
- CUEVAS-REYES P, QUESADA M, HANSON P & OYAMA K (2007). Interactions among three trophic levels and diversity of parasitoids: a case of top-down processes in mexican tropical dry forest. *Environmental Entomology*, 36(4): 792-800.
- CRESPI BJ, CARMEAN DA & CHAPMAN TW (1997). Ecology and Evolution of galling thrips and their allies. *Annual Review of Entomology*, 42: 51–71.
- CRESPI BJ & WOROBEY M (1998). Comparative analysis of gall morphology in Australian gall thrips: the evolution of extended phenotypes. *Evolution*, 52: 1686-1696.
- DAWKINS R (1982). The extended phenotype: the gene as the unit of selection. Oxford: *Oxford University Press*.
- DREGER-JAUFFRET F & SHORTHOUSE JD (1992). Diversity of gall-inducing insect and their gall. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- ERAZO S, DELPORTE C, NEGRETE R, GARCÍA R, ZALDÍVAR M, ITURRA G, CABALLERO E, LOPEZ JL & BACKHOUSE N (2006). Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 395–400.
- FLEIG M (1979). Estudo taxonômico da família Anacardiaceae no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado, *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre.
- FLEIG M (1985). Análise da variação foliar de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr., ANACARDIACEAE. *Iheringia*, Ser. Bot., Porto Alegre, 33: 3-16.
- FLEIG M (1987). Anacardiaceae. *In*: Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul. v.18. *Boletim do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
- FLEIG M (1989). Anacardiáceas. *In*: Flora Ilustrada Catarinense. *Herbário Barbosa Rodrigues*.

- FERNANDES GW & PRICE PW (1992). The adaptive significance of insect gall distribution: survivorship of species in xeric and Mesic habitats. *Oecologia*, 90: 14-20.
- FERRAZ FFF & MONTEIRO RF (2003). Complex interactions involving a gall midge *Myrciomyia maricaensis* Maia (Diptera, Cecidomyiidae), phytophagous modifiers and parasitoids. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(3): 433-437.
- FERREIRA SA, FERNANDES GW & CARVALHO LG (1990). Biologia e história natural de *Euphaleurus ostreoides* (Homoptera: Psillidae) Cecidógeno de *Lonchocarpus guillerminianus* (Leguminosae). *Revista Brasileira de Biologia*, 50(2): 417-423.
- GONÇALVES-ALVIM SJ & FERNANDES GW (2001). Biodiversity of galling insects: historical, community and habitat effects in four neotropical savannas. *Biodiversity and Conservation*, 10: 79–98.
- GULLAN PJ & MARTIN JH (2003). Sternorrhyncha (jumping plant-lice, whiteflies, aphids, and scale insects). In: Encyclopedia of Insects (Resh, VH & Cardé R T, eds.),. *Academic Press*, Amsterdam.
- HARTLEY SE (1998). The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by gall-former? *Oecologia*, 113: 492-501.
- HAWKINS BA, CORNELL HV, & HOCHBERG ME (1997). Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, 78(7): 2145–2152.
- HORI K (1992). Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- ISAIAS RMS (1998). Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. Departamento de Botânica, *Universidade de São Paulo*, São Paulo.
- LÁSZLÓ Z & TÓTHMÉRÉSZ B (2006). Inquiline effects on a multilocular gall community. *Acta Zoologica Scientiarum Hungaricae*, 52(4): 373-383.
- MAIA VC & FERNANDES GW (2004). Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil) *Brazilian Journal of Biology*, 64 (3A): 423-445.
- MANI MS (1964). Ecology of plant galls. The Hague (The Netherlands): *Dr. W. Junk Publishers*. The Netherlands.
- MANI MS (1992). Introduction to Cecidology. In *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.

- MENDONÇA-JR MS (2007). Plant diversity and galling arthropod diversity searching for taxonomic patterns in an animal-plant interaction in the Neotropics. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 42 (3-4): 347 – 357.
- MEYER J (1987). Plant galls and Gall inducers. *Gebrüder Bornträger*. Berlin.
- NYMAN T (2000). Phylogeny and ecological evolution of gall-inducing sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *University of Joensuu*, PhD Dissertations in Biology, 6.
- NÚÑEZ C & SÁIZ F (1994). Cecidios en vegetación autóctona de Chile de clima mediterráneo. *Anais del Museo de Historia Natural*, 22: 57-80.
- OLIVEIRA JC & MAIA VC (2005). Ocorrência e caracterização de galhas de insetos da Restinga da Grumari (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro, 63(4): 669-675.
- OLIVEIRA JMS (2005). Gênero *Schinus* L. (Anacardiaceae): características embriológicas e a circunscrição das espécies ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Tese de Doutorado.
- PRICE PW, WARING GL & FERNANDES GW (1986). Hypothesis on the adaptive nature of galls. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 88: 361-363.
- PRICE PW, FERNANDES GW & WARING GL (1987). Adaptive nature of insect gall. *Environment Entomology*, 16: 15-24.
- RAMAN A (2003). Cecidogenetic behaviour of some gall-inducing thrips, psyllids, coccids, and gall midges, and morphogenesis of their galls. *Oriental Insects*, 37: 359-413.
- RAMAN A, SCHAEFER CW & WITHERS TM (2005). Galls and gall-inducing arthropods: an overview of their biology, ecology and evolution. *In* Biology, Ecology and Evolution of Gall-Inducing Arthropods (Raman, A., Schaefer, C.W. & Withers, T.M., eds). *Science Publishers Inc.*, Plymouth, UK.
- RAMAN A (2007). Insect-induced plant galls of India: unresolved questions. *Current Science*, 92: 748-757.
- REDFERN M & ASKEW RR (1992). Plant galls. *Richmond Publishing Co Ltd*.
- RIBEIRO JMC (1995). Insect saliva: function, biochemistry, and physiology. *In*: Regulatory mechanisms in insect feeding.(Chapman RF, DeBoer G, eds.) New York, *Chapman & Hall*.
- RODRIGUES D, SAMPAIO DS, ISAIAS RMS & MOREIRA GRP (2007). Xylem and seed feeding by two passion vine leaf-footed bugs, *Holymeria clavifera* and *Anisoscelis*

- foliacea marginella* (Hemiptera: Coreidae: Anisoscellini), with notes on mouthpart morphology. *Annals of the Entomological Society of America*, 100(6): 907-913.
- ROHFRITSCH O & ANTHONY M (1992). Strategies on gall induction by two groups of homopterans. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfritsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- ROSKAM JC (1992) Evaluation of the gall-inducing guild. *In*: Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfritsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- SÁIZ F & NÚÑEZ C (1997). Estudio ecológico de las cecidias del género *Schinus*, especialmente las de hoja y de rama de *Schinus polygamus* y *Schinus latifolius* (Anacardiaceae), em Chile Central. *Acta Entomológica Chilena*, 21: 39-59.
- SCHRÖNROGGE K, HARPER LJ & LICHTENSTEIN CP (2000). The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment*, 23: 215-222.
- SIMPSON MG (2006). Plant Systematics. *Elsevier Academic Press*, Oxford.
- STONE GN & COOK JM (1998). The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Proceedings of the Royal Society, Series B* 265, 1-10.
- STONE GN & SCHÖNROGGE K (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(10): 512-522.
- WIEBES-RIJKS AA & SHORTHOUSE JD (1992). Ecological Relationships of Insects Inhabiting Cynipid Galls. *In* Biology of Insect-Induced Galls (Shorthouse JD & Rohfritsch O, eds). *Oxford University Press*, p. 238-257.

**O sistema *Schinus polygamus* (Cav). Cabrera
(Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauae* Scott
(Hemiptera: Calophyidae)**

O sistema *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae)

Resumo

Schinus polygamus é uma super-hospedeira de herbívoros galhadores, dentre os quais destaca-se *Calophya* aff. *duvauae* Scott, o qual induz galhas cuja coloração varia de vermelho vivo a verde na superfície adaxial. Neste estudo, coletas trimestrais foram realizadas entre junho de 2008 e março de 2009, com o objetivo de caracterizar o sistema *S. polygamus*-*Calophya* aff. *duvauae* de uma população localizada na cidade de Canguçu, Rio Grande do Sul, Brasil. Verificou-se que as galhas são induzidas preferencialmente na região mediana da folha (53,2%) e não se constatou alterações significativas na área foliar de folhas galhadas. Indutores de primeiros ínstaes foram encontrados em todas as amostras do ano, caracterizando o ciclo de vida como multivoltino. Existe uma relação relativamente alta entre o ínstar do indutor e o tamanho da galha, com galhas maiores correspondendo aos ínstaes finais. A proporção entre galhas verdes (GVD) e vermelhas (GVM) variou ao longo das amostras, com maior (96%) e menor (38%) quantidade de galhas vermelhas nos meses de setembro e dezembro, respectivamente. Alterações nos teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*, totais e carotenóides) e fotoprotetores (antocianinas) foram constatadas, sendo o teor médio de clorofilas *a* e *b* e clorofilas totais 70% menor nas galhas quando comparado às porções intactas das folhas galhadas (PIFG). O teor de carotenóides foi menor e a razão clorofila *a/b* maior nas GVM em relação às demais amostras. O teor médio de antocianinas totais diferiu em todas as amostras, sendo consideravelmente maior nos limbos foliares quando comparado às galhas. Folhas não galhadas apresentaram o maior teor de antocianinas totais, seguido pelas partes da folha próximas às GVM e GVD. Estas últimas apresentam cerca de quatro vezes menos antocianinas em relação às folhas não galhadas. Alterações na proporção entre GVD e GVM e nos pigmentos relacionam-se com a presença de inimigos naturais, como parasitoides e inquilinos e/ou microorganismos patogênicos, que causam morte prematura ou diminuição gradual do estímulo responsável pela manutenção da estrutura e da cor da galha vermelha.

Palavras-chave: antocianinas, área foliar, assobieira, calofídeos, clorofilas, galhas, infestação

Abstract

Schinus polygamus is a super-host of galling herbivores, including *Calophya* aff. *duvauae* Scott one of the most common, which induces green or red galls on the adaxial surface of the leaf. The collections were performed in three-month intervals between June 2008 and March 2009, with the objective of characterizing *S. polygamus*-*Calophya* aff. *duvauae* system in a population located in Canguçu Municipality, Rio Grande do Sul, Brasil. These galls are preferentially induced in the mid portion of the leaf (53.2%) and there was no significant change in leaf area because of gall development. Immature insects were observed in all samples along one-year time, characterizing the life cycle of *Calophya* aff. *duvauae* Scott as multivoltine. There is a relatively high correlation between the instars of the inducer and the size of the gall, with larger galls corresponding to more advanced instars. The ratio between red (RG) and green (GG) galls varied over the samples, with the highest (96%) and lowest (38%) frequency of red galls observed in September, and December 2008, respectively. Changes in the levels of photosynthetic (chlorophyll *a* and *b*, total chlorophylls, and carotenoids), and protective pigments (anthocyanins) were found, and the average amounts of chlorophyll *b* and total chlorophylls are 70% lower in galls when compared to intact portions of galled leaves (IPGL). The contents of carotenoids was lower and the ratio of chlorophyll *a/b* higher in RG for the other samples. The average content of total anthocyanins differed in all samples and was considerably higher in the leaf when compared to galls. IPGL have the highest content of anthocyanins, followed by the portions of the leaf near the RG and GG. The latter have about four times less anthocyanins when compared to IPGL. Changes in the ratio of pigments in RG and GG were related to the presence of parasitoids and / or pathogenic microorganisms that caused premature death or gradual decrease in the stimuli responsible for maintaining the structure and color of the red galls.

Key words: anthocyanins, calophyids, chlorophylls, galls, infestation, leaf area, Peruvian peppertree

Introdução

Galhas são estruturas compostas de tecidos vegetais diferenciados que fornecem abrigo, proteção e nutrição ao indutor e seus descendentes (Shorthouse *et al.* 2005). A relação entre a planta hospedeira e o galhador é geralmente espécie-específica (Redfern & Askew 1992), havendo para cada morfotipo de galha um único inseto indutor relacionado. A galha é, portanto, um fenótipo estendido deste (Dawkins 1982), com tecidos vegetais modificados em sua função.

Para haver sucesso na relação parasítica que resulta na galha, a escolha do local para a oviposição é crucial para o galhador, uma vez que a galha é sésil e será a estrutura em cujo interior este irá passar parte ou todo o seu ciclo de vida (Weis *et al.* 1988, Rohfritsch 1992, Mendonça Jr. 2001). Sendo assim, parece haver uma tendência evolutiva de oviposição em regiões mais centrais na planta hospedeira, como regiões basais da folha ou no caule (Price & Roininen 1993), conferindo vantagens adaptativas ao galhador, por evitar reações de abscisão e competição intra-específica e proporcionar melhor controle do fluxo de nutrientes (Nyman *et al.* 2000).

Muitas vezes este sucesso é tão grande que resulta em altos índices de infestação nas plantas hospedeiras (Vrcibradic *et al.* 2000, Gonçalves *et al.* 2005, Formiga *et al.* 2009) ou alterações nos padrões morfológicos destas, causando, por exemplo, redução na área foliar (Gonçalves *et al.* 2005).

Outro fator importante a ser considerado é o número de gerações dos indutores ao longo do ano, que está relacionado à disponibilidade de recursos e de sítios favoráveis de indução, havendo uma forte tendência de sincronização dos ciclos dos galhadores à fenologia da planta hospedeira (Fernandes *et al.* 1987, Weis *et al.* 1988, Rohfritsch 1992, Ferraz & Monteiro 2003). Dessa forma, em espécies de clima temperado e/ou decíduas, é compreensível que haja muitos casos de univoltinismo, o que não reflete necessariamente um padrão. Estudos de sistemas galhador-planta hospedeira são menos abundantes em locais com plantas perenes, como é o caso da região neotropical (Espírito-Santo & Fernandes 2007). Na superfamília Psylloidea (Ferreira *et al.* 1990, Sáiz & Núñez 1997, Yang & Raman 2007) e no gênero *Calophya* (Burckhardt & Basset 2000) são conhecidos exemplos de ciclos de vida uni e multivoltinos. *Schinus polygamus*, por ser uma espécie perene (Caballero & Lorini 2000) e com produção de folhas em diversos períodos do ano, oferece sítios periódicos para indução de galhas. Deste modo, espera-se encontrar

indutores jovens em qualquer época, o que caracterizaria o ciclo da espécie como multivoltino.

Além do ciclo de vida, outras inferências podem ser feitas associando-se o estágio de desenvolvimento do indutor à fase de crescimento da galha. Estas fases, de acordo com Rohfritsch (1992), correspondem à indução, crescimento e desenvolvimento, maturidade e senescência. Segundo a autora, na fase de indução iniciam-se as respostas bioquímicas e estruturais que resultarão nos tecidos da galha. Na fase de crescimento e desenvolvimento muitas divisões celulares resultam no grande aumento do tamanho e volume das galhas. Na fase de maturidade o galhador consome a maior parte dos recursos alimentares e completa seu ciclo de vida. Na senescência ocorre a saída do indutor e alterações teciduais se processam na galha, decorrentes da ausência do estímulo alimentar antes fornecido pelo galhador. Espera-se, portanto, que haja relação do ínstar do indutor com o tamanho da galha, considerando-se que o tamanho também se relaciona com a fase de desenvolvimento desta.

Schinus polygamus (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) é uma planta hospedeira de galhas e abriga sete morfotipos diferentes, induzidas por insetos pertencentes às famílias Cecidomyiidae (Diptera) e Cecidosidae (Lepidoptera) e à superfamília Psylloidea (Hemiptera) (Sáiz & Núñez 1997). Dentro de Psylloidea, os gêneros *Tainarys* (Psyllidae: Rhinocolinae) e *Calophya* (Calophyidae) possuem espécies galhadoras associadas a *Schinus*. Deste último gênero cinco espécies se associam a *Schinus polygamus*: *C. andina*, *C. duvauae*, *C. rubra*, *C. scrobicola* e *C. mammifex* (Burckhardt & Basset 2000).

Neste estudo são consideradas as galhas foliares induzidas por *Calophya* aff *duvauae* Scott (Hemiptera: Psylloidea). Estas variam de vermelho a verde, o que supostamente ocorre em mudanças na produção de pigmentos ou ainda por fatores abióticos ou bióticos. Sáiz e Núñez (1997), por exemplo, verificaram que há maior abundância de galhas vermelhas em *S. polygamus* no inverno e menor abundância destas no verão, fato que os autores associam a diferenças no conteúdo hídrico das folhas. Por outro lado, o estímulo constante por parte do galhador é responsável pela manutenção da estrutura da galha (Mani 1992) e, sendo assim, qualquer alteração neste estímulo, seja por agentes patogênicos ou parasitoides e/ou inquilinos pode alterar os padrões bioquímicos e estruturais provocados pelo indutor. A presença de parasitoides é registrada nas galhas de *C. duvauae* em *S. fasciculatus*, de *C. mammifex* em *S. latifolius* e *S. polygamus* e de *C. terebinthifolii* em *S. terebinthifolius* (Burckhardt & Basset 2000).

A adaptabilidade das galhas decorre comumente da capacidade dos galhadores de alterar as concentrações de compostos dos metabolismos primário e secundário (Motta *et al.* 2005), bem como de pigmentos fotossintetizantes (Yang *et al.* 2003, Castro 2007, Yang *et al.* 2007, Fleury 2009). Geralmente causa uma redução nestes, o que as torna fortes drenos de recursos (Weis *et al.* 1988, Raman *et al.* 2006) necessários a manutenção dos sistemas. Assim, não são criados novos padrões de translocação de fotoassimilados, mas há alterações nas rotas pré-existentes (Weis *et al.* 1988). As relações fonte-dreno dependem de um gradiente de concentração de sacarose, da distância entre a fonte e o dreno, das conexões vasculares entre eles, da força do dreno e da competição entre drenos próximos (Ho 1988, Burstein *et al.* 1994, Larson & Whitham 1997, Taiz & Zeiger 2004, Raman *et al.* 2006). Deste modo, o sucesso do galhador depende da capacidade de induzir uma galha que seja um ótimo dreno (Fay *et al.* 1996), o que é esperado devido ao baixo teor de pigmentos fotossintéticos das galhas.

Dentre estes pigmentos, clorofilas e carotenóides são responsáveis pela fotossíntese, enquanto antocianinas relacionam-se à proteção contra radicais livres e radiação ultravioleta (Zuanazzi 2000, Taiz & Zeiger 2004). Portanto, espera-se que as galhas vermelhas apresentem teores de antocianinas maiores em relação às galhas verdes e às folhas não galhadas, além de uma concentração menor deste pigmento nas regiões próximas às galhas vermelhas, pelo estabelecimento de um dreno de precursores das antocianinas. Esperam-se também alterações na concentração e proporções de pigmentos fotossintetizantes em função da ação do galhador.

Diante destas considerações, o estudo do sistema *Schinus polygamus-Calophya* aff. *duvauae* Scott tem por objetivos: (1) definir se há um sítio preferencial de indução; (2) caracterizar o nível de infestação de galhas na população estudada; (3) verificar o impacto da presença de galhas na área foliar; (4) relacionar o desenvolvimento de *C. aff. duvauae* Scott àquele das galhas; (5) verificar a proporção entre galhas verdes e vermelhas; (6) comparar as concentrações relativas de antocianinas, clorofilas (*a* e *b*, totais) e carotenóides encontradas em folhas não galhadas, porções intactas das folhas galhadas e nas galhas verdes e vermelhas.

Material e métodos

Área de estudo e hospedeira

Foi estudada uma população de *Schinus polygamus*, existente no Rincão da Ronda, terceiro distrito do município de Canguçu, Rio Grande do Sul (32°15'00"S, 65°58'00"W). A área consta de um campo nativo típico da Serra do Sudeste, integrante do Bioma Pampa (descrito em detalhe em Overbeck *et al.* 2007), onde os indivíduos de *S. polygamus* ocorrem isolados ou em pequenos grupos, principalmente no topo das coxilhas. Na propriedade amostrada (total = 86 ha), predomina a atividade pecuária extensiva de bovinos e ovinos há dois séculos. A região pode ser considerada árida em relação às demais do Estado. Os dados climáticos disponíveis de maior proximidade referem-se à cidade de Encruzilhada do Sul (distante aproximadamente 65 km), onde no período de 1931/60, a precipitação média anual foi de apenas 1485 mm (IPAGRO 1989). Nesse período houve predominância de verões relativamente secos, com precipitações médias de 76 e 92 mm para os meses de novembro e dezembro, respectivamente. A temperatura média anual foi de 16,5° C, com o mês mais frio correspondendo a julho (média de 11,6° C) e, o mais quente, fevereiro (média de 21,3° C).

Coleta do material

As coletas ocorreram em junho, setembro e dezembro de 2008 e março de 2009. Cada amostra consistiu de 10 ramos de 10 indivíduos diferentes, dos quais foram separadas 10 folhas por indivíduo, escolhidas aleatoriamente, independentemente de serem galhadas ou não. Em cada coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos, submetido à refrigeração e enviado para análises no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG. O material vegetal fértil está depositado no herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número ICN 42884.

Deteção de sítio de oviposição, proporção de galhas e nível de infestação

Em todas as amostras, a posição das galhas na folha foi avaliada por observação direta, em relação às seguintes posições: ápice, regiões mediana e basal, sobre nervuras

secundárias e região internervural. O número de galhas verdes e vermelhas em cada folha foi contado manualmente.

Para determinar o nível de infestação, dez indivíduos foram avaliados, em novembro de 2008. Em cada indivíduo, cento e cinquenta folhas, de ramos diferentes, foram analisadas, anotando-se o número de folhas galhadas e não galhadas e de galhas (n de galhas = 2895). Para esta análise foram consideradas galhas vermelhas mesmo aquelas levemente avermelhadas. A partir destes dados, calculou-se a porcentagem de folhas galhadas e não galhadas e de galhas vermelhas e verdes.

Relação entre o tamanho das galhas e o ínstar do indutor

De modo a verificar possíveis relações entre o tamanho da galha e do ínstar do indutor, os maiores diâmetro e altura das galhas foram medidos com auxílio de paquímetro digital (Digimess®, modelo 100.174B). Com base na medida de altura, foram criadas classes artificiais de tamanho (com intervalo de 1 mm). Posteriormente, considerando-se a cor, observada na superfície adaxial, as galhas foram separadas em três categorias: vermelhas, verdes e verde-avermelhadas. As galhas assim obtidas foram separadas em seis classes de tamanho e em três categorias de cores.

O material foi fixado em Karnovsky (O'Brien & McCully 1981, modificado para tampão fosfato pH 7,2) ou em FAA₅₀ (formaldeído 37%, ácido acético glacial e etanol 50%, 1:1:18, v/v) por 48 horas (Johansen 1940) e posteriormente estocado em etanol 70%. As galhas maiores de 1 mm (n = 733) foram dissecadas com auxílio de lâmina de barbear sob estereomicroscópio (Olympus® SZH) e reagrupadas, considerando-se o tamanho e a cor da galha, o ínstar do indutor e a presença de outros níveis tróficos. Os insetos e exúvias obtidos foram enviados a especialistas para identificação. As galhas dissecadas foram utilizadas em posteriores análises anatômicas e histoquímicas.

A morfologia ultra-estrutural externa das tecas alares dos indutores (ínstares 3 a 5) foi caracterizada conforme o seguinte protocolo: passagem por série acetônica crescente, desidratação em ponto crítico num aparelho BAL-TEC® CPD-030, montagem sobre suporte metálico, metalização com ouro (Paim *et al.* 2004) em um metalizador BAL-TEC® SCD-050, observação e geração de imagens em um microscópio eletrônico de varredura JEOL® JSM6060 ou LEO EVO® 40.

Análises morfométricas

Das quatro coletas realizadas foram avaliadas 258 folhas galhadas e não galhadas, escolhidas aleatoriamente, das quais foram estimadas as áreas, utilizando-se o programa gráfico *Quantikov Image Analyzer* (Pinto 1996).

Dosagem de pigmentos

Para quantificação dos teores dos pigmentos fotossintetizantes (clorofilas *a* e *b*, clorofilas totais e carotenóides) e fotoprotetores (antocianinas), quatro categorias foram analisadas: folha não galhada (FNG), parte intacta da folha galhada (PIFG), galha vermelha (GVM) e galha verde (GVD), com 20 repetições em cada amostra. Folhas totalmente expandidas foram utilizadas (n = 80, para clorofilas; n = 80 para antocianinas).

Para a quantificação dos teores de clorofilas e carotenóides, quatro discos de 0,44cm² foram retirados de cada um dos tratamentos. Nas amostras de galhas, estas foram mantidas no centro do disco, de modo a garantir uma área constante. Cada conjunto de quatro discos foi pesado, colocado em frascos âmbar contendo 5 ml de solução de acetona 80% e mantido sob refrigeração. Após cinco dias, as amostras foram maceradas em ambiente com baixa luminosidade, com o auxílio de almofariz e pistilo, sendo o volume do extrato ajustado para 10 ml. O extrato bruto obtido foi centrifugado a 3600 rpm por cinco minutos (centrífuga Fanem® Baby II modelo 2BL). O sobrenadante foi coletado e a absorbância medida em espectrofotômetro (Thermo Spectronic®, modelo 20 Genesys) nos comprimentos de onda 470, 646 e 663nm. A quantificação foi obtida segundo as equações propostas por Lichtenthaler e Wallburn (1983), sendo os valores corrigidos para unidade de massa fresca (MF). A partir dos dados obtidos foi calculada a razão clorofila *a/b*.

Para a quantificação do teor de antocianinas totais, quatro discos de 0,44cm² foram retirados de cada tratamento, pesados, colocados em frascos âmbar contendo 5 ml de solução extratora (etanol 95%: HCl 1,5N) (99:1, v/v) e mantidos sob refrigeração. Após cinco dias, as amostras foram maceradas e centrifugadas como realizado para a extração de clorofilas e carotenóides. O teor de antocianinas totais foi quantificado utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Antocianinas totais (mg.100g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{absorbância} \times \text{fator de diluição}}{E^{1\%}_{1\text{cm}}}$$

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

Análises estatísticas e representação gráfica

Análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa JMP (SAS Institute, US, 1989-2002). Foram feitos testes de normalidade (Teste de Shapiro Wilk). Quando satisfeitas tais premissas, os dados foram comparados por ANOVA, seguida de teste t de Student ou testes múltiplos de Tukey. Quando ao contrário, foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn. O teste de correlação de Pearson foi utilizado na comparação entre a variação ontogenética em tamanho do inseto indutor e da galha. Em todos os testes utilizou-se $\alpha = 0,05$. Os gráficos foram gerados pelo programa GraphPad Prism® para Windows, versão 5.0 (Motulsky 1992-2009).

Resultados

A planta hospedeira e as galhas

Schinus polygamus (Cav.) Cabrera apresenta porte arbustivo-arbóreo (fig. 1) e filotaxia alterna espiralada (fig. 2). Nas amostras analisadas, as folhas variavam em tamanho e forma entre os indivíduos, sendo geralmente elípticas, com limbo inteiro, ápice agudo, base atenuada e, em sua maioria, glabras. As galhas são induzidas por uma espécie nova de *Calophya* Löw próxima a *C. duvauae* Scott (Hemiptera, Psylloidea, Calophyidae) (Burckhardt D; *Naturhistorisches Museum*, Suíça, informação pessoal). A indução ocorre na superfície abaxial, preferencialmente em folhas recém-expandidas. Tais estruturas são sésseis, esféricas, isoladas ou agrupadas, projetadas para a superfície adaxial das folhas, com apenas um indutor por câmara ninfal. Sua coloração, na superfície adaxial, varia de vermelho vivo a verde, podendo apresentar gradações nas tonalidades (fig. 3, 4 e 5). Mesmo nas galhas vermelhas, a superfície abaxial permanece

verde. Quando senescentes, todas as galhas tornam-se verdes, e abrem-se totalmente na superfície abaxial (fig. 6).

Mais da metade das folhas encontravam-se galhadas (tabela 1). Houve um predomínio de galhas na região mediana da folha, seguida pelas regiões basal e apical. As galhas foram induzidas no mesófilo e o campo cecidogênico, com o desenvolvimento destas, atingiu nervuras secundárias, em mais da metade dos casos.

Outros níveis tróficos associados foram encontrados em 11,3% das galhas. A ocorrência de galhas senescentes apresentou variação, com maior registro (17,9%) em junho de 2008 e ausência em setembro de 2008. Em todas as amostras foram encontradas 3% de galhas fechadas, sem vestígio de indutor ou outro nível trófico associado.

A área de folhas galhadas não apresentou diferenças significativas quando comparada àquela das folhas não galhadas (ANOVA um fator, seguido pelo teste *t* de Student).

A proporção entre galhas verdes e vermelhas variou ao longo das amostras, com valores de 75,4%, 96,4%, 37,6% e 84,1% de galhas vermelhas nas amostras de junho, setembro e dezembro de 2008 e março de 2009, respectivamente. Os indutores presentes nas galhas verdes de dezembro apresentaram, em sua maioria, malformação dos olhos compostos e/ou outras partes do corpo. Excluindo-se esta amostra, 69% de todas as demais galhas verdes apresentavam inquilinos ou parasitoides.

Tabela 1: Variação temporal de características das galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) nas folhas de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) em Canguçu, RS.

	2008			2009	
	Junho	Setembro	Dezembro	Março	Médias
Posição das galhas na folha (%)					
Ápice	16	20,6	20,9	12,3	17,4
Região mediana	50,3	61,3	46,3	56,5	53,6
Região basal	33,7	18,1	32,8	31,2	29
Mesofilo	33,4	20,2	35,6	57,9	36,8
Sobre nervuras secundárias	66,6	79,8	64,4	42,1	63,2
Área foliar em mm² (Média ± SE)					
Folhas galhadas					196,63 ± 123,34
Folhas não galhadas					171,07 ± 116,83
Nível de infestação (%)					
Folhas galhadas			53,2		
Folhas não galhadas			46,8		
Galhas verdes			62,4		
Galhas vermelhas			37,6		
Cor das galhas (%)					
Galhas verdes	24,6	3,6		15,9	25
Galhas vermelhas	75,4	96,4		84,1	75
Composição das amostras (%)					
Galhas com indutor	65,2	83	88,9	77,5	78,7
Galhas com outros níveis tróficos	12,1	12,2	7,5	13,2	11,3
Galhas senescentes	17,9	0	3,2	7	7
Galhas vazias	4,8	4,4	0,4	2,3	3
Fases do indutor (%)					
1º ínstar	3,0	0,0	0,0	0,0	0,8
2º ínstar	19,5	0,0	21,4	32,0	18,2
3º ínstar	72,9	2,5	40,2	57,0	43,2
4º ínstar	4,6	0,0	29,0	7,0	10,2
5º ínstar	0,0	66,4	7,6	1,0	18,8
Adulto	0,0	31,1	1,8	3,0	9

O indutor

Calophya aff. *duvauae* Scott apresenta cinco ínstaes ninfais (fig. 7-16). Em todos os ínstaes, apresenta o corpo achatado dorso-ventralmente. O primeiro é caracterizado pelo formato arredondado, sem apêndices aparentes em vista dorsal (fig. 7). O abdômen apresenta-se menos longo do que largo, sendo pouco distinto do tórax, em vista dorsal. No segundo, embora também não sejam aparentes as tecas alares, ao contrário do primeiro, o abdômen é mais longo do que largo (fig. 8). No terceiro ínstar, as tecas alares são incipientes, representadas como pequenas protuberâncias no pterotórax, não se sobrepondo entre segmentos correspondentes (fig. 9 e 14). No quarto ínstar, as tecas alares mesotorácicas encontram-se bem desenvolvidas, dirigidas lateralmente, sobrepondo menos da metade do comprimento do metatórax (fig. 10 e 15). No quinto ínstar, tais estruturas encontram-se voltadas posteriormente, sendo que as mesotorácicas ultrapassam o comprimento total do metatórax (fig. 11 e 16). A fase adulta caracteriza-se pela presença de asas funcionais (fig. 12 e 13), dentre outros caracteres, sendo o macho distinto da fêmea por apresentar um edeago característico (fig. 12) e, a fêmea, um ovipositor apendicular curto (fig. 13).

Os diferentes ínstaes foram encontrados em todas as amostras. Os adultos, em três destas, indicando um ciclo de vida multivoltino (fig. 17, tabela 1). Indutores de primeiro ínstar foram raramente encontrados. Ninfas de terceiro ínstar, predominaram em junho e dezembro de 2008 e março de 2009, enquanto em setembro verificou-se maior número de ninfas de quinto ínstar e adultos.

Tabela 2: Variação temporal no tamanho (média \pm desvio padrão) das galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae), em Canguçu, RS.

		Classe de altura (mm)					
Amostras	n	0-1,0	1,1-2,0	2,1-3,0	3,1-4,0	4,1-5,0	$\geq 5,1$
Jun/2008	207	0,79 \pm 0,08	1,50 \pm 0,22	2,64 \pm 0,26	3,42 \pm 0,27	4,36 \pm 0,30	5,60 \pm 0,44
Set/2008	159	-	1,86 \pm 0,11	2,58 \pm 0,39	3,66 \pm 0,24	4,37 \pm 0,26	5,44 \pm 0,31
Dez/2008	252	0,87 \pm 0,10	1,58 \pm 0,24	2,51 \pm 0,31	3,49 \pm 0,26	4,38 \pm 0,31	5,49 \pm 0,44
Mar/2009	129	0,96 \pm 0,04	1,63 \pm 0,25	2,47 \pm 0,29	3,36 \pm 0,30	4,46 \pm 0,29	5,36 \pm 0,29

Galhas de todas as classes de tamanho foram encontradas nas amostras, com exceção daquelas menores que 1 mm em setembro de 2008 (tabela 2). Observou-se uma correlação relativamente alta ($y = 0,8524x + 0,6218$; $r = 0,675$; $n = 578$; $p < 0,001$) entre o tamanho da galha e o ínstar do indutor, correspondendo os ínstars maiores às galhas com maiores diâmetro e altura (fig. 18). Nas classes de tamanho 1 e 2 predominaram ninfas de segundo a quarto ínstar, enquanto nas classes 4 e 5 encontram-se mais insetos de quinto ínstar e adultos.

Pigmentos fotossintetizantes e fotoprotetores

O teor médio de clorofilas *a* e *b* e clorofilas totais foi significativamente menor (aproximadamente 70%) nas galhas quando comparado às porções não galhadas (tabela 3). Não houve diferença significativa destes pigmentos entre GVD e GVM ou entre FNG e PIFG para os teores de clorofila *a* e clorofilas totais. O teor de clorofila *b* diferiu entre FNG e PIFG. O teor de carotenóides foi semelhante em FNG, PIFG e GVD, havendo redução de cerca de 32% de seu teor em GVM, quando comparado ao valor médio obtido para FNG. A razão clorofila *a/b* foi maior em FNG e semelhante em PIFG, GVM e GVD.

O teor médio de antocianinas totais diferiu entre as amostras, sendo consideravelmente maior nos limbos foliares quando comparado às galhas. As FNG apresentaram o maior teor de antocianinas totais, seguidas por PIFG, GVM e GVD. Estas últimas apresentaram cerca de quatro vezes menos antocianinas em relação a FNG.

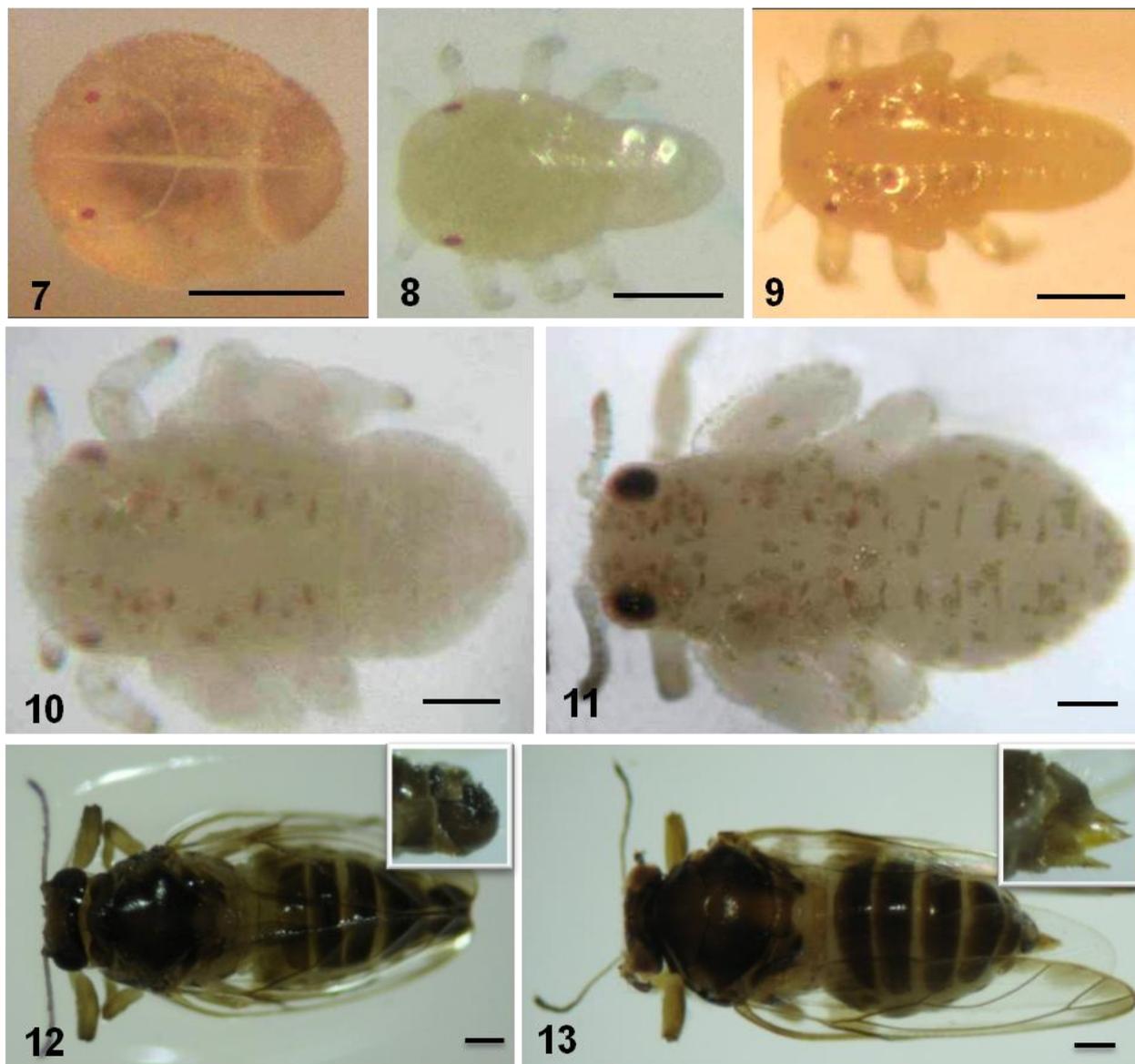
Tabela 3: Teor de pigmentos em folhas não galhadas (FNG), porções intactas das folhas galhadas (PIFG), galhas vermelhas (GVM) e galhas verdes (GVD) de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) em Canguçu, RS ($n = 20$; média \pm erro padrão; $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$).

Amostras	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides	Clorofila <i>a/b</i>	Clorofilas totais	Antocianinas totais
FNG	759,52 \pm 12,06a	148,13 \pm 8,29a	10,3 \pm 1,82a	7,26 \pm 2,5a	917,95 \pm 11,93a	21,09 \pm 1,79 a
PIFG	688,56 \pm 10,92a	234,83 \pm 7,46b	10,82 \pm 1,62a	3,06 \pm 0,93b	934,22 \pm 12,39a	17,04 \pm 1,98b
GVM	194,70 \pm 11,79b	46,36 \pm 4,33c	7,02 \pm 1,45b	4,39 \pm 1,62b	218,82 \pm 6,44b	9,68 \pm 1,64c
GVD	208,94 \pm 11,88b	61,94 \pm 4,86c	9,22 \pm 1,43a	3,34 \pm 1,35b	251,54 \pm 8,4b	5,13 \pm 0,97d

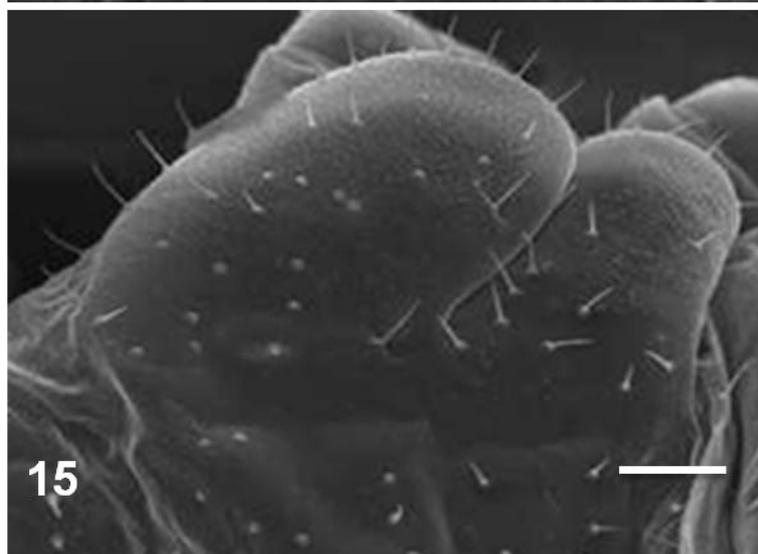
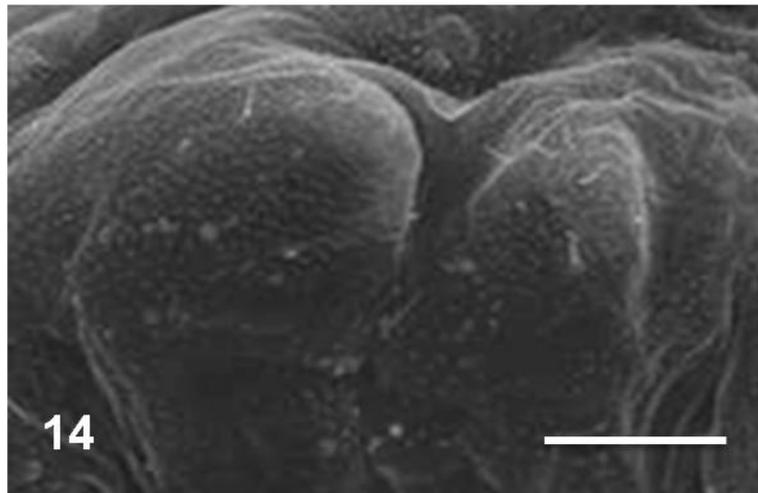
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn) ($\alpha = 0,05$).



Figuras 1-6: Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). 1) Aspecto geral da planta. 2) Gema apical e folhas jovens, contendo galhas em fase de crescimento e desenvolvimento. 3) Ramo com galhas com diferentes tonalidades. 4) Galha vermelha. 5) Galhas verdes. 6) Galha senescente. Barras: 2,4-6 = 0,5cm; 3 = 1cm.



Figuras 7-13: *Calophya* aff. *duvauae* (Hemiptera: Calophyidae), em vista dorsal, ao estereomicroscópio, no primeiro (7), segundo (8), terceiro (9), quarto (10) e quinto (11) instares; e, no estágio adulto, macho (12) e fêmea (13). Detalhes das figuras 12 e 13 mostram o edeago e ovipositor, respectivamente. Barras: 7-11 = 200 μ m; 12-13 = 400 μ m.



Figuras 14-16: Tecas alares de *Calophya* aff. *duvauae* (Hemiptera: Calophyidae), em vista dorsal, na microscopia eletrônica de varredura, no terceiro (14), quarto (15) e quinto (16) ínstares. Barras = 50 μ m.

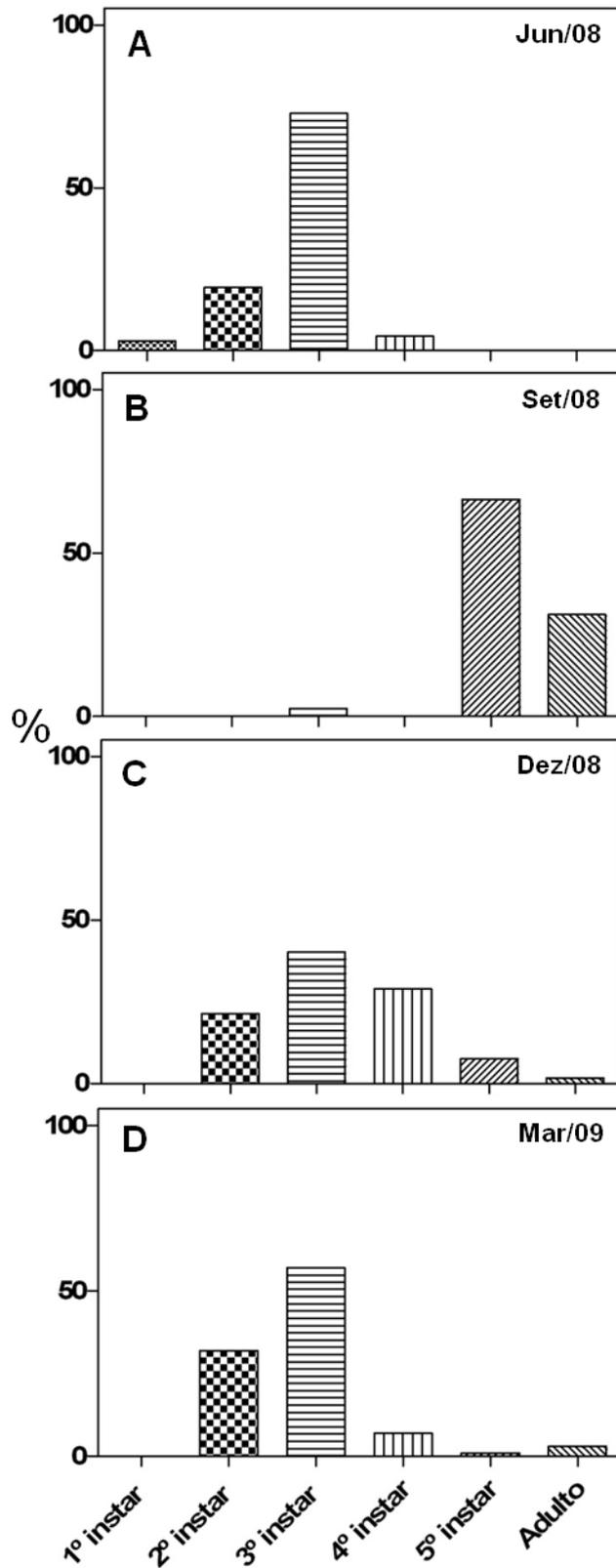


Figura 17: Variação numérica dentre as proporções de fases de desenvolvimento de *Calophya* aff. *duvauae* (Hemiptera: Calophyidae) de junho de 2008 a março de 2009, numa população de Canguçu, RS.

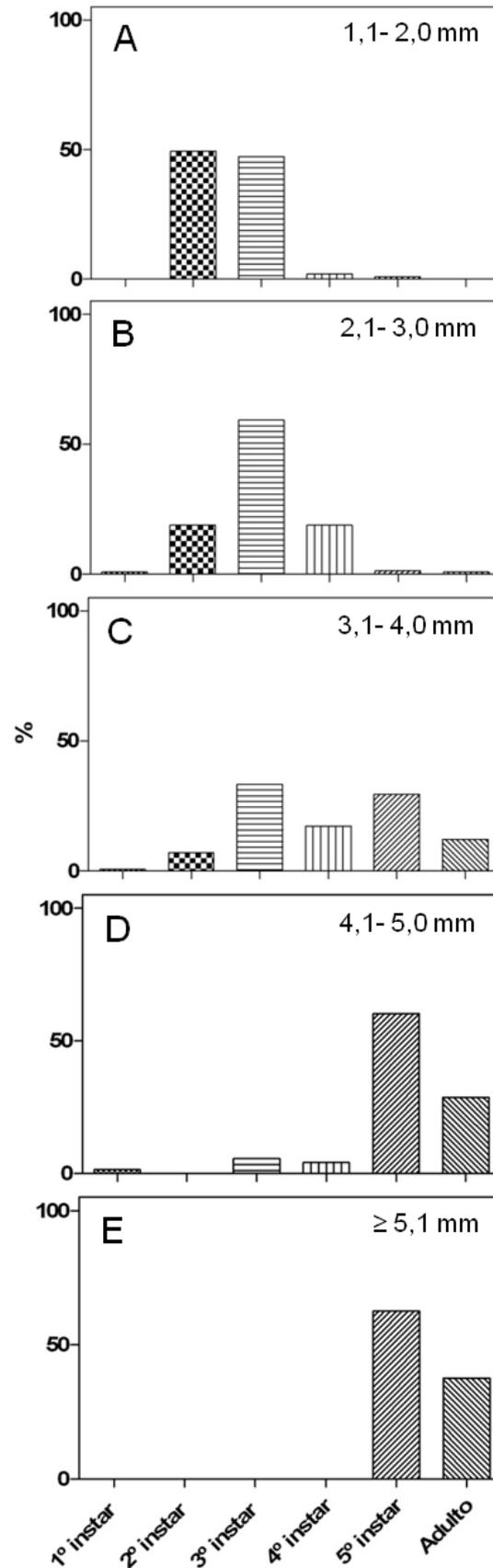


Figura 18: Variação temporal na proporção numérica dentre as fases de desenvolvimento de *Calophya* aff. *duvauae* (Hemiptera: Calophyidae) nas classes de tamanho das galhas em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): 1,1-2,0 mm (A), 2,1-3,0 mm (B), 3,1-4,0 mm (C), 4,1-5,0 mm (D) e $\geq 5,1$ mm (E).

Discussão

A maioria das galhas induzidas por *Calophya* aff. *duvauae* Scott em *Schinus polygamus* localiza-se na porção mediana das folhas, o que segundo Price e Roininen (1993) seria um caráter derivado dentro do hábito galhador. A região escolhida para a oviposição poderia interceptar mais nutrientes (Price & Roininen 1993) e melhorar a força do dreno gerado pela galha (Larson & Whitham 1997). No sistema em questão, o sítio preferencial de oviposição parece estar relacionado com um melhor aporte nutricional, um dos fatores responsáveis pela alta taxa de infestação observada, demonstrando o sucesso do galhador ao colonizar sua planta hospedeira, à semelhança do encontrado por Ferreira *et al.* (1990) em galhas de Psyllidae e Formiga *et al.* (2009) em galhas de Cecidomyiidae.

Este sistema apresenta um nível de infestação relativamente baixo (53,2% das folhas galhadas) quando comparado a outros sistemas, como *Aspidosperma spruceanum*-Cecidomyiidae, com 64% a 87% das folhas galhadas (Formiga *et al.* 2009) e *Rollinia laurifolia*-*Pseudotectococcus rolliniae*, com 93,8% das folhas com galhas (Gonçalves *et al.* 2005). Três aspectos são possíveis de estarem envolvidos com as explicações para este equilíbrio relativo nas galhas de *Schinus polygamus*: sítios de indução disponíveis todo o ano, teor de fenólicos e presença de inimigos naturais. No caso de galhadores de plantas decíduas, a época com sítios de indução disponíveis para novas galhas é muito restrita. Sendo assim, novas induções ocorrem em grande quantidade em um curto período de tempo, resultando em taxas semelhantes às encontradas por Gonçalves *et al.* (2005). Por ser uma espécie perene, as induções em *S. polygamus* podem ocorrer em várias épocas do ano, resultando na menor infestação observada. Já em *Aspidosperma spruceanum*, apesar do grande índice de infestação em todo o período amostrado, Formiga *et al.* (2009) encontraram as menores taxas de infestação nos períodos com maior concentração de substâncias fenólicas. Este fato poderia explicar, parcialmente, a menor taxa de infestação em *S. polygamus*, visto haver aparentemente grande concentração de substâncias fenólicas em suas folhas (Cf. Dias 2010, cap. 2). Por outro lado, a presença de parasitoides e inquilinos constatada no sistema também causa mortalidade dos indutores supostamente regulando em parte sua população (Ito & Hijji 2004, László & Tóthmérész 2006, Noort *et al.* 2007), sendo responsável, em alguns casos, por até 96% de mortalidade (Abrahamson & Weiss 1997). O índice relativamente baixo de galhas vazias (3%) reflete uma baixa mortalidade do indutor por causas outras além do

parasitoidismo verificado em 11% das galhas amostradas, valor quase três vezes maior que o encontrado por Sáiz e Núñez (1997) em galhas foliares de *S. polygamus* em uma população do Chile.

A indução de galhas de *C. aff. duvauae* Scott em *S. polygamus* ocorre preferencialmente em folhas jovens recém-expandidas. Contudo, induções também foram verificadas em folhas maduras, contradizendo o pressuposto de que as induções devem, necessariamente, ocorrer em tecidos ainda indiferenciados (Weis *et al.* 1988, Abrahamson & Weis 1997), que receberiam maior aporte de nutrientes e aminoácidos (Andrade *et al.* 1995). Induções em folhas maduras também foram detectadas para galhas de *Lantana camara* (Verbenaceae) (Moura *et al.* 2009) e em folíolos maduros de uma espécie não descrita de Diptera (Cecidomyiidae) em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), com diferenças anatômicas destas galhas em relação às induzidas pelo mesmo inseto em folíolos jovens (Oliveira & Isaias 2009). No caso de induções que ocorrem em folhas maduras, observa-se rediferenciação dos tecidos em volta do indutor, retornando à condição meristemática necessária à formação da galha (Cf. Dias 2010, cap. 2).

Em alguns sistemas, a formação da galha gera alterações da área foliar, um efeito marcante do parasitismo (Gonçalves *et al.* 2005, Castro 2007). Contudo, a presença de galhas em *Schinus polygamus* não alterou este parâmetro. Os altos valores de desvio padrão observados, tanto em folhas galhadas como não galhadas, decorrem da grande variabilidade fenotípica existente nesta espécie conforme descrito por Fleig (1985) e semelhantemente ao encontrado por Lima (2008) para galhas de Psyllidae em *Richeria grandis* (Annonaceae). Sendo assim, diferenças na área das folhas galhadas não seriam devidas às galhas, mas a diferenças no padrão de expansão das folhas. Além disso, a oviposição deste calofídeo pode ocorrer em folhas plenamente expandidas, com área foliar já definida, não havendo influência do galhador nestes casos, similarmente ao encontrado por Lima (2008).

Ínstares jovens foram observados em todas as amostras, o que é comum em plantas hospedeiras que apresentam crescimento durante todo o ano (Weis *et al.* 1988, Lara & Fernandes 1994). Este achado contraria Sáiz e Núñez (1997), que definem os indutores de galhas foliares, *Tainarys sordida* e *Calophya mammifex*, como univoltinos em *S. polygamus*. De fato, os galhadores necessitam de tecidos reativos ao estímulo de indução (Weis *et al.* 1988, Mendonça Jr. 2001) que, no caso, ocorre em folhas jovens ou expandidas. *Schinus polygamus* é sempre-verde, oferecendo sítios de indução ao longo

do ano, o que a torna uma espécie adequada para o desenvolvimento de herbívoros galhadores multivoltinos.

A ocorrência de grande quantidade de galhas senescentes em junho sugere maior emergência de adultos no período anterior. A ausência de galhas senescentes em setembro indica o início de uma nova fase de crescimento e/ou infestação entre junho e setembro. De fato, deve haver mais de uma geração entre as coletas, o que resta a ser elucidado em estudos futuros.

À medida que cresce e se alimenta, o contínuo estímulo do indutor mantém a estrutura e resulta no aumento sucessivo da galha, proporcional à mudança do ínstar. Segundo Rohfritsch (1992), a fase de indução se dá em resposta à oviposição ou à atividade alimentar da ninfa ou larva de primeiro ínstar. Na fase de crescimento e desenvolvimento, a galha aumenta muito sua biomassa e na fase de maturidade o inseto, que está no último estágio ninfal, consome a maior quantidade de alimento. Na fase de senescência, o indutor emerge da galha, que passa por grandes transformações fisiológicas e químicas. Deste modo, nas galhas de *C. aff. duvauae* Scott em *Schinus polygamus* as classes de tamanho entre 1,1 e 4,0 mm corresponderiam à fase de crescimento e desenvolvimento e as classes de tamanho acima de 4,1 mm, por abrigarem, quase que exclusivamente, indutores de quinto ínstar e adultos, corresponderiam a galhas em fase de maturação. Relação semelhante foi constatada por Ferreira *et al.* (1990) em galhas de *Euphalerus ostreoides*, outro Psylloidea, em *Lonchocarpus guilleminianus* (Fabaceae). Apesar de haver mais de um ínstar por classe de tamanho, observou-se uma correlação relativamente alta entre o tamanho da galha e ao ínstar do indutor, correspondendo os ínstars mais desenvolvidos às maiores galhas. Além das variações de tamanho, chama a atenção neste sistema a variação de cor e a proporção entre os tipos de galhas. Sáiz e Núñez (1997) relacionam esta característica a idades diferentes da mesma galha, sendo as galhas verdes fases anteriores às vermelhas, que corresponderiam ao estágio de maturação. Os resultados do presente estudo, porém, refutam esta afirmação, uma vez que se visualizaram galhas vermelhas portando ínstars jovens e galhas verdes com indutores de quinto ínstar. Os mesmos autores, em outro estudo (Sáiz & Núñez 2000), relacionam galhas de diferentes colorações à época do ano, em razão de diferentes disponibilidades hídricas. Nestas condições seriam encontrados, ainda, dois indutores diferentes: *Taynaris sordida* e *Calophya mammifex* cujas proporções variam de acordo com a cor da galha. Nas galhas vermelhas predominaria *C. mammifex*, com mais de 90% do total, enquanto nas galhas

verdes *T. sordida* seria a espécie predominante. A cor vermelha seria, portanto, um reflexo da maior disponibilidade hídrica e sob estas condições, *C. mammifex* se beneficiaria. Não há, porém, evidências da presença de mais de uma espécie de indutor para as galhas em estudo. De fato, houve variações sazonais da proporção de galhas verdes e vermelhas na população estudada, mas sempre com predomínio de galhas vermelhas, com exceção do observado em dezembro de 2008. As diferenças marcantes na proporção de galhas verdes e vermelhas observadas por Sáiz e Núñez (2000) não foram verificadas.

Neste sistema, a diferença de coloração pode estar relacionada a dois eventos: patologias do indutor ou a presença de parasitoides e inquilinos. Em dezembro de 2008, a proporção de galhas verdes foi maior, época na qual muitos indutores apresentavam malformações morfológicas. Nas demais amostras, foi grande o número de galhas com parasitoides e inquilinos associados (69%). Considerando que o estímulo do galhador é o responsável pela manutenção da estrutura (Mani 1964, Mani 1992, Abrahamson & Weiss 1997) e da cor vermelha característica da galha, agentes patogênicos e parasitoides ou inquilinos parecem provocar sua senescência fisiológica. Corrobora esta suposição o fato de todas as galhas senescentes serem verdes.

Embora *C. aff. duvauae* Scott não tenha causado alterações significativas na área foliar, aparentemente não havendo mudanças no padrão de diferenciação e expansão celular, outros parâmetros foram alterados, por exemplo o teor de pigmentos fotossintéticos. Os teores de clorofilas *a* e totais foram semelhantes entre FNG e PIFG (limbos foliares) e entre GVM e GVD (tipos de galhas), sendo maiores nos limbos quando comparados às galhas. Por outro lado, em relação ao teor de clorofila *b* e carotenóides, verificaram-se diferenças de PIFG e FNG, refletindo a influência do galhador não apenas em nível local, mas também em tecidos vizinhos à galha. A razão clorofila *a/b*, por sua vez, foi maior em FNG. De fato, há estudos demonstrando alterações bioquímicas e fisiológicas a nível local (Mani 1964, Motta *et al.* 2005) ou também em regiões próximas à galha, dependendo do composto analisado (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000).

A redução expressiva nos teores de clorofilas totais nas galhas demonstra a incapacidade destas em sintetizar todos os fotoassimilados necessários a sua manutenção, comportando-se, portanto, como dreno de recursos, como proposto por vários autores (Weis *et al.* 1988, Burstein *et al.* 1994, Schrönrogge *et al.* 2000, Raman *et al.* 2006, Álvarez *et al.* 2009). Esta redução nos pigmentos fotossintetizantes já foi reportada em outros sistemas (Khattab & Khattab 2005, Castro 2007, Fleury 2009) e pode ser devida à

realocação de esqueletos de carbono e nitrogênio para a síntese de compostos do metabolismo secundário nestas galhas (Yang *et al.* 2003, Fleury 2009).

FNG e PIFG apresentaram teores similares de pigmentos fotossintéticos e teores diferentes de antocianinas. Estes pigmentos relacionam-se à sinalização para polinizadores e dispersores, e protegem contra fatores de estresse, tais como radiação ultravioleta, radicais livres, temperaturas extremas, seca, infecções fúngicas e virais, injúrias e herbivoria (Zuanazzi 2000, Hatier & Gould 2009). A maior concentração de antocianinas ocorre em FNG em comparação às demais amostras. Apesar de possuir um menor teor, as regiões próximas às galhas mantiveram a capacidade de sintetizar quantidades relativamente grandes destes pigmentos.

Apesar do reduzido teor de antocianinas das galhas em relação a FNG, o estímulo do galhador é responsável por manter praticamente o dobro deste teor nas GVM quando comparadas às GVD. Nestas últimas, este estímulo diminuiu consideravelmente ou cessou, resultando em menores teores de antocianinas e, conseqüentemente, na cor verde observada. As GVM apresentam esta cor devido à redução de seu conteúdo de clorofilas totais que, em FNG, mascara o alto teor de antocianinas. Este padrão de alteração na cor da estrutura é relatado para folhas caducifólias, correspondendo a coloração avermelhada das folhas senescentes à degradação de clorofilas e, em alguns casos, a síntese de novas moléculas de antocianinas (Matile 2000).

As análises realizadas no sistema *S. polygamus-C. aff. duvauae* Scott permitem concluir que a indução de galhas na região mediana das folhas parece potencializar a força do dreno, refletido pela redução de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores. O nível de infestação foi menor que o verificado em outros sistemas, refletindo estabilização da população de indutores, pela presença de parasitoides e inquilinos e sítios de indução disponíveis durante todo o ano. Não houve alterações significativas na área foliar em decorrência da indução, o que se relaciona com a variabilidade fenotípica da planta hospedeira.

A variação na forma das tecas alares, utilizada para diferenciar os ínstaes no presente trabalho, está de acordo com outros trabalhos em Hemiptera, onde tal estrutura tem sido usada com tal finalidade (e.g. Southwood 1956, Rodrigues & Moreira 2005). Embora se constate que ínstaes mais desenvolvidos são encontrados em maior quantidade em galhas maiores, um mesmo tamanho de galha pode abrigar indutores em estágios diferentes de desenvolvimento, o que resta a ser explorado.

Em resumo, os dados sugerem que as galhas de *Calophya* aff. *duvauae* são vermelhas, sendo mantidas assim até a emergência do indutor, a menos que haja mudanças no curso da ontogênese deste. Ou seja, tornam-se verdes pela diminuição do estímulo do galhador, em virtude de sua morte ou menor taxa de alimentação, causada por parasitoidismo e/ou inquilinismo, o que se reflete na menor quantidade de clorofilas e antocianinas presente nestas galhas.

Referências bibliográficas

- ABRAHAMSON WG & WEIS AE (1997). Evolutionary ecology across three trophic levels: goldenrods, gall-makers and natural enemies. *Monographs in population biology* 29. Princeton University Press.
- ÁLVAREZ R, ENCINA A, PÉREZ HIDALGO N (2009). Histological aspects of three *Pistacia terebinthus* galls induced by three different aphids: *Paracletus cimiciformis*, *Forda marginata* and *Forda formicaria*. *Plant Science*, 176: 303-314.
- ANDRADE GI, SILVA IM, FERNANDES GW & SCATENA VL (1995). Aspectos biológicos das galhas de *Tomoplagia rudolphi* (Diptera: Tephritidae) em *Vernonia polyanthes* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 55 (4): 819-829.
- BURCKHARDT D & BASSET Y (2000). The jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): systematics, biogeography and host plant relationships. *Journal of Natural History*, 34: 57–155.
- BURSTEIN M, WOOL D & ESHEL A (1994). Sink strength and clone-size of sympatric, gall-forming aphids. *European Journal of Entomology*, 91: 57-61.
- CABALLERO PP & LORINI H (2000). Does resource concentration affect attack by galling and folivorous insects on *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr. (Anacardiaceae)? *Revista Chilena de Entomología*, 26: 89-92.
- CASTRO ACR (2007). Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- DAWKINS R (1982). The extended phenotype: the gene as the unit of selection. Oxford: *Oxford University Press*.

- ESPÍRITO-SANTO M M & FERNANDES GW (2007). How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they? *Annals of the Entomological Society of America*, 100(2): 95-99.
- FAY PA, PRESZLER RW & WHITHAM TG (1996). The functional resource of a gall-forming adelgid. *Oecologia*, 105: 199-204.
- FLEIG M (1985). Análise da variação foliar de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). *Iheringia, Série Botânica*, Porto Alegre, 33: 3-16.
- FLEURY G (2009). Reações estruturais, histoquímicas e fisiológicas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) a Cecidomyiidae galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- FERNANDES GW, MARTINS RP & TAMEIRÃO NETO E (1987). Food web relationships involving *Anadiplosis* sp. Galls (Diptera: Cecidomyiidae) on *Machaerium aculeatum* (Leguminosae). *Revista Brasileira de Botânica*, 10: 117-123.
- FERRAZ FFF & MONTEIRO RF (2003). Complex interactions involving a gall midge *Myrciamyia maricaensis* Maia (Diptera: Cecidomyiidae), phytophagous modifiers and parasitoids. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(3): 433-437.
- FERREIRA SA, FERNANDES GW & CARVALHO LG (1990). Biologia e história natural de *Euphaleurus ostreoides* (Homoptera: Psillidae) cecidógeno de *Lonchocarpus guillerminianus* (Leguminosae). *Revista Brasileira de Biologia*, 50(2): 417-423.
- FORMIGA AT, GONÇALVES SJMR, SOARES GLG & ISAIAS RMS (2009). Relações entre o teor de fenóis totais e o ciclo das galhas de Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* Müll. Arg. (Apocynaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 23(1): 93-99.
- GONÇALVES SJMR, ISAIAS RMS, VALE FHA & FERNANDES GW (2005). Sexual dimorphism of *Pseudotectococcus rollinae* Hodgson & Gonçalves 2004 (Hemiptera Coccoidea Eriococcidae) influences gall morphology on *Rollinia laurifolia* Schltld. (Annonaceae). *Tropical Zoology*, 18: 161-169.
- HATIER J-HB & GOULD KS (2009). Anthocyanin: Function in Vegetative Organs. In *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications* (Gould K *et al.* eds.). *Springer Science and Business Media*, New York.
- HO LC (1988). Metabolism and compartmentation imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 355-78.

- IPAGRO (1989). Seção de Ecologia Agrícola. Porto Alegre. *Atlas agroclimático do Estado do Rio Grande do Sul*. 3 vols.
- ITO M & HIJII N (2004). Roles of gall morphology in determining potential fecundity and avoidance of parasitoid attack in *Aphelonyx glanduliferae*. *The Japanese Forestry Society and Springer-Verlag*, 9: 93-100.
- JOHANSEN DA (1940). Plant microtechnique. New York, *McGraw-Hill Book Co. Inc.*
- KHATTAB H & KHATTAB I (2005). Responses of eucalypt trees to the insect feeding (gall-forming psyllid). *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(6): 979-984.
- LARA AC & FERNANDES GW (1994). Distribuição de galhas de *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 54 (4): 661-668.
- LARSON KC & WHITHAM TG (1997). Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia*, 109: 575-582.
- LÁSZLÓ Z & TÓTHMÉRÉSZ B (2006). Inquiline effects on a multilocular gall community. *Acta Zoologica Scientiarum Hungaricae*, 52(4): 373-383.
- LEES DH & FRANCIS FJ (1972). Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience*, 7(1): 83-84.
- LICHTENTHALER HK, WALLBURN AR (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592.
- LIMA FS (2008). Respostas estruturais e fisiológicas de *Richeria grandis* Vahl. (Phyllanthaceae) ao estabelecimento do Psyllidae galhador. Tese de Doutorado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- MANI MS (1964). Ecology of plant galls. The Hague (The Netherlands): *Dr. W. Junk Publishers*. The Netherlands.
- MANI MS (1992). Introduction to Cecidology. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- MATILE P (2000). Biochemistry of Indian summer: physiology of autumnal leaf coloration. *Experimental Gerontology*, 35: 145–158.
- MENDONÇA JR. MS (2001). Galling insect diversity patterns: the resource synchronization hypothesis. *Oikos*, 95: 171-176.
- MOTTA LB, KRAUS JE, SALATINO A & SALATINO MLF (2005). Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 971-981.

- MOTULSKY H (1992-2009). Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, GraphPad Software Inc.
- MOURA MZD, SOARES GLG & ISAIAS RMS (2009). Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina: Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 32(2): 271-282.
- NOORT SV, GRAHAM NS, WHITEHEAD VB & NIEVES-ALDREY JL (2007). Biology of *Rhoophilus loewi* (Hymenoptera: Cynipoidea: Cynipidae), with implications for the evolution of inquilinism in gall wasps. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90: 153-172.
- NYMAN T & JULKUNEN-TIITTO R (2000). Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*. 97(24): 13184-13187.
- NYMAN T, WIDMER A & ROININEN H (2000). Evolution of gall morphology and host-plant relationships in willow-feeding sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Evolution*, 54(2): 526–533.
- O'BRIEN TP, McCULLY ME (1981). The study of plant structure principles and selected methods. *Termarcarphi Pty*, Melbourne.
- OLIVEIRA DC & ISAIAS RMS (2009). Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of the midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista de Biologia Tropical*, 57(1-2): 293-302.
- OVERBECK GE, MÜLLER SC, FIDELIS A, PFADENHAUER J, PILLAR VD, BLANCO CC, BOLDRINI II, BOTH R & FORNECK ED (2007). Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 9: 101–116.
- PAIM AC, KAMINSKI LA, MOREIRA GRP (2004). Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. IV. *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). *Iheringia, Série Zoologia*, 94: 25-35.
- PINTO LMC (1996) Quantikov: um analisador microestrutural para o ambiente Windows. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- PRICE PW & ROININEN H (1993). Adaptive radiation in gall induction. In Sawfly life history adaptations to woody plants. (Wagner M & Raffa KF, eds.). *Academic Press*, New York.
- RAMAN A, MADHAVAN S, FLORENTINE SK & DHILEEPAN K (2006). Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema*

strenuana inferred from the signatures of isotopic carbon and nitrogen and concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119: 101-107.

- REDFERN M & ASKEW RR (1992). Plant galls. *Richmond Publishing Co Ltd*.
- ROHFRITSCH O (1992). Patterns in Gall Development. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfritsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- SÁIZ F & NÚÑEZ C (1997). Estudio ecológico de las cecidias del género *Schinus*, especialmente las de hoja y de rama de *S. polygamus* y *Schinus latifolius* (Anacardiaceae), em Chile Central. *Acta Entomológica Chilena*, 21: 39-59.
- SÁIZ F & NÚÑEZ C (2000). Cecidias de hoja y de rama de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): ¿Doble agente formador o secuencia temporal de cecidias formadas por huespedes diferentes? *Revista Chilena de Entomología*, 27: 57-63.
- SCHRÖNROGGE K, HARPER LJ & LICHTENSTEIN CP (2000). The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment*, 23: 215-222.
- SHORTHOUSE JD, WOOL D & RAMAN A (2005). Gall-inducing insects – Nature’s most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology*, 6: 407-411.
- SOUTHWOOD TRE (1956). A key to determine the instar of a heteropterous larva. *The Entomologist*, 89: 220-222.
- TAIZ L & ZEIGER E (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: *Artmed*.
- VRCIBRADIC D, ROCHA CFD & MONTEIRO RF (2000). Patterns of gall-forming in *Ossaea confertiflora* (Melastomataceae) by *Lopesia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae) in an area of Atlantic Rainforest in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 60(1): 159-166.
- WEIS AE, WALTON R & CREGO C L (1988). Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology*, 33: 467- 486.
- YANG MM & RAMAN A (2007). Diversity, richness, and patterns of radiation among gall-inducing psyllids (Hemiptera: Psylloidea) in the orient and eastern palearctic). *Oriental Insects*, 41: 55–65.
- YANG CM, YANG MM, HUANG MY, HSU JM & JANE WN (2003). Herbivorous insect causes deficiency of pigment-protein complexes in an oval-pointed cecidomyiid gall of *Machilus thunbergii* leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44: 314-321.

YANG CM, YANG MM, HUANG MY, HSU JM & JANE WN (2007). Life time deficiency of photosynthetic pigment-protein complexes CP1, A1, AB1 and AB2 in two cecidomyiid galls derived from *Machilus thunbergii* leaves. *Photosynthetica*, 45(4): 589-593.

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

**Desenvolvimento das folhas e das galhas
induzidas por *Calophya* aff. *duvauae* Scott
(Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus
polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)**

Desenvolvimento das folhas e das galhas induzidas por *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)

Resumo

Galhas resultam da alteração do padrão normal de desenvolvimento e da fisiologia do órgão vegetal de modo a beneficiar o indutor, conferindo-lhe abrigo, nutrição e um microambiente adequado. O estudo do desenvolvimento da folha não galhada de *Schinus polygamus* e das galhas foliares induzidas por *Calophya* aff. *duvauae* Scott, e análises cito e histométricas foram realizados em amostras provenientes de uma população localizada no município de Canguçu, Rio Grande do Sul, Brasil. A presença do ovo e, posteriormente, a atividade alimentar da ninfa provocam alterações nos sistemas de revestimento, fundamental e vascular nas folhas de *S. polygamus*. A epiderme adaxial rediferencia-se na epiderme adaxial da galha, o parênquima paliçádico origina o córtex externo adaxial da galha e o parênquima lacunoso origina os feixes vasculares e o córtex interno adaxial e o córtex abaxial da galha. A epiderme abaxial rediferencia-se na epiderme abaxial da galha e a epiderme que reveste a câmara ninfal. A galha madura caracteriza-se por um aumento no número de camadas celulares, da espessura do mesofilo e na área das células parenquimáticas, além da neoformação de feixes vasculares. Verificou-se diminuição da espessura da epiderme abaxial e da área das células das duas faces da epiderme. As alterações celulares que originaram a galha relacionam-se ao hábito alimentar sugador de *Calophya* aff. *duvauae* Scott, caracterizando-se pela homogenização do parênquima e ausência de tecido nutritivo e lignificação. O sistema *S. polygamus*-*Calophya* aff. *duvauae* Scott apresenta-se similar ao encontrado em outro sistema de sugadores, provavelmente devido à semelhança dos hábitos alimentares. As peculiaridades de cada sistema podem ser atribuídas ao número de indutores na câmara.

Palavras-chave: anatomia vegetal, desenvolvimento foliar, galhas de sugadores, histometria

Abstract

Gall induction causes changes in the patterns of plant development and physiology, which supposedly benefit the galling herbivores, by providing them with shelter, nutrition and an appropriate microenvironment to live. Studies on the development of non galled leaves and leaf galls induced by *Calophya* aff. *duvauae* Scott on *Schinus polygamus*, as well as histometric analysis and histochemical tests were performed in samples from a population of Canguçu Municipality, Rio Grande do Sul, Brazil. Oviposition and the feeding activity of the nymphs caused changes in dermal, fundamental, and vascular systems of the leaves of *S. polygamus*. The adaxial protoderm of non galled leaves originated the adaxial epidermis of the gall, the palisade parenchyma originates the outer cortex at the adaxial gall surface, and spongy parenchyma, the vascular bundles and the innermost layers of the adaxial and abaxial gall cortex. Mature galls presented greater number and area of parenchymatic cells, of mesophyll thickness as well as regarding rate of neoformation of vascular bundles. The epidermis was thinner on the abaxial surface, and cell area was reduced on both gall surfaces. The alterations of the gall cells were related to the feeding habit of *Calophya* aff. *duvauae* Scott, i.e., homogenization of parenchyma, and absence of nutritive tissue and cell walls lignification. *S. polygamus*-*Calophya* aff. *duvauae* Scott system is similar to that found in other sucking insects systems, due to the similarity of their feeding habits. The peculiarities of each system may be attributed to the number of inducers per chamber.

Palavras-chave: Hemipteran galls, histometry, leaf development, plant anatomy

Introdução

Grupos filogeneticamente relacionados de insetos galhadores tendem a influenciar de modo similar os tecidos vegetais (Rohfritsch 1992), especialmente se considerarmos seu hábito alimentar. As diferenças no tipo de alimentação dos galhadores podem explicar as diferenças morfológicas das galhas (Crespi & Worobey 1998), especialmente da região mais interna destas (Stone & Schönrogge 2003), onde pode haver a diferenciação ou não de um tecido nutritivo.

Uma vez que os psiloídeos (Hemiptera: Psylloidea) são geralmente sugadores de floema (Burckhardt 2005), induzem galhas nas quais, supostamente, não há diferenciação de um tecido nutritivo típico, apesar de alguns estudos citológicos mostrarem a indução de um tecido nutritivo de reserva (Meyer 1987, Oliveira *et al.* 2006).

Independentemente da formação ou não de um tecido nutritivo, a indução da galha por um dado inseto se dá em resposta à oviposição, atividade alimentar da ninfa de primeiro ínstar, ou, em alguns casos, à alimentação do imago durante a oviposição (Rohfritsch 1992). Acredita-se que as respostas teciduais que originarão a galha ocorram devido à ação combinada de injúria tecidual e substâncias presentes na saliva do indutor, que ocasionam um desbalanço metabólico e hormonal nos tecidos adjacentes (Hori 1992). Segue-se a este evento uma série de divisões celulares e hipertrofia das células (Mani 1964; Rohfritsch 1992, Isaias 1998; Oliveira *et al.* 2006), que aumenta em função da alimentação do indutor (Rohfritsch 1992). Ademais, as características anatômicas das galhas resultam de alterações no padrão normal de desenvolvimento do órgão vegetal hospedeiro.

Deste modo, acompanhar o desenvolvimento do órgão hospedeiro e compará-lo àquele da galha permite compreender os padrões de diferenciação dos tecidos foliares alterados pela ação do galhador ao longo de seu ciclo de vida. Paralela às observações estruturais, a quantificação destas alterações de hipertrofia e hiperplasia fornece subsídios para comparações estatisticamente confiáveis (Thiébalt 2000). Na flora neotropical, estudos semelhantes foram conduzidos nos sistemas *Copaifera langsdorffii*-Cecidomyiidae (Oliveira & Isaias 2009b) e *Lantana camara*-*Aceria lantanae* (Moura *et al.* 2009). Partindo do pressuposto que as peculiaridades das galhas estão relacionadas ao hábito alimentar dos galhadores, espera-se que os processos de diferenciação e rediferenciação observados no sistema *Schinus polygamus*-*Calophya* aff. *duvauae* Scott

sejam similares àqueles também induzidos por insetos sugadores, como observado, por exemplo, no sistema *Lantana camara-Aceria lantanae*.

Muito embora a presença de galhas em *S. polygamus* tenha sido relatada por diversos autores (Núñez & Sáiz 1994, Sáiz & Núñez 1997, 2000, Burckhardt & Basset 2000, Caballero & Lorini 2000, Burckhardt 2005), os aspectos de desenvolvimento envolvidos na interação desta espécie vegetal com *C. aff. duvauae* Scott permanecem desconhecidos. Sendo assim, o estudo do desenvolvimento da folha e das galhas de *C. aff. duvauae* Scott em *S. polygamus* tem por objetivos: (1) descrever o desenvolvimento do órgão hospedeiro, a folha, a fim de obter um padrão para a análise das alterações anatômicas induzidas pelo galhador; (2) descrever o desenvolvimento da galha induzida por *C. aff. duvauae* Scott em *S. polygamus*, verificando as mudanças estruturais ao longo do desenvolvimento em relação ao ciclo de vida do indutor; e (3) analisar alterações causadas pela indução na espessura dos tecidos e na área das células, quantificando reações de hipertrofia e/ou hiperplasia.

Material e métodos

Análises estruturais

Amostras de galhas em diferentes estágios de desenvolvimento foram obtidas de uma população de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) localizada em uma propriedade rural existente no Rincão da Ronda, município de Canguçu, Rio Grande do Sul (32°15'00"S, 65°58'00"W). As coletas ocorreram em junho, setembro e dezembro de 2008 e março de 2009. Cada amostra consistiu de 10 ramos de 10 indivíduos diferentes, dos quais foram separadas 10 folhas de cada indivíduo, escolhidas aleatoriamente, galhadas ou não galhadas e 6 porções apicais do caule. Em cada coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos, submetido à refrigeração e enviado para análises no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG. O material vegetal fértil está depositado no herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número ICN 42884.

Para análises estruturais, gemas apicais, folhas jovens e expandidas não galhadas, galhas e fragmentos com indícios de indução foram fixados em Karnovsky (O'Brien & McCully 1981, modificado para tampão fosfato pH 7,2), em FAA₅₀ (formaldeído 37%,

ácido acético glacial e etanol 50%, 1:1:18, v/v) por 48 horas (Johansen 1940) e posteriormente estocadas em etanol 70%.

Lâminas semipermanentes foram preparadas com seções transversais realizadas à mão livre com auxílio de lâmina de barbear em suporte de isopor. Estas seções foram submetidas à clarificação em hipoclorito de sódio comercial diluído a 50%, lavadas em água destilada, coradas com solução aquosa de azul de astra-safranina (9:1) (Kraus & Arduin 1997) e montadas com gelatina glicerinada de Kaiser (Johansen 1940).

Para a preparação de lâminas permanentes, fragmentos do terço médio das folhas não galhadas com cerca de 0,5 cm² e galhas dissecadas foram desidratados em série n-butílica (Johansen 1940) e infiltrados em Paraplast® (Kraus & Arduin 1997) em estufa a 60° C. Cortes transversais seriados (12-14 µm de espessura) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica® 2035 BIO CUT). Os cortes foram afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing 1974) e secos sobre placa aquecedora a 42° C. Após a retirada do Paraplast® com acetato de butila a 45° C em banho-maria, as seções foram hidratadas em série etílica decrescente. As lâminas foram imersas rapidamente em ácido acético 5%, lavadas em água destilada e coradas em solução aquosa de azul de astra-safranina (9:1) (Kraus & Arduin 1997). Posteriormente, os cortes foram banhados em água, desidratados em série etílica (Johansen 1940) seguida de acetato de butila absoluto e montados em verniz vitral incolor Acrilex® (Paiva *et al.* 2006). A presença de cristais foi verificada por luz polarizada; posteriormente a natureza química destes foi testada com solução aquosa de ácido sulfúrico (5-10%) (Chamberlain 1932).

Para os estudos em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), amostras dos fragmentos com indícios de indução e galhas separadas de acordo com a fase de vida do indutor foram fixadas em Karnovsky (O'Brien & McCully 1981, modificado para tampão fosfato pH 7,2), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por duas horas e desidratadas em série etílica crescente (Johansen 1940), seguida de ponto crítico com gás carbônico (Bal-Tec® CPD 030). O material foi fixado a um porta-amostras com auxílio de cola branca e metalizado (O'Brien & McCully 1981) com 30 nm de ouro em metalizador (Bal-Tec® SCD 050). A captura das imagens foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO® 40).

Para obtenção de epidermes isoladas, foram utilizadas 10 folhas não galhadas e 10 galhas maduras (com indutores de 4º ou 5º ínstar) dos quais foram obtidos fragmentos de cerca de 1 cm² de epidermes isoladas. Estes fragmentos foram submetidos à solução de hipoclorito de sódio comercial diluído a 50% à temperatura ambiente. Após destacamento,

as epidermes foram lavadas em água destilada e coradas com solução aquosa de safranina 0,5% em etanol 95% (Johansen 1940) e montadas com gelatina glicerinada de Kaiser (Johansen 1940).

Para o cálculo do índice estomático, foram contados os estômatos e as células epidérmicas em sete campos de 1 mm² dos fragmentos de folhas não galhadas (n = 35 campos) e das galhas maduras (n = 35 campos) com auxílio de câmara clara acoplada a microscópio óptico (Olympus CH 30). Este índice foi calculado segundo Cutter (1978).

Os cortes transversais de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento, galhas desde a indução até a senescência, bem como fragmentos epidérmicos, foram analisados e fotografados com câmera digital (Canon[®] Power Shot A630) em microscópio óptico (Olympus[®] BHS) ou estereomicroscópio (Zeiss[®] Stemi 2000-C). Diagramas foram feitos a partir de fotomicrografias no programa gráfico Adobe Photoshop CS[®] (Adobe Systems Inc. 1990-2003) com o auxílio de mesa digitalizadora (Trust[®] TB-6300).

As análises estruturais das folhas não galhadas e das galhas foram acrescidas de dados histométricos e citométricos. Estes dados foram obtidos a partir de fotomicrografias de cortes transversais da região mediana de cinco folhas não galhadas totalmente expandidas e de cinco galhas maduras, na região adaxial e oposta à abertura. O número de células foi contado a partir de um transecto. Avaliou-se a espessura do mesofilo das folhas não galhadas e da parede adaxial da galha, dos feixes vasculares na porção mediana e das epidermes adaxial e do revestimento da câmara (n = 40 campos). Avaliou-se a área das células do parênquima lacunoso nas folhas não galhadas e do córtex interno na galha e das células da face adaxial da epiderme e do revestimento da câmara (n = 50 campos).

As medições foram realizadas através do programa gráfico Axion Vision, Zeiss Imaging Systems, versão 4.7.2 (Zeiss 2008) e submetidas a análises estatísticas, realizadas com auxílio do programa JMP (SAS Institute, US, 1989-2002). Foram feitos testes de normalidade (Teste de Shapiro Wilk). Quando satisfeitas tais premissas, os dados foram comparados por ANOVA, seguida de testes múltiplos de Tukey. Quando ao contrário, foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de testes múltiplos de Dunn. Em todos os testes utilizou-se alfa = 0,05. Os gráficos foram gerados pelo programa GraphPad Prism[®] para Windows, versão 5.0 (Motulsky 1992-2009).

Resultados

Desenvolvimento foliar

Durante o desenvolvimento foliar diferencia-se primeiramente a protoderme, seguida do meristema fundamental, que por sua vez, origina o procâmbio. No mesófilo, o parênquima paliçádico é o último tecido a se diferenciar e a folha estará expandida, com tecidos completamente diferenciados no sexto nó. No ápice (fig. 1), observa-se o promeristema em início de diferenciação e as células da C1 mostram divisões anticlinais. No primeiro nó, o primeiro primórdio foliar apresenta dois dos meristemas primários diferenciados, a protoderme e o meristema fundamental (fig. 2). Na protoderme as divisões são anticlinais, e nas camadas submarginais ocorrem divisões anticlinais e periclinais (fig. 3).

No segundo nó, o primórdio foliar (fig. 4) apresenta protoderme com células em divisões anticlinais e meristema fundamental com mais camadas celulares. As células do meristema fundamental são isodiamétricas, produto de divisões anticlinais e periclinais. Na região mediana do meristema fundamental as células se dividem em vários planos e percebe-se a diferenciação do cordão procambial central, com células menores (fig. 5).

No terceiro nó, o meristema fundamental apresenta três regiões distintas, definidas de acordo com sua localização: meristema adaxial, abaxial e mediano (fig. 6). Observa-se a presença de um ducto secretor associado ao floema (fig. 7), com epitélio íntegro, sugerindo origem esquizógena. O meristema mediano apresenta maior número de camadas. As células do meristema abaxial são isodiamétricas (fig. 8), evidenciando a ocorrência de divisões peri e anticlinais. Verifica-se também um aumento na frequência de idioblastos com conteúdo fenólico, que começaram a ser visualizados a partir do segundo nó. Este aumento é gradual, ocorrendo ao longo do desenvolvimento da folha.

No quarto nó (fig. 9), o meristema adaxial apresenta divisões nos dois planos e alongamento das células no sentido anticlinal. Divisões periclinais do procâmbio são responsáveis pelo desenvolvimento do sistema vascular (fig. 10). O meristema mediano, além do sistema vascular, origina as camadas centrais do parênquima lacunoso, com 4-5 camadas de células isodiamétricas, enquanto o meristema abaxial forma duas camadas. Pode-se observar neste estágio o início da diferenciação das nervuras secundárias, que ainda não apresentam ductos secretores (fig. 11).

No quinto nó, a lâmina foliar apresenta parênquima paliçádico com duas camadas celulares alongadas anticlinalmente, um aumento no número de células do parênquima lacunoso e estômatos diferenciados (fig. 12). Na nervura principal, observam-se de dois a três ductos secretores associados ao floema.

No sexto nó, a lâmina foliar está completamente diferenciada e a região da nervura principal apresenta-se biconvexa (fig. 13). O sistema vascular é constituído por 3-5 unidades com arranjo colateral e crescimento secundário evidente (fig. 14 e 15). O floema acha-se voltado para a superfície abaxial da folha e possui ductos secretores associados (fig. 13 e 14). As células epiteliais e do parênquima vascular apresentam conteúdo fenólico. Na porção adaxial do córtex da nervura, pequenos cordões floemáticos isolados podem ser visualizados (fig. 16). Endoderme e periciclo possuem células com conteúdo fenólico, havendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio na endoderme de alguns indivíduos (fig. 14). Na região mais externa da nervura, internamente às epidermes, visualizam-se duas a três camadas de colênquima anelar e células parenquimáticas isodiamétricas (fig. 16 e 17). As células da epiderme nesta região apresentam aspecto papiloso e cutícula espessa (fig. 17). As nervuras secundárias possuem feixes colaterais e ductos secretores associados ao floema (fig. 18). As nervuras de menor calibre apresentam poucas células condutoras e não possuem ductos (fig. 19).

O mesofilo é dorsiventral (fig. 20), com parênquima paliçádico geralmente bisseriado, voltado para a superfície adaxial e parênquima lacunoso com número variável de camadas celulares entremeadas por feixes vasculares. Idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio estão presentes (fig. 21). A maioria das células dos parênquimas lacunoso e paliçádico apresenta acúmulo de polifenóis (fig. 20).

A folha é anfiestomática com células epidérmicas alongadas no sentido periclinal (fig. 20) e diferentes distribuições dos estômatos nas duas faces epidérmicas (fig. 22 e 23). O índice estomático foi de 11,48 na face abaxial e 4,26 na face adaxial. As células epidérmicas apresentam-se retangulares em vista frontal na região das nervuras. Há mais estômatos, que são ciclocíticos (fig. 24), na superfície abaxial. As demais células epidérmicas apresentam-se irregulares e com paredes levemente sinuosas (fig. 25). Raros tricomas tectores com células dispostas radialmente em torno destes foram observados (fig. 26). Com auxílio de luz polarizada, observam-se pequenos cristais na cutícula (areia cristalífera) (fig. 21).

Desenvolvimento da galha

As galhas foliares induzidas por *C. aff. duvauae* Scott em *S. polygamus* são esféricas, com coloração variando entre vermelho a verde e atingindo 5-6 mm de altura (fig. 27). A indução se dá na superfície abaxial da folha e promove uma depressão no limbo (fig. 28), seguida por formação de emergências cujos tricomas obliteram a abertura da galha na fase de crescimento e desenvolvimento. A fase de maturação (fig. 29) é caracterizada pelo maior tamanho da galha. Na fase de senescência ocorre suberificação da epiderme da câmara ninfal e da região de abertura.

Pode-se observar um ovo pedunculado (fig. 30) inserido entre duas células epidérmicas, causando aumento de fenólicos na região (fig. 30 e 31). Deste ovo, eclode uma ninfa de primeiro ínstar que se alimenta por inserção dos estiletos na epiderme, sendo responsável por continuar as alterações celulares iniciadas pela presença do ovo (fig. 32). O sistema vascular não apresenta alterações nesta fase.

A indução apresenta-se inicialmente como uma depressão (fig. 33) em torno da qual os tecidos vegetais se desenvolvem (fig. 34), envolvendo a ninfa. A epiderme abaxial e as células parenquimáticas adjacentes iniciam divisões em diferentes planos (fig. 35) e ocorre diferenciação de tricomas (fig. 36), que ocasionarão o fechamento da galha (fig. 37). Este fechamento é ocasionado pela justaposição dos tricomas (fig. 38), não havendo soldadura. A epiderme que reveste a câmara ninfal está em continuidade com a epiderme da face abaxial da folha e é constituída por células isodiamétricas (fig. 39) que passam por sucessivas divisões anticlinais.

Enquanto a galha se fecha, o parênquima lacunoso torna-se homogêneo e se divide. Células deste parênquima se rediferenciam localmente em cordões procambiais responsáveis pela neoformação de feixes vasculares (fig. 39 e 40).

No início da fase de crescimento e desenvolvimento, o parênquima é homogêneo e ocorre aumento no número e tamanho das células (fig. 41 e 42), resultando em maiores diâmetro e espessura da galha. Os cordões procambiais apresentam-se mais desenvolvidos, ainda não havendo a formação de ductos secretores, que se diferenciam e aumentam em diâmetro no fim desta fase. A região de abertura (abaxial) não é vascularizada (fig. 41).

Na fase de maturação, a galha apresenta várias camadas de parênquima, intensa vascularização na parede adaxial e ductos secretores com grande lúmen (fig. 43 e 44). Na região de abertura visualizam-se inúmeros tricomas justapostos (fig. 45), que apresentam

lignificação das paredes celulares (fig. 46) e que se projetam interna e externamente (fig. 47) à câmara ninfal. A parede adaxial apresenta células parenquimáticas e epidérmicas isodiamétricas (fig. 48).

As células do revestimento da câmara ninfal são de pequenas dimensões (fig. 49) quando comparadas àquelas da epiderme externa da galha (fig. 50) na qual a cutícula é bastante espessa e contém areia cristalífera abundante, especialmente na região próxima à abertura (fig. 46 e 50). Estes cristais não foram observados na epiderme que reveste a câmara. O índice estomático foi 8,42 na face abaxial e 6,85 na face adaxial, tendo sido avaliado apenas nas faces epidérmicas externas das galhas, uma vez que não se diferenciam estômatos na epiderme que reveste a câmara ninfal.

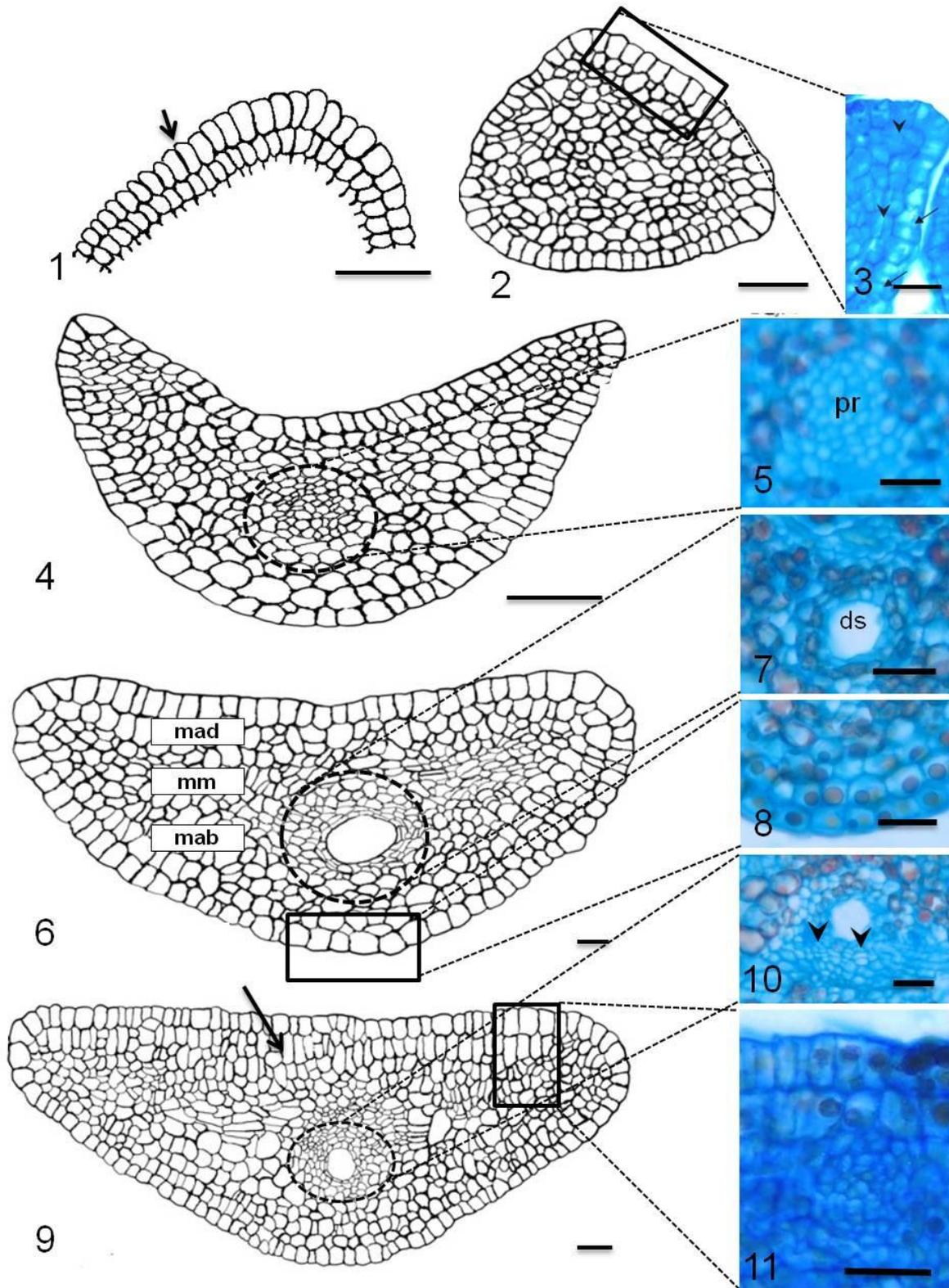
A vascularização dos tecidos da galha ocorre apenas na parede adaxial (fig. 51), havendo várias células parenquimáticas, do parênquima vascular e do epitélio secretor repletas de conteúdo fenólico (fig. 51 e 52). Drusas são abundantes no mesofilo adaxial da galha (fig. 53) e ausentes na parede abaxial. A epiderme adaxial apresenta-se revestida por cutícula espessa e com células isodiamétricas em seção transversal (fig. 54). As células parenquimáticas e epidérmicas apresentam ausência ou diversas formas de acúmulo de substâncias fenólicas (fig. 55-59), sendo mais abundantes no córtex da parede adaxial (fig. 51).

Na fase de senescência, ocorre eclosão do indutor através da abertura, que se expande (fig. 60). A principal alteração anatômica apresentada é a ausência de tricomas na região e suberificação da abertura e da epiderme que reveste a câmara próxima a ela (fig. 61-63). Os tecidos e conteúdos celulares apresentam-se íntegros em algumas porções e desorganizados em outras, tanto na epiderme que reveste a câmara quanto no parênquima. Isso se observa pela presença de células rompidas e com formatos e conteúdos alterados (fig. 64 e 65).

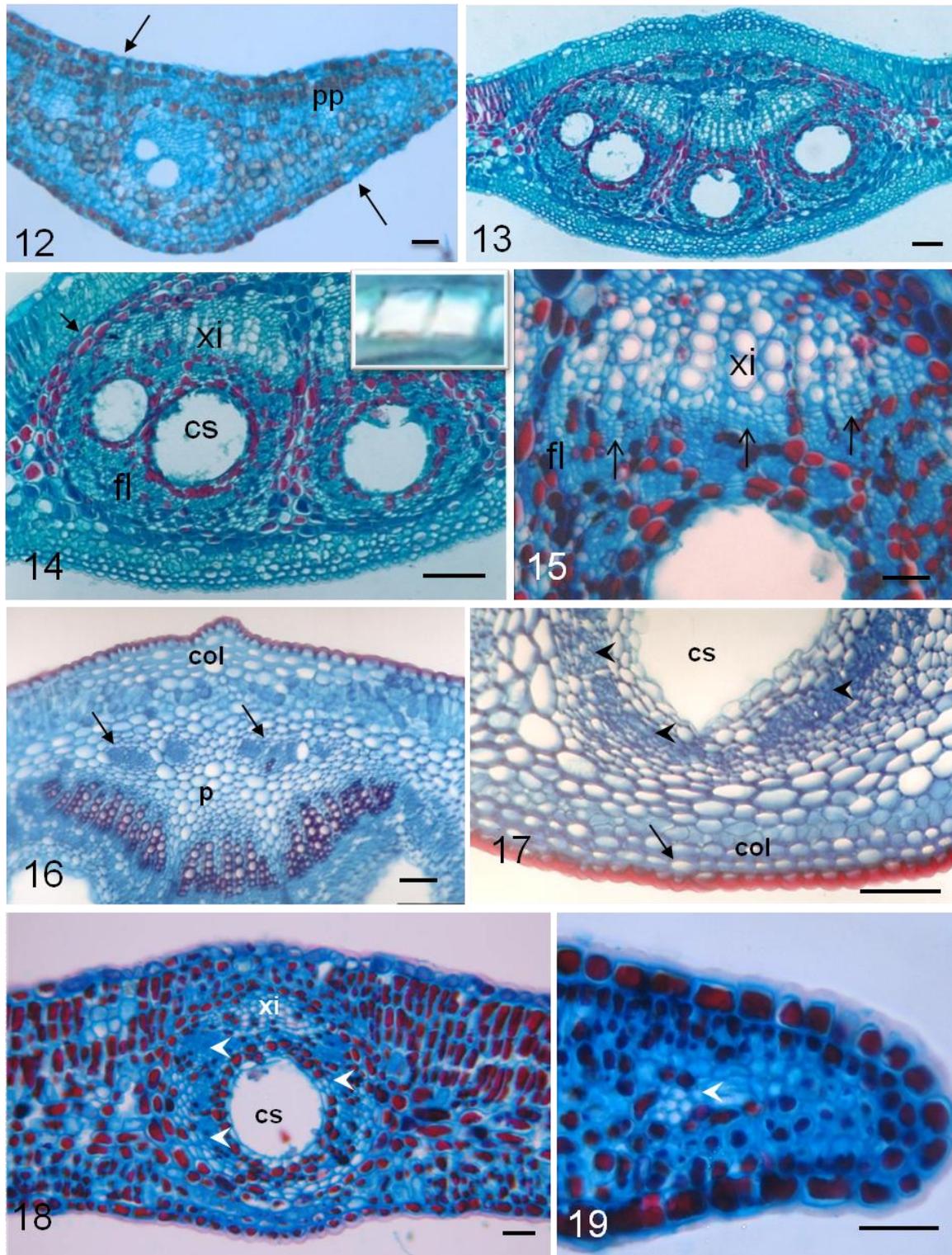
As modificações decorrentes da indução promovem a rediferenciação dos tecidos da folha. Neste processo, a epiderme abaxial forma o revestimento interno da câmara ninfal, o parênquima lacunoso forma o córtex abaxial da galha, o córtex interno adaxial e os feixes vasculares. O parênquima paliçádico e a epiderme adaxial originam o córtex adaxial externo e a epiderme adaxial da galha, respectivamente (fig. 66).

Histometria

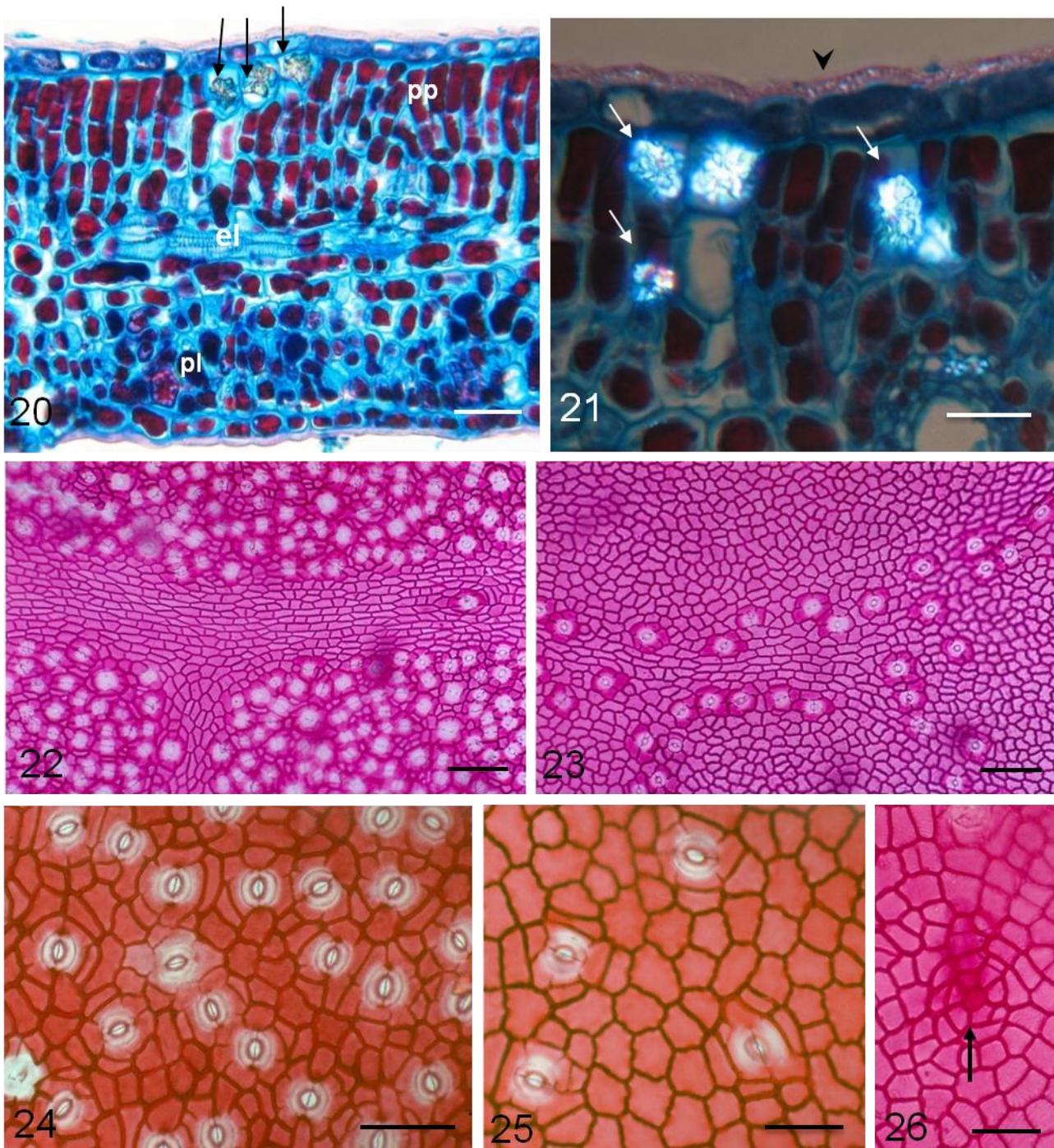
Todos os parâmetros histométricos analisados revelaram alterações decorrentes da indução, com exceção apenas à espessura da epiderme adaxial (fig. 67-74). Os valores do número de camadas celulares e da espessura do mesofilo e dos feixes vasculares foram praticamente o dobro na galha madura (GM), quando comparados à folha não galhada (FNG) (fig. 67-69). A espessura da epiderme adaxial não se alterou (fig. 70), enquanto ocorreu redução significativa dos valores da espessura da epiderme que reveste a câmara (fig. 71). A área das células parenquimáticas aumentou na GM (fig. 72), enquanto houve redução da área das células da epiderme adaxial (fig. 73) e do revestimento da câmara (fig. 74).



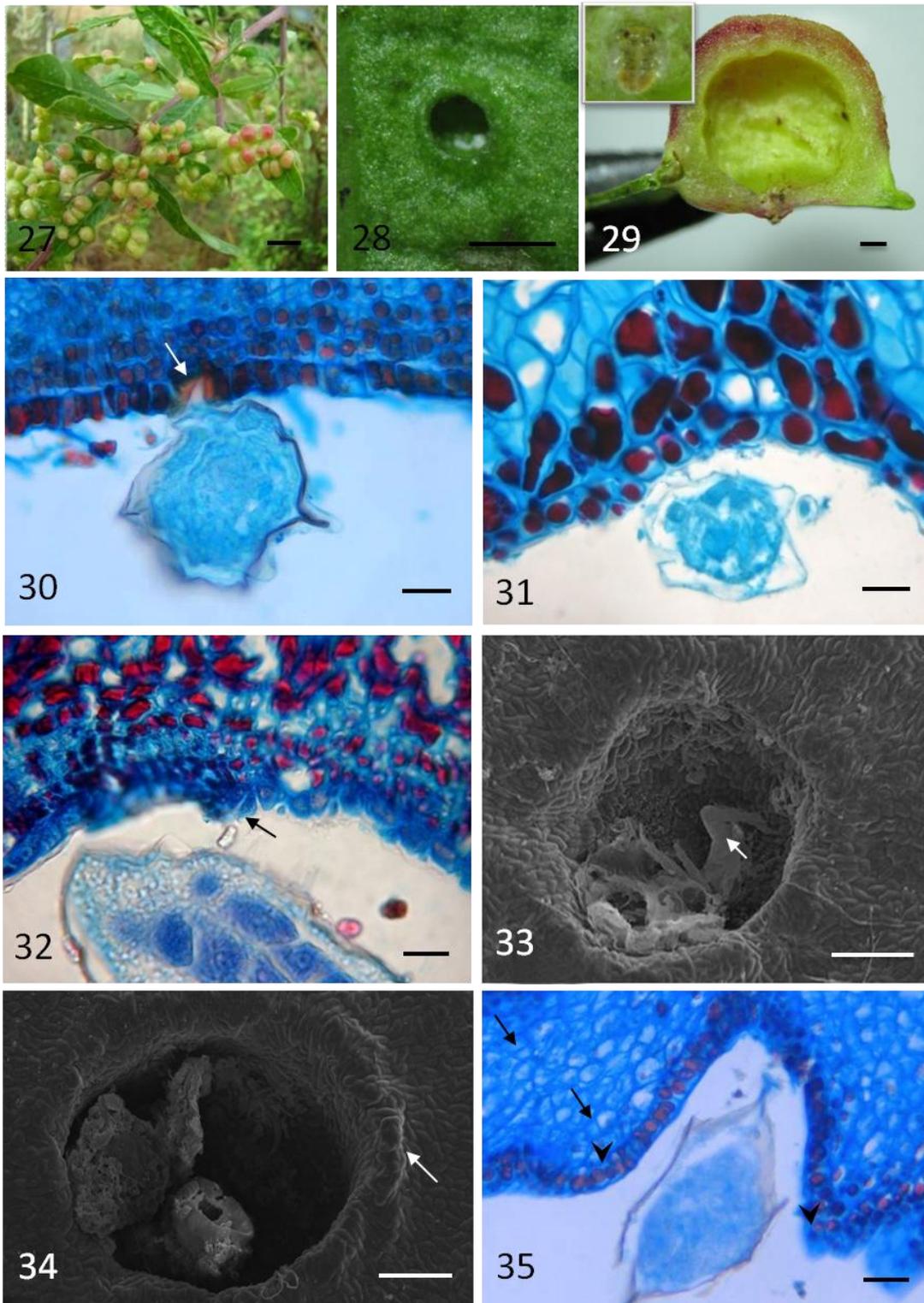
Figuras 1-11. Início do desenvolvimento foliar de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). Seções transversais. 1) Diagrama do ápice. Visualizam-se divisões anticlinais (seta) das células da C1. 2) Diagrama do primórdio foliar, no primeiro nó. 3) Primórdio foliar no primeiro nó. Divisões anticlinais na protoderme (setas) e periclinais no meristema fundamental (ponta de seta). 4) Diagrama do segundo nó, com procâmbio em diferenciação (círculo). 5) Detalhe dos cordões procambiais, no segundo nó. 6) Diagrama do terceiro nó. Maior diferenciação dos meristemas adaxial, mediano e abaxial e do ducto secretor. 7) Detalhe do feixe vascular e início da formação do ducto secretor associado ao floema, no terceiro nó. 8) Detalhe da protoderme e parte do meristema abaxial, no terceiro nó. 9) Diagrama do quarto nó. Início do alongamento do parênquima paliçádico (seta). 10) Detalhe do feixe vascular, evidenciando divisões periclinais do procâmbio (seta). 11) Início da diferenciação de nervuras secundárias no quarto nó. ds= ducto secretor; mad= meristema adaxial; mab= meristema abaxial; mm= meristema mediano. Barras: 1-5; 7-8,10 -11= 20 µm; 6 e 9 = 40 µm.



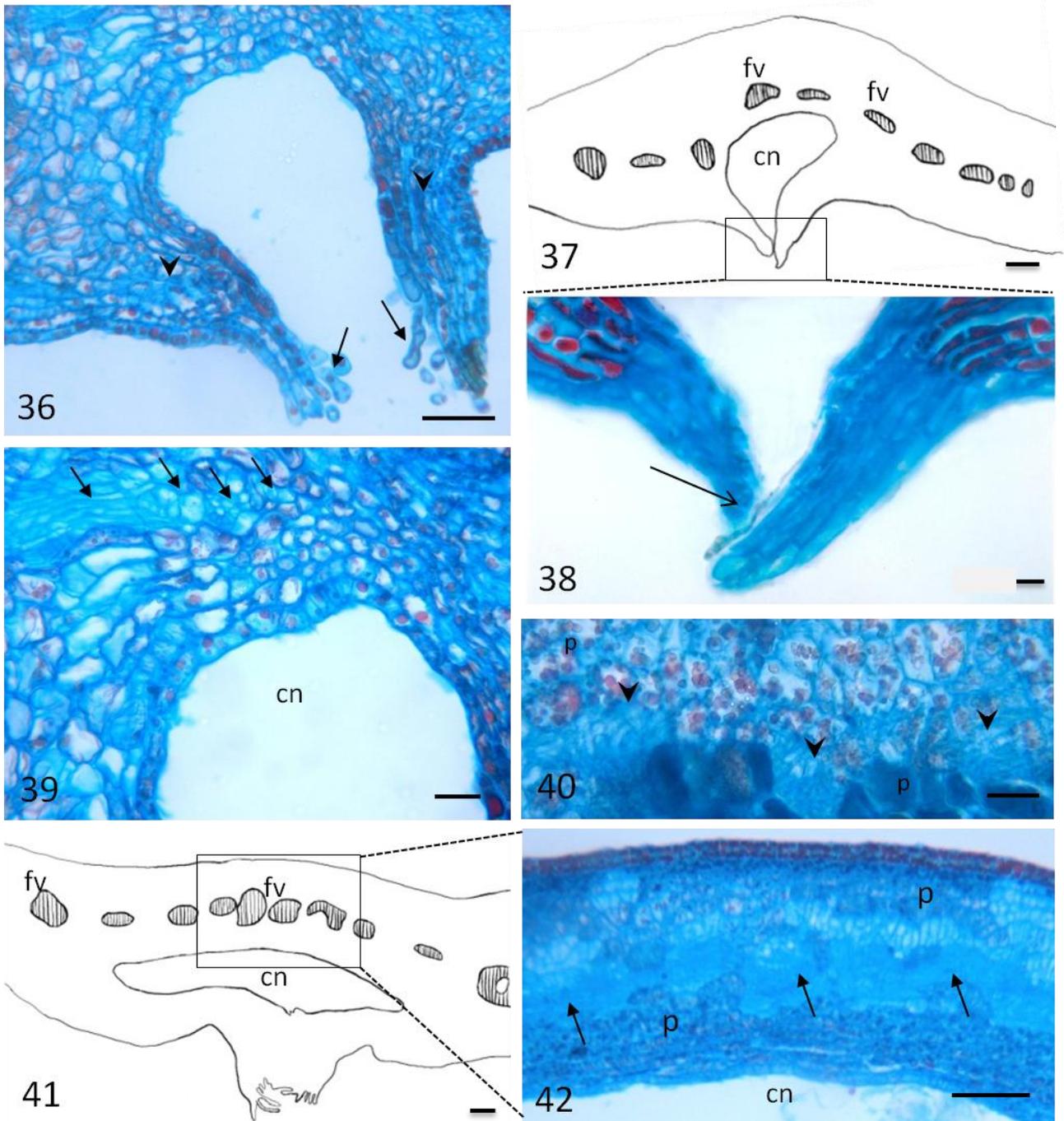
Figuras 12-19. Expansão da folha de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). Seções transversais. 12) Quinto nó, com parênquima paliádico em alongamento. 13) Nervura principal da folha expandida, no sexto nó. 14) Nervura principal. Em destaque, a endoderme (seta), que pode possuir cristais prismáticos de oxalato de cálcio (detalhe). 15) Detalhe do feixe vascular, com crescimento secundário (setas). 16) Região adaxial da nervura principal, evidenciando colênquima e feixes floemáticos (setas). 17) Região abaxial da nervura, com epiderme papilosa com cutícula espessa (seta) e floema (ponta de seta). 18) Nervura colateral de segunda ordem, evidenciando xilema (xi) e floema (ponta de seta). 19) Bordo foliar com células epidérmicas repletas de conteúdo fenólico e um pequeno feixe vascular (ponta de seta). co= colênquima; ds= ducto secretor; fl= floema; p= parênquima; pp= parênquima paliádico; xi= xilema. Barras: 12; 15-17; 19 = 25 µm; 13-14; 18 = 50 µm.



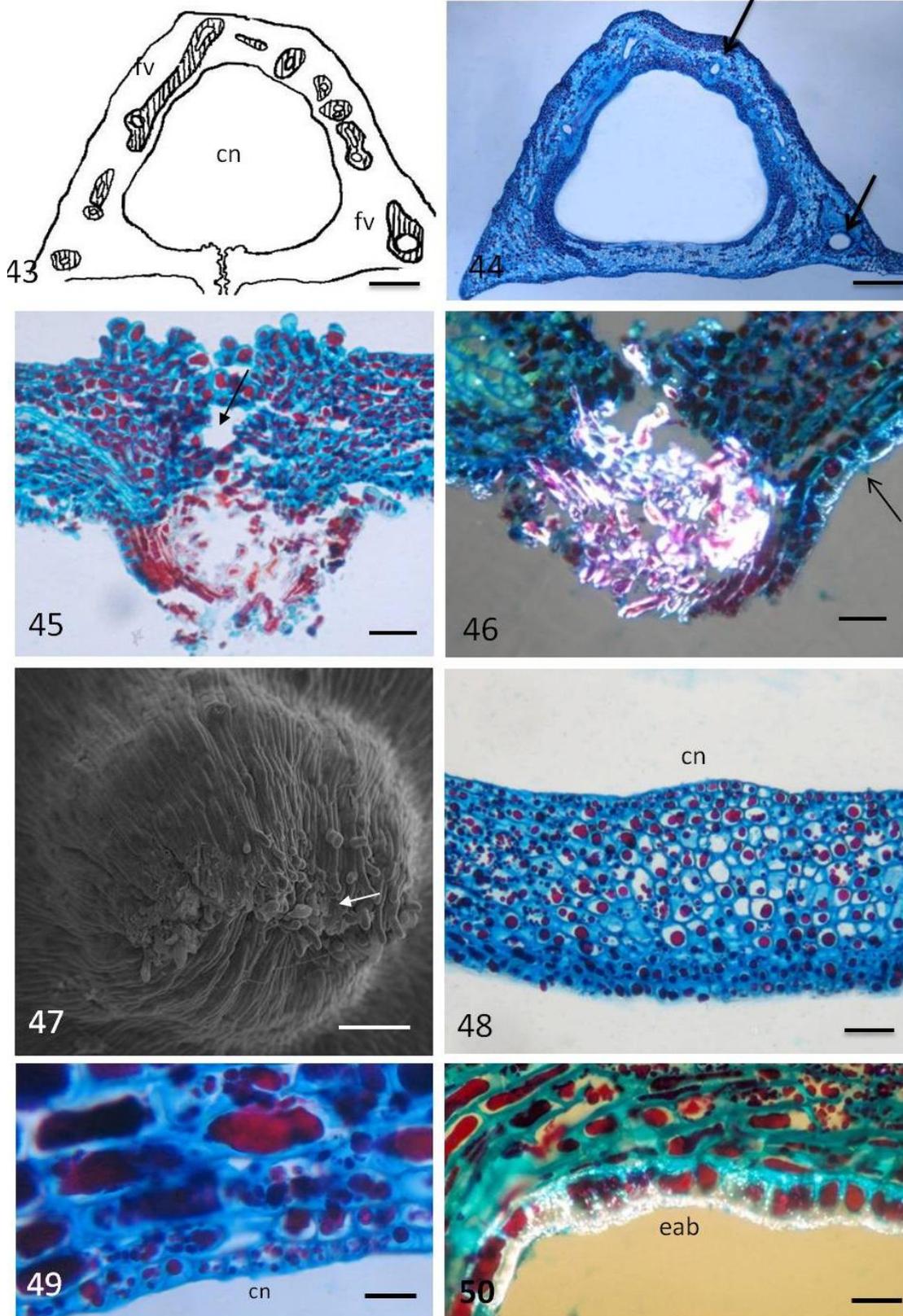
Figuras 20-26. Folha expandida de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). 20) Seção transversal do mesofilo evidenciando drusas no parênquima paliçádico (setas), parênquima lacunoso e elementos de vaso. 21) Parênquima paliçádico com idioblastos cristalíferos contendo drusas (setas) e epiderme adaxial apresentando cutícula espessa com areia cristalífera (ponta de seta). Seção transversal. Fig. 22-26: vista frontal. 22) Epiderme abaxial. 23) Epiderme adaxial. 24) Detalhe da epiderme abaxial, com estômatos ciclocíticos e células epidérmicas retangulares. 25) Detalhe da epiderme adaxial, mostrando estômatos ciclocíticos e células epidérmicas com paredes sinuosas. 26) Inserção de tricoma tector na epiderme adaxial (seta). el= elemento de vaso; pl= parênquima lacunoso; pp= parênquima paliçádico. **Barras:** 20-23 = 50 µm; 24-26 = 25 µm.



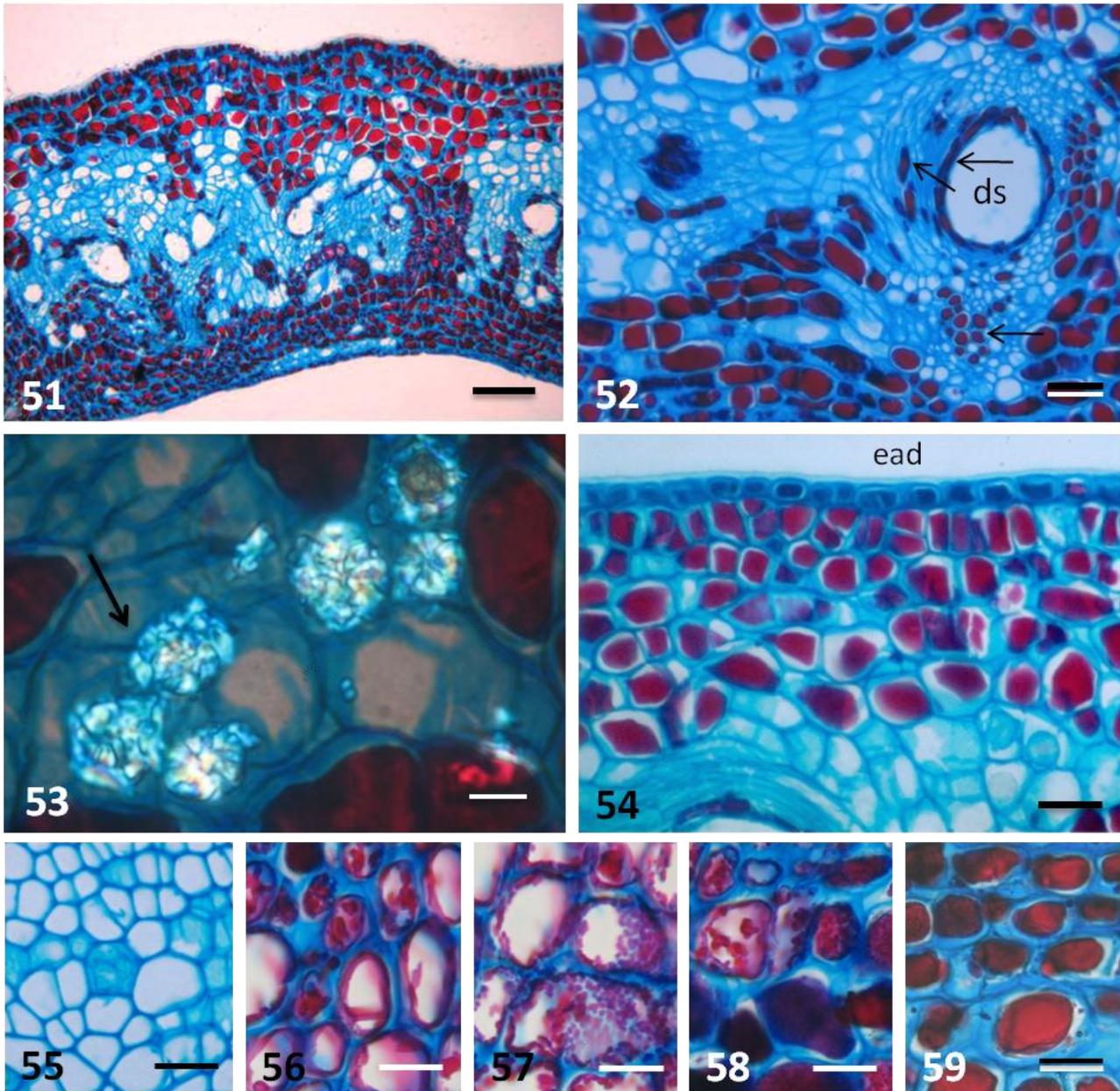
Figuras 27-35. Formação da galha de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). Fig. 27-29: visão macroscópica e ao estereomicroscópio. 27) Ramo com galhas. 28) Indução (superfície abaxial). 29) Galha madura. Em detalhe, indutor recoberto por cera. Fig. 30-35: fase de indução. 30) Ovo com pedúnculo (seta) inserido na epiderme. Há acúmulo de fenólicos possivelmente devido à injúria. 31) Início do afundamento da lâmina foliar, em resposta ao estímulo provocado pelo ovo. 32) Ninfa se alimentando, inserindo os estiletes (seta) na epiderme. 33) "Depressão" ocasionada pela indução. Observar remanescentes (exoesqueleto) de um inseto (seta). (MEV). 34) Células iniciando o crescimento que envolverá a ninfa (seta) (MEV). 35) Crescimento com divisões em vários planos no parênquima (setas), divisões e alongamento celular na epiderme (pontas de seta). MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura. Barras: 27 = 1cm; 28 e 29 = 500 µm; 30-32; 35 = 20 µm; 33 e 34 = 100 µm.



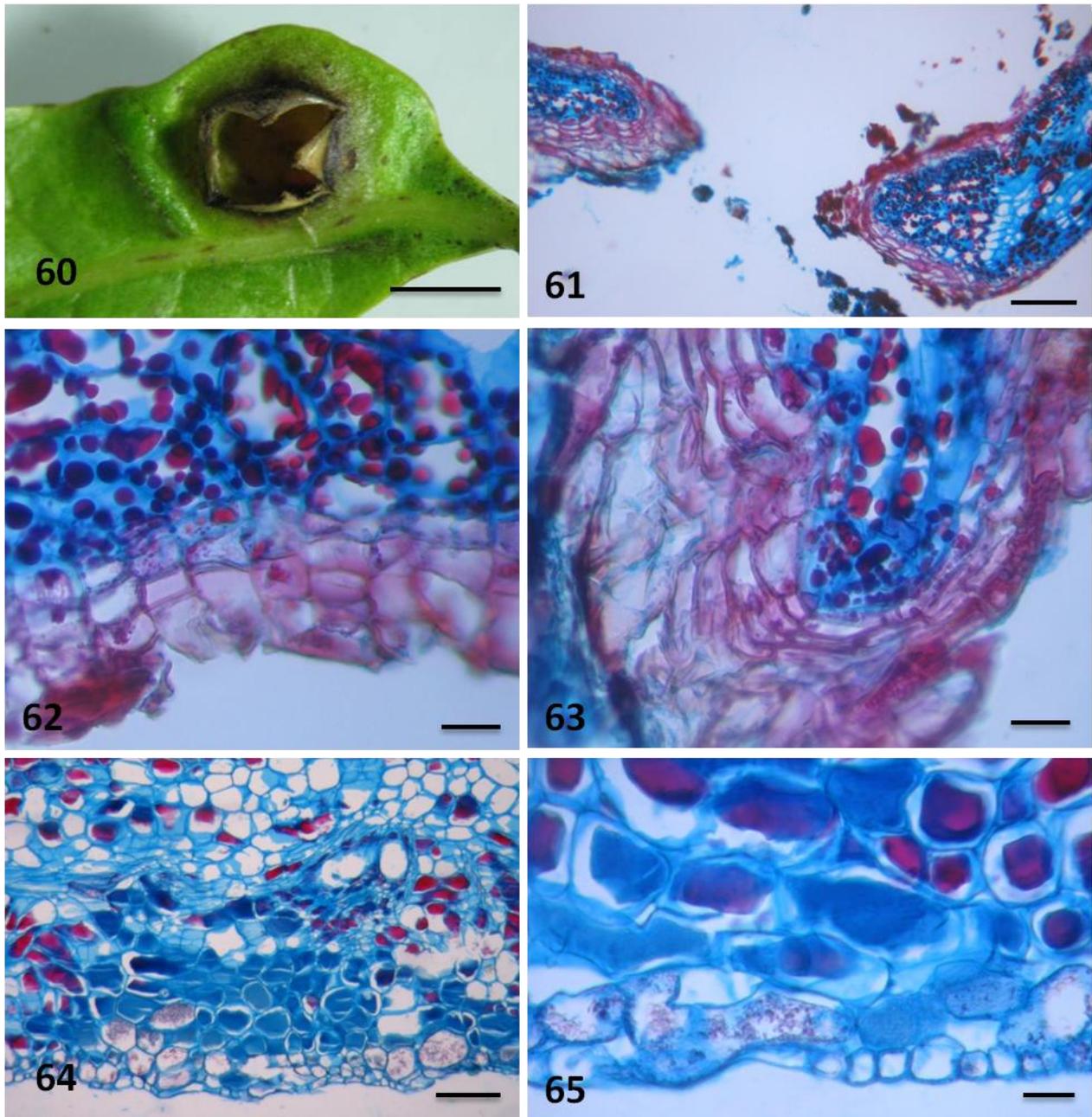
Figuras 36-42. Galha de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): fase de crescimento e desenvolvimento. Seções transversais. 36) Emergência com tricomas neoformados (setas) a partir da epiderme e células do parênquima (pontas de seta). 37) Diagrama do início da fase de crescimento e desenvolvimento. 38) Detalhe da região de abertura da galha, evidenciando justaposição dos tricomas (seta). 39) As células do revestimento da câmara se dividem anticlinalmente (pontas de seta). O parênquima apresenta-se homogêneo, entremeado com feixes vasculares neoformados (setas). 40) Parênquima com células de diferentes conteúdos celulares e neoformação de feixes vasculares (pontas de seta). 41) Diagrama de galha já fechada. 42) Região adaxial da galha fechada. As células dos feixes procambiais (setas) e parenquimáticas continuam a se multiplicar e se diferenciar, resultando no aumento da parede da galha. cn= câmara ninfal; fv= feixe vascular; p= parênquima. Barras: 36,37,41,42 = 50 µm; 38-40 = 20 µm.



Figuras 43-50. Galha de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): fase de maturação. Seções transversais. 43) Diagrama da galha madura. 44) Galha madura. Os feixes vasculares já apresentam ductos secretores associados ao floema (seta). 45) Região da abertura com tricomas justapostos, onde permanece uma pequena abertura (seta). 46) Mesma região sob luz polarizada, evidenciando a lignificação dos tricomas e epiderme externa com areia cristalífera (seta). 47) Tricomas no local da abertura (seta) (MEV). 48) Parede abaxial da galha, sem vascularização. 49) Revestimento da câmara ninfal. 50) Epiderme externa da galha, próxima à região da abertura, demonstrando cristais de areia cristalífera. cn= câmara ninfal; ds= ducto secretor; eab= face abaxial da epiderme fl= floema; fv= feixe vascular; xi= xilema. Barras: 45,46,48 = 50 µm; 43, 44 = 200 µm; 47 = 100 µm; 49 = 10 µm; 50 = 20 µm.



Figuras 51-59. Galha de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): fase de maturação. Seções transversais. 51) Parede adaxial da galha, altamente vascularizada e mostrando células parenquimáticas com fenólicos. 52) Detalhe de feixe vascular, com células endoteliais e do parênquima vascular repletas de conteúdo fenólico (setas). 53) Idioblastos cristalíferos na galha (seta). 54) Detalhe da região adaxial, mostrando as células com conteúdo fenólico. 55-59) Gradação de fenólicos das células do parênquima. cn= câmara ninfal; ds= ducto secretor; ead= face adaxial da epiderme. Barras: 51 = 100 µm; 52 = 40 µm; 53 = 10 µm; 54-59 = 20 µm.



Figuras 60-65. Galha de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): fase de senescência. 60) Região da abertura, vista ao estereomicroscópio. Fig. 61-65: seções transversais. 61) Região da abertura mostrando tecido de cicatrização (súber). 62) Revestimento da câmara, próximo à região da abertura. 63) Região de abertura da galha, onde observam-se tecido de cicatrização (súber) e ausência de tricomas. 64) A parede adaxial da galha degrada-se, tanto no revestimento da câmara, com células desorganizadas, quanto no parênquima. 65) Detalhe do revestimento da câmara, na região oposta à abertura. Barras: 60 = 1cm; 61, 64 = 100 µm; 62 = 10 µm; 63, 65 = 20 µm.

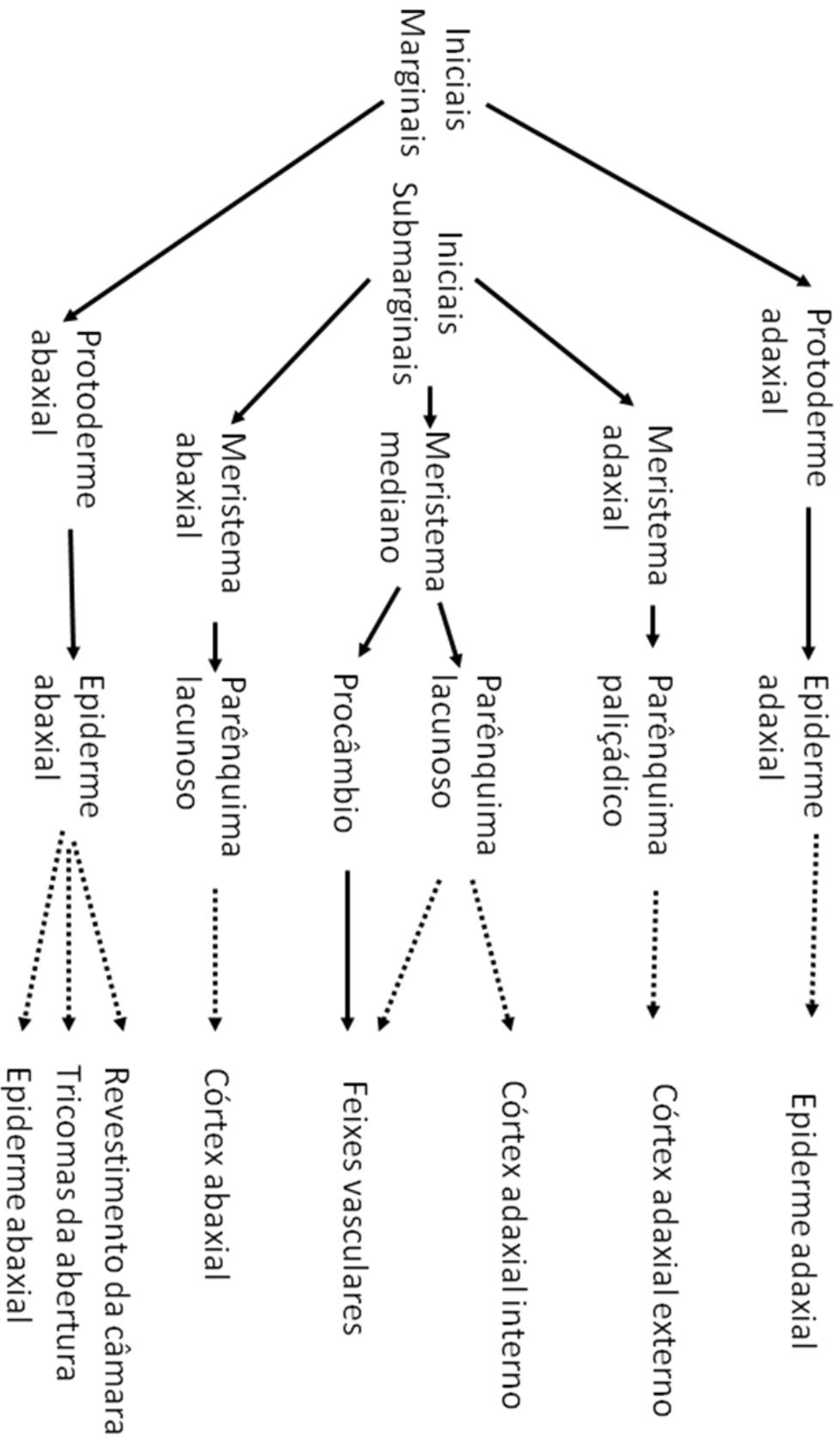
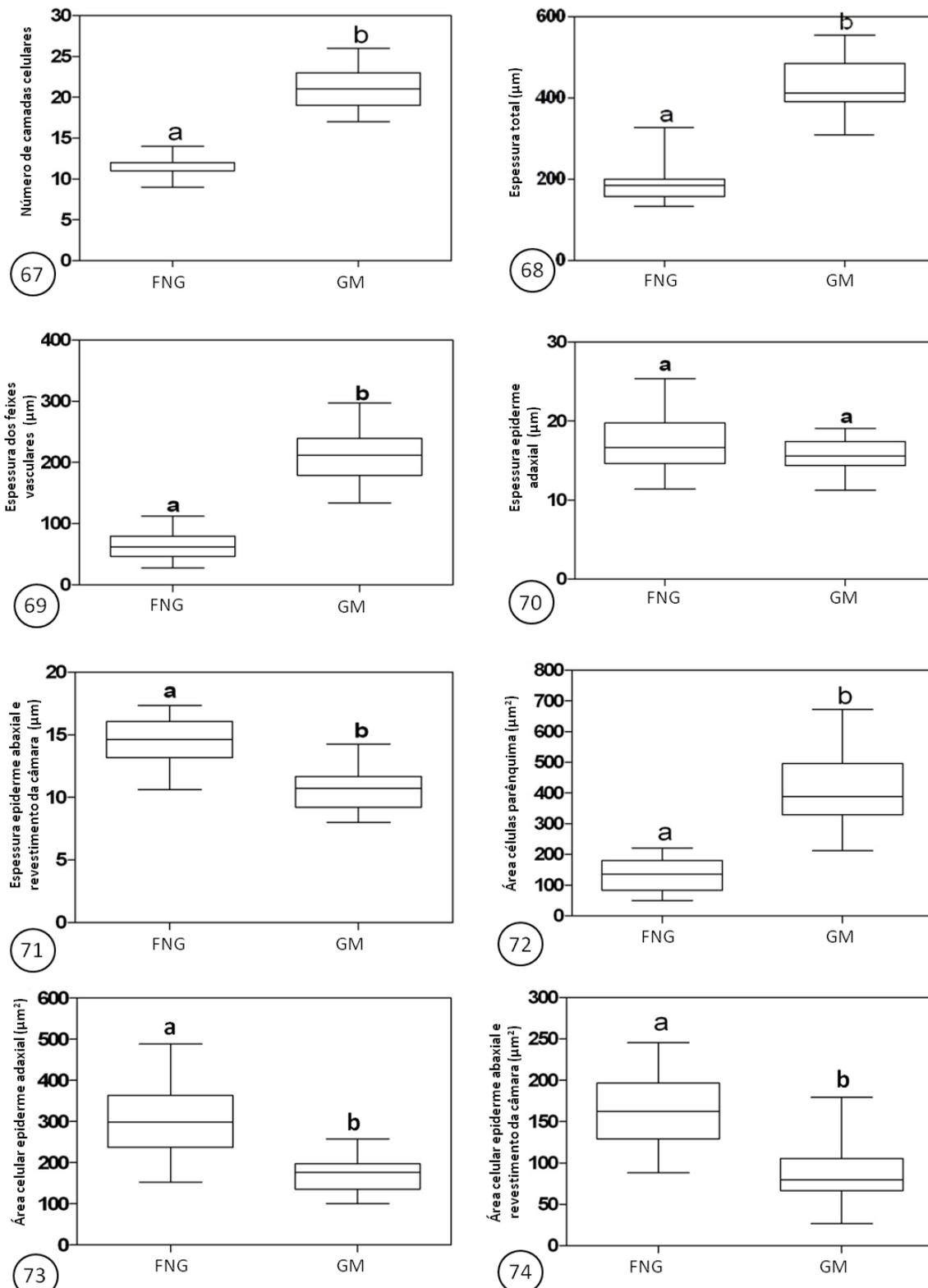


Figura 66. Desenvolvimento foliar (seta contínua) de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) e da galha (seta pontilhada) de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophytidae).



Figuras 67-74: Análises cito e histométricas de folhas não galhadas de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) e galhas maduras induzidas por *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em seção transversal. 67) Número de camadas celulares. 68) Espessura do mesofilo. 69) Espessura dos feixes vasculares. 70) Espessura da epiderme adaxial. 71) Espessura da epiderme abaxial da folha e do revestimento da câmara ninfal. 72) Área de células do parênquima. 73) Área de células da epiderme adaxial. 74) Área de células da epiderme abaxial da folha e do revestimento da câmara ninfal. FNG= folha não galhada; GM= galha madura. Barras seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes (Kruskall-Wallis, seguido por testes múltiplos de Dunn; $\alpha = 0,05$). Os dados são representados pela medianas e respectivos quartis.

Discussão

O desenvolvimento da folha de *S. polygamus* segue o padrão descrito por Foster (1936) para *Pelargonium zonale*, onde a camada adaxial do meristema fundamental dá origem ao parênquima paliçádico e as camadas medianas originam as células procambiais e parte do parênquima lacunoso, cujas células também se originam da camada abaxial do meristema fundamental. Padrão semelhante foi encontrado por Oliveira e Isaias (2009b) nos folíolos de *Copaifera langsdorffii*.

O sistema de revestimento da folha de *Schinus polygamus* deriva exclusivamente da protoderme e é constituído por apenas uma camada de células, desde o primeiro nó até o sexto, no qual as folhas estão plenamente expandidas. A superfície adaxial da epiderme originou-se da protoderme adaxial e a superfície abaxial da epiderme, da protoderme abaxial (Fahn 1990, Moura *et al.* 2009, Oliveira & Isaias 2009b). Tricomas são raramente observados, a exemplo do descrito por Fleig (1985) para *S. polygamus* em Canguçu. Os estômatos são numerosos e associados às nervuras, como descrito por Álvarez *et al.* (2008) para *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae).

No mesofilo, drusas de oxalato de cálcio são observadas, especialmente no parênquima paliçádico, enquanto cristais prismáticos ocorrem na endoderme e areia cristalífera nas duas superfícies epidérmicas. A deposição destes cristais é comum em Anacardiaceae (Solereeder 1908, Álvarez *et al.* 2008) e pode estar relacionada a vários fatores, dentre eles proteção contra herbivoria (Fernandes 1994), regulação de cálcio, suporte tecidual e detoxificação (Nakata 2003).

As células do procâmbio se originam a partir das camadas medianas a exemplo do observado para *Pelargonium zonale*, *Copaifera langsdorffii* e *Lantana camara* (Foster 1936, Moura *et al.* 2009, Oliveira & Isaias 2009b). Estas células começam a diferenciação da nervura principal no segundo nó, e as nervuras secundárias a partir do quarto nó. Além destas, as células das camadas medianas originam o epitélio secretor dos ductos, sempre associados ao floema, característica comum em Anacardiaceae (Solereeder 1908, Metcalfe & Chalk 1983, Carmello-Guerreiro & Paoli 2005, Simpson 2006, Lacchia & Carmello-Guerreiro 2009). Estes ductos, secretores de goma-resina (Fahn 1979), começam a se diferenciar a partir do terceiro nó, estando relacionados à proteção precoce das folhas ainda em expansão, a exemplo das substâncias fenólicas, presentes em células do mesofilo desde o segundo nó.

Nas galhas de *C. aff. duvauae* Scott em *S. polygamus*, durante a oviposição, o pedúnculo do ovo é inserido com precisão entre duas células epidérmicas. De acordo com Burckhardt (2005), a maioria das galhas de psilóideos é induzida pela atividade alimentar da ninfa e este autor sugere que no gênero *Calophya*, a ninfa de primeiro ínstar seja a responsável pela indução das galhas de *Schinus*. Observaram-se, porém, alterações celulares já em resposta à presença do ovo, caracterizadas pelo acúmulo de fenólicos e início da proliferação de células ao redor deste, resultando no início da depressão no limbo foliar. A ninfa, neste caso, é responsável por continuar os estímulos que se iniciaram no momento da oviposição. Muito provavelmente esta nova informação advém da análise anatômica, a qual permite a evidênciação de alterações não perceptíveis a olho desarmado. De fato, são conhecidas as respostas da planta à deposição de ovos de insetos, como secreção de substâncias ovicidas e voláteis, que atraem parasitoides e predadores, além de reações de hipersensibilidade (Hilker & Meiners 2006). Tais respostas também podem ser verificadas em galhas, uma vez que o estímulo iniciador desta pode ser a própria oviposição (Rohfritsch 1992, Hilker & Meiners 2006). A depressão e o crescimento dos tecidos ao redor do sítio de oviposição parecem seguir o padrão já observado anteriormente em galhas de algumas espécies de Psylloidea (Bouyjou & Nguyen Than Xuan 1974 *apud* Meyer 1987, Taylor 1992). As células epidérmicas subjacentes ao ovo e, posteriormente à ninfa, se dividem anticlinalmente e formarão o revestimento da câmara ninfal. Este não apresenta estômatos diferenciados e possui células de pequenas dimensões recobertas por cutícula delgada, como observado nas galhas de *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae) (Álvarez *et al.* 2009). A epiderme adaxial também passa por inúmeras divisões anticlinais, acompanhando o crescimento da estrutura, que se projeta para esta face. Emergências constituídas de células epidérmicas e parenquimáticas se diferenciam e originam a região da abertura da galha, por onde sairá o imago.

Nas extremidades das emergências, células epidérmicas se rediferenciam em tricoblastos e crescem em extensão, originando os tricomas que obliteram a abertura. A presença de tricomas nesta região está relacionada à proteção mecânica contra invasores, tais como predadores, parasitoides e cecidófagos, além de favorecer a manutenção da temperatura e umidade (Johnson 1975 *apud* Moura *et al.* 2005, Arduin *et al.*, 2005, Oliveira *et al.* 2006, Álvarez *et al.* 2009). Nas galhas de *Forda formicaria* induzidas em *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae), os tricomas são remanescentes da fase jovem dos folíolos hospedeiros; em *S. polygamus*, contudo, há neoformação destes,

à semelhança do observado nas galhas de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) na borda das valvas e no revestimento interno (Oliveira *et al.* 2006).

Em galhas induzidas em tecidos maduros, ocorre rediferenciação celular, gerando tecidos especializados (Oliveira & Isaias 2009a). Nas galhas de *C. aff. duvauae* Scott em *S. polygamus*, tanto o sistema vascular quanto o fundamental derivaram das células do meristema fundamental. Devido a sua posição relativa no limbo foliar, é possível traçar a origem dos tecidos rediferenciados a partir dos parênquimas paliçádico e lacunoso.

Em resposta ao estímulo do indutor, as células do parênquima retomam a capacidade de divisão e apresentam-se hipertróficas. As divisões celulares ocorrem em vários planos e resultam no aumento das camadas celulares e espessura do mesofilo, além de conferir aspecto homogêneo ao parênquima cortical. Tanto a homogenização do parênquima quanto a hipertrofia celular são fenômenos comuns à formação de galhas e foram verificados em outros sistemas (Isaias 1998, Souza *et al.* 2000, Oliveira 2007, Moura *et al.* 2008, Fleury 2009, Moura *et al.* 2009). Tais fenômenos estão ligados à redução da capacidade fotossintética na galha (*Cf.* Dias 2010, cap. 1; Moura *et al.* 2008) e estariam relacionados às novas funções que o mesofilo assume, barreira protetora e local de alimentação do galhador (Mani 1964, Rohfritsch 1992, Moura *et al.* 2008).

Drusas de oxalato de cálcio são observadas no parênquima da região adaxial da galha e areia cristalífera na epiderme externa, especialmente nas proximidades da abertura. O acúmulo de cristais de diferentes formas parece estar relacionado à proteção do indutor (Fernandes *et al.* 1989, Arduin & Kraus 1995, Álvarez *et al.* 2009), o que não impede que o mesmo sofra o ataque de organismos especializados (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992). Este fato ressalta que a ação do galhador comumente não provoca o surgimento de características inéditas no órgão hospedeiro, antes redireciona substâncias e padrões de desenvolvimento já verificados no órgão não galhado (Rohfritsch & Shorthouse 1982 *apud* Weis *et al.* 1988, Schrönrogge *et al.* 2000, Fleury 2009).

A neoformação de feixes vasculares é observada em toda a porção adaxial da galha de *S. polygamus*, de modo similar ao relatado por Oliveira (2007) para *Copaifera langsdorffii*. Esses feixes são essenciais, pois é a partir deles que ocorre a nutrição das células da própria galha e também do galhador, que se alimenta pela inserção de seus estiletos nas células floemáticas. O fato de os feixes nas galhas serem muitas vezes predominantemente floemáticos favorece a mobilização de nutrientes (Motta *et al.* 2005). Nas galhas de *S. polygamus* estes feixes se originam da camada mediana do parênquima lacunoso, indicando um retorno das potencialidades meristemáticas destas células, fato

frequentemente relatado para galhas (Mani 1992, Isaias *et al.* 2000, Oliveira & Isaias 2009a). Há, ainda, um aumento considerável na espessura destes feixes, resultado do aumento do número de células vasculares. Esta hiperplasia dos feixes vasculares foi também verificada nas galhas de *Euphalerus ostreoides*, um sugador, em *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae) (Oliveira *et al.* 2006). A ausência de feixes vasculares no córtex abaxial da galha é justificada pela origem desta região, produto de rediferenciação das camadas mais externas do parênquima lacunoso, que também não eram vascularizadas.

Nas galhas, os ductos secretores associados ao floema só terminam sua diferenciação no início da fase de maturação. Este fato confirma o retorno à atividade meristemática do parênquima lacunoso mediano, uma vez que se repete na galha o padrão observado no desenvolvimento da folha: primeiro surgem os cordões procambiais, e a partir destes, os ductos secretores.

Os resultados cito e histométricos confirmam as alterações celulares ocorridas durante a maturação da galha. As células que revestem a câmara ninfal e estão em contato direto com o indutor apresentaram redução de espessura e área celulares. Na epiderme adaxial, a espessura se manteve semelhante ao encontrado na folha, mas houve redução da área celular. Estas alterações na epiderme refletem a grande hiperplasia deste tecido para acompanhar o crescimento da galha. O aumento do número de células e da espessura do mesofilo e dos feixes vasculares, além do aumento considerável da área das células parenquimáticas reflete a hiperplasia e hipertrofia típicas da formação de galhas (Mani 1964, Isaias 1998, Oliveira 2007, Moura *et al.* 2009).

No momento em que o inseto atinge a fase adulta, este sai da galha através da região obliterada pelos tricomas. Estudos adicionais devem ser conduzidos a fim de se verificar se a ausência dos tricomas na fase de senescência deve-se à abscisão ou à retirada mecânica destes no momento da saída do indutor. Esta região passa a apresentar-se revestida por felema, à semelhança do observado em galhas de *Lantana camara* (Verbenaceae), resultando, possivelmente, do término do estímulo alimentar do indutor (Moura *et al.* 2009). A porção abaxial da galha degrada-se em maior velocidade, apresentando tecidos com aspecto desorganizado. A senescência desta galha não é caracterizada por lignificação, como observado nas galhas de *C. langsdorffii* (Oliveira 2007). Neste instante, também ocorrem mortes celulares na parede adaxial, pois sem o estímulo constante do inseto, os tecidos da galha entram em fase de senescência, o que também explica a mudança de cor da galha, de vermelha para verde.

Assim, *Calophya* aff. *duvauae* Scott altera os padrões morfogênicos dos tecidos vegetais de *S. polygamus*, provocando homogenização do parênquima, supressão do desenvolvimento de estômatos na epiderme que reveste a câmara ninfal e neoformação de feixes vasculares e tricomas na região da abertura.

Comparativamente aos dois sistemas estudados na região neotropical, utilizadas como exemplo, as galhas de *S. polygamus* apresentam maiores similaridades com o sistema *L. camara-Aceria lantanae* do que com o sistema *C. langsdorffii-Cecidomyiidae*. Este último apresenta especializações teciduais, como a presença de tecido nutritivo, em resposta ao hábito alimentar do indutor. *Aceria lantanae*, por sua vez, induz galhas com parênquima homogêneo, sem lignificação e com suberificação na fase de senescência, características resultantes de seu hábito sugador. As peculiaridades de cada sistema são definidas pelo número de indutores na câmara, ou seja, *L. camara* abriga uma colônia de *A. lantanae* em cada uma das galhas, enquanto em *S. polygamus* há apenas um indutor por câmara.

Referências bibliográficas

- ADOBE PHOTOSHOP (1990-2003). Version CS for Windows. Seattle (WA): Adobe Systems Inc.
- ÁLVAREZ R, ENCINA A & PÉREZ HIDALGO N (2008). *Pistacia terebinthus* L. leaflets: an anatomical study. *Plant Systematics and Evolution*, 272: 107–118.
- ÁLVAREZ R, ENCINA A & PÉREZ HIDALGO N (2009). Histological aspects of three *Pistacia terebinthus* galls induced by three different aphids: *Paracletus cimiciformis*, *Forda marginata* and *Forda formicaria*. *Plant Science*, 176: 303-314.
- ARDUIN M & KRAUS JE (1995). Anatomia e ontogenia de galhas foliares de *Piptadenia gonoacantha* (Fabales, Mimosaceae). *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 14: 109–130.
- ARDUIN M, FERNANDES GW & KRAUS JE (2005). Morphogenesis of galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) leaves. *Brazilian Journal of Biology*, 65(4): 559-571.
- BISSING DR (1974). Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Technology*, 49(2): 116-117.

- BURCKHARDT D & BASSET Y (2000). The jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): systematics, biogeography and host plant relationships. *Journal of Natural History*, 34: 57–155.
- BURCKHARDT D (2005). Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Psyllids (Hemiptera: Psylloidea). In: Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods (Raman A, Schaefer CW & Withers TM, eds). *Science Publishers*, Plymouth, UK.
- CABALLERO PP & LORINI H (2000). Does resource concentration affect attack by galling and folivorous insects on *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr. (Anacardiaceae)? *Revista Chilena de Entomología*, 26: 89-92.
- CARMELLO-GUERREIRO SM & PAOLI AAS (2005). Anatomy of the pericarp and seed-coat of *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae) with taxonomic notes. *Brazilian Archives of Biology and technology*, 48(4): 599-610.
- CHAMBERLAIN CJ (1932). Methods in plant histology. 5. ed. Chicago: *University Press*.
- CRESPI B & WOROBEY M (1998). Comparative analysis of gall morphology in Australian gall thrips: the evolution of extended phenotypes. *Evolution*, 52: 1686–1696.
- CUTTER EG (1978). Plant Anatomy. Part I Cells and Tissues. 2. ed. *Addison-Wesley Publishing Company*, London.
- FAHN A (1990). Plant Anatomy. *Pergamon Press*, Oxford.
- FAHN A (1979). Secretory tissues in plants. *Academic Press*, London.
- FERNANDES GW, PRESZLER RW & GRIM JN (1989). The occurrence of crystals in a cynipid leaf gall on *Quercus turbinella*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 65: 377–383.
- FERNANDES GW (1994). Plant mechanical defenses against insect herbivory. *Revista Brasileira de Entomologia*, 38(2): 421-433.
- FLEIG M (1985). Análise da variação foliar de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). *Iheringia, Série Botânica*, Porto Alegre, 33: 3-16.
- FLEURY G (2009). Reações estruturais, histoquímicas e fisiológicas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) a Cecidomiidae galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*. Minas Gerais.
- FOSTER AS (1936). Leaf differentiation in angiosperms. *Botanical Review*, 2: 349-372.
- HILKER M & MEINERS T (2006). Early Herbivore Alert: Insect Eggs Induce Plant Defense. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1379–1397.

- HORI K (1992). Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. *In: Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- ISAIAS RMS (1998). Galhas entomógenas em *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoidae): anatomia e histoquímica. Tese de Doutorado. Departamento de Botânica, *Universidade de São Paulo*, São Paulo.
- ISAIAS RMS, SOARES GLG, CHRISTIANO JCS & GONÇALVES SJMR (2000). Análise comparativa entre as defesas mecânicas e químicas de *Aspidosperma australe* Müell. Arg. e *Aspidosperma cylindrocarpon* Müell. Arg. (Apocynaceae) contra herbivoria. *Floresta e ambiente*, 7: 19-30.
- JOHANSEN DA (1940). Plant microtechnique. New York, *McGraw-Hill Book Co. Inc.*
- KRAUS JE & ARDUIN M (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica RJ, *EDUR*.
- LACCHIA APS & CARMELLO-GUERREIRO SM (2009). Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. *Acta Botanica Brasilica*, 23(2): 376-388.
- MANI MS (1964). Ecology of plant galls. The Hague (The Netherlands): *Dr. W. Junk Publishers*.
- MANI MS (1992). Introduction to Cecidology. *In Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- METCALFE CR & CHALK L (1983). Anatomy of the dicotyledons. Second edition. *Clarendon Press*, Oxford.
- MEYER J (1987). Plant galls and Gall inducers. *Gebrüder Bornträger*. Berlin. 291p.
- MOTULSKY H (1992-2009). Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, *GraphPad Software Inc.*
- MOTTA LB, KRAUS JE, SALATINO A & SALATINO MLF (2005) Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 971-981.
- MOURA MZD, ISAIAS RMS & SOARES GLG (2005). Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 148: 427-431.
- MOURA MZD, SOARES GLG & ISAIAS RMS (2008). Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf galls in *Lantana camara* (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany*, 56: 153-160.

- MOURA MZD, SOARES GLG & ISAIAS RMS (2009). Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina:Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 32(2): 271-282.
- NAKATA PA (2003). Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*, 164: 901-909.
- NÚÑEZ C & SÁIZ F (1994). Cecidios en vegetación autóctona de Chile de clima mediterráneo. *Anais del Museo de Historia Natural*, 22: 57-80.
- 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 mulherbergianus* (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica*, 29(4): 657-667.
- OLIVEIRA DC (2007). Relações entre ontogenia foliolar e idade dos tecidos para o valor adaptativo de galhas em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- OLIVEIRA DC & ISAIAS RMS (2009a). Influence of leaflet age in anatomy and possible adaptive values of the midrib gall of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista de Biología Tropical*, 57(1-2): 293-302.
- OLIVEIRA DC & ISAIAS RMS (2009b). Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). doi:10.1016/j.sajb.2009.10.011.
- PAIVA JGA, FANK-DE-CARVALHO SM, MAGALHÃES MP & GRACIANO-RIBEIRO D (2006). Verniz vitral incolor 500 ®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasílica*, 20(2): 257-264.
- ROHFRI TSCH O (1992). Patterns in Gall Development. In *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York, p. 60-86.
- SÁIZ F & NÚÑEZ C (1997). Estudio ecológico de las cecidias del género *Schinus*, especialmente lãs de hoja y de rama de *S. polygamus* y *Schinus latifolius* (Anacardiaceae), em Chile Central. *Acta Entomológica Chilena*, 21: 39-59.
- SÁIZ F & NÚÑEZ C (2000). Cecidias de hoja y rama de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr. (Anacardiaceae): ¿doble agente formador o secuencia temporal de cecidias formadas por huespedes diferentes? *Revista Chilena de Entomología*, 27: 57-63.

- SCHRÖNROGGE K, HARPER LJ & LICHTENSTEIN CP (2000). The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment*, 23: 215-222.
- SIMPSON MG (2006). Plant Systematics. *Elsevier Academic Press*, Oxford.
- SOLEREDER H (1908). Systematic anatomy of the Dicotyledons. v. 2. *Oxford at the Clarendon Press*.
- 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 Botanica Brasilica*, 14(1): 57-69.
- STONE GN & SCHÖNROGGE K (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 512-522.
- TAYLOR GS (1992). The structure of the eggs of some Australian Psylloidea (Hemiptera). *Journal of the Australian Entomological Society*, 31: 109-117.
- THIÉBAULT M (2000). A foliar morphometric approach to the study of Salicaceae. *The Botanical Review*, 66: 423-439.
- WIEBES-RIJKS AA & SHORTHOUSE JD (1992). Ecological Relationships of Insects Inhabiting Cynipid Galls. *In: Biology of Insect-Induced Galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds), *Oxford University Press*, New York, p. 238-257.
- WEIS AE, WALTON R & CREGO C L (1988). Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology*, 33: 467- 486.
- ZEISS C (2008). Carl Zeiss Imaging Systems – 32 Software Release 4.7.2. USA. Carl Zeiss MicroImaging Inc.

**Influência de Parasitoides e Inquilinos na
Estrutura das Galhas de *Calophya* aff.
duvauae Scott (Hemiptera: Calophyidae) em
Schinus polygamus (Cav.) Cabrera
(Anacardiaceae)**

Influência de Parasitoides e Inquilinos na Estrutura das Galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) em *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)

Resumo

Galhas são crescimentos anormais que resultam da capacidade de plantas hospedeiras em responder aos estímulos do galhador, sendo consideradas fenótipos estendidos deste. As galhas foliares de *Schinus polygamus* são induzidas por *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) e abrigam duas espécies de inquilinos e um endoparasitoide. Este estudo explora as alterações anatômicas e histométricas provocadas pela presença destes insetos no sistema. Um morfotipo de endoparasitoide (Hymenoptera sp. 1 - H1) não causou alterações anatômicas ou, alternativamente, induziu células nutritivas isoladas, projetadas para o interior da câmara ninfal. Um dos inquilinos (Hymenoptera sp. 2 - H2) induziu tecido nutritivo abundante. O outro, (Lepidoptera sp. - LP) não promoveu alterações celulares, tendo sido verificados apenas vestígios de sua atividade alimentar nas células epidérmicas da câmara ninfal. H1 foi encontrado nas galhas vermelhas e verdes, H2 predomina nas verdes e o LP ocorre apenas nas vermelhas. A presença de H2 parece afetar numericamente a população de H1 e vice-versa, visto haver maior proporção de H2 justamente na amostra com menor proporção de H1. A cor da galha contendo apenas o indutor, sem ataque de parasitoide ou inquilino, foi sempre vermelha. Assim, as alterações observadas nas galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott deveram-se à cessação do estímulo do indutor associada ao ataque do parasitoide H1 (cor) e do inquilino H2 (anatomia e cor). Em conseqüência, impõem-se limites à aplicação do conceito de fenótipo estendido à gênese da morfologia de galhas no sentido *stricto* na prática, visto que devido a esses fatores, pode haver variação em fenótipo dentre as galhas de uma mesma população de indutor.

Palavras-chave: anatomia da galha, inquilinos, parasitoides, variação de cor

Abstract

Galls are abnormal growths, which are products of the plants in response to the stimuli of specific galling herbivores, being considered as their extend phenotype. One of the leaf gall morphotypes of *Schinus polygamus* is induced by *Calophya* aff. *duvauae* Scott and also present two species of inquilines and one of an endoparasitoid. This study concerns the anatomical and histometric alterations caused by the presence of these insects in the system. The endoparasitoid (Hymenoptera sp. 1 - H1) induced the differentiation of isolated nutritive cells prominent towards the nymphal chamber, while one of the inquilines (Hymenoptera sp. 2 - H2) induces abundant nutritive tissue. The other inquiline (Lepidoptera sp. – LP), does not promote any cellular alterations, and leaves just traces of its feeding activity; a cicatrization of epidermal cells surrounding the nymphal chamber. H1 was found either in red or green galls; H2 galls were predominantly green. LP was occasionally found only in the red ones. The presence of H2 seems to numerically affect the population of H1 and vice versa, a greater proportion of H2 being found in samples with the lowest proportion of H1. The color of the gall without either parasitoid or inquiline was always red, which is thus related to that colour. Thus, the anatomical and color changes observed in galls of *Calophya* aff. *duvauae* Scott were due to cessation of the stimuli provided by the gall inducer in association with attack of parasitoid H1 (colour) and inquiline H2 (anatomy and colour). As a consequence, in the strictus senso, there are limits the practical appliance of the extend phenotype concept in the cases, since in these populations there are more than one phenotype for a giving indutor.

Key words: color variation, gall anatomy, inquilines, parasitoids

Introdução

Galhas são exemplos claros de fenótipo estendido dos insetos indutores (Dawkins 1982), pois muito embora sejam compostas de tecidos vegetais, seu desenvolvimento é amplamente controlado pelos genes dos insetos (Stone & Schrönrogge 2003). Muitas vezes, além da relação planta hospedeira-indutor, existe uma variedade de organismos associados às galhas, como inquilinos, predadores, ecto- e endoparasitoides, espécies detritívoras, fungos, consumidores destes fungos e microorganismos (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992).

Um exemplo de planta hospedeira que abriga diversos indutores e, conseqüentemente, diversos outros níveis tróficos é *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae). Esta espécie vegetal apresenta sete diferentes morfotipos de galhas, entre foliares, florais e caulinares (Sáiz & Núñez 1997). Dentre as galhas foliares, chama a atenção aquelas induzidas por *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae), devido à diferença de coloração observada, variando de vermelho a verde. Nas galhas verdes é alta a frequência de outros insetos em relação ao observado nas galhas vermelhas (Cf. Dias 2010, cap. 1), que podem ser inquilinos ou parasitoides. Além de diferentes galhadores, a presença de outros integrantes nas galhas de *Schinus* é descrita na literatura (Burckhardt & Basset 2000), havendo relatos, inclusive, de endoparasitoides em *S. polygamus* (Sáiz & Núñez 1997).

Muito embora diversos organismos utilizem a galha como hábitat, apenas os galhadores são capazes de realizar a indução de fato. Contudo, o exato mecanismo da indução ainda não foi elucidado e até o momento é aceito que esta ocorra em resposta à injúria tecidual e substâncias liberadas durante a alimentação do indutor (Hori 1992, Mani 1992, Farmer 2000). Os estímulos envolvidos na indução parecem ser específicos, mesmo em grupos proximamente relacionados (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992, Rohfritsch 1992), gerando galhas que são, por conseguinte, resultado da interação dos genótipos da planta hospedeira e do galhador (Weis *et al.* 1988). Espera-se, portanto, que secreções de outros organismos provoquem respostas bioquímicas e/ou estruturais diferentes nas galhas. De fato, é sabido que os inquilinos, por exemplo, os quais não são capazes de induzir a formação de sua própria galha, mas que usam a de outros, provocam modificações teciduais, induzindo hipertrofia celular, causando modificações no tamanho das galhas (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992, László & Tóthmérész 2006). A influência dos parasitoides na estrutura das galhas, por sua vez, não é usualmente referida, provavelmente devido ao pouco impacto tecidual que causam.

De acordo com a definição de Wiebes-Rijks & Shorthouse (1992) o termo “parasitoide” refere-se a espécies entomófagas e o termo “inquilino” a espécies fitófagas. Embora parasitoides sejam entomófagos, podem eventualmente consumir os tecidos da galha após terem se alimentado do indutor (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992), às vezes simplesmente para cavar o canal de saída. Definição semelhante de inquilino é apresentada por László e Tóthmérész (2006), sendo este um inseto que não possui a habilidade de iniciar galhas, mas cujas larvas se desenvolvem e se alimentam nestes tecidos, podendo provocar neles modificações anatômicas (Noort *et al.* 2007). Tanto parasitoides quanto inquilinos contribuem substancialmente na mortalidade dos indutores, afetando numericamente suas populações (Ferreira *et al.* 1990, Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992, Ito & Hijii 2004, László & Tóthmérész 2006).

Os parasitoides são insetos com estilo de vida intermediário entre predadores e parasitas verdadeiros, já que findam por matar o hospedeiro, no caso o galhador (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992), e tem vida livre no estágio adulto. Podem ser endoparasitoides, desenvolvendo-se dentro do corpo de seus hospedeiros, ou ectoparasitoides, se alimentando externamente destes. A oviposição dos endoparasitoides está restrita a uma janela de oportunidade temporal que depende das fases de desenvolvimento do hospedeiro e da galha. No primeiro caso, é necessário que estes entrem no corpo do galhador quando ainda nos ínstares mais jovens, já no segundo caso, o ovipositor deve ser capaz de atravessar os tecidos da galha (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992, Noort *et al.* 2007).

Tendo em vista que as alterações estruturais e químicas decorrentes do processo de formação das galhas têm grande influência na manutenção do ciclo de vida dos galhadores, e conseqüentemente dos demais herbívoros associados, a análise da presença dos outros níveis tróficos no sistema *Schinus polygamus-Calophya aff. duvauae* Scott objetiva verificar: (1) quais são os integrantes da guilda de insetos associados; (2) alterações anatômicas e histométricas decorrentes da entrada de outros integrantes da guilda, em relação ao padrão de desenvolvimento apresentado pela galha apenas com o indutor; (3) se há relação entre a cor da galha e a presença de cada um dos outros integrantes no sistema; e (4) se a proporção entre indutores e parasitoides/inquilinos e entre estes últimos varia ao longo do ano.

Material e métodos

Análises estruturais

Amostras de folhas não galhadas e de galhas de *C. aff. duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) foram obtidas de uma população de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) localizada em uma propriedade rural existente no Rincão da Ronda, município de Canguçu, Rio Grande do Sul (32°15'00"S, 65°58'00"W). As coletas ocorreram em junho, setembro e dezembro de 2008 e março de 2009. Cada amostra consistiu de 10 ramos de 10 indivíduos diferentes, dos quais foram separadas 10 folhas de cada indivíduo, escolhidas aleatoriamente, galhadas ou não galhadas. Em cada coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos, submetido à refrigeração e enviado para análises no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG. O material vegetal fértil está depositado no herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número ICN 42884.

Folhas não galhadas e galhas foram fixadas em Karnovsky (O'Brien & McCully 1981 modificado para tampão fosfato pH 7,2) ou em FAA₅₀ (formaldeído 37%, ácido acético glacial e etanol 50%, 1:1:18, v/v) por 48 horas (Johansen 1940). Os maiores diâmetro e altura das galhas foram medidos com auxílio de paquímetro digital (Digimess®, modelo 100.174B), sendo criadas classes artificiais de tamanho com base na medida de altura, com intervalo de 1 mm entre as classes (Cf. Dias 2010, cap. 1). Considerando-se a cor, vista na superfície adaxial, as galhas foram separadas em três categorias: vermelhas, verdes e verde-avermelhadas. As galhas maiores de 1 mm foram dissecadas sob estereomicroscópio (Olympus® SZH) e inicialmente separadas em dois grupos: galhas contendo apenas o indutor (grupo 1) e galhas com outro nível trófico associado (grupo 2). As galhas do grupo 2 foram separadas de acordo com o tipo de inseto encontrado e posteriormente estocadas em etanol 70%. Os insetos foram enviados a especialistas para identificação.

Lâminas semipermanentes de folhas não galhadas e das galhas foram preparadas com seções transversais realizadas à mão livre com auxílio de lâmina de barbear em suporte de isopor. Estas seções foram submetidas à clarificação em hipoclorito de sódio comercial diluído a 50%, lavadas em água destilada, coradas com solução aquosa de azul de astra-safranina (9:1) (Kraus & Arduin 1997) e montadas com gelatina glicerinada de Kaiser (Johansen 1940).

Para a preparação de lâminas permanentes, fragmentos do terço médio das folhas não galhadas com cerca de 0,5 cm² e galhas fechadas ou dissecadas foram desidratados em série n-butílica (Johansen 1940) e infiltrados em Paraplast® (Kraus & Arduin 1997) em estufa a 60 °C. Cortes transversais seriados (12-14 µm de espessura) foram obtidos em micrótomo rotatório (Leica® 2035 BIOCUT). Os cortes foram afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing 1974) e secos sobre placa aquecedora a 42 °C. Após a retirada do Paraplast® com acetato de butila a 45°C em banho-maria, as seções foram hidratadas em série etílica decrescente. As lâminas foram imersas rapidamente em ácido acético 5%, lavadas em água destilada e coradas em solução aquosa de azul de astra-safranina (9:1) (Kraus & Arduin 1997). Posteriormente, os cortes foram lavados em água e desidratados em série etílica (Johansen 1940), seguida de acetato de butila absoluto e montados em verniz vitral incolor Acrilex® (Paiva *et al.* 2006).

As análises estruturais das folhas não galhadas e das galhas foram acrescidas de dados histométricos e citométricos. Estes dados foram obtidos a partir de fotomicrografias de cortes transversais da região mediana de cinco folhas não galhadas, totalmente expandidas, e de cinco galhas com altura entre 3,0-4,0 mm, dos grupos 1 e 2 na região adaxial e oposta à abertura. O número de células foi contado a partir de um transecto. Avaliou-se a espessura do mesofilo das folhas não galhadas e da parede adaxial da galha, dos feixes vasculares na porção mediana e das epidermes adaxial e do revestimento (n = 40 campos). Avaliou-se a área das células do parênquima lacunoso nas folhas não galhadas e do córtex adaxial interno, das células epidérmicas das faces adaxial e do revestimento e das células mais internas do tecido nutritivo, nas galhas que o possuíam (n = 50 campos). As medições foram realizadas através do programa gráfico Zeiss Imaging Systems, versão 4.7.2 (Zeiss 2008).

Proporção de insetos

Após a dissecação das galhas em cada amostra e subsequente separação em grupos, o número de indivíduos destes grupos foi anotado e os dados resultantes foram submetidos a análises estatísticas, para comparação de frequência em relação à cor da galha e ao longo do ano.

Análises estatísticas

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

Resultados

Os integrantes do sistema Schinus polygamus-Calophya aff. duvauae Scott

O sistema analisado possui galhas foliares, esféricas, vermelhas, verde-avermelhadas ou verdes, induzidas por *C. aff. duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) (fig. 1) com outros três integrantes associados (morfotipos): um Hymenoptera endoparasitoide, referido como “Hymenoptera sp. 1” (H1); um Hymenoptera inquilino, referido como “Hymenoptera sp. 2” (H2); e um Lepidoptera inquilino, referido como “Lepidoptera sp.” (LP).

Indivíduos H1 em diferentes fases de desenvolvimento foram observados em *C. aff. duvauae* Scott, de diferentes ínstares, não havendo aparente relação entre o ínstar do indutor e a fase de desenvolvimento do endoparasitoide. Estes são visualizados, inicialmente, como um pequeno ponto escuro no abdômen do indutor e aumentam progressivamente de tamanho, ocupando todo o seu abdômen e tórax (fig. 2 e 3). Posteriormente, emergem do indutor e empupam na galha (fig. 4). Em algumas galhas, apenas o exoesqueleto do indutor foi observado, provavelmente por este ter sido consumido previamente à eclosão do endoparasitoide (fig. 5). O término do ciclo de vida de H1 parece não depender do estágio ninfal do indutor.

Indivíduos H2 foram encontrados nas amostras de junho e setembro de 2008 e março de 2009, medem cerca de 3 mm e apresentam corpo fusiforme, com apêndices ausentes ou em início de desenvolvimento nas galhas analisadas (fig. 6).

Indivíduos LP medem cerca de 4 mm de comprimento (fig. 7) e foram encontrados raramente (n = 3), apenas em junho de 2008.

Alterações morfológicas e anatômicas

As galhas contendo apenas o indutor (H1) são, em sua maioria, vermelhas, projetadas para a superfície adaxial e possuem câmara ninfal cujo revestimento apresenta aspecto liso e homogêneo (fig. 8), assim como as galhas portando indivíduos H1 (fig. 9). Galhas com indivíduos H2 desenvolvem um tecido nutritivo que se projeta para o interior da câmara ninfal (fig. 10) e que apresenta sinais de necrose quando cessa a atividade alimentar do inquilino (fig. 11). Quando senescentes, as galhas contendo apenas o indutor se abrem totalmente na superfície abaxial, na região antes fechada por tricomas (Cf. Dias 2010, cap. 2) (fig. 12). Indivíduos de outro nível trófico, quando emergem da galha, cavam um canal de saída, cuja abertura pode ser vista ao lado da abertura original (fig. 13).

As alterações anatômicas decorrentes da entrada de outros integrantes, quando presentes, ocorreram no sistema de revestimento da câmara ninfal ou no sistema fundamental adjacente a este, não havendo modificações aparentes no sistema vascular destas galhas.

A maioria das galhas com H1 não apresentou alterações anatômicas (fig. 14). Contudo, em alguns casos, iniciaram-se divisões anti e periclinais na epiderme que reveste a câmara e no parênquima subjacente (fig. 15), originando células de tamanho semelhante às vizinhas. Em um estágio posterior, verifica-se um aumento considerável no diâmetro de algumas destas células (fig. 16).

As galhas contendo indivíduos H2 desenvolveram tecido nutritivo abundante (fig. 17 e 18). O início da formação deste tecido é semelhante ao evidenciado na galha com endoparasitoide (fig. 15 e 16), havendo divisões peri e anticlinalis no revestimento da câmara e no parênquima adjacente. Este tecido apresentou-se como um aglomerado de células, frequentemente globosas, conferindo-lhe aspecto papiloso (fig. 17), localizado quase sempre em contato com o sistema vascular (fig. 18). Verificou-se uma diminuição considerável na quantidade e tamanho das drusas de oxalato de cálcio nestas galhas.

Nas galhas contendo Lp não se observaram alterações estruturais ou anatômicas, exceto pelo revestimento da câmara, com células necrosadas, sinais de atividade alimentar da larva (fig. 19).

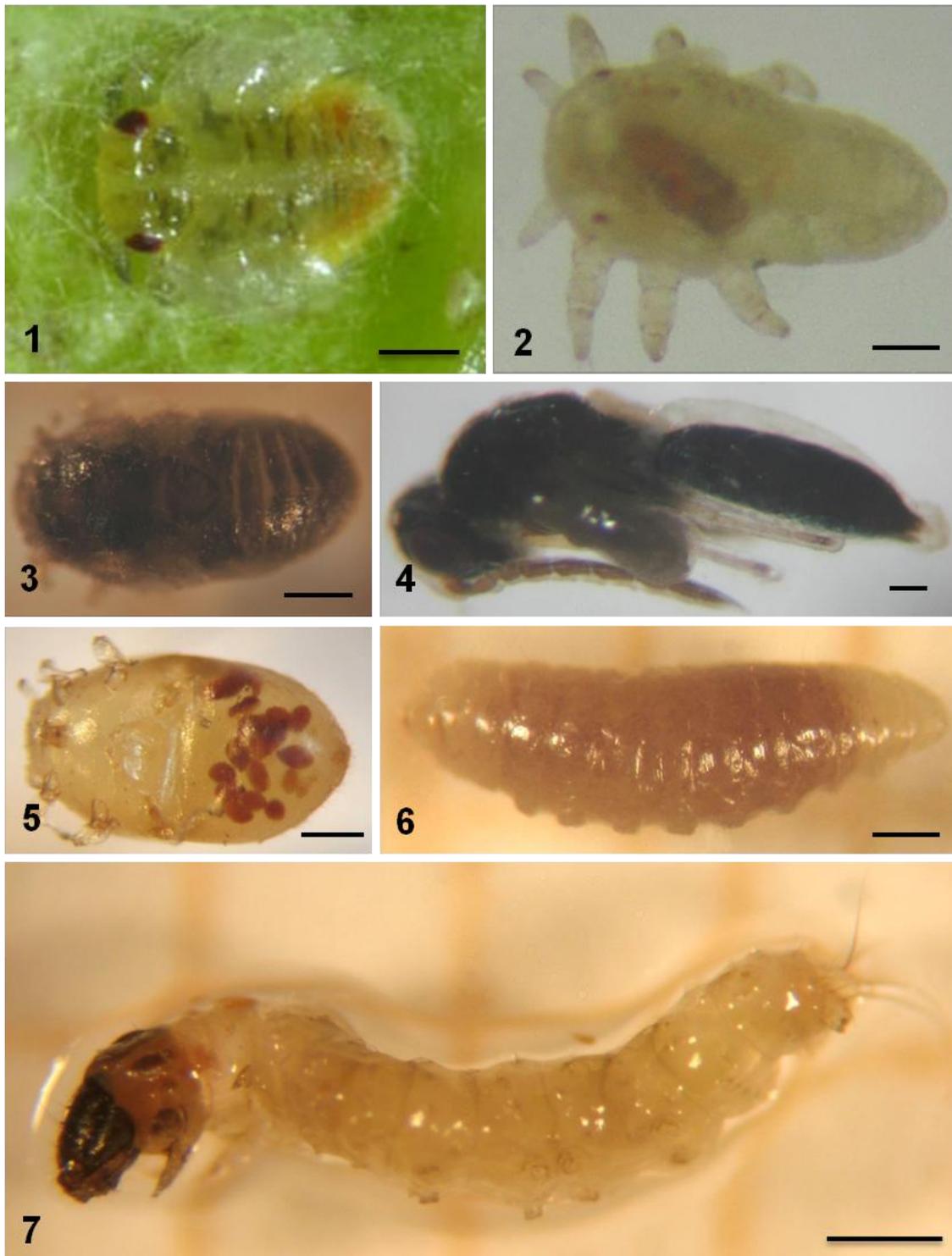
A presença de outros integrantes no sistema *S. polygamus*-*C. aff. duvauae* Scott altera os parâmetros histo e citométricos das galhas (fig. 20-27), apesar de algumas exceções. O aumento do número de células (fig. 20) e da espessura do feixe vascular (fig. 22) e a diminuição da espessura da epiderme abaxial (fig. 24) provocados pela indução por *C. aff. duvauae* Scott se mantiveram na presença de H1 e H2. A espessura média total (fig. 21) e da epiderme adaxial das galhas com H1 (fig. 23) foi significativamente maior que o observado nas galhas com IN e H2. A área das células do parênquima aumentou quando comparada à área de FNG, sendo ligeiramente maior nas galhas contendo H1 (fig. 25). A redução da área das células da epiderme adaxial foi menos evidente nas galhas com H1 e H2, quando comparada às galhas com *C. aff. duvauae* Scott (fig. 26). Quando analisada a área das células da epiderme abaxial, verificou-se uma redução drástica nas galhas, especialmente naquelas com H2 (fig. 27). As células do tecido nutritivo de H2 aumentaram muito seu volume, apresentando área média cerca de treze vezes maior quando comparada àquela das células do revestimento da câmara ($874,2 \pm 340,93 \text{ mm}^2$ e $65,62 \pm 19,38 \text{ mm}^2$, respectivamente).

A baixa frequência de LP inviabilizou análises histométricas nestas galhas.

Proporção de insetos e cores das galhas

A proporção dos insetos integrantes desta guilda varia nas galhas em relação à coloração destas (fig. 28). As galhas vermelhas contêm predominantemente o inseto indutor, pequenas proporções de H1 e LP, correspondendo a cerca de 9% e 1%, respectivamente, e nenhum indivíduo H2 (fig. 28A). Proporção semelhante é verificada nas galhas verde-avermelhadas (fig. 28B), ocorrendo pequenas mudanças na proporção dos demais integrantes: 7% de H1, 0,5% de H2 e nenhum LP. As galhas verdes, somando-se todas as amostras, apresentaram grande proporção de IN e proporções semelhantes entre H1 e H2 (fig. 28C). Porém, uma vez que se constatou grande número de indutores com malformações morfológicas na amostra de dezembro, realizou-se novo cálculo das proporções entre os insetos, desta vez, desconsiderando-se esta amostra. A nova proporção obtida reflete o padrão verificado nas amostras isoladamente: galhas verdes apresentam proporção reduzida de indutores e predomínio de H2, correspondendo a 55% do total de insetos encontrados nas galhas desta cor, além de cerca de 3% das galhas contendo H1 (fig. 28D).

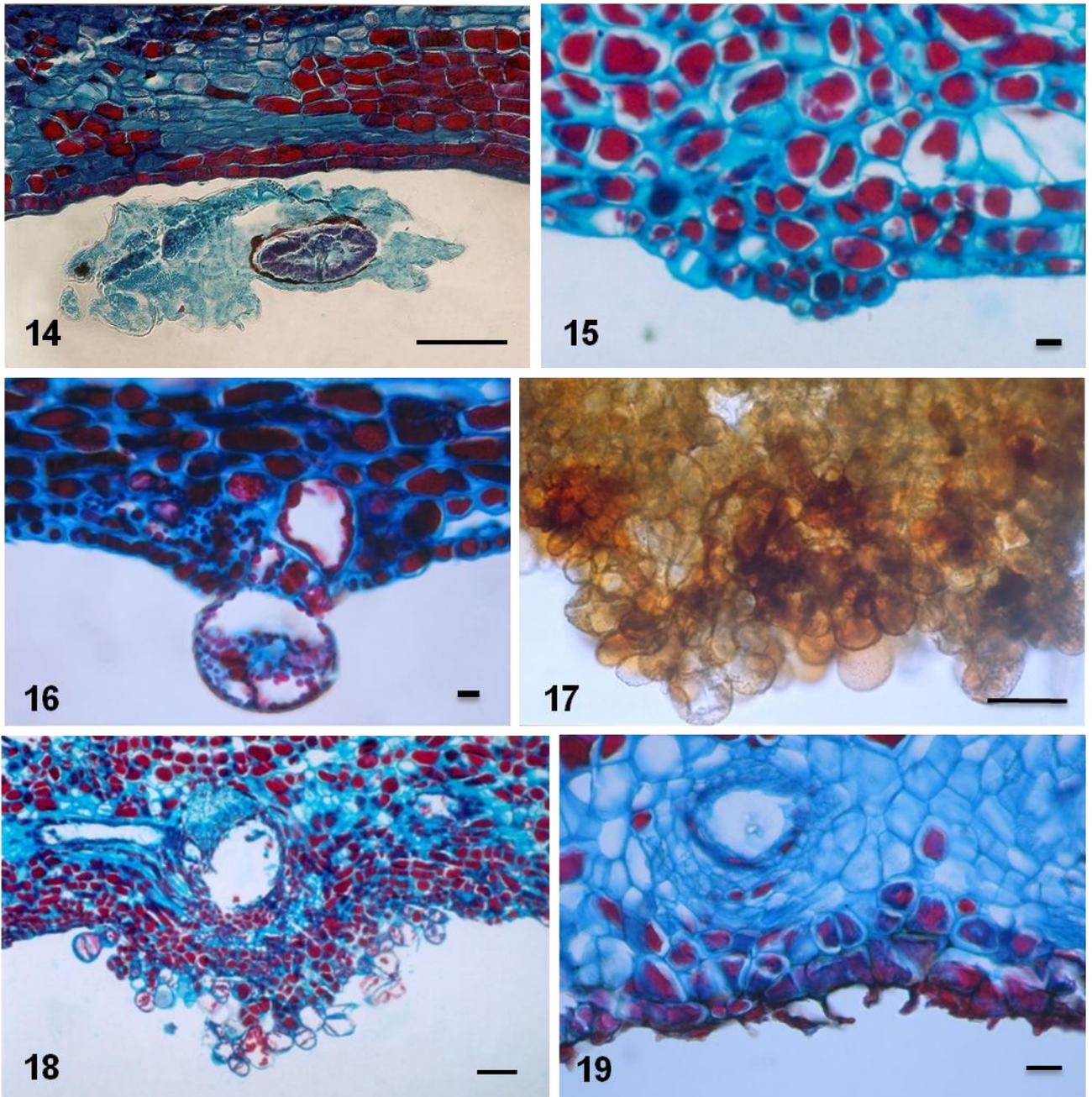
A proporção entre os insetos integrantes do sistema *S. polygamus*-*C. aff. duvauae* Scott também variou ao longo do ano de amostragem (fig. 29). A proporção de indutores manteve-se mais ou menos constante, sendo um pouco maior em dezembro de 2008. A proporção de H1 foi menor em junho, com cerca de 3% (fig. 29A), e maior em setembro de 2008, com 12% do total de insetos (fig. 29B). A maior proporção de H2 coincidiu com o período de menor frequência de H1. Nenhum representante deste grupo foi encontrado na amostra de dezembro de 2008 (fig. 29C). Em março de 2009, verificou-se a presença de H1 e H2, sendo H1 em maior proporção (fig. 29D). A presença ocasional de LP (n = 3) foi verificada apenas em junho de 2008.



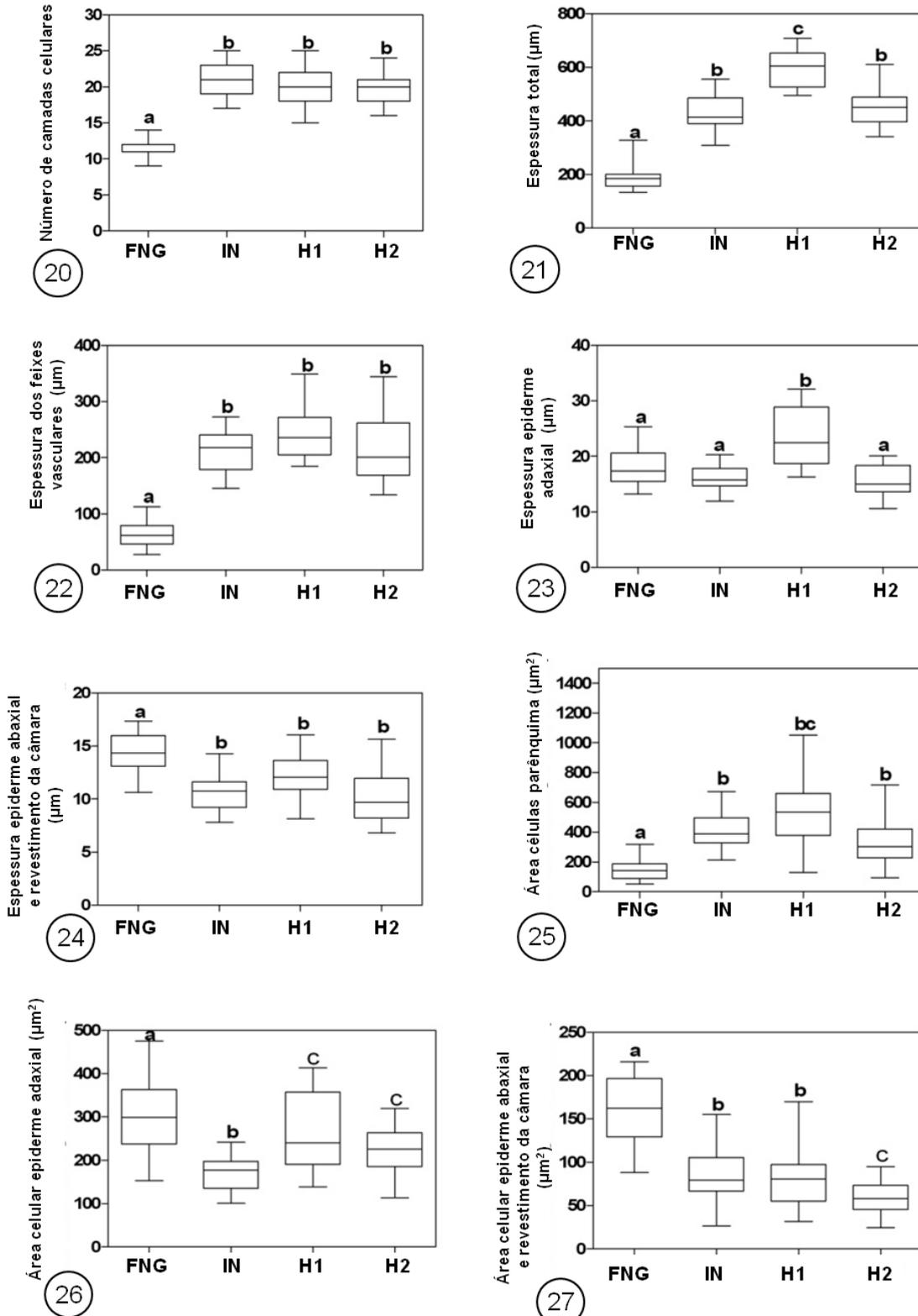
Figuras 1-7: Integrantes do sistema *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae). 1) Ninfa de 4^o instar do indutor, *C. aff. duvauae* Scott. 2-3) Ninfas de *C. aff. Duvauae*, com endoparasitóide (*Hymenoptera* sp.1). 2) Início do desenvolvimento. 3) Estágio avançado do desenvolvimento. 4) Pupa do *Hymenoptera* sp.1. 5) Exoesqueleto de *C. aff. duvauae*, do qual emergiu o *Hymenoptera* sp. 1. 6) Larva de *Hymenoptera* sp. 2. 7) Larva de *Lepidoptera* sp. **Barras:** 1, 3, 5-7 = 500 µm; 2, 4 = 100 µm.



Figuras 8-13: Sistema *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae). Galhas ao estereomicroscópio. Figuras 8-11) Galhas abertas transversalmente. 8) Aspecto da galha madura, apenas com o indutor. Parede adaxial (seta) com coloração vermelha. 9) Galha com *Hymenoptera* sp. 1, dentro do exoesqueleto de *Calophya* aff. *duvauae*. 10) Galha em fase de crescimento e desenvolvimento, com *Hymenoptera* sp. 2. Evidencia-se o tecido nutritivo onde o inquilino se alimenta (setas). 11) Galha madura, com pupa de *Hymenoptera* sp. 2. As regiões de alimentação (setas) apresentam sinais de necrose. 12) Abertura de galha senescente, de onde emergiu o indutor. 13) Galha senescente, de onde emergiu imago de outro nível trófico. Em destaque, a abertura do canal de saída (seta), ao lado da região de abertura (ponta de seta). Barras = 500 µm.



Figuras: 14-19: Sistema *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae). Alterações anatômicas nas galhas decorrentes da presença de inquilinos. 14-16: Alterações provocadas pela presença do *Hymenoptera* sp. 1. 14) *Calophya* aff. *duvauae*, com endoparasitóide no abdômen. Revestimento da câmara uniforme, sem tecido nutritivo diferenciado. 15) Células epidérmicas e parenquimáticas com indícios de divisões em vários planos. 16) Células epidérmicas e parenquimáticas hipertrofiadas, projetadas para o interior da câmara ninfal, com vacúolo claro e conteúdo fenólico granuloso no citoplasma. 17 e 18: Alterações decorrentes da presença do *Hymenoptera* sp. 2. 17) Aspecto papiloso das células do tecido nutritivo. Resultado positivo para açúcares solúveis. 18) Tecido nutritivo próximo ao feixe vascular. 19) Revestimento da câmara apresentando sinais de atividade alimentar do *Lepidoptera* sp. Barras: 14, 17, 18 = 50 µm; 15, 16, 19 = 10 µm.



Figuras 20-27: Sistema *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauei* Scott (Hemiptera: Calophyidae). Análises cito e histométricas de folhas não galhadas (FNG) e de galhas maduras com indutor (IN), *Hymenoptera* sp. 1 (H1) e *Hymenoptera* sp. 2 (H2), em seção transversal. 20) Número de camadas celulares. 21) Espessura total. 22) Espessura dos feixes vasculares. 23) Espessura da epiderme adaxial. 24) Espessura da epiderme abaxial e do revestimento da câmara. 25) Área de células do parênquima. 26) Área de células da epiderme adaxial. 27) Área de células da epiderme abaxial e do revestimento da câmara. Barras seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, seguido por testes múltiplos de Dunn; $\alpha = 0,05$). Os dados são representados pela medianas e respectivos quartis.

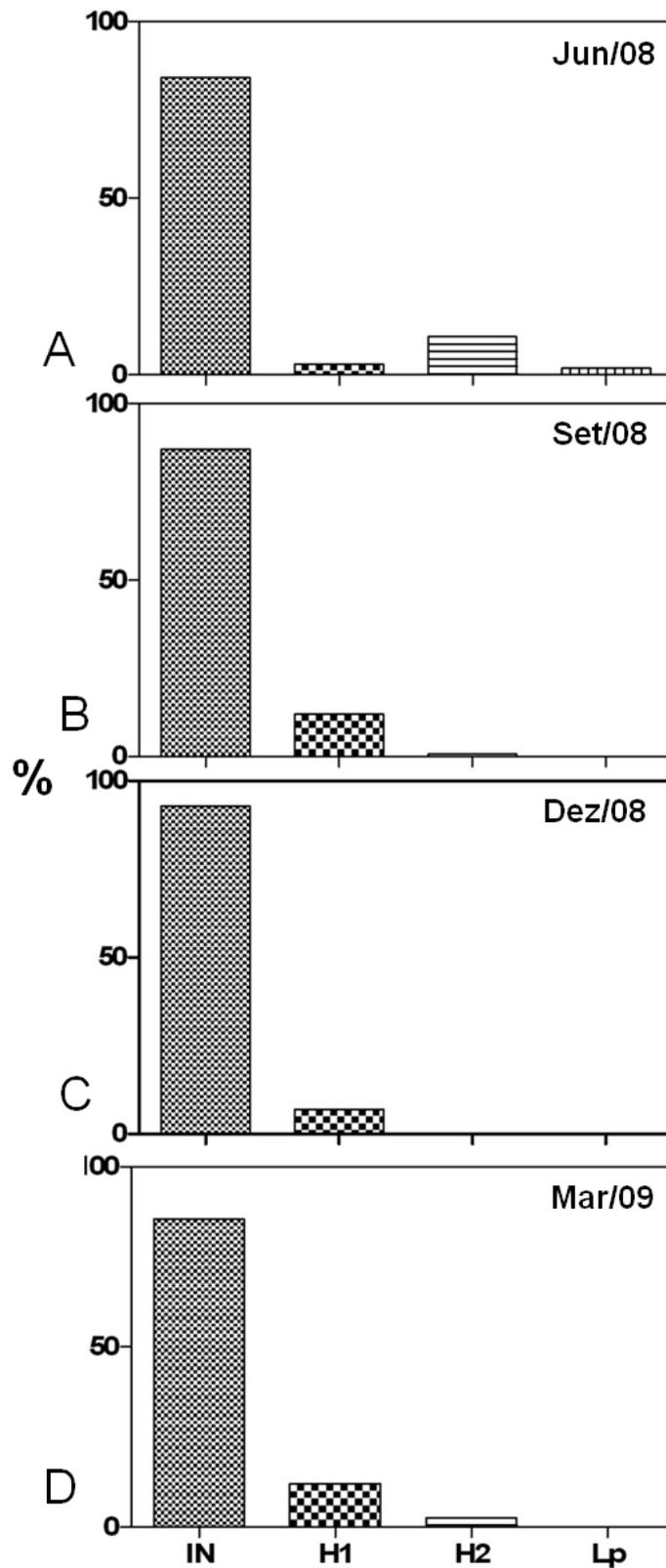


Figura 28: Proporções de integrantes do sistema *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae), nas amostras de junho (A), setembro (B) e dezembro de 2008 (C) e março de 2009 (D). IN= indutor; H1= *Hymenoptera* sp. 1; H2= *Hymenoptera* sp. 2; LP= *Lepidoptera* sp.

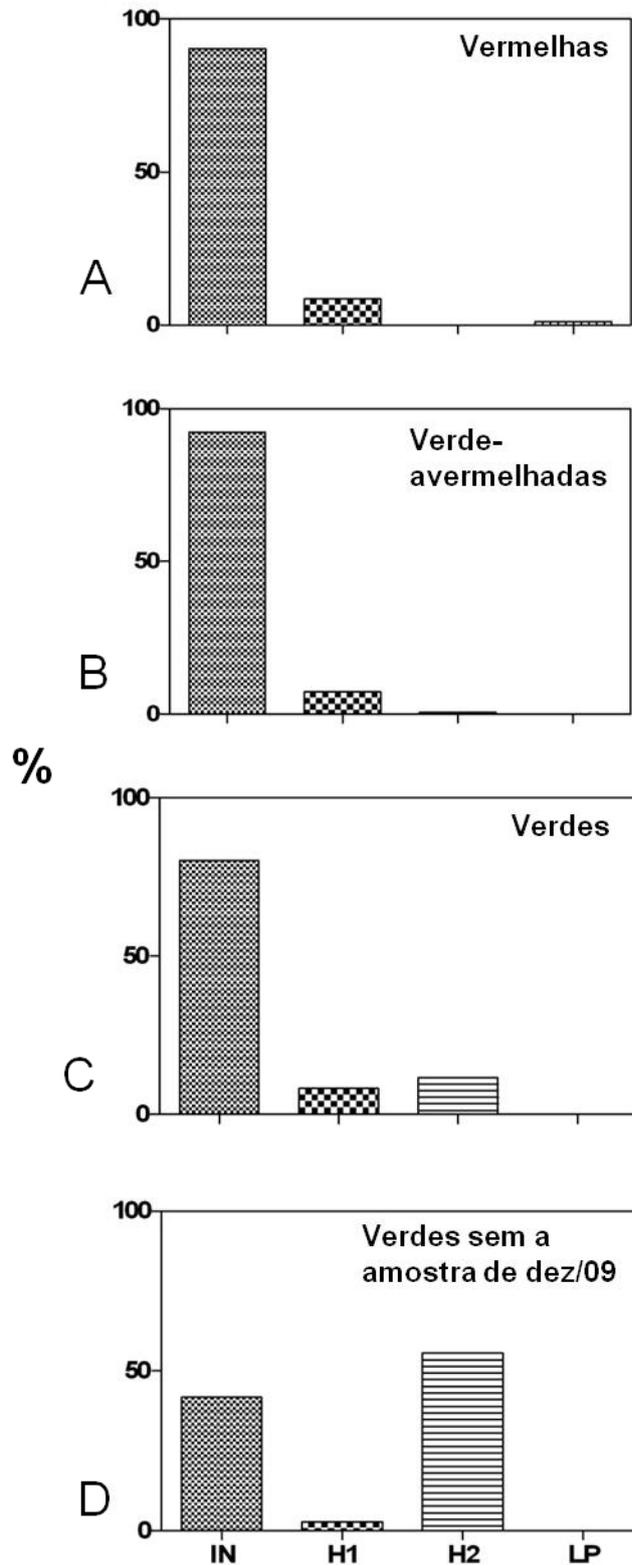


Figura 29: Sistema *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)-*Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae). Proporções de integrantes nas galhas vermelhas (A), verde-avermelhadas (B) e verdes (C), excluindo-se os dados da amostra de dezembro de 2008 (D). IN= indutor; H1= *Hymenoptera* sp. 1; H2= *Hymenoptera* sp. 2; LP= *Lepidoptera* sp.

Discussão

Os integrantes do sistema Schinus polygamus-Calophya aff. duvauae Scott

Os parasitoides e inquilinos presentes no sistema *S. polygamus-C. aff. duvauae* Scott pertencem às ordens Hymenoptera e Lepidoptera. De fato, a maioria dos parasitoides descritos na literatura pertence à ordem Hymenoptera (Weis 1982, Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992, Andrade *et al.* 1995, Hanson 1995, Maia & Monteiro 1999, Espírito-Santo *et al.* 2004, Ito & Hiji 2004, Cuevas-Reyes *et al.* 2007) e atacam a fase larval do hospedeiro (Maia & Monteiro 1999). Estudos com inquilinos foram raramente realizados (Ferraz & Monteiro 2003, László & Tóthmérész 2006) embora, nos sistemas em que são encontrados, sua proporção tenda a ser menor que a de parasitoides (Schonrogge *et al.* 2000, Chust *et al.* 2007).

Alterações morfológicas e anatômicas

A maioria dos estudos envolvendo inquilinos e parasitoides em galhas aborda o papel destes na dinâmica da comunidade (Wiebes-Rijks & Shorthouse 1992, Andrade *et al.* 1995, Hawkins *et al.* 1997, Maia & Monteiro 1999), sendo pouco referida sua influência nos tecidos da galha. As referências encontradas dizem respeito a mudanças no formato e tamanho da galha em resposta ao inquilino, sem maiores esclarecimentos quanto a diferenças anatômicas (Fernandes *et al.* 1987, Ferraz & Monteiro 2003, László e Tóthmérész 2006). As alterações anatômicas decorrentes da entrada de inquilinos e parasitoides neste sistema parecem estar relacionadas ao hábito alimentar destes organismos. É compreensível que as galhas com H1, por este se desenvolver dentro do indutor, não apresentem tecidos adicionais diferenciados, pois não há impacto nos tecidos da galha, como foi verificado por László e Tóthmérész (2006) nas galhas de *Diplolepsis rosae* contendo parasitoides. Já H2, promove alterações teciduais necessárias para a obtenção de seus recursos nutricionais devido ao seu hábito alimentar mastigador. O tecido nutritivo presente nesta galha se assemelha ao observado para galhas de Hymenoptera (Cynipidae) (Bronner 1992, Rohfritsch 1992) e parece ser a única fonte de alimento para estes insetos. O surgimento deste tecido demonstra a capacidade da planta em responder a estímulos variados (Moura *et al.* 2008). Neste caso, o estímulo do indutor foi necessário para a formação da galha e a atividade alimentar do inquilino resulta no

surgimento de células nutritivas ausentes na galha contendo apenas o primeiro. Ou seja, os resultados demonstram que um inquilino não apenas utiliza os tecidos existentes previamente na galha, mas que é capaz de induzir a produção de tecidos nutritivos em seu próprio benefício, conforme sugerido por Noort *et al.* (2007).

Os indivíduos LP não são capazes de alterar os tecidos da galha em seu benefício, deixando apenas, como vestígios de sua alimentação, células necrosadas na câmara. A ausência de alterações anatômicas e a baixa frequência encontrada sugerem o hábito cecidófago oportunista, sendo esta espécie, provavelmente, um cecidófago facultativo (Shinji & Kazuo 2009). Estes autores citam, inclusive, que este hábito ocorre em Lepidoptera.

As análises histo e citométricas revelam que o número de camadas celulares das galhas foi significativamente maior do que aquele de FNG sem, contudo, haver grandes diferenças entre as galhas com IN, H1 e H2. Galhas contendo H1 apresentaram maior espessura total e da epiderme adaxial quando comparadas às galhas com IN e H2, que não diferiram entre si. A espessura dos feixes vasculares aumentou significativamente em relação à folha não galhada, mas não diferiu entre a galha de IN e os demais integrantes da guilda. Comportamento similar foi observado para a espessura da epiderme abaxial e a área das células parenquimáticas. Em relação à área celular da epiderme adaxial, verificou-se redução na galha com IN quando comparada a FNG, e aumento resultante da entrada de H1 e H2. Já na epiderme abaxial, observou-se redução das áreas celulares nas galhas, sendo esta redução mais pronunciada na galha com H2. Galhas induzidas por H2 exibiram redução da área do revestimento da câmara e marcante hipertrofia nas células do tecido nutritivo.

Muito embora a presença do endoparasitoide provoque alterações estruturais, percebidas por divisões nas células do revestimento da câmara ninfal e do parênquima adjacente, estas galhas apresentaram maior espessura total. Isto se deve ao aumento em espessura e área das células da epiderme adaxial. Tal fato denota que embora o endoparasitoide não impacte diretamente os tecidos da galha, sua presença provoca sutis alterações citológicas.

A presença de H2 tem efeitos localizados, gerando dois tipos de reações. Sítios de hiperplasia resultam em células de dimensões reduzidas e sítios de hipertrofia relacionam-se à diferenciação de tecido nutritivo.

Proporção de insetos e cores das galhas

A proporção dos insetos variou nas diferentes cores das galhas, sendo encontrados endoparasitoides em todos os tipos de coloração, H2 predominantemente nas galhas verdes e LP somente nas vermelhas. Sabe-se que é necessária a presença e estímulo constante do galhador para a manutenção da integridade da galha (Mani 1992, Bronner 1992) e, neste sistema, a galha está vermelha quando abriga apenas o indutor, que deve estar saudável. Corroborar esta afirmação o fato de, na amostra de dezembro de 2008, muitas galhas serem verdes, apesar de abrigarem apenas o indutor. Estes indutores, porém, apresentavam malformações dos olhos compostos e demais partes do corpo, patologia esta que, por sua vez, pode resultar na diminuição do estímulo por parte deste indutor. É reconhecido há tempo na literatura entomológica que os endoparasitoides de larva e pupa geralmente não matam seus hospedeiros logo após o ataque (Askew 1971). Ou seja, seus ínstaes iniciais alimentam-se do conteúdo interno do hospedeiro, principalmente corpos gordurosos, quando ainda vivo. Assim, é de se esperar que as ninfas de *C. aff. duvauae* permaneçam se alimentando da planta por algum tempo após o ataque destes. Em consequência, a mudança da cor da galha ocorreria progressivamente após esse evento, com a diminuição da alimentação por parte do indutor e atenuação do estímulo de indução correspondente. De fato, verificou-se um contínuo na coloração das galhas, do vermelho para o verde, quando da presença do endoparasitoide. Excluindo-se a amostra de dezembro, a proporção entre indutores e H2 nas galhas verdes muda, com predominância deste inquilino em mais de 50% destas galhas.

A entrada de H1 nas galhas ocorre quando IN ainda está nos primeiros ínstaes de desenvolvimento e a galha ainda é vermelha, concordando com as afirmações de Wiebes-Rijks & Shorthouse (1992). Com o desenvolvimento de H1 em seu interior, IN, diminui gradualmente sua alimentação e, conseqüentemente, o estímulo que mantém a galha, resultando na mudança gradual de coloração do vermelho para o verde e a presença deste inseto em galhas com várias gradações de cor. Portanto, mesmo estando os indutores encontrados nas galhas verdes e verde-avermelhadas, aparentemente saudáveis, estes já podem estar abrigando o endoparasitoide, em um estágio ainda não detectável nas observações ao estereomicroscópio.

O inquilino H2 provoca a morte de IN rapidamente, visto este não ter sido encontrado em nenhuma das galhas que continham H2. Na ausência do indutor, se

processa a mudança de cor nas galhas, mais rápido que verificado para H1, o que explica a totalidade dos registros destes inquilinos em galhas verdes ou verde-avermelhadas.

A ocorrência ocasional e apenas em galhas vermelhas sugere a incapacidade de Lp em alterar os tecidos da galha, à exceção das células necrosadas no revestimento da câmara.

As galhas são vermelhas pela redução do teor de pigmentos fotossintéticos e as galhas verdes, além desta redução, apresentam a metade do conteúdo de antocianinas exibido nas galhas vermelhas (Cf. Dias 2010, cap. 1). Estes resultados confirmam que a presença de inquilinos e parasitoides, ao matarem o indutor, suprime o estímulo necessário à manutenção da fisiologia da galha.

As galhas, portanto, são induzidas e mantém sua integridade estrutural enquanto o indutor se alimenta de seus tecidos. Quando por patologias ou por ação de parasitoides e inquilinos, este estímulo cessa, a galha deixa de apresentar as características próprias desta interação. Tais conclusões, em consequência, impõem limites à aplicação do conceito de fenótipo estendido de Dawkins (1982) à gênese da morfologia de galhas no sentido *stricto*, visto que devido a esses fatores, pode haver variação em fenótipo dentro de uma mesma população de indutor.

Referências bibliográficas

- ANDRADE GI, SILVA IM, FERNANDES GW & SCATENA VL (1995). Aspectos biológicos das galhas de *Tomoplagia rudolphi* (Diptera: Tephritidae) em *Vernonia polyanthes* (Asteraceae). *Revista brasileira de Biologia*, 55(4): 819-829.
- ASKEW RR (1971). Parasitic insects. *Heinemann, London*.
- BISSING DR (1974). Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Technology*, 49(2): 116-117.
- BRONNER R (1992). The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press, New York*.
- BURCKHARDT D & BASSET Y (2000). The jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): systematics, biogeography and host plant relationships. *Journal of Natural History*, 34: 57-155.

- CHUST G, GARBIN L & PUJADE-VILLAR (2007). Gall wasps and their parasitoids in cork oak fragmented forests. *Ecological Entomology*, 32: 82–91.
- CUEVAS-REYES P, QUESADA M, HANSON P & OYAMA K (2007). Interactions among three trophic levels and diversity of parasitoids: a case of top-down processes in mexican tropical dry forest. *Environmental Entomology*, 36(4): 792-800.
- DAWKINS R (1982). The extended phenotype: the gene as the unit of selection. Oxford: *Oxford University Press*.
- DREGER-JAUFFRET F & SHORTHOUSE JD (1992). Diversity of gall-inducing insect and their gall. In *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- ESPÍRITO-SANTO MM, FARIA ML & FERNANDES GW (2004). Parasitoid attack and its consequences to the development of the galling psyllid *Baccharopelma dracunculifoliae*. *Basic and Applied Ecology*, 5: 475-484.
- FARMER E (2000). Potent mitogenic lipids from gall-inducing insects. *Trends in Plant Science*, 5(9): 359-360.
- FERNANDES GW, MARTINS RP & TAMEIRÃO NETO E (1987). Food web relationships involving *Anadiplosis* sp. Galls (Diptera: cecidomyiidae) on *Machaerium aculeatum* (Leguminosae). *Revista Brasileira de Botânica*, 10: 117-123.
- FERRAZ FFF & MONTEIRO RF (2003). Complex interactions involving a gall midge *Myrciomyia maricaensis* Maia (Diptera, Cecidomyiidae), phytophagous modifiers and parasitoids. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(3): 433-437.
- FERREIRA SA, FERNANDES GW & CARVALHO LG (1990). Biologia e história natural de *Euphaleurus ostreoides* (Homoptera: Psillidae) Cecidógeno de *Lonchocarpus guillerminianus* (Leguminosae). *Revista Brasileira de Biologia*, 50(2): 417-423.
- HANSON P (1995). The Hymenoptera of Costa Rica. *Oxford University Press*, New York.
- HAWKINS BA, CORNELL HV, & HOCHBERG ME (1997). Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, 78(7): 2145–2152.
- HORI K (1992). Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.

- ITO M & HIJII N (2004). Roles of gall morphology in determining potential fecundity and avoidance of parasitoid attack in *Aphelonyx glanduliferae*. *The Japanese Forestry Society and Springer-Verlag*, 9: 93-100.
- JOHANSEN DA (1940). Plant microtechnique. New York, *McGraw-Hill Book Co. Inc.*
- KRAUS JE & ARDUIN M (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica RJ, *EDUR*.
- LÁSZLÓ Z & TÓTHMÉRÉSZ B (2006). Inquiline effects on a multilocular gall community. *Acta Zoologica Scientiarum Hungaricae*, 52(4): 373-383.
- MAIA VC & MONTEIRO RF (1999). Espécies cecidógenas (Diptera, Cecidomyiidae) e parasitóides (Hymenoptera) associadas a *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. (Nyctaginaceae) na Restinga da Barra de Maricá, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16 (2): 483 – 487.
- MANI MS (1964). Ecology of plant galls. The Hague (The Netherlands): *Dr. W. Junk Publishers*. The Netherlands.
- MANI MS (1992). Introduction to Cecidology. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- MOURA MZD, SOARES GLG & ISAIAS RMS (2008). Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf gallers in *Lantana camara* (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany*, 56: 153-160.
- MOTULSKY H. (1992-2009). Analyzing data with Graph Pad Prism software. San Diego, California, USA, *GraphPad Software Inc.*
- NOORT SV, GRAHAM NS, WHITEHEAD VB & NIEVES-ALDREY JL (2007). Biology of *Rhoophilus loewi* (Hymenoptera: Cynipoidea: Cynipidae), with implications for the evolution of inquilinism in gall wasps. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90: 153-172.
- O'BRIEN TP & McCULLY ME (1981). The study of plant structure principles and selected methods. *Termarcarphi Pty*, Melbourne.
- PAIVA JGA, FANK-DE-CARVALHO SM, MAGALHÃES MP & GRACIANO-RIBEIRO D (2006). Verniz vitral incolor 500 ®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botanica Brasílica*, 20(2): 257-264.
- ROHFRITSCH O (1992). Patterns in Gall Development. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.

- SÁIZ F & NÚÑEZ C (1997). Estudio ecológico de las cecidias del género *Schinus*, especialmente las de hoja y de rama de *S. polygamus* y *Schinus latifolius* (Anacardiaceae), em Chile Central. *Acta Entomológica Chilena*, 21: 39-59.
- SCHRÖNROGGE K, HARPER LJ & LICHTENSTEIN CP (2000). The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment*, 23: 215-222.
- SHINJI S & KAZUO Y (2009). Gall-attacking behavior in phytophagous insects, with emphasis on Coleoptera and Lepidoptera. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 2(1): 41-61.
- STONE GN & SCHÖNROGGE K (2003). The adaptative significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(10): 512-522.
- WEIS AE (1982). Resource Utilization Patterns in a Community of Gall-Attacking Parasitoids. *Environmental Entomology*, 11(4): 809-815.
- WEIS AE, WALTON R & CREGO C L (1988). Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology*, 33: 467- 486.
- WIEBES-RIJKS AA & SHORTHOUSE JD (1992). Ecological Relationships of Insects Inhabiting Cynipid Galls. *In Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- ZEISS C (2008). Carl Zeiss Imaging Systems – 32 Software Release 4.7.2. USA. *Carl Zeiss MicroImaging Inc.*

**Impacto de *Calophya* aff. *duvauae* Scott
(Hemiptera: Calophyidae) e demais
habitantes da galha nos perfis histoquímicos
das folhas de *Schinus polygamus* (Cav.)
Cabrera (Anacardiaceae)**

Impacto de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) e demais habitantes da galha nos perfis histoquímicos das folhas de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae)

Resumo

A indução de galhas depende de processos de reconhecimento entre os organismos, os quais envolvem sinalizações ligadas a caracteres morfológicos e químicos das plantas hospedeiras. O estabelecimento do galhador, por sua vez, depende da sua capacidade de manipular o perfil químico da planta. Desta capacidade advém parte do valor adaptativo das galhas para nutrição e defesa contra inimigos naturais. O estudo comparativo dos perfis histoquímicos dos tecidos não galhados e das galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott em *Schinus polygamus*, contendo somente o indutor (IN) ou outros níveis tróficos (endoparasitoide “Hymenoptera sp. 1” – H1 e inquilino “Hymenoptera sp 2” – H2) permitiu evidenciar a estabilidade da síntese de compostos e a variabilidade dos sítios de acúmulo destes nas diferentes amostras. As galhas apresentaram açúcares redutores e gotículas lipídicas no córtex interno. Verificaram-se reações de maior intensidade para conteúdos fenólico e flavonoídico na galha madura, principalmente no córtex externo na superfície adaxial. Na galha senescente, a menor intensidade das reações para gotículas lipídicas, açúcares redutores, fenólicos e alcalóides, e as reações negativas para flavonóides e terpenos indicaram redução do metabolismo após a saída de IN. A quantidade e distribuição de substâncias nutricionais ou de defesa foram alteradas principalmente nas galhas contendo H2, com reações positivas para lipídios, açúcares redutores, flavonóides e terpenos no tecido nutritivo. Galhas com IN e H1 apresentaram perfis histoquímicos semelhantes, com diferenças apenas na localização dos terpenos. As diferenças entre as galhas com IN, H1 e H2 foram relacionadas aos níveis de impacto dos organismos nos tecidos vegetais.

Palavras-chave: defesas químicas, inquilinismo, nutrição, parasitoidismo

Abstract

Gall induction is dependent on the recognition between the corresponding host plant and gall inducer, whose processes involve signals related to the morphological and chemical features of the host plant. Therefore, the establishment of the gall inducer depends on its ability to manipulate the chemical profile of the plant. This capacity confers part of the adaptive value of the galls for nutrition, and defense against natural enemies. The comparative study of the histochemical profiles of the non-galled tissues and of the galls of *Calophya* aff. *duvauae* Scott in *Schinus polygamus*, containing only the gall inducer (IN) or other trophic levels (endoparasitoid “Hymenoptera sp. 1” – H1 and inquiline “Hymenoptera sp. 2” – H2) allowed to highlight the stability of the synthesis of compounds, and the variability of the sites of accumulation within the samples. Galls presented sugars and lipid droplets in the inner cortex. There were more intense reactions for phenolic and flavonoid contents especially in the outer cortex on the adaxial surface, in mature galls. Senescent galls exhibit the less intense reactions to lipids, reducing sugars, phenolics and alkaloids, and negative reactions for flavonoids and terpenes, indicating their lower metabolism after the leaving of the inducing insect. The amount and distribution of nutritional or defense substances have changed mainly in galls containing H2, with positive reactions for lipids, sugars, flavonoids and terpenes in the nutritive tissue. Galls with the inducing insect and H1 showed similar histochemical profiles, with differences only in the location of terpenes. The differences between the galls with IN, H1 and H2 were related to the levels of impact of organisms in plant tissues.

Key words: chemical defense, inquillinism, nutrition, parasitoidism

Introdução

O sucesso na indução de galhas entomógenas depende de processos de reconhecimento entre o indutor e a planta hospedeira, os quais envolvem sinalizações ligadas a caracteres morfológicos e químicos destas (Rohfritsch 1992). Por parte do galhador, a indução e seu estabelecimento dependem da sua capacidade de promover alterações nas substâncias dos metabolismos primário e secundário (Hartley 1998). Destas alterações, em geral, decorre parte do valor adaptativo das galhas para nutrição e defesa contra inimigos naturais (Weis & Abrahamson 1986).

Uma das ferramentas que permite a detecção dos metabólitos nos tecidos das galhas é a histoquímica. Através de testes *in situ*, é possível não somente detectar, mas também localizar os metabólitos nas camadas de tecidos especializados das galhas. Seu perfil histoquímico depende, sobretudo, das potencialidades químicas das plantas hospedeiras e da capacidade de manipulação destas potencialidades por parte dos indutores.

Schinus polygamus, a espécie hospedeira de galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott, abordadas neste estudo, apresenta composição química peculiar que lhe garante propriedades anti-inflamatórias e antissépticas (Burckhardt & Basset 2000; Erazo *et al.* 2006). Estas propriedades são atribuídas a compostos secundários, tais como flavonóides e mono e sesquiterpenos, compostos com reconhecida atividade antimicrobiana e anti-herbívora. Este trabalho objetiva verificar a presença e localização de substâncias químicas nas galhas em comparação às folhas não galhadas, visando compreender se e como a espécie galhadora manipula o perfil histoquímico da planta hospedeira em seu próprio benefício. A influência, neste perfil histoquímico, de dois habitantes desta galha, pertencentes à ordem Hymenoptera, sendo um endoparasitoide (Hymenoptera sp. 1 – H1) e um inquilino (Hymenoptera sp. 2 – H2) também é avaliada.

Material e métodos

Coleta do material

Amostras de folhas não galhadas e de galhas de *C.* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) foram obtidas de uma população de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera

(Anacardiaceae) localizada em uma propriedade rural existente no Rincão da Ronda, município de Canguçu, Rio Grande do Sul (32°15'00''S, 65°58'00''W). As coletas ocorreram em junho, setembro e dezembro de 2008 e março de 2009. Em cada coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos, submetido à refrigeração e enviado para análises no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG. O material vegetal fértil está depositado no herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número ICN 42884.

Análises histoquímicas

Amostras de folhas não galhadas (FNG) e de galhas maduras (GM) e senescentes (GS) foram cortadas à mão livre utilizando-se lâminas de barbear. Estes cortes foram recolhidos em água e submetidos diretamente às análises histoquímicas. Outra parte destas amostras foi fixada em Karnovsky (O'Brien & McCully 1981, modificado para tampão fosfato pH 7,2) e transferidas para etanol 70%. Este material foi reidratado, desidratado em série crescente de polietilenoglicol 6000 (PEG) em estufa a 60 °C e incluído em PEG 100% a baixa temperatura. As seções transversais (20 µm) foram obtidas em micrótomo rotatório (Leica® 2035 BIOCUT), transferidas para placas de Petri contendo água e submetidas às reações histoquímicas.

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

A presença e localização de compostos do metabolismo secundário relacionados a sinalização ou defesa contra inimigos naturais (polifenóis, proantocianidinas, taninos condensados, derivados flavonoídicos, ligninas, alcalóides, terpenos e triterpenos) foram avaliadas. Para detecção de polifenóis, as amostras foram submetidas ao cloreto férrico (Johansen 1940). A presença de proantocianidinas foi testada pela fixação dos cortes em cafeína/benzoato de sódio em butanol, e imersão em solução etélica de *p*-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) (Feucht *et al.* 1986). Taninos condensados foram

verificados após a reação com vanilina clorídrica (Gardner 1975). Derivados flavonoídicos foram testados pela reação com ácido sulfúrico (Zuanazzi 2000) e ligninas pela submersão dos cortes em solução acidificada de floroglucinol (Johansen 1940). Reagente de Draggendorff (Yoder & Mahberg 1976), mistura de Jeffrey (Johansen 1940), reagente de Dittmar (Furr & Mahlberg 1981) e ácido pícrico (Faure 1914) foram utilizados para detecção de alcalóides. A presença de terpenos foi verificada pela imersão dos cortes em solução de alfa-naftol em etanol/solução de cloridrato de dimetil-parafenilenodiamina (NADI) (David & Carde 1964) e triterpenos pelo reagente de Lieberman-Buchard (ácido acético-ácido sulfúrico concentrado) (Wagner *et al.* 1984).

Os testes-controle foram realizados conforme sugerido nas respectivas referências bibliográficas. Testes-controle e reações também foram analisados em comparação com cortes-branco.

As seções submetidas às reações histoquímicas foram montadas em lâminas com água e imediatamente fotografadas em microscópio óptico (Olympus BHS) com câmera digital (Canon® Power Shot A630).

Resultados

O perfil histoquímico dos tecidos das galhas mostrou peculiaridades em comparação aos tecidos não galhados, bem como dentre aqueles com a presença do endoparasitoide e do inquilino (tabela 1). Em relação às substâncias envolvidas nos aspectos nutricionais das galhas, as reações foram positivas para lipídios, proteínas e açúcares redutores, e negativas para amido. Lipídios foram detectados no revestimento cuticular, mesofilo e nos ductos secretores em todas as amostras. Em galhas contendo H2, verificou-se menor concentração de gotículas lipídicas nas células do mesofilo, quando comparada às galhas contendo IN, e maior concentração destas no tecido nutritivo.

Açúcares redutores foram observados nos parênquimas lacunoso e paliçádico de FNG, havendo uma reação mais intensa neste último tecido. Em GM e nas galhas contendo H1 ou H2, a reação para açúcares redutores foi positiva e homogênea por todo o parênquima cortical, sendo mais intensa na região próxima à câmara ninfal e no tecido nutritivo, no caso de H2. Em GS, a reação foi negativa no mesofilo e tênue nas células proximais e no epitélio dos ductos secretores.

Poucos grânulos protéicos foram evidenciados em células no mesofilo e parênquima vascular de FNG e no parênquima cortical de GM, GS e galhas com H1 ou H2. Em GS, a reação foi um pouco mais intensa nas células adjacentes à câmara ninfal. Nas células epidérmicas, não foram detectadas substâncias do metabolismo primário.

Tabela 1: Testes histoquímicos realizados em folhas não galhadas (FNG), e em galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae) maduras (GM), senescentes (GS), com Hymenoptera sp. 1 (H1) e Hymenoptera sp. 2 (H2), em população de *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae), em Canguçu, RS. A quantidade de sinais positivos indica a intensidade da reação. (+) = reação positiva; (-) = reação negativa

Reagentes	Substâncias alvo	FNG	GM	GS	H1	H2
Vermelho B do Sudão	Lipídios	+++	++	+	++	+
Lugol	Amido	-	-	-	-	-
Fehling	Açúcares redutores	+++	+++	+	++	++
Azul de Coomassie	Proteínas	+	+	+	+	+
Azul Mercúrico de Bromofenol	Proteínas	+	+	+	+	+
Floroglucinol Acidificado	Ligninas	+	+	+	+++	+++
Cloreto Férrico	Polifenóis	+++	++++	+	+++	+++
DMACA	Proantocianidinas	+	++++	-	+++	+
Ácido Sulfúrico	Derivados flavonoídicos	+	+++	-	++	+++
Vanilina-HCl	Taninos condensados	++	+	++	+	+
Jeffrey	Alcalóides	+++	+++	+	++	++
Dragendorff	Alcalóides	++	++	+	++	+
Dittmar	Alcalóides	+++	+++	+	+++	+
Ácido Pícrico	Alcalóides	++	++	+	++	+
NADI	Terpenos	+	+	-	+	+
Lieberman-Buchard	Triterpenos	++	++	++	++	++

Com relação às substâncias do metabolismo secundário, fenólicos e alcalóides foram detectados distintamente nas camadas de tecidos das galhas. A reação para ligninas foi positiva apenas nas paredes celulares dos elementos de vaso e traqueídes, tanto em FNG quanto nas galhas e nos tricomas da abertura destas. Os polifenóis foram detectados como conteúdo enegrecido no vacúolo das células do mesófilo e no citoplasma daquelas do parênquima vascular de FNG e de GS, nas quais a reação foi também positiva na epiderme externa. Em GM e galhas contendo H1, a reação para polifenóis foi mais pronunciada na região cortical externa, enquanto nas galhas contendo H2, a reação foi mais intensa nas camadas celulares do córtex interno. A natureza tanífera destes compostos foi verificada pelo resultado positivo à reação com a vanilina-clorídrica em todas as amostras.

Em FNG, GM e galhas contendo H1, proantocianidinas e derivados flavonoídicos foram detectados por todo o parênquima, floema, parênquima vascular e epitélio secretor. Contudo, verificou-se um aumento considerável na intensidade da reação em GM, especialmente nas camadas celulares mais externas do córtex. Em GS, estes compostos não foram detectados. Na galha contendo H2, a reação foi conspícua no córtex, sendo mais intensa nas células adjacentes à câmara ninfal, especialmente no tecido nutritivo.

Alcalóides foram encontrados no conteúdo vacuolar das células do parênquima em todas as amostras. No caso de GS, embora a reação tenha sido mais tênue nos quatro testes utilizados, foi relativamente mais intensa nos ductos secretores. Nas galhas com H2, os alcalóides ocorreram na forma de grânulos no citoplasma de todas as células do córtex e da epiderme, havendo um gradiente de concentração do revestimento externo da galha em direção ao revestimento da câmara.

A natureza terpênica da secreção lipídica foi verificada nos ductos secretores de FNG, GM, galhas contendo H1 ou H2 e no revestimento da câmara ninfal de todas as galhas. Em GS, a reação para terpenos foi negativa. A reação para triterpenos foi positiva em células isoladas no parênquima lacunoso e na cutícula de FNG, no córtex externo e epiderme adaxial de GM, GS, e nas galhas contendo H1 ou H2. Na galha com H1, verificou-se reação positiva em várias células parenquimáticas do córtex interno e da epiderme que reveste a câmara ninfal. Na galha com H2, os sítios de reação para terpenos foram similares àqueles da galha com IN, além da detecção nas células do tecido nutritivo.

Discussão

A indução das galhas de *C. aff. duvauae* Scott em *S. polygamus* não provocou supressão ou expressão de nenhum composto pesquisado pelos testes histoquímicos em relação aos tecidos não galhados. As diferenças foram percebidas em relação à localização de alguns destes compostos nos tecidos especializados das galhas. A similaridade entre os perfis histoquímicos de tecidos galhados e não galhados pode ser devida ao hábito alimentar sugador de *C. aff. duvauae* Scott. De fato, Larson e Whitham (1997) já haviam observado que sugadores de floema são menos influenciados pelos níveis de compostos nas galhas, quando comparados aos herbívoros mastigadores. Conseqüentemente, é plausível supor que os tecidos vegetais também sejam menos impactados por estes galhadores quando comparados àqueles impactados por insetos de hábito mastigador.

Nas galhas de *S. polygamus*, a reação pelo vermelho B do Sudão evidenciou uma quantidade de gotículas lipídicas relativamente menor nas galhas do que nas folhas não galhadas. Por se tratar de insetos sugadores de floema (Burckhardt 2005), a presença de tecido nutritivo contendo lipídios não é esperada, e estes compostos podem ser metabolizados e convertidos em componentes estruturais e metabólicos. Estes componentes seriam fundamentais para o desenvolvimento da galha e do galhador, conforme proposto por Oliveira *et al.* (2006) para galhas de *Lonchocarpus muehlbergianus*. A detecção de lipídios em galhas de sugadores foi registrada por Moura *et al.* (2008) em *Lantana camara* e atribuída a caracteres intrínsecos à espécie vegetal. De fato, esta pode ser uma explicação para a detecção de lipídios em galhas de *S. polygamus*, haja visto esta substância ser integrante do perfil químico das Anacardiaceae (Lacchia 2006, Sant'Anna-Santos *et al.* 2006).

A detecção de açúcares redutores nas galhas, especialmente nas camadas do córtex interno e no tecido nutritivo de galhas com H2, indica sua condição de dreno de fotoassimilados (Weis *et al.* 1988, Raman *et al.* 2006, Motta *et al.* 2005, Álvarez *et al.* 2009, Schrönrogge *et al.* 2000, Burstein *et al.* 1994). Por conseguinte, a localização histoquímica destas substâncias nas galhas indica a maximização da potencialidade de *S. polygamus*, gerando maior valor nutricional. A menor quantidade de gotículas lipídicas e açúcares redutores em GS reflete o menor metabolismo dos tecidos após o fim do estímulo por parte do inseto indutor.

Nas galhas contendo outros níveis tróficos, mudanças nos metabólitos primários foram mais pronunciadas naquelas contendo H2. Em relação às galhas contendo IN e H1, as respostas foram semelhantes, com detecção de lipídios, açúcares redutores e proteínas nos mesmos sítios. Nas galhas contendo H2, verifica-se menor quantidade de gotículas lipídicas no córtex em relação ao encontrado no tecido nutritivo, onde também se verificou a presença de açúcares redutores. A presença de lipídios e açúcares é típica de tecidos nutritivos encontrados em galhas de Cynipidae e Cecidomyiidae, respectivamente (Bronner 1992, Rohfritsch 1992). Tendo em vista que o acúmulo destes metabólitos não é característica comum em galhas de sugadores (Rohfritsch 1992, Oliveira *et al.* 2006), a ação alimentar de H2, o qual apresenta aparelho bucal do tipo mastigador, parece influenciar a síntese destas substâncias e o direcionamento para seu sítio de alimentação. Pode-se, pois, concluir que a presença de outros integrantes da guilda associada às galhas de *S. polygamus* altera os compostos nutricionais, dentro de limites estabelecidos pela planta hospedeira.

Outro aspecto relevante das interações químicas ligado ao estabelecimento e desenvolvimento das galhas diz respeito à detecção e localização dos compostos secundários envolvidos na defesa química contra inimigos naturais. Neste aspecto, há relatos tanto de diminuição (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000) quanto de aumento (Abrahamson *et al.* 1991, Pascual-Alvarado *et al.* 2008) destas substâncias em resposta à presença do galhador.

Dentre os metabólitos secundários relacionados às interações que resultam nas galhas, os polifenóis (dentre estes os taninos), os derivados flavonoídicos e os alcalóides são bastante explorados (Henriques *et al.* 2000, Nyman e Julkunen-Tiitto 2000, Motta *et al.* 2005, Fleury 2009). Em *S. polygamus*, durante o desenvolvimento da folha não galhada ocorreu um aumento gradual na concentração de fenólicos, substâncias detectadas em algumas células da protoderme, já no primeiro nó (*Cf.* Dias 2010, cap. 2). A síntese precoce destas substâncias está relacionada na literatura à defesa química contra inimigos naturais ou como inibidoras de oviposição (Álvarez *et al.* 2008, Moura *et al.* 2008), uma ameaça crescente à medida que a folha se expande, oferecendo maior superfície. As FNG apresentaram reação positiva para polifenóis nas células epidérmicas, do mesófilo e do parênquima vascular, reação similar à observada para *Pistacia terebinthus* (Álvarez *et al.* 2008), na qual os autores relacionam os polifenóis com proteção anti-herbivoria, por reduzirem a digestibilidade. A reação para o cloreto férrico formou manchas enegrecidas no citoplasma das células parenquimáticas, reação esta

mais intensa no córtex das galhas contendo IN ou H1, à semelhança do observado por Nyman e Julkunen-Tiitto (2000). Em galhas com H2, verificou-se uma distribuição diferencial de compostos fenólicos, havendo maior reatividade ao cloreto férrico nas camadas do córtex interno, assim com verificado por Oliveira *et al.* (2006) para *Lonchocarpus muehlbergianus*, Moura *et al.* (2008) para *Lantana camara* e Álvarez *et al.* (2009) para *Pistacia terebinthus*.

Um aumento da concentração de fenólicos nas galhas em relação às folhas foi evidenciada por Motta *et al.* (2005) em *Tibouchina pulchra*. Segundo Abrahamson *et al.* (1991), as maiores concentrações destas substâncias se relacionam com os níveis de auxina, refletindo a taxa de crescimento dos tecidos das galhas. De fato, os fenólicos participam da inibição das AIA oxidases (Hori 1992), o que aumenta os níveis de auxina nos sítios de reação, resultando na maior taxa de divisões celulares (Formiga *et al.* 2009) e na neovascularização observada nas galhas (Aloni 2001). A maior concentração de fenólicos nas células próximas ao tecido nutritivo das galhas de *S. polygamus* contendo H2 corrobora esta afirmação, uma vez que o incremento nas divisões celulares ocorre exatamente nas regiões de alimentação destes insetos. Ademais, a própria injúria imposta nas células devido à atividade alimentar do inquilino, neste caso, aumenta a força do dreno e estimula o fluxo de nutrientes, resultando na constante regeneração deste tecido enquanto houver estímulo alimentar (Raman *et al.* 2006).

Dentre os fenólicos, os taninos, compostos que participam da defesa contra herbívoros vertebrados e invertebrados, e contra micro-organismos patogênicos, especialmente fungos (Abrahamson *et al.* 1991, Nyman & Julkunen-Tiitto 2000, Pascual-Alvarado *et al.* 2008) são também bastante estudados. O resultado positivo para estas substâncias no córtex das galhas com IN e H1 é similar ao encontrado em diversos sistemas (Bronner 1992, Nyman & Julkunen-Tiitto 2000, Schrönrogge *et al.* 2000, Harper *et al.* 2004). Os taninos geralmente causam inibição da atividade alimentar pela diminuição da palatabilidade, causando dificuldades na digestão pela complexação com enzimas digestivas e/ou proteínas da planta ou através da formação de subprodutos tóxicos decorrentes da hidrólise destes taninos (Álvarez *et al.* 2008, Santos & Mello 2000). A distribuição destes compostos nas camadas de tecidos das galhas é atribuída a defesas contra invasores (Abrahamson *et al.* 1991, Pascual-Alvarado *et al.* 2008) quando localizadas no córtex externo. Ao mesmo tempo, evitaria os problemas decorrentes de sua alta concentração próximo ao indutor (Nyman & Julkunen-Tiitto 2000). O inquilino H2

parece não sofrer os efeitos deletérios dos taninos, uma vez que em suas galhas foram detectados no córtex interno, inclusive nas células de tecido nutritivo.

Com relação aos flavonóides, os testes histoquímicos realizados permitiram a detecção de proantocianidinas e derivados flavonoídicos com distribuição diferencial entre tecidos não galhados e galhas. Verificou-se reação mais intensa no córtex de GM, GS e galhas contendo H1, além do tecido nutritivo de galhas contendo H2. Na região mais externa do córtex, os derivados flavonoídicos podem estar relacionados à proteção contra radicais livres, radiação ultravioleta e luz visível (Zuanazzi 2000), enquanto, nas camadas mais internas, proteção contra fungos, vírus e bactérias (Dai *et al.* 1996, Zuanazzi 2000). Estas substâncias também podem agir como sinalizadores interferindo na oviposição de co-específicos e na localização da galha por predadores e parasitoides (Drummond 2005, Oliveira *et al.* 2006, Simmonds 2001). Muito embora o papel dos flavonóides seja ainda pouco esclarecido nas galhas, sua ocorrência tem sido constantemente detectada nos sistemas na região neotropical (Oliveira *et al.* 2006, Castro 2007, Lima 2008, Fleury 2009). Deste modo, é possível que sua função seja a sinalização de sítios de oviposição para o galhador ou outros integrantes da guilda, como o próprio H2.

Reações relativamente semelhantes para compostos alcaloídicos foram observadas em FNG, GM, GS e galhas contendo H1, sendo menos intensa nas galhas com H2. Segundo Henriques *et al.* (2000), herbívoros evitariam plantas com altas concentrações de alcalóides devido a sua toxicidade ou ao sabor amargo destes compostos. *C. aff. duvauae* Scott, portanto, é capaz de sobrepujar este mecanismo de defesa potencial de *S. polygamus*, enquanto H2 parece regular sua síntese, uma vez que estes compostos estão em menor teor próximo ao seu sítio de alimentação. Além disso, os alcalóides são mais abundantes em tecidos com crescimento ativo (Henriques *et al.* 2000), fato que pode relacionar-se com a juvenilidade fisiológica da galha (Weis *et al.* 1988) e justificar sua alta concentração nestes tecidos.

Compostos terpênicos foram verificados nos ductos intrafloemáticos de FNG, GM, GS e galhas com H1, além do revestimento da câmara de GM e galhas com H1. Nas galhas contendo H2, a reação foi positiva nestas mesmas regiões e no tecido nutritivo. Estes compostos também são sinalizadores contra herbivoria e atrativos de parasitas e predadores (Simões & Spitzer 2000, Taiz & Zeiger 2004), havendo relatos de alterações na quantidade e qualidade destas substâncias já em resposta à oviposição (Hilker & Meiners 2006). De modo geral, o papel dos compostos terpênicos nas galhas é pouco explorado e, no sistema em estudo, sua detecção parece ser reflexo de uma

característica inerente à planta hospedeira. Os herbívoros associados possivelmente conseguem inativar a toxicidade potencial destas substâncias.

A interação metabólica de *C. aff. duvauae* Scott com os tecidos foliares de *S. polygamus* parece ser mais próxima daquela de H1 pois, as reações histoquímicas foram semelhantes na presença e localização de compostos secundários, com exceção apenas para a localização dos terpenos e triterpenos. Tomando como base o papel dos hábitos alimentares como principais fatores reguladores da interação entre os herbívoros e os tecidos vegetais, esta similaridade não seria esperada, uma vez que IN é sugador e H1 é mastigador. Contudo, devido ao endoparasitoidismo de H1, seu hábito alimentar não impacta diretamente os tecidos vegetais da planta hospedeira.

Os perfis histoquímicos observados permitem evidenciar a similaridade entre tecidos não galhados e de galhas no sistema *S. polygamus-Calophya aff. duvauae* Scott. Contudo, devido às especializações teciduais das galhas e aos diferentes hábitos alimentares dos inquilinos e parasitoides, pode-se concluir que cada um destes integrantes da guilda consegue manipular o perfil histoquímico da planta hospedeira de forma diferencial. As galhas contendo H1 apresentam maior similaridade àquelas contendo IN e aquelas contendo H2 são as mais diversas, o que se explica pelo maior impacto destes últimos nos tecidos vegetais.

Referências bibliográficas

- ABRAHAMSON WG, McCREA KD, WHITWELL AJ & VERNIER LA (1991). The role of phenolic compounds in goldenrod ball resistance and formation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19: 615-622.
- ALONI R (2001). Foliar and axial aspects of vascular differentiations: Hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth and Regulation*, 20: 22-34.
- ÁLVAREZ R, ENCINA A & PÉREZ HIDALGO N (2008). *Pistacia terebinthus* L. leaflets: an anatomical study. *Plant Systematics and Evolution*, 272: 107–118.
- ÁLVAREZ R, ENCINA A & PÉREZ HIDALGO N (2009). Histological aspects of three *Pistacia terebinthus* galls induced by three different aphids: *Paracletus cimiciformis*, *Forda marginata* and *Forda formicaria*. *Plant Science*, 176: 303-314.

- BRONNER R (1992). The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. *In* Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- BRUNDETT MC, KENDRICK B & PETERSON CA (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, 66: 111-116.
- BURCKHARDT D & BASSET Y (2000). The jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): systematics, biogeography and host plant relationships. *Journal of Natural History*, 34: 57–155.
- BURCKHARDT D (2005). Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Psyllids (Hemiptera: Psylloidea). *In*: Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods (Raman A, Schaefer CW & Withers TM, eds). *Science Publishers*, Plymouth, UK.
- BURSTEIN M, WOOL D & ESHEL A (1994). Sink strength and clone-size of sympatric, gall-forming aphids. *European Journal of Entomology*, 91: 57-61.
- CASTRO ACR (2007). Reações estruturais e químicas de *Caryocar brasiliense* Camb (Caryocaraceae) a herbívoros galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- DAI GH, NICOLE M, ANDARY C, MARTINEZ C, BRESSON E, BOHER B, DANIEL JF & GEIGER JP (1996). Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 285-306
- DAVID R & CARDE JP (1964). Coloration defférentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 258: 1338-1340.
- DRUMMOND MM (2005). Galhas entomógenas em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae): estrutura anatômica, histoquímica e sazonalidade. Dissertação de Mestrado, *Universidade Federal de Minas Gerais*, Minas Gerais.
- DUNN MJ (1993). Gel Electrophoresis: Proteins. *Bios Scientific Publishers*, Oxford.
- ERAZO S, DELPORTE C, NEGRETE R, GARCÍA R, ZALDÍVAR M, ITURRA G, CABALLERO E, LOPEZ JL & BACKHOUSE N (2006) Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 395–400.

- FAURE G (1914). Manuale di micrografia vegetale. Roma: *Medico Farmacológico Ed.*
- FEUCHT W, SCHMID PPS & CHRIST E (1986). Distribution of flavonols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *Journal of Plant Physiology*, 125: 1-8.
- FLEURY G (2009). Reações estruturais, histoquímicas e fisiológicas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) a Cecidomiidae galhadores. Dissertação de Mestrado. *Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.*
- FORMIGA AT, GONÇALVES SJMR, SOARES GLG & ISAIAS RMS (2009). Relações entre o teor de fenóis totais e o ciclo das galhas de Cecidomyiidae em *Aspidosperma spruceanum* Müll. Arg. (Apocynaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 23(1): 93-99.
- FURR M & MAHLBERG PG (1981). Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 44: 153-159.
- GARDNER RO (1975). Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannins. *Stain Technology*, 50: 315-317.
- HARPER LJ, SCHRÖNROGGE K, FRANCIS KYL & LICHTENSTEIN CP (2004). Cynipid galls: insect-induced modifications of plant development create novel plant organs. *Plant, Cell and Environment*, 27: 327-335.
- HARTLEY SE (1998). The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by gall-former? *Oecologia*, 113: 492-501.
- HENRIQUES AT, KERBER VA & MORENO PRH (2000). Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (CMO Simões, EP Schenkel, G Gosmann, JCP Mello, LA Mentz & PR Petrovik, eds.). 2ª ed. *Editora da UFSC, Santa Catarina.*
- HILKER M & MEINERS T (2006). Early Herbivore Alert: Insect Eggs Induce Plant Defense. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1379-1397.
- HORI K (1992). Insect secretions and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In: *Biology of insect-induced galls* (Shorthouse JD & Rohfristsch O, eds). *Oxford University Press, New York.*
- JOHANSEN DA (1940). *Plant microtechnique*. New York, *McGraw-Hill Book Co. Inc.*, 523 p.
- LACCHIA APS (2006). Estruturas secretoras em órgãos secretores vegetativos e reprodutivos de espécies de Anacardiaceae: anatomia, histoquímica e ultra-estrutura. Tese de Doutorado. *Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.*

- LARSON KC & WHITHAM TG (1997). Competition between gall aphids and natural plant sinks: plant architecture affects resistance to galling. *Oecologia*, 109: 575-582.
- LIMA FS (2008). Respostas estruturais e fisiológicas de *Richeria grandis* Vahl. (Phyllanthaceae) ao estabelecimento do Psyllidae galhador. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- MAZIA D, BREQER PA & ALFERT M (1953). The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *The Biological Bulletin*, 104: 57-67.
- MOTTA LB, KRAUS JE, SALATINO A & SALATINO MLF (2005) Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 971-981.
- MOURA MZD, ISAIAS RMS & SOARES GLG (2005). Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 148: 427-431.
- MOURA MZD, SOARES GLG & ISAIAS RMS (2008). Species-specific changes in tissue morphogenesis induced by two arthropod leaf gallers in *Lantana camara* (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany*, 56: 153-160.
- NYMAN T & JULKUNEN-TIITTO R (2000). Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, 97(24): 13184-13187.
- 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 mulherbergianus* (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Brasileira de Botânica*, 29(4): 657-667.
- PASCUAL-ALVARADO E, CUEVAS-REYES P, QUESADA M & OYAMA K (2008). Interactions between galling insects and leaf-feeding insects: the role of plant phenolic compounds and their possible interference with herbivores. *Journal of Tropical Ecology*, 24: 329-336.
- RAMAN A, MADHAVAN S, FLORENTINE SK & DHILEEPAN K (2006). Metabolite mobilization in the stem galls of *Parthenium hysterophorus* induced by *Epiblema strenuana* inferred from the signatures of isotopic carbon and nitrogen and

- concentrations of total non-structural carbohydrates. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119: 101-107.
- ROHFRITSCH O (1992). Patterns in Gall Development. In Biology of insect-induced galls (Shorthouse JD & Rohfritsch O, eds). *Oxford University Press*, New York.
- SANT'ANNA-SANTOS BF, THADEO M, MEIRA RMSA & ASCENSÃO L. (2006). Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore*, 30(3): 481-489.
- SANTOS SC & MELLO JCP (2000). Taninos. In Farmacognosia: da planta ao medicamento (CMO Simões, EP Schenkel, G Gosmann, JCP Mello, LA Mentz & PR Petrovik, eds.). 2ª ed. *Editora da UFSC*, Santa Catarina.
- SASS JE (1951). Botanical Microtechnique. 2ª ed. *Ames: Iowa State College Press*.
- SCHÖNROGGE K, WALKER P & CRAWLEY MJ (2000). Parasitoid and inquiline attack in the galls of four alien cynipid gall wasps: host switches and the effect on parasitoid sex ratios. *Ecological entomology*, 25(2): 208-219.
- SIMÕES CMO & SPITZER V (2000). Óleos voláteis. In Farmacognosia: da planta ao medicamento (CMO Simões, EP Schenkel, G Gosmann, JCP Mello, LA Mentz & PR Petrovik, eds.). 2ª ed. *Editora da UFSC*, Santa Catarina.
- SIMMONDS MSJ (2001). Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*, 56: 245-252.
- TAIZ L & ZEIGER E (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: *Artmed*.
- WAGNER H, BLADT S & ZGAINSKI EM (1984). Plant drug analysis. Berlin: *Springer-Verlag*.
- WEIS AE & ABRAHAMSON WG (1986). Evolution of host-plant manipulation by gallmakers: ecological and genetic factors in the Solidago-Eurosta system. *The American Naturalist*, 127: 681-95.
- WEIS AE, WALTON R & CREGO C L (1988). Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. *Annual Review of Entomology* 33: 467- 486.
- YODER LR & MAHLBERG PG (1976). Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 63(9): 1167-1173.
- ZUANAZZI JAS (2000). Flavonóides. In Farmacognosia: da planta ao medicamento (CMO Simões, EP Schenkel, G Gosmann, JCP Mello, LA Mentz & PR Petrovik, eds.). 2ª ed. *Editora da UFSC*, Santa Catarina.

Considerações finais

O estudo do sistema *Calophya* aff. *duvauae* Scott (Hemiptera: Calophyidae)-*Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) permitiu avaliar a extensão do impacto causado pelo galhador na planta hospedeira, bem como a influência de parasitoides e inquilinos na população e na estrutura das galhas de *Calophya* aff. *duvauae* Scott.

As folhas são os órgãos preferencialmente atacados pelos galhadores, contudo, variações de cor em um mesmo morfotipo de galha são pouco relatadas. As variações de cor observadas neste sistema relacionam-se à presença de patógenos ou inquilinos e parasitoides. Por ser a maioria das galhas verdes portadora de indutores com malformações ou outros níveis tróficos, conclui-se que a cor vermelha decorre do estímulo constante do indutor. Além disso, ínstares finais correspondem às galhas de maiores dimensões e galhas vermelhas predominam sobre as verdes. Há uma redução expressiva do teor de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores nas galhas, redução esta, no caso de antocianinas totais, maior nas galhas verdes.

A taxa de infestação de *Calophya* aff. *duvauae* Scott em *S. polygamus* é menor que a verificada em outros sistemas na região neotropical, o galhador ataca preferencialmente a região mediana da folha, não causando alterações significativas na área foliar, provavelmente pela indução ocorrer comumente em folhas já expandidas.

O desenvolvimento destas folhas segue um dos padrões descritos para folhas simples, repetindo o observado para outras hospedeiras de galhas. Em decorrência da indução, os tecidos foliares maduros se rediferenciam. A epiderme adaxial se rediferencia na epiderme adaxial da galha, o parênquima paliçádico no córtex externo adaxial da galha e o parênquima lacunoso nos feixes vasculares e no córtex interno adaxial e abaxial da galha. A epiderme abaxial se rediferencia na epiderme abaxial da galha e na epiderme que reveste a câmara ninfal. Os padrões de desenvolvimento destas galhas conferem as peculiaridades do sistema. Na galha madura constatou-se hipertrofia e hiperplasia celulares, repetindo os principais processos registrados na literatura.

A presença de parasitoides e inquilinos alterou os tecidos e o perfil histoquímico da galha, o que parece ser um novo registro para a super-hospedeira *S. polygamus*. O endoparasitoide provocou nenhuma ou poucas alterações teciduais, ao passo que um dos inquilinos (H2) induz a formação de um tecido nutritivo abundante. O inquilino Lepidoptera sp. não induziu alterações nos tecidos da galha, deixando apenas vestígios de sua

atividade alimentar. Variações na localização de substâncias nutricionais e/ou de defesa também foram constatadas em relação aos integrantes da guilda. Estas variações foram mais expressivas nas galhas contendo H2, devido ao impacto de seu hábito alimentar nos tecidos vegetais.

Os aspectos abordados permitiram compreender melhor as alterações provocadas pela indução de galhas de um sugador, *Calophya* aff. *duvauae* Scott, na morfologia, fisiologia, histoquímica e anatomia de *S. polygamus*. Além disso, abre perspectivas para a delimitação da especificidade dos morfotipos de galhas, haja vista a influência de outros níveis tróficos em seu fenótipo, nos níveis morfológico e anatômico. Em consequência, demonstra-se indiretamente que a aplicação do conceito de fenótipo estendido à gênese da morfologia de galhas no sentido *stricto*, é limitada na prática, visto que devido a esses fatores, pode haver variação em fenótipo dentro de uma mesma população de indutor.