



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

Projeto de tese:

Perfis estruturais e químicos em galhas em duas espécies de Myrtaceae

Equipe proponente:

Doutorando: Renê Gonçalves da Silva Carneiro
Orientadora: Dra Rosy Mary dos Santos Isaias
Co-orientador: Dr Cláudio Luis Donnicci

RESUMO

Galhas em Myrtaceae são comumente reportadas nos levantamentos de riqueza e abundância de galhas em diferentes biomas. O estudo de galhas em duas espécies de Myrtaceae – *Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleianum* – induzidas por galhadores com hábitos semelhantes permitirá o teste de hipóteses previamente propostas em sistemas galhador-planta hospedeira na região Neotropical. Em primeiro lugar, será testada a potencialidade da planta hospedeira em restringir a manipulação do indutor quanto à armazenagem de substâncias nos tecidos nutritivo e de reserva das galhas. Em segundo lugar, será testada a formação de gradientes citológicos e histoquímicos nas galhas de insetos sugadores das duas espécies-modelo. A presente proposta incorporará análises sobre o papel da parede celular e dos microtúbulos na determinação dos morfotipos de galhas, além de análises microquímicas que, aliadas às análises histoquímicas, permitirão identificar a localização e a função das moléculas nas diferentes camadas de tecidos das galhas. Ao conhecimento anatômico e histométrico previamente gerado com as galhas de *P. myrsinoides* serão comparados dados relativos a *P. cattleianum*.

JUSTIFICATIVA

As Myrtaceae são amplamente registradas como hospedeiras de herbívoros galhadores na região neotropical. Não obstante, estudos estruturais e químicos em plantas hospedeiras de galhas nesta família são escassos quando comparados a outras famílias botânicas. Tendo em vista sua capacidade de atrair e abrigar os herbívoros galhadores, permitindo a morfogênese constante e repetitiva de diversos morfotipos de galhas, justifica-se a escolha de algumas Myrtaceae como espécies-modelo para estudos de desenvolvimento e de acúmulo de reservas em sistemas galhador-planta hospedeira. Ademais, a presente proposta incorporará identificação de moléculas, via análises microquímicas, a localização de substâncias nos tecidos das galhas, via histoquímica, o que dará precisão às discussões sobre as funções das substâncias em galhas - nutrição ou defesa.

RELEVÂNCIA

A presente proposta se insere nos estudos realizados pelo grupo de pesquisa “Estrutura, fisiologia e química de galhas neotropicais” em cujos produtos recentes constam hipóteses sobre o papel das plantas hospedeiras na determinação da estrutura e metabolismo das galhas. A atual perspectiva é testar hipóteses previamente propostas, relativas aos gradientes citológicos e histoquímicos (Oliveira & Isaias 2010b, Oliveira *et al.* 2010), bem como as restrições metabólicas impostas pela planta hospedeira quanto a armazenagem de substâncias no tecido nutritivo das galhas (Moura *et al.* 2009). Tal perspectiva permite a continuidade na produção do conhecimento relativo às interações inseto-planta pelo grupo supracitado. Ademais, traz como inovação as investigações relativas ao metabolismo de lipídios e as potencialidades das plantas hospedeiras em definir limites ao campo cecidogênico induzido pelo inseto nos sítios de desenvolvimento das galhas.

REVISÃO DE LITERATURA

Galhas são provenientes da interação espécie-específica entre um agente indutor e uma planta hospedeira (Redfern & Askew 1992). Podem ocorrer em todos os órgãos das plantas, sendo em maior número em caules e folhas, e decorrem de um crescimento anormal dos tecidos do hospedeiro (Mani 1964). Este crescimento, entretanto, é limitado e finamente controlado pelo indutor através de estímulo mecânico e/ou químico exercido de forma contínua (Redfern & Askew 1992). O impacto causado pelo galhador induz a formação de uma estrutura que o abriga contra intempéries do ambiente e inimigos naturais, bem como incrementa suas opções nutricionais (Price *et al.* 1987), aumentando o seu *fitness*.

As galhas apresentam diversas formas, tamanhos e cores, características que podem constituir um alerta a predadores sobre o conteúdo possivelmente tóxico dos seus tecidos (Inbar *et al.* 2010), sendo ainda entendidas como o fenótipo estendido dos galhadores (Stone & Schönrogge 2003). Dada a especificidade das relações que resultam nas galhas e o alto número estimado de espécies de galhadores no mundo, cerca de 130 mil (Espírito Santo & Fernandes 2007), é esperado que haja uma alta diversidade de aspectos macroscópicos, histológicos, citológicos e químicos nestas estruturas. Esta diversidade é produto de alterações nos padrões de alongamento e expansão celulares quando comparadas aos órgãos hospedeiros. Estudos anatômicos aliados a histométricos contribuem para elucidação destes padrões e sua relação com a forma final das galhas e funções assumidas pelas diferentes camadas de tecidos (Oliveira & Isaias 2010a). Ademais, ajudam no entendimento dos mecanismos geradores de respostas, alterando padrões morfogênicos altamente conservativos como os de folhas simples (Cutter 1986, Fahn 1990).

Uma das famílias botânicas na qual registra-se uma grande riqueza de galhadores associados é Myrtaceae. Na Austrália, onde ocorre um número expressivo de gêneros endêmicos de Myrtaceae, é reportada

uma alta ocorrência de Eriococcidae galhadores associados a *Eucalyptus* (Cook & Gullan 2004). Em Taiwan, as Myrtaceae constituem a segunda família hospedeira mais representativa, abrigando 13 espécies de Psyllidae galhadores (Yang *et al.* 2006). Nieves-Aldrey *et al.* (2008) ressaltam situação semelhante em um levantamento de riqueza de galhadores no Panamá, onde as Myrtaceae apresentam grande diversidade de galhas induzidas por Diptera: Cecidomyiidae. Ainda, em estudo conduzido em savanas neotropicais, as Myrtaceae figuram entre as cinco famílias de plantas mais galhadas, corroborando os padrões reportados por Gonçalves-Alvim & Fernandes (2001).

No Brasil, os levantamentos da riqueza e abundância de galhadores em diversos biomas como na Mata Atlântica (Fernandes *et al.* 2001, Mendonça 2007), Pantanal (Julião *et al.* 2002), Amazônia (Julião *et al.* 2005) e Restinga (Bregonci *et al.* 2010, Maia *et al.* 2002, Mendonça 2007, Oliveira e Maia 2005) registram as Myrtaceae associadas a galhadores de diversos *taxa*. Contudo, estudos sobre desenvolvimento, estrutura, ultraestrutura e química dessas interações, especialmente sob o ponto de vista da planta, são escassos. Comumente são reportadas a biologia do inseto e dados morfológicos incipientes (Fernandes *et al.* 1988, Maia *et al.* 2005).

As alterações induzidas pelos artrópodes galhadores estão diretamente ligadas à manutenção de um ambiente adequado ao seu desenvolvimento. Dessa maneira, galhas de diferentes *taxa* indutores apresentam características que se relacionam ao seu tempo de desenvolvimento e hábito alimentar (Mani 1964). Classicamente, dentre as galhas mais simples, estão aquelas de ácaros, que não apresentam grande especialização tecidual, variando desde a formação de pêlos nutritivos, galhas em bolso ou de enrolamento marginal (Meyer 1987, Moura *et al.* 2008, Moura *et al.* 2009). Similarmente, as galhas induzidas por insetos sugadores, como os Thysanoptera e Hemiptera, apresentam maior diversidade de formas, porém baixa especialização tecidual, uma vez que estes insetos sugam conteúdos celulares e/ou do floema, exercendo baixo impacto nos tecidos. Sua forma pode variar desde enrolamentos marginais até galhas de cobertura com múltiplas câmaras (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992). O córtex é formado por hiperplasia e/ou hipertrofia do parênquima, entremeado por feixes vasculares, e frequentemente há a formação de tecido esclerificado (Meyer 1987). Nas ordens Coleoptera e Lepidoptera, os indutores geralmente atacam caules que pouco se diferenciam funcionalmente dos tecidos não galhados de seus hospedeiros. Neste caso, nota-se uma hipertrofia cortical e hiperplasia cambial e medular, formando tecidos dos quais a larva se alimenta (Dreger-Jauffret & Shorthouse 1992, Mani 1964). Por fim, as galhas de Hymenoptera e Diptera estão dentre as mais complexas e portadoras de maior especialização tecidual. De modo geral, apresentam diferentes zonas concêntricas que se diferenciam ao redor da câmara larval. Externamente localiza-se a epiderme com diferentes níveis de alterações estruturais, camadas de parênquima, uma zona esclerenquimática que, por sua vez, delimita o tecido nutritivo (Mani, 1964). Entretanto, as galhas induzidas por insetos dessas classes diferem quanto à composição química dos metabólitos alocados em seus tecidos, o que é relacionado à fisiologia e hábitos alimentares dos indutores (Cornell 1983, Bronner 1992). Bronner (1992) propôs o padrão de armazenagem de carboidratos para galhas de Cecidomyiidae e de lipídios para galhas de Cynipidae, contudo Moura *et al.* (2008) detectou lipídios no tecido nutritivo tanto de galhas induzidas por *Aceria lantanae*, um ácaro, quanto de *Schimatodiplosis lantanae*, um Diptera: Cecidomyiidae. Os autores atribuíram tal padrão constante de armazenagem como uma restrição metabólica imposta pelo táxon hospedeiro. A possibilidade de estudar outros sistemas envolvendo plantas notadamente produtoras de substâncias lipídicas como as Myrtaceae permitirá testar esta hipótese.

Em um estudo mais aprofundado sobre características anatômicas e ultraestruturais, Bronner (1992)

propôs a existência de um padrão no estabelecimento de gradientes citológicos e histoquímicos em galhas de Cynipidae (Hymenoptera). Estes gradientes são responsáveis pela manutenção da estrutura da galha e apresentam acúmulo de substâncias nutritivas, ação enzimática e características anatômicas que possibilitam a atividade metabólica ideal estabelecida em função das necessidades do indutor. Entretanto, estudos recentes propõem a existência desses gradientes não somente em galhas de Cynipidae, mas também em galhas de Cecidomyiidae e Psyllidae. No sistema *Aspidosperma spruceanum* – Cecidomyiidae, o padrão anteriormente descrito foi corroborado, com a detecção de atividade enzimática e acúmulo de carboidratos semelhantes (Oliveira *et al.* 2010). Ao contrário do esperado, na relação estabelecida entre *Aspidosperma australe* – *Pseudophacopteron* sp., foi observado acúmulo de carboidratos e ação enzimática relacionada, muito embora essas galhas não apresentem tecido nutritivo propriamente dito (Oliveira & Isaias 2010a). Em face desses achados, se torna imprescindível um maior número de investigações nos sistemas de insetos sugadores - plantas hospedeiras a fim de se comprovar a prevalência destes padrões na região Neotropical.

Um sistema atualmente em estudo, *Neotriozella* sp. (Hemiptera: Psylloidea)-*Psidium myrsinoides* (Myrtaceae), revelou a presença de camadas celulares ontogeneticamente distintas em função de respostas diferenciais à ação do galhador (Carneiro 2010, dados não publicados). Nesse sistema, são observados padrões diferentes de hiperplasia, hipertrofia e alongamento celulares, bem como a presença de carboidratos detectados tanto por métodos quantitativos quanto qualitativos. Entretanto, análises ultraestruturais e histoquímicas adicionais se fazem necessárias para a afirmação da existência de um padrão semelhante àquele encontrado por Oliveira & Isaias (2010a). Ainda, estudos envolvendo a análise do citoesqueleto e o padrão de deposição da parede celular podem ajudar a determinar as implicações ultraestruturais relativas às mudanças nos principais eixos de alongamento das células e, conseqüentemente, os eventos que determinam a forma do novo órgão ao longo de suas fases de desenvolvimento (Baskin 2001). Tais estudos permitirão também evidenciar mudanças determinantes para as diferentes funções assumidas pelas camadas de tecidos nas diferentes galhas.

As fases de desenvolvimento das galhas foram divididas por Rohfritsch (1992) em quatro estágios: Indução, crescimento e desenvolvimento, maturação e senescência. Respectivamente, essas fases representam processos de reconhecimento entre inseto indutor e órgão hospedeiro; de hiperplasia e hipertrofia celular que resultam num aumento de biomassa da galha; da alimentação intensa do indutor quando este se encontra em sua principal fase trófica e, por fim, da senescência da galha que coincide com o período de maiores mudanças fisiológicas e químicas da estrutura.

Mudanças na forma de órgãos e tecidos ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento sendo resultado de divisões celulares, modificações estruturais e reorganização de componentes da parede celular (Rose 2003). Destes componentes, as pectinas compreendem a mais abundante classe de macromoléculas presentes na matriz da parede celular vegetal, ocorrendo também na lamela média, com função de regular a adesão intercelular (Willats *et al.* 2001). Além disso, múltiplas evidências indicam o papel importante das pectinas no crescimento vegetal, desenvolvimento, morfogênese, defesa, estrutura da parede, sinalização, expansão celular e porosidade da parede, entre outros (Ridley *et al.* 2001, Willats *et al.* 2001).

A família das pectinas é composta por polissacarídeos complexos que compreendem os homogalacturonanos, em sua forma metilesterificada e acetilesterificada, ramnogalacturonanos I, ramnogalacturonanos II e xilogalacturonanos (Carpita and McCann, 2000). O grau de esterificação e as mudanças na proporção e estrutura das moléculas pécnicas determinam alterações nas propriedades funcionais da

parede celular vegetal, principalmente durante o crescimento e desenvolvimento dos tecidos (Knox 1997).

Análises preliminares utilizando absorvância em infravermelho mostraram resultados promissores quanto aos perfis químicos de galhas maduras e folhas não galhadas (Carneiro 2010, dados não publicados). Um considerável decréscimo na absorvância dentro da faixa dos 1750 cm^{-1} indica uma perda de grupos funcionais carbonila (C=O) na estrutura da parede das células da galha. Curiosamente, as pectinas constituem moléculas candidatas a figurar no contexto desta mudança, uma vez que sua estrutura é basicamente composta de ácido poligalacturônico. Assim, apresentam grupos carboxilas que, dependendo do seu grau de esterificação, determinam mudanças no comportamento da molécula que provavelmente influem nas propriedades da matriz péctica da parede celular. De fato, alguns trabalhos demonstram a importância do grau de metilesterificação dessas moléculas para a sua capacidade de formação de gel (Gnanasambandam & Proctor 2000, Lima *et al.* 2010) estimadas através de análise por espectrometria na faixa do infravermelho. Entretanto, alguns autores ressaltam a importância do modo de extração das pectinas na conservação da molécula, uma vez que sua estrutura pode ser significativamente mudada durante esses processos (McCready 1970, Pinheiro *et al.* 2008). Tendo em vista os resultados preliminares promissores, propõe-se a utilização de material *in vivo* para análise, evitando assim, as variáveis decorrentes da extração. Com isso, possivelmente serão obtidos espectros de absorvâncias, que, quando comparados, poderão prover informações acerca do grau relativo de esterificação dessas moléculas nos tecidos sadios e galhas. Deste modo, a detecção de diferenças estruturais em pectinas nas fases de desenvolvimento da galha constituirá ferramenta importante na avaliação do modo como os galhadores manipulam o hospedeiro em prol da instalação e manutenção do campo cecidogênico através de mudanças nas propriedades da parede celular.

Além de todas as implicações estruturais e ultraestruturais, a complexidade química constitui outro fator importante na investigação das alterações induzidas pelo galhador nos tecidos da planta, especialmente sob a perspectiva do acúmulo de substâncias associadas à proteção e nutrição. A localização de compostos relacionados à nutrição como lipídios e carboidratos (Bronner 1992), assim como uma série de compostos do metabolismo primário e secundário da planta que podem estar associados à defesa contra herbivoria, tais como derivados fenólicos e flavonoídicos (Drummond 2005, Formiga *et al.* 2009) pode ser realizada através de testes histoquímicos (Bronner 1992). Estudos abordando detecção histoquímica têm sido cada vez mais usuais, entretanto, não são capazes de revelar a ocorrência de vias metabólicas específicas por si só. Testes histoquímicos para a localização de enzimas, por sua vez, detectam a presença de proteínas específicas dessas rotas, permitindo uma avaliação segura do status fisiológico do órgão (Oliveira & Isaias 2010b, Oliveira *et al.* 2010). A proposição de aliar análises microquímicas às detecções topográficas contribuirão para o conhecimento dos padrões de desenvolvimento e do metabolismo de tais estruturas.

Os perfis químicos de diferentes Myrtaceae ilustram bem a diversidade química de compostos de natureza lipídica nessa família. A variedade de componentes encontrados nos óleos essenciais, por sua vez, pode compreender uma mistura complexa de terpenóides, particularmente monoterpenos e sesquiterpenos, além de fenóis, óxidos, éteres, alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas aromáticas (Chen *et al.* 2007, Batish *et al.* 2008, Kennington 2008). A mistura desses compostos pode conferir ação pesticida, antimicrobiana, antioxidante e anti-herbivórica ao extrato dessas plantas, implicando no seu uso para fins comerciais e médicos (Gutiérrez *et al.* 2008, Nuengchamnong & Ingkaninan 2009).

Testes histoquímicos já realizados no sistema *Psidium myrsinoides* – *Neotriozella* sp. revelaram a

presença de polifenóis, flavonóides, alcalóides e terpenóides em estruturas diferencialmente localizadas nas folhas não galhadas e galhas (Carneiro 2010, dados não publicados). A posição desses metabólitos realocados no campo cecidogênico foi associada à melhoria da qualidade da alimentação do galhador e ao incremento das suas defesas contra inimigos naturais. Segundo Nyman (2000), os estudos microquímicos devem ser aliados a testes histoquímicos, uma vez que a localização exata dos compostos no tecido constitui informação importante sobre a qualidade dos recursos aos quais o galhador tem acesso.

Em se tratando das substâncias comumente utilizadas para nutrição, os lipídios, também detectados em testes histoquímicos preliminares, se destacam pelo alto teor energético acumulado, especialmente nas moléculas de triacilgliceróis. O metabolismo de uma única molécula de triacilglicerol composto de três moléculas de ácido palmítico (16 carbonos) e glicerol resulta na produção de aproximadamente 387 ATP's através da beta oxidação dos ácidos graxos (Stryer 1995). Além disso, existe a possibilidade da entrada da molécula de glicerol da rota da glicólise e/ou gliconeogênese, integrando as rotas metabólicas dos lipídios e carboidratos. Entretanto, essa rota metabólica requer a atuação de uma classe de enzimas, denominadas lipases, que têm por função quebrar as ligações entre as moléculas de ácidos graxos e glicerol. Evidências adicionais da ocorrência das etapas da gliconeogênese *in situ*, podem ser providas pela observância da atividade de enzimas chave dessa via, como por exemplo, a Frutose 1,6 bisfosfatase. De modo similar, a detecção da ação das enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, seja na via glicolítica ou na formação e quebra de amido, permitem o entendimento da dinâmica metabólica geral na galha. A realização de testes histoquímicos e imunocitoquímicos para a atividade dessas enzimas, portanto, ajudam a avaliar o metabolismo da estrutura e a existência dos gradientes anteriormente citados.

Galhas entomógenas constituem microlaboratórios que permitem a avaliação de diversos aspectos estruturais e químicos em um sistema finamente regulado pelo galhador (Oliveira 2007). As galhas de *Psidium myrsinoides* são induzidas por uma espécie ainda não identificada do gênero *Neotriozeila* (Hemiptera: Psylloidea) os quais se alimentam inserindo o aparelho bucal pungitivo diretamente no floema dos feixes vasculares, da mesma forma que *Neotrioza tavaresi* (Hemiptera: Psylloidea) o faz em *Psidium cattleyanum*. O fato de serem induzidas por insetos taxonomicamente próximos em espécies de plantas cogenéricas permite um estudo comparativo das alterações específicas induzidas pelos galhadores, bem como dos limites impostos pelas plantas hospedeiras. Dessa maneira, as investigações propostas se tornam interessantes pela possibilidade de elucidar eventos-chave que determinam respostas morfogênicas específicas.

Sob essa perspectiva, as seguintes hipóteses foram elaboradas:

- 1- Muito embora, o padrão de desenvolvimento das galhas seja determinado por modificações dependentes do táxon indutor (*sensu* Rohfritsch 1992), o metabolismo intrínseco da planta hospedeira determina padrões repetitivos de respostas celulares.
- 2- A formação da galha promove alterações no padrão de diferenciação, expansão e divisão celulares, esperando-se mudanças na composição e padrão de deposição da matriz da parede celular, bem como da organização dos polímeros do citoesqueleto nas galhas em relação ao tecido não galhado.
- 3- As Myrtaceae apresentam potencial para produção de lipídios tóxicos e antiherbivóricos, logo se espera que, em virtude do estabelecimento do campo cecidogênico, haja bloqueio na produção ou neutralização de tais substâncias de modo que estas não prejudiquem a instalação e o ciclo de vida dos

indutores.

- 4- O acúmulo e metabolismo de carboidratos têm sido estudados em galhas induzidas por sugadores (Oliveira & Isaias 2010b; Oliveira *et al.* 2010). Em espécies de plantas hospedeiras pertencentes à família Myrtaceae, reconhecidamente produtoras de substâncias lipídicas, espera-se detectar atividade enzimática capaz de potencializar tais substâncias como nutricionais para os galhadores, convergindo as reservas para o metabolismo dos açúcares.

Objetivo geral

Determinar as alterações anatômicas, citológicas e químicas que se relacionam ao estabelecimento do galhador e revelam o status metabólico/fisiológico dos tecidos rediferenciados durante a morfogênese de galhas induzidas por *Neotriozella* sp. em *Psidium myrsinoides* e de *Neotriozia tavaresi* (Hemiptera: Psylloidea) em *Psidium cattleianum*. Essas análises permitirão observar a extensão do impacto exercido por galhadores taxonomicamente relacionados na determinação de processos morfogênicos específicos.

Objetivos específicos

1. Estudar o desenvolvimento anatômico de galhas induzidas por *Neotriozia tavaresi* em *Psidium cattleianum*, com ênfase na histometria e nos padrões de alteração nos eixos de alongamento e expansão celulares de modo a compará-lo ao desenvolvimento da galha de *Psidium myrsinoides* previamente estudado e verificar a existência de padrões estruturais.
2. Avaliar a citologia e a histoquímica das galhas de *Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleianum* de modo a averiguar a formação de gradientes citológicos e histoquímicos como padrão, independentemente do taxa indutor, testando a hipótese proposta por Oliveira & Isaias 2010b e Oliveira *et al.* 2010.
3. Detectar, por técnicas de imunocitoquímica e de infravermelho, alterações de parede celular relacionadas às alterações de forma e de função das distintas zonas de tecido das galhas de *Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleianum*.
4. Detectar, através de técnicas de histoquímica e microquímica, perfis químicos de substâncias lipídicas ligadas a nutrição ou defesa em galhas de *Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleianum* visando detectar limites impostos pelo metabolismo da planta hospedeira e a capacidade dos indutores em manipular tal metabolismo, testando a hipótese proposta por Moura *et al.* 2009.
5. Localizar histoquimicamente a atividade de enzimas ligadas ao metabolismo de lipídios e carboidratos como forma de elucidar as vias metabólicas pelas quais as substâncias potencialmente armazenadas pelas Myrtaceae hospedeiras (*Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleianum*) podem ser aproveitadas tanto pela maquinaria celular vegetal quanto pelos indutores em sua alimentação.

Materiais e métodos

Coleta de material

As amostras coletadas consistirão de folhas não galhadas jovens e totalmente expandidas e de galhas em diferentes estágios de desenvolvimento (crescimento, maturação e senescência) nos sistemas *Neotriozella* sp.

(Psylloidea) - *Psidium myrsinoides* (Myrtaceae) e *Neotrioza tavaresi* - *Psidium cattleyanum* (Myrtaceae), coletadas na região da Serra do Caraça, Minas Gerais, Brasil e no Parque Estadual do Pico do Marumbi, Paraná, Brasil, respectivamente.

Análises estruturais e histométricas

Para a preparação de lâminas permanentes, as amostras ($n \geq 5$) serão desidratadas em série butílica (Johansen 1940) e incluídas em Paraplast® (Kraus & Arduin 1997). Cortes transversais (10-14 μm) serão obtidos em micrótomo rotatório (Leica® 2035 BIOCUT). Os cortes histológicos serão afixados às lâminas com adesivo de Bissing (Bissing 1974). Após a retirada do Paraplast® com acetato de butila a 56°C, em banho-maria, as amostras serão desidratadas em série etílica e coradas com a mistura de azul de astra e safranina 9:1 (v/v) (Bukatsch 1972, modificado para 0,5%) e montadas em verniz vitral incolor Acrilex® (Paiva 2006).

A partir de imagens digitais serão medidas as áreas celulares e os eixos maior e menor da protoderme nas faces adaxial e abaxial, dos meristemas adaxial, mediano e abaxial, bem como dos tecidos derivados destes quando da formação da galha, com auxílio do programa AxioVision Rel. 4.8.

Análises citológicas

As amostras serão fixadas em Karnovsky 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) por 24 horas (Karnovsky 1965, modificado), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M, desidratadas em série etanólica (Johansen 1940) e infiltradas em Araldite® (Luft 1961). O material será seccionado em Ultramicrótomo Reichert-jung – Ultracut, contrastado em acetato de uranila e citrato de chumbo de acordo com Reynolds (1963) e analisado no Microscópio Eletrônico de Transmissão ZEISS EM 109.

Análises histoquímicas

- *Detecção de carboidratos*

Para a detecção de amido, será utilizado o teste de Lugol (Johansen 1940) onde material fresco ou fixado será submetido à reação em solução de iodo-iodeto de potássio por cinco minutos e observado em microscópio ótico. Para açúcares redutores, o teste de Fehling (Sass 1951) será realizado em material fresco imerso em solução composta de parcelas iguais das soluções A (sulfato de cobre II 6,93% m:v) e B (tartarato sódico de potássio 34,6% e hidróxido de sódio 12% m:m:v) e aquecidas à temperatura de pré-ebulição..

- *Detecção de lipídios*

Lipídios totais serão corados com o reagente Vermelho do Sudão (Brundett *et al.* 1991) com material fresco ou fixado imersos por cinco minutos em solução saturada de vermelho B de Sudão em etanol 70°GL. Óleos essenciais serão evidenciados com o reagente de NADI (David & Carde 1964), sendo imersos em solução contendo α -naftol 1%, dimetil-*p*-feniletilenodiamina 1% e tampão fosfato 0,01M pH 7,2 (1:1:98, v/v). Triterpenos serão revelados instantaneamente com o reagente de Lieberman-bouchard (Wagner & Bladt 1996) pela imersão em solução de anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado.

1. *Detecção da atividade de lipases*

Como primeiro passo para a quebra das moléculas de lipídios nos sítios de armazenagem, a ação das

lipases será verificada em secções à mão livre de material recém coletado incubadas em solução 0,03M de *a*-naftilacetato em acetona 1% em tampão fosfato pH 7,0 por 30 minutos a 27°C. Em seguida, será adicionada solução reveladora constituída de 2 partes de solução aquosa de azul rápido B 1% (Fast blue B) e 5 partes de solução aquosa de Dodecil sulfato de sódio 5% (SDS). É esperada uma coloração inicialmente vermelha, que muda para azul quando estabilizada, nos sítios de ação das aliesterases. O controle será feito incubando-se os cortes em solução 10^{-5} M de cloreto férrico em etapa anterior às descritas acima (van Asperen 1962, modificado).

- *Detecção da atividade da fosfatase ácida*

De modo a verificar a possível liberação de fosfato pelo ácido fosfórico, para a ação da fosforilase nos tecidos sadios e galhas, as amostras serão fixadas em etanol 70%, infiltradas em historresina e seccionadas em micrótomo rotatório (5–10 μ m) (Johansen, 1940). Em seguida, serão incubadas por 30 minutos a 18 horas em 0,6g de nitrato de chumbo em 500 ml de tampão acetato 0,5 M com pH 4,5, adicionado de 50 ml de glicerofosfato de sódio 0,1 M. Posteriormente, as seções serão lavadas em água destilada e colocadas em solução de amônia diluída por 5 minutos, lavadas e montadas para observação ao microscópio de luz.

2. *Detecção de atividade da glicose-6-fosfatase*

A glicose-6-fosfatase está relacionada com a síntese de glicose 6-fosfato que é um intermediário da via glicolítica e da síntese de sacarose. A atividade desta enzima em tecidos sadios e nas galhas pode indicar o hábito alimentar do galhador e formas de armazenagem de nutrientes. Para verificar sua presença nos tecidos galhados em comparação aos sadios, seções de material recém-coletado serão incubadas por 15 minutos a 2 horas à 37 °C em 20 mg de potássio glicose-6-fosfato, 125 ml de tampão tris-maleato 0,2 M com pH 6,7, 3 ml de solução nitrato de chumbo 2%, e 7 ml de água destilada. Em seguida, o material será lavado em água destilada, submetido à solução de sulfato de amônia por 5 minutos e montado em gelatina glicerina (Jensen 1962).

3. *Detecção de atividade da fosforilase*

A atividade da fosforilase poderá fornecer evidências da síntese de amido para nutrição do galhador ou manutenção do metabolismo da galha. A atividade desta enzima será verificada em seções de tecidos recém-coletados e incubados em glicose-1-fosfato 1% em tampão acetato (pH 6,0) por 2 horas a temperatura ambiente, submetidas a solução de iodeto de potássio iodado (reagente de Lugol) para verificar a presença de amido recém-formado. Para controle será usado um inibidor da fosfatase (Jensen 1962).

4. *Detecção de atividade da sacarose sintase*

De modo a verificar comparativamente a presença de subprodutos da quebra e síntese de sacarose, que estão relacionados diretamente com a síntese de amido e transporte de fotoassimilados, a atividade da sacarose sintase *in situ* será evidenciada nas amostras. Estas serão fixadas e tratadas com sacarose e UDP (uridina difosfato) para iniciar a cascata de reações da enzima culminando na formação de sais. Os tecidos serão fixados em formaldeído 2%, polivinilpirrolidona 2% e ditiotreitól 5mM por 1 hora. As amostras serão lavadas em água oito vezes durante 1 hora. Para detecção dos sítios de formação da enzima, as seções serão incubadas em meio contendo 100 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,2% BSA, 1mM NAD, 0,02 mM glicose-1,6-bifosfato, 1 U fosfoglicomutase, 1 U glicose-6-fosfato desidrogenase, 1 U UDP glicose pirofosforilase, 0,03% NBT, 50 mM sacarose, 1 mM UDP, 1 mM PPI. A atividade da enzima *in situ* será demonstrada pela formação de um composto de NADH com azul nitroso de tetrazólio (NTB). O controle será

feito pela supressão da sacarose (Wittich & Vreugdenhil 1998).

5. *Deteção de atividade das invertases*

A atividade da invertase disponibiliza glicose a partir da quebra da sacarose para as atividades metabólicas e/ou alimentação do galhador. Os sítios de atividade da invertase nas amostras serão localizados em seções de material recém-coletado, fixado em formalina 4% (pH 7,0) por 30 minutos. As seções serão lavadas em água destilada dez vezes por três a cinco horas para remover todos os açúcares solúveis. Em seguida, as seções serão incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente em reagente contendo fosfato de sódio 0,38 M (pH 6,0), 0,24 mg ml⁻¹ de azul nitroso de tetrazólio, 0,14mg ml⁻¹ de metassulfato de fenazina, 25 unidades ml⁻¹ de glicose oxidase e 5mg ml⁻¹ de sacarose-1. Para controle, as seções serão incubadas em reagente sem sacarose. Depois de lavadas em água, as seções serão fixadas em formalina por 15 minutos seguido por várias passagens em água, montadas e fotografadas (Doehlert & Felker 1987).

Análises de imunocitoquímica

6. *Localização de FBPase*

A localização da frutose 1,6 bisfosfatase (FBPase) será feita de acordo com o método descrito por Schmoll *et al.* 1995 através da utilização de um anticorpo anti FBPase seguido de um anticorpo secundário.

7. *Compostos de parede*

Para deteção da composição da parede celular, as amostras serão fixadas em Karnovsky 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) (Karnovsky 1965, modificado), desidratadas em série etanólica (20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), e infiltradas em historresina. Seções transversais serão feitas em micrótomos rotatórios (Jung biocut), incubadas em anticorpos monoclonais (MAbs) JIM5, JIM7, JIM13, LM5 e LM6 (solicitados no Centre for Plant Science, University of Leeds, UK), epitopos descritos na tabela 1. A incubação das seções para imunofluorescência serão processadas segundo Mastroberti & Mariath (2008).

Tabela 1. Descrição e reconhecimento dos anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais	Epitopos	Referências
JIM 5	Homogalacturananos (HGA) não metil-esterificados	VandenBosh <i>et al.</i> (1989), Knox <i>et al.</i> (1990), Willats <i>et al.</i> (2000), Clausen <i>et al.</i> (2003)
JIM 7	HGA metil-esterificado	Knox <i>et al.</i> (1990), Willats <i>et al.</i> (2000), Clausen <i>et al.</i> (2003)
JIM 13	Proteínas arabinogalactanos	Knox <i>et al.</i> (1991)
LM 5	(1 → 4) β-D-galactano	Jones <i>et al.</i> (1997)
LM 6	(1 → 5) α-L-arabinanos	Willats <i>et al.</i> (1998)

8. *Visualização dos microtúbulos*

A orientação dos microtúbulos serão marcados com anticorpos monoclonais como descrito por Sugimoto *et al.* (2000). As amostras serão fixadas em formaldeído 1,5% e glutaraldeído 0,5% em tampão PEMT, lavados e incubados em anticorpos primários anti-tubulina por 12 horas em temperatura ambiente. Em seguida serão incubados em anticorpos secundários por 3 horas a 37°C, montados em lâminas e analisados em microscópio confocal com laser no comprimento de 488 nm.

Análises microquímicas

A análise dos perfis químicos de tecidos não galhados e de galhas será feita através de cromatografia de fase gasosa a partir de extratos etanólicos. Frações adicionadas a diferentes solventes serão injetadas em cromatógrafo de fase gasosa equipado com coluna capilar e acoplado a espectrômetro de massa. A identificação dos sinais será feita por comparação entre os espectros obtidos e as bibliotecas pré-existentes.

A análise do grau de esterificação das pectinas será estimada nos diferentes tratamentos ($n \geq 5$) através do uso de espectrômetro na faixa do infravermelho e análise comparativa das bandas no comprimento de onda 1750 cm^{-1} .

Resultados esperados

Espera-se ao final do presente projeto dados que permitam a publicação de pelo menos 5 artigos, divulgados em eventos nacionais e internacionais, com as abordagens assim propostas:

1. Desenvolvimento anatômico de galhas induzidas por *Neotrioza tavaresi* em *Psidium cattleyanum*, com ênfase na histometria e nos padrões de alteração nos eixos de alongamento e expansão celulares que determinam os morfotipos de galhas.
2. Detecção de gradientes citológicos e histoquímicos ligados ao campo cecidogênico induzidos por taxa de insetos distintos em plantas hospedeiras taxonomicamente relacionadas, *Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleyanum*.
3. Detecção imunocitoquímica e por infravermelho das alterações em nível de parede celular necessárias às mudanças de forma e de função das distintas zonas de tecido das galhas de *Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleyanum*.
4. Perfis químicos de substâncias lipídicas ligadas a nutrição ou defesa em galhas de duas espécies de Myrtaceae (*Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleyanum*), aliando análises histoquímicas à microquímicas, visando detectar limites impostos pelo metabolismo da planta hospedeira e a capacidade dos indutores em manipular tal metabolismo.
5. Atividade enzimática em galhas como forma de elucidar as vias metabólicas pelas quais as substâncias potencialmente armazenadas pelas Myrtaceae hospedeiras (*Psidium myrsinoides* e *Psidium cattleyanum*) podem ser aproveitadas tanto pela maquinaria celular vegetal quanto pelos indutores em sua alimentação.

Cronograma

Atividades / trimestre	ANO I				ANO II			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta de material	X	X	X	X	X	X	X	X
Citologia			X	X			X	X
Análises histoquímicas	X	X	X	X				
Imunocitoquímica					X	X		
Análises químicas		X	X		X	X		X

Redação de relatório							X	X
Redação de artigos					X	X		
	ANO III				ANO IV			
<i>Atividades / trimestre</i>	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X
Citologia	X	X						
Imunocitoquímica	X	X						
Análises químicas	X		X	X				
Redação de artigos			X	X	X	X		
Qualificação				X				
Redação da tese					X	X	X	X
Defesa								X

Previsão de gastos

As atividades propostas estão contempladas dentro do financiamento já obtido com outros projetos do grupo de pesquisa no qual se insere. Análises químicas serão conduzidas em parceria com o Prof. Dr. Cláudio Luiz Donnici, do departamento de química, utilizando aparelhos e materiais já adquiridos. A parte referente às análises com *Psidium myrsinoides* foi aprovada pelo edital de demanda universal da FAPEMIG (processo número CRA - APQ-00901-11), projeto a ser implementado no ano de 2012.

Referências

- Baskin TI. 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215:150-171.
- Batish DR, Singh HP, Kohli RK & Kaur S (2008) *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256: 2166–2174.
- Bissing DR (1974) Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Technology*, 49: 116-117.
- Bregonci JM, Polycarpo PV e Maia VC (2010) Insect galls of the Parque Estadual Paulo César Vinha (Guarapari, ES, Brazil). *Biota Neotrop.*, 10(1): 265-274.
- Bronner R (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds) *Biology of insect induced galls*. Oxford University, Oxford, pp 118-140.
- Brundett MC, Kendrick B & Peterson CA (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, 66: 111-116.
- Bukatsch F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61:255.
- Carpita NC & McCann M (2000) In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Edited by Buchanan, B.B., Grissem, W. and Jones, R.J. pp.25–109. American Society of Plant Biologists, Rockville, MA.
- Chen H, Sheu M, Lin L & Wu C (2007) Chemical Composition of the Leaf Essential Oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *Journal of Essential Oil Research*, 19: 345-347.

- Clausen MH, Willats WGT & Knox JP (2003) Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of antihomogalacturonan monoclonal antibodies LM5, JIM5 and JIM7. *Carbohydrate Research* 338:1797-1800.
- Cook LG & Gullan PJ (2004) The gall-inducing habit has evolved multiple times among the eriococcid scale insects (Sternorrhyncha: Coccoidea: Eriococcidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 83: 441–452.
- Cornell HV (1983) The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipidae (Hymenoptera): why and how? *American Midland Naturalist*, 110: 225–234.
- Cutter EG (1986) *Anatomia Vegetal*, vol. 2. Segunda edição. Roca, São Paulo, pp. 1–304.
- David R & Carde JP (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 258: 1338-1340.
- Doehlert DC & Felker FC (1987) Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. *Physiologia Plantarum* 70:51-57.
- Dreger-Jauffret F & Shorthouse JD (1992) Diversity of gall-inducing insects and their galls. In: Shorthouse JD & Rohfisch O (eds). *Biology of insect-induced galls*. Oxford: Oxford University Press, 8-33.
- 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.
- Espírito-Santo M.M. & Fernandes G.W. 2007. How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they? *Annals of the Entomological Society of America*, 100:95-99.
- Espírito-Santo MM & Fernandes GW (2007) How many species of galling insects are there on earth and where they are? *Annals of the Entomological Society of América* 100:637-646.
- Fahn A (1990). *Plant Anatomy*. Pergamon Press, Oxford.
- Fernandes GW, Julião GR, Araújo RC, Araújo SC, Lombardi JA, Negreiros D & Carneiro MAA (2001) Distribution and morphology of insect galls of the Rio Doce Valley, Brazil. *Naturalia*, 26: 211–244.
- Fernandes GW, Tameirão Neto E & Martins RP (1988) Ocorrência e caracterização de galhas entomógenas na vegetação do Campus-Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais. *Rev. Bras. Zool.*, 5: 11-29.
- 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.
- Gao M & Showalter AM. 1990. Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant Journal* 19:21-331.
- Gnanasambandam R, Proctor A (2000) Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 68: 327-332.
- Gonçalves-Alvim SI & FERNANDES GW (2001) Biodiversity of galling insects: historical, community and habitat effects in four Neotropical savannas. *Biodivers. Conserv.*, 10: 79-98.
- Gutiérrez RMP, Mitchell S & Solis RV (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 1–27.
- Inbar M, Izhaki I, Koplovich A, Lupo I, Silanikove N, Glasser T, Gerchman Y, Perevolotsky A, Lev-Yadun S

- (2010) Why do many galls have conspicuous colors? A new hypothesis. *Arthropod - Plant interactions*, 4(1): 1-6.
- Jensen WA (1962) *Botanical histochemistry*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book, New York.
- Jones L, Seymour GB & Knox JP (1997) Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4) β-D-galactan. *Plant Physiology* 113:1405-1412.
- Julião GR, Amaral MEC & Fernandes GW (2002) Galhas de insetos e suas plantas hospedeiras no Pantanal sul-mato-grossense. *Naturalia*, 27: 47–74.
- Julião GR, Venticinque EM, Fernandes GW & Kraus JE (2005) Richness and abundance of gall-forming insects in the Mamirauá Varzea, a flooded Amazonian forest. *Uakari*, 1: 39–42.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27:137-138.
- Kennington WJ (2008) Volatile leaf oil diversity in the narrow range endemic *Eucalyptus argutifolia* (Myrtaceae) and its widespread congener *Eucalyptus obtusiflora*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 96: 738–745.
- Knox JP (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology*, 171:79-120.
- Knox JP, Linstead PJ, King J, Cooper C & Roberts K (1990) Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of roots apices. *Planta* 181:512-521.
- Knox JP, Linstead PJ, Peart J, Cooper C & Roberts K (1991) Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant Journal* 1:317-326.
- Kraus JE & Arduin M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica RJ, EDUR.
- Lima MS, Paiva EP, Andrade SAC, Paixão JA (2010) Fruit pectins – A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 24: 1–7.
- Luft JH (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *The journal of biophysical and biochemical cytology* 9: 404-414.
- Maia VC, Azevedo MAP & Couri MS (2002) New contribution to the knowledge of the gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) from the restinga of Barra de Maricá (Rio de Janeiro, Brazil). *Studia Dipterologica*, 9: 447–452.
- Maia VC, Constantino PAL & Monteiro RF (2005) New gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) associated with two species of *Eugenia* (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 49: 347-352.
- Mani MS. 1964. *Ecology of Plant Galls*. Dr. W. JunkPublis. The Hague.
- Mastroberti AA & Mariath JEA. 2008. Developmental of mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). *Protoplasma* 232: 233-245.
- Mastroberti AA & Mariath JEA. 2008. Imunocitochemistry of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). *Revista Brasileira Botânica* 31:1-13.
- McCready RM (1970) Pectin. In M. A. Joslyn (Ed.), *Methods in food analysis: Physical, chemical, and instrumental* (pp. 565–599). New York: Academic Press.
- Mendonça MS (2007) Plant diversity and galling arthropod diversity searching for taxonomic patterns in an animal-plant interaction in the neotropics. *Boletín Sociedad Argentina Botánica*, 42: 347–357.
- Meyer J (1987) *Plant gall and gall inducers*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

- Moura MZD, Soares GLG & Isaias RMS (2008) Ontogênese da folha e das galhas induzidas por *Aceria lantanae* Cook (Acarina:Eriophyidae) em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Revista Brasileira de Botânica, 32(2):271-282.
- Moura MZD, Soares GLG & Isaias RMS (2009) Intra-specific phenotypic variations in *Lantana camara* leaves affect host selection by the gall maker *Aceria lantanae*. Biochemical Systematics and Ecology 37: 541–548.
- Nieves-Aldrey J L, Ibañez A, Medianero E (2008) Richness and composition of gall-inducing arthropods at Coiba National Park, Panama. Rev. Biol. Trop., 56: 1269-1286.
- Nothnagel EA (1997) Proteoglycans and related components in plant cells. Int Rev Cytol 174: 195–291.
- Nuengchamnonng N & Ingkaninan K (2009) On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family Myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. LWT - Food Science and Technology, 42: 297–302.
- Nyman T (2000) Phylogeny and ecology evolution of gall-inducing sawflies (Hymenoptera:Tenthredinidae). University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology.
- Oliveira DC & Isaias RMS (2010a) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). South African Journal of Botany. 76(2):239-248
- Oliveira DC & Isaias RMS (2010b) Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). Plant Science, 178(4):350-358
- Oliveira DC (2007) Relações entre ontogenia foliolar e idade dos tecidos para o valor adaptativo de galhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Oliveira DC, Magalhães TA, Carneiro RGS, Alvim MN & Isaias RMS (2010) Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns?. Protoplasma, 242(1-4):81-93.
- Oliveira JC & Maia VC (2005) Ocorrência e caracterização de galhas de insetos na restinga de Grumari (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Arquivos do Museu Nacional, 63: 669–675.
- Paiva JGA (2006) Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. Acta Botanica Brasilica, 20(2): 257-264.
- Pinheiro ER, Silva IMDA, Gonzaga LV, Amante ER, Teófilo RF, Ferreira MMC, et al. (2008) Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. Bioresource Technology, 99: 5561–5566.
- Price PW, Fernandes GW & Waring GL (1987). Adaptive nature of insect gall. Environment Entomology, 16: 15-24.
- Redfern M & Askew RR (1992). Plant galls. Richmond Publishing Co Ltd.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17: 208-212.
- Ridley B, O'Neil MA & Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry, 57:929-967.
- Rocha JM, Kalo PJ, Ollilainen V, Malcata FX (2010) Separation and identification of neutral cereal lipids by normal phase high-performance liquid chromatography, using evaporative light-scattering and electrospray mass

spectrometry for detection. *Journal of Chromatography A*, 1217: 3013-3025.

Rohfritsch O (1992) Patterns in gall developmental. In: Shorthouse JD Rohfritsch O (eds) *Biology of insect induced galls*. Oxford University, Oxford, pp 60-86.

Rose JC (2003) *The plant cell wall*. Blackwell Publishing, Garsington Road, Oxford.

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

Schmoll D, Cesar M, Fiihrmann E & Hamprecht B (1995) Colocalization of fructose-1,6-bisphosphatase and glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Brain Research* 677: 341-344.

Seifert GJ, Roberts K (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol* 58: 137–161.

Showalter AM (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci* 58: 1399–1417.

Stone GN & Schönrogge K (2003). The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(10): 512-522.

Stryer L (1995) *Bioquímica*. 4a. ed; São Paulo - SP: Guanabara Koogan.

Sugimoto K, Williamson RE & Wasteneys GO (2000) New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:1493-1506.

van Asperen K (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol.*, 8: 401-416.

VandenBosh KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW & Brewin N (1989) Common components of the infection thread matrix and intercellular space identifies by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO Journal* 8:335-342.

Wagner H & Bladt S, (1996) *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*, second ed. Springer-Verlag, Berlin.

Willats WGA, Limberg G, Buchholt HC, VanAlebeeck GJ, Benen J, Christensen TMIE, Visser J, Voragen A, Mikkelsen JD & Knox JP(2000) Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defines oligossaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research*, 327:309-320.

Willats WGA, Marcus SE & Knox JP (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1-5)- α -L-arabinan. *Carbohydrate Research* 308:149-152.

Willats WGT, McCartney L, Mackie L & Knox P (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular Biology* 47:9-27.

Wittich PE. & Vreugdenhil D (1998) Localization of sucrose synthase in developing maize kernels by in situ enzyme histochemical. *Journal Experimental Botany* 49:163-1171.

Yang MM, Liao LH, Lou MF, Chen WC, Huang SS, Tung GS, Weng YC, Shen CC (2006) Diversity, biology, and nutritional adaptation of Psyllids and their galls in Taiwan, pp. 33-42. In: Ozaki K, Yukawa J, Ohgushi T & Price PW (Eds.). *Galling arthropods and their associates*. Ecology and Evolution, Springer – Verlag Tokyo. 308 pp.