

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**REAÇÕES ESTRUTURAIS E QUÍMICAS DURANTE A ONTOGÊNESE
DE DUAS GALHAS INDUZIDAS EM FOLÍOLOS DE *Protium icicariba*
(DC) Marchand**

VICTOR FRANCO RAMALHO

VILA VELHA
AGOSTO / 2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**REAÇÕES ESTRUTURAIS E QUÍMICAS DURANTE A ONTOGÊNESE
DE DUAS GALHAS INDUZIDAS EM FOLÍOLOS DE DE *Protium*
icicariba (DC) Marchand**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

VICTOR FRANCO RAMALHO

VILA VELHA
AGOSTO / 2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R165r Ramalho, Victor Franco.

Reações estruturais e químicas durante a ontogênese de duas galhas induzidas em folíolos de *Protium icariba* (DC) Marchand. – 2013.
48 f.: il.

Orientador: Ary Gomes da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Plantas - Fisiologia. 3. Plantas - Morfologia. 4. Inseto como transmissor de doenças das plantas. 5. Relação inseto-planta. I. Silva, Ary Gomes da. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 581.7

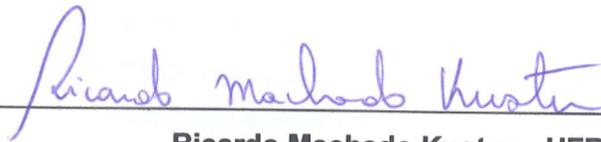
VICTOR FRANCO RAMALHO

**REAÇÕES ESTRUTURAIS E QUÍMICAS DURANTE A ONTOGÊNESE
DE DUAS GALHAS INDUZIDAS EM FOLÍOLOS DE DE *Protium
icicariba* (DC) Marchand**

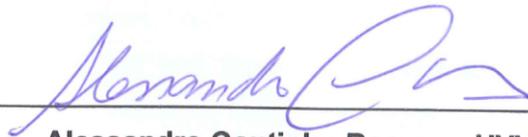
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ecologia
de Ecossistemas, para a obtenção do grau
de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 30 de agosto de 2013,

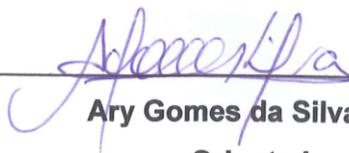
Banca Examinadora:



Ricardo Machado Kuster – UFRJ



Alessandro Coutinho Ramos – UVV



Ary Gomes da Silva – UVV

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, designo de todas as bênçãos e graças concedidas em minha vida. A minha família, aos meus pais primeiramente, que acreditam no meu potencial e investiram na minha formação, educação e caráter. A minha mãe pelo seu incondicional zelo, amor, carinho ao meu pai, que não está mais presente entre nós para participar deste momento, mas que em vida foi uma grande inspiração e incentivo na minha vida acadêmica. As minhas irmãs, minhas joias, a todo carinho, conversas, parceria, em fim grandes pessoas que são partes de mim e de tudo aquilo que eu sou.

Agradeço ao meu grande amigo e orientador Ary Gomes da Silva, essa pessoa fantástica, não tem o que falar, só sabe quem é ele, quem tem a oportunidade de conhecer. Acima de tudo um espírito iluminado, que nos transmite sempre essa boa vibração, coragem, bem aventurança, amor e alegria por onde quer que passe. Um professor fora de sério, inteligentíssimo, quase uma enciclopédia, esforçado e dedicado no que faz, e principalmente preocupado com o sucesso dos seus orientados e aqueles que o pedem ajuda, um homem com um grande coração. Ary, na verdade escrevo por escrever, não mensuro a gratidão que eu tenho pela oportunidade que você me deu, saiba que ela vai além até do que você possa imaginar. Chegou no momento certo e me ajudou também no meu desenvolvimento pessoal. Obrigado também pela companhia, compreensão e paciência em todo esse tempo. Por ter acreditado acima de tudo no meu potencial e ter dado crédito ao meu trabalho e esforço. Obrigado, obrigado e obrigado.

Agradeço aos meus amigos, não preciso citar nomes, porque eles aqui se reconhecem. Essas pessoas que fazem parte de todos os momentos, risadas, conversas, colaboração, incentivo, amor, companheirismo. Agradeço a equipe científica do curso de ecologia de ecossistemas, todos os professores que contribuíram para minha formação e me ajudaram em meu projeto em incentivo, Ary, Charles, Alessandro, Moretti, Júlia, Drielli, Breno, Flávio, Márcio, Jordana, Fernanda, Alessandra, Aice, Romulo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	2
ABSTRAT	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Área de estudo	5
2.2 Coleta de material.....	6
2.3 Descrição morfológica e estrutural das galhas e estruturas secretoras....	6
2.4 Extração e análise fitoquímica do óleo essencial.....	7
2.5 Análise estatística dos dados.....	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1 Descrição morfológica e estrutural da galha cecidomyiidae e psyllidae.....	9
3.2. O óleo essencial.....	17
8. REFERÊNCIAS	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Galhas cecidomyiidae em *Protium icariba* (DC) Marchand. A- galha fusiforme; B-larva fase inicial; C- larva fase pré pupa; D – pupa; E- exúvia; F- adulto.....10
- Figura 2** Galhas em *psyllidae* em *Protium icariba* (DC) Marchand. A- galha campanulada; B- câmara larval; C- exúvia; D- larva vista dorsal; E- larva vista ventral.....10
- Figura 3** Galhas em *psyllidae* em *Protium icariba* (DC) Marchand. A-postura do ovo; B- larva (L1); C- larva(L2); D- larva (L3); E- larva (L4); F- adulto.....11
- Figura 4** *Protium icariba*: corte transversal do foliolo. Delimitação mostra bainha de feixe de natureza esclerenquimática em torno dos feixes vasculares. Diposição dorsiventral do mesófilo, com parênquima palicádico (PP) voltado para a face adaxial e o parênquima lacunoso (PL) voltado para a face abaxial. Epiderme (EP).....12
- Figura 5** Galha de Cecidomyiidae em *Protium icariba*: corte longitudinal da galha. 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.....12
- Figura 6** Galha de *Psyllidae* em *Protium icariba*: corte longitudinal da galha.....13
- Figura 7** Galha Cecidomyiidae em *Protium icariba*: detalhe do corte transeversal da galha. Seta 1: epiderme da parede externa da galha; seta 2: esclereídeos; seta 3: colênquima; seta 4: esclereídeos; seta 5: colênquima; seta 6: epitélio da parede da câmara larval.....14
- Figura 8** Galha *Psyllidae* em *Protium icariba*: detalhe do corte transeversal da galha.....15
- Figura 9** *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal do mesofilo de folíolos. 1- Estrutura secretora.....18
- Figura 10** *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal da nervura principal. 1- Bainha de fibras esclerenquimáticas; 2- Estrutura secretora; 3- Xilema; 4- Floema.....18
- Figura 11** *Protium icariba* (DC) Marchand. Nervura principal seccionada longitudinalmente a) Nervura secundária evidenciando o ducto: 1- Ducto. / b) Aréolas contendo ductos retorcidos: 2- Ducto retorcido.....19
- Figura 12** *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal do peciolo evidenciando o ducto bicoloral entre dois feixes vasculares concêntricos anficrivais. 1- Xilema; 2- Floema; 3- Ducto.....19

Figura 13 *Protium icicariba* Secção transversal do ramo. 1- Bainha esclerenquimática; 2- Estrutura secretora; 3- Floema; 4- Xilema.....20

Figura 14 Dendrograma de agrupamento das amostras de óleos essenciais de de folíolos com e sem galhas *Protium icicariba* (DC) Marchand, construído a partir da média de grupos formados pelo coeficiente de Distância de Canberra excluindo os zeros comuns.....24

Figura 15 Dendrograma de agrupamento das amostras de óleos essenciais de de folíolos com e sem galhas *Protium icicariba* (DC) Marchand, construído a partir da média de grupos formados pelo coeficiente de Distância Média de Manhattan.....25

Figura 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 Cecidomyidae (Cecy), com galhas ativas de Psyllidae (Psyat) e galhas inativas de Psyllidae (Psyinat).....26

Figura 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 Cecidomyidae (Cecy), com galhas ativas de Psyllidae (Psyat) e galhas inativas de Psyllidae (Psyinat).....27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Rendimento, riqueza, diversidade química do óleo essencial de folíolos sem galha e com galha de cecidomyiidae e psyllidae em *Protium icicariba*.....21
- Tabela 2** Compostos majoritários nos folíolos sem galha de *Protium icicariba* (DC) Marchand dos.....22
- Tabela 3** Compostos majoritários nos folíolos com galha de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand.....22
- Tabela 4** Compostos majoritários nos folíolos com galha de Psyllidae ativa de *Protium icicariba* (DC) Marchand.....23
- Tabela 5** Compostos majoritários nos folíolos com galha de Psyllidae inativa de *Protium icicariba* (DC) Marchand.....23

RESUMO

RAMALHO, Victor Franco, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, agosto de 2013. **Reações estruturais e químicas durante a ontogênese de duas galhas induzidas em folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand.** Orientador: Ary Gomes da Silva.

A indução de galhas em plantas é considerada a mais complexa associação na natureza, onde o ganho dos insetos consiste em redirecionar o crescimento e fisiologia de órgãos atacados, de modo a criar um ambiente favorável, que forneça alimento, abrigo e proteção para o desenvolvimento de suas larvas. Tanto alterações estruturais quanto químicas têm grande influência na manutenção do ciclo de vida dos galhadores. Assim, este trabalho tem o objetivo de dimensionar do ponto de vista estrutural e químico a constituição reacional da galha induzida por Cecidomyiidae e Psyllidae *Protium icicariba* (DC) Marchand. A morfologia e a estrutura das galhas foi avaliada em microscopia estereoscópica e de luz transmitida. O perfil químico dos óleos essenciais foi analisado em cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Métodos numéricos de análise estatística paramétrica e multivariada foram aplicados na análise de dados. Na galha de Cecidomyiidae e Psyllidae, a presença de epiderme não cutinizada e as pontoações em paredes celulares lignificadas, são os instrumentos principais na transferência de água e substâncias hidrosolúveis das células do parênquima fundamental, onde se localizam os feixes vasculares, para dentro da câmara larval favorecendo o acesso da larva à alimentação. A parede externa da galha e a parede interna da câmara larval composta em parte por esclerênquima, no tecido com galha induzida por Cecidomyiidae e Psyllidae em *P. icicariba* indica forte relação com a defesa mecânica contra os inimigos externos. Tanto quantitativa como qualitativamente, a química dos óleos essenciais formou grupos distintos de amostras para as galhas ativas de Cecidomyiidae e Psyllidae, que por sua vez se separam bem distintamente da composição química do óleo essencial dos folíolos que não têm galhas ou estão inativas. A análise de substâncias indicadoras revelou que 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.

Palavras-chaves: Galha, Cecidomyiidae, cecidogênese, Psyllidae, restinga.

REAÇÕES ESTRUTURAIS E QUÍMICAS
DURANTE A ONTOGÊNESE DE DUAS
GALHAS INDUZIDAS EM FOLIOLOS DE
Protium icicariba

Manuscrito apresentado nas normas da revista Journal of Natural Products (JCR 2,82)

Victor Franco Ramalho[#], Drielle Lima de Almeida Pratti[§] Rodrigo Scherer ^{‡§}, e Ary Gomes
da Silva^{§*}

Universidade Vila Velha – UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

* Tel: 55 (27) 3421-5527. Fax: 55 (27) 3421-2000. E-mail: arygomes@uvv.br

Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas da Universidade Vila Velha – UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

§ Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas da Universidade Vila Velha – UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

‡ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha – UVV. Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil - CEP 29.102-770.

§ Tommasi Analítica. Av. Luciano das Neves, 2016. Divino Espírito Santo, Vila Velha/ES. CEP: 29.107-010

REAÇÕES ESTRUTURAIS E QUÍMICA DURANTE A ONTOGÊNESE DE DUAS GALHAS INDUZIDAS EM FOLÍOLOS DE *Protium icicariba*

Resumo

A indução de galhas em plantas é considerada a mais complexa associação na natureza, onde o ganho dos insetos consiste em redirecionar o crescimento e fisiologia de órgãos atacados, de modo a criar um ambiente favorável, que forneça alimento, abrigo e proteção para o desenvolvimento de suas larvas. Tanto alterações estruturais quanto químicas têm grande influência na manutenção do ciclo de vida dos galhadores. Assim, este trabalho tem o objetivo de dimensionar do ponto de vista estrutural e químico a constituição reacional da galha induzida por Cecidomyiidae e Psyllidae *Protium icicariba* (DC) Marchand. A morfologia e a estrutura das galhas foi avaliada em microscopia estereoscópica e de luz transmitida. O perfil químico dos óleos essenciais foi analisado em cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Métodos numéricos de análise estatística paramétrica e multivariada foram aplicados na análise de dados. Na galha de Cecidomyiidae e Psyllidae, a presença de epiderme não cutinizada e as pontuações em paredes celulares lignificadas, são os instrumentos principais na transferência de água e substâncias hidrosolúveis das células do parênquima fundamental, onde se localizam os feixes vasculares, para dentro da câmara larval favorecendo o acesso da larva à alimentação. A parede externa da galha e a parede interna da câmara larval composta em parte por esclerênquima, no tecido com galha induzida por Cecidomyiidae e Psyllidae em *P. icicariba* indica forte relação com a defesa mecânica contra os inimigos externos. Tanto quantitativa como qualitativamente, a química dos óleos essenciais formou grupos distintos de amostras para as galhas ativas de Cecidomyiidae e Psyllidae, que por sua vez se separam bem distintamente da composição química do óleo essencial dos folíolos que não têm galhas ou estão inativas. A análise de substâncias indicadoras revelou que 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.

Palavras-chaves: Galha, Cecidomyidae, cecidogênese, Psyllidae, restinga.

Abstract

Gall induction in plants is considered the most complex association in nature, where the insect gains in redirecting the physiology and growth of attacked organs, in order to create a proper environment that provides food, shelter and protection for the development of their larvae. Both structural and chemical changes have great influence in maintaining the life cycle of galling insect. So this study aims to evaluate the structural and chemical reaction of the gall induced by the *Lopesia simplex* in *Protium icicariba*. The morphology and structure of the galls was assessed by stereoscopic and transmitted light microscopy. The chemical profile of essential oils was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Numerical methods of parametric and multivariate statistics were used for data analysis. The presence in the gall, of non cutinized inner epidermis and pits in plant cells in tissues whose walls were lignified, are the main instruments in the transfer of water and water soluble substances from the cells of the fundamental parenchyma, where there are the vascular bundles, towards the camera larval promote access to food for the larvae. The outer wall of the gall and the internal wall of the camera larval composed in part by schlerenchyma, with gall tissue induced Cecidomyidae e Psyllidae in *P. icicariba* indicates a strong relationship with the physical defense against external enemies. Both quantitatively and qualitatively, the chemistry of essential oils formed galls active Cecidomyidae and Psyllidae, which in turn is quite distinctly separate the chemical composition of the essential oil galls the leaflets that do not have or are inactive. The indicator substance analysis revealed that both quantitatively and qualitatively, there is a gradient of chemical composition of the essential oils of leaflets which do not bear galls active while the leaves with galls active form distinct and cohesive blocks.

Key-words: Gall, Cecidomyidae, cecidogênese, Psyllidae, restinga.

INTRODUÇÃO

Insetos herbívoros e plantas estabelecem relações que assumem vários níveis de complexidade, abrangendo desde relações tróficas até as adaptações evolutivas. No que diz respeito aos insetos herbívoros, uma das características mais marcantes das relações com as plantas é o alto grau de especialização alimentar que podem alcançar. Este fenômeno constitui o ponto principal destas relações logo, é útil considerar o grau de especialização ou generalização alimentar mostrado por herbívoros (Schoonhoven et al., 2005).

Alguns estudos demonstraram que existe uma variação na abundância e composição de insetos herbívoros associados às plantas em estágios ontogenéticos distintos (Fonseca et al., 2006, Campos et al., 2006). Assim, o comportamento, a fisiologia e adaptações ecológicas dos herbívoros selecionam o estágio de desenvolvimento da planta que lhes propiciam melhores taxas de sobrevivência e reprodução. Portanto, o processo de desenvolvimento da planta hospedeira é a principal pressão seletiva sobre este tipo de interação (Fonseca & Benson 2003). Prever e avaliar as alterações ontogenéticas na resistência de plantas aos herbívoros é importante, já que tais variações podem alterar os efeitos ecológicos e evolutivos das interações planta-herbívoro (Boege & Marquis, 2005).

A ontogenia, ou modificação natural na expressão gênica do meristema do vegetal, está diretamente relacionada ao desenvolvimento das plantas. Com a sucessão para estágios ontogenéticos mais avançados, ocorrem variações na forma, fisiologia, composição química e resistência a patógenos (Lawrence et al., 2003). A principal força por trás das sucessões ontogenéticas na interação planta-inseto, é o processo de desenvolvimento do hospedeiro, o que muda continuamente a qualidade do recurso, associado à seletividades comportamentais, fisiológicas e ecológicas dos herbívoros, de modo a alcançar o melhor conjunto de condições para a sua sobrevivência e reprodução. Além disso, interações bióticas com níveis tróficos superiores e condições abióticas vão modular densidades de espécies ao longo da ontogenia (Fonseca et al., 2006).

A indução de galhas na planta é considerada a mais complexa associação entre insetos e plantas existentes no mundo natural, onde o ganho dos insetos consiste em redirecionar o crescimento e fisiologia de órgãos atacados, de modo a criar um ambiente interno favorável, que forneça alimento, abrigo e proteção para o desenvolvimento de suas larvas (Shorthouse et al., 2005).

Em contraste com os herbívoros generalistas de vida livre que podem se mover entre habitats e se alimentam de diferentes espécies de plantas durante suas vidas, os insetos galhadores tendem a viver a maior parte de suas vidas dentro da espécie hospedeira, induzindo

a alterações nos tecidos da planta. No entanto, eles são livres para escolher entre os diferentes órgãos oferecidos por seus hospedeiros, podendo induzir galhas em folhas, caules, espinhos, flores, frutos e raízes (Fonseca et al., 2006).

Muitos insetos têm uma capacidade notável para modificar os tecidos da planta hospedeira e induzem crescimentos atípicos no tecido vegetal, chamados de galhas (Mani, 1964; Redfern e Shirley, 2002). Galhas são estruturas sofisticadas constituídas de células vivas da planta hospedeira, consideradas como o fenótipo estendido do indutor, no qual o mesmo é capaz de induzir crescimentos anormais no tecido da planta hospedeira, através de um estímulo específico (Mani, 1964; Redfern & Shirley, 2002; Stone & Schönrogge, 2003; Shorthouse et al., 2005). Insetos galhadores são herbívoros que representam um dos extremos do gradiente especialista-generalista, sendo demasiadamente específicos em relação à escolha do hospedeiro (Fernandes & Price, 1992; Price et al., 1998).

Até agora, muitos estudos ecológicos e histológicos se concentraram no significado adaptativo do hábito de insetos galhadores (Rohfritsch & Shorthouse, 1982; Price et al., 1987; Stone & Schönrogge, 2003; Raman et al., 2005; Shorthouse et al., 2005), e no processo de desenvolvimento de galhas induzidas por insetos (Rohfritsch, 1992). Apresentando estilos de vida altamente especializados, esses insetos são aparentemente parasitas, monófagos, sésseis e imersos em tecidos vegetais por um período mais ou menos do seu ciclo de vida (Shorthouse et al., 2005). O reconhecimento das várias espécies de indutores de galha nos últimos anos sugere que os galhadores ainda estão em um estado dinâmico evolutivo, com extensa radiação adaptativa (Price, 2005).

As espécies do gênero *Protium* têm cedido seus epítetos à descrição de novas espécies de insetos galhadores, de tal maneira que o tipo de espécie em que as galhas ocorrem passam a ser passos das chaves analíticas para identificação das espécies de insetos galhadores (Maia, 2013). Assim este trabalho tem por objetivo investigar as reações estruturais e químicas que ocorrem nos folíolos de *Protium icicariba* (DC) Marchand, (Burseraceae), quando acometido por galhas de duas espécies diferentes de insetos galhadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

As coletas de material botânico foram feitas em exemplares que crescem na Área de Proteção Ambiental de Setiba – APA-Setiba (Figura 1, UTM Sad 69: 352397 E/ 77233856 N). A identificação botânica foi realizada por Ary Gomes da Silva. Dentre as diversas

comunidades vegetais da APA-SETIBA, foi escolhida uma área de formação arbustiva aberta não inundável, em função da facilidade de deslocamento e acessibilidade da vegetação. É característica marcante a presença de areia branca exposta e a vegetação distribuída em moitas de diferentes tamanhos e formas, com até oito metros de altura, intercaladas por espaços onde a cobertura vegetal é esparsa (Araújo & Henriques, 1984).

Coleta de Material

Em setembro/2011 foram realizadas três coletas de folíolos sem galhas com intervalo de uma semana entre elas. Em janeiro/2012 foram realizadas três coletas de folíolos com galha fusiforme em fase ativa de desenvolvimento. Em julho/2012 foram realizadas três coletas de folíolos com galha laminar em fase senil. Em março/2013 foram realizadas três coletas de folíolos com galha laminar em fase ativa de desenvolvimento.

Nas coletas foram utilizados frascos de vidro hermeticamente fechados, limpos e aquecidos a 200°C para eliminar quaisquer resíduos voláteis, sendo mantido resfriados em campo em bolsa térmica até que chegassem ao laboratório e ecologia funcional da UVV-ES para o processo de hidrodestilação.

Descrição morfológica e estrutural das galhas e estruturas secretoras

As galhas foram caracterizadas morfológicamente quanto à forma, coloração, órgão de ocorrência na planta hospedeira, número de câmaras internas e indumento. No caso de galhas foliares, foi assinalada a sua ocorrência na face adaxial ou abaxial. A avaliação estrutural das galhas foi feita no Laboratório de Ecologia Funcional da UVV.

As análises morfológicas foram feitas em material fresco de folíolos sem galha, com galhas jovens, com galhas maduras e, num dos casos, com galhas senis. Exemplos de folíolos com galhas jovens foram separados em frascos de vidro protegidos por tela de malha inframilimétrica para acompanhar a eclosão dos insetos adultos. Parte das galhas foi dissecada para obtenção de estágios imaturos. Os exemplares das larvas foram identificados com auxílio de literatura especializada e fotografados em lupa.

Para as análises anatômicas, a fixação dos folíolos sem galhas e com os dois tipos estudados de galha em diferentes estádios de desenvolvimento foram fixados em campo no FAA 50 (Jensen, 1962). Após cerca de 40 minutos de transporte, os recipientes foram submetidos à câmara de vácuo por um período de duas horas para facilitar a penetração do fixador (Jensen, 1962). Em seguida as amostras foram lavadas em água destilada para a retirada de todo o fixador e conservadas em álcool 70%. As seções foram realizadas a mão livre, em

plano transversal à região nervura central do terço médio da lâmina foliolar e nas galhas em fase de maturação, em plano transversal e longitudinal (Johansen, 1940).

As seções obtidas foram diafanizadas em solução de hipoclorito de sódio (1:1), lavadas água destilada e neutralizadas em solução de ácido acético 5%, por cinco minutos. Após a neutralização as seções foram lavadas em água destilada até o total desaparecimento do odor de ácido acético e coradas com uma mistura de safranina e azul de astra (1:4), por 10 segundos e logo após as seções foram lavadas em água. As seções coradas foram montadas em meio à glicerina bidestilada e analisadas e fotografadas em microscópio óptico

A investigação in situ da natureza das impregnações avermelhadas na região das galhas foi feita através de microextração das regiões afetadas em metanol e etanol, posterior e exposição ao HCl a 1%, NH₄OH a 1% e AlCl₃ a 5% (Costa, 1972; Harborne, 1984).

Extração e análise fitoquímica do óleo essencial

As extrações de óleo essencial foram realizadas em triplicata, no laboratório de Ecologia Funcional da UVV. As amostras de folíolos com e sem galha foram separadamente pesadas em balança semi-analítica com exatidão de 0,01 g, trituradas e transferidos para um balão de destilação de 2 L. A extração do óleo essencial foi feita por hidrodestilação em aparelho Clevenger, durante uma hora de processo extrativo. A purificação do óleo essencial foi realizada após a separação da água residual do processo de extração, através da redução a temperatura ao ponto de congelamento da água, de modo a separar por escoamento do óleo essencial obtido que se manteve em fase líquida.

As amostras de óleos essenciais foram pesadas em balança analítica de exatidão 1mg e, posteriormente, calculados os valores de rendimento de cada extração para obtenção das análises quantitativas do material. As injeções das amostras em cromatografia em fase gasosa de alta resolução foram realizadas no Laboratório de Química Fina da Tommasi Analítica. O volume de injeção foi 2µL, composto por 1,9 µL de uma solução de óleo essencial (30mg/ml) e 0,1 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 da Thermo Scientific® Ultra GC acoplado a um espectrômetro de massa, 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 3° C por minuto, entre 60° -240° C. Os espectros de massa foram obtidos em 70eV a velocidade de varredura de 0,84 scan/s, na faixa de m/z 40-500 (Adams, 2009).

A identificação dos componentes dos óleos essenciais extraídos foi realizada no Laboratório de Ecologia Funcional da UVV. Num dos critérios aplicados para identificação das substâncias, 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, na comparação deles com a biblioteca espectral de CG-EM nos IK e IA calculados em comparação com a literatura disponível (Adams, 2009).

Análise estatística dos dados

A diversidade química para cada unidade morfológica trabalhada foi estimada pelo índice de Diversidade de Shannon-Weaver – H' . A equitabilidade foi determinada pelo índice de Pielou (Brower et al. 1997). 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. As diferenças entre as médias foram discriminadas 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, 2010)

Na avaliação das afinidades, foi utilizada uma matriz com os sinais detectados em eletronsvolts – eV – para os componentes dos óleos essenciais, corrigida em escala pela transformação *ranging* que acomodou todos os dados numa amplitude entre zero e um, 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 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 de Canberra, excluindo-se as ausências em comum. Para a matriz qualitativa, o coeficiente de distância utilizado foi a Distância Média de Manhattan. Em ambos os casos, o dendrograma foi construído pelo método de ligação de média de grupo. Os coeficientes de distância, os dendrogramas e seus respectivos coeficientes de correlação cofenética foram realizados no programa Fitopac versão 2.0 (Shepherd, 1995).

No estudo do gradiente químico foi aplicado o algoritmo da análise de espécies indicadoras – TWINSpan (Hill, 1979) utilizando os componentes químicos dos óleos essenciais e de cada unidade morfológica trabalhada, como classificadores que foram categorizados como compostos indicadores, preferenciais e não preferências para os blocos

formados pela maximização das discrepâncias encontradas nas mesmas matrizes qualitativa e quantitativa empregadas (ter Braak, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Descrição morfológica e estrutural das galhas de cecidomyiidae e psyllidae

As galhas de Cecidomyiidae em *P. icariba* são fusiformes, glabras, verdes durante boa parte do seu desenvolvimento, podendo apresentar estrias avermelhadas pela presença de antocianinas na senilidade. Podem se desenvolver tanto na face adaxial como na abaxial como em ambas as faces do folíolo (Figura 1.A). Possuem uma única câmara larval, onde se aloja apenas uma larva do indutor (Figura 1.B; Figura 1.C). Em galhas maduras foram encontrados 3 estágios larvais (Figura 1) e a presença do indivíduo adulto em material fechado em bote de vidro (Figura 1.F). O primeiro estágio larval apresenta coloração amarela e com desenvolvimento incompleto de tubo digestivo ventral (figura 1.B); o segundo estágio larval apresenta uma segmentação mais marcada, coloração amarela e com aparelho digestivo ventral de cor preta bem desenvolvido (figura 1.C), e o terceiro estágio já apresenta um desenvolvimento mais marcante com a mudança de coloração do corpo para laranja e a formação de exoesqueleto que irá dar origem ao cefalotórax e ao par de asas (figura 1.D). O adulto é um díptero com asas membranosas, balancins bem desenvolvidos, três pares de pernas ambulatórias com estrias pretas e brancas e um par de antenas (figura 1.F). A exúvia foi encontrada presa ao canalículo de saída em um dos materiais vistoriados (figura 1.E).

As galhas de Psyllidae são campanuladas, glabras, de cor vinosa pela presença de antocianinas e se desenvolve apenas na face abaxial dos folíolo (Figura 2.A; figura 2.B). Possui uma única câmara larval que não é fechada pelo tecido vegetal da galha, mas pelo corpo do próprio inseto em desenvolvimento (Figura 2.B). Na superfície do local onde ocorreu a ovoposição, os ovos (figura 3.A), e quatro estágios larvais (figura 3.B; figura 3.C; figura 3.D; figura 3.E) se apresentaram envoltos por um material lanuginoso branco, que também foi observado nas imediações do corpo das pupas obliterando a câmara larval de onde eclode o inseto adulto (figura 3.F).

Maia (2001) relatou em estudo sobre galhas nas restingas, a ocorrência de oito tipos de galhas associado *Protium*: 2 tipos em *Protium brasiliense*; 2 em *Protium heptaphyllum*; e 4 em *Protium icariba*. Em outro estudo Maia et al. (2002) 2 novas espécies de Cecidomyiidae foram descritas para *Protium icariba*: *Dactylodiplosis icaribae* Maia, 2002 e *Lopesia*

simplex Maia,2002. Maia (2013) reconhece 4 morfotipos de galhas em folhas e 1 morfotipo em fruto de *Protium icariba*, a partir de suas pesquisas e de outros autores.

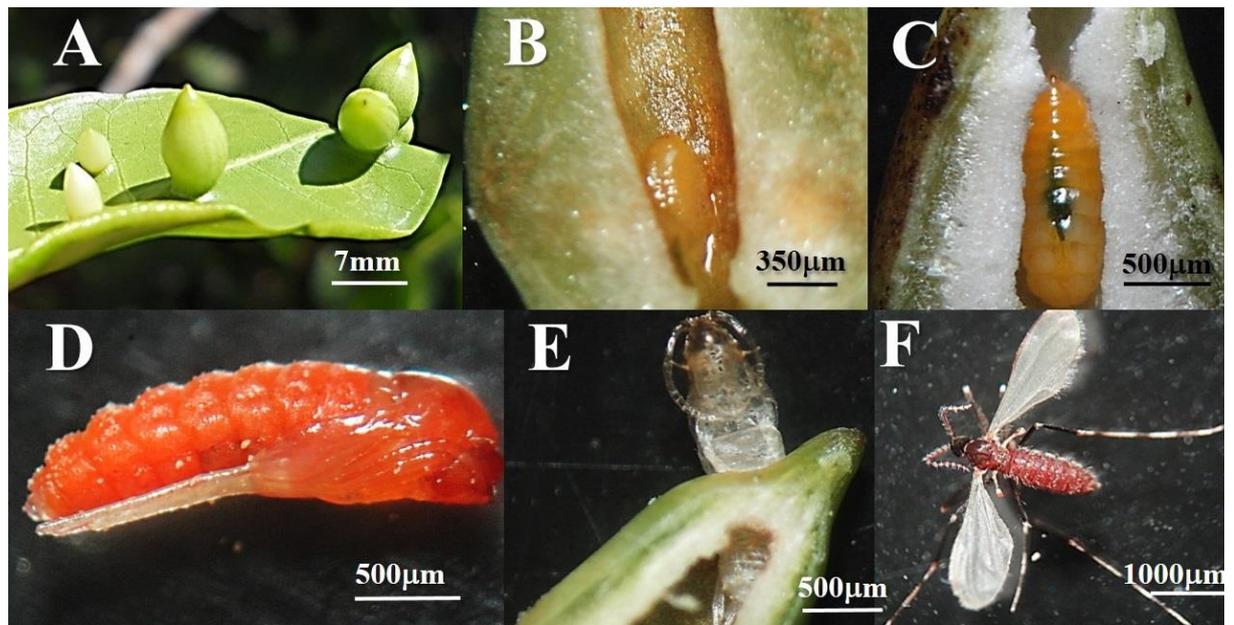


Figura 1 Galhas cecidomyiidae em *Protium icariba* (DC) Marchand. A- galha fusiforme; B- larva fase inicial; C- larva fase pré pupa; D – pupa; E- exúvia; F- adulto

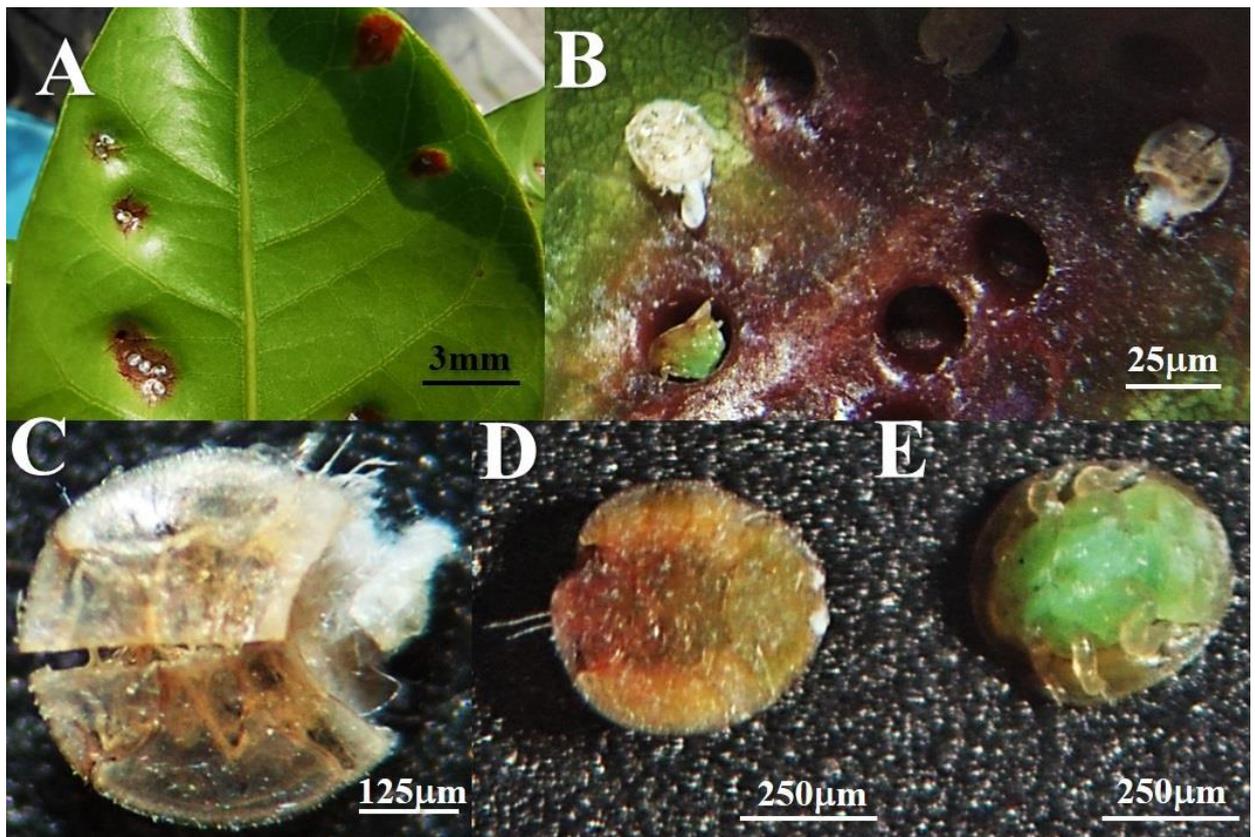


Figura 2 Galhas em psyllidae em *Protium icariba* (DC) Marchand. A- galha campanulada; B- câmara larval; C- exúvia; D- larva vista dorsal; E- larva vista ventral

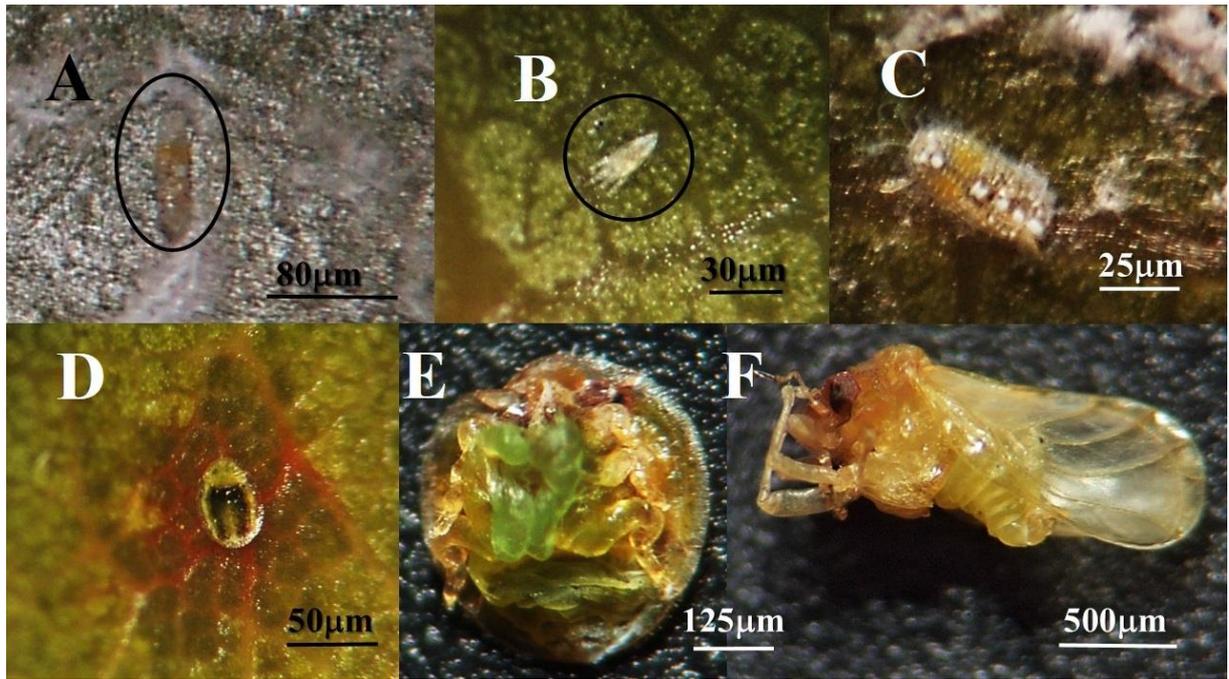


Figura 3 Galhas em psyllidae em *Protium icariba* (DC) Marchand. A-postura do ovo; B- larva (L1); C- larva(L2); D- larva (L3); E- larva (L4); F- adulto

Tanto nos folíolos sem galha, como nas porções sadias dos folíolos com galhas, foi observado um mesofilo dorsiventral típico, com o parênquima clorofiliano paliçádico na face adaxial e o lacunoso na abaxial (Figura 4; figura 5; figura 6). Contudo na galha de cecidomyiidae e psyllidae, a modificação mais evidente é a formação e a disposição de parênquima fundamental, com formas celulares diferentes das que ocorrem no mesofilo onde se desenvolveram (figura 5; figura 6).

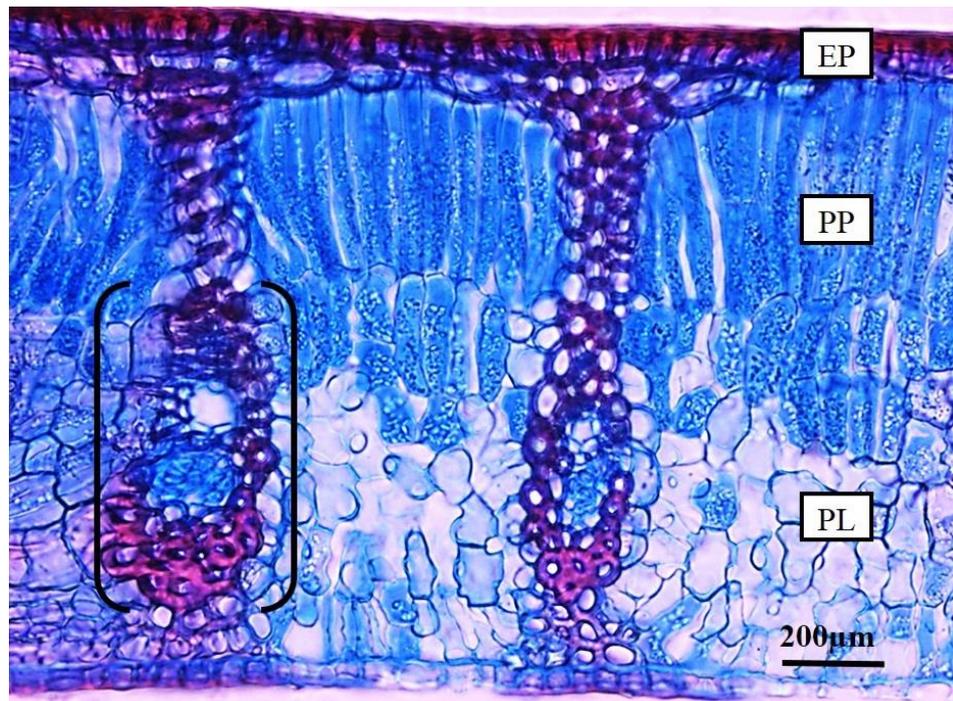


Figura 4. *Protium icariba*: corte transversal do foliolo. Delimitação mostra bainha de feixe de natureza esclerenquimática em torno dos feixes vasculares. Disposição dorsiventral do mesófilo, com parênquima palicádico (PP) voltado para a face adaxial e o parênquima lacunoso (PL) voltado para a face abaxial. Epiderme (EP)

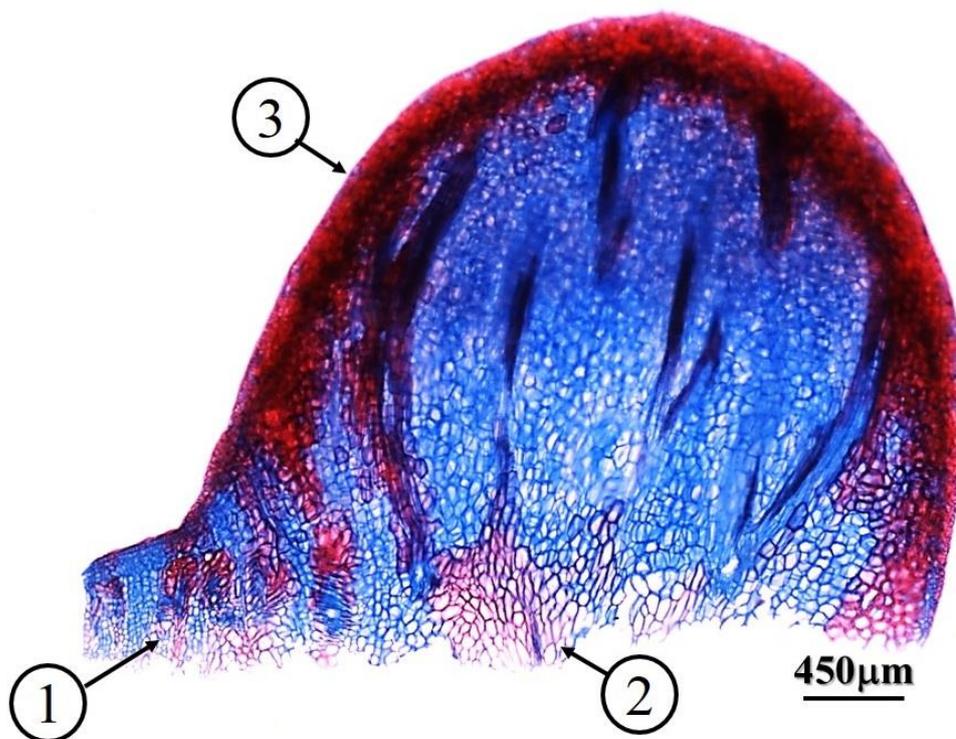


Figura 5. Galha de Cecidomyiidae em *Protium icariba*: corte longitudinal da galha. Seta 1: formação das características hiperplásica; seta 2: esclerênquima na porção da câmara larval em formação; seta 3: esclerênquima envolvendo a superfície externa da galha

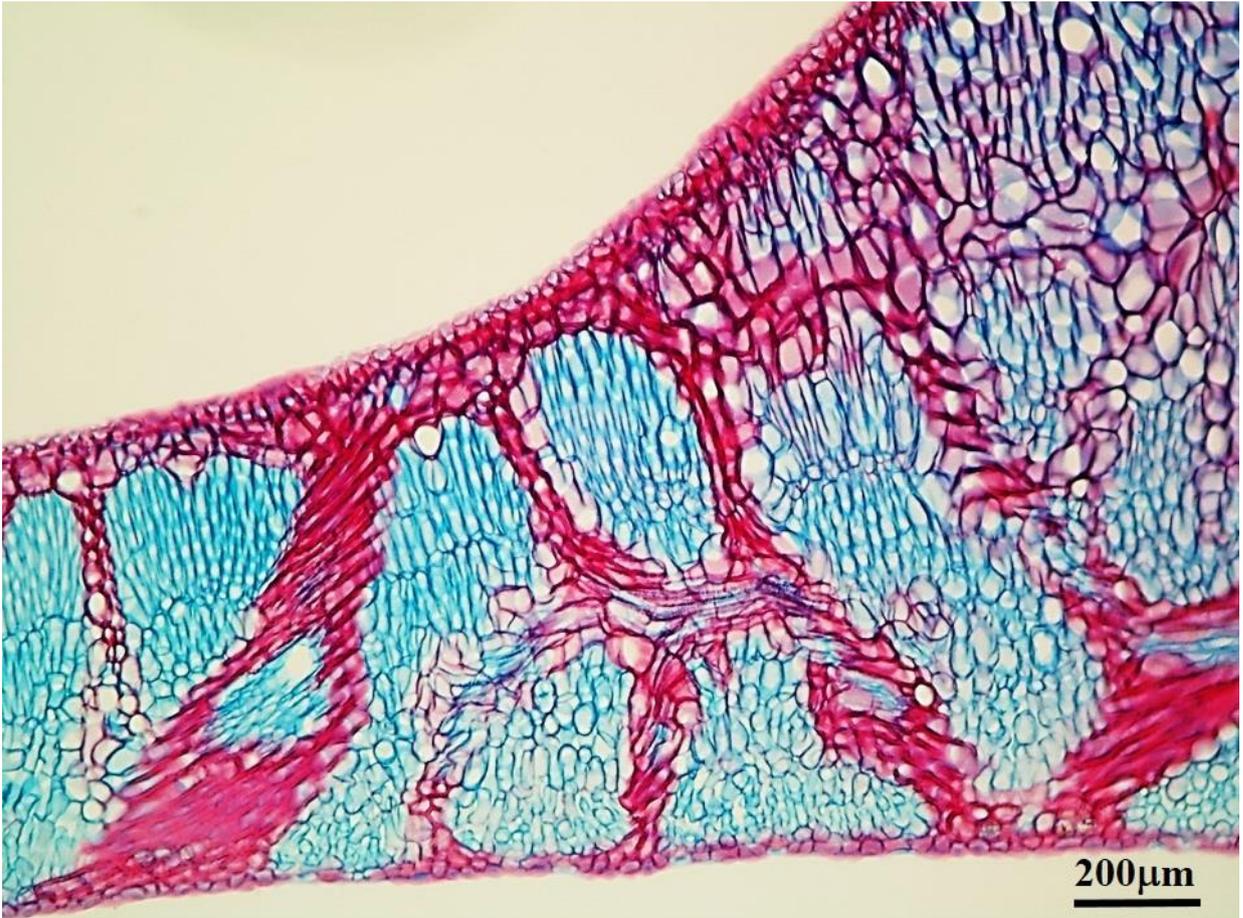


Figura 6. Galha de Psyllidae em *Protium icicariba*: corte longitudinal da galha.

A perda da diferenciação dos parênquimas paliçádico e lacunoso, formando um parênquima fundamental pode ser uma característica atribuída ao efeito indutor da galha, devido a essa profunda modificação no mesófilo da folha provocada em *Protium icicariba*. Isto pode ser entendido como uma forma de demonstrar a adaptação aos agentes indutores de galha, 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 seu crescimento e desenvolvimento (Dawkins, 1982; Stone & Schönrogge, 2003).

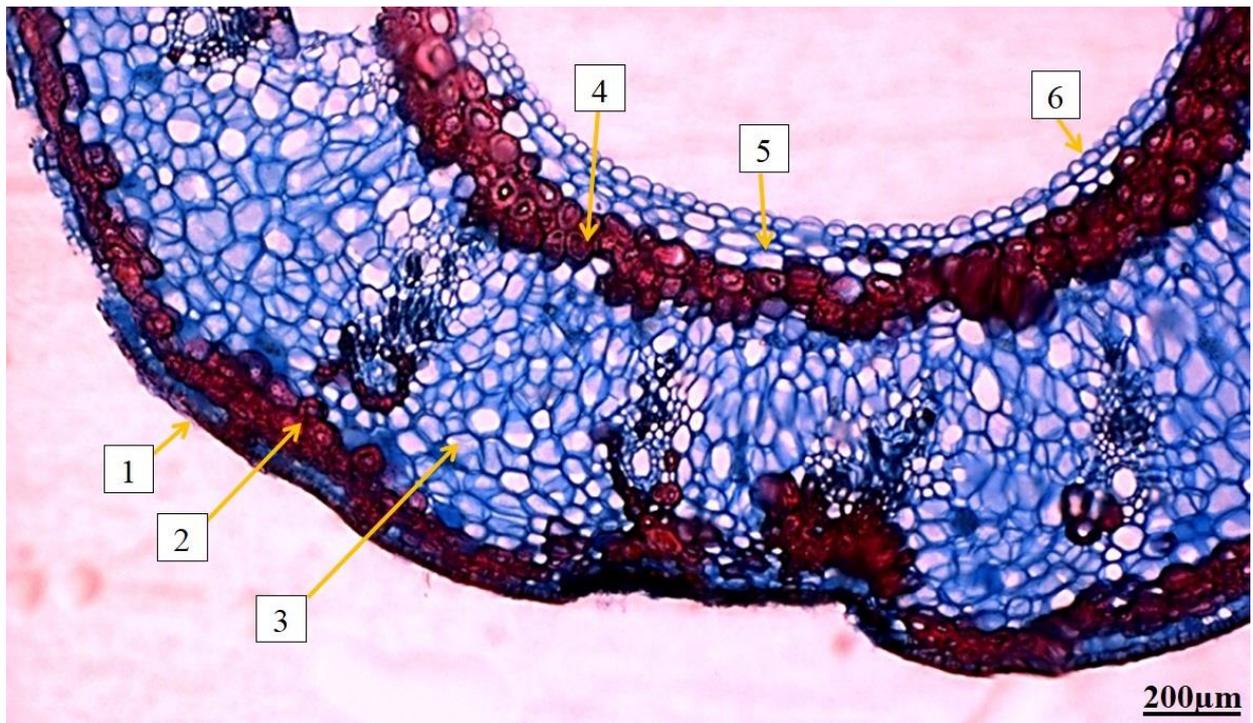


Figura 7. Galha Cecidomyiidae em *Protium icariba*: detalhe do corte transversal da galha. Seta 1: epiderme da parede externa da galha; seta 2: esclereídeos; seta 3: colênquima; seta 4: esclereídeos; seta 5: colênquima; seta 6: epitélio da parede da câmara larval

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 (Figura 7). A parede interna da câmara larval apresenta disposição diferente da parede externa. Com camadas de células esclerenquimáticas formadas por esclereídeos, voltadas mais externamente à parede da camera larval, camadas de células colenquimáticas preenchendo o espaço entre o esclerênquima e o epitélio unisseriado não cutinizado que delimita seu espaço interno. Não foi observado nenhum tecido com características de nutrição.

A presença de um epitélio não cutinizado que reveste a câmara larval 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 dentro da câmara larval favorecendo o acesso da larva à alimentação. Além disso as pontuações em células vegetais em tecidos cujas paredes foram lignificadas permitem a troca de água e solutos orgânicos hidrossolúveis, poderiam constituir um modo complementar a essa relação (Evert, 2005). Em estudo histológico da epiderme de *Pistacia terebinthus* com galhas, provocadas por três pulgões diferentes, mostrou que a epiderme multiseriada observada nas três

galhas, representa uma barreira destinada a impedir a entrada de água da parede exterior para o interior da galha, viabilizando um ambiente seco hidrofóbico que é crucial para a sobrevivência dos insetos (Álvarez et al., 2009)

Nas galhas de Psyllidae a formação da câmara larval envolve modificações estruturais, uma vez que não há tumoração do folíolo, mas sim um crescimento apressado da própria lâmina foliolar, 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 refiã da galha desenvolve uma coloração vinosa decorrente da deposição de antocianinas. 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 estafio da galha foi considerado inativo para o desenvolvimento do inseto.



Figura 8. Galha Psyllidae em *Protium icariba*: detalhe do corte transversal da galha.

As camadas de células esclerenquimáticas encontradas em ambas as paredes externas da galha de Cecidomyiidae e Psyllidae e da câmara larval, são constituídas de esclereídeos. Os esclereídeos tem 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 confere aos tecidos da galha maior capacidade de resistir ao esmagamento. (Dorchin et al., 2002; Evert, 2005).

A formação de esclereídeos pode ser atribuída também ao envolvimento dos hormônios, em especial, a 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*, poderia estar atuando em nível molecular na regulação da expressão gênica da planta, acoplado a resposta cecidogênica, 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 são alterados pela diferenciação e rediferenciação destas células, podendo revelar a origem e a trajetória das formas peculiares e variabilidade dos morfotipos (Oliveira & Isaias, 2010). Bem como uma forma de demonstrar a adaptação aos agentes indutores de galha, 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 seu crescimento e desenvolvimento (Stone & Schönrogge, 2003).

De acordo com Stone & Schönrogge (2003) a diversificação da estrutura interna de galhas devem ser relacionadas com a nutrição de seus habitantes, enquanto que as variações na estrutura externa estariam relacionadas à defesa contra inimigos. A parede externa da galha de cecidomyiidae e psyllidae composta em parte por esclerênquima, no tecido com galha induzida em *Protium icicariba* indica forte relação com a defesa mecânica contra os inimigos externos. Adicionalmente as adaptações com fins de alimentação na parede interna da câmara larval, a presença de tecido esclerênquimático compondo esse estrutura, pode ser também um bom apontador que a mesma sirva como artefato de defesa a favor do inseto indutor em desenvolvimento no interior no galha. Essa seria uma defesa adicional ao indutor, já que as galhas em *Protium icicariba* não apresentam outras formas de defesa como pêlos, tricomas e cristais.

É claro que galhas fornecem nutrição e proteção contra variações bioclimáticas aos seus habitantes, todavia as galhas não estão livres de inimigos. Inserido nesse contexto, as adaptação de defesa contra os inimigos naturais seriam as responsáveis por sua grande diversidade de morfotipos, embora essa hipótese ainda precise ser confirmada (Stone & Schönrogge, 2003). A respeito do significado evolutivo das galhas as linhas de investigação que abrangem as hipóteses: nutricional, microambientais e de proteção contra os inimigos, são atualmente as vias mais promissoras de análise e passíveis de estudos adicionais (Stone & Schönrogge, 2003).

Uma das características histológicas dos cortes transversais dos folíolos de *Protium icicariba* é a existência no mesófilo de uma bainha de feixe vascular (Figura 9), e estruturas secretoras associadas aos feixes vasculares desde a nervura principal (Figura 9) até as nervuras secundárias (Figura 5), com a formação de uma cavidade secretora (Figura 6, Figura 9), sem a formação de um ducto propriamente dito, revelado claramente por um corte tangencial eventual ao corte transversal do mesófilo do folíolo (Figura 8). Na nervura principal, há em torno das 8-13 cisternas secretoras dispostas em um arranjo circular sinuoso, e uma bainha de fibras esclerenquimáticas que abrange além dessas, 8 feixes vasculares com presença de bainha de feixe situados mais internamente, dispostos também em um círculo sinuoso (Figura 7, Figura 9). Pela característica de resistência mecânica essas fibras esclerenquimáticas podem desempenhar entre outros papéis, o de proteção ao 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 (Figura 9).

Os feixes vasculares dispostos radialmente na galha de *Cecidomyiidae* em *P. icicariba*, não apresentam bainha de feixe ao seu redor (Figura 11; Figura 12). 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 indutor 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 também ocorrem 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 saudáveis de *P. terebinthus* apresentam este mesmo padrão (Álvarez et al., 2009).

Óleo essencial

Tanto nos folíolos como nas galhas encontradas o óleo essencial está disperso em resina, formando uma oleorresina que se acumula em ductos e cavidades secretoras. Os ductos secretores, presentes em folíolos e pecíolos, acompanham nervuras principais e secundárias, contudo as nervuras secundárias de menor calibre não foram vistas associadas a ductos em seções transversais da lâmina foliar (Figura 9). Seções transversais da nervura primária mostram uma bainha de fibras esclerenquimáticas que delimita a região vascular, onde as estruturas secretoras, em média de 8-13, estão dispostas em um arranjo circular sinuoso, além de 8 feixes vasculares (Figura 10). Em seções paradérmicas observa-se ductos retorcidos dentro das aréolas (Figura 11). E o feixe vascular no pecíolo mostra-se concêntrico anficrival (Figura 12).

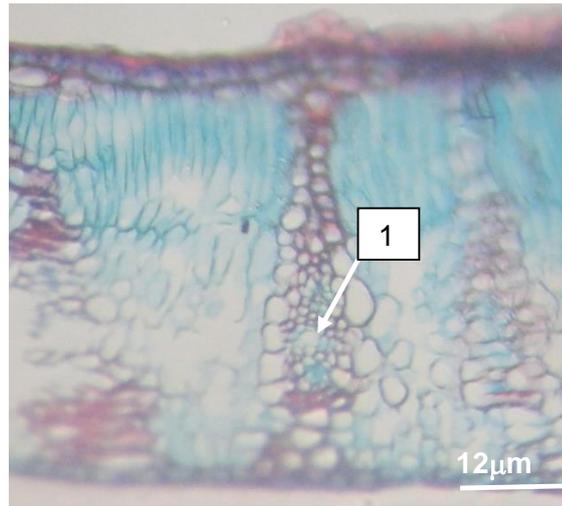


Figura 9 *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal do mesofilo de folíolos. 1- Estrutura secretora.

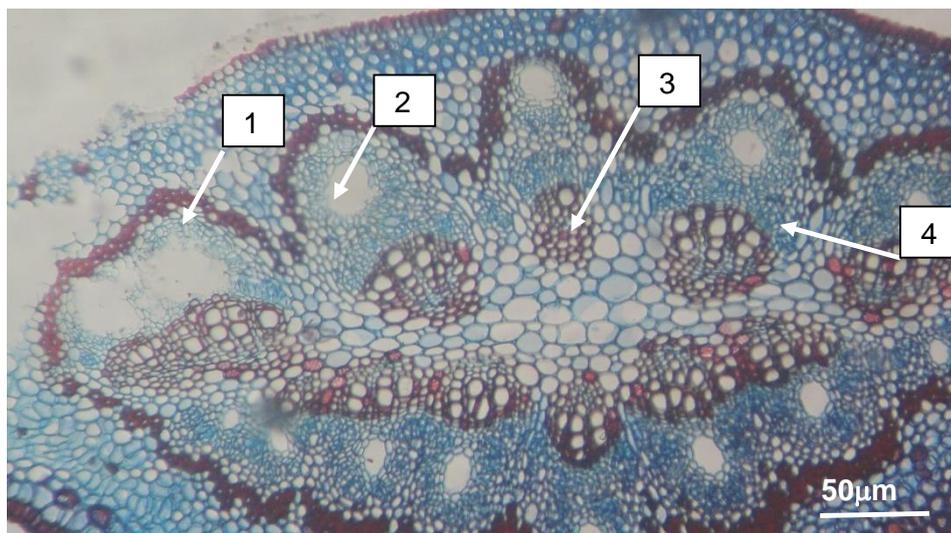


Figura 10 *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal da nervura principal. 1- Bainha de fibras esclerenquimáticas; 2- Estrutura secretora; 3- Xilema; 4- Floema.

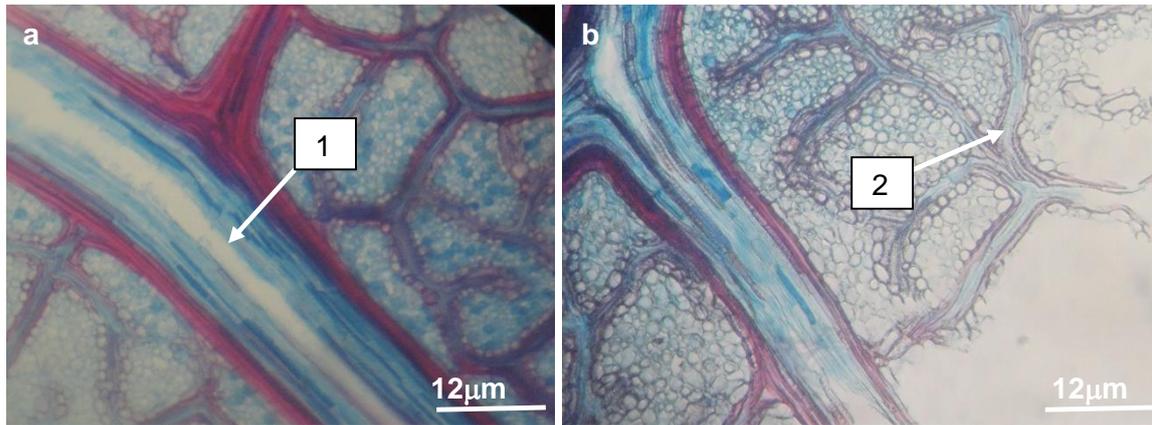


Figura 11 *Protium icariba* (DC) Marchand. Nervura principal seccionada longitudinalmente a) Nervura secundária evidenciando o ducto: 1- Ducto. / b) Aréolas contendo ductos retorcidos: 2- Ducto retorcido.

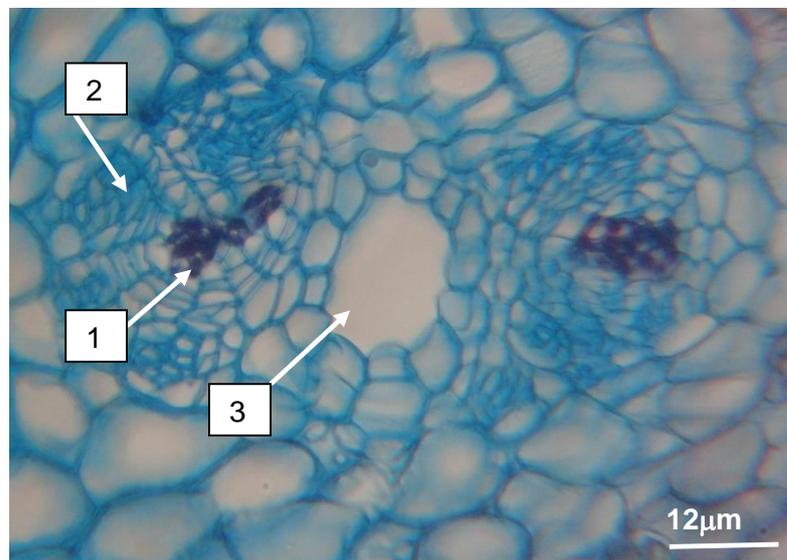


Figura 12 *Protium icariba* (DC) Marchand. Secção transversal do peciolo evidenciando o ducto bicollateral entre dois feixes vasculares concêntricos anficrivais. 1- Xilema; 2- Floema; 3- Ducto.

Nos ramos as estruturas secretoras ocorrem entre as células do floema num cilindro vascular delimitado por uma bainha esclerenquimática, onde os feixes vasculares são colaterais (Figura 10).

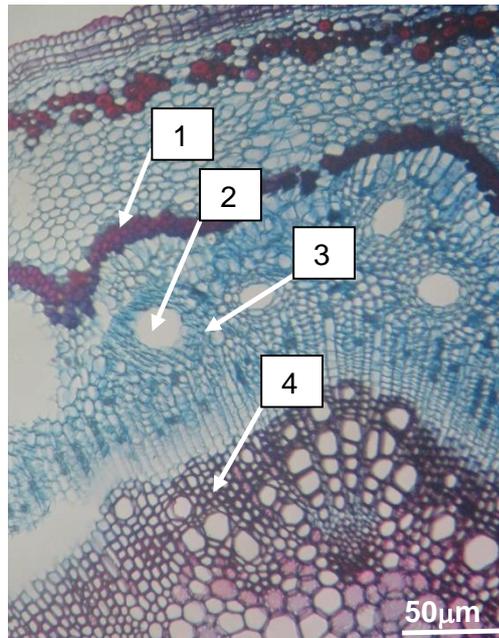


Figura 13 *Protium icicariba* Secção transversal do ramo. 1- Bainha esclerenquimática; 2- Estrutura secretora; 3- Floema; 4- Xilema

O óleo essencial extraído dos folíolos de *P. icicariba* sem galha e com galha Cecidomyiidae e Psyllidae ativa e 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 folíolos sem galha e dos com galhas inativas de psyllidae ($F=33,409$; $df=3:8$; $p=0,00$; $r=0,962$; $r^2=0,926$). Os insetos galhadores podem ser considerados como um tipo de herbívoro especializado que para completar seu ciclo de vida, obrigatoriamente são indutores de galhas na planta hospedeira, direcionando a maior parte da sua capacidade para controlar e redirecionar o desenvolvimento e a fisiologia dos órgãos da planta atacada em seu próprio benefício (Shorthouse et al., 2005). A diminuição na produção de óleo essencial acompanhada do processo de indução de galha em *Protium icicariba*, pode ser um processo que evidencia uma capacidade dos galhadores em atuar em um nível cecidogenético na planta hospedeira, modulando a capacidade quantitativa de síntese de óleos essenciais enquanto as galhas estão em processo ativo.

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 ($F=0,971$; $df=3:8$; $p=0,453$; $r=0,517$; $r^2=0,267$), equitabilidade ($F=1,184$; $df=3:8$; $p=0,375$; $r=0,555$; $r^2=0,308$) (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento, riqueza, diversidade química do óleo essencial de folíolos sem galha e com galha de cecidomyiidae e psyllidae em *Protium icicariba*.

Origem	Média ± Intervalo de Confiança a 95%			
	Rendimento (g/%)	Riqueza	Diversidade química (H')	Equitabilidade (J)
Foliolo sem galha	0,619 ^a ± 0,363	3,251 ^a ± 0,622	2,182 ^a ± 0,808	0,510 ^a ± 0,175
Galha cecidomyiidae	0,099 ^b ± 0,049	2,258 ^a ± 1,169	2,454 ^a ± 0,928	0,643 ^a ± 0,299
Galha psyllidae ativa	0,148 ^b ± 0,037	1,721 ^a ± 0,262	2,279 ^a ± 1,323	0,606 ^a ± 0,336
Galha psyllidae inativa	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 diferenças significativas.

O número de substâncias químicas detectadas nos óleos essenciais analisados variou entre as amostras. Enquanto no óleo essencial da folíolos sem galha foram encontrados 91 compostos, nos folíolos com galha cecidomyiidae foram encontrados 67, nos folíolos com galha de psyllidae inativos foram encontrados 101 compostos, folíolos com galha de psyllidae ativos 56 compostos.

Foram considerados para todas as amostras de óleos essenciais extraídos a presença de 12 compostos majoritários, listados em suas respectivas tabelas. Sendo representados para folíolos sem galha (Tabela 2) um total de 86,26% de toda a amostra. Folíolos com galha de cecidomyiidae (Tabela 3), um total de 87,3%. Os folíolos com galha de psyllidae ativa um total de 77,94% (Tabela 4). E folíolos com galha de psyllidae inativa, um total de 88,29%. (Tabela 5).

Tabela 2 Compostos majoritários nos folíolos sem galha de *Protium icicariba* (DC) Marchand dos

Índices de Retenção					
Van der Dool e Kratz		Kovats		Substâncias	%
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1031	1032	1036	1037	Z- β -ocimene	20,59
1016	1014	1020	1017	α -terpinene	13,89
1483	1483	1484	1484	α -amorphene	9,90
1055	1054	1060	1059	γ -terpinene	8,03
1424	1423	1425	1424	4,8- β -epoxy-caryophyllane	7,33
1536	1537	1538	1538	α -cadinene	6,48
985	984	987	987	3- <i>p</i> -menthene	6,08
931	932	939	939	α -pinene	4,17
1450	1449	1452	1451	α -himalachene	3,38
1001	1002	1002	1002	α -phellandrene	2,31
1525	1527	1527	1528	E- γ -macrocarpene	2,25
1575	1577	1577	1578	spathulenol	1,85
Total					86,26

Tabela 3 Compostos majoritários nos folíolos com galha de Cecidomyiidae em *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção					
Van der Dool e Kratz		Kovats		Substâncias	%
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1370	1369	1372	1371	cyclosativene	28,06
984	983	988	987	cis- <i>m</i> -mentha-2,8-diene	15,59
1003	1003	1003	1004	<i>p</i> -mentha-1(7),8-diene	10,37
931	932	939	939	α -pinene	5,96
1410	1409	1410	1409	α -gurjunene	5,36
1436	1436	1438	1438	β -humulene	5,15
1380	1380	1382	1382	2-epi- α -funebrene	3,78
1327	1326	1329	1328	limonene aldeyde	3,78
1520	1520	1521	1522	7-epi- α -selinene	2,36
1454	1454	1456	1456	α -patchoulene	2,30
1403	1405	1404	1405	italicene	2,30
1483	1483	1484	1484	α -amorphene	2,29
Total					87,3

Tabela 4 Compostos majoritários nos folíolos com galha de Psyllidae ativa de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção				Substâncias	%
Van der Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1408	1407	1409	1407	longifolene	30,73
1031	1032	1036	1037	Z- β -ocimene	10,33
1483	1483	1484	1484	α -amorphene	6,97
1016	1014	1020	1017	α -terpinene	5,91
1427	1429	1428	1431	cis-thujopsene	5,26
1503	1502	1503	1502	trans- β -guaiene	3,58
931	932	939	939	α -pinene	2,96
1552	1554	1554	1555	β -vetivenene	2,72
1575	1577	1577	1578	spathulenol	2,65
1492	1492	1492	1492	δ -selinene	2,37
1462	1460	1464	1462	dehydro-aromadendrane	2,25
1450	1449	1452	1451	α -himalachene	2,21
Total					77,94

Tabela 5 Compostos majoritários nos folíolos com galha de Psyllidae inativa de *Protium icicariba* (DC) Marchand.

Índices de Retenção				Substâncias	%
Van der Dool e Kratz		Kovats			
Calculado	Adams 2009	Calculado	Adams 2009		
1320	1319	1321	1321	neo-verbanol acetate	18,431
969	969	976	975	sabinene	16,980
1380	1380	1382	1382	2-epi- α -funebrene	15,177
949	946	958	954	camphene	8,611
904	906	905	908	santolina triene	5,504
931	932	939	939	α -pinene	5,181
1329	1328	1331	1330	(E)-patchenol	4,131
1392	1390	1393	1391	sativene	3,359
1459	1458	1460	1460	allo-aromadendrene	2,855
1352	1352	1354	1355	α longipinene	2,806
1235	1235	1238	1239	Isobornyl formate	2,799
1275	1274	1277	1276	β -pregeijerene	2,456
Total					88,29

A composição quantitativa e a qualitativa dos óleos essenciais extraídos evidenciaram um agrupamento bem distinto entre os óleos essenciais das amostras de folíolos sem galhas com folíolos que apresentavam galhas de Psyllidae inativas e ambas as galhas ativas. (Figura 14 e 15).

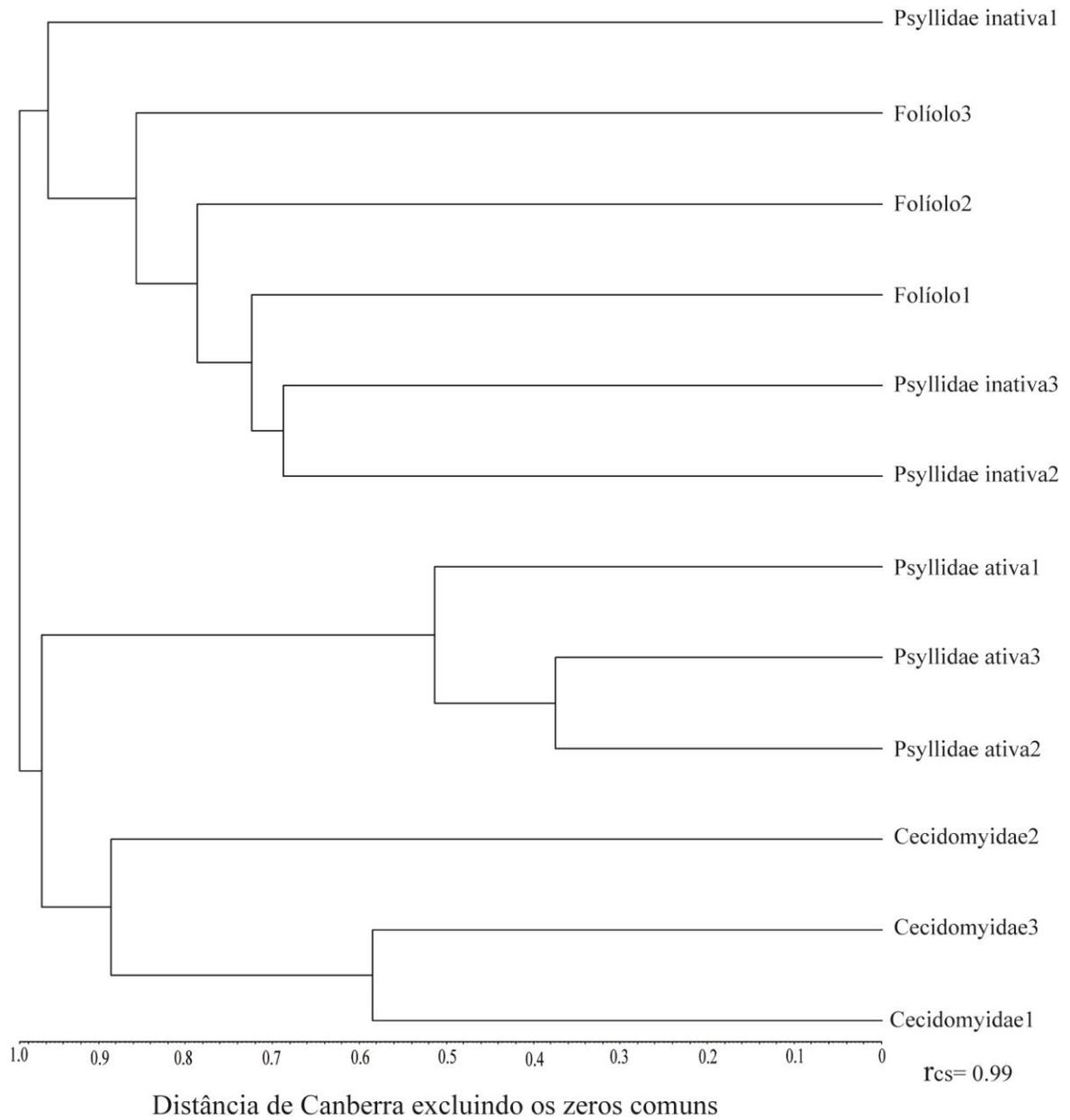


Figura 14. Dendrograma de agrupamento das amostras de óleos essenciais de de folíolos com e sem galhas *Protium icicariba* (DC) Marchand, construído a partir da média de grupos formados pelo coeficiente de Distância de Canberra excluindo os zeros comuns.

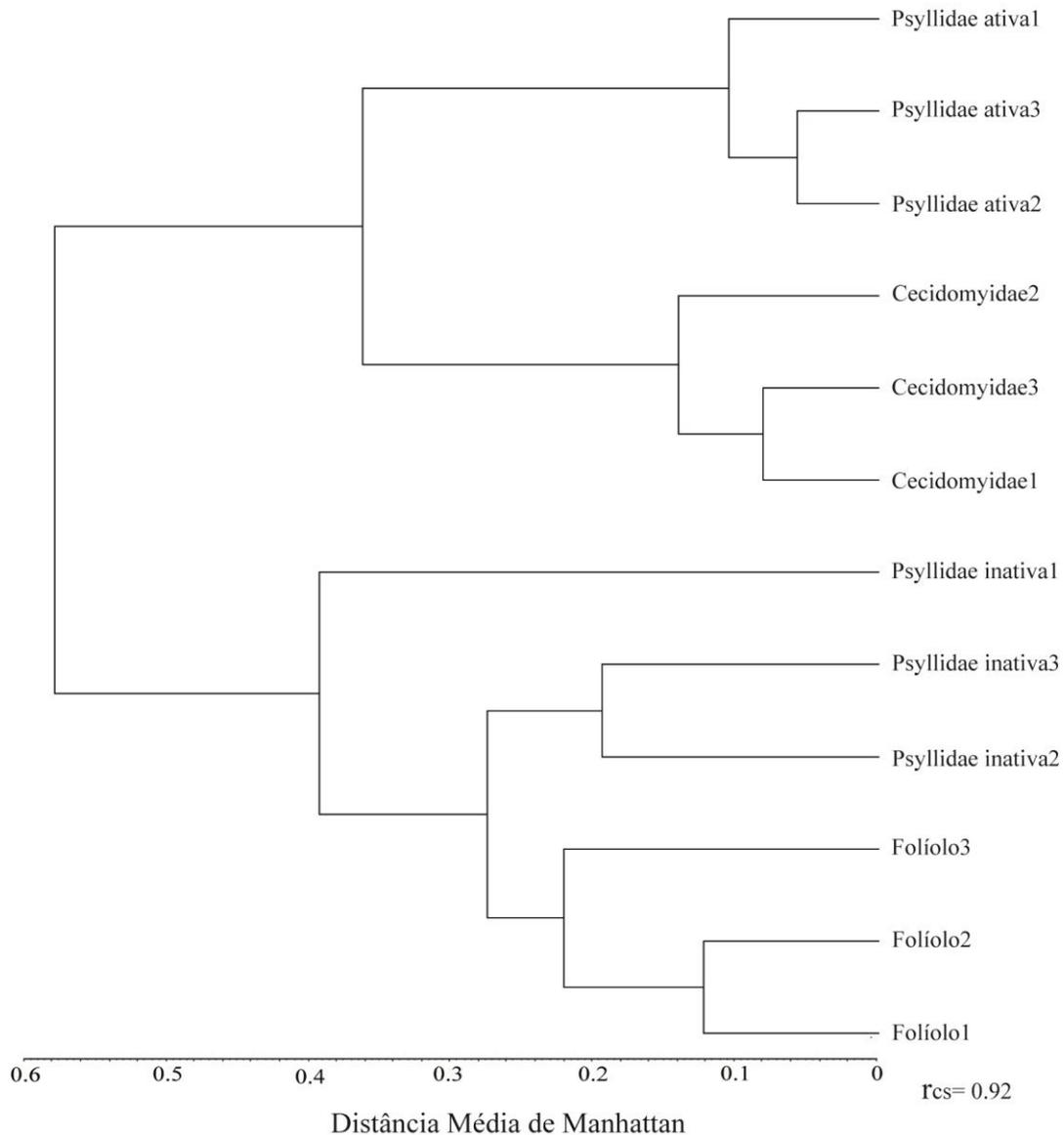


Figura 15. Dendrograma de agrupamento das amostras de óleos essenciais de de folíolos com e sem galhas *Protium icicariba* (DC) Marchand, construído a partir da média de grupos formados pelo coeficiente de Distância Média de Manhattan.

Tanto quantitativa como qualitativamente, a química dos óleos essenciais produziu a definição de grupos distintos de amostras para as galhas ativas de Cecidomyidae e Psyllidae, que por sua vez se separam bem distintamente da composição química do óleo essencial dos folíolos que não têm galhas ou cujas galhas de Psyllidae estão inativas.

A análise de substâncias indicadoras (Figuras 16 e 17) revelou que não necessariamente os compostos majoritários podem determinar a identificação típica dos óleos essenciais em questão, e ajudou a definir que 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.

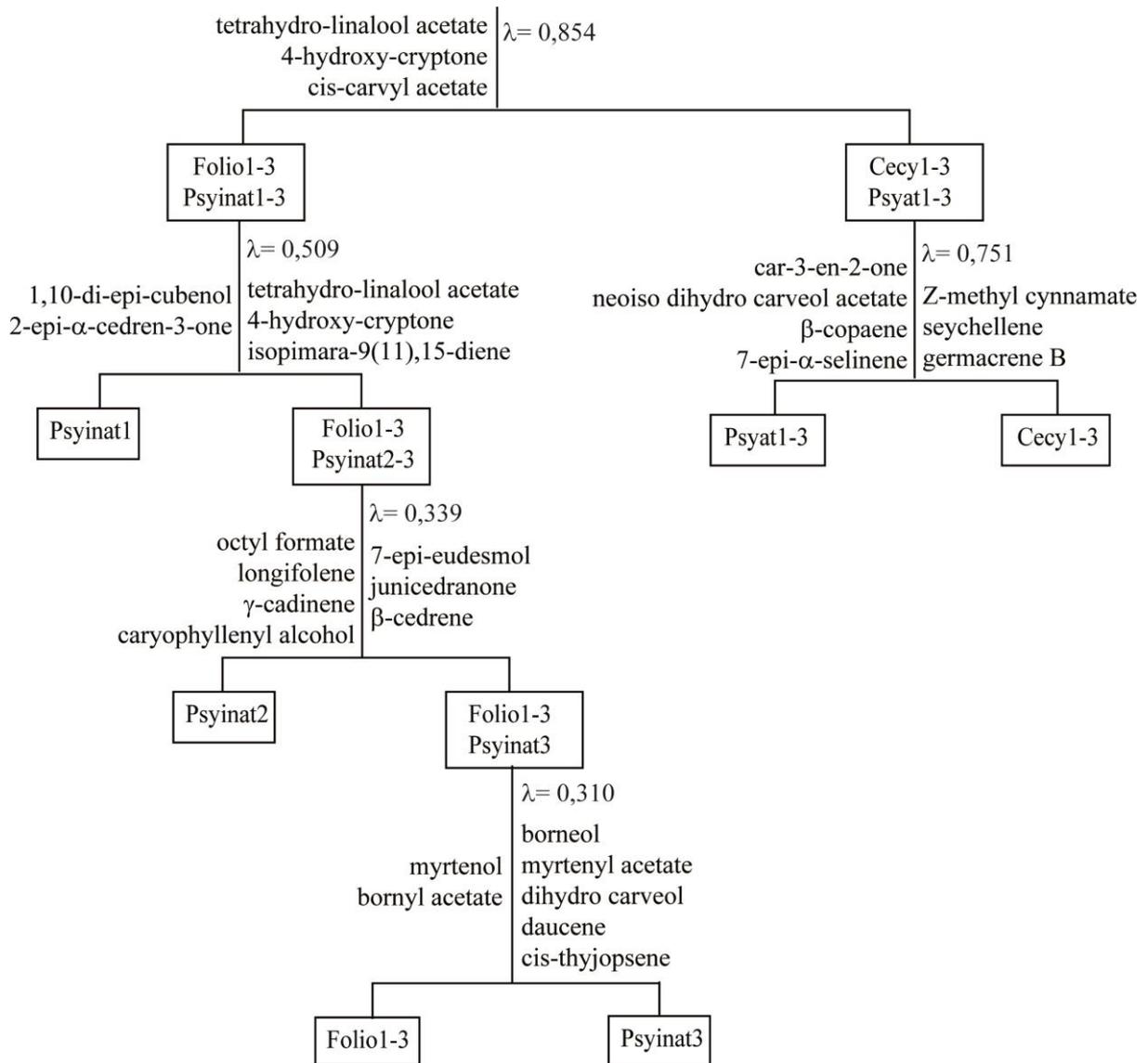


Figura 16. Diagrama de ordenação por análise de substâncias indicadoras (TWINSPAN) considerando a composição quantitativa entre os óleos essenciais de folíolos sem galhas (Folio), folíolos com galhas de Cecidomyidae (Cecy), com galhas ativas de Psyllidae (Psyat) e galhas inativas de Psyllidae (Psinat)

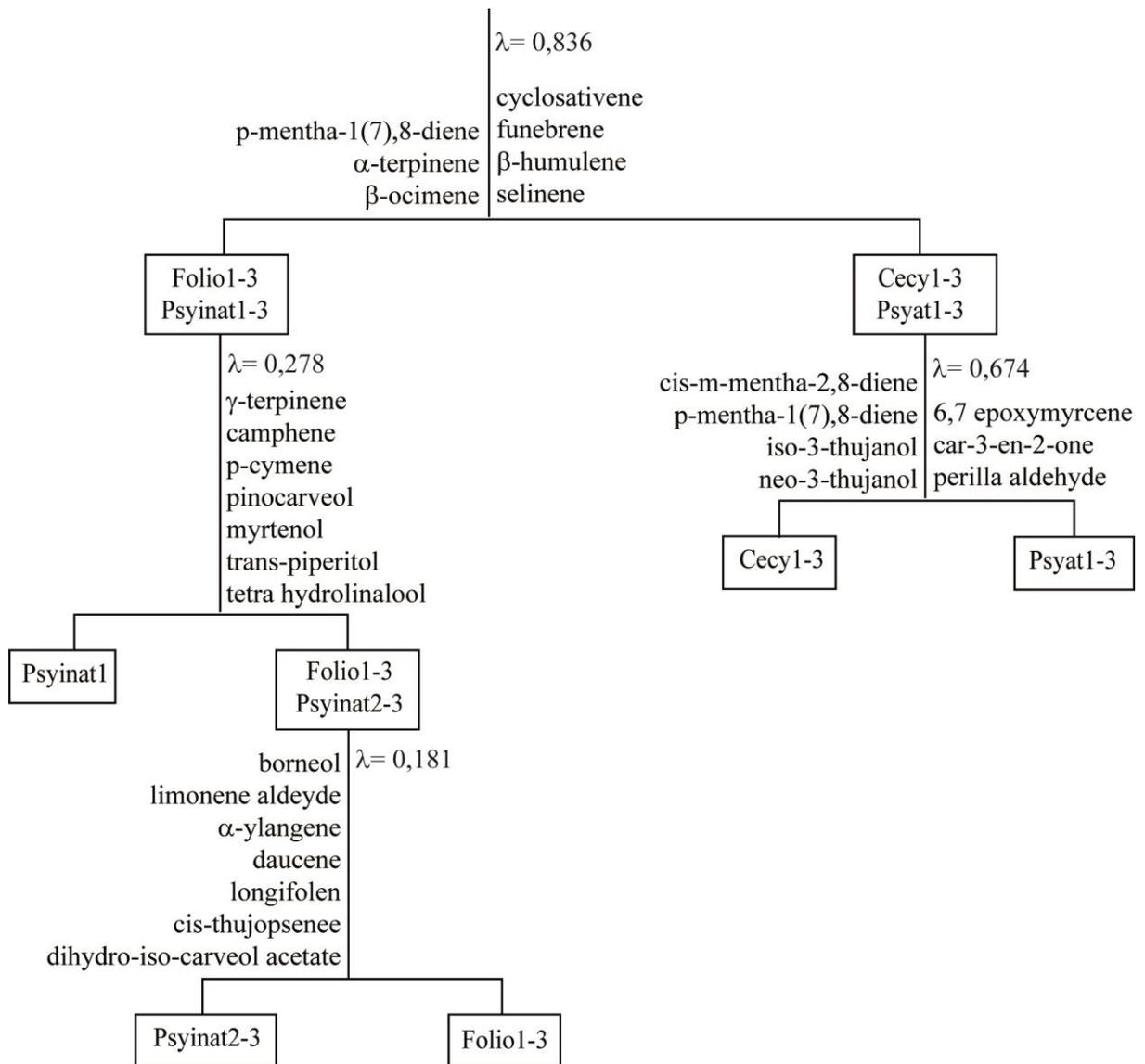


Figura 17. Diagrama de ordenação por análise de substâncias indicadoras (TWINSpan) considerando a composição qualitativa entre os óleos essenciais de folíolos sem galhas (Folio), folíolos com galhas de Cecidomyidae (Cecy), com galhas ativas de Psyllidae (Psyat) e galhas inativas de Psyllidae (Psyinat)

A literatura tem consagrado a existência de ductos secretores de oleorresina em espécies do gênero *Protium* (Engler, 1874), ao mesmo tempo em que são também comuns os relatos de ductos e cavidades secretoras tanto para este gênero como para a família Burseraceae (Siani et al., 2004).

A análise anatômica dos folíolos e ramos jovens, permitiu evidenciar os dois padrões de estruturas secretoras. As cavidades, desde isodiamétricas até romboides, foram visualizadas em regiões parenquimáticas, sem associações mais imediata com floema. Os ductos, mais calibrosos, foram facilmente visualizados nos ramos e nervuras secundárias dos folíolos, assim como em meio ao tecido do fruto que constituiria o mesocarpo carnoso. A

mesma distribuição de ductos secretores associados ao floema em traços vasculares de pequeno calibre foi identificada em flores de *Protium morii* D.C. Daly e *P. obtusifolium* Marchand (Bachelier & Edress, 2009). A oleorresina de *P. icicariba* pode ser encontrada em todas as partes da planta. Contudo, o perfil fitoquímico qualitativo e quantitativo evidenciou óleos essenciais com características bem distintas, dependendo da existência ou da atividade da galha.

A equitabilidade encontrada evidencia a maneira pela qual o número de substâncias químicas está distribuído em suas proporções nas espécies em estudo, indicando o grau de simetria na distribuição proporcional de massas entre os componentes dos óleos essenciais. Os valores menores que um vão expressando uma concentração cada vez mais irregular entre os componentes na medida em que se aproximam de zero, o que é muito comum nos óleos essenciais nos quais se identificam facilmente mais de 40 substâncias, porém apenas um pequeno número é responsável pela maior proporção de massas (Bakkali et al., 2008).

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 planta, o que pode variar de acordo com a família. Podem ser produzidos em células secretoras, cavidades, ductos, células epidérmicas e tricomas, assim como visto em cortes anatômicos de *Protium icicariba* nos folíolos e ramos a presença de ductos e nos frutos cavidades. Geralmente, possuem densidade menor que da água e são solúveis em compostos orgânicos (Bakkali et al., 2008).

A composição química dos óleos essenciais sofre importante influência do ambiente e tipo de cultivo que o vegetal é submetido, especialmente nas espécies cuja estocagem ocorre em regiões mais superficiais (Maciel et al., 2002). Os óleos podem conter, mais comumente, cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Geralmente 2 ou 3 componentes apresentam-se em maior concentração (20 – 70%) que vão caracterizar o óleo e determinar sua propriedade biológica (Bakkali et al., 2008).

Os mono e sesquiterpenos dominaram o perfil cromatográfico dos óleos essenciais estudados. Este fato tem sido comumente descrito na literatura onde as oleorresinas se apresentam como uma dispersão natural de ácidos diterpênicos em uma mistura de mono-e sesquiterpenos, que são os principais componentes do óleo essencial (Rigamonte-Azevedo et al., 2006; Cole, 2008).

A composição majoritária dos óleos essenciais estudados (Tabelas 2 a 5) divergem dos encontrados no óleo essencial dos folíolos constituído principalmente sesquiterpeno germacreno, seguido em abundância pelo α -copaeno, pelo γ -elemeno e pelo σ -cadineno (Siani et al., 2004). Quimicamente, os óleos essenciais da família Burseraceae são, em sua maioria, constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de

moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta normalmente monoterpenos e sesquiterpenos, mas, dependendo do método e extração e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo essencial (Simões et al., 2004).

Variações qualitativas e quantitativas desta ordem na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal podem estar relacionadas com várias causas diferentes. Estes tipos de diferenças podem ocorrer como consequência da variação intra-clonal no melhoramento genético de cultivares exclusivamente de propagação vegetativa de 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 pode também ocasionar variações na composição do óleo essencial (Paul et al., 2010), e mesmo o processo de extração não deve ser descartado (Sefidkon et al., 2007). Neste caso, o processo experimental de extração pode ser refutado como uma causa para esta variação, uma vez que os três compostos principais eram os mesmos encontrados anteriormente, após a extração e análise cromatográfica exatamente nas mesmas condições como descritas aqui (Silva et al., 2010).

Mesmo quando originários de uma mesma região geográfica, materiais vegetais coletados em diferentes fases do ciclo fenológico das plantas podem produzir diferenças qualitativas e quantitativas nos principais compostos, e as diferenças qualitativas e quantitativas sobre os compostos minoritários, como descrito por Silva e colaboradores (2010) pode ser provavelmente uma consequência da sazonalidade (Paolini et al., 2010).

Os óleos essenciais são um produto do metabolismo secundário e estão contidos em vários órgãos da planta. 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 (Silva & Lutz 2004), a dispersão de frutos e sementes (Harborne, 1993), ou mesmo a localização de hospedeiros por seus insetos galhadores (Moura et al., 2009).

Os compostos voláteis fazem parte das emissões de sinais químicos detectáveis pelos sistemas de olfação e gustação de um grande número de espécies animais (Harborne, 1993), provocando respostas semelhantes tanto para os sistemas de polinização, como para a dispersão de frutos e sementes e para a herbivoria (Spencer, 1988; Silva & Lutz, 2004). Similares por serem interações tróficas, a polinização e a herbivoria diferem entre si pelas

consequências ecológicas. Enquanto a herbivoria se caracteriza pelo antagonismo entre as partes, a polinização é principalmente mutualista (Weis & Campbell, 1992).

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 à presença do herbívoro (Harborne 1993), usualmente associada à defesa química da planta. Contudo, o teor de óleos essenciais nos folíolos com galhas foi menor que nos folíolos sem galhas, e aliado a isto, quando as galhas de Psyllidae se tornaram inativas, o teor de óleos essenciais não apresentou diferenças significativas em relação aos folíolos sem galhas. Este fato sugere uma ação do inseto galhador, induzindo à diminuição do acúmulo de óleos essenciais (Tabela 1). Enquanto as galhas de Cecidomyidae apresentam ductos secretores em sua parede, nas de Psyllidae a esclerificação se torna mais evidente e os ductos secretores se mantem na associação aos feixes vasculares.

Esta diminuição do teor de óleos essenciais (Tabela 1) não pode ser atribuída a uma perda estrutural de ductos e cavidades secretoras, reforçando a ideia de um controle molecular do inseto galhador sobre os tecidos da planta hospedeira. Esta possibilidade se consolida ainda mais, quando a composição química dos óleos essenciais permite separar em blocos bem distintos, as galhas de Cecidomyidae e Psyllidae (Figuras 13 a 16) e estes por sua vez, separando-se também de maneira bem distinta dos folíolos sem galhas e dos que apresentavam galhas inativas, entre os quais foi evidenciado um gradiente tanto qualitativo como quantitativo.

Este fato poderia estar relacionado à Hipótese Nutricional (Price et al. 1987) no desenvolvimento de galhas, pela qual os insetos galhadores controlariam os tecidos dos hospedeiros que os envolvem, de modo ou a aumentar seu potencial nutritivo ou a diminuir os teores de densifisivos aleloquímicos (Hartley 1998).

Quando a herbivoria, a polinização e a dispersão são analisadas em relação à essência da motivação, do consumidor, a busca de algum tipo de recurso se apresenta como um ponto comum entre elas, sendo que Pellmyr e Thien (1986) sugeriram que fragrâncias florais teriam evoluído a partir de inibidores de herbivoria. Apesar da repercussão ecológica e evolutiva da polinização e da dispersão de diásporos não serem menos importantes que a da herbivoria, os estudos sobre a química e bioquímica da polinização e da dispersão avançaram muito menos que os ligados à herbivoria (Spencer, 1988; Harborne, 1993).

Estudos sobre a mediação química dessas interações tornam-se ainda mais relevantes quando são considerados os progressos na investigação de voláteis florais (Williams & Whitten, 1983; Knudsen et al., 1993). A busca de perfis químicos de aromas característicos para as síndromes de polinização e as de dispersão continua, contudo, motivando pesquisadores (Knudsen & Tollsten, 1993; Knudsen & Tollsten, 1995).

Cuidados no estabelecimento destes perfis químicos têm sido fortemente recomendados, principalmente quando são feitas inferências de respostas dos visitantes florais a aromas percebidos pelo homem. O olfato humano é sensorialmente muito limitado (Vogel, 1963), em relação a outros grupos de animais (Dusenbery, 1992), e é mais comumente sensibilizado pelo conjunto de componentes majoritários das fragrâncias (Kaiser, 1993) que, por sua vez, estão sujeitos a convergências ecológicas (Knudsen & Tollsten, 1995). Nem mesmo listagens químicas de compostos majoritários permitem tal inferência, a não ser que os efeitos dos voláteis sobre o animal em questão já estejam disponíveis na literatura.

REFERÊNCIAS

- Abrahamson, W.G.; Weis, A.E. **1997**. 2.ed. Princeton: Princeton University Press, 448p.
- Adams, R.P. **2009**. 4. ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Álvarez, R.; Encina, A.; Hidalgo, N.P., *Plant Science*. **2008**, 272,107–11.
- Álvarez, R.; Encina, A.; Hidalgo, N.P, *Plant Science*, **2009**, 176: 303–314.
- Araújo, A.P.A.; Paula, J.D.; Carneiro, M.A.A.; Schoereder, J.H, *Austral Ecology*, **2006** 31: 343–348.
- Araújo, D.S.D.; Henriques, R.P.B. 1984 (Eds.) *Restingas: origem, estrutura, processos*, Niterói: CEUFF.
- Araújo, D.S.D.; Henriques, R.P.B. 1984. Análise florística das restingas do estado do Rio de Janeiro. In: Lacerda, L.D.; Araújo, D.S.D.; Cerqueira, R.; Turcq, B. (eds.) *Restingas: origem, estrutura, processos*. Niterói: CEUFF, p. 159-193.
- Araújo, W.S.; Gomes, K.V.L.; Santos, B.B, *Revista Brasileira de Biociências*, **2007**, 5, 45–47.
- Arduin, M.; Fernandes, G.W.; Kraus, J.E. *Brazilian Journal of Biology*, **2005**, 65, 559–571.
- Bachelier, J.B. & Endress, P.K, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **2009**, 159, 499-571.
- Bakkali, F.; Idaomar, M.; Averbek, D.; Averbek, S, *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46, 446–475.

- Bandeira, P.N.; Lemos, T.L.; Costa, S.M.; Santos, H.S. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2007**,17, 204-208.
- Bandeira, P.N.; Pessoa, O.D.; Trevisan, M.T.; Lemos, T.L, *Química Nova*, **2002**, 25, 1078-1080.
- Bissett, J.; Borkent, A. 1988. Ambrosia galls: the significance of fungal nutrition in the evolution of the Cecidomyiidae (Diptera). In: Pirozynski, K.A.; Hawksworth, D.L. (eds.) *Coevolution of fungi with plants and animals*. London: Academic Press, p.203-205.
- Boege, K.; Marquis, R.J, *Trends Ecology Evolution*, **2005**, 20,441–448.
- Bregonci, J.M.; Polycarpo, P.V.; Maia, V.C, *Biota Neotropica*, **2010**, 10, 265-274.
- Bronner, R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. In: Shorthouse, J.D.; Rohfritsch, O. (eds.) *Biology of insect-induced galls*. New York: Oxford University Press, p. 118-140.
- Carneiro M.A.A.; Branco, C.S.A.; Braga C.E.D.; Almada E.D.; Costa M.B.M.; Maia V.C.; Fernandes G.W, *Revista Brasileira de Entomologia*, **2009**, 53, 365-378.
- Castro, F.B.G.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C. 1988. Estudo fitoquímico de *Protium icicariba* (Burseraceae). *Anais XL Congresso da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, São Paulo: SBPC, p. 575.
- Cole, E.R. (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.
- Cornell, H.V, *The American Midland Naturalist Journal*, **1983**, 110, 225- 234.
- Corrêa, P.G.; Pimentel, R.M.; Cortez, J.S.; Xavier, H.S, *Ciência e Cultura*, **2008**, 60, 54-57
- Cuatrecasas, J, *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exata*, **1957**, 2,435-441.
- Dáttilo, W.; Marques, E.C.; Falcão, J.C.; Moreira, D.D. *EntomoBrasilis*, **2009**, 2, 32-36.
- Dawkins, R., 1982. *The Extended Phenotype*. Oxford University Press, Oxford.
- Deminicis, B.B.; Vieira, H.D.; Araújo, S.A.; Jardim, J.G.; Pádua, F.T.; Chambela Neto, A. *Archivos de zootecnia*, **2009**,58, 35-58.

- Dorchin, N.; Freidberg, A.; Aloni, R, *Canadian Journal of Botany*, **2002**, 80, 1141–1150.
- Dusenbery, D. 1992, *Sensory ecology: how organisms acquire and respond to information*. New York: W.H. Freeman.
- Evert, R.F, 2005. *Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development*. 3.ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 601p.
- Fenner, M.; Hanley, M.E.; Lawrence, R, *Functional Ecology*, **2002**, 13, 546–551.
- Fernandes, G.W.; Price, P.W, *Oecologia*, **1992**, 90, 14-20.
- Fonseca, C.R.; Benson, W.W, *Oikos*, **2003**, 102, 407–412.
- Fonseca, C.R.; Fleck, T.; Fernandes, G.W, *Biotropica*, **2006**, 38, 514 - 521.
- Formiga, A.T.; Goncalves, S.J.M.R.; Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S, *Acta Botanica Brasileira*, **2009**, 23, 93-99.
- Fosket, D.E. 1994. *Plant growth and development: a molecular approach*. 2.ed. London: Academic Press, 580p.
- Francisco, M.R.; Lunardi, V.O.; Galetti, M, *Brazilian Journal of Biology*, **2007**, 67, 627-634.
- Gagné, R. J, *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, **2004**, 25, 1-408.
- Harborne, J.B. 1993: *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London.
- Harborne, J.B. 1984. *Phytochemical methods; a guide to modern techniques of plant analysis*. 2 ed. London, Chapman and Hall.
- Harris, M.O.; Stuart, J.J.; Mohan, M. Nair, S. Lamb, R.J. Rohfritsch, O. *Annual Review of Entomology*, **2003**, 48, 549–577.
- Hartley, S.E. 1998, *Oecologia*, **1998**, 113, 492-501.
- Herrera, C.M.; Pellmyr, O. 2002. *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*. Cornwall: Blackwell Science, 294p.
- 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*. Ithaca: Cornell University.

- Hori, K. 1992. Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In: Shorthouse, J.D.; Rohfritsch, O (eds.) *Biology of insect-induced galls*. New York: Oxford University Press, p.157-170.
- Huang, M.Y.; Yang, M.M.; Jane, W.N.; Chang, Y.T.; Yang, C.M, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **2009**, 12, 165-168.
- Inbar, M., Wink, M., & Wool, D. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2004**, 32, 504-511.
- Janzen, D.H, *The American Naturalist*, **1977**, 111, 691-713.
- Jensen, W.A. 1962. *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco, W. H. Freeman.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. 1.ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 523p.
- Khalid, S.A. 1983. Chemistry of Burseraceae. In: Waterman, P. G. e Grundon, M. F. (eds.) *Chemistry and chemical taxonomy of Rutales*. New York: Academic Press, p. 281-299.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L.; Bergström, G, *Phytochemistry*, **1993**, 33, 253-280.
- Knudsen, J.T.; Tollsten, L, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **1993**, 113, 263-284.
- Knudsen, J.T.; Tollsten, L, *Botanical Journal of the Linnean Society* **1995**, 119, 45-57.
- Kokkini, S., Karousou, R. and Vokou, D. *Biochemical Systematics and Ecology* **1994**, 22, 517-528.
- Kulkarni, R.N.; Baskaran, K.; Ramesh, S.; Kumar, S, *Industrial Crops and Products*, **1997**, 6, 107-112.
- Larson, K, *Oecologia*, **1998**, 115, 161-166.
- Lawrence, R.; Potts, B.M.; Whitham, T.G, *Ecology*, **2003**, 84, 1171-1178.
- Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Júnior, V. F, *Química Nova*, **2002**, 25, 429-438.
- Maia, R.M.; Barbosa, P.R.; Cruz, F.G.; Roque, N.F.; Frascio, M, *Química Nova*, **2000**, 23, 623-626.

- Maia, V.C, *Revista Brasileira de Zoologia*, **2001**, 18, 583-629.
- Maia, V.C, *Biota Neotropica*, **2005**, 5, 1-15.
- Maia, V.C, *Publicações Avulsas do Museu Nacional*, **2006**, 110, 01-24.
- Maia, V.C, *Biota Neotropica*, **2013**, 3, 182-209.
- Maia, V.C.; Monteiro, R.F.; Narahara, K.L, *Studia Dipterologica*, **2002**, 9, 171-178.
- Mani, M.S. 1964. *Ecology of plant galls*. 1.ed. Netherlands: The Hague Dr. W. Junk Publishers, 434p.
- Moura, M.Z.D.; Alves, T.M.A.; Soares, G.L.G.; Isaia, R.M.S, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2009**, 37, 541–548.
- Nair, M.N. & Subrahmanyam, S.V, *Iawa Journal*, **1998**, 19, 415-427.
- Nilsson, C.; Gardfjell, M. Grelsson, G, *Canadian Journal of Botany*, **1991**, 69, 2631-2633.
- Nyman, T.; Julkunen-Tiitto, J, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2000**, 97, 13184-13187.
- Oliveira, D.C.; Christiano, J.C.S.; Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S, *Revista Brasileira de Botânica*, **2006**, 29, 657-667.
- Oliveira, D.C.; Isaias, R.M.S, *South African Journal of Botany*, **2010**, 76, 239–248.
- Paolini J, Barboni T, Desjobert JM, Djabou N, Muselli A, Costa J, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2010**, 38, 865–874.
- Paul A, Thapaa G, Basub A, Mazumdarb P, Kalita MC, Sahoo L. *Industrial Crops Production*, **2010**, 32, 366-374.
- Pellmyr, O; Thien, L.B, *Taxon*, **1986**, 35, 76-85.
- Pontes, W.J.T.; Oliveira, J.C.G.; Câmara, C.A.G.; Lopes, A.C.H.; Gondim, M.G.C.; Oliveira, J.V.; Barros, R.; Schwartz, M.O.E, *Acta Amazônica*, **2007**, 37, 103-110.

- Price, P.W. 1990. Evaluating the role of natural enemies in latent and eruptive species. New approaches in life table constructions. In: Watt, A.D.; Leather, S.R.; Hunter, M.D.; Kidd, M.A. (eds.) Population dynamics of forest insects. Hampshire: Intercept, Undover, 424p.
- Price, P.W. 2002. Species interaction and the evolution of biodiversity. In: Herrera, C.M.; Pellmyr, O (eds.) Plant Animal Interactions: an evolutionary approach. Blackwell Science, Oxford, pp.3-25
- Price, P.W, Basic and Applied Ecology, **2005**, 6, 413-421.
- Price, P.W.; Fernandes, G.W.; Lara, A.C.F.; Brawn, J.; Barrios, H.; Wright, M.G.; Ribeiro, S.P.; Rothcliff, N, Journal of Biogeography, **1998**, 25, 581-591.
- Price, P.W.; Fernandes, G.W.; Waring, G.L, Environmental Entomology, **1987**, 16, 15–24.
- Price, P.W.; Waring, G.L.; Fernandes, G.W, Proceedings of the Entomological Society of Washington, **1986**, 88, 361–363.
- Prince, P.W., Lewinsohn, T.M.; Fernandes, G.W.; Benson, W.W. 1991. Plant-animal interactions. In: Coley, P.D.; Aide, T.M. (eds.) Evolutionary ecology in tropical and temperate regions. New York: Wiley-Interscience Publication, p.25-49.
- Purohit, S.D.; Ramawat, K.G.; Arya, H.C, Current Science, **1979**, 48, 714-716.
- Raman, A, Current Science, **2007**, 92, 748–757.
- Raman, A, Functional Ecology of Plants, **2011**, 206, 517-533.
- Raman, A.; Schaefer, C.W.; Withers, T.M. 2005. Galls and gall-inducing arthropods: An overview of their biology, ecology, and evolution. In: Raman, A.; Schaefer, C.W.; Withers, T.M (eds.) Biology, ecology, and evolution of gall-inducing arthropods. New Hampshire: Science Publishers, p. 1–33.
- Redfern, M.; Shirley, P, Field Studies, **2002**, 10, 207–531.
- Rodrigues, A.R.; Maia, V.C, Biota Neotropica, **2010**, 10, 85-99.
- Rohfritsch, O. 1992. Patterns in gall development. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds.) Biology of insect induced galls. New York: Oxford University Press, p. 60–86.

- Rohfritsch, O.; Shorthouse, J.D. 1982. Insect galls. In: Gunter K, Schell JS (eds) Molecular biology of plant tumors. New York: Academic New York, p. 131–152.
- Rüdiger, A.L.; Siani, A.C.; Veiga, V.F, *Pharmacognosy Reviews*, **2007**, 1, 93-104.
- Sachs JL, Simms EL, *Trends in Ecology and Evolution*, **2006**, 21, 585–592
- Schaller, A. 2008. *Induced plant resistance to herbivory*. 3.ed. Stuttgart: University of Hohenheim Press, 457p.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M. 2005. *Insect-Plant Biology*. 2.ed. New York: Oxford University Press, 421p.
- Schowalter, T.D. 2006. *Insect ecology: an ecosystem approach*. 2.ed. New York: Oxford, Academic Press, 569p.
- Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z., Ahmadi S, Jamzad. *Food Chemistry*, **2007**, 100, 1054-1058.
- Shepherd, G.J. 1995. *Fitopac 1*. Campinas: Departamento de Botânica, Unicamp.
- Shorthouse, J.D.; Wool, D.; Raman, A, *Basic and Applied Ecology*, **2005**, 6, 407–411.
- Siani, A.C.; Garrido, I.S.; Monteiro, S.S.; Carvalho, E.S.; Ramos, M.F.S. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**, 32, 477–489.
- Silva, A.G.; Almeida, D.L.; Ronchi, S.N.; Bento, A.C.; Scherer, R.; Ramos, A.C.; Cruz, Z.M.A, *Parasites & Vectors*, **2010**, 3, 3: 79.
- Silva, A.G.; Lutz, L.V, *Natureza on line*, **2004**, 2,10–14.
- Silva, I.M.; Andrade, G.; Fernandes, G.W.; Lemos, J.P. *Annals of Botany*, **1996**, 78:45-48.
- Sinnott, E.W. 1960. *Plant Morphogenesis*. McGraw-Hill, New York
- Siqueira, J.B.G. 1991. *Estudo fitoquímico do gênero Protium: unifoliolatum P. (Engl.) Engl. e P. laxiflorum . Engl.* Tese de Mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil.
- Soares, G.L.G.; Isaias, R.M.S.; Gonçalves, S.J.M.R.; Christiano, J.C.S, *Revista Brasileira de Zoociências*, **2000**, 2, 103-116.
- Spencer, K.C. 1988. *Chemical mediation of coevolution*. San Diego: Academic Press.

- Stamp, N, *The Quarterly Review of Biology*, **2003**, 78, 23–55.
- Stone, G.N.; Schönrogge, K, *Trends Ecology Evolution*, **2003**, 18, 512–522.
- Strong, D.R.; Lawton, J.H., Southwood, T.R.E. 1984. *Insects on plants: community patterns and mechanisms*. New York: Oxford Blackwell Scientific Publications, 320p.
- Takahama, U, *Plant Cell Physiology*, **1988**, 29, 433-438.
- ter Braak, C.J.F. 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. Wageningen, Pudoc.
- Tyrrel, M.H, *Food Technology*, **1990**, 44, 68-72.
- van der Pijl L, 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Vogel, S. *Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse: Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mainz* **1963**, 10: 1-165.
- Weis, A. R.; R. Walton & C. Greco, *Annual Review of Entomology*, **1988**, 33, 467-486.
- Weis, A.E.; Campbell, D.R. 1992. Plant genotype: a variable factor in insect-plant interactions. In: Hunter; M.D.; Ohgushi, T.; Price PW (ed) *Effects of resource distribution on animal-plant interactio*. San Diego: Academic Press ns pp 75-111.
- Weis, A.E.; Walton, R.; Crego, C.L. *Annual Review of Entomology*, **1988**, 33, 467–486.
- Wheler, H. 1975. *Plant pathogenesis*. 1.ed. Berlin: Springer-Verlag, 106p.
- Williams NH; Whitten WM, *Biological Bulletin* **1983**, 164, 355-395.
- Yang, C.M., Yang, M.M., Hsu, J.M., Jane, W.N, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **2003**, 44, 315–321.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical analysis*. 5 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall.
- Zoghbi, M.G.B.; Siqueira, J.B.G.; Wolter, E.L.A.; Junior, O.L.P., *Acta Amazônica*, **1993**, 23, 187-189.