UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

PROCESSO DE FORMAÇÃO, PADRÃO DE USO E SUCESSÃO ONTOGENÉTICA EM GALHAS

GIULIANO DE MARTIN

VILA VELHA

OUTUBRO / 2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

PROCESSO DE FORMAÇÃO, PADRÃO DE USO E SUCESSÃO ONTOGENÉTICA EM GALHAS

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

GIULIANO DE MARTIN

VILA VELHA

OUTUBRO / 2020

Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M379p Martin, Giuliano de
Processo de formação, padrão de uso e sucessão ontogenética em galhas / Giuliano de Martin – 2020.
115 f.; il.

Orientadora: Ana Carolina Srbek-Araujo.

Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas), Universidade Vila Velha, 2020.
Inclui bibliografias.

1. Burseraceae. 2. Relação inseto-planta. 3. Gomas e resinas. 4. Restingas. I. Srbek-Araujo, João Luiz. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 595.70981

GIULIANO DE MARTIN

PROCESSO DE FORMAÇÃO, PADRÃO DE USO E SUCESSÃO ONTOGENÉTICA EM GALHAS

Tese apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Aprovada em 30 de outubro de 2020.

Banca Examinadora:

Dra. Luciana Dias Thomaz (UFES)

Dr. Levi Pompermayer Machado (UNESP)

Dr. Levy de Carvalho Gomes (UVV)

Dra. Ana Carolina Srbek de Araujo (UVV)

Orientadora

Dedico essa dissertação à minha mãe, esposa, filha, irmãos, sobrinha, afilhada, padrinhos, avó e tia.

“A desobediência é uma virtude necessária à criatividade.” Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha esposa, Marianna, pela cumplicidade, amor, carinho e muita paciência nesses 13 anos e principalmente na reta final desta tese. Você e a nossa filha, Eva, foram os melhores presentes que tive na vida. A presença de vocês foi fundamental.

Aos meus pais, Rita de Lourdes Bellotti de Martin e Cebes de Martin (*in memorian*), muito obrigado pelo amor sempre dedicado e por terem me apoiado em todas as minhas decisões, sempre me mostrando a importância do estudo acima de tudo.

Aos meus irmãos, Cebes e Kika, que sempre me apoiaram em tudo; à minha cunhada, Nandinha, pelo apoio e risadas; aos meus nenéns, Clara e Lolozita, por me deixarem apertá-las sempre.

Ao meu sogro, Manoel, e à minha sogra, Adelaide, obrigado pelo apoio e incentivo ao longo da minha trajetória.

Ao meu padrinho Luciano, apenas palavras não explicam a gratidão e admiração que tenho por você; e ao meu padrinho Pepe, que me apoiou durante a caminhada; e à tia Zezé, que também sempre me incentivou a trilhar pelo caminho do conhecimento.

Em especial ao amigo André Falcão Santana Merencio, pela ajuda e apoio incondicional ao longo desses 4 anos.

Agradeço também à Professora Zilma Maria Almeida Cruz, que me ajudou nas análises fitoquímicas.

Aos membros da banca examinadora, Levy de Carvalho Gomes, Levi Pompermayer Machado e Luciana Dias Thomaz, minha querida professora, por terem aceitado o convite e pela leitura, sugestões e contribuições para alcançar um trabalho melhor.

Agradeço aos meus três orientadores, Marcelo da Silva Morreti, Ary Gomes da Silva e Ana Carolina Srbek de Araujo, minha atual orientadora, pela paciência e dedicação na reta final desta tese. Serei eternamente grato a vocês.

Obrigado

SUMÁRIO

RESUMO....8

ABSTRACT....10

INTRODUÇÃO GERAL....12

Referências Bibliográficas....13

CAPÍTULO 1....15

DESENVOLVIMENTO DE GALHAS: MODIFICAÇÕES ONTOGENÉTICAS DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DA GALHA....15

Resumo....16

Abstract....17

Introdução....18

Materiais e Métodos....20

Área de estudo....20

A espécie vegetal estudada....21

Coleta de material....22

Identificação do inseto galhador....23

Caracterização morfológica....24

Extração do óleo essencial....25

Análise cromatográfica do óleo essencial....25

Análise de dados....26

Resultados....28

Identificação do inseto galhador e descrição macroscópica das galhas....28

Descrição microscópica dos tecidos....32

Descrição fitoquímica dos tecidos....40

Discussão....49

Descrição microscópica dos tecidos....50

Descrição fitoquímica dos tecidos....56

Conclusão....65

Referências....65

CAPÍTULO 2....80

PADRÃO DE USO E SUCESSÃO ONTOGENÉTICA DE INSETOS EM GALHA PRESENTE EM *Protium icicariba*....80

Resumo....81

Abstract....81

Introdução.....82
Materiais e Métodos.....85
Área de estudo 85
Coleta de material.....87
Identificação do inseto galhador 88
Caracterização morfológica 88
Resultados.....90
Identificação do inseto galhador e descrição macroscópica da galha 90
Padrões morfológicos de ocorrência da galha.....90
Estruturação anatômica.....92
Desenvolvimento dos insetos 95
Discussão 98
Conclusão.....103
Referências.....103
CONSIDERAÇÕES FINAIS 114

RESUMO

DE MARTIN, GIULIANO, Dr.; Universidade Vila Velha – ES, outubro de 2020. **Processo de formação, padrão de uso e sucessão ontogenética em galhas.** Orientador(a): Ana Carolina Srbek-Araujo.

Esta tese teve como objetivo caracterizar o processo de formação e o padrão de uso de galhas entomógenas em folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand. Duas linhas de investigação direcionaram o estudo: 1) a investigação do processo ontogenético de galhas considerando as modificações estruturais e fitoquímica ocorridas nos tecidos vegetais de acordo com o desenvolvimento do inseto galhador; 2) a determinação do tipo de interação ecológica existente entre duas espécies de insetos galhadores durante a ocupação de uma mesma estrutura. Para investivação do processo de formação das galhas, a morfologia e a estrutura dos tecidos foram avaliadas em microscopia estereoscópica de luz transmitida, considerando tecidos das galhas e de folíolos não afetados. O perfil fitoquímico foi realizado com base em óleos essenciais dos diferentes tecidos estudados e analisado em cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foram analisados dois tipos de galhas: fusiforme, induzida por Cecidomyidae (Diptera), e verrucosa, induzida por Psyllidae (Hemiptera). Para o segundo tipo, além das galhas ativas (inseto em desenvolvimento), foram estudadas galhas inativas (após eclosão do inseto). O tecido vegetal sofreu alteração nas regiões galhadas, sendo que nas galhas fusiformes houve reorganização do sistema vascular do folíolo, enquanto nas galhas verrucosas houve cutinização dos tecidos e hiperplasia celular. O perfil fitoquímico se mostrou mais rico em compostos nos folíolos sadios e em galhas inativas, enquanto nos tecidos de galhas ativas houve redução de até metade no número de compostos presentes no óleo essencial. As mudanças induzidas no tecido vegetal em ambos os morfotipos de galha acompanham a ontogênese dos insetos, o que reforça a ideia de influência do galhador nas alterações locais do tecido vegetal, redirecionando as funções vegetais no tecido afetado até a fase adulta do inseto. A investigação da relação entre os insetos ocupantes da mesma estrutura foi realizada a partir do estudo de galhas tipo tubular marginal. A galha em questão se originou por enrolamento da lâmina foliar (adaxial ou abaxial) e houve modificações no tecido foliolar causados pelo inseto galhador, com parênquima paliçádico se transformando em esclerócitos, o que torna a galha mais resistente à compressão ou à perfuração. O inseto indutor foi identificado como um Cecidomyiidae e a galha induzida abrigou e nutriu outra larva distinta, identificada como Eulophidae (Hymenoptera). As fases de desenvolvimento do eulofídeo foram observadas apenas em galhas já maduras, enquanto o cecidomiídeo foi encontrado somente em galhas juvenis. Desta forma, em nenhuma ocasião as formas ativas dos dois insetos foram observadas dentro da mesma galha ao mesmo tempo, sugerindo que eles se sucedem sem se sobrepor temporalmente. Apesar do eulofídeo não induzir a galha, ele se alimenta dos tecidos internos da estrutura pré-formada e, ao se alimentar, participa da ontogenia da galha (mantém a galha ativa), estabelecendo assim um processo de sucessão ontogenética. Caso a galha fosse utilizada como abrigo, sem consumo de material vegetal presente no interior da câmara larval, a relação do eulofídeo com a estrutura induzida pelo cecidomiídeo (e consequentemente com este organismo, uma vez que a galha pode ser considerada fenótipo estendido do indutor) e com a planta hospedeira poderia ser de inquilinismo, não interferindo na ontogênese da galha. Os resultados obtidos corroboram a ideia que os insetos galhadores possuem papel muito importante nas

modificações ou desdiferenciações celulares, bem como na função dos tecidos afetados ao longo das diferentes etapas do desenvolvimento de galhas em folíolos de *Protium icicariba*. Além disso, a ontogênese pode envolver não apenas o inseto indutor, mas também outros insetos que venham a ocupar a galha posteriormente, ampliando as funções ecológicas destas estruturas no que se refere ao desenvolvimento de insetos e aos tipos de relações ecológicas das quais participam.

Palavras-chave: Burseraceae, Cecidomyiidae, Eulophidae, Interação inseto-planta, ontogênese.

ABSTRACT

DE MARTIN, GIULIANO, D.Ph.; University Vila Velha - ES, October 2020. **Formation process, pattern of use and ontogenetic succession in galls**. Advisor: Ana Carolina Srbek-Araujo.

This thesis aimed to characterize the formation process and the use pattern of entomogenous galls in *Protium icicariba* (DC) Marchand leaflets. Two lines of investigation directed the study: 1) the investigation of the ontogenetic process of galls considering the structural and phytochemical changes in plant tissues according to the development of the galling insect; 2) determining the type of ecological interaction existing between two species of galling insects during the occupation of the same structure. In order to investigate the gall formation process, the morphology and structure of the tissues were evaluated in transmitted light stereoscopic microscopy, considering gall tissues and non-affected leaflets. The phytochemical profile was performed based on essential oils from the different tissues studied and analyzed in gas chromatography coupled with mass spectrometry. Two types of galls were analyzed: fusiform, induced by Cecidomyidae (Diptera), and verrucous, induced by Psyllidae (Hemiptera). For the second type, in addition to the active galls (developing insect), inactive galls were studied (after the insect hatched). The plant tissue suffered alterations in the antlers, and in the fusiform galls there was a reorganization of the vascular system of the leaflet, while in the verrucous galls there was tissue cutinization and cellular hyperplasia. The phytochemical profile showed to be richer in compounds in healthy leaflets and inactive galls, while in the tissues of active galls there was a reduction of up to half in the number of compounds present in the essential oil. The changes induced in plant tissue in both gall morphotypes accompany the ontogenesis of insects, which reinforces the idea of the galler's influence on local changes in plant tissue, redirecting plant functions in the affected tissue until the adult stage of the insect. The investigation of the relationship between insects occupying the same structure was carried out from the study of marginal tubular galls. The gall in question originated by rolling the leaf blade (adaxial or abaxial) and there were changes in the foliolar tissue caused by the galling insect, with palisade parenchyma becoming sclerocytes, which makes the gall more resistant to compression or perforation. The inducing insect was identified as a Cecidomyiidae and the induced gall harbored and nourished another distinct larva, identified as Eulophidae (Hymenoptera). The developmental stages of the eulophid were observed only in mature galls, while cecidomiide was found only in juvenile galls. Thus, the active forms of the two insects were never observed within the same gall at the same time, suggesting that they succeed one another without overlapping temporally. Although the eulophid does not induce gall, it feeds on the internal tissues of the pre-formed structure and, when feeding, participates in the ontogeny of the gall (keeps the gall active), thus establishing an ontogenetic succession process. If the gall was used as a shelter, without consuming plant material present inside the larval chamber, the relationship of the eulophid with the structure induced by the cecidomiide (and consequently with this organism, since the gall can be considered an extended inductor phenotype) and with the host plant it could be of tenancy, not interfering in the gall's ontogenesis. The results obtained corroborate the idea that galling insects play a very important role in cellular modifications or de-differentiations, as well as in the function of the affected tissues during the different stages of gall development in *Protium icicariba* leaflets. In addition, ontogenesis can involve not only the inducing insect, but also other insects that will later occupy the gall, expanding the ecological functions of these structures with regard

to the development of insects and the types of ecological relationships in which they participate.

Keywords: Burseraceae, Cecidomyiidae, Eulophidae, Insect-plant interaction, ontogenesis.

INTRODUÇÃO GERAL

Galhas são estruturas formadas a partir de tecidos vegetais alterados pela ação de outros organismos, os quais penetram nos vegetais, sobrepujam suas defesas e liberam compostos que estimulam os meristemas a proliferar e a se diferenciar em resposta a estímulos induzidos pelos invasores, como insetos, ácaros, vírus, entre outros (Borges, 2006; Dreger-Jaufret & Shorthouse, 1992; Santos et al., 2012; Wratten, 1981). A habilidade de induzir galhas em plantas evoluiu convergentemente em dezenas de táxons filogeneticamente distantes e é resultado de uma espetacular irradiação adaptativa (Stone & Schönrogge, 2003). Espécies congenéricas, por exemplo, podem colonizar uma ou várias famílias vegetais (Yukawa et al., 2005) ou ainda um único gênero de plantas (Gagné, 2010), gerando padrões evolutivos complexos (Shorthouse et al., 2005).

Os insetos são o grupo mais representativo de indutores de galha e, dentre eles, a família Cecidomyiidae (Diptera) compreende a maioria das espécies conhecidas (Price, 2005), exibindo diversos padrões de associação com seus hospedeiros (Yukawa & Rohfritsch, 2005). É atribuído a essa família a principal radiação do estilo de vida endofítico (Stireman et al., 2010). As galhas induzidas por insetos são estruturas altamente especializadas, geradas por hipertrofia e/ou hiperplasia dos tecidos vegetais em resposta à alimentação ou outros estímulos gerados pelo invasor (Maia et al., 2014), e de alto valor adaptativo, concedendo ao indutor nutrientes e proteção contra intempéries e contra inimigos naturais (Price et al., 1987). Os insetos galhadores são bastante especializados pois têm a capacidade de modificar o metabolismo vegetal para produzir um crescimento semelhante ao de um tumor e que fornece ao inseto nutrição e habitat seguro durante todo seu desenvolvimento (Gagné, 2010). Há registros também de insetos que conseguem modular as alterações citológicas e fisioquímicas do tecido vegetal de acordo com seu desenvolvimento, favorecendo ou inibindo a presença de outros organismos, como outros insetos indutores de galhas, insetos inquilinos ou insetos predadores (Fleury et al., 2015). Os insetos galhadores são capazes de induzir galhas nos mais diversos grupos de plantas, assim como em diferentes órgãos vegetais, sendo estruturas comumente encontradas na vegetação (Mani, 1964).

As galhas representam um potencial nicho a ser explorado por outros organismos, pois elas podem ser utilizadas tanto como alimento quanto como abrigo por vários outros táxons (Sanver & Hawkins, 2000). Por serem as galhas diversas e

abundantes, alguns trabalhos já demonstraram que elas representam importantes microhabitats para diferentes pequenos organismos que habitam as plantas (e.g. Maruyama et al., 2012), incluindo táxons que interagem tanto com as galhas quanto com os galhadores (Gagné, 2010). Contudo, ainda não se conhece a fundo a interação dos indutores com a planta hospedeira em cada uma das fases da ontogênese da galha e destes táxons com outros organismos também associados às galhas.

A presente tese tem como objetivo contribuir para a elucidação de aspectos ainda pouco compreendidos das relações anteriormente citadas, estando organizada em dois capítulos. No Capítulo 1 foram estudadas as alterações celulares e fitoquímica dos tecidos de dois morfotipos de galhas que ocorrem em almesca, *Protium icicariba* (DC) Marchand, para melhor entendimento das modificações ontogenéticas associadas ao desenvolvimento da galha e do papel dos insetos galhadores neste processo. No Capítulo 2 foi investigado o padrão de uso e a relação ecológica entre dois táxons de insetos encontrados em um outro morfotipo de galha que ocorre em *Protium icicariba*. Com o desenvolvimento do presente estudo, foram adicionados elementos ao conhecimento sobre desenvolvimento das galhas e de insetos envolvidos neste processo. Adicionalmente, o entendimento do processo de formação de galhas permite uma melhor interpretação do que acontece em cada etapa de desenvolvimento e de como os insetos envolvidos participam na ontogênese da galha, favorecendo assim a compreensão do significado adaptativo e da importância biológica deste complexo sistema de interações entre insetos e plantas.

Referências Bibliográficas

Dreger-Jauffret, F. Diversity of gall-inducing insects and their galls. **Biology of insect-induced galls**, p. 8-33, 1992.

Espírito-Santo, M. M., & Fernandes, G. W. How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they? **Annals of the Entomological Society of America**, v. 100, n. 2, p. 95-99, 2007.

Fleury, G. et al. Elucidating the determination of the rosette galls induced by Pisphondylia brasiliensis Couri and Maia 1992 (Cecidomyiidae) on *Guapira opposita* (Nyctaginaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 63, n. 7, p. 608-617, 2015.

Gagné, R. J., & Jaschhof, M. A Catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the World. Digital version 2. **Entomological Society of Washington. 493p**, 2014.

Mani, MS. **Ecology of Plant Galls. Junk, The Hague**. 343 pp, 1964.

Maia, V. C., Cardoso, L. J. T., & Braga, J. M. A. Insect galls from Atlantic Forest areas of Santa Teresa, Espírito Santo, Brazil: characterization and occurrence. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 33, n. 1, p. 47-129, 2014.

Maruyama, P. K. et al. Gall-inducing nematodes as ecosystem engineers for arthropods associated with its host plant in the Cerrado of Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 47, n. 2, p. 131-138, 2012.

Price, P. W., Fernandes, G. W., & Waring, G. L. Adaptive nature of insect galls. **Environmental entomology**, v. 16, n. 1, p. 15-24, 1987.

Sanver, D., & Hawkins, B. A. Galls as habitats: the inquiline communities of insect galls. **Basic and Applied Ecology**, v. 1, n. 1, p. 3-11, 2000.

Shorthouse, J. D., Wool, D., & Raman, A. Gall-inducing insects–Nature's most sophisticated herbivores. **Basic and Applied Ecology**, v. 6, n. 5, p. 407-411, 2005.

Stone, G. N., & Schönrogge, K. The adaptive significance of insect gall morphology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 10, p. 512-522, 2003.

Yukawa, J. Biology and ecology of gall-inducing Cecidomyiidae (Diptera). **Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods**, v. 1, p. 273-304, 2005.

Yukawa, J. et al. Radiation of gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) in Japan. **Basic and Applied Ecology**, v. 6, n. 5, p. 453-461, 2005.

CAPÍTULO 1

Artigo escrito nas normas da revista Journal of Chemical Ecology

DESENVOLVIMENTO DE GALHAS: MODIFICAÇÕES ONTOGENÉTICAS DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DA GALHA

Título resumido:

Modificações ontogenéticas em galhas

GIULIANO DE MARTIN[1,2]

ANDRÉ FALCÃO MERENCIO[3]

ARY GOMES DA SILVA[4]

ANA CAROLINA SRBEK-ARAUJO[2,5,6]

[1]DR Tese Doutorado

[2]Laboratório de Ecologia e Conservação de Biodiversidade, Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Boa Vista. 29.102-920, Vila Velha, ES, Brasil.

[3]Laboratório de Citometria de Imagem, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brasil.

[4]Pesquisador do Instituto Capixaba de Pesquisas, Assistência Técnica e Extensão Rural.

[5]Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brasil.

[6]Instituto SerraDiCal de Pesquisa e Conservação, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Resumo A indução de galhas é considerada uma complexa associação entre organismos, que consiste no redirecionamento do desenvolvimento e da fisiologia dos órgãos vegetais atacados pelo galhador, criando um ambiente favorável para o desenvolvimento de ovos e larvas. Este trabalho objetivou analisar as modificações estruturais e fitoquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento de galhas em folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand, comparando as modificações nos tecidos das galhas com partes vegetativas não afetadas do vegetal. Foram analisados dois tipos de galhas: fusiforme e verrucosa. A morfologia e a estrutura dos tecidos foram avaliadas em microscopia estereoscópica de luz transmitida.

O perfil fitoquímico foi realizado com base em óleos essenciais e analisado em cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Como resultado dessas análises, foi identificada a presença de uma maior quantidade dos compostos Z-β-ocimeno, α-terpineno, α-amorpheno nos folíolos sadios em relação as galhas inativas. Enquanto que nos tecidos de galhas ativas houve redução de até metade dos tipos de compostos disponíveis no óleo essencial. O tecido vegetal sofreu alteração nas regiões galhadas, sendo que nas galhas fusiformes o sistema vascular do folíolo foi reorganização enquanto que nas galhas verrucosas ocorreu a cutinização dos tecidos e hiperplasia celular. Os insetos galhadores de ambos os morfotipos induziram modificações em estruturas celulares e na composição fitoquímica ao longo do desenvolvimento das larvas em folíolos de *Protium icicariba*. As desdiferenciações ocorridas no tecido vegetal, como por exemplo, a mudança de um parênquima paliçádico e lacunoso em um parênquima fundamental e a formação de colênquima, esclerênquima e esclerídeos, acompanham a ontogênese dos insetos. Essas evidências reforçam a ideia da influência do galhador nas alterações locais do tecido vegetal, redirecionando as funções vegetais no tecido afetado até a fase adulta do inseto.

Palavras-chave Almécega, Burseraceae, Cecidomyidae, Estrutura secretora, Interação inseto-planta, Oleorresina, Psyllidae, Restinga.

Abstract Gall induction is considered a complex association between organisms, which consists in redirecting the development and physiology of Organs plant organs attacked by the galler, creating a favorable environment for the development of eggs and larvae. This work aimed to analyze the structural and phytochemical changes that occur during the development of galls in *Protium icicariba* (DC) Marchand leaflets, comparing the modifications in the gall tissues with non-affected vegetative parts of the plant. Two types of galls were analyzed: fusiform and verrucous. The morphology and structure of the tissues were evaluated using stereoscopic transmitted light microscopy.

The phytochemical profile was performed based on essential oils and analyzed in gas phase chromatography coupled with mass spectrometry. As a result of these analyzes, the presence of a greater quantity of the compounds Z-β-ocimene, α-terpinene, α-amorpheno in the healthy leaflets was identified in relation to the inactive galls. While in the tissues of active galls there was a reduction of up to half of the types of compounds available in essential oil. The plant tissue underwent changes in the antlers, and in the spindle-shaped galls the vascular system of the leaflet was reorganized, while in the verrucous galls, tissue cutinization and cellular hyperplasia occurred. The galling insects of both morphotypes induced changes in cell structures and phytochemical composition along the development of the larvae in *Protium icicariba* leaflets. Dedifferentiations that occur in plant tissue, such as changing a palisade and lacunous parenchyma into a fundamental parenchyma and the formation of collenchyma, sclerenchyma and sclerids, accompany the ontogenesis of insects. This evidence reinforces the idea of the galler's influence on local changes in plant tissue, redirecting plant functions in the affected tissue until the adult stage of the insect.

Keywords Almécega, Burseraceae, Cecidomyidae, Insect-plant, interaction, Oleoresin, Psyllidae, Restinga, Secretory structure.

Introdução

A indução de galhas é considerada a mais complexa associação entre insetos e plantas no mundo natural, onde o ganho para os insetos consiste no redirecionamento do crescimento e da fisiologia de órgãos atacados, de modo a criar um ambiente interno favorável que forneça alimento, abrigo e proteção para o desenvolvimento de suas larvas (Redfern, 2011; Shorthouse et al., 2005).

Insetos galhadores são parasitas que representam um dos extremos do gradiente especialista-generalista, sendo demasiadamente específicos em relação à escolha do hospedeiro (Price et al., 1993). Em contraste com os parasitas generalistas de vida livre que podem se mover entre habitats e se alimentar de diferentes organismos durante seu ciclo de vida, os insetos galhadores tendem a viver a fase inicial de suas vidas dentro da espécie hospedeira, participando das alterações desencadeadas nos tecidos da planta (Shorthouse et al., 2005). No entanto, os insetos indutores de galhas podem utilizar diferentes órgãos dos seus hospedeiros, podendo induzir galhas em folhas, caules, espinhos, flores, frutos e raízes (Fonseca et al., 2006).

Galhas são estruturas sofisticadas constituídas por células vivas da planta hospedeira, consideradas como um fenótipo estendido do inseto, pois cada galha possui características diferentes de acordo com o inseto presente em seu interior, o que sugere uma possível interação molecular entre dois genomas independentes (Oliveira et al., 2006). Sabe-se, por exemplo, que indivíduos da família Cecidomyiidae de espécies diferentes podem formar o mesmo morfotipo de galha nas bordas das folhas, enquanto outras espécies da mesma família formam galhas em outras partes da planta, como galhos e nervuras foliares (Narahara et al., 2004). Ressalta-se também que o processo de desenvolvimento do hospedeiro muda continuamente a qualidade dos recursos associados à estrutura da galha, tanto como alimento quanto abrigo, o que está associado às seletividades comportamentais, fisiológicas e

ecológicas dos insetos, de modo a alcançar o melhor conjunto de condições para sua sobrevivência e reprodução (Ramalho e Silva, 2010).

O reconhecimento da existência de diferentes grupos de insetos indutores de galha sugere que os galhadores ainda estejam em um estado dinâmico evolutivo, com extensa irradiação adaptativa, ressaltando que este tipo de interação ocorre em tecidos vegetais variados e com características histológicas diferentes e que as modificações sofridas pelas plantas variam de acordo com a espécie indutora da galha (Giron et al., 2015; Price, 2005).

Muitos estudos têm se concentrado no significado adaptativo do hábito de vida de organismos galhadores (Dodueva et al., 2020; Giron et al., 2016; Shorthouse et al., 2005) e no processo de desenvolvimento das galhas (Mete e Mergen, 2016), abrangendo aspectos ecológicos da interação e histológicos das estruturas. De forma geral, o processo de formação de galhas envolve uma série de alterações no metabolismo primário e secundário do vegetal, principalmente no metabolismo de fenóis e proteínas, influenciando diretamente o crescimento dos tecidos devido ao aumento da produção de metabólitos secundários e redução da produção de metabólitos primários (Dodueva et al., 2020). Os compostos fenólicos, por exemplo, pertencem a uma classe de substâncias associadas a galhas e que agem como defesa química da planta contra a herbivoria (Santos, 2014).

Mani (1964) descreve o inseto galhador como responsável pelas modificações do destino morfogênico da célula vegetal de forma profunda, a ponto de desdiferenciar células nos três sistemas do tecido vegetal (epiderme, parênquima e colênquima) e induzir a alteração de estruturas em resposta à presença do galhador (Hirano et al., 2020; Shorthouse et al., 2005). Estas alterações, entretanto, não acontecem apenas em nível morfológico. Klimm et al. (2020) observaram que as mudanças causadas pelo inseto também alteram a produção de compostos secundários pelo tecido vegetal afetado, como óleos essenciais, por exemplo. Estas alterações também podem variar de acordo com o táxon do inseto indutor da galha (Klimm et al., 2020). A relação entre galhadores e hospedeiros pode ser tão específica que a incidência

de determinados morfotipos de galha é utilizada, inclusive, como característica para identificação de algumas plantas a nível específico (Fernandes, 2010). Neste sentido, é importante conhecer os morfotipos de galha e o inseto indutor para melhor entendimento destas complexas relações ecológicas entre insetos e plantas. De forma complementar, como colocado por Ramalho e Silva (2010), a descrição de modificações ontogenéticas envolvendo o tecido galhado e o inseto indutor permite conhecer melhor o processo ontogenético desta relação, contribuindo para o entendimento das alterações ocorridas no tecido vegetal e seu benefício ou maleficio para a planta como um todo.

Assim, compreender as alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares que os insetos podem causar nas plantas pode ajudar a elucidar os tipos de transformações desencadeadas durante o processo de ontogênese da galha e a entender melhor esta relação ecológica envolvendo insetos e plantas. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as modificações estruturais e fitoquímicas que ocorrem durante o processo de desenvolvimento de galhas em folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand, comparando as modificações nos tecidos das galhas com partes vegetativas não afetadas da espécie vegetal, visando elucidar a resposta da planta à presença do inseto galhador.

Materiais e Métodos

Área de estudo

As coletas de material botânico foram realizadas na Área de Proteção Ambiental de Setiba (APA Setiba) e no Parque Estadual Paulo Cesar Vinha (PEPCV), localizados no município de Guarapari (Espírito Santo). Estes constituem um único remanescente de vegetação nativa (UTM SAD69: 352397 E / 77233856 N) interceptado pela Rodovia ES-060, conhecida como Rodovia do Sol (Fig. 1). Dentre as comunidades vegetais presentes na região, foi selecionada a área de formação vegetal arbustiva aberta não inundável de Restinga. É característico desse ecossistema a presença de areia branca exposta, solo arenoso com lençol freático afastado da

superfície e sedimentos formados por Depósitos Flúvio-Marinhos Holocênicos, resultantes da ação de processos fluviais e marinhos (Cepemar, 2007).

A vegetação está distribuída em moitas de diferentes tamanhos e formas, com até oito metros de altura, intercaladas por espaços onde a cobertura vegetal é esparsa (Zaluar e Scarano, 2000). O clima nessa região, segundo a classificação de Köppen (1948), é do tipo AW - quente e úmido, com temperatura média anual de 25º C e precipitação média de 1.800 mm/ano (Incaper, 2011).

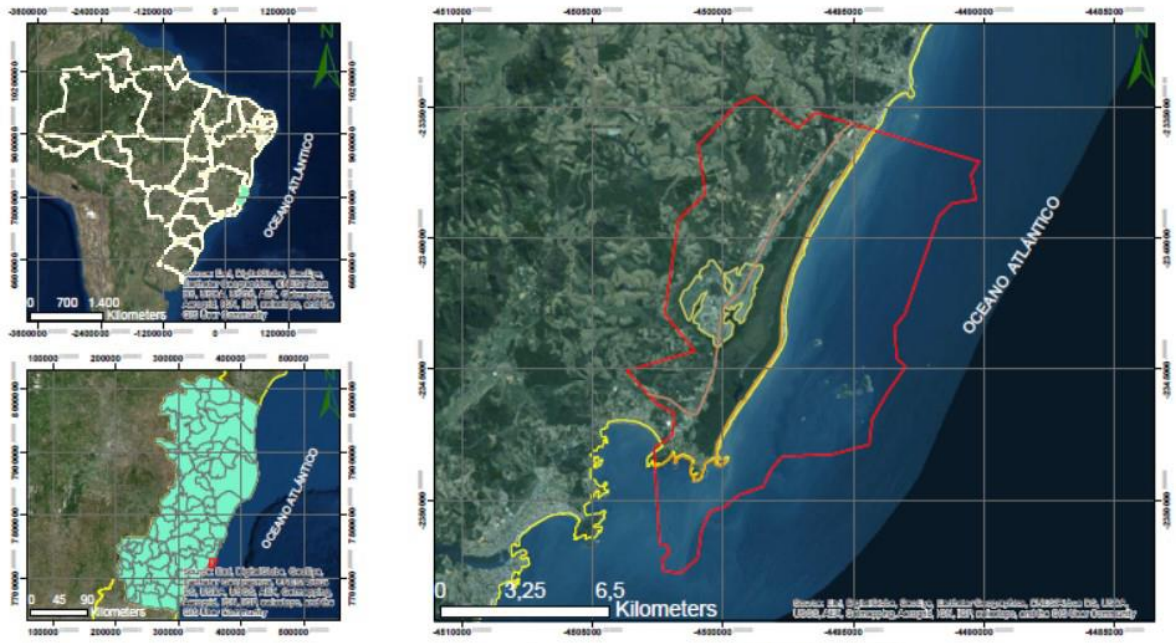

Fig. 1 Área Proteção Ambiental de Setiba (polígono vermelho) e Parque Estadual Paulo Cesar Vinha (polígono marrom), localizados no município de Guarapari (Espírito Santo, sudeste do Brasil), com indicação do local onde as amostras foram coletadas (polígono amarelo interno às áreas protegidas).

A espécie vegetal estudada

A família Burseraceae está presente em toda a região Pantropical, possuindo 20 gêneros e mais de 500 espécies ocorrentes no mundo, sendo que no Brasil existem aproximadamente sete gêneros (Daly et al., 2010). Seus representantes apresentam exsudação de oleorresina

seca constituída por substâncias voláteis conhecidas como óleos essenciais, de forte aroma, amplamente utilizados na indústria cosmética e farmacêutica devido às suas propriedades químicas (Dali et al., 2010), incluindo ação anti-inflamatória (Klimm et al., 2020). Os óleos essenciais estão presentes em várias partes da planta nessa família, entre elas o folíolo, a flor, o fruto e a semente, além da resina seca (Bakkali et al., 2008; Oliveira et al., 2006; Siani et al., 2000). O gênero de Burseraceae mais bem representado no Brasil é *Protium* Burm. f., com aproximadamente 68 espécies (Santana et al., 2020). Popularmente é conhecido como "pau-de-breu" e sua oleorresina chamada de "elemi" (Pontes et al., 2007). Ao ferir alguma parte da planta, como caule, ramos, folhas e frutos, há exsudação de uma oleorresina que seca rapidamente formando blocos esbranquiçados. Essa secreção é originada em ductos ou cavidades secretoras esquizógenos ou esquizolisígenos (Pontes et al., 2007). Devido à presença deste exsudato resinoso aromático, a família ganha grande destaque na etnobotânica (Siani et al., 2004).

Protium icicariba (DC) Marchand, conhecido popularmente como almécega ou almesca, está presente desde o norte da Amazônia até a Argentina (Ferreira et al., 2010). É uma espécie de porte arbustivo a arbóreo, atingindo alturas médias de 2,5m, podendo variar de 8 a 14m, com folhas compostas de 5-7 folíolos, peciólulos muito curtos e oblongo-lanceolados. O fruto, de forte aroma e com mais de 10% em açúcar, é uma cápsula de pericarpo avermelhado. Quando maduro, abre expondo uma semente com sarcotesta branca comestível. Esta semente produz 25% de óleo que pode ser consumido substituindo o azeite. A espécie apresenta ductos ou canais secretores de oleorresina no caule, ramos, folíolos, flores e frutos (Ferreira et al., 2010; Siani et al., 2004).

Coleta de material

A coleta dos exemplares foi executada entre os meses de julho e dezembro de 2018, sendo um dia de amostragem a cada duas semanas por um período de 3 a 6 horas/dia. Foram coletadas

amostras através de busca ativa manual de ramos com folíolos sem galha e folíolos com galha de *P. icicariba*. Foi considerado para a retirada do material, os folíolos na altura de um metro, contendo galhas em diferentes estádios de desenvolvimento (jovens, maduras e senis e de mesma idade e posição no ramo.As galhas jovens são caracterizadas pela coloração clara e alta maleabilidade; as maduras apresentam coloração escura e são rígidas; e as galhas senis são definidas pela presença do orifício de saída do inseto adulto. Assim, as galhas jovens e maduras foram classificadas como galhas ativas, enquanto as galhas senis foram consideradas como inativas quanto à presença do inseto. As galhas foram ainda divididas em dois morfotipos, sendo ~200 unidades de galhas verrucosas e ~300 fusiformes. No caso dos folíolos sem galha, foi coletada uma amostra de referência para a espécie vegetal.

Ainda em campo, os folíolos coletados foram separados em potes de vidro por grupos com galhas e sem galhas, sendo o grupo de amostras com galha separados por morfotipo para evitar a mistura de material. As amostras de folíolos foram então mergulhadas em solução de FAA 50 (formol, ácido acético e álcool) para preservação e fixação dos detalhes mais delicados, assim como para manter o protoplasma sem distorções para realização das análises morfológicas. As amostras foram transportadas e refrigeradas em caixa térmica com gelo por quarenta minutos até o Laboratório de Ecologia Funcional da Universidade Vila Velha. As amostras de folíolos utilizadas para extração de óleos essenciais foram armazenadas em sacolas plásticas e refrigeradas em caixa térmica com gelo até a chegada no laboratório onde foram armazenadas no freezer a -25º C para posterior análise fitoquímica.

Identificação do inseto galhador

A identificação do inseto presente em cada morfotipo de galha foi feita a partir da abertura das estruturas utilizando bisturis, lâminas e pinças de ponta fina sob lupa estereoscópica para obtenção dos estádios de desenvolvimento dos galhadores. As larvas foram identificadas até o nível de família com auxílio de literatura especializada (Maia, 1995; Rafael et al., 2012;

Santos et al., 2012). Para confirmação da identificação do inseto galhador da galha turbinada, cinco ramos com 10 galhas foram coletados e armazenados em frasco de vidro com tela para aguardar a eclosão o inseto adulto e, após a eclosão, o espécime foi identificado utilizando-se literatura especializada (Rafael et al., 2012). Tal método também foi utilizado para a galha verrucosa, embora seja possível destacar e remover o inseto em estágio de desenvolvimento avançado diretamente da galha.

Caracterização morfológica

As galhas foram caracterizadas morfologicamente quanto à forma, coloração, localização nos folíolos, número de câmaras internas e indumento (Maia et al., 2002).

Para a análise histológica, as amostras de 900 folíolos permaneceram imersas em solução de FAA 50 durante, no mínimo, 24 horas após a coleta em campo. Após este período, as amostras foram desidratadas em série etanólica, em concentrações graduais e crescentes (50%, 60%, 70%, 90% e 100%), a cada 24 horas, e mantidas em câmara de vácuo. Em seguida, foi realizada a infiltração do material num gradiente crescente de concentração de historresina (25%, 50%, 75% e 100%), diluída em etanol 95%, e mantida em câmara de vácuo por um período de 24 horas para cada concentração de infiltração. Após este procedimento, o material foi submetido ao processo de emblocamento em solução endurecedora exposta à luz florescente por um período de até 72 horas para consolidação (Jensen, 1962).

Para preparação das lâminas, foram realizados, em micrótomo rotativo, cortes transversais, paradérmicos, tangenciais e longitudinais do material fixado em historesina para que fosse possível observar de todos os ângulos possíveis a disposição das células no tecido vegetal galhado. Com o auxílio de um pincel, os cortes foram selecionados e posicionados em uma lâmina para secagem. A coloração foi feita em azul de toluidina 0,5% em solução aquosa em tampão fosfato com pH 6,8 por até 20 segundos e logo após as seções foram lavadas em água deionizada para retirada do excesso de corante. Após coradas e secas, as amostras foram

cobertas com uma fina camada de Entelan® (Merck) para fixar a lamínula. Os procedimentos realizados seguiram Jensen (1962). As preparações de lâminas histológicas semipermanentes foram analisadas em microscópio óptico de campo claro (Euromex iScope) e imagens foram obtidas por meio da câmera de celular, Samsung Galaxy S7 Edge, acoplada ao microscópio.

Extração do óleo essencial

O processo de extração do óleo essencial foi realizado no laboratório de Ciências Químicas da Universidade Vila Velha, pelo método de hidrodestilação, utilizando o extrator de Clevenger. Para extração do óleo essencial, foram utilizados folíolos sem galha, tecido de galhas verrucosas e de galhas fusiformes após extração do inseto do interior das estruturas (galhas ativas) e tecido de galhas verrucosas inativas. Foram utilizadas 100 g de cada amostra (= unidade morfológica) que foram trituradas utilizando um almofariz e pesadas individualmente utilizando uma balança semianalítica. As amostras foram então transferidas para um balão de 2000 ml com água deionizada e acomodadas sobre uma manta aquecedora. O extrator de Clevenger foi adaptado ao balão e o pingador à saída superior do extrator, deste modo iniciando o processo. Ao ferver a água deionizada no balão junto com a amostra triturada, ocorre a evaporação do óleo essencial, que passa pelo extrator de Clevenger, e o contato com a água gelada do pingador faz com que o óleo se condense e goteje do outro lado do extrator. Para cada uma das unidades morfológicas de *P. icicariba* utilizadas, o processo de hidrodestilação foi feito separadamente. O processo teve a duração de aproximadamente 4 horas para cada extração feita. Após a extração, o óleo essencial foi armazenado em um frasco de vidro âmbar devidamente vedado e etiquetado. A purificação do óleo foi feita através de resfriamento, reduzindo a temperatura a ponto de congelamento da água de forma a separar o óleo da água. Os procedimentos realizados seguiram Lahlou (2004).

Análise cromatográfica do óleo essencial

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução no Laboratório de Química Fina da empresa Tommasi Analítica. O volume de injeção foi 2,0 μL, composto por 1,6 μL de uma solução de óleo essencial (30mg/ml) e 0,4 μL de uma solução de uma série de hidrocarbonetos de C7-C30, como padrão interno, tendo o *n*-hexano como solvente. Na cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), o sistema utilizado consistiu de um cromatógrafo a gás Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa, ambos da Thermo Scientific®. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 J & W Scientific (30m x 0,25 mm x 0,25 mm). O gás de arraste foi o hélio e o programa de temperatura da coluna consistiu em aumentos de 3ºC por minuto, entre 60° e 240°C. Os espectros de massa foram obtidos em 70eV à velocidade de varredura de 0,84 scan/s, na faixa de m/z 40-500 (Adams, 2009). O tempo de retenção dos componentes da amostra e uma mistura de *n*-alcanos de C7-C30, co-injetados no sistema GC-MS no âmbito do mesmo programa de temperatura, foram utilizados para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats (IK) e do Índice Aritmético de Van der Dool e Kratz (IA). A identificação dos componentes do óleo essencial foi baseada nos espectros de massas obtidos e na comparação dos IK e IA calculados com base na biblioteca espectral de CG-EM e literatura disponível (Adams, 2009).

Análise de dados

O perfil fitoquímico qualitativo e quantitativo dos óleos essenciais foi determinando com base na quantidade de óleo produzido e na composição do produto de extração de cada unidade morfológica trabalhada. O grupo sem galhas foi introduzido na análise como padrão externo para monitoramento do processo de indução de galhas. A diversidade química para cada unidade morfológica foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver (*H'*; Alves, 2001). A equitabilidade foi determinada pelo índice de Pielou (J; Moura et al., 2009). Os índices obtidos foram testados em relação a eventuais diferenças pela Análise de Variância

(ANOVA), com um critério de classificação, utilizando as fontes de óleo essencial como blocos de tratamento no modelo linear. As diferenças entre as médias foram descriminadas a posteriori pelo Teste de Scheffè. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de igualdade entre os índices médios foi $p \leq 0,05$ (Zar, 2019).

Para a avaliação quantitativa das afinidades fitoquímicas, foi utilizada uma matriz com os sinais detectados em eletronvolts (eV) para os componentes dos óleos essenciais, corrigida em escala pela transformação *ranging* que acomodou todos os dados numa amplitude entre 0 e 1, excluídos os componentes de ocorrência restrita em uma única amostra e os que estivessem presentes em todas elas. Para a avaliação qualitativa, os sinais detectados em eV foram convertidos numa matriz binária que expressasse a presença ou a ausência do componente no óleo essencial, excluídos também os compostos de ocorrência restrita a uma amostra e os que estivessem presentes em todas. Na matriz quantitativa, a dissimilaridade foi estimada pelo coeficiente de Distância Média de Manhattan. Na matriz qualitativa, foi adotado o coeficiente de distância de Canberra excluindo os zeros comuns. O dendrograma foi construído pelo método de ligação de média de grupo. O coeficiente de Manhattan, o coeficiente de Canberra, os dendrogramas e os respectivos coeficientes de correlação cofenética foram calculados utilizando o programa Fitopac (versão 2.0; Shepherd, 1995).

Para estudo do gradiente químico, foi aplicado o algoritmo da análise de espécies indicadoras – TWINSPAN (Hill, 1979) utilizando os componentes químicos dos óleos essenciais de cada unidade morfológica trabalhada como classificadores que foram categorizados como compostos indicadores, preferenciais e não preferenciais para os blocos formados pela maximização das discrepâncias encontradas nas mesmas matrizes quantitativa e qualitativa empregadas nas análises anteriores (Ter Braak, 1987).

Resultados

Identificação do inseto galhador e descrição macroscópica das galhas

As galhas identificadas em *P. icicariba* foram atribuídas às famílias Cecidomyiidae (Diptera) e Psyllidae (Hemiptera), correspondendo aos morfotipos fusiforme e verrucoso, respectivamente.

As galhas fusiformes de Cecidomyiidae eram glabras e verdes durante boa parte do seu desenvolvimento, podendo apresentar estrias avermelhadas na senilidade. Podem se desenvolver em ambas as faces do folíolo (Fig. 2.A). Possuem uma única câmara larval, onde se aloja apenas uma larva do indutor (Fig. 2.B e C). Nas galhas juvenis foram encontrados apenas ovos e o 1° instar larval; em galhas maduras foram identificados dois estádios larvais, sendo 1° instar larval e 2° instar larval, além de pupa e adulto (Fig. 2 D e F). O 1° instar larval apresenta coloração amarela e desenvolvimento incompleto de tubo digestivo ventral (Fig. 2.B); o 2° instar larval apresenta segmentação mais marcada, coloração amarela e aparelho digestivo ventral de cor preta bem desenvolvido (Fig. 2.C); e a pupa apresenta desenvolvimento mais marcante, com a mudança de coloração do corpo para alaranjado e a formação de exoesqueleto que irá dar origem ao cefalotórax e ao par de asas (Fig. 2.D). O adulto é um díptero com asas membranosas, balancins bem desenvolvidos, três pares de pernas ambulatórias com estrias pretas e brancas (Fig. 2.F). A exúvia foi encontrada presa ao canalículo de saída em uma das galhas analisadas (Fig. 2.E).

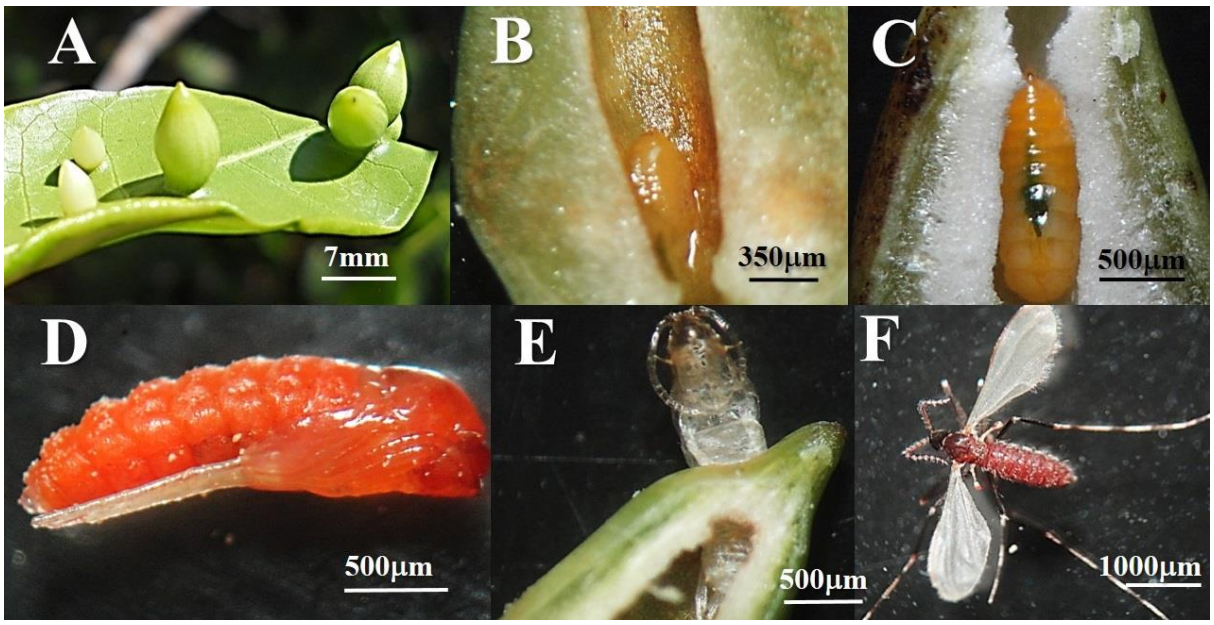

Fig. 2 Galha fusiforme de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. A - galha fusiforme; B – 1° instar larval; C – 2° instar larval; D – pupa; E - exúvia; F - adulto.

As galhas verrucosas de Psyllidae eram glabras, de cor vinosa, e foram identificadas apenas na face abaxial dos folíolos (Fig. 3.A e B). Possuem uma única câmara larval que não é fechada pelo tecido vegetal da galha, mas pelo corpo do próprio inseto em desenvolvimento (Fig. 3.B, E e G). Na superfície do local onde ocorreu a oviposição, os ovos (Fig. 3.A) e os estádios larvais se apresentaram envoltos por um material lanuginoso branco (Fig. 3.C e D), que também foi observado nas imediações do corpo das pupas obliterando a câmara larval de onde eclode o inseto adulto. Foram identificados três estádios larvais, sendo 1°, 2° e 3° instares larvais, e adulto (Fig. 3.F, G, H, I, J e K). No 1° instar larval, o inseto apresenta coloração amarelada no abdômen, duas manchas brancas, sendo uma na extremidade posterior e outra no meio do corpo próximo ao tórax, as quais são interligadas por uma linha escura; a segmentação no abdômen da larva é visível e o tórax apresenta pouca diferenciação entre proto, meso e metanoto (Fig. 3.J). No 2° instar larval há um escurecimento do corpo da larva e uma maior adesão do animal às primeiras modificações ocorridas na formação da galha, onde o corpo do inseto se encaixa na câmara larval em desenvolvimento e seu tórax e

abdômen apresentam projeções laterais que vedam a câmara larval (Fig. 3.F). No 3° instar é possível observar algumas modificações que lembram o inseto adulto, como o alongamento das pernas e o formato da cabeça, contudo, ainda persiste o formato arredondado, semelhante ao formato da câmara larval (Fig. 3.H). O adulto apresenta corpo nitidamente dividido em três partes, sendo a cabeça esclerificada com olhos bem evidentes, o tórax proeminente de onde partem pernas alongadas e asas membranosas, e o abdômen mais curto do que as asas e com segmentação bem evidente (Fig. 3.J). A exúvia é arredondada, conforme formato da câmara larval, e esbranquiçada, apresentando uma abertura de saída do inseto que se origina da parte posterior até a parte anterior do inseto, como uma fenda longitudinal (Fig. 3.K).

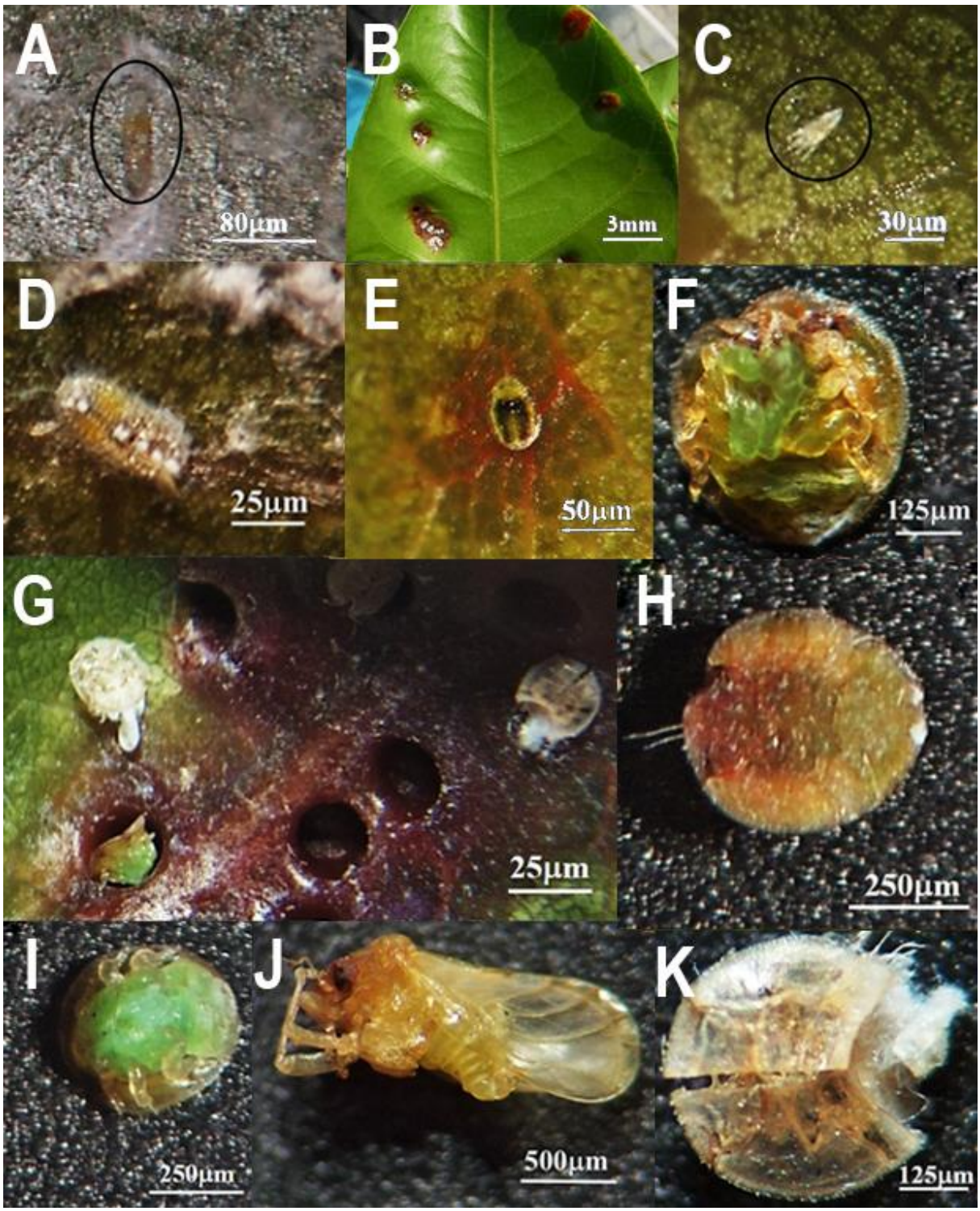

Fig. 3 Galha de Psyllidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. A – local de oviposição com ovo; B - galha verrucosa (câmara larval) em face abaxial do folíolo; C – ovo após eclosão; D - 1° instar larval; E – 2° instar larval em vista dorsal; F - 2° instar larval em vista ventral ; G - vista abaxial das galhas, câmaras larvais, insetos e exúvias; H - 3° instar larval em vista dorsal; I - 3° instar larval em vista ventral; J - adulto; K – exúvia.

Descrição microscópica dos tecidos

Nos folíolos sem galha e nas porções sadias dos folíolos com galhas foi observado mesófilo dorsiventral típico, com o parênquima clorofiliano paliçádico na face adaxial e o parênquima lacunoso na abaxial (Fig. 4). Contudo, nos tecidos das galhas de Cecidomyiidae e Psyllidae, a modificação mais evidente foi a formação e a disposição de parênquima fundamental, com formas celulares diferentes das que ocorrem no mesófilo onde se desenvolveram (Fig. 5; Fig. 6; Fig. 7).

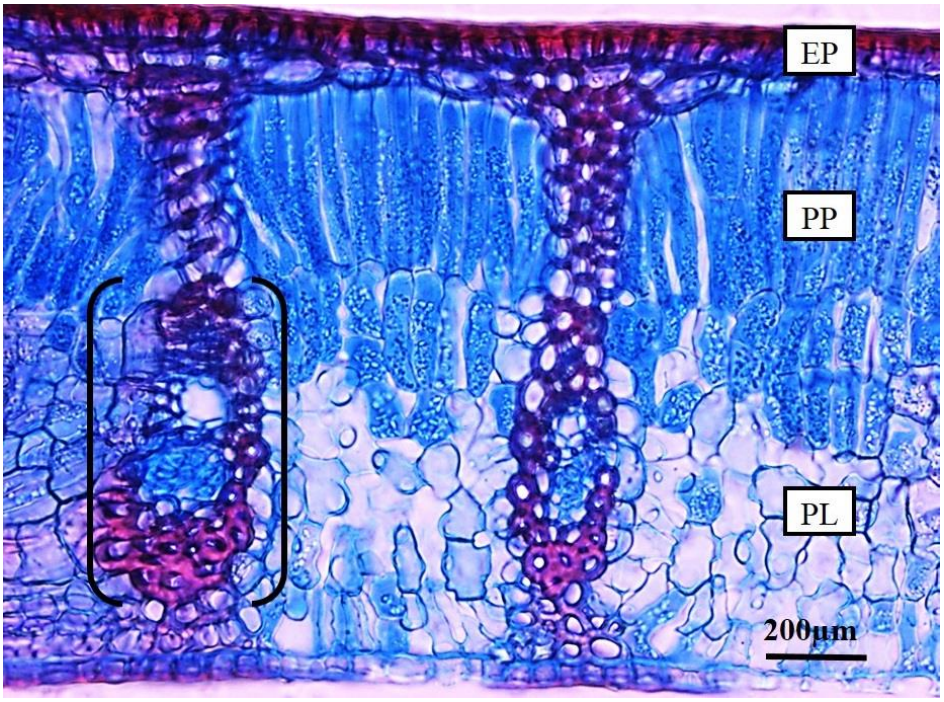

Fig. 4 Corte transversal do folíolo sadio de *Protium icicariba* (DC) Marchand. Delimitação mostra bainha de feixe de natureza esclerenquimática em torno dos feixes vasculares. Disposição dorsiventral do mesófilo, com parênquima paliçádico (PP) voltado para a face adaxial e parênquima lacunoso (PL) voltado para a face abaxial. Epiderme (EP).

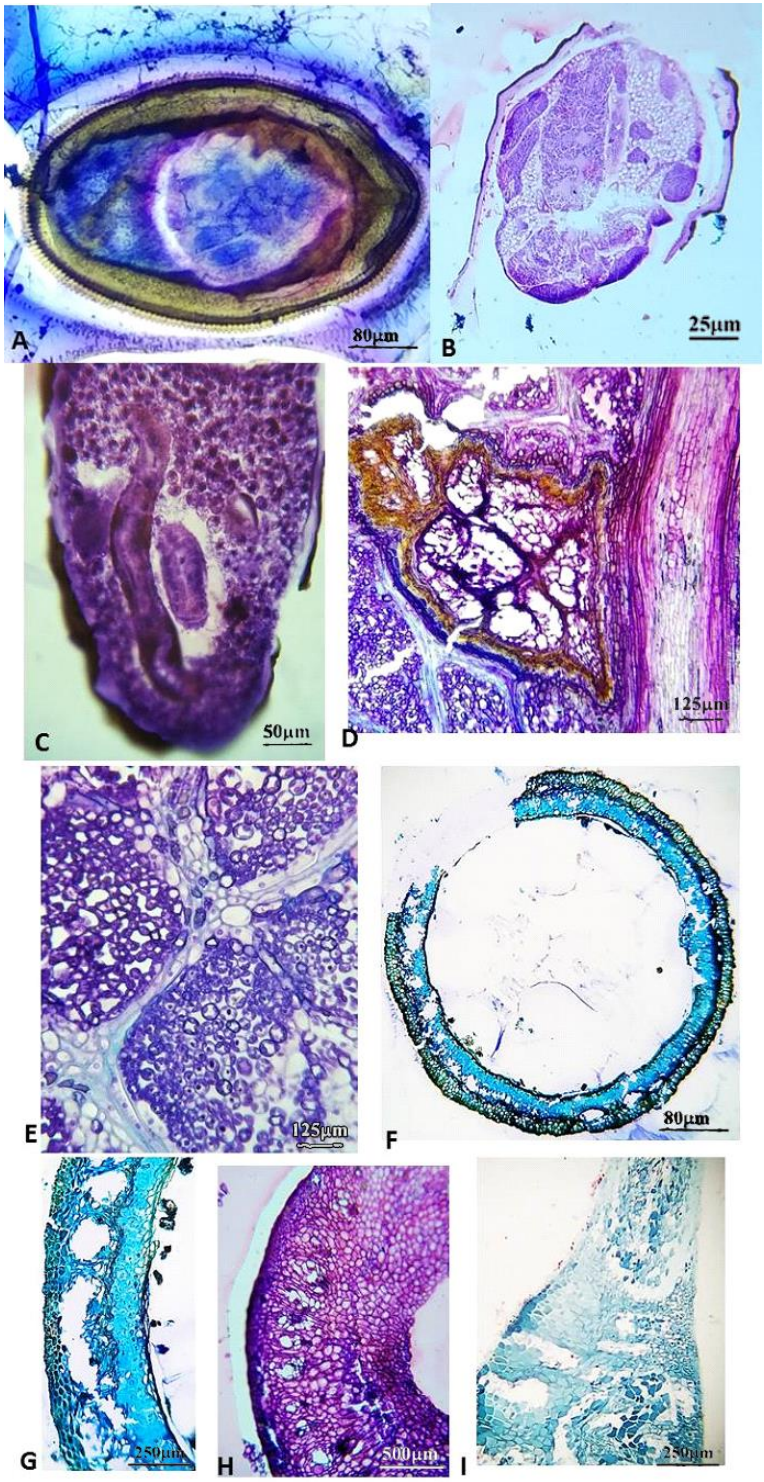

Fig. 5 Corte transversal da galha fusiforme de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. A - detalhe do ovo; B - desenvolvimento da larva; C - formação da câmara larval; D - modificações histológicas provocadas pelo processo formação da galha; E - formação da aréola; F - câmara larval; G-I - modificações das células pelo processo de formação da galha.

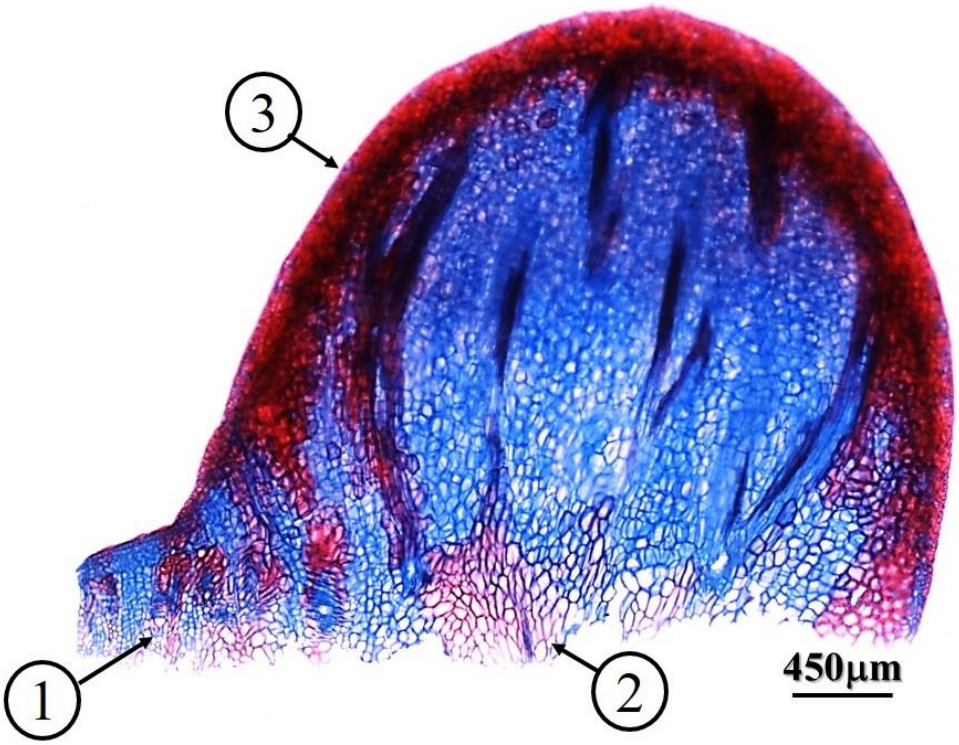

Fig. 6 Corte longitudinal da galha fusiforme de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. Seta 1 - formação das características hiperplásica; seta 2 - esclerênquima na porção da câmara larval em formação; seta 3 - esclerênquima envolvendo a superfície externa da galha.

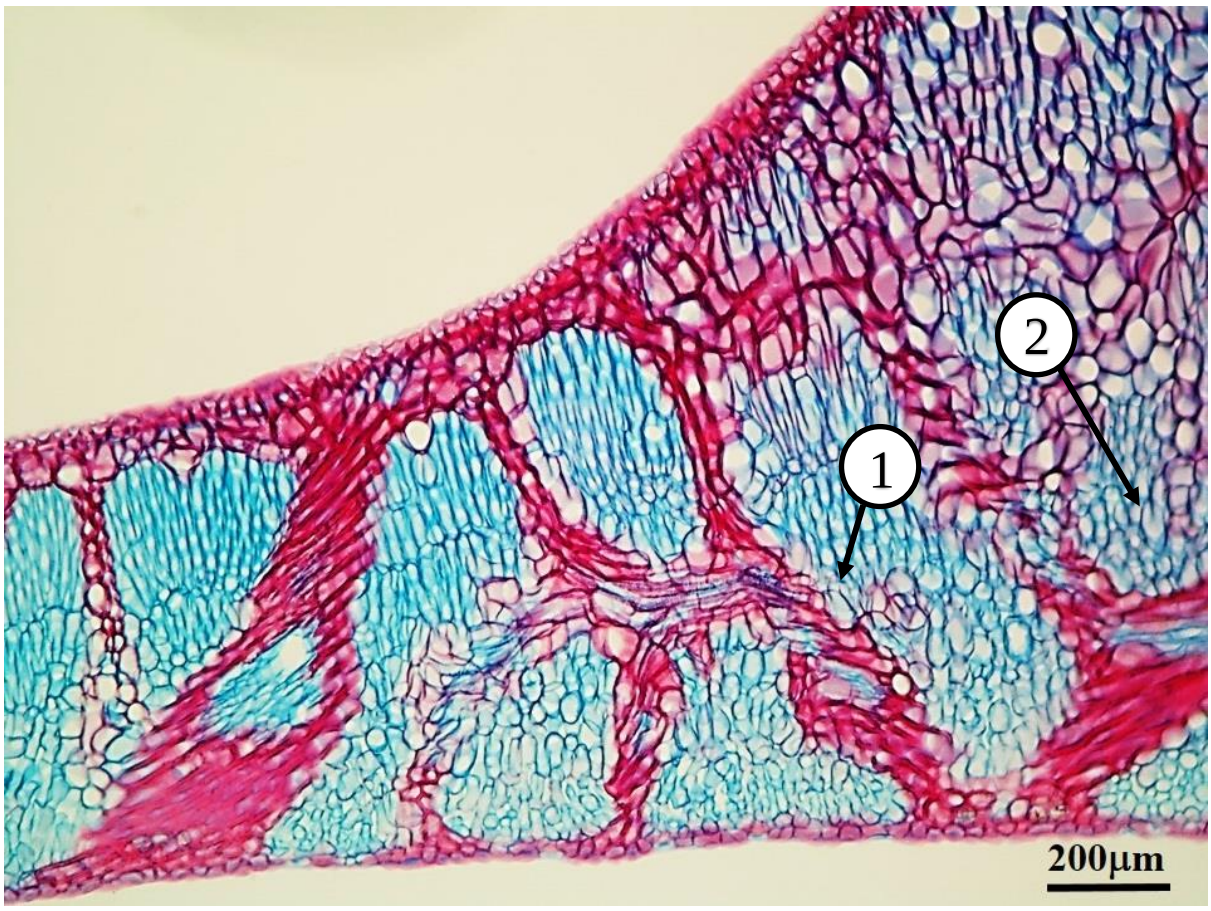

Fig. 7 Corte longitudinal da galha verrucosa de Psyllidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. Seta 1 - formação de tecido colenquimático; Seta 2 - início da desdiferenciação celular que ocorre na formação da galha.

A parede externa da galha de Cecidomyiidae é revestida por uma epiderme glabra unisseriada, intensamente cutinizada. Mais internamente, é seguida por duas a três camadas de colênquima que tocam uma faixa de duas a três camadas de esclereídes que podem se projetar de maneira focal e irregular (Fig. 8). A parede interna da câmara larval apresenta disposição diferente da parede externa. Possui camadas de células esclerenquimáticas formadas por esclerídeos, voltadas mais externamente à parede da câmara larval, e camadas de células colenquimáticas preenchendo o espaço entre o esclerênquima e o epitélio unisseriado não cutinizado que

delimita a câmara larval. Não foi observado nenhum tecido com características de nutrição.

Fig. 8 Corte transversal da galha fusiforme de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. Seta 1 - epiderme da parede externa da galha; seta 2 - esclereídeos; seta 3 - colênquima; seta 4 - epitélio da parede da câmara larval não cutinizado.

Nas galhas de Psyllidae, a formação da câmara larval envolve modificações estruturais, contudo, tais modificações não acarretam a tumoração do folíolo, mas sim um crescimento anormal da própria lâmina foliar (Fig. 9), formando um pequeno túnel dentro do qual se acomoda o corpo do inseto em desenvolvimento, que é efetivamente a estrutura que oblitera a saída da câmara larval. Durante o desenvolvimento larval, a região da galha desenvolve uma coloração vinosa. Após a eclosão do adulto, o tecido vegetal evolui para um estado senil, onde a região que foi utilizado pelo inseto galhador se torna acastanhada e persiste no folíolo. Este estádio da galha foi considerado inativo quanto à presença (desenvolvimento) do inseto.

Fig. 9 Corte transversal da galha verrucosa de Psyllidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. Detalhe da câmara larval.

Uma das características histológicas dos cortes transversais dos folíolos sadios de *P. icicariba* é a existência de uma bainha de feixe vascular no mesófilo e estruturas secretoras associadas aos feixes vasculares, desde a nervura principal até as nervuras secundárias, com a formação de uma cavidade secretora, sem a formação de um ducto propriamente dito, revelado claramente por um corte tangencial eventual ao corte transversal do mesófilo do folíolo (Fig. 10). Na nervura principal, há 8-13 cisternas secretoras dispostas em um arranjo circular sinuoso e uma bainha de fibras esclerenquimáticas que abrangem oito feixes vasculares com presença de bainha de feixe situados mais internamente, dispostos também em um círculo sinuoso (Fig. 10). Pela característica de resistência mecânica, essas fibras esclerenquimáticas podem desempenhar, entre outras funções, a de proteção contra o esmagamento das células secretoras mais frágeis envolvidas por elas. As estruturas secretoras

estão no floema, com xilema voltado internamente para uma medula composta por parênquima fundamental (Fig. 10).

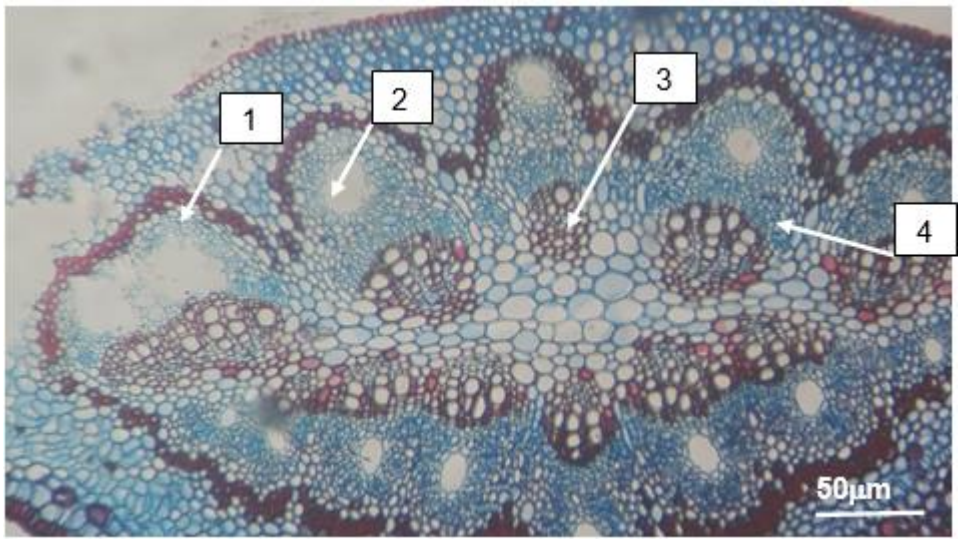

Fig. 10 Secção transversal da nervura principal do folíolo sadio de *Protium icicariba* (DC) Marchand. 1 - bainha de fibras esclerenquimáticas; 2 - estrutura secretora; 3 - xilema; 4 - floema.

Os feixes vasculares dispostos radialmente na galha de Cedidomyidae em *P. icicariba* não apresentam bainha de feixe ao seu redor e a nervura principal se ramifica em nervuras secundárias que se encontram em alguns pontos formando aréolas; em algumas regiões estas aréolas se retorcem e apresentam conformação diferente dos feixes de folíolos sem galhas (Fig. 11). No corte transversal do pecíolo foliar é possível observar o xilema, o floema e o ducto (Fig. 12); e no corte transversal do ramo de folíolos com e sem galha é possível observar a presença de uma bainha esclerenquimática fina formada por fileiras de 3 a 5 células circundando os feixes vasculares xilema e floema junto a ductos de diversos diâmetros (Fig. 13).

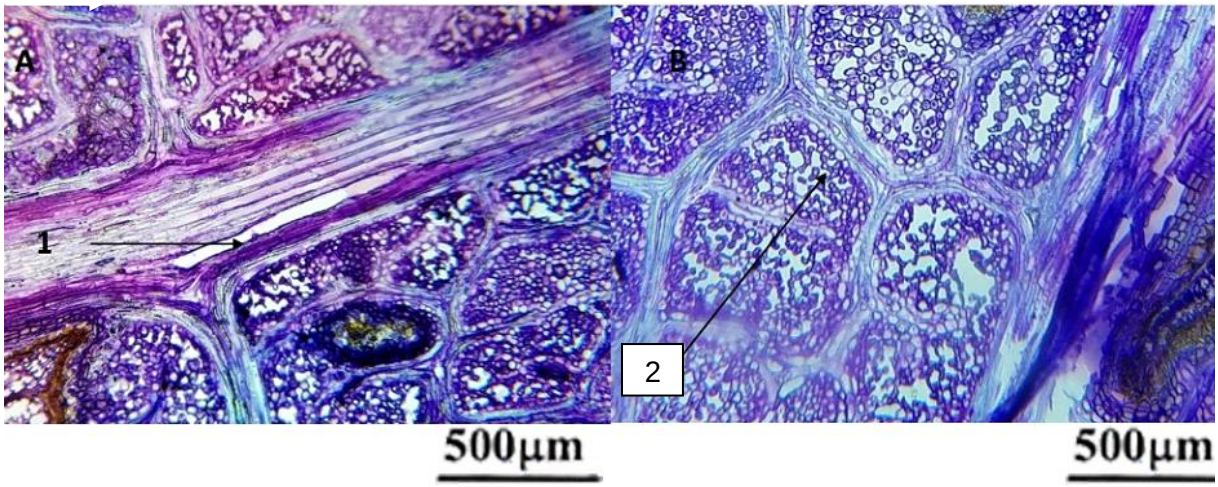

Fig. 11 Corte longitudinal da face abaxial do folíolo com galha fusiforme de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. Nervura secundária evidenciando o ducto: 1 - aréolas contendo ductos retorcidos; 2 - ducto retorcido.

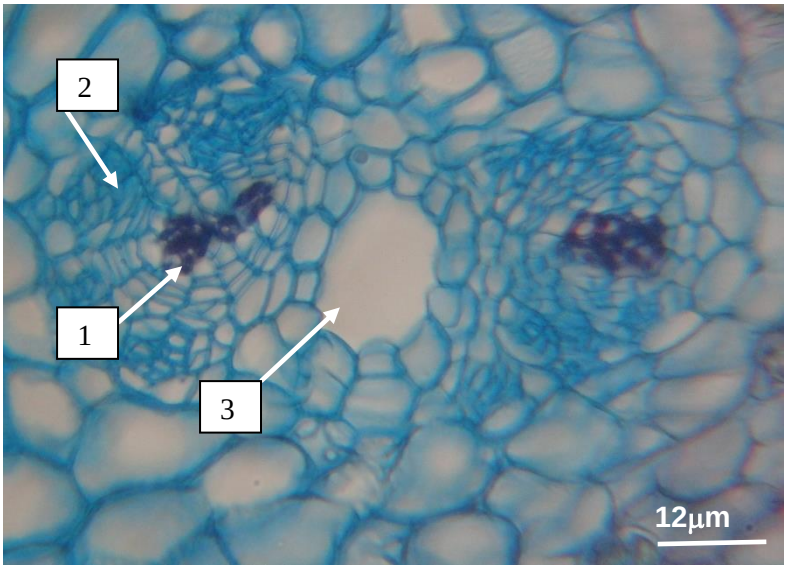

Fig. 12 Secção transversal do pecíolo do folíolo com galha fusiforme de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand. evidenciando o ducto bicolateral entre dois feixes vasculares concêntricos anficrivais. 1 - xilema; 2 - floema; 3 - ducto.

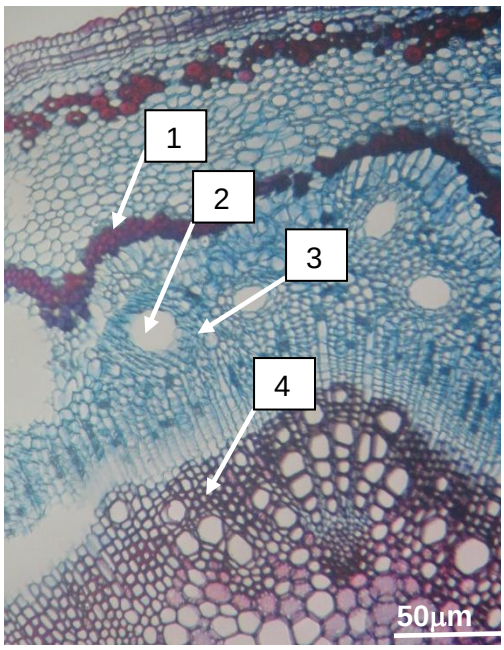

Fig. 13 Secção transversal do ramo do folíolo (com ou sem galha) de *Protium icicariba* (DC) Marchand. 1 - bainha esclerenquimática; 2 - estrutura secretora; 3 - floema; 4 - xilema

Nos folíolos com galha de Psyllidae, os feixes vasculares se mostraram semelhantes aos folíolos saudáveis. Entretanto, as regiões galhadas foram caracterizadas por um espessamento das paredes celulares do parênquima paliçádico e pela formação de um tecido colenquimático.

Descrição fitoquímica dos tecidos

O óleo essencial extraído dos folíolos de *P. icicariba* sem galha, com galha de Cecidomyiidae e com galha de Psyllidae (ativa ou inativa) constituíram em um líquido de alta mobilidade, transparente e incolor. Os folíolos com galhas ativas de Cecidomyiidae e de Psyllidae produziram uma quantidade de óleo essencial significativamente menor do que os folíolos sem galha e com galhas inativas de Psyllidae ($F=33,409$; $df=3:8$; $p=0,00$; $r=0,962$; $r^2=0,926$). Não foram detectadas diferenças entre os índices médios de riqueza ($F=2,998$; $df=3:8$; $p=0,095$; $r=0,73$; $r^2=0,53$), diversidade ($F=0,971$; $df=3:8$; $p=0,453$; $r=0,517$; $r^2=0,267$) e

equitabilidade (F=1,184; df=3:8; p=0,375; r=0,555; r^2=0,308) para os componentes químicos das amostras de óleo essencial testadas (Tabela 1).

Tabela 1 Rendimento e índices médios de riqueza, diversidade e equitabilidade dos componentes químicos do óleo essencial (Média ± Intervalo de Confiança de 95%) de folíolos de *Protium icicariba* sem galha e com galha de Cecidomyiidae e Psyllidae (ativas e inativas).

Origem	Rendimento (g/%)	Riqueza	Diversidade (*H'*)	Equitabilidade (J)
Folíolo sem galha	0,619[a] ± 0,363	3,251[a] ± 0,622	2,182 [a] ± 0,808	0,510 [a] ± 0,175
Galha de Cecidomyiidae	0,099[b] ± 0,049	2,258 [a] ± 1,169	2,454 [a] ± 0,928	0,643 [a] ± 0,299
Galha de Psyllidae ativas	0,148[b] ± 0,037	1,721 [a] ± 0,262	2,279 [a] ± 1,323	0,606 [a] ± 0,336
Galha de Psyllidae inativas	0,524[a] ± 0,132	2,908 [a] ± 2,712	2,657 [a] ± 0,242	0,657 [a] ± 0,201

Legenda: *H'*: índice de diversidade de Shannon-Weaver; J: índice de equitabilidade de Pielou. Letras iguais: não há diferença significativa.

A riqueza de componentes químicos detectados nos óleos essenciais analisados variou entre as unidades morfológicas analisadas. Enquanto no óleo essencial de folíolos sem galha foram encontrados 91 compostos, nos folíolos com galha de Cecidomyiidae foram encontrados 67, nos folíolos com galha de Psyllidae ativa foram 56 compostos e nos folíolos com galha de Psyllidae inativa foram encontrados 101 compostos. Dos compostos obtidos, 12 foram considerados compostos majoritários para todas as amostras de óleos essenciais extraídos. Estes compostos representaram para folíolos sem galha um total de 86,3% de toda a amostra (Tabela 2); para folíolos com galha de Cecidomyiidae um total de 87,3% (Tabela 3); para folíolos com galha de Psyllidae ativa um total de 77,9% (Tabela 4); e para folíolos com galha de Psyllidae inativa um total de 88,3% (Tabela 5).

Tabela 2 Compostos majoritários do óleo essencial nos folíolos de *Protium icicariba* sem galha.

Índices de Retenção				Substâncias	%
Van der Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1031	1032	1036	1037	Z-β-ocimeno	20,59
1016	1014	1020	1017	α-terpineno	13,89
1483	1483	1484	1484	α-amorpheno	9,90
1055	1054	1060	1059	γ-terpineno	8,03
1424	1423	1425	1424	4,8-β-epoxy-caryophyllano	7,33
1536	1537	1538	1538	α-cadineno	6,48
985	984	987	987	3-*p*-mentheno	6,08
931	932	939	939	α-pineno	4,17
1450	1449	1452	1451	α-himalacheno	3,38
1001	1002	1002	1002	α-phellandreno	2,31
1525	1527	1527	1528	E-γ-macrocarpeno	2,25
1575	1577	1577	1578	spathulenol	1,85
			Total		**86,26**

Tabela 3 Compostos majoritários do óleo essencial nos folíolos de *Protium icicariba* com galha de Cecidomyiidae.

Índices de Retenção					
Van der Dool e Kratz		**Kovats**		**Substâncias**	**%**
Calculado	**Adams 2009**	**Calculado**	**Adams 2009**		
1370	1369	1372	1371	cyclosativeno	28,06
984	983	988	987	cis-m-mentha-2,8-dieno	15,59
1003	1003	1003	1004	p-mentha-1(7),8-dieno	10,37
931	932	939	939	α-pineno	5,96
1410	1409	1410	1409	α-gurjuneno	5,36
1436	1436	1438	1438	B-humuleno	5,15
1380	1380	1382	1382	2-epi-α-funebreno	3,78
1327	1326	1329	1328	limonene aldeido	3,78
1520	1520	1521	1522	7-epi-α-selineno	2,36
1454	1454	1456	1456	α-patchouleno	2,30
1403	1405	1404	1405	italiceno	2,30
1483	1483	1484	1484	α-amorpheno	2,29
			Total		**87,30**

Tabela 4 Compostos majoritários do óleo essencial nos folíolos de *Protium icicariba* com galha de Psyllidae ativa.

Índices de Retenção					
Van der Dool e Kratz		**Kovats**		**Substâncias**	**%**
Calculado	**Adams 2009**	**Calculado**	**Adams 2009**		
1408	1407	1409	1407	longifoleno	30,73
1031	1032	1036	1037	Z-β-ocimeno	10,33
1483	1483	1484	1484	α-amorpheno	6,97
1016	1014	1020	1017	α-terpineno	5,91
1427	1429	1428	1431	cis-thujopseno	5,26
1503	1502	1503	1502	trans-β-guaieno	3,58
931	932	939	939	α-pineno	2,96
1552	1554	1554	1555	β-vetiveneno	2,72
1575	1577	1577	1578	spathulenol	2,65
1492	1492	1492	1492	δ-selineno	2,37
1462	1460	1464	1462	dehydro-aromadendrano	2,25
1450	1449	1452	1451	α-himalacheno	2,21
			Total		**77,94**

Tabela 5 Compostos majoritários do óleo essencial nos folíolos de *Protium icicariba* com galha de Psyllidae inativa.

Índices de Retenção					
Van der Dool e Kratz		**Kovats**		**Substâncias**	**%**
Calculado	**Adams 2009**	**Calculado**	**Adams 2009**		
1320	1319	1321	1321	neo-verbanol acetato	18,43
969	969	976	975	sabineno	16,98
1380	1380	1382	1382	2-epi-α-funebreno	15,18
949	946	958	954	campheno	8,61
904	906	905	908	santolina trieno	5,50
931	932	939	939	α-pineno	5,18
1329	1328	1331	1330	(E)-patchenol	4,13
1392	1390	1393	1391	sativeno	3,36
1459	1458	1460	1460	allo-aromadendreno	2,86
1352	1352	1354	1355	α-longipineno	2,81
1235	1235	1238	1239	Isobornyl formato	2,80
1275	1274	1277	1276	β-pregeijereno	2,46
			Total		**88,29**

A composição dos óleos essenciais resultou em um agrupamento bem distinto entre os produtos das amostras de folíolos sem galhas e folíolos com galhas ativas de ambos galhadores (Fig. 14; Fig. 15). Os folíolos com galhas inativas de Psyllidae, por sua vez, se agruparam com os folíolos sem galhas (Fig. 14; Fig. 15). Tanto quantitativa como qualitativamente, a química dos óleos essenciais indicou grupos distintos de amostras para as galhas ativas de Cecidomyiidae e Psyllidae, que por sua vez se separaram bem distintamente

da composição química do óleo essencial dos folíolos que não têm galhas ou cujas galhas de Psyllidae estão inativas.

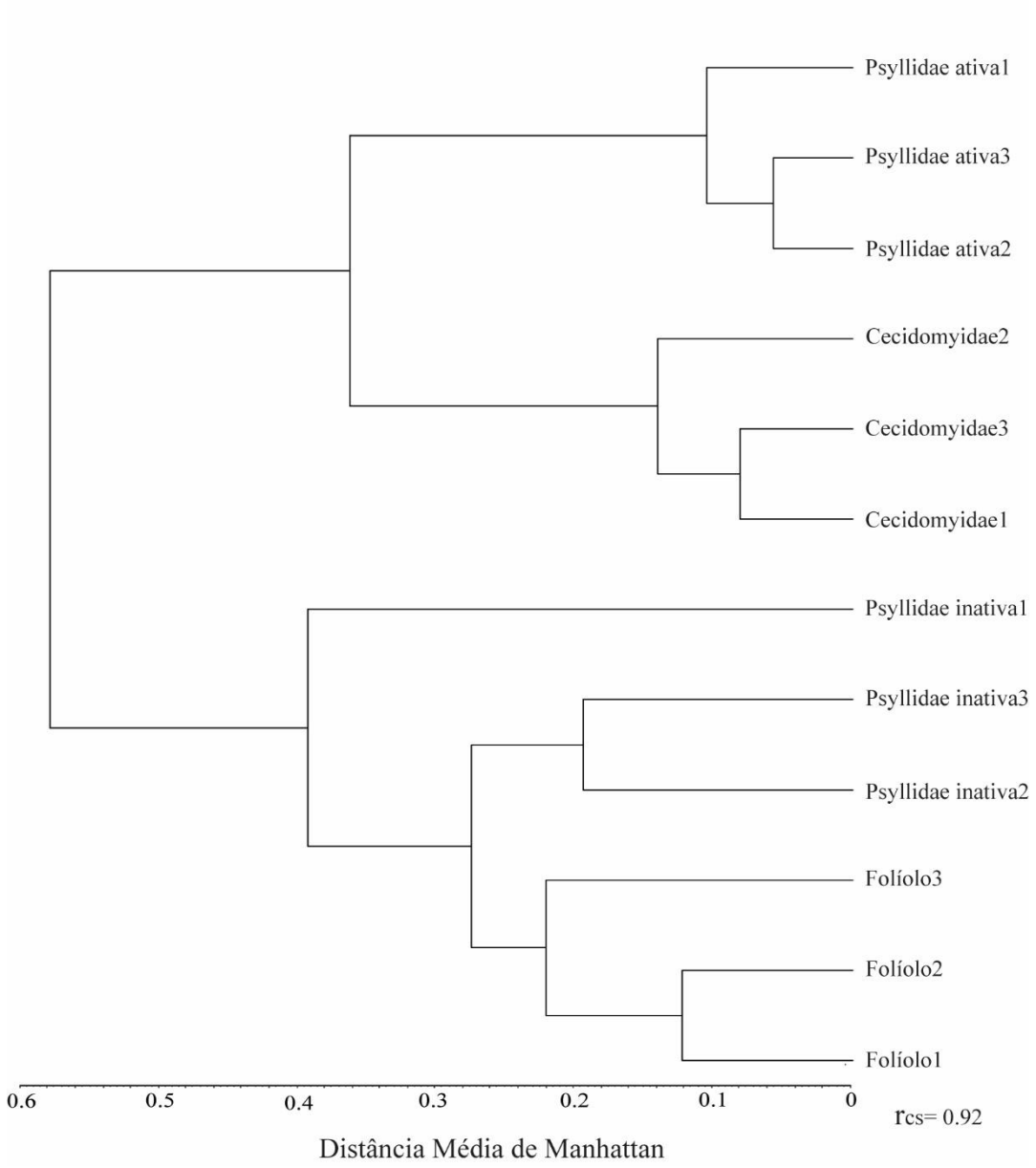

Fig. 14 Dendrograma de agrupamento (quantitativo) das amostras de óleos essenciais de folíolos de *Protium icicariba* com e sem galha, construído a partir da média de grupos formados pelo coeficiente de Distância Média de Manhattan.

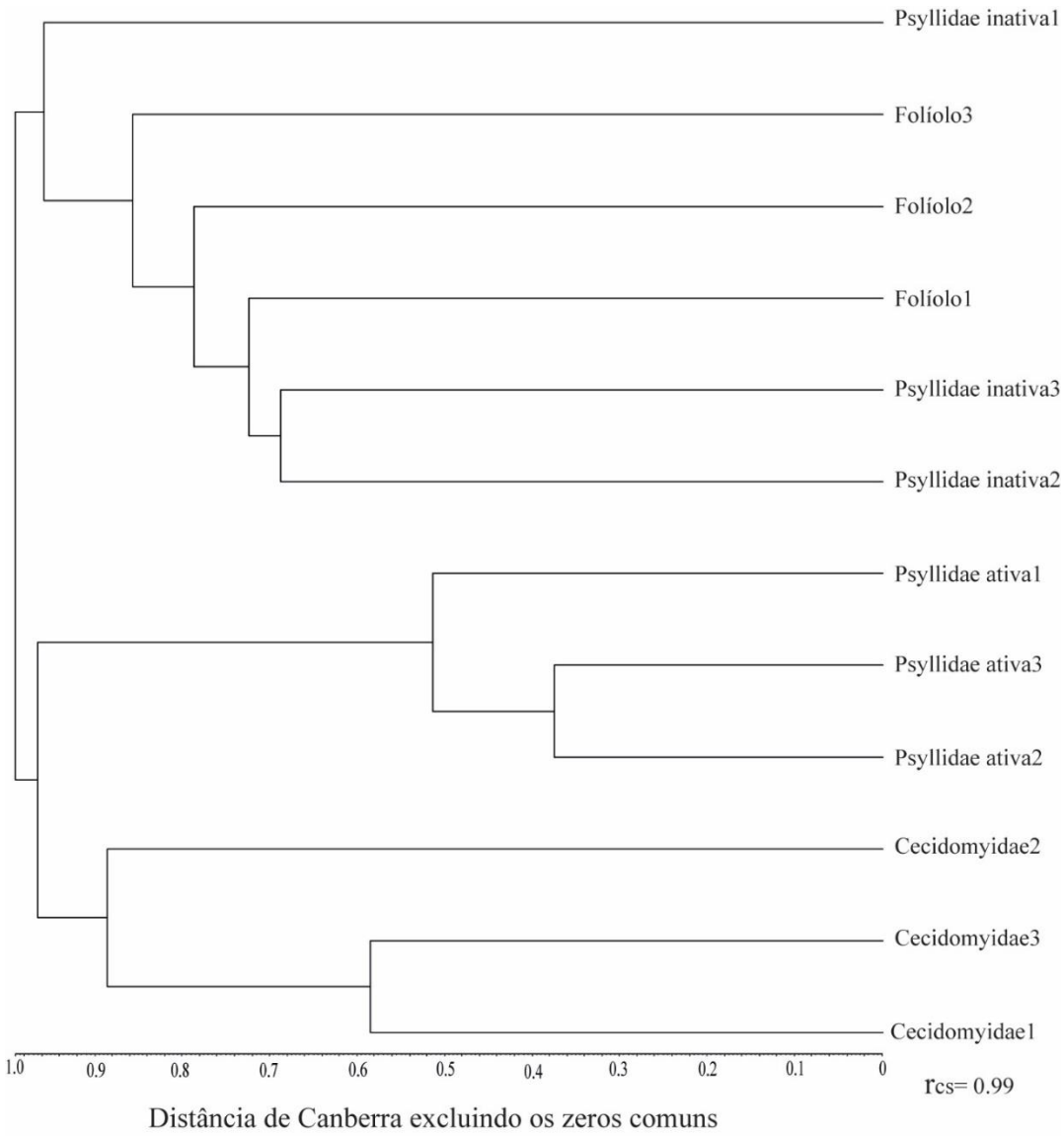

Fig. 15 Dendrograma de agrupamento (qualitativo) das amostras de óleos essenciais de folíolos de *Protium icicariba* com e sem galha, construído a partir da média de grupos formados pelo coeficiente de Distância de Canberra excluindo os zeros comuns.

A análise de substâncias indicadoras revelou que não necessariamente os compostos majoritários podem determinar a identificação típica dos óleos essenciais obtidos a partir de cada unidade morfológica analisada (Fig. 16; Fig. 17). Entretanto, tanto quantitativa como qualitativamente, existe um gradiente de composição química dos óleos essenciais de folíolos que não portam galhas ativas, ao mesmo tempo em que os folíolos com galhas ativas formam blocos bem distintos e coesos (Fig. 16; Fig. 17).

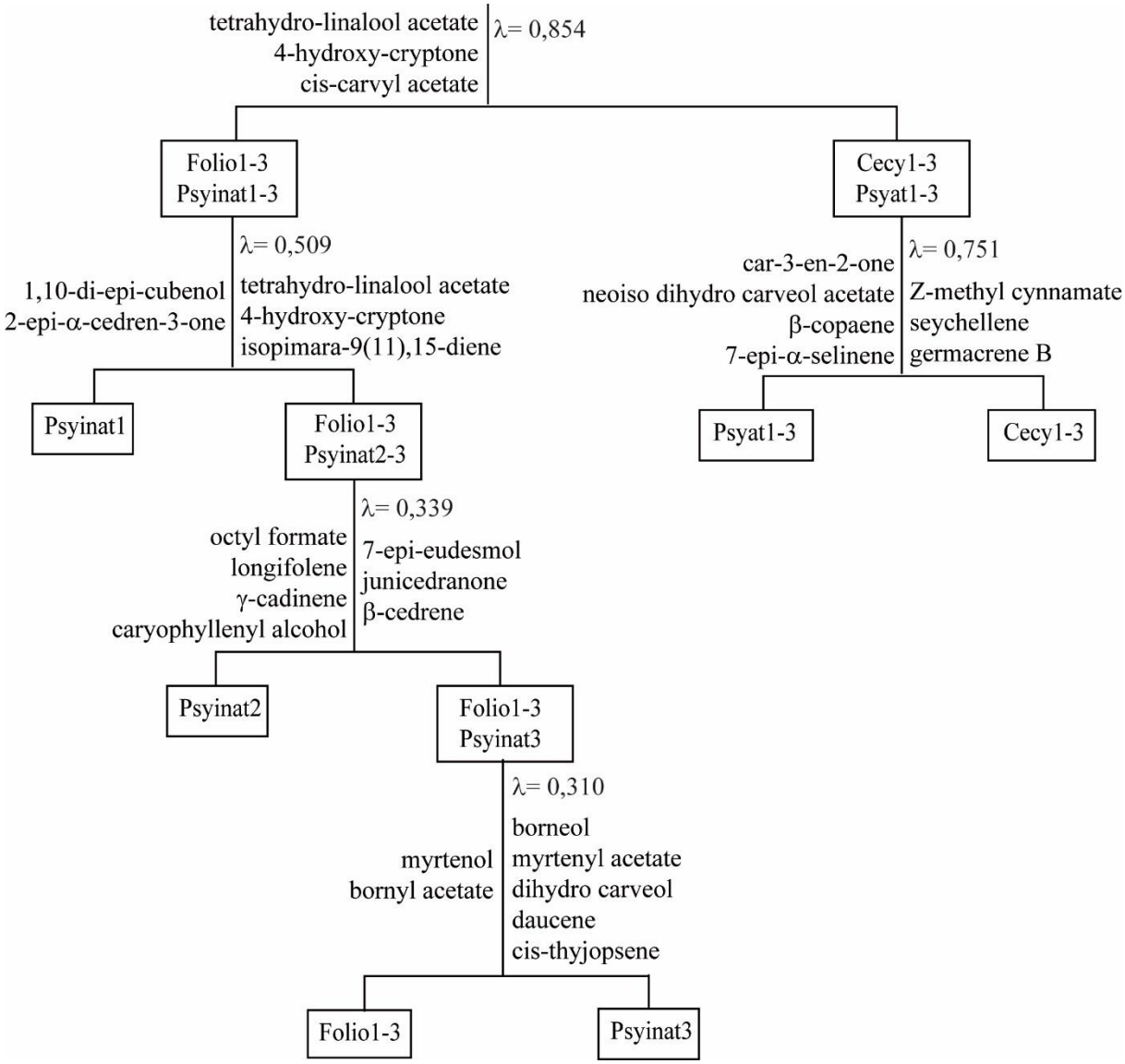

Fig. 16 Diagrama de ordenação por análise de substâncias indicadoras (TWINSPAN) considerando a composição quantitativa entre os óleos essenciais de folíolos sem galhas (Folio), folíolos com galhas de Cecidomyiidae (Cecy), folíolos com galhas ativas de Psyllidae (Psyat) e folíolos com galhas inativas de Psyllidae (Psyinat).

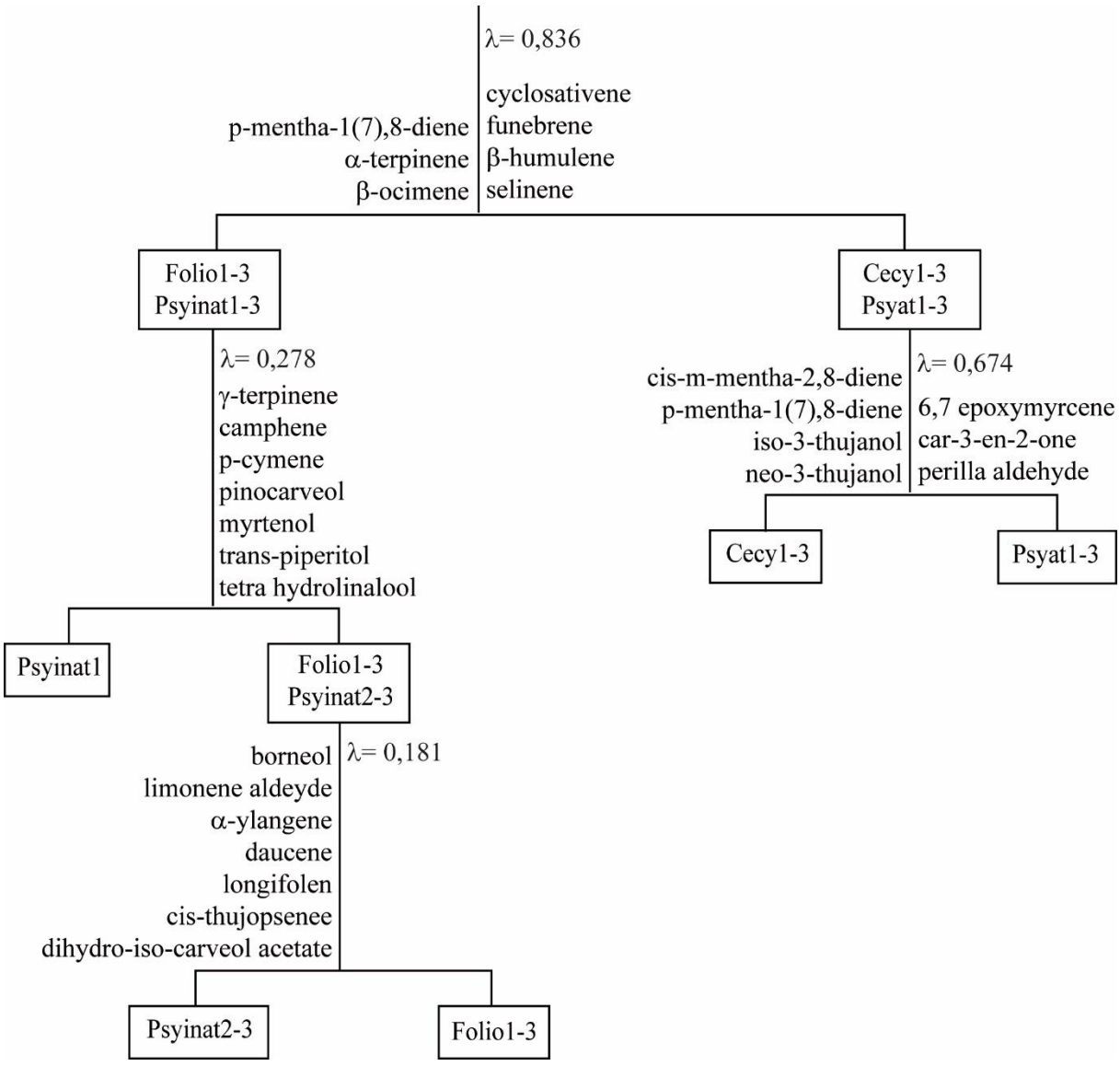

Fig. 17 Diagrama de ordenação por análise de substâncias indicadoras (TWINSPAN) considerando a composição qualitativa entre os óleos essenciais de folíolos sem galhas (Folio), folíolos com galhas de Cecidomyiidae (Cecy), folíolos com galhas ativas de Psyllidae (Psyat) e folíolos com galhas inativas de Psyllidae (Psyinat).

Discussão

Vários táxons de insetos podem induzir galhas, contudo, no gênero *Protium*, tem-se observado que alguns grupos têm maior incidência na indução de galhas, como os representantes das ordens Diptera, Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Thysanoptera e Hymenoptera (Maia, 1999). Nesse gênero botânico, os Cecidomyiidae (Diptera) destacam-se como o principal grupo

galhador e podem induzir galhas em todos os órgãos vegetais, embora mostrem uma forte preferência por folhas (Medianero e Barrios, 2001). Apesar da preponderância dos cecidomiídeos nos inventários brasileiros de insetos galhadores, eles geralmente não são identificados ao nível de espécie, seja por causa de incertezas taxonômicas ou porque ainda precisam ser descritos e nomeados (Araújo, 2019).

No gênero *Protium*, foram descritas até o momento 98 morfotipos de galhas distribuídas em 15 espécies e atribuídas a 147 morfoespécies de insetos indutores (Fernandes, 2010). Em *Protium icicariba* especificamente, existem quatro morfotipos de galha atualmente descritas, sendo: o morfotipo cônico e curvo, que é induzido em folíolos por Psyllidae (Bregonci et al, 2010; Monteiro et al., 2004); o morfotipo tubular, formado por enrolamento da borda foliolar, induzido por Cecidomyiidae (Bregonci et al., 2010; Maia, 2001; Monteiro et al., 2004); o morfotipo oval, também induzido em folíolos por Cecidomyiidae (Monteiro et al., 2004); e o morfotipo reniforme, induzido em frutos por Cecidomyiidae (Maia, 2001; Maia, 2004; Monteiro et al., 2004). Neste sentido, os dois morfotipos de galhas apresentados no presente estudo não haviam sido descritos previamente, contribuindo para o melhor conhecimento das estruturas presentes em *P. icicariba* e das relações entre esta espécie vegetal e insetos galhadores.

Descrição microscópica dos tecidos

A organização tecidual dos folíolos saudáveis de *P. icicariba* correspondeu ao padrão esperado para estas estruturas, estando formado por parênquima paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico está presente na face adaxial da folha, com células justapostas e sem espaços entre elas, enquanto o parênquima lacunoso apresenta células mais irregulares e com lacunas entre as células (Ferri, 1996), como observado na espécie em estudo. Contudo, na ontogênese da galha houve alterações celulares notáveis, onde as células apresentavam características distintas das células do tecido saudável.

Neste sentido, notou-se a perda da diferenciação dos parênquimas paliçádico e lacunoso, modificados em um parênquima fundamental. Essa característica pode ser atribuída ao efeito indutor da galha, ocasionando a alteração do mesófilo no folíolo de *P. icicariba*.

Rohfritsch (1992) em seus estudos, constataram que galhas de Cecidomyiidae hipertrofiaram células parenquimáticas e desenvolvem uma camada mecânica em torno do tecido nutritivo de *Lopesia sp*. Essas galhas alteraram porções internas do sistema vascular em direção às suas demandas nutritivas. O tecido nutritivo foi consumido pelas larvas que se diferenciam em pequenas células quando comparadas com os outros tecidos da vesícula. Essas alterações também foram observadas nas galhas das folhas induzidas por *Pisphondylia brasiliensis* Couri e Maia, 1992 (Cecidomyiidae) em *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. (Nyctaginaceae) (Fleury et al., 2015) e por *Lopesia sp*. em *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) Azevedo-Tozzi & H.C.Lima (Leguminosae- Papilionoideae) (Suzuki et al., 2015). Esses fatos corroboram com o presente estudo, uma vez que observou-se nos cortes histológicos a presença de um tecido diferenciado no interior da câmara larval que pode estar relacionado ao processo de nutrição das larvas dos insetos galhadores.

Essa alteração pode ser um dos instrumentos principais na transferência simplástica da passagem de água e substâncias hidrossolúveis das células do parênquima fundamental (onde se localizam os feixes vasculares) para os tecidos de revestimento interno da câmara larval. Esses cecidomiídeos possuem aparelho bucal sugador e as alterações fisiológicas na planta favorecem o acesso da larva à alimentação, uma vez que os feixes vasculares passam a ficar próximos da câmara larval e voltados para a superfície ventral do inseto galhador (Martins et al, 2012; Bronner 1992; Carneiro et al., 2009).

De acordo com Oliveira et al. (2006), alguns insetos colhem nutrientes diretamente das células nutritivas por meio de seu aparelho bucal, que funciona mecanicamente por mastigação, com um sistema de liberação de secreções salivares que neutralizam possíveis defesas químicas que a planta produza. Os insetos com aparelhos bucais sugadores em forma de agulha, por sua

vez, também induzem secreções do tecido nutritivo, mas os nutrientes são coletados indiretamente, à medida que os insetos indutores de galhas se alimentam dos tecidos vasculares adjacentes (Oliveira et al., 2006). Nas galhas estudadas, as larvas possuem mandíbulas estiletiformes que raspam a parede interna da galha auxiliando no processo de alimentação durante o seu desenvolvimento.

A estrutura da superfície externa das galhas de Cecidomyiidae apresentou modificações na espessura das paredes celulares, revelando-se mais cutinizadas do que no tecido não afetado. Sugere-se que esta modificação possa estar associada especialmente à proteção da larva, representando uma barreira contra agentes físicos do meio. De forma semelhante, um estudo histológico da epiderme de folhas de *Pistacia terebinthus* com galhas provocadas por três gêneros de pulgões mostrou que a epiderme multisseriada observada nos três tipos de galhas, representa uma barreira destinada a impedir a entrada de água da superfície da parede exterior para o interior da galha, viabilizando um ambiente seco hidrofóbico, crucial para a sobrevivência dos insetos (Álvarez et al., 2009).

Na análise da galha de Psyllidae, entretanto, não ocorreu o fechamento da câmara larval por tecido vegetal e sim pelo corpo do inseto em desenvolvimento, havendo apenas material lanuginoso branco envolvendo as larvas e as pupas, como também observado por Calácio (2016). Sugere-se, portanto, que uma das funções desse material lanuginoso seja a proteção do inseto contra elementos do meio externo, funcionando como uma estrutura capaz de repelir água (hidrofóbica), o que pode ser favorecido pelo fato da galha estar localizada na face abaxial dos folíolos. Estas características morfofuncionais da galha de Psyllidae podem representar um mecanismo facilitador na saída do inseto da planta hospedeira. Assim, novos estudos são necessários objetivando avaliar as características físico-químicas do material lanuginoso associados à galha, para que sua função possa ser elucidada.

As camadas de células esclerenquimáticas observadas nas paredes externas da galha de Cecidomyiidae e Psyllidae e na parede interna da câmara larval, são constituídas de

esclereídeos. Os esclereídeos têm sido caracterizados pela maior capacidade de compressão (Evert, 2005). Tomando como base que esclereídeos podem surgir de células do parênquima que se esclerificaram e não necessariamente a partir de células meristemáticas, esta característica pode conferir aos tecidos da galha maior capacidade de resistir ao esmagamento (Dorchin et al., 2002; Evert, 2005), contribuindo para a proteção do inseto em desenvolvimento.

A formação de esclereídeos pode ser atribuída a hormônios, em especial, à diminuição dos níveis de auxina (Dorchin et al., 2002). Essa é uma associação que indica que a indução da galha de Cecidomyiidae e Psyllidae em *P. icicariba* pode estar atuando em nível molecular na regulação da expressão gênica da planta, acoplando a resposta vegetal à ontogênese da galha, e que de outra forma estaria agindo diretamente em rotas metabólicas bioquímicas de produção de hormônios de crescimento vegetal. Como consequência, o destino das células da planta hospedeira é alterado pela diferenciação modificada das células, podendo revelar a origem e a trajetória das características e variabilidade dos morfotipos (Oliveira e Isaias, 2010). Isso pode demonstrar a adaptação dos agentes indutores de galha à defesa química e mecânica da plantas, com base em um design funcional que, do ponto de vista evolutivo, pode ser visto como galhas sendo fenótipos estendidos dos insetos indutores devido à influência dos mesmos sobre o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos do hospedeiro (Stone e Schönrogge, 2003).

De forma geral, a diversificação da estrutura interna de galhas deve estar relacionada com a nutrição de seus habitantes, enquanto as variações na estrutura externa estariam relacionadas à defesa contra inimigos (Stone e Schönrogge 2003) e agentes físicos do meio (Álvarez et al., 2009). A parede externa da galha de Cecidomyiidae e Psyllidae, composta em parte por esclerênquima no tecido com galha induzida em *P. icicariba*, indica forte relação com a defesa mecânica contra os inimigos externos, enquanto a parte interna, por ser composta por tecidos nutritivos, principalmente na galha induzida por Cecidomyiidae, está relacionada à alimentação do inseto indutor. Adicionalmente, a presença de esclereídeos compondo o tecido presente na parede da galha pode ser também um bom apontador que a mesma sirva como

artefato de defesa a favor do inseto indutor em desenvolvimento no interior na galha. Essa seria uma defesa adicional ao indutor, já que as galhas em *P. icicariba* não apresentam outros elementos de defesa, como pelos, tricomas ou cristais.

Na galha induzida por Cecidomyiidae, a principal alteração ocorrida nos feixes vasculares do tecido galhado foi a entorse dos feixes vasculares na região associada à galha, resultando em uma conformação diferente daquela observada nos feixes de folíolos sem galha. Esta alteração pode estar relacionada ao redirecionamento da produção dos tecidos nutritivos da planta para benefício do galhador (Cook e Gullan, 2008). Contudo, durante a ontogênese da galha fusiforme, as nervuras secundárias se retorceram impedindo o fluxo normal de metabólitos para a parte modificada pela ontogênese da galha, o que também pode indicar uma forma de evitar contato com determinados compostos químicos que prejudiquem a formação da galha. Entretanto, para se determinar qual a real função deste tipo de alteração, é necessário que sejam feitas investigações mais específicas sobre os efeitos dos vários componentes do óleo essencial de *P. icicariba* sobre o inseto indutor desse tipo de galha e avaliações quanto às permeabilidade dos feixes vasculares normais e em tecidos alterados. Segundo Arduin et al. (2005), os feixes vasculares que não são rodeados por uma bainha fascicular ou bainha do feixe, com espessamento secundário nas paredes celulares, tendem a favorecer o acesso do inseto ao floema ou a liberação das substâncias orgânicas transportadas por ele para os tecidos ao redor. Os feixes vasculares de galhas sem uma bainha fascicular ocorrem de forma similar nas folhas de *Pistacia terebinthus* e não estão relacionados ao conceito de alimentação do pulgão, mas sim com o fato de que as nervuras principais e secundárias de folíolos sadios de *P. terebinthus* apresentam este mesmo padrão (Álvarez et al., 2009). Nas galhas verrucosas de Psyllidae, as modificações observadas não afetaram as nervuras foliares de *P. icicariba*, sugerindo que a alimentação das larvas possa ser feita a partir do consumo de fotoassimilados de feixes vasculares que passam pela parede da galha.

As galhas fornecem nutrição e proteção contra variações bioclimáticas aos seus habitantes, todavia, as galhas não estão livres de inimigos. Inserido nesse contexto, as adaptações de defesa contra os inimigos naturais seriam as responsáveis por sua grande diversidade de morfotipos, embora essa hipótese ainda precise ser confirmada (Compson et al. 2011). A respeito do significado evolutivo das galhas, as linhas de investigação propostas na literatura abrangem três hipóteses: (1) nutricional, onde o inseto galhador modifica a estrutura celular dos tecidos de forma a facilitar ou melhorar o acesso das larvas à alimentação (Price et al., 1987); (2) microambiental, onde o inseto altera o microambiente, representado pela câmara existente na estrutura da galha, a fim de ter as características ideais para o desenvolvimento das larvas (Stone e Shonrogge, 2003); e (3) de proteção contra os inimigos, onde o inseto modifica a estrutura celular das células vegetais para criar formas de defesa mecânica contra possíveis inimigos (Price et al., 1987). Estas três hipóteses são atualmente as vias mais promissoras de análise e interpretação de galhas (Compson et al., 2011; Formiga e Isaias, 2011; Nabity et al., 2013). Com base nas modificações observadas no presente estudo, sugere-se que a ontogênese da galha de Cecidomyiidae seja decorrente de um processo evolutivo multifatorial, corroborando igualmente as três hipóteses citadas. Para a galha de Psyllidae, por sua vez, as características observadas mostraram um controle maior do galhador sobre elementos associados à resistência mecânica das células afetadas pela ontogênese da galha, sugerindo que a proteção possa ser o fator mais relevante para o sucesso reprodutivo do inseto. Isso não exclui, entretanto, a retirada de nutrientes da planta pelo inseto, embora não tenha havido alterações na disposição dos feixes vasculares, ocorrendo apenas alterações em menor proporção (espessamento) das paredes celulares dos tecidos afetados. Adicionalmente, o fechamento da câmara larval pela própria larva pode indicar uma maior autonomia do inseto e menor efeito da estrutura da galha propriamente dita na manutenção do microhabitat adequado ao desenvolvimento do inseto.

Descrição fitoquímica dos tecidos

O perfil fitoquímico das unidades morfológicas trabalhadas evidenciou a produção de óleos essenciais com características bem distintas, considerando aspectos qualitativos e quantitativos, dependendo da existência ou da atividade da galha. Os tecidos das galhas ativas produziram óleos essenciais com menos compostos em sua composição quando comparadas ao óleo essencial de folíolos sem galha e com galhas inativas, o que pode indicar que a planta tem seu metabolismo secundário afetado durante a ontogênese da galha. Segundo Shorthouse et al. (2005), os insetos galhadores podem controlar e redirecionar o desenvolvimento e a fisiologia dos órgãos da planta atacada em seu próprio benefício. Esta capacidade de alteração fisiológica pode explicar a diminuição na produção de óleo essencial durante o processo de indução de galhas em *P. icicariba*, evidenciando a capacidade dos galhadores atuarem em nível ontogenético nas galhas, alterando o funcionamento dos tecidos afetados da planta hospedeira. Com a alteração do tecido da planta, as estruturas secretoras teriam sua capacidade de produção de óleos essenciais reduzida, caracterizando, portanto, um processo de estresse fisiológico vegetativo, devido as modificações realizadas pelo inseto no metabolismo primário e secundário do vegetal.

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos químicos com características voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Martins et al., 2002). Podem estar presentes em um só órgão ou em toda a planta, o que pode variar de acordo com a família do vegetal (Bakkali et al., 2008). Podem ser produzidos em células secretoras, cavidades, ductos, células epidérmicas e tricomas (Cole, 2008). No presente estudo, os óleos essenciais eram produzidos nos folíolos, frutos e caule. Estes óleos são um produto do metabolismo secundário e possuem várias funções importantes para os vegetais dentro do seu ecossistema, pois atuam defendendo-o contra microorganismos e predadores (Henriques et al., 2000) e como sinalizadores químicos em vários processos ecológicos, como a polinização (Ramalho e Silva, 2014), a dispersão de frutos e sementes (Harborne, 1993), além de auxiliar na localização de

hospedeiros por seus insetos galhadores (Moura et al., 2009 Entretanto, o presente estudo demonstra que no início da oviposição a planta reage aumentando a produção dos óleos essenciais e que o inseto galhador consegue desdiferenciar os parênquima paliçádico e lacunoso em parênquima fundamental, além de retorcer os ductos das nervuras principais, impedindo a chegada dos metabolitos secundários até o local galhado. Dessa forma, o inseto consegue continuar o seu desenvolvimento, e, portanto, a galha pode ser considerada provocador de estresse fisiológico na planta hospedeira.

A maior parte dos compostos encontrados no perfil cromatográfico dos óleos essenciais analisados foi classificada como terpenos, podendo ser mono ou sesquiterpenos, os quais foram identificados a partir da classificação de compostos cromatográficos desenvolvida por Felipe e Bicas (2017). A presença abundante de componentes terpênicos tem sido comumente descrita na literatura, onde as oleorresinas se apresentariam como uma dispersão natural de ácidos diterpênicos em uma mistura de mono e sesquiterpenos, que são os principais componentes dos óleos essenciais (Cole, 2008). Segundo Cibelem (2016), os terpenos são substâncias que servem como defesa química para diversas plantas e estas substâncias compõem em grande parte os óleos essenciais produzidos pelo metabolismo vegetal das plantas. A composição majoritária dos óleos essenciais dos tecidos galhados divergiu do encontrado no óleo essencial dos folíolos sadios. Nos tecidos saudáveis de *P. icicariba*, os óleos essenciais estão constituídos principalmente por sesquiterpeno germacreno, seguido em abundância pelo Z-β-ocimeno, α-terpineno, α-amorpheno. Quimicamente, os óleos essenciais da família Burseraceae são, em sua maioria, constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. A diminuição na presença destes componentes no óleo essencial analisado de galhas ativas pode indicar uma interferência do inseto no funcionamento do metabolismo secundário da região da planta onde a galha está se desenvolvendo. Nas galhas inativas foi observado padrão de componentes de óleos essenciais semelhantes ao de tecidos sadios, corroborando a ideia de que o processo de

formação da galha influencia a qualidade do óleo essencial produzido na região galhada especialmente enquanto ela permanece ativa.

Variações qualitativas e quantitativas na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal podem estar relacionadas a causas diferentes. Estes tipos de diferenças podem ocorrer como consequência da variação intra-clonal no melhoramento genético de cultivares de propagação exclusivamente vegetativa, como observado na rosa com cheiro de gerânio, *Pelargonium* sp., sugerindo que mesmo variações genéticas somáticas podem afetar a biossíntese e a produção de óleo essencial (Kulkarni et al., 1997). Em outras situações, essas diferenças podem ser devido a razões ambientais que podem envolver a origem geográfica, como consequência de estresse produzido por fatores abióticos como vento, umidade do ar e salinidade (Kokkini et al., 1994). A forma de cultivo também pode ocasionar variações na composição do óleo essencial (Paul et al., 2010). No caso em questão, a presença de um inseto galhador conduziria a um raciocínio primário que relacionasse a química dos óleos essenciais com uma resposta reacional da planta à presença do inseto. Este tipo de resposta foi evidenciada por Harborne (1993) que demostrou que a variação na composição do óleo essencial pode estar associada à defesa química da planta em resposta à presença de herbívoros. Contudo, o rendimento de óleos essenciais nos folíolos com galhas foi menor do que nos folíolos sem galhas e, aliado a isto, quando as galhas de Psyllidae se tornaram inativas, o rendimento de óleos essenciais não apresentou diferenças significativas em relação aos folíolos sem galhas. Estes fatos sugerem uma ação por parte do inseto galhador, induzindo à diminuição da produção e/ou do acúmulo de óleos essenciais em galhas ativas, a partir das desdiferenciações ocorridas ao longo do desenvolvimento do inseto galhador.

A diminuição do rendimento de óleos essenciais pode ser atribuída à perda estrutural de ductos e cavidades secretoras, conforme discutido, reforçando a ideia de um controle molecular do inseto sobre os tecidos da planta hospedeira. Assim, no momento da oviposição, o galhador injetaria pequenas moléculas que alteram a estrutura dos tecidos dos parênquimas paliçádico e

lacunoso, modificam o funcionamento das células hospedeiras e modulam a resposta da planta (Giron et al., 2015; Hogenhout e Bos, 2011; Mani, 1964; Redferne Shirley, 2002; Shorthouse et al., 2005; Stone eSchönrogge, 2003). O vegetal passa então a produzir uma maior quantidade de sacarose nas células do mesofilo, que são então direcionadas para a região dos tecidos afetados (Figueroa e Lunn, 2016; Granot et al., 2013a, 2013b).

Esta possibilidade se consolida pelos resultados obtidos através do diagrama de ordenação das substâncias indicadoras (Figura 17), que revela distinções nas composições químicas qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais nas galhas ativas de Cecidomyidae e de Psyllidae, bem como nos folíolos sem galhas dos com galhas inativas de Psyllidae, Essa distinção na composição dos óleos essenciais, leva a formação de blocos distintos entre as galhas ativas de Cecidomyidae e Psyllidae, tal qual na organização de grupos diferentes entre os folíolos sem galhas dos com galhas inativas em Psyllidae. Neste sentido, a presença do inseto em desenvolvimento também exerceria algum nível de influência sobre a fisiologia dos tecidos do hospedeiro, o que é interrompido quando o desenvolvimento se conclui e o inseto abandona a galha. Isso poderia estar relacionado ao fato dos insetos galhadores controlarem os tecidos dos hospedeiros de modo a aumentar seu potencial nutritivo ou com intuito de diminuir os teores de defensivos aleloquímicos, que prejudicariam o desenvolvimento do galhador (Hartley 1998). O aumento da capacidade nutritiva e da redução dos teores de defensivos, podem se associar, respectivamente, à hipótese nutricional e de proteção contra inimigos. Neste caso, a proteção ocorreria em relação às respostas fisiológicas do próprio hospedeiro, abrangendo também aspectos de defesa química e não apenas de defesa mecânica.

O metabolismo secundário de uma planta produz três grandes compostos orgânicos na sua biossíntese: terpenoides, alcaloides e fenólicos. Os terpenoides apresentam diversas funções nos vegetais, como a produção de carotenoides, hormônios e nos mecanismos de defesa e de comunicação da planta (Probst, 2012).

No presente estudo foram determinados os compostos majoritários do óleo essencial nos folíolos de *Protium icicariba* sem galha, *Protium icicariba* com galha de Cecidomyiidae, *Protium icicariba* com galha ativa de Psyllidae e em *Protium icicariba* com galha inativa de Psyllidae Nos folíolos de *P. icicariba* sem galhas, foram representativos os compostos Z-β-ocimeno (20,59%), α-terpineno (13,89%) e α-amorpheno (9,90%). O Z-β-ocimeno é um volátil muito comum nas plantas e liberado em quantidades importantes nas folhas e flores. Este monoterpeno acíclico pode desempenhar várias funções biológicas, podendo afetar os visitantes florais e também mediar respostas defensivas à herbivoria. Atua ainda como uma pista química em várias espécies vegetais para atrair inimigos naturais de insetos fitófagos. Plantas infestadas com herbívoros induzem aumento das emissões de Composto Volatéis, como Z-β-ocimeno, nos tecidos danificados e não danificados, em uma resposta defensiva sistêmica (Loughrin et al., 1994, Miresmailli et al., 2010, Copolovici et al., 2014, Miresmailli et al., 2011 , Pickett et al., 2003). Além de seu efeito sobre os insetos, o Z-β-ocimeno também pode desempenhar papéis importantes na comunicação planta-planta, mediando a indução de genes envolvidos na defesa (Arimura et al., 2000, 2002).Arimura et al. (2000, 2002) revelaram que o Z-β-ocimeno e outros voláteis emitidos pelo feijão-de-lima, após o ataque do ácaro-aranha, induzem a expressão de vários genes envolvidos na defesa da planta pela ativação da via de sinalização do ácido jasmônico, permitindo que essas plantas preparem antecipadamente defesas contra os ácaros. Tais estudos corroboram com o presente trabalho, uma vez que a presença em grandes quantidades do Z-β-ocimeno ocorreu nos folíolos de *P. icicariba* sem galhas. Esse fator pode indicar que *P. icicariba* produz esse composto como resposta defensiva contra à herbivoria dos insetos galhadores.

Os α-terpinenos são um grupo de isômeros de hidrocarbonetos classificados como terpenos. Segundo Jaramillo; Duarte e Delgado (2012), o óleo essencial extraído das folhas e caule de *Chenopodium ambrosioides*, ocasionou a mortalidade de 100% (dose de 500 μL de óleo/L de ar, após 24 h de exposição) do gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais* Mots).

Os autores atribuíram a atividade inseticida à presença do α-terpineno, que foi o composto encontrado em maior porcentagem no óleo. Esse composto também foi encontrado em grandes quantidades no presente estudo, sugerindo assim que sua capacidade inseticida pode ser um mecanismo defensivo de *P. icicariba*, impedindo a ação de insetos galhadores.

O α-amorpheno é um composto pertencente à classe de compostos orgânicos conhecidos como sesquiterpenóides. São terpenos com três unidades consecutivas de isopreno, presentes em várias espécies de plantas. Tem papel como metabolito vegetal e com ação alelopática (Talwar et al., 1992). Olayemi (2017), demonstrou que *Teucrium marum* (família Labiatae) possui múltiplos mecanismos de defesa e produziu uma grande variedade de compostos químicos que são conhecidos como metabólitos secundários, dentre eles o α-amorpheno. Segundo ao autor, estes metabólitos podem proteger as plantas de ataques de insetos, herbívoros e patógenos, e ainda fazer com que as mesmas sobrevivam a outros estresses bióticos e abióticos. Esses achados podem ser relacionados com o presente estudo, indicando que *P. icicariba* produz α-amorphenos a fim de evitar a presença de insetos galhadores.

Em *Protium icicariba* com galha de Cecidomyiidae, destaca-se a presença de cyclosativeno (28,06%), cis-m-mentha-2,8-dieno (15,59%) e de p-mentha-1(7),8-dieno (10,37%). O Ciclosativeno (CSV) é classificado como um sesquiterpeno tetracíclico. Togar et al. (2014), encontraram esse composto nos óleos essenciais de *Centaurea cineraria* (Asteraceae), *Abies magnifica* e de *A. Murray* (Pinaceae), e sugeriram que os CSVs possuem ação citotóxica, genotóxica e antioxidante. Diversos estudos demonstram ainda que essa substância apresenta fortes propriedades antimicrobianas e inseticidas (Lee et al., 2016, Turkez et al., 2015, Kang e Lee 2018, Werz 2007). Se tratando do presente estudo, a grande quantidade de cyclosativeno encontrada em *Protium icicariba* com galha de Cecidomyiidae, pode indicar a atividade antioxidante e inseticida desse composto atuando na defesa da planta hospedeira contra a galha em desenvolvimento. Além disso, Beck et al. (2015) relataram um possível papel do cyclosativeno como semioquímico. Semioquímicos são sinais que causam alterações no

comportamento e desenvolvimento dos organismos (Hassanali et al., 2008). Assim, a alta porcentagem do cyclosativeno encontrado no presente estudo, também pode indicar a ação semioquímica como uma possível resposta de *Protium icicariba* contra o desenvolvimento do inseto galhador (Cecidomyiidae) em seu interior.

A substância cis-m-mentha-2,8-dieno é classificada como um monoterpeno. Ramadan et al. (2020), indicou que a ação antioxidante dos óleos essenciais de *Senecio glaucus L*. Segundo os autores, essa característica é devido a presença de altos teores de cis-m-mentha-2,8-dieno (22,9%). Sugere-se que a atividade antioxidante desse composto encontrado no presente trabalho, pode estar relacionada como uma defesa da planta hospedeira contra a galha em desenvolvimento.

O composto p-mentha-1(7),8-dieno pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como monoterpenóides mentano. Em um estudo realizado por Viljoen et.,al (2005), com óleo essêncial de *Lippia javanica*, a presença de p-mentha-1(7),8-dieno foi associada com atividade antimicrobiana e de biocida natural. Em outro trabalho realizado por Bassole et al. (2011), com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon giganteus* também foi demonstrada a ação biocida do composto. Sugere-se que a alta porcentagem de p-mentha-1(7),8-dieno encontrada pelo presente estudo, possa ser um mecanismo usado por *Protium icicariba* para repelir o inseto em desenvolvimento, além de impedir que ocorram novas colonizações em seus folíolos.

Nos folíolos de *Protium icicariba* com galha ativa de Psyllidae, sobressai-se a presença de longifoleno (30,73%), Z-β-ocimeno (10,33%) e α-amorpheno (6,97%).

O composto longifoleno é um sesquiterpeno tricíclico. Quando produzido pela planta, pode atuar de diferentes formas sobre o inseto herbívoro: com ação diretamente tóxica, como um adesivo unindo as peças bucais ou ainda envolver todo o inseto em desenvolvimento levando-o a morte (Taiz et al., 2017). Além disso, Krinski et al. (2016) mostraram resultados promissores da ação do longifoleno, extraído dos óleos essenciais das folhas de *Piper aduncum*,

P. gaudichaudianum, P. malacophyllum, P. marginatum e *P. tuberculatum* (Piperaceae), sobre ovos do percevejo do colmo do arroz. *T. limbativentri.* Esse estudo indica que o longifoleno é um fitoinseticida inibidor da eclosão de ninfas de *T. limbativentris*. É possível que *Protium icicariba* com galha ativa de Psyllidae, produza altas concentrações de longifoleno, na tentativa de evitar que o inseto complete o seu desenvolvimento ontogenético no interior da câmara larval. Entretanto, as observações do presente estudo evidenciam a ocorrência de modificações como as entorses dos feixes vasculares, provocadas pelo desenvolvimento do inseto. Essas alterações podem ser um mecanismo de defesa do inseto para bloquear a chegada de longifolenos na câmara larval, possibilitando assim o crescimento dessa galha.

O Z-β-ocimeno desempenha papel importante na indução de genes envolvidos na defesa vegetal. Arimura et al. (2000, 2002) revelaram que o Z-β-ocimeno e outros voláteis emitidos pelo feijão-de-lima, após o ataque do ácaro-aranha, induzem a expressão de vários genes envolvidos na defesa da planta pela ativação da via de sinalização do ácido jasmônico, permitindo que essas plantas preparem defesas contra os ácaros com antecedência. Tais achado podem sugerir que há uma correlação com o presente estudo, no sentido que *Protium icicariba* produza altas quantidades de Z-β-ocimeno, como uma resposta defensiva contra uma possível recolonização dos insetos galhadores.

A presença de altas quantidades de α-amorpheno presentes nas amostras de em *Protium icicariba* com galha ativa de Psyllidae, pode indicar que a planta produz esse composto a fim de suportar o estresse fisiológico provocado pela galha, além de evitar futuras infestações em seus folíolos por esses insetos. Essas evidências são corroboradas também pelos estudos de Olayemi (2017), que demonstrou que *Teucrium marum* (família Labiatae) possui uma grande variedade de metabólitos secundários dentre eles o α-amorpheno, responsáveis por proteger as plantas de ataques de insetos, herbívoros e patógenos, e ainda de fazer com que as plantas sobrevivam a outros estresses bióticos e abióticos.

Nas amostras de *Protium icicariba* com galha inativa de Psyllidae, destacam-se os compostos neo-verbanol (18,43%) e sabineno (16,98%).

O neo-verbanol acetato ou isoverbanol faz parte do grupo dos monoterpenos. Arjmand e Dastan (2019), relataram a presença de neo-verbanol no óleo essencial de *Ferula haussknechtii* e indicam que esse composto apresenta efeitos antioxidantes e antimicrobianos. Pode-se sugerir que a alta porcentagem de neo-verbanol encontrada nos óleos essenciais de *Protium icicariba* com galha inativa de Psyllidae, funciona com uma via de defesa da planta contra futuras recolonizações.

O sabineno é um monoterpeno bicíclico e diversos estudos indicam a sua característica antioxidante, devido à capacidade de captarem radicais de oxigênio oriundos do processo fotossintético (Peñuelas e Llusià, 2002; Peñuelas e Munné-Bosch, 2005). Em um estudo realizado por Hosam (2015) com óleos essenciais de *Origanum majorana*, indicou que a ação antioxidante desses óleos é devido a presença de altos teores de sabineno. Assim, sugere-se que exista uma correlação com o presente estudo. Possivelmente, *Protium icicariba* passa a produzir esse composto a fim de evitar futuras infestações em seus folíolos realizadas pelos insetos galhadores.

Conclusão

As modificações anatômicas e fitoquímicas da planta coincidem com a presença do inseto na galha, o que sugere a interferência do inseto indutor na estrutura dos tecidos e no funcionamento das células hospedeiras. Estas observações são compatíveis com a proposição de injeção de moléculas sinalizadoras no tecido do hospedeiro, as quais poderiam modular a resposta da planta no tecido lesionado, dando início à interação com o hospedeiro a partir da oviposição pelos insetos para redirecionar o desenvolvimento planta. Entretanto, sugere-se que a presença do inseto em desenvolvimento também possua algum nível de influência sobre os tecidos do hospedeiro, considerando que os óleos essenciais produzidos em galhas inativas foram mais similares à secreção obtida em folíolos sem galha. Com isso, propõe-se que os insetos galhadores possuam papel muito importante nas modificações ou desdiferenciações celulares, bem como na função dos tecidos afetados, ao longo das diferentes etapas do seu desenvolvimento em folíolos de *Protium icicariba*.

Referências

Adams RP (2009) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry 4. ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.

Álvarez R, Encina A, Hidalgo NP (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.

Alves HDM (2001) A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, 3: 11-15.

Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Boland W., Takabayashi J (2000) Herbivoria-induzida voláteis elicit genes de defesa em folhas de feijão de lima. Natureza. 406: 512–515.

Arimura G., Ozawa R., Nishioka T., Boland W., Koch T., Kühnemann F., Takabayashi J (2002) Herbivoria-induzido voláteis induzem a emissão de etileno em plantas de feijão de lima vizinhas. Plant J. 29: 87–98. doi: 10.1046 / j.1365-313 x.2002.01198.x.

Arjmand, Zahra & Dastan, Dara. (2019) Chemical characterization and biological activity of essential oils from the aerial part and root of *Ferula haussknechtii*. Flavour and Fragrance Journal. 35. 10.1002/ffj.3544.

Anwar, F., et al. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel *(Foeniculum vulgare Mill*.) seeds from Pakistan. 24, pp.170-176.

Arduin M, Fernandes GW, Kraus JE (2005) Morfogênese das galhas induzidas por *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) em folhas de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). Brazilian Journal of Biology 65: 559–571.

Araújo WS, Fernandes GW, Santos JC (2019) An overview of inventories of gallinducing insects in Brazil: looking for patterns and identifying knowledge gaps. An Acad Bras Cienc 91: e20180162. DOI 10.1590/0001-3765201920180162.

Bassole, I.H.N, et al. (2011) "Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination." Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, vol. 18, no. 12, p. 1070+. Gale OneFile: Health and medicine.

Bakkali F, Idaomar M, Averbeck D, Averbeck S (2008) Biological effects of essential oils–a review. Food and Chemical Toxicology 46: 446–475.

Beck, John & Porter, Nathan & Cook, Daniel & Gee, Wai & Griffith, Corey & Rands, Anthony & Truong, Tai & Smith, Lincoln & Román, I. (2015) In-field Volatile Analysis Employing a Hand-held Portable GC-MS: Emission Profiles Differentiate Damaged and Undamaged Yellow *Starthistle Flower Heads*. Phytochemical Analysis. 26. 10.1002/pca.2573.

Calácio TDF (2016) Estrutura e metabolismo de galhas foliares induzidas por Hemiptera (Psyllidae) em *Pouteria ramiflora* (Mart). Radlk.(Sapotaceae).

Carneiro RGS, Castro AC, Isaias RMS. (2014) Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. South African Journal of Botany 92: 97–104. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.011

Cepemar. (2007) Plano de manejo do Parque Estadual Paulo César Vinha. Relatório Técnico COM RT.

Cibelem I, Rodney AF, Wolf MR (2016) Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. Química Nova 39(7): 795-800.

Cole ER (2008) Estudo fitoquímico do óleo essencial dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) e sua eficácia no combate ao dengue. MSc dissertation, Federal University of the Espírito Santo - Brazil, Department of Chemistry, Center of Exact Sciences.

Compson ZG, Larson KC, Zinkgraf MS, Whitham TG (2011) A genetic basis for the manipulation of sink-source relationships by the galling aphid *Pemphigus betae*. Oecologia 167:711–721. doi:10.1007/s00442-011-2033-x

Copolovici L., Kännastea A., Remmel T., Niinemets Ü (2014) Emissões de compostos orgânicos voláteis de *Alnus glutinosa* sob a interação de seca e estresse herbívoro. Environ. Exp. Robô. 100: 55–63. doi: 10.1016 / j. envexpbot.2013.12.011.

Cook LG, Gullan PJ (2008) Insect, not plant, determines gall morphology in the *Apiomorpha pharetrata* species-group (Hemiptera: Coccoidea). Australian Journal of Entomology, *47*(1): 51-57.

Costa MFB (2015) Morfologia do estigma de Ficus L. (Moraceae) e suas implicações no mutualismo figo-vespa de figo. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Dadalioglu, I. & Evrendilek, G. A. (2004) Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, pp.8255-8260.

Daly DC, Harley MM, Martínez-Habibe MC, Weeks A (2010) Burseraceae. In Flowering Plants. Eudicots Springer, Berlin, Heidelberg. 76-104

Dodueva IE, Lebedeva MA, Kuznetsova KA, Gancheva MS, Paponova SS, Lutova LL (2020) Plant tumors: a hundred years of study. Planta, 251(4): 1-28.

Dorchin N, Freidberg A, Aloni R (2002) Canadian Journal of Botany 80: 1141–1150.

Evert RF (2005) Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development. 3.ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 601.

Felipe LO, Bicas JL (2017) Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. Química Nova Escola, 39(2): 120-130.

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

Fernandes, SPC (2010) Insetos galhadores associados à família Burseraceae da reserva florestal Ducke, Manaus, Amazonoas, Brasil. Manaus: [s.n.], ix, 50f.. Dissertação (Ciências Biológicas (Entomologia)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Ferreira LC, Thomazi RD, Oliveira DA, Silva AG (2010) Estrutura populacional e padrão espacial de *Protium icicariba* (DC.) Marchand na Área de Proteção Ambiental de Setiba, Espírito Santo, sudeste do Brasil. Natureza on line, 8(1): 39-45.

Ferri MG (1996) Botânica: morfologia interna das plantas: anatomia. NBL Editora.

Fleury, G., Ferreira, B.G., Soares, G.L.G., Oliveira, D.C. & Isaias, R.M.S **(**2015) Elucidating the determination of the rosette galls induced by *Pisphondylia brasiliensis* Couri and

Maia 1992 (Cecidomyiidae) on *Guapira opposita* (Nyctaginaceae). Australian Journal of Botany 63: 608-617.

Fonseca CR, Fleck T, Fernandes GW (2006) Biotropica, 38: 514 - 521.

Formiga AT, Isaias RMS (2011) Responses of the host plant tissues to gall induction in *Aspidosperma spruceanum* Müell. Arg. (Apocynaceae). Am J Plant Sci 2:823–834. doi:10.4236/ajps.2011.26097

Gagné RJ. (2014) A catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Mem. Entomol. Soc. Wash. 25:1–544.

Gershenzon J, Dudareva N (2007) The function of terpene natural products in the natural world. Nat Chem Biol 3: 408–414.

Giron D, Huguet E, Stone GN, Body M (2015) Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling insects and leaf miners to manipulate their host plant. J Insect Physiol. doi: 10.1016 / j.jinsphys.2015.12.009

Giron D, Huguet E, Stone GN, Body M. (2016) Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. Journal of Insect Physiology, 84: 70-89.

Granot, D., David-Schwartz, R., Kelly, G., (2013a) Hexose kinases and their role in sugarsensing and plant development. Front. Plant Sci. 4, 44. https://doi.org/10.3389/fpls. 2013.00044.

Granot, D., Kelly, G., Stein, O., David-Schwartz, R., (2013b) Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. J. Exp. Bot. 65, 809–819.

Harborne, J.B. (1984) Phytochemical methods; a guide to modern techniques of plant analysis. 2 ed. London.

Chapman and Hall.Harborne JB (1993) Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press, London.

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

Henriques MGM, Siani AC, Rosas EC, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Soares ROA (2000) Óleos essenciais – Potencial antiinflamatório. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 3 (16): 38-43.

Hosam O. Elansary (2015) Chemical Diversity and Antioxidant Capacity of Essential Oils of Marjoram in Northwest Egypt, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18: 4, 917-924, DOI: 10.1080 / 0972060X.2014.958561

Hill, M. O. (1979) Twinspan – a Fortran program for arranging multivariate data in an ordered two-way table by classification of the individuals and attributes. Cornell University, Ithaca, 60 p.

Hassanali, A.; et al. (2008) Integrated pest management: the push–pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 363, n. 1491, p. 611-621.

Hogenhout SA, Bos JI (2011) Effector proteins that modulate plant-insect interactions. Curr Opin Plant Biol 14:422–428. doi:10.1016/j.pbi.2011.05.003.

Incaper (2011) Programa de assistência técnica e extensão rural PROATER – 2011- 2013, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Guarapari. Planejamento e programação de ações – 2011. Disponível em: http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Centro_cerrano/Guarapari.pdf.

Jaramillo, B. E.; Duarte, E.; Delgado, W (2012) Bioactividad 67la aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 17, n. 1, p. 54-64.

Jensen WA (1962) Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco, W. H. Köppen, FW. (1948). Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra.

México: Fondo de Cultura Econômica. 479 p.

Kang M.-S., Lee H.-S (2018) Respostas acaricidas e inseticidas de óleos e constituintes principais de *Cinnamomum cassia.* Appl. Biol. Chem. 61: 653–659. doi: 10.1007 / s13765-018-0402-4.

Krinski, Diones and Foerster, Luís Amilton (2016) Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). Ciênc. agrotec. [online]. vol.40, n.6 https://doi.org/10.1590/1413-70542016406021616.

Kokkini S, Karousou R, Vokou D (1994) Biochemical Systematics and Ecology, 22: 517-528.

Klimm FS, Weinhold A, Volf M (2020) Volatile production differs between oak leaves infested by leaf-miner *Phyllonorycter harrisella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and galler *Neuroterus quercusbaccarum* (Hymenoptera: Cynipidae). European Journal of Entomology, 117: 101-109.

Kulkarni RN, Baskaran K, Ramesh S, Kumar S (1997) Industrial Crops and Products, 6: 107-112.

Lahlou M (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 18(6): 435-448.

Lee BR; Kim KY; Jung WJ; Avice JC; Ourry A; Kim TH. (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). Journal of Experimental Botany 58(6): 1271-1279. https://doi.org/10.1093/jxb/erl280.

Lee GW, Chung MS, Kang MBY, Chung BY, Lee S (2016) Supressão direta de uma praga bacteriana do arroz (*Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*) por monoterpeno (S) - limoneno. Protoplasma. 253: 683–690. doi: 10.1007 / s00709-015-0904-4.

Loughrin JH, Manukian A., Heath RR, Turlings TC, Tumlinson JH (1994) Ciclo diurno de emissão de terpenóides voláteis induzidos por plantas de algodão danificadas por herbívoros. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 91: 11836–11840. doi: 10.1073 / pnas.91.25.11836.

Limberger, R.P. et al (2004) Óleos voláteis de espécies de *Myrcia nativas* do Rio Grande do Sul. Química Nova, v.27, n.6, p.916-919.

Maia VC (1995) Chaves para classificação de galhas de Cecidomyiidae (Diptera) em Myrtaceae na restinga da Barra de Maricá, Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Zoologia, 12(4): 1009-1013.

Maia, V.C., (1999) Artrópodes associados às galhas de Cecidomyiidae (Diptera) em *Eugenia rotundifolia* (Myrtaceae) e *Clusia lanceolata* (Clusiaceae) em uma restinga do Rio de Janeiro, Brasil. Iheringia, Série Zoologia, 87:75-79.

Maia, V.C. (2001 a) The gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) from threerest ingas of Rio de Janeiro State, Brazil. Rev. Bras. Zool. 18(2):583-629. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752001000200028.

Maia, V.C. (2004) Description of a new species of *Bruggmannia* Tavares (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Guapira opposita* (Vell.) Reitz. (Nyctaginaceae) from Brazil. Rev. Bras. Zool. 21(4):761-764. http:// dx.doi.org/10.1590/S0101-81752004000400005

Mani MS (1964) Ecology of plant galls. 1.ed. Netherlands: The Hague Dr. W. Junk Publishers, 434p.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE (2002) Plantas Medicinais. Viçosa: Editora UFV.

Maruyama PK, Nahasa L, Moura-Neto C, Santos JC (2012) Gall-inducing nematodes as ecosystem engineers for arthropods associated with its host plant in the Cerrado of Brazil. Stud. Neotrop. Fauna Envir. 47: 131–138.

Medianero E, barrios H (2001) Riqueza de insectos cecidógenos en el dosel y sotobosque de dos zonas ecológicas en Panamá. Scientia (Panamá), 16:17-42.

Mencier, B. et al. (2009) The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α- and β-pinenes): a review. International journal of Occupational Medicine and Environmental Health, v.22, n.4, p.331-342.

Mete Ö, Mergen YO (2016) The community members associated with rose gall wasp *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen, 1895) (Hymenoptera: Cynipidae) in Tokat Province of Turkey. Turkish Journal of Zoology, 40(3): 411-416.

Miresmailli S., Gries R., Gries G., Zamarc RH, Isman MB (2010) Herbivore-induzida por planta voláteis permitem a detecção de infestação de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) em plantas de tomate em estufa. Pest Manag. Sci. 66: 916–924. doi: 10.1002 / ps.1967.

Miresmailli S., Gries R., Gries G., Zamarc RH, Isman MB (2011) A densidade populacional e a duração da alimentação de larvas de looper de repolho em plantas de tomate alteram os níveis de emissões voláteis de plantas. Pest Manag. Sci. 68: 101–107. doi: 10.1002 / ps.2229.

Moura MZD, Alves TMA, Soares GLG, Isaia RMS (2009) Biochemical Systematics and Ecology, 37: 541–548.

Monteiro, R.F., ODA, R.A.M., Narahara, K.L. & Constantino, P.a.l. (2004) Galhas: Diversidade, Especificidade e Distribuição. In Pesquisa de Longa Duração na Restinga de Jurubatiba: Ecologia, História Natural e Conservação (C.F.D. Rocha, F.A. Esteves & F.R. Scarano, orgs.). RiMa Editora, São Carlos, p.127-141.

Nabity PD, Haus MJ, Berenbaum MR, DeLucia EH (2013) Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology. PNAS 110:16663–16668. doi:10.1073/pnas.1220219110.

Narahara KL, Maia VC, Monteiro RF (2004) Two new species of gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae) in Brazil. Revista Brasileira de Entomologia, 48(4): 485-490.

Nicholls JA, Melika G, Stone GN (2017) Sweet tetra-trophic interactions: multiple evolution of nectar secretion, a defensive extended phenotype in cynipid gall wasps. The American Naturalist, 189(1): 67-77.

Olayemi, R.F. (2017) The Role of Monoterpenoids and Sesquiterpenoids as defense Chemicals in Plants – a Review. Nigerian Research Journal of Chemical Sciences, Vol. 3, 1-15.

Oliveira DCD, Christiano JDCS, Soares GLG, Isaias RMDS (2006) Structural and chemical defensive reactions *of Lonchocarpus muehlbergianus Hassl*.(Fabaceae) to *Euphalerus ostreoides Crawf*.(Hemiptera: Psyllidae) galling stimuli. Brazilian Journal of Botany, 29(4): 657-667.

Oliveira DC, Drummond MM, Moreira ASFP, Soares GLG, Isaias RMDS (2009) Potencialidades morfogênicas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae): super-hospedeira de herbívoros galhadores. Revista de Biologia Neotropical, 5(1): 10.

Oliveira DC, Isaias RMS (2010) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) South African Journal of Botany, 76: 239–248.

Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S., Wilson Fernandes, G., Ferreira, B.G., Carneiro, R.G.S., Fuzaro, L. (2015) Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds, Journal of Insect Physiology doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.012.

Oke, F., et al. (2009) Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chemistry, 112, pp.874-879.

Omolo, M. O.; Okinyo, D.; Ndiege, I. O; Lwande, W.; Hassanali, A. (2004) Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. Phytochemistry, v. 65, n. 20, p. 2797-2802.

Paul A, Thapaa G, Basub A, Mazumdarb P, Kalita MC, Sahoo L. (2010) Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. – An industrially important aromatic plant. Indutrial Crops Production, 32: 366-374.

Peñuelas, J.; Llusià, J. (2002) Linking photorespiration, monoterpenes and hermotolerance in Quercus. NewPhytologist, 155: 227-238.

Peñuelas, J.; Munné-Bosch, S. (2005) Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. Trends in Plant Science, 10: 166-169.

Pickett JA, Rasmussen HB, Woodcock CM, Matthes M., Napier JÁ (2003) Sinalização de estresse de planta: Entendendo e explorando interações planta-planta. Biochem. Soc. Trans.31: 123–127. doi: 10.1042 / bst0310123.

Pontes WJT, Oliveira JCG, Câmara CAG, Lopes ACH, Gondim MGC, Oliveira JV, Barros R, Schwartz MOE (2007) Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). Acta Amazônica, 37(1): 103-110.

Price PW (2005) Basic and Applied Ecology, 6: 413-421.

Price PW, Fernandes GW, Lara ACF, Brawn J, Barrios H, Wright MG, Ribeiro SP, Rothcliff N (1998) Journal of Biogeography, 25: 581-591.

Price PW, Fernandes GW, Waring GL. (1987) Adaptive nature of insect galls. Environ. Entomol.16:15-24.

Probst, I.S. (2012) Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Avaliação de Potencial Sinérgico. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Setor de

Concentração de Biomoléculas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

Rafael JA, de Melo GAR, de Carvalho CJB (2012) Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia. Holos Editora.

Ramalho VF, Silva AG (2010) Modificações bioquímicas e estruturais induzidas nos tecidos vegetais por insetos galhadores. Natureza on line, 8(3): 117-122.

Redfern M (2011) Plant galls. The new naturalistic library. Harper Collins Publishers, Londres. 562

Redfern M, Shirley P (2002) British plant galls identification of galls on plant and fungi, Field Studies, 10: 207–531.

Rohfritsch O (1992) Patterns in gall development. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (ed) Biology of Insect Induced Galls. New York, Oxford University Press, 60-86.

Santana RC, dos Santos Rosa A, Matheus MH, Soares DC, Atella G, Guimarães AC, Pinto-da-Silva LH (2020) In vitro leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of Protium (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. Journal of Ethnopharmacology. 112981.

Santos BB, Ribeiro BA, Silva TM, Araújo W (2012) Galhas de insetos em uma área de cerrado sentido restrito na região semi-urbana de Caldas Novas (Goiás, Brasil). Revista Brasileira de Biociências, 10(4): 439.

Santos LMDL (2014) Alocação de recurso entre nutrição e defesa em galhas foliares de espécies da família Euphorbiaceae (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).

Sanver D, Hawkins BA. (2000) Galls as habitats: the inquiline communities of insect galls. Basic. App. Ecol. 1: 3-11.

Shepherd G.J. (1995) Fitopac 1. Campinas: Departamento de Botânica, Unicamp.

Shorthouse JD, Wool D. Raman A (2005) Basic and Applied Ecology, 6: 407–411.

Siani AC, Garrido IS, Monteiro SS, Carvalho ES, Ramos MFS (2004) Biochemical Systematics and Ecology, 32: 477–489.

Siani AC, Sampaio AL, Sousa MC, Henriques MG, Ramos MF (2000) Óleos Essenciais. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, 16(3): 38-43.

Stone GN, Schönrogge K (2003) Trends Ecology Evolution, 18, 512–522.

Suzuki, A.Y.M., Bedetti, C.S., & Isaias, R.M.S **(**2015) Detection and distribution of cell growth regulators and cellulose microfibrils during the development of *Lopesia* sp. galls on *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). Botany 93: 435-444.

Taha Ramadan, Ahmed Zaher, Ahmed Amro & Raoof Sultan (2020) Chemical Composition and Biological Activity of Capetula and Shoots Essential Oils of *Senecio glaucus L*., Journal of Essential Oil Bearing Plants, 23:1, 168-183, DOI: 10.1080/0972060X.2020.1742797

Tang, B., Wang, S., Wang, S.G., Wang, H.J., Zhang, J.Y., Cui, S.Y., (2018) Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene genetic architecture, biochemistry, physiological function, and potential applications. Front. Physiol. 9, 30.

Tanoh, EA, Nea, F., Kemene, TK, Genva, M., Saive, M., Tonzibo, FZ, & Fauconnier, ML (2019) Atividades antioxidantes e inibitórias da lipoxigenase de óleos essenciais de plantas endêmicas da Costa do Marfim: *Zanthoxylum mezoneurispinosum* Ake Assi e *Zanthoxylum psammophilum* Ake Assi. *Molecules (Basel, Suíça), 24* (13), 2445. https://doi.org/10.3390/molecules24132445.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017) Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Artmed Editora.

Talwar, K.K., Singh, I.P., Kalsi, P.S. (1992) A sesquiterpenoid with plant growth regulating activity from *Saussuria Iappa*. Pgytochemistry, v,31, n.1, p. 336-338.

ter Braak CJF. (1987) Ordination. In: Jongman, R.H.G.; ter Braak C.J.F.; van Tongeren O.F.R. (eds.) Data analysis in community and landscape ecology, pp. 91-173.

Togar, Başak & Türkez, Hasan & Geyikoglu, Fatime & Hacimuftuoglu, Ahmet & Tatar, Abdulgani. (2014) Antiproliferative, genotoxic and oxidant activities of cyclosativene in rat neuron and neuroblastoma cell lines. Archives of Biological Sciences. 66. 1171-1177. 10.2298/ABS1403171T.

Turkez H., Togar B., Di Stefano A., Taspınar N., Sozio P (2015) Protective effects of cyclosativene on H2O 2 -uced damage in Cultured Rat Primary Brain Cortex cells. Citotecnologia. 67: 299–309. doi: 10.1007 / s10616-013-9685-9.

Tunón, H.; Thorsell, W.; Mikiver, A.; Malander, I. (2006) Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from Artemisia 52 abrotanum and essential oil from flowers of *Dianthus caryophillum*. Fitoterapia, Milan, v. 77, n. 4, p. 257-261.

Werz O (2007) Inibição da síntese do produto 5-lipoxigenase por compostos naturais de origem vegetal. Planta Med. 73: 1331–1357. doi: 10.1055 / s-2007-990242.

Wetzel WC, Screen RM, Li I, McKenzie J, Phillips KA, Cruz M, Tran C (2016) Ecosystem engineering by a gall-forming wasp indirectly suppresses diversity and density of herbivores on oak trees. Ecology, 97(2), 427-438.

Woerdenbag, Herman J.*et al.;* Windono, Tri; Bos, Rein; Riswan, Sudarsono; Quax, Wim J. (2004) "Composição dos óleos essenciais de *Kaempferia rotunda*. Erizomas *Kaempferia angustifólia Roscoe* da Indonésia". Flavor and Fragrance Journal **19**(2): 145-148. doi : 10.1002 / ffj.1284 .

Yukawa J, Rohfritsch O. (2005) Biology and ecology of gall-inducing Cecidomyiidae (Diptera). In: Raman A, Schaefer CW, Withers TM. (Eds.), Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Aarthropods. Science Publishers Inc., Enfield, NH, 273–304.

Yukawa J, Uechi N, Tokuda M, Sato S. (2005) Radiation of gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) in Japan. Basic Appl Ecol. 6:453–46.

Viljoen A M, Subramoney S, Vuuren S F V, Baser K H C, Demirci B (2005) The composition geografical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. J Ethnopharmacol 96: 271-277.

Zaluar HLT, Scarano FR (2000) Facilitação em restingas de moitas: Um século de buscas por espécies focais. Pp. 3-23. In: F.A. Esteves & L.D. Lacerda (eds.). Ecologia de restingas e lagoas costeiras. Rio de Janeiro, NUPEM/UFRJ.

Zar JH (2019) Biostatistical analysis. Pearson Education, Incorporated.

CAPÍTULO 2

Artigo escrito nas normas da revista Journal of Chemical Ecology

PADRÃO DE USO E SUCESSÃO ONTOGENÉTICA DE INSETOS EM GALHA PRESENTE EM *Protium icicariba*

Título resumido:

Sucessão ontogenética em galha em *Protium icicariba*

GIULIANO DE MARTIN[1,2]

ANDRÉ FALCÃO MERENCIO[3]

ARY GOMES DA SILVA[4]

ANA CAROLINA SRBEK-ARAUJO[2,5,6]

[1]DR Tese Doutorado

[2]Laboratório de Ecologia e Conservação de Biodiversidade, Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, Boa Vista. CEP 29.102-920, Vila Velha, ES, Brasil.

[3]Laboratório de Citometria de Imagem, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brasil.

[4]Pesquisador do Instituto Capixaba de Pesquisas, Assistência Técnica e Extensão Rural.

[5]Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brasil.

[6]Instituto SerraDiCal de Pesquisa e Conservação, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Resumo As galhas são transformações no tecido vegetal causadas por outros organismos, recebendo o nome de entomógenas quando são atribuídas a insetos. Em *Protium icicariba* existem descritos cinco morfotipos de galhas foliolares induzidas por insetos. O presente trabalho é baseado em um morfotipo de galha entomógena já descrito em *P. icicariba* e objetiva caracterizar a relação ecológica entre dois insetos observados ocupando a mesma estrutura. A galha é do tipo tubular marginal e se origina por enrolamento adaxial ou abaxial, havendo transformação do parênquima paliçádico, com ocorrência de esclerócitos. Isso faz com que a galha se torne mais resistente à compressão ou à perfuração, protegendo o inseto de inimigos externos. Com base na análise das larvas, o inseto indutor foi identificado como Cecidomyiidae (Ordem Diptera). Durante o processo de investigação do inseto indutor, observou-se que a galha pode abrigar e nutrir uma outra espécie distinta, embora os dois insetos se sucedam sem se sobrepor temporalmente. O segundo inseto foi identificado como Eulophidae (Ordem Hymenoptera). Apesar do eulofídeo não induzir a galha, sua larva se alimenta dos tecidos internos da estrutura previamente formada por ação do cecidomiídeo, participando ativamente de sua ontogenia (mantém a galha ativa) e estabelecendo assim um processo de sucessão ontogenética da galha.

Palavras-chave Cecidomyiidae, Eulophidae, Galha, Interação inseto-planta, PEPCV, Restinga, Sucessão ontogenética.

Abstract Galls are transformations in plant tissue caused by other organisms, being called entomogens when they are attributed to insects. In *Protium icicariba*, five morphotypes of insect-induced galls have been described. This work is based on an entomogenous gall morphotype already described in *P. icicariba* and aimed to characterize the ecological relationship between two insects observed occupying the same structure. The gall is of the marginal tubular type and originates by adaxial or abaxial winding, with transformation of the

palisade parenchyma, with the occurrence of sclerocytes. This makes the gall more resistant to compression or puncture, protecting the insect from external enemies. Based on the analysis of the larvae, the inducing insect was identified as Cecidomyiidae (Order Diptera). During the investigation process of the inducing insect, it was observed that the gall can harbor and nourish another distinct species, although the two insects succeed one another without overlapping temporally. The second insect was identified as Eulophidae (Order Hymenoptera). Although the eulophid does not induce gall, its larva feeds on the internal tissues of the structure previously formed by the action of the cecidomiide, actively participating in its ontogeny (keeps the gall active) and thus establishing a process of ongenetic succession of the gall.

Keywords Cecidomyiidae, Eulophidae, Gall, Insect-plant interaction, Ontogenesis, Ontogenetic succession, Restinga.

Introdução

As galhas são estruturas neoformadas nos tecidos vegetais resultantes da hipertrofia e hiperplasia celular (Stone e Schönrogge 2003). São gerados por interações espécie-específicas entre um organismo indutor e uma planta hospedeira e podem ser de formas e tamanhos distintos, estando presentes em muitas espécies de plantas e órgãos diferentes, como ramos, flores e folhas (Niinemets 2005). O indutor manipula o metabolismo primário e secundário da planta hospedeira, promovendo alterações qualitativas e quantitativas das substâncias bioquímicas acumuladas no tecido da galha (Santos et al. 2018).

Quando os insetos são os indutores do processo, com um efeito íntimo na morfologia das galhas, o resultado é uma galha entomógena (Stone e Schönrogge 2003). Insetos galhadores encontram nas plantas um habitat no qual passam boa parte de sua vida, desde ovo até a fase adulta, obtendo proteção contra fatores climáticos, refúgio de predadores e inimigos naturais e,

com isso, superam a dificuldade em obter alimento (Boege e Marquis 2005). Neste sentido, eles são considerados parasitas especializados (Araújo e Santos 2009), monófagos e sésseis durante os estadios de desenvolvimento até a fase adulta (Shorthouse et al., 2005).

O mecanismo de formação de galhas, embora tenha sido amplamente investigado, ainda não foi totalmente esclarecido, principalmente no que se refere à grande diversidade de morfotipos de galhas, plantas hospedeiras e fauna associada às galhas (Filgueira et al. 2020). Sendo assim, o estudo da ontogenia é de grande importância para compreender melhor a relação entre os insetos galhadores, os insetos associados e o vegetal hospedeiro.

Ontogenia significa a sucessão de transformações de um mesmo indivíduo, onde cada estádio apresenta um conjunto de características próprias, sejam características morfológicas, fisiológicas, moleculares ou ainda comportamentais (Fleck e Fonseca, 2007). Tais transformações podem acontecer de forma individualizada em um organismo ou pode envolver outros organismos neste processo, envolvendo uma relação ecológica que pode ser de natureza predatória, mutualísticas ou de inquilinismo (Fleck e Fonseca, 2007). Segundo Medianero e Barrios (2001) e Medianero et al. (2017), a sucessão ontogenética pode ser observada na relação ecológica exclusiva de alguns insetos em diferentes estádios ontogenéticos de vegetais, como, por exemplo, galhas que ocorrem apenas em tecidos jovens ou em tecidos maduros da planta. Isso pode estar relacionado ao fato de muitas variáveis mudarem durante a ontogenia da planta e produzirem diferentes respostas diretas e indiretas frente à presença dos insetos galhadores (Fonseca e Benson, 2003). Assim, a ontogenia da galha é um processo complexo associado a um grande conjunto de covariáveis, que podem se suceder numa mesma espécie hospedeira em diferentes estádios do seu desenvolvimento (Cuevas-Reyes et al., 2004). A sucessão ontogenética segue um padrão não sazonal, direcional e contínuo de modificações histológicas que é desencadeado por um outro organismo (Fonseca e Benson, 2003). Vários estudos demostraram que a abundância e a diversidade de insetos associados a galhas variam ao longo dos estádios de desenvolvimento do hospedeiro (Altamirano et al., 2016; Boege, 2005; Marquis

et al., 2019; Medianero et al., 2017; Zevereva et al., 2020), sugerindo a ocorrência de padrões de sucessão ontogenética em larga escala (Fonseca e Benson, 2003). Padrões sucessionais são muito importantes para entender a diversidade biológica, promovendo um incremento na riqueza de espécies, principalmente porque possibilitam que os mesmos nichos sejam ocupados por diferentes espécies no tempo (Begon et al., 2006).

Pode-se esperar que insetos exibam uma grande variedade de respostas às mudanças ontogenéticas dos hospedeiros. Os insetos parasitas diferem em sua forma de obtenção de energia e nutrientes e podem exibir preferências por parasitar estádios ontogenéticos diferentes em produtividade e nutrição, enquanto outros insetos que mastigam e se alimentam de seiva diferem fortemente em hábitos alimentares e podem exibir preferências por estádios do hospedeiro que diferem na disponibilidade relativa de diferentes tecidos vegetais (Ochoa-Lopez et al., 2015). Além disso, os limites fisiológicos dos insetos em termos de temperatura corporal e estresse hídrico podem determinar sua ocorrência ao longo da ontogenia do vegetal (Schowalter, 2000).

Embora as galhas correspondam à interação entre o hospedeiro vegetal e o inseto galhador, há relatos da presença de insetos inquilinos no interior das estruturas, os quais incluem representantes das ordens Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Lepidoptera e Thysanoptera (Fernandes e Negreiros, 2006), além da possível ocorrência de um terceiro nível trófico em galhas (Merencio et al., 2015). Este estaria representado por uma larva de Hymenoptera da família Eulophiidae, descrita como pertencente à fauna acompanhante em processos de formação de galha, em tese, induzida incialmente por um cecidomiídeo, e que passaria a se alimentar da larva em desenvolvimento (Merencio et al., 2015). Entretanto, existe um questionamento sobre a incidência da vespa citada por Merencio et al. (2015), uma vez que não se sabe se a vespa seria capaz de induzir o folíolo ao ponto de ser um inseto galhador ou se teria a capacidade de ovopositar na galha já iniciada pelo cecidomiídeo, dando início ao processo parasitário.

O presente trabalho teve como objetivo ampliar a investigação sobre o morfotipo de galha tubular marginal em *P. icicariba* e caracterizar o padrão de uso e a relação ecológica entre táxons de insetos observados ocupando a mesma estrutura.

Materiais e Métodos

Área de estudo

As coletas de material botânico foram realizadas na Área de Proteção Ambiental de Setiba (APA Setiba) e no Parque Estadual Paulo Cesar Vinha (PEPCV), localizados no município de Guarapari (Espírito Santo). Estes constituem um único remanescente de vegetação nativa (UTM SAD69: 352397 E / 77233856 N) interceptado pela Rodovia ES-060, conhecida como Rodovia do Sol (Fig. 1). Dentre as comunidades vegetais presentes na região, foi selecionada a área de formação vegetal arbustiva aberta não inundável de Restinga. É característica desse ecossistema a presença de areia branca exposta, solo arenoso com lençol freático afastado da superfície e sedimentos formados por Depósitos Flúvio-Marinhos Holocênicos, resultantes da ação de processos fluviais e marinhos (Cepemar, 2007).

A vegetação está distribuída em moitas de diferentes tamanhos e formas, com até oito metros de altura, intercaladas por espaços onde a cobertura vegetal é esparsa (Zaluar e Scarano, 2000). O clima nessa região, segundo a classificação de Köppen (1948), é do tipo AW - quente e úmido, com temperatura média anual de 25º C e precipitação média de 1.800 mm/ano (Incaper, 2011).

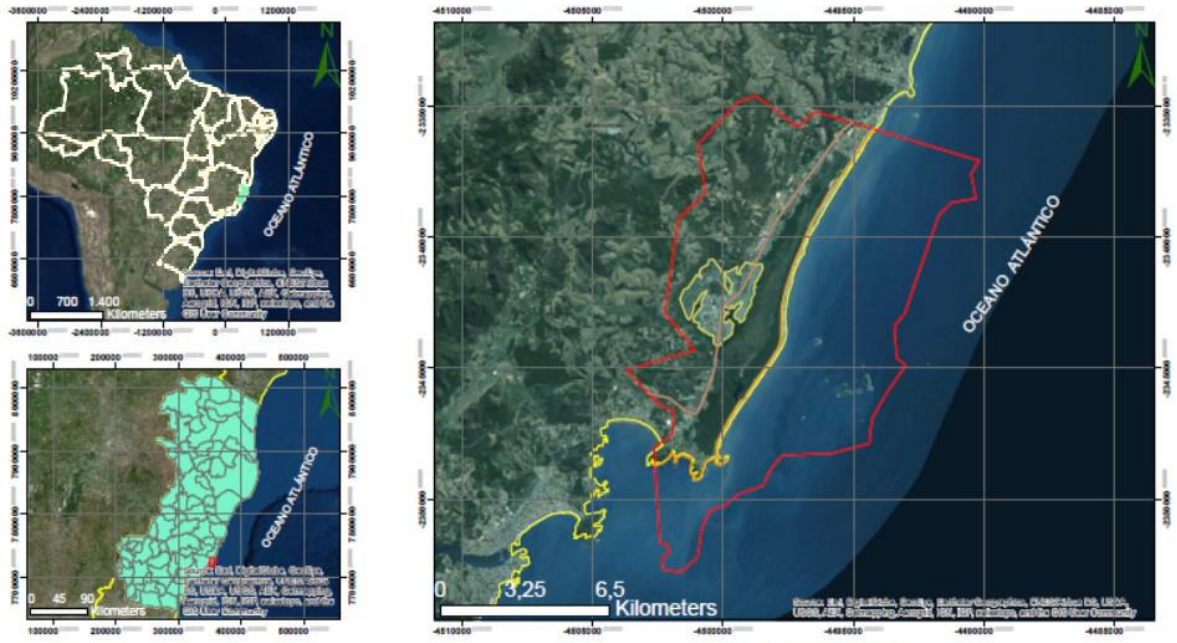

Fig. 1 Área Proteção Ambiental de Setiba (polígono vermelho) e Parque Estadual Paulo Cesar Vinha (polígono marrom), localizados no município de Guarapari (Espírito Santo, sudeste do Brasil), com indicação do local onde as amostras foram coletadas (polígono amarelo interno às áreas protegidas).

A espécie vegetal estudada

A família Burseraceae está presente em toda a região Pantropical, com 20 gêneros e mais de 500 espécies ocorrentes no mundo. No Brasil existem aproximadamente sete gêneros (Daly et al., 2010). Seus representantes apresentam exsudação de oleorresina seca constituída por substâncias voláteis conhecidas como óleos essenciais, de forte aroma, amplamente utilizados na indústria cosmética e farmacêutica devido às suas propriedades químicas (Dali et al., 2010), incluindo ação como anti-inflamatório (Klimm et al., 2020). Nessa família, os óleos essenciais estão presentes em várias partes da planta, entre elas o folíolo, a flor, o fruto e a semente, além da resina seca (Bakkali et al., 2008; Oliveira et al., 2006; Siani et al., 2000). O gênero de Burseraceae mais bem representado no Brasil é *Protium* Burm. f., que possui aproximadamente 68 espécies (Santana et al., 2020), e é nomeado popularmente como "pau-de-breu", cuja oleorresina é conhecida como "elemi" (Pontes et al., 2007). Ao ferir alguma

parte da planta, como caule, ramos, folhas e frutos, há exsudação de uma oleorresina que seca rapidamente formando blocos esbranquiçados. Essa secreção é originada em ductos ou cavidades secretoras esquizógenos ou esquizolisígenos (Pontes et al., 2007). Devido à presença deste exsudato resinoso aromático, a família ganha grande destaque na etnobotânica (Siani et al., 2004).

Protium icicariba (DC) Marchand, conhecido popularmente como almécega ou almesca, está presente desde o norte da Amazônia até a Argentina (Ferreira et al., 2010). É uma espécie de porte arbustivo a arbóreo, atingindo alturas médias de 2,5m, podendo variar de 8 a 14m, com folhas compostas de 5-7 folíolos, com peciólulos muito curtos e oblongo-lanceolados. O fruto, de forte aroma e com mais de 10% em açúcar, é uma cápsula de pericarpo avermelhado. Quando maduro, abre expondo uma semente com sarcotesta branca comestível. Esta semente produz 25% de óleo que pode ser consumido substituindo o azeite. A espécie apresenta ductos ou canais secretores de oleorresina no caule, ramos, folíolos, flores e frutos (Ferreira et al., 2010; Siani et al., 2004).

Coleta de material

A coleta de material foi realizada entre os meses de dezembro de 2017 e junho de 2018, a cada duas semanas, totalizando 14 dias de coleta, com duração entre 3 e 6 horas de amostragem em cada ocasião. Foram coletadas manualmente aproximadamente 600 amostras de ramos com folíolos de *P. icicariba* em diferentes fases de desenvolvimento com galha, considerando todos os ramos disponíveis em cada indivíduo de acordo com a disponibilidade no dia de coleta, estando ou não no mesmo arbusto. As galhas foram classificadas quanto à maturação do folíolo, de acordo com sua coloração, sendo vinosa em diferentes graus de intensidade para classificar os juvenis ou com coloração verde clara para classificar os adultos e, em ambos os casos, sem expressivos sinais de esclerificação.

Ainda em campo, os folíolos coletados foram separados em potes de vidro por grupos com galhas e sem galhas. As amostras de folíolos foram mergulhadas em solução de FAA 50 (formol, ácido acético e álcool; Jensen, 1962) para preservação e fixação dos detalhes mais delicados, assim como manter o protoplasma sem distorções para realização das análises morfológicas. As amostras foram transportadas refrigeradas em caixa térmica com gelo por quarenta minutos até o Laboratório de Ecologia Funcional da Universidade Vila Velha. Uma outra parte das folhas com galhas foi guardada fresca para posterior análise em laboratório.

Identificação do inseto galhador

As galhas foram separadas entre juvenis ou adultas, contabilizando o número de galhas em cada folíolo, bem como a ocorrência ou não do inseto galhador. Para isso, as galhas foram isoladas dos folíolos de origem, tendo sido obtidas 2000 unidades, considerando que cada ramo apresentou 40 galhas. Em seguida, as galhas foram dissecadas para obtenção dos diferentes estádios de desenvolvimento do inseto galhador, sendo cortadas manualmente no sentido longitudinal da folha de modo a evitar eventuais danos ao inseto presente na estrutura (Merencio et al., 2015). Este procedimento foi realizado ao Microscópio Estereoscópio Euromex – Holland Nexius Zoom Range. Quando encontrado o inseto galhador, as amostras contendo a galha e o inseto galhador foram imersas em etanol 70% e acondicionadas em tubos plásticos tipo Eppendorf. Para a obtenção do adulto, ramos contendo galhas em estágio adiantado de desenvolvimento foram acondicionados em um porte com tela de malha inframilimétrica para acompanhamento da eclosão. Os espécimes obtidos foram fotografados em microscópio estereoscópico. Os insetos encontrados nas galhas analisadas foram identificados de acordo com literatura especializada desde o primeiro instar encontrado até a fase adulta (Rafael et al., 2012; Santos et al., 2012; Maia, 1995).

Caracterização morfológica

As galhas foram caracterizadas morfologicamente considerando aspectos macro e microscópicos (análises histológicas). Macroscopicamente as galhas foram avaliadas quanto à forma, coloração, localização nos folíolos, número de câmaras internas e indumento (Maia et al., 2002). A avaliação histológica foi realizada a partir de folíolos sem galha e com galhas em diferentes estádios de desenvolvimento considerando o material fixado por imersão em FAA 50 (Jensen, 1962).

O detalhamento da organização estrutural das galhas foi feito com base em fragmentos foliolares compostos de galhas e lâmina foliolar adjacente a elas, em metades definidas longitudinal e transversalmente ao maior eixo de comprimento das galhas. As amostras foram desidratadas em série etanólica, em concentrações graduais e crescentes (50%, 60%, 70%, 90% e 3 vezes 100%) a cada 24 horas, e mantidas em câmara de vácuo. Em seguida, foi realizada a infiltração do material em um gradiente crescente de concentração de historrresina (25%, 50%, 75% e 100%), diluída em etanol 95%, e mantida em câmara de vácuo por um período de 24 horas para cada concentração de infiltração. Após este período, o material foi submetido ao processo de emblocamento em solução endurecedora exposta a luz florescente por um período de até 72 horas até consolidação (Jensen, 1962).

O material foi então seccionado ao micrótomo rotativo, sendo obtidas secções transversais e longitudinais dos tecidos da galha e do corpo da larva. Devido ao material ser de difícil infiltração, as secções foram coradas com safranina 0,5% por 10 segundos e em seguidas lavadas com água deionizada e coradas com azul de toluidina 0,5% em solução aquosa em tampão fosfato com pH 6,80 por até 20 segundos e também lavadas com água deionizada para retirar o excesso de corante. Após coradas e secas, as lâminas foram montadas com uma fina camada de Entelan® (Merck) para fixar a lamínula. Os procedimentos realizados seguiram Jensen (1962). A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico de campo claro (Euromex iScope) e as imagens foram obtidas por meio de câmera de celular, Samsung Galaxy S7 Edge, acoplada ao microscópio.

Resultados

Identificação do inseto galhador e descrição macroscópica da galha

A galha estuada em *P. icicariba* foi atribuída à família Cecidomyiidae (Diptera), tendo sido identificada posteriormente a presença de outra larva distinta, identificada como Eulophidae (Hymenoptera).

A galha analisada apresentava formato cilíndrico e alongado com afinamento acentuado nas extremidades, indicando o enrolamento da borda foliolar para criação da câmara larval, resultando no formato tubular típico deste morfotipo de galha (tubular marginal).

Padrões morfológicos de ocorrência da galha

A galha tubular marginal estudada pode ocorrer tanto com enrolamento da lâmina foliar em direção à face adaxial quanto da face abaxial das margens foliolares (Fig. 1.C e 1.F), sendo observada em folíolos juvenis vinosos (Fig. 1.C e 1.F), com tecidos ainda com características meristemáticas, e em folíolos adultos (Fig. 2.D e 2.K). Em seu processo de amadurecimento, este morfotipo de galha sofre o endurecimento da parede externa da estrutura, que é um processo próprio do desenvolvimento da galha. O cecidomiídeo adulto sai da galha pela lateral estrutura, o que é possível devido ao seu tamanho corporal reduzido, enquanto o eulofídeo adulto, em função do seu maior tamanho corporal, abre um orifício na região mediana da galha com o auxílio do seu aparelho bucal mastigador (Fig. 1.l).

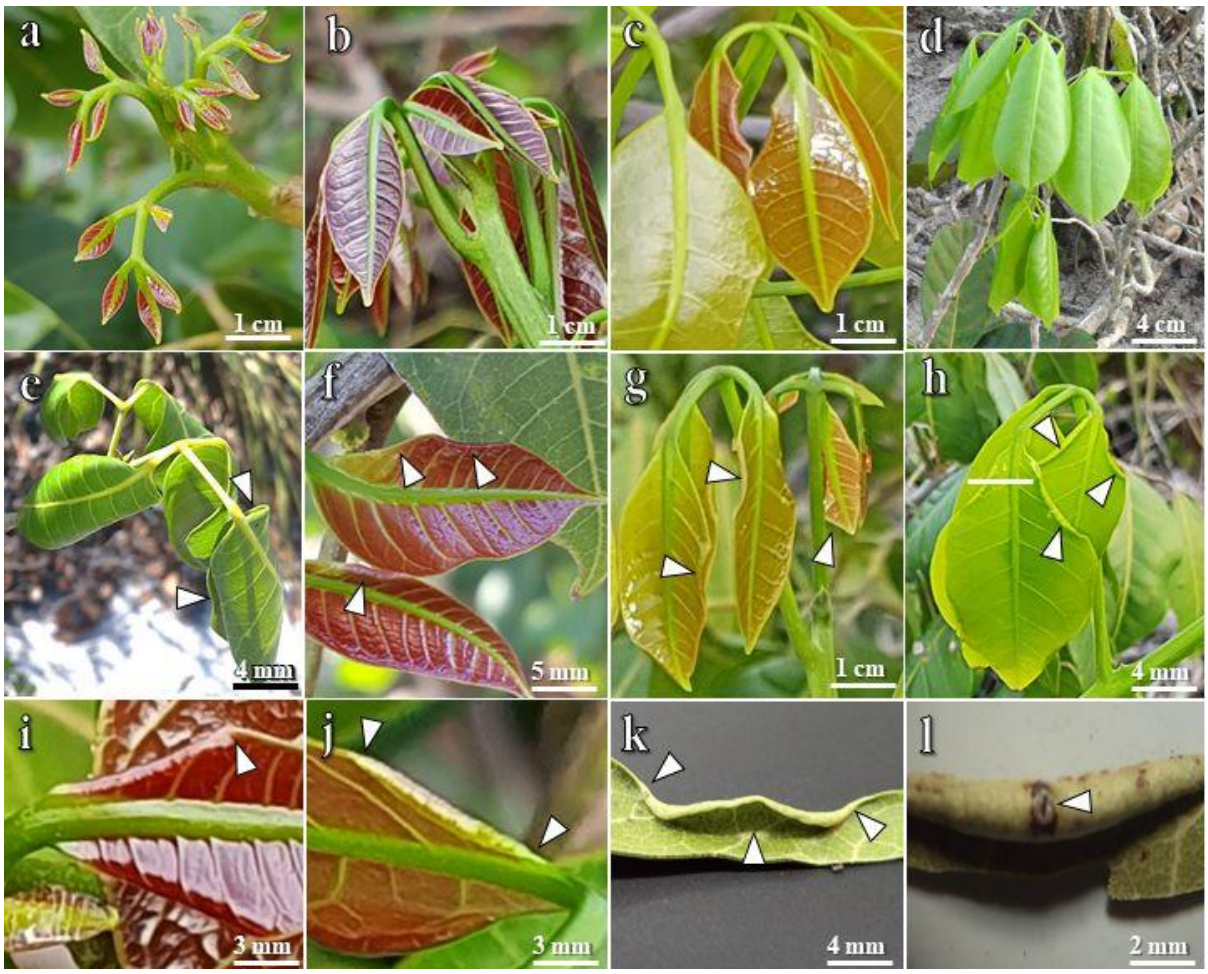

Fig. 1 Folíolos de *Protium icicariba* (DC.) Marchand. a: folíolos recém abertos; b: folíolo juvenil predominantemente vinoso; c: folíolo juvenil predominantemente clorofilado; d: folíolos adultos pouco esclerificados verde claro; e: folíolos maduros discolores verde mais escuro, com a indicação de folíolo portando galha (seta); f: folíolos juvenis vinosos com galhas de enrolamento adaxial (setas); g: folíolos juvenis verdes com galhas de enrolamento adaxial (setas); h: folíolos adultos verdes com galhas de enrolamento adaxial (setas); i: folíolos juvenis vinosos com galhas de enrolamento adaxial (setas); j: folíolos juvenis verdes com galhas de enrolamento abaxial (setas); k: folíolos maduros verdes com galhas de enrolamento abaxial (setas); l: galha de enrolamento adaxial evidenciando o orifício lateral mediano de eclosão da vespa adulta ,(seta) o cecidomiídeo sai pelas bordas do enrolamento da galha.

Estruturação anatômica

Do ponto de vista anatômico, os folíolos juvenis de *P. icicariba* não apresentam a diferenciação de parênquimas no mesófilo, enquanto os folíolos adultos apresentam o mesófilo bilateral típico com a diferenciação de parênquima paliçádico e lacunoso. Ocorreram diferenças bem marcadas nos folíolos parasitados entre o início do desenvolvimento da galha em folíolos juvenis e seu desenvolvimento completo em folíolos adultos, conforme descrito em detalhes a seguir.

A indução da galha se inicia quando o mesófilo do folíolo ainda apresenta características celulares meristemáticas (Fig. 2.A a 2.D). Com a ontogênese da galha, o parênquima paliçádico original foi substituído por uma faixa de três a quatro camadas de células esclerenquimatosas próximas à epiderme externa da parede da galha (Fig. 2.A e 2.B). Em sequência, uma faixa de duas a três camadas de células de parênquima fundamental foi formada (Fig. 2.C e 2.D), entremeada de cavidades secretoras de oleorresina envolvidas por uma bainha esclerenquimática. Como resultado, foi observada perda da diferenciação de parênquima paliçádico e lacunoso do mesófilo dorsiventral típico de *P. icicariba* (Fig. 2.H). A indução da galha promoveu a desdiferenciação deste tecido em um parênquima fundamental, seguida de uma reordenação do suprimento vascular (Fig. 2.D e 2.E). Ao mesmo tempo, houve intensa esclerificação dos tecidos, o que se apresentou como um evento marcante na galha estudada (Fig. 2.H). A epiderme interna, que está em contato com a câmara larval, apresenta alternância de trechos com estratos cuticulares bem mais espessos que outros (Fig. 2.E a 2.H). Assim, o mesófilo na parede da galha apresenta duas zonas bem distintas. A zona externa, que compreende a epiderme adaxial e a faixa de células esclerenquimatosas, conferindo dureza e resistência à parede da galha (Fig. 2.I a 2.K); e a zona interna, preenchida principalmente por parênquima fundamental, que, juntamente com a epiderme interna, delimita a câmara larval (Fig. 2.F a 2.J). Desta maneira, se estrutura um amplo simplasto, uma vez que há pontuações simples entre as células esclerenquimáticas. Este fato, associado à existência de idioblastos

amilíferos, indica que a zona interna se apresenta como um tecido disponível à alimentação das larvas do indutor em desenvolvimento.

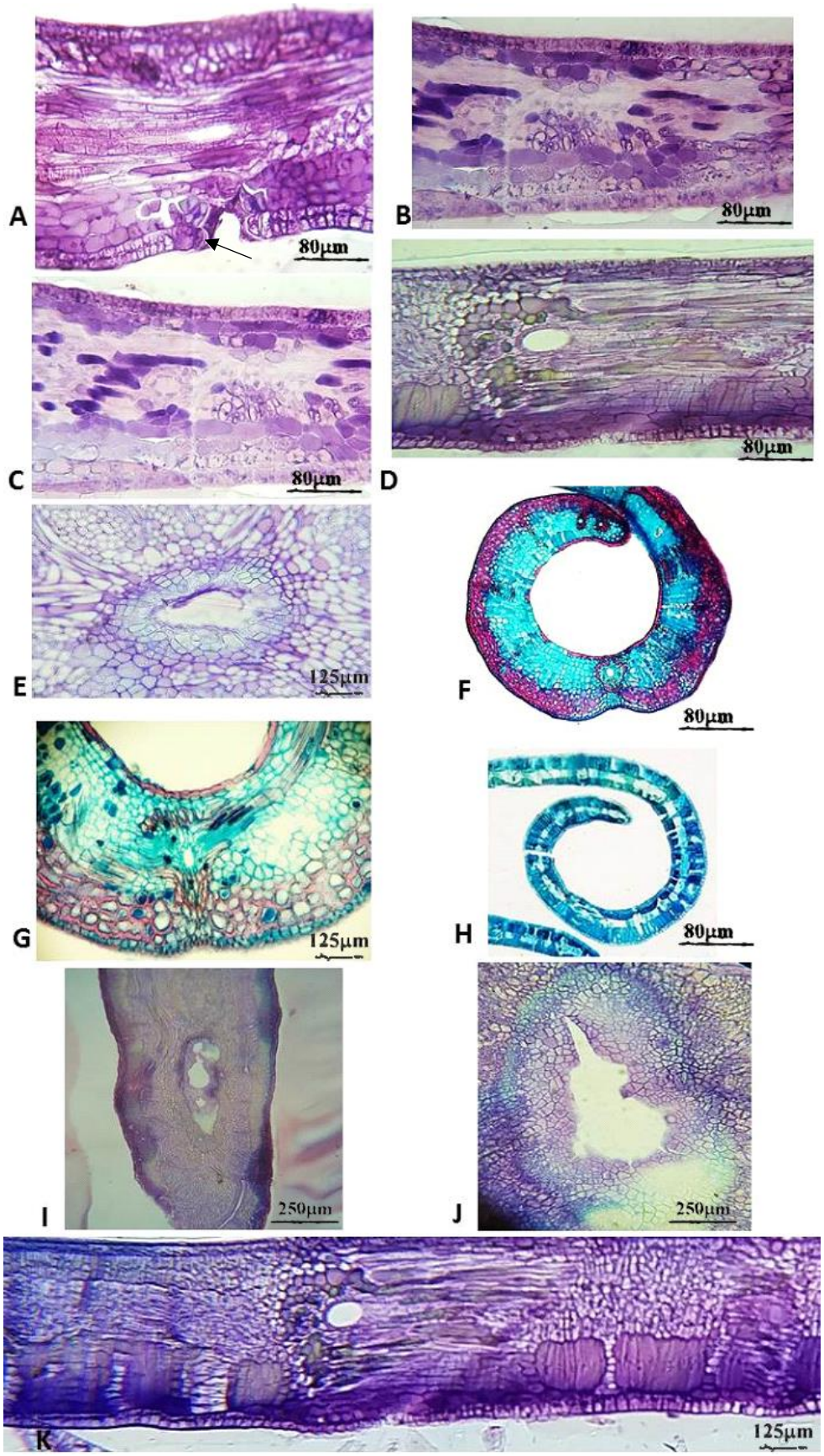

Fig. 2 Desenvolvimento e estruturação anatômica (seção transversal e longitudinal) de galha tubular marginal em folíolos de *Protium icicariba* (DC.) Marchand. a: ovo entre a epiderme e

o parênquima paliçádico; b: desdiferenciação das células do parênquima paliçádico e lacunoso; c: continuação da desdiferenciação dos tecidos do parênquima paliçádico e lacunoso; d: início da formação da cavidade secretora de oleorresina; e: detalhe da cavidade secretora de oleorresina; f: detalhe da intensa esclerificação na parede externa imediatamente abaixo da epiderme externa; g: esclerificação da parte interna da câmara larval; h: detalhe do mesófilo sem definição do padrão bilateral típico da espécie vegetal com células meristemáticas na face adaxial e abaxial, assumindo um aspecto aparentemente isobilateral; i; câmara larval no início do desenvolvimento da galha; j: detalhe da câmara larval em desenvolvimento; k: detalhe evidenciando a desdiferenciação dos tecidos parênquima paliçádico e lacunoso do mesófilo dorsiventral.

Desenvolvimento dos insetos

Ao todo foram coletadas e analisadas 1930 galhas originárias de folíolos juveis vinosos (8,3%), folíolos juveis clorofilados (26,0%) e folíolos adultos (65,7%), das quais a grande maioria (83,4%) encontrava-se vazia (Tabela 1). Conforme citado anteriormente, foram observadas duas espécies de insetos associadas à galha tubular marginal nos folíolos de *P. icicariba*, tendo sido encontradas formas larvais e pupas de um Cecidomyiidae (Fig. 3.A a 3.E) e desde ovos até o inseto adulto de um Eulophidae (Fig. 3.F a 3.N). Ao todo foram registradas 321 galhas com insetos, sendo que Cecidomyiidae foi registrado em 72 galhas (22,4%) e o Eulophidae em 249 estruturas (77,6%).

Nas galhas em folíolos imaturos foram encontrados dois estádios larvais e a pupa de Cecidomyiidae, além do adulto (Fig. 3. A a 3. E; Tabela 1). O primeiro instar apresenta coloração amarela (Fig. 3. A e 3. B); e o segundo instar apresenta uma segmentação mais marcada, com coloração branca (Fig. 3.C e 3. D). A pupa apresenta mudança de coloração na região do corpo, que se torna rosado, com a formação de exoesqueleto que dará origem ao cefalotórax e ao par de asas (Fig. 3. E).

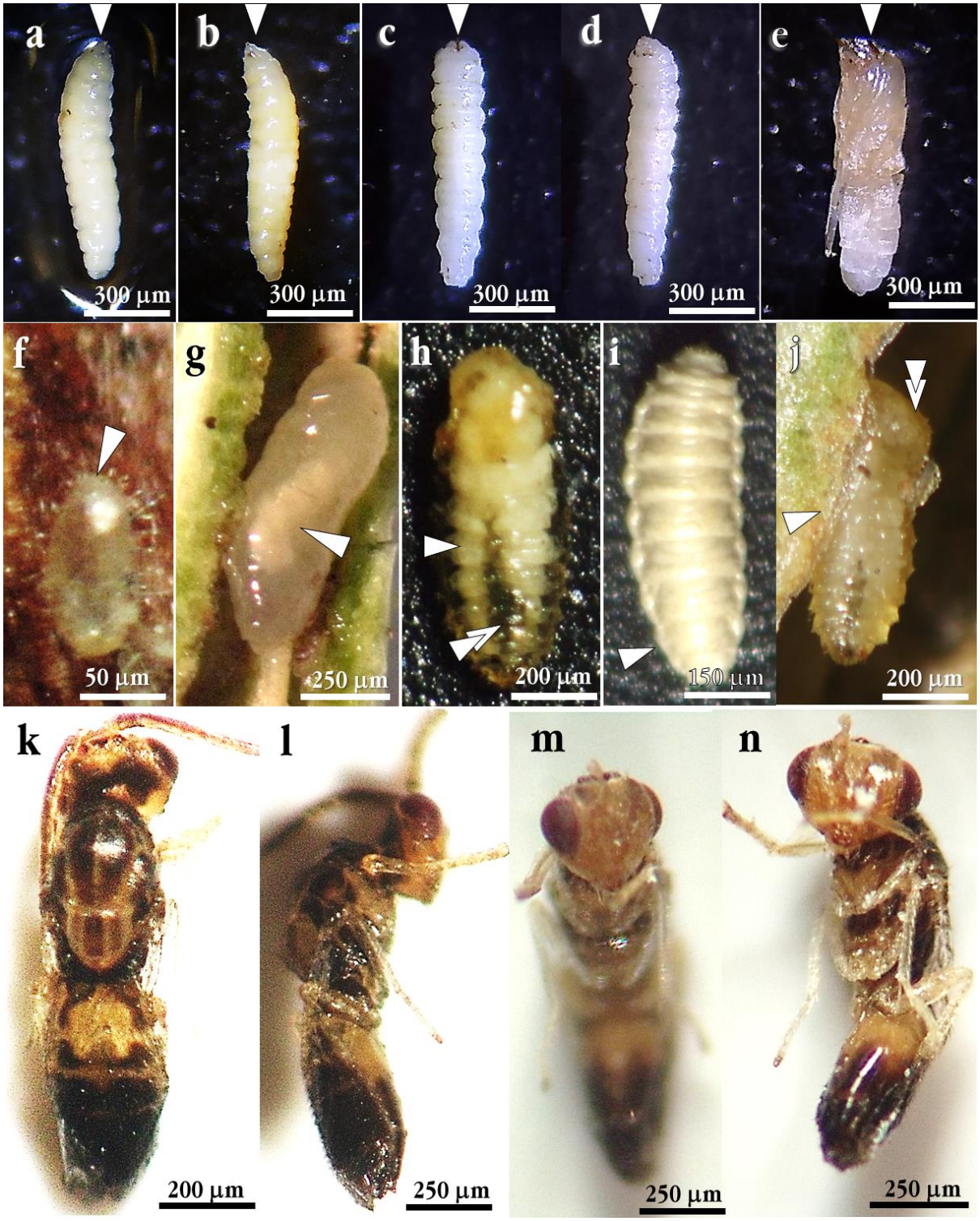

Fig. 3 Estádios de desenvolvimento de insetos encontrados no interior da galha tubular marginal em folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand. Cecidomyiidae - a: instar mais juvenil em vista ventral com formato fusiforme evidenciando o aparelho bucal (seta), e é ápoda, geralmente pouco esclerosada; b: instar mais juvenil em vista lateral com formato fusiforme e

segmentação aparente evidenciando o aparelho bucal (seta) e; c: instar mais juvenil em vista ventral com formato cilíndrico e segmentação mais evidente, além do aparelho bucal (seta); d: instar mais juvenil em vista lateral com formato cilíndrico evidenciando o aparelho bucal (seta); e: pupa. Eulophidae - f: 1º instar evidenciando o aparelho bucal (seta); g: 2º instar em vista lateral evidenciando o tubo digestório (seta); h: 2º instar em vista ventral evidenciando a segmentação mais marcada (seta) e o tubo digestório (dupla seta); i: larva em vista ventral; j: larva se alimentando do tecido nutritivo interno da câmara larval; k: adulto em vista dorsal; l: adulto em vista lateral; m: adulto em vista ventral com destaque para a cabeça; n: adulto em vista ventral com destaque para o corpo do inseto. O Eulophidae foi encontrado nas galhas de folíolos maduros que se apresentavam conspicuamente esclerificadas, tendo sido registrados quatro estádios larvais, a pupa e o adulto (Fig. 3. F a 3 N; Tabela 1). O primeiro estágio de desenvolvimento encontrado possui formato ovalado e tem coloração esbranquiçada e transparente (Fig. 3. F). O segundo estágio de desenvolvimento já apresenta tubo digestório evidente (Fig. 3. G). O terceiro estágio de desenvolvimento apresenta alguma segmentação no corpo, geralmente 12 segmentos muito bem definidos, e já é possível encontrar o tubo digestivo totalmente formado (evidente na cor escura), possuindo coloração corporal amarelada transparente (Fig. 3.H). O quarto estágio larval encontrado já possui segmentos completamente formados, mas ainda apresenta formato larval sem diferenciação de pernas; e nesta fase a transparência tegumentar já não existe mais, apresentando coloração inteiramente branca, não sendo mais possível a visualização do tubo digestivo (Fig. 3. I). O quinto estágio de desenvolvimento é a pupa, quando começa a evidenciar a divisão do corpo em abdômen, tórax e cabeça, sendo nesse estágio que os apêndices começam a se desenvolver, observando-se as estruturas que originarão as asas (Fig. 3. J). O inseto adulto é um himenóptero, possuindo formato vespiforme, com coloração do corpo em tons de marrom e olhos vermelhos (Fig. 3. K a 3. N). O mesonoto e o metanoto possuem coloração marrom escuro com três linhas marrons claras paralelas entre si (Fig. 3k e 3 L). O abdômen possui coloração marrom nos últimos

segmentos e nos segmentos mais próximos ao tórax a coloração é marrom claro (Fig. 3.K e 3.L).

Tablea 1. Ocorrência dos insetos associados à galha tubular marginal dos folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand de acordo com o estágio de maturação das estruturas foliolares.

Folíolo	Galhas (N)	Cecidomyidae (N)	Eulophidae (N)	Vazias (N)
Juvenil vinoso	160 (8,3%)	37 (23,1%)	0	123 (76,9%)
Juvenil clorofilado	502 (26,0%)	35 (7,0%)	0	467 (93,0%)
Maduro	1268 (65,7%)	0	249 (19,6%)	1019 (80,4%)
Total	**1930**	**72 (3,7%)**	**249 (12,9%)**	**1609 (89,1%)**

Discussão

Várias características da interação entre insetos galhadores e suas plantas hospedeiras são importantes para uma melhor compreensão dos processos que estruturam as comunidades naturais. Por exemplo, alguns insteos indutores de galhas possuem alta especificidade em relação à planta hospedeira e o local para oviposição (Carneiro et al., 2009; Joy e Crespi, 2007). Eles sincronizam o período de oviposição com o período fenológico da planta, onde há crescimento e os tecidos ainda não são lignificados (Whithman, 1978; Yukawa, 2000). Logo após a oviposição, larvas eclodidas de insetos galhadores induzem rápidas mudanças morfológicas e fisiológicas no tecido da planta hospedeira, drenando recursos para seu próprio desenvolvimento (Hoglund, 2014; Ollerstman et al., 2013). No presente estudo, os insetos associados à galha tubular marginal formada em folíolos de *Protium icicariba* foram descritos ao longo de todo o seu desenvolvimento, desde a oviposição, estádios larvais iniciais até a fase adulta, incluindo também o registro das modificações teciduais que ocorreram no tecido foliolar

galhado. Com isso, foi possível caracterizar as desdiferenciações foliares associadas ao desenvolvimento dos insetos e determinar o padrão de uso da galha por seus ocupantes.

As galhas que ocorrem em plantas sustentam comunidades diversas e complexas de parasitóides e inquilinos que fornecem sistemas complexos para explorar questões evolutivas, ecológicas e de conservação. Entretanto essas relações ainda não são totalmente esclarecidas (Ramos et al., 2019). Além disso, os fatores ambientais atuam como impulsionadores da coexistência ou competição das espécies. Estudos recentes têm mostrado que a competição interspecífica é um fenômeno importante e capaz de moldar a estrutura da comunidade de organismos sedentários, como os insetos indutores de galhas (Cornelissem et al., 2013; Fagundes et. al., 2018). No presente estudo, foram registrados dois padrões de coexistência de insetos à galha estudada, os quais estão relacionados a diferentes estádios de maturação do folíolo. Apesar das evidências até o momento não apontarem para a sobreposição temporal de ocupação da galha entre o cecidomiídeo e o eulofídeo, a estrutura da galha estudada é consequência de modificações nos tecidos do mesófilo foliolar induzidas em folíolos jovens pelo Cecidomyiidae, que é o iniciador da galha, sendo posteriormente ocupada pelo Eulophidae. De acordo com López – Núñez et al. (2019), essa assincronia entre os cilcos de vida de cada guilda poderia ser explicada pela disponibilidade sequencial de recursos para galhas e parasitóides e pelas restrições fisiológicas entre galhas e inquilinos. Essas informações básicas são vitais para revelar um componente oculto da biodiversidade e esclarecer sua estrutura.

Ainda nos estudos feitos por López-Nuñes (2019), observaram diversas desdiferenciações nos tecidos de outros morfotipos de galhas formando por ceccidomyiidae. No presente estudo, sugere-se que a caracterização da anatomia da galha tubular marginal foi importante para elucidar a forma da reorganização tecidual direcionada pelo inseto indutor. Neste sentido, ressalta-se a perda da diferenciação de parênquimas paliçádico e lacunoso do mesófilo dorsiventral típico de *P. icicariba*, promovendo a desdiferenciação deste tecido em um parênquima fundamental, seguida de uma reordenação do suprimento vascular. Ao mesmo

tempo, houve intensa esclerificação dos tecidos, o que se apresentou como um evento marcante na galha estudada. Entretanto, o epitélio que delimita a câmara larval apresentou zonas onde a cutinização é mais fina ou inexistente e tal característica indica que a captação de alimento dos insetos em seu interior, ocorre a partir da formação de um simplasto. Além disto, o tecido meristemático voltado para o interior da galha delimitando a câmara larval, pode ser considerado nutritivo, havendo também pontuações presentes nas células de paredes lignificadas. Estas estruturas adicionam uma via complementar de transferência de água e substâncias hidrossolúveis à câmara larval (Evert, 2005). De fato, é relativamente comum encontrar um tecido nutritivo no interior de galhas, revestindo a câmara larval (Stone e Schönrogge 2003). As células deste tecido geralmente apresentam citoplasma denso e acúmulo de substâncias nutritivas (Bronner 1992). Todavia, em algumas galhas não há formação de tecido nutritivo e os indutores se alimentam de fotoassimilados ou, no caso, de algumas galhas que não desenvolvem o tecido nutritivo, pode haver o envolvimento de hifas de fungos que funcionam como material trófico (Bissett e Borkent, 1988).

Em relação a parasitóides e inqulinos, inúmeras famílias coexistiram nas mesmas espécies de galhas, algumas das quais co-ocorreram simultaneamente. Mas, enquanto os parasitóides pertencem a poucas famílias com vários representantes, os inquilinos eram geralmente espalhados por muitas famílias, dentro de diferentes ordens. Isso reflete, por um lado, as morfologias complexas de algumas galhas, como exemplo *Plagiotrocus quercusilicis* que apresenta diferentes morfotipos, fornecendo diversos nichos para vários inquilinos. Na verdade, embora todos os inquilinos estivessem incluídos na mesma categoria, deve-se reconhecer que sua ecologia e traços da história de vida podem ser bastante diversos (Sanver e Hawkins 2000). Além disso, os parasitóides são provavelmente mais especializados, devido aos requisitos fisiológicos desta interação íntima, enquanto a relação entre galhas e inquilinos é menos restrita e, portanto, mais generalizado (Paniagua et al. 2009).

Historicamente, a competição interespecífica é considerada uma das principais forças responsáveis por moldar a distribuição das espécies no espaço e no tempo (Diamond 1973). Entre as interações ecológicas, o inquilinismo é uma associação interespecífica na qual um organismo utiliza outro como abrigo ou suporte, sem que haja prejuízos de nenhuma natureza para seu desenvolvimento ou o comprometimento de sua integridade física. O inquilinismo é usualmente observado em interações ecológicas envolvendo galhas (Ronquist e Lijeblad, 2001). Entretanto, insetos inquilinos não podem induzir o desenvolvimento de galhas ou influenciar seu desenvolvimento por meio de qualquer modificação do tecido galhado (Sanver e Hawkins, 2000). Entretanto, os dados do presente estudo mostraram que em um dos estádios da larva de eulofídeo, o inseto consumiu o tecido da galha (Figura 3J), relação essa que não pode ser explicada como um caso de inquilinismo.

Nos insetos estudados, foi possível observar a ocorrência de diferentes estádios no desenvolvimento da estrutura, estando os cecidomyiídeos associados a galhas em folíolos jovens, com coloração vinosa e clorofiladas, enquanto os eulofídeos foram encontrados em galhas de folíolos maduros. Alguns estudos relatam que os resultados de interações interespecíficas envolvendo insetos fitófagos podem ser dependentes do habitat (Kuchenbecker e Fagundes, 2018).

A grande heterogeneidade nas condições ambientais associadas com a distribuição de plantas hospedeiras, e possivelmente assíncronas a fenologia das plantas, pode ter conferido alta diversidade de nichos durante todo o ano para diferentes galhas e, conseqüentemente, parasitóides e inquilinos (Cuevas-Reyes et al. 2004; Lawton 1983). Com relação à fenologia dos insetos, parasitóides e inquilinos só podem entrar nas galhas após as galhas e, conseqüentemente eles geralmente surgem mais tarde. Quanto aos parasitóides, a infecção das larvas de galhas é geralmente realizada durante os primeiros estágios do desenvolvimento da galha (Askew 1961), e os parasitóides geralmente levam mais tempo até que estejam prontos para emergirem e completarem o seu ciclo de vida.Já os inquilinos têm uma ampla amplitude

ecológica em termos de galhas usadas como muitos deles estão apenas procurando abrigo e tendem a usar as galhas só depois que as galhas ou parasitóides já surgiram (Sanver e Hawkins 2000). Merencio et. al (2015) detalharam, no mesmo morfotipo de galha analisado pelo presente trabalho, a presença de um ovo e de indivíduos adultos de vespa da família Eulophiidae, embrora o cecidomiídeo não tenha sido observado. Esta constatação inspirou o presente trabalho a investigar a sequência ontogenética das larvas relacionadas à galha estudada afim de estabelecer os estádio de desenvolvimento larval e qual a relação entre os insetos. Com base nos resultados obtidos, observou-se que o mesmo morfotipo de galha pode ser ocupado por insetos de taxons distintos e em momentos diferentes da ontogenia da galha, sugerindo que um deles seja o indutor e o outro um ocupante secundário. Ressalta-se ainda que os registros obtidos não sugerem que haja relação de parastismo entre os dois insetos, como sugerido por Merencio et. al (2015). Assim, com os achados do presente estudo, propõem-se que a relação do eulofídeo com a galha e consequentemente com o cecidomiídeo, revela que os cecidomiídeos completam todo seu ciclo de vida no interior da galha, uma vez que em nenhuma das fases do desenvolvimento foi encontrado o eulofídeo coexistindo com o cecidomiídeo. Assim, essa galha pode ser considerada fenótipo estendido do indutor e, portanto, a relação com a planta hospedeira deve ser um processo de sucessão ontogenética.

Conclusão

A galha tubular marginal dos folíolos de *P. icicariba* pode abrigar e nutrir duas espécies distintas de insetos que se sucedem sem se sobrepor temporalmente. A espécie indutora da galha é um cecidomiídeo, que promove o processo de formação da galha, sendo ele sucedido por um eulofídeo, também fitófago. Apesar do eulofídeo não induzir a galha, sua larva se alimenta do tecido galhado e, embora as características de ocupação do inseto possam se assemelhar à de um inquilino, o eulofídeo consome tecidos presentes no interior da câmara larval, interferindo na ontogênese da galha. Sugere-se assim que a relação ecológica entre os organismos estudados seja de sucessão ontogenética da galha.

Referências

Abrahamson WG, Scrafford MR, orka GCS (1998) Gallinducing insects provide insights into plant systematic relationships. Am. J. Bot. 85: 1159–1165.

Agrawal AA, Johnson MTJ, Hastings AP, Maron JL (2013) A field experiment demonstrating plant life-history evolution and its eco-evolutionary feedback to seed predator populations. Am Nat 181: 35–S45. https://doi.org/10.1086/666727.

Altamirano A, Valladares G, Kuzmanich N, Salvo A (2016) Galling insects in a fragmented forest: incidence of habitat loss, edge effects and plant availability. Journal of Insect Conservation, 20(1), 119-127.

Álvarez R, Encina A, Hidalgo NP (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.

Araújo WS, Fernandes GW, Santos JC (2019) An overview of inventories of gallinducing insects in Brazil: looking for patterns and identifying knowledge gaps. An Acad Bras Cienc 91: e20180162. DOI 10.1590/0001-3765201920180162.

Araújo WS, Santos BB, Guilherme FAG, Scareli-santos C (2014) Galling insects in the Brazilian Cerrado: Ecological patterns and perspectives. In: Santos JC, Fernandes GW (Eds), Neotropical Insect Galls, New York, Springer Netherlands. 257-272. DOI 0.1590/0001-3765201920180162.

Araújo WS, Santos BB (2009) Efeitos da sazonalidade e do tamanho da planta hospedeira na abundância de galhas de Cecidomyiidae (Diptera) em *Piper arboreum* (Piperaceae). Rev. Bras. Ent. 53(2):300-303. DOI 10.1590/S0085-56262009000200014.

Araújo WS, Gomes KVL, Santos BB (2007) Galhas entomógenas associadas à vegetação do Parque Estadual da Serra dos Pireneus, Pirenópolis, Goiás, Brasil. Revista Brasileira de Biociências, 5: 45–47.

Askew RR (1961) A study of the biology of species of the genus *Mesopolobus* (Hymenoptera: Pteromalidae) associated with cynipid galls on oaks. Trans R Entomol Soc Lond 113:155–173.

Barton KE, Koricheva J (2010) The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. Am Nat 175:481–493.

Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) Ecology: from individuals to ecosystems. Oxford: Blackwell Publishing.

Sanver J, Borkent A (1988) Ambrosia galls: the significance of fungal nutrition in the evolution of the Cecidomyiidae (Diptera). In: Pirozynski KA, Hawksworth DL (ed) Coevolution of fungi with plants and animals. London: Academic Press, 203-205.

Boege K, Marquis RJ (2005) Facing herbivory as you grow up: The ontogeny of resistance in plants. Trends Ecol. Evol. 20: 441–448.

Boege, K. (2005) Herbivore attack in *Casearia nitida* influenced by plant ontogenetic variation in foliage quality and plant architecture. Oecologia 143: 117–125.

Bregonci JM, Polycarpo PV, Maia VC (2010) Galhas de insetos do Parque Estadual Paulo César Vinha (Guarapari, ES, Brasil) Biota Neotropica 10: 265-274.

Bronner R (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (ed) Biology of insect-induced galls. New York: Oxford University Press, 118-140.

Calácio TDF (2016) Estrutura e metabolismo de galhas foliares induzidas por Hemiptera (Psyllidae) em *Pouteria ramiflora* (Mart). Radlk. (Sapotaceae).

Campos RI, Vasconcelos HL, Ribeiro SP, Neves FS, Soares JP (2006) Relationship between tree size and insect assemblages associated with *Anadenanthera macrocarpa* Ecology 29: 442-450.

Campos WG, Teixeira NC, Valim JOS, Guedes RNC, Oliveira MGA (2016) Bottom-up mechanisms generate the same temporal pattern of attack by a specialist and a generalist caterpillar on short-lived plants. Environ Entomol.

Carneiro MAA, Branco CSA, Braga CED, Almada ED, Costa MBM, Maia VC, Fernandes GW (2009) Are gall midge species (Diptera, Cecidomyiidae) host-plant specialists? Revista Brasileira de Entomologia, 53(3):365-378.

Cepemar. (2007) Plano de manejo do Parque Estadual Paulo César Vinha. Relatório Técnico COM RT.

Cornelissen, T., de Carvalho Guimarães, C. D., Rodrigues Viana, J. P., & Silva, B. (2013) Interspecific competition influences the organization of a diverse sessile insect community. Acta Oecologica, 52, 15– 18. https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.07.001

Cuevas-Reyes MQ, Oyama k (2006) Abundance and leaf damage caused by gall-inducing insects in aMexican tropical dry forest. Biotropica 38: 107–115.

Cuevas-Reyes P, Hanson P, Dirzo R, Oyama K (2004) Diversity of gall-inducing insects in a Mexican tropical dry forest: The importance of plant richness, life-forms, host plant age and plant density. J. Ecol. 92: 707–716.

Diamond, J. M. (1973) Distributional ecology of New Guinea birds. Science, 179(4075), 759– 769.

Dawkins R (1982) The Extended Phenotype. Oxford, Oxford University Press.

Evert RF (2005) Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3 ed. Hoboken, John Wiley & Sons.

Fagundes, M., Xavier, R. C. F., Faria, M. L., Lopes, L. G. O., Cuevas-Reyes, P., & Reis-Junior, R. (2018) Plant phenological asynchrony and community structure of gall-inducing insects in a super-host tropical tree species. Ecology Evolution, **8**(22): 10687– 10697.

Fernandes GW, Negreiros D (2006) A comunidade de insetos galhadores da RPPN Fazenda Bulcão, Aimorés, Minas Gerais, Brasil. Lundiana 7(2):111-120.

Fleck T, Fonseca CR (2007) Hipóteses sobre a riqueza de insetos galhadores: uma revisão considerando os níveis intra-específico, interespecífico e de comunidade. Neotropical Biology and Conservation, 2(1): 36-45.

Ferreira LC, Thomazi RD, Oliveira DA, Silva AG (2010) Estrutura populacional e padrão espacial de *Protium icicariba* (DC.) Marchand na Área de Proteção Ambiental de Setiba, Espírito Santo, sudeste do Brasil. Natureza on line, 8(1): 39-45.

Filgueira HTR, de Lima FF, Bizerra MMS, da Silva Costa KD, dos Santos AMM, de Oliveira Silva M, Costa CDSR (2020) Reação de resistência de genótipos de quiabeiro ao *Meloidogyne incognita* raça 1. Brazilian Journal of Development, 6(6): 40776-40785.

Fonseca CR, Benson WW (2003) Ontogenetic succession in Amazonian ant trees. Oikos 102: 407-412.

Fonseca CR, Fleck T, Fernandes GW (2006) Processes driving ontogenetic succession of galls in canopy tree. Biotropica 38: 514-521.

Fritz RS, Crabb BA, Hochwender CG (2000) Preference and performance of a gall-inducing sawfly: A test of the plant vigor hypothesis. Oikos 89: 555–563.

Gagné R (1994) The Gall Midges of the Neotropical Region. Ithaca, Cornell University Press. 360 p.

Gupta SK, Singh H, Ram J (2019) Need for a Novel Paradigm in Forestry Research: Perspectives of Comparative Atmospheric Cooling Effect by Different Forestry Tree Species. Indian Forester, 145(6): 521-527.

Hanley ME, Girling RD, Felix AE, Olliff ED, Newland PL, Poppy GM (2013) Olfactory selection of *Plantago lanceolata* by snails declines with seedling age. Ann Bot 112:671–676

Hanson PE, Gauld ID (1995) (ed) The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford, Oxford University Press.

Hanson PE, Gauld ID (2006) Hymenoptera de la region Neotropical. Memoirs of the American Entomological Institute 77: 1-994.

Höglund, S. (2014) Timing of growth determines fitness and performance of a galling insect on willow. Ecological Entomology, 39(2), 159– 167. https://doi.org/10.1111/een.12078

Incaper (2011) Programa de assistência técnica e extensão rural PROATER – 2011- 2013, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Guarapari. Planejamento e programação de ações – 2011. Disponível em: http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Centro_cerrano/Guarapari.pdf.

Isaias RMS (1998) Galhas em *Machaerium* (Leguminosae – Papilionoideae): Anatomia e histoquímica. São Paulo: Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 220.

Jensen WA (1962) Botanical Histochemistry: principles and practice. San Francisco, W.H. Freeman.

Joy, J. B., & Crespi, B. J. (2007) Adaptive radiation of gall-inducing insects within a single host-plant species. Evolution, 61(4), 784– 795. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00069.x Wiley Online Library.

Köppen, FW. (1948) Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra México: Fondo de Cultura Econômica. 479 p.

Kuchenbecker, J., & Fagundes, M. (2018) Diversity of insects associated with two common plants in the Brazilian Cerrado: Responses of two guilds of herbivores to bottom-up and top-down forces. European Journal of Entomology, 115, 354– 363. https://doi.org/10.14411/eje.2018.035.

Larson K (1998) The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their host. Oecologia, 115: 161-166.

Lawton JH (1983) Plant architecture and the diversity of phytophagous insects. Annu Rev Entomol 28:23–39.

López-Núñez FA, Ribeiro S, Marchante H, Heleno RH, Marchante E (2019) Life inside a gall: diversity, phenology and structure of Portuguese gall communities, their hosts, parasitoids and inquilines. Arthropod-Plant Interactions, 13(3), 477-488.

Maia VC (2001) The gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) from three restingas of Rio de Janeiro State, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia 18: 305-656.

Maia VC (2012) Richness of hymenopterous galls from South America. Papéis Avulsos de Zoologia 52: 423-429.

Maia VC (2013) Galhas de insetos em restingas da região sudeste do Brasil com novos registros. Biota Neotropica 13: 183-209.

Maia VC, Fernandes GW (2004) Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil). Brazilian Journal of Biology 64: 423-445. DOI 10.1590/S1519-69842004000300007.

Maia VC, Monteiro RF, Narahara KL (2002) Two new species of gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Protium icicariba* (Burseraceae) in Brazil. Studia Dipterologica 9: 171-178.

Maia VC. (2013) Galhas de insetos em restingas da região sudeste do Brasil com novos registros. Biota Neotropica 13: 183-209.

Mani MS (1964) Ecology of Plant Galls. Netherlands, The Hague Dr. W. Junk Publishers.

Marquis RJ, Lill JT, Forkner RE, Le Corff J, Landosky JM, Whitfield JB. (2019) Impacts of late spring frosts and summer drought on communities of leaf chewing insects on Missouri oaks. Frontiers in Ecology and Evolution, 7: 396.

Mason WRM (1993) Key to superfamilies of Hymenoptera. In: Goulet H, Huber Jt (ed) Hymenoptera of the World: an identification guide to families. Ottawa, Centre for Land and Biological Resources Research, 65-100.

Medianero E, barrios H (2001) Riqueza de insectos cecidógenos en el dosel y sotobosque de dos zonas ecológicas en Panamá. Scientia (Panamá), 16:17-42.

Medianero E, Carrasco G, Pérez E, Araúz-Araúz B, Castaño-Meneses G, Martínez-Torres AO (2017) Composición De La Comunidad De Artrópodos Que Habitan En El Dosel En Un Bosque Tropical De Tierras Bajas En Panamá. Scientia, 27(2): 51-67.

Menezes H (2009) Imunidade inata e específica em plantas. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 30(2), 195-212.

Merencio AFS, Dias,GB, Souza JPP, Silva AG. (2015) A wasp species in a rolling gall at the margine of the leaflets of *Protium icicariba*: an inducer, a parasitoid or an inquiline? Natureza on line 13 (1): 12-1.

Narahara KL, Maia VC, Monteiro RF (2004) Two new species of gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). Revista Brasileira de Entomologia 48: 485-490.

Narahara KL, Maia VC, Monteiro RF. (2004) Two new species of gall midges (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Protium heptaphyllum*(Aubl.) Marchand (Burseraceae). Revista Brasileirade Entomologia 48: 485-490. DOI 10.1590/S0085-56262004000400010.

Niinemets,U. (2005) Key plant structural and allocation traits depend on relative age in the perennial herb *Pimpinella saxifraga*. Ann. Bot. 96: 323–330.

Ochoa-Lopez S, Villamil N, Zedillo-Avelleyra P, Boege K (2015) Plant defence as a complex and changing phenotype throughout ontogeny. Ann Bot 116:797–806.

llerstam, O., Rohfritsch, O., Hoglund, S., & Larsson, S. (2002) A rapid hypersensitive response associated with resistance in the willow *Salix viminalis* against the gall midge *Dasineura marginemtorquens*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 102(2), 153– 162. https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2002.00935.x

Paniagua MR, Medianero E, Lewis OT (2009) Structure and vertical stratification of plant galler-parasitoid food webs in two tropical forests. Ecol Entomol 34:310–320.

Price PW (2005) Adaptative radiation of gall-inducing insects. Basic and Applied Ecology 6: 413-421.

Price PW, and H. Roininen. (1993) Adaptive radiation in gall induction. In M. R. Wagner and K. F. Raffa (Eds.). Sawfly life history adaptation to woody plants, 229–257. Academic Press, New York.

Price PW, Fernandes GW, Waring GL (1987) Adaptative nature of insect galls. Environmental Entomology 16: 15-24.

Price PW, Cobb N, Craig TP, Fernandes GW, Itami J, Mopper S, Preszler RW (1990) Insect herbivore population dynamics on trees and shrubs: New approaches relevant to latent and eruptive species and life table development. In E. Bernays (Ed.). Focus on insect-plant interactions, 3: 1–38. CRC Books, Boca Raton, Florida.

Quintero C, Barton KE, Boege K (2013) The ontogeny of indirect plant defenses. PPEES 15: 245–254

Ramalho VF, Silva AG. (2014) Two different gall morphotypes for two different galling insect species in *Protium icicariba*, Burseraceae. Natureza on line 12 (3): 101-108.

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

Raman A, Schaefer CW, Withers TM (2005) Galls and gall-inducing arthropods: An overview of their biology, ecology, and evolution. In: Raman A, Schaefer CW, Withers TM (ed) Biology, Ecology, and Evolution of Gall-Inducing Arthropods. New Hampshire, Science Publishers, pp 1-33.

Raman, A. (2007) Insect-induced plant galls of India: Unresolved questions. Current Science, 92(6): 748-757. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/24097803.

Ramos, LF, solares, RRC, Santos, HT, Fagundes, M (2019) A variação na estrutura da comunidade de insetos indutores de galhas associados a uma planta tropical apoia a hipótese de competição em habitats estressantes. *Ecol Evol*. 9: 13919 - 13930. https://doi.org/10.1002/ece3.5827

Rodrigues AR, Maia VC (2010) Duas novas espécies de *Lopesia Rübsaamen* (Diptera, Cecidomyiidae) do Brasil, com chave para as espécies. Biota Neotropica 10: 85-99.

Rohfritsch O (1992) Patterns in gall development. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (ed) Biology of Insect Induced Galls. New York, Oxford University Press, 60-86.

Rohfritsch O, Shorthouse JD (1982) Insect galls. In: Gunter K, Schell JS (ed) Molecular Biology of Plant Tumors. New York, Academic Press, 131-152.

Ronquist F, Lijeblad J (2001) Evolution of the gall wasp-host plant association. Evolution 55: 2503–2522.

Santos GM, Hanson P, Maia CV, Mehltreter K. (2018) A Review of Galls on Ferns and Lycophytes Environmental Entomology. DOI 10.1093/ee/nvy172

Sanver D, Hawkins BA (2000) Galls as habitats: the inquiline communities of insect galls. Basic and Applied Ecology 1: 3-11.

Schauff ME, LaSalle J, Coote LD (1997) Eulophidae. Annotated Keys to the Genera of *Nearctic Chalcidoidea* (Hymenoptera). National Research Council Research Press. Ottawa, Ontario, Canada, 327-429.

Schoonhoven LM, Van Loon JJA, Dicke M. (2005) Insect-Plant Biology. 2.ed. New York: Oxford University Press, 421.

Schowalter TD (2000) Insect ecology. An ecosystem approach. Academic Press, San Diego.

Schowalter TD (2006) Insect ecology: an ecosystem approach. 2.ed. New York: Oxford, Academic Press, 569.

Shorthouse JD, Wool D, Raman A (2005) Gall-inducing insect: nature's most sophisticated herbivores. Basic and Applied Ecology 6: 407-411.

Siani AC, Garrido IS, Monteiro SS, Carvalho ES, Ramos MFS (2004) Biochemical Systematics and Ecology, 32: 477–489.

Sitch TA, Grewcock DA, Gilbert FS. (1988) Factors affecting components of fitness in a gall-making wasp (*Cynips divisa Hartig*). Oecologia 76: 371–375.

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

Travis J, Reznick D, Bassar RD et al (2014) Do eco–evo feedbacks help us understand nature? Answers from studies of the *Trinidadian guppy*. Adv Ecol Res 50:1–40. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801374-8.00001-3.

Weis AE, Walton R, Crego CL (1988) Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. Annu. Rev. Entomol. 33: 467– 486.

Whitham, T. G. (1978) Habitat selection by *Pemphigus aphids* in response to response limitation and

competition. Ecology, 59(6), 1164– 1176. https://doi.org/10.2307/1938230

Yukawa, J. (2000). Synchronization of gallers with host plant phenology. Population Ecology, 42(113), 105– 113. https://doi.org/10.1007/PL00011989

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstraram que as modificações anatômicas e fitoquímicas da planta ocorrem juntamente com a presença do inseto na galha, o que sugere uma possível interferência deste organismo na estrutura dos tecidos e no funcionamento das células hospedeiras. Assim, o desenvolvimento do inseto influencia o tecido galhado, ressaltando que o rendimento de óleos essenciais dos folíolos com galhas foi menor do que em folíolos sem galhas. Junto a isso, os tecidos associados as galhas inativas passaram a produzir óleos essenciais com características mais semelhantes aos óleos de folíolos sem galha, evidenciando a influência do inseto galhador sobre a produção e a qualidade dos óleos essenciais produzidos pelas células dos tecidos galhados e adjacências. Além disso, o presente trabalho contribui para o conhecimento de galhas em Burseraceae, com a descrição de dois novos morfotipos de galhas ocorrentes em *Protium icicariba* e a caracterização da relação ecológica entre dois táxons de insetos observados ocupando a mesma estrutura, em um processo de sucessão ontogenética da galha.

Nas últimas décadas, houve grande aumento no número de estudos de história natural, ecologia e biogeografia de insetos indutores de galhas e atualmente sabe-se muito mais do que há uns poucos anos. No Brasil, a maioria das espécies de insetos galhadores ainda não foi descrita, sendo necessário um maior aprofundamento nos estudos sobre os principais grupos de insetos indutores de galhas, como, por exemplo, os Cecidomyiidae. É necessário também, avançar nos estudos sobre o processo de formação inicial e de desenvolvimento de galhas, uma vez que poucas espécies foram estudadas com maior nível de detalhes. Neste sentido, o presente trabalho apresenta novas informações sobre o desenvolvimento, o comportamento e interações ecológicas envolvendo insetos galhadores, contribuindo para o incremento das bases teóricas e para a compreensão da ecologia de galhas.

A partir da compreensão das modificações relacionadas à formação e desenvolvimento das galhas é possível entender os efeitos desta relação sobre o vegetal e quais os riscos deste tipo de interação para a planta hospedeira, visto que muitas culturas de importância comercial também podem ser afetadas por galhas. Neste sentido, conhecer as etapas ontogenéticas da galha é um dos passos para o delineamento de um plano para o controle de futuras pragas. Adicionalmente, o

conhecimento sobre os padrões dos usos de galhas por insetos indutores e ocupantes secundários contribui para a melhor compreensão dos aspectos relacionados à ecologia de galhas e as complexas interações entre insetos e plantas.

Entre os herbívoros os galhadores são os mais notáveis, devido aos seus hábitos de alimentação e desenvolvimento, e também por constituírem interações bem específicas com suas plantas hospedeiras. A mosca galhadora *Asphondylia yushimai* (Diptera, Cecidomyiidae) é responsável pela formação de galhas em brotos, flores e frutos em várias espécies vegetais, como por exemplo na soja, onde essa indução de galhas gera problemas na agricultura com redução na produtividade. Sendo assim, o presente trabalho poderá auxiliar na compreensão das relações entre planta e inseto, para agregar aos estudos ecológicos e contribui na elaboração de planos de conservação de ecossistemas eficientes. Outro desdobramento do presente trabalho é evidenciar para o sistema de agricultura local, a importância das associações que ocorrem na natureza, bem como a aplicação desses conhecimentos no controle de pragas e consequente aumento da produtividade das culturas.