

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO- CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

ESTRUTURA, FISIOLOGIA E NÍVEIS DE ESTRESSE
PROMOVIDOS POR GALHAS DE *Manihot esculenta*
(EUPHORBIACEAE) INDUZIDAS POR *Iatrophobia*
brasiliensis (DIPTERA, CECIDOMYIIDAE)

Autora: Ana Paula de Souza

Orientador: Dr. Vinícius Coelho Kuster

Coorientadora: Dra. Valdnéa Casagrande Dalvi

RIO VERDE- GO

SETEMBRO- 2023

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO- CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

ESTRUTURA, FISIOLOGIA E NÍVEIS DE ESTRESSE
PROMOVIDOS POR GALHAS DE *Manihot esculenta*
(EUPHORBIACEAE) INDUZIDAS POR *Iatrophobia*
brasiliensis (DIPTERA, CECIDOMYIIDAE)

Autora: Ana Paula de Souza

Orientador: Dr. Vinícius Coelho Kuster

Coorientadora: Dra. Valdneá Casagrande Dalvi

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em Biodiversidade e Conservação, ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano- campus Rio Verde- Área de concentração, Recursos Naturais do Cerrado.

RIO VERDE-GO

SETEMBRO- 2023

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SSO729 Souza, Ana Paula de
e ESTRUTURA, FISILOGIA E NÍVEIS DE ESTRESSE
PROMOVIDOS POR GALHAS DE *Manihot esculenta*
(EUPHORBIACEAE) INDUZIDAS POR *Iatrophobia*
brasiliensis (DIPTERA, CECIDOMYIIDAE) / Ana Paula de
Souza; orientador Vinicius Coelho Kuster; co-
orientadora Valdneá Casagrande Dalvi. -- Rio Verde,
2023.
87 p.

Dissertação (Mestrado em Mestrado) -- Instituto
Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2023.

1. Antioxidantes. 2. Compartimentalização. 3.
Fluorescência. 4. Parede celular. . I. Kuster,
Vinicius Coelho, orient. II. Dalvi, Valdneá
Casagrande, co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 n°2376

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de

leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Ana Paula de Souza

Matrícula:

2021202310840003

Título do trabalho:

ESTRUTURA, FISIOLOGIA E NÍVEIS DE ESTRESSE PROMOVIDOS POR GALHAS DE Manihot esculenta (EUPHORBIACEAE) INDUZIDAS POR *Iatrophobia brasiliensis* (DIPTERA, CECIDOMYIIDAE)

RESTRICÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento Não Sim,

confidencial: justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: 22 / 11 / 2023

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;

Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilização do documento em formato digital no RIIIF Goiano;

Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, GO
Local

21 / 11 / 2023
Data

Ana Paula de Souza

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:



Documento assinado digitalmente

VINÍCIUS COELHO KUSTER

Data: 21/11/2023 15:36:49-0300

Verifique em <https://validar.ifg.gov.br>



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 88/2023 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO

ATA Nº/75

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e dois dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e três, às 14h00min (quatorze horas), reuniram-se os componentes da banca examinadora em sessão pública realizada por videoconferência, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **ANA PAULA DE SOUZA**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Vinícius Coelho Kuster, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora para, em 30 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação Biodiversidade e Conservação, e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**, na área de concentração em Conservação dos Recursos Naturais, pelo Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGBio da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60 (sessenta) dias** da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa dissertação em periódicos após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada eletronicamente pelos membros da Banca Examinadora.

Membros da Banca Examinadora

Nome	Instituição	Situação no Programa
Prof. Dr. Vinícius Coelho Kuster	Universidade Federal de Jataí	Presidente
Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira	Universidade Federal de Uberlândia	Membro externo

Prof. ^a Dr. ^a Rosy Mary dos Santos Isaias	Universidade Federal de Minas Gerais	Membro externo
-----------------------------------------------------------------	--------------------------------------	----------------

Documento assinado eletronicamente por:

- Vinícius Coelho Kuster, Vinícius Coelho Kuster - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Jataí (35840659000130), em 26/09/2023 17:45:38.
- Denis Coelho de Oliveira, Denis Coelho de Oliveira - Professor Avaliador de Banca - Ufu (1), em 26/09/2023 14:03:55.
- Rosy Mary dos Santos Isaias, Rosy Mary dos Santos Isaias - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano (1), em 26/09/2023 12:14:48.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 22/09/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 533595
Código de Autenticação: b7560e951f



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3624-1000

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Goiano, pelo Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, pela oportunidade de realizar o mestrado. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão de bolsa, que me permitiu desenvolver essa pesquisa.

Ao meu orientador Vinícius. Muito obrigada pelo tempo, paciência, sensibilidade, respeito e tanta sabedoria em me guiar nessa caminhada, que foi linda com a sua brilhante participação. Gratidão.

Aos meus grandes amigos que o mestrado me presenteou, Mateus e Maísa. Que honra compartilhar esse tempo com vocês, e aprender tanto. A Taíza que me ofereceu lar durante as análises fora da minha casa.

Aos professores do PPGBio, em especial a coordenadora Maria Andréia que através do PPGBio digital me proporcionou grandes aprendizagens.

A banca de qualificação, Rosy e Denis, por serem tão bons e contribuírem tanto para a minha formação, com conhecimento cheio de humildade e bondade. A minha coorientadora Valdneá, gratidão.

A minha família, em especial a minha mãe, que sempre incentivou e fez o que pode para que eu pudesse estudar. Uma pedagoga linda e grandiosa que sempre foi e é amparo e segurança. Nos dias mais difíceis, ela sempre esteve ali para oferecer um café, e força para continuar. A minha sobrinha Eliza, motivo da minha alegria diária. Ao meu pai, que tanto me ensina sobre as plantas.

A minha irmã Dorotéia, que tanto faz por nós, minha inspiração acadêmica, a primeira doutora da família. Obrigada por tanto, a sua dedicação e determinação me guiaram até aqui.

As minhas amigas, Micaela, Luanna, Maria Cristina, Jessika, Ana Gabriela, Taiane e Kamilla, sem vocês o meu mundo seria muito triste.

A minha avó Maria, que tanto me encorajou a estudar enquanto esteve nesse plano, e que eu pude conversar sobre tantas coisas, inclusive sobre as galhas de mandioca, e explicar o que eram aquelas “berruginhas” que ela brincava enquanto criança.

BIOGRAFIA

Me chamo Ana Paula de Souza tem 25 anos de idade e sou filha de Marly Alves de Souza e Umarles Paulo de Souza, nascida em Jataí, GO, em 22 de maio de 1998. Moro nesta cidade desde quando nasci, intercalando minha vivência entre o ambiente urbano e a zona rural. Desde bem criança, antes mesmo de iniciar o ensino infantil, tive a sorte de ter contato com a educação, por meio de mulheres professoras da família que tanto me estimularam com o ensino através dos livros de desenho e pintura, bem como com jogos educativos. Dessa forma, o meu despertar pelo conhecimento foi bem cedo e, desde então, segui todos os anos de estudos na escola pública até concluir o ensino médio e adentrar também em uma universidade pública. Sinto muito orgulho disso e defendo, sempre que tenho a oportunidade, o ensino público brasileiro.

Ingressei na graduação em 2016 no curso de Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura, na Universidade Federal de Goiás (UFG), campus Jataí, que posteriormente, se tornou Universidade Federal de Jataí (UFJ), uma enorme conquista. Concluí o curso no semestre 01/2020, que se estendeu até 2021 devido à pandemia. A pandemia foi um dos momentos mais difíceis da nossa geração. Enormes perdas físicas, medos profundos, e tantos outros acontecimentos. A pandemia me distanciou dos meus amigos da graduação, nos impossibilitando de ter colação de grau e todas àquelas festividades. No mesmo ano, ingressei no Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde, em setembro/2021, ainda na pandemia. E assim, iniciava-se da mesma forma como finalizei a graduação, as aulas da pós-graduação online, o temido formato virtual que, por um lado já era bastante cansativo, e por outro, a única opção que nos permitiu prosseguir com nossos sonhos. O tempo de 24 meses para conclusão do mestrado foi cumprido, e a defesa da dissertação veio, e juntamente com meu orientador, e todo o trabalho em equipe, conseguimos finalizar dentro do esperado, e planejado. Aqui, descrevo um pouco da minha trajetória pessoal e profissional, e digo que venha o doutorado!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	11
CAPÍTULO I	11
CAPÍTULO II	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
CAPÍTULO I	12
CAPÍTULO II	13
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACIONES E UNIDADES	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO GERAL	20
1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
2. CAPÍTULO I	29
ABSTRACT	29
2.1 INTRODUCTION	30
2.2 MATERIAL AND METHODS	32
2.2.2 Morphological and histological analyses.....	33
2.2.3 Histochemical analyses	34
2.2.4 Immunocytochemical analyses	34
2.3 RESULTS	36
2.3.1 Morphology and anatomy	36
2.3.2 Histochemistry	37
2.3.3 Immunocytochemistry	39
2.4 DISCUSSION	42
2.4.1 Histo-functional compartmentalization of the cortex	42
2.4.2 Immunocytochemistry of the cell walls: pectins, proteins and hemicelluloses .	44
2.5 CONCLUSION	46
2.6 REFERENCES	47
3. CAPÍTULO II	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58

3.1 INTRODUÇÃO	59
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.2.1 Local de coleta e sistema estudado	61
3.2.2 Perfil anatômico	62
3.2.3 Histolocalização de H ₂ O ₂	63
3.2.4 Quantificação do estresse.....	63
3.2.5 Quantificação de moléculas dissipadoras de estresse	64
3.2.6 Determinação da atividade fotossintética e pigmentos cloroplastídicos	66
3.2.7 Análises estatísticas	66
3.3 RESULTADOS	67
3.3.1 Perfil anatômico e histolocalização do estresse	67
3.3.2 Espécies reativas do oxigênio e malondialdeído	68
3.3.3 Enzimas antioxidantes e compostos fenólicos.....	69
3.3.4 Pigmentos cloroplastídicos e parâmetros fotossintéticos.....	70
3.4 DISCUSSÃO	73
3.4.1 As galhas possuem menor estresse oxidativo devido a maior atividade de enzimas dissipadoras de estresse	73
3.4.2 As galhas possuem maior rendimento quântico do fotossistema mesmo com menor concentração de pigmentos cloroplastídicos	75
3.5 CONCLUSÃO.....	77
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
4. CONCLUSÃO GERAL	86

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Monoclonal antibodies and their respective epitopes for the recognition of proteins, pectins and hemicelluloses.

Table 2. Fluorescence intensity of epitopes of proteins (LM1 and LM2), pectins (LM5, LM6, LM19 and LM20) and hemicelluloses (LM11, LM15 and LM21) in the cell walls of the non-galled leaves of *Manihot esculenta* and its galls induced by *Iatrophobia brasiliensis*.

CAPÍTULO II

Tabela 1. Teores de pigmentos cloroplásticos em folhas não galhadas de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae). Os dados representam valores da média \pm desvio padrão.

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fig. 2. Anatomical features of the non-galled leaves (A) of *Manihot esculenta* and its gall (B-E), induced by *Iatrophobia brasiliensis*. A, C, D, E- Transversal section; B- Longitudinal section; A- Uniseriate epidermis, dorsiventral mesophyll and collateral vascular bundle. Stomata occur only on the abaxial face; B- General structure of gall, with detail of ostiole; C- Parenchymatic cortex and larval chamber with inducer; D- Detail of the cortex with collateral vascular bundles (dotted, to the left), as well as of the laticifer (dotted, on the right); E- Detail of the storage and nutritive cortex. Abbreviations: ST- Storage tissue; NT- Nutritive tissue; LC- Larval chamber; Co- Cortex; Ep- Epidermis; ADEP- Epidermis on the adaxial face; ABEP- Epidermis on the abaxial face; St- Stomata; VB- Vascular bundle; In- Inducer; SP- Spongy parenchyma; PP- Palisade parenchyma.

Fig. 3. Positive histochemical results in the non-galled leaves (A) of *Manihot esculenta* and its gall, induced by *Iatrophobia brasiliensis*. A, D- Non-galled leaves; B, C, E-L- Gall; A- Starch in the mesophyll; B- Detail of starch in the outer cortex; C- Detail of starch in the inner cortex; D- Reducing sugars in the epidermis; E- Reducing sugars in the vascular bundles and inner cortex; F- Detail of the reducing sugars in the inner cortex; G- Proteins in the vascular bundles and inner cortex; H- Detail of proteins in the inner cortex; I- Alkaloids in the epidermis, vascular bundles and inner cortex; J- Detail of alkaloids in the vascular bundle and inner cortex; K- Phenolic compounds in the outer and inner cortex; L- Detail of phenolic compounds in the inner cortex. Abbreviations: ADEP- Epidermis on the adaxial face; ABEP- Epidermis on the abaxial face; PP- Palisade parenchyma; SP- Spongy parenchyma; ST- Storage tissue; NT- Nutritive tissue; LC- larval chamber; Ep- Epidermis; VB- Vascular bundle. *Positive result to reducing sugars.

Fig. 4. Immunocytochemical results of proteins, pectins, and hemicelluloses in the cell walls of the non-galled leaves (NGL) of *Manihot esculenta* and its galls, induced by *Iatrophobia brasiliensis*. A- Non-galled leaf with (1→4)-β-D-galactans weakly labeled in the epidermis and mesophyll, and moderately labeled in the vascular bundle; B- Non-

galled leaf with (1 → 5) - α -L- arabinans weakly labeled in all tissues. D- Gall with extensins weakly labeled in nutritive tissue; E- Gall with arabinogalactan-proteins weakly labeled in nutritive tissue; E, F- Gall with (1→4)- β -D-galactans moderately labeled in storage tissue; G- Gall with (1 → 5) - α -L- arabinans weakly labeled in storage tissue; H- Gall with xyloglucans weakly labeled in nutritive tissue; I- Gall with non-methylesterified HGs weakly labeled in nutritive tissue; J- Gall with methylesterified HGs moderately labeled in nutritive tissue. *Green color indicates the presence of the epitope and blue color indicates absence. Abbreviations: ST- Storage tissue; NT- Nutritive tissue; LC- Larval chamber; Ep- Epidermis; ABEP- Epidermis on the abaxial face; ADEP- Epidermis on the adaxial face; VF- Vascular bundle; In- Inducer; SP- Spongy parenchyma; PP- Palisade parenchyma.

CAPÍTULO II

Figura 1. Morfologia da folha de *Manihot esculenta* subsp. *esculenta* e da galha formada por *Iatrophobia brasiliensis* (A-B). A- Visão geral da folha com galhas; e B- Detalhe para a galha em corte longitudinal, com destaque para o indutor.

Figura 2. Anatomia (A-B) e histolocalização de peróxido de hidrogênio (C-D) em folhas não galhadas (A, C) de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas (B, D) induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae). * Marcação marrom nas imagens “C” e “D” indica resultado positivo para peróxido de hidrogênio. EpAd: epiderme adaxial; EpAb: epiderme abaxial; PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; Ep: epiderme; CE: córtex externo; CI: córtex interno; In: indutor; Fv: feixe vascular.

Figura 3. Fluorescência da clorofila *a* em folhas (A, C, E, G, I, K) de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas (B, D, F, H, J, L) induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae). Os dados representam valores da média \pm desvio padrão. F0: fluorescência mínima adaptado ao escuro; Fm: fluorescência máxima adaptado ao escuro; Fv/Fm: rendimento quântico máximo; NPQ: extinção não fotoquímica durante adaptação à luz; Rfd: taxa de declínio de fluorescência em curso estável; (F'm-F')/F'm: eficiência operacional de PSII.

* Médias seguidas pela mesma letra no comparativo entre folha não galhada e galha no mesmo parâmetro indicam que não houve significância ($p < 0,05$).

Figura 4. Quantificação de estresse em folhas de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas. A- Quantificação de peróxido de hidrogênio; B- Quantificação de ânion superóxido; C- Quantificação de malondialdeído.

Figura 5. Quantificação de moléculas envolvidas na dissipação do estresse em folhas de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas, medido pela atividade de enzimas antioxidantes (A-D) e de compostos fenólicos (E); A- Atividade da enzima antioxidante CAT; B- Atividade antioxidante APX; C- Atividade antioxidante POX; D- Atividade antioxidante SOD; E- Atividade dos compostos fenólicos. CAT: catalase; APX: ascorbato peroxidase; POX: peroxidase; SOD: superóxido dismutase.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

Sigla	Significado	Unidade
APX	ascorbato peroxidase	$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
CAT	catalase	$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
SOD	superóxido dismutase	$\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
POX	peroxidase	$\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
CFST	compostos fenólicos	mg/kg
MDA	malondialdeído	$\mu\text{mol kg}^{-1}$
H_2O_2	peróxido de hidrogênio	nmol g^{-1}
O_2	ânion superóxido	$\text{nm min}^{-1} \text{g}^{-1}$
EROs	espécies reativas de oxigênio	-
ERCs	espécies reativas de carbonila	-
FAA ₇₀	formaldeído, ácido acético e etanol a 70%	-
DAB	3,3' diaminobenzidina	-
F_0	fluorescência mínima no estado adaptado ao escuro	-
F_m	fluorescência máxima no estado adaptado ao escuro	-
F_v/F_m	rendimento quântico máximo	-
NPQ	quenching não fotoquímica durante adaptação à luz	-
R_{fd}	razão de declínio de fluorescência em estado estacionário	-
$(F'_m - F')/F'_m$	eficiência operacional PSII	-
HGs	homogalacturonanos	-
RG-I	ramnogalacturonano I	-
RG- II	ramnogalacturonano II	-
AGPs	proteínas arabinogalactanos	-
ADEP	epiderme adaxial	-
ABEP	epiderme abaxial	-
PP	parênquima paliçádico	-
SP	parênquima lacunoso	-
ST	tecido de armazenamento	-
NT	tecido nutritivo	-
LC	câmara larval	-
Ep	epiderme	-
VB	feixes vasculares	-

PMEs

pectinas metilesterases

-

RESUMO

SOUZA, ANA PAULA. Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde, GO, setembro de 2023. Estrutura, fisiologia e níveis de estresse promovidos por galhas de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera, Cecidomyiidae). Orientador: Vinícius Coelho Kuster. Coorientadora: Valdneá Casagrande Dalvi.

Os organismos indutores de galhas modificam o crescimento normal de tecidos e órgãos vegetais, através de alterações nos seus padrões morfogênicos, em busca de uma estrutura que os ofereça abrigo, alimentação e proteção. A mosca-da-galha *Iatrophobia brasiliensis* induz galhas nas folhas da mandioca *Manihot esculenta*. Assim, o objetivo do presente estudo é caracterizar a anatomia, histoquímica, fotossíntese, imunocitoquímica da parede celular, níveis de estresse oxidativo e formas de dissipação de estresse em galhas induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* nas folhas de *Manihot esculenta*. Para tal, folhas não galhadas e galhas maduras foram coletadas para a realização das análises. Para as análises de histologia, as amostras foram fixadas, incluídas em resina, seccionadas em micrótomo, coradas com azul de toluidina e montadas em Entellan®. Amostras frescas foram utilizadas para histolocalização de metabólitos primários e secundários. Para a imunocitoquímica, amostras incluídas em resina foram submetidas a anticorpos monoclonais para avaliação de pectinas, hemiceluloses e proteínas de parede celular. Para as análises fisiológicas, Handy Fluor Cam – PSI foi utilizado para avaliação da fluorescência da clorofila *a* em campo, associado com a concentração de pigmentos cloroplastídicos com o uso do extrator acetona 80%. Para a avaliação do estresse foi quantificado ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o malondialdeído, bem como as enzimas antioxidantes catalase, peroxidase inespecífica, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase. As galhas de *M. esculenta* apresentam compartimentalização tecidual rica em metabólitos primários e secundários, e parede celular estruturada por glicoproteínas, pectinas, e hemiceluloses. O tecido nutritivo foi amplamente marcado por esses compostos, que pode ter relação com a alimentação do galhador. As galhas de *M. esculenta* apresentaram sistema enzimático de defesa antioxidante mais eficiente que a folha, resultando em menor estresse nas galhas, principalmente pela maior atividade da POX e da SOD. A maior produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e malondialdeído nas folhas de

M. esculenta indicam maior estresse oxidativo, que foram associados com a menor atividade do sistema antioxidante, o que parece ter afetado o rendimento quântico do PSII, o tornando inferior ao da galha. O presente estudo traz novidades sobre estresse em galhas e vias de dissipação, mostrando maior complexidade desses processos quando se amplia o acesso ao sistema antioxidante nas galhas.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes; Compartmentalização; Fluorescência; Parede celular.

ABSTRACT

SOUZA, ANA PAULA. Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO, September 2023. Structure, physiology and levels of stress promoted by galls of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) induced by *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera, Cecidomyiidae). Advisor: Vinícius Coelho Kuster. Co-advisor: Valdneá Casagrande Dalvi.

The gall-inducing organisms modify the normal growth of plant tissues and organs, through changes in their morphogenic patterns, in search of a structure that offers them shelter, food and protection. The “mosca-da-galha” *Iatrophobia brasiliensis* induces galls on the leaves of cassava *Manihot esculenta*. Thus, the aim of the current study is to characterize the anatomy, histochemistry, photosynthesis, immunocytochemistry of the cell wall, levels of oxidative stress and forms of stress dissipation in galls induced by *Iatrophobia brasiliensis* on *Manihot esculenta* leaves. So, non-galled leaves and mature galls were collected for analysis. For histological analyses, the samples were fixed, embedded in resin, sectioned in a microtome, stained with toluidine blue and mounted in Entellan®. Fresh samples were used for histolocalization of primary and secondary metabolites. For immunocytochemistry, samples embedded in resin were subjected to monoclonal antibodies for evaluation of pectins, hemicelluloses and proteins of the cell walls. For the physiological analyses, Handy FluorCam– PSI was used to evaluate the chlorophyll *a* fluorescence in the field, associated with the concentration of chloroplast pigments using an 80% acetone extractor. For the assessment of stress, superoxide anion, hydrogen peroxide and malondialdehyde were quantified, as well as the antioxidant enzymes catalase, non-specific peroxidase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase. *M. esculenta* galls show tissue compartmentalization rich in

primary and secondary metabolites, and a cell wall structured by glycoproteins, pectins, and hemicelluloses. The nutritious tissue was largely labeled by these compounds, which may be related to feed of the galling inducer. The galls of *M. esculenta* showed a more efficient enzymatic system of antioxidant defense than the leaf, resulting in less stress on the galls, mainly due to the greater activity of POX and SOD. The greater production of hydrogen peroxide, superoxide anion and malondialdehyde in the leaves of *M. esculenta* generated greater stress, associated with lower activity of the antioxidant system, which seems to have affected the quantum yield of PSII, making it lower than that of the gall. The current study brings news about stress in galls and dissipation pathways, showing greater complexity of these processes when access to the antioxidant system in galls is expanded.

KEYWORDS: Antioxidants; Cell wall; Compartmentalization; Fluorescence.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os organismos indutores de galhas modificam o crescimento normal de tecidos e órgãos vegetais, através de alterações nos seus padrões morfogênicos (Mani 1964; Oliveira & Isaias 2007; Oliveira & Isaias 2010; Isaias et al. 2011; Carneiro et al. 2015), em busca de uma estrutura que os ofereça abrigo, alimentação e proteção, direta ou indireta, contra inimigos naturais e fatores abióticos (Price et al. 1986; Rohfritsch & Anthony 1992). As galhas podem ser formadas em raízes, caules, flores, frutos, sementes e folhas (Mani 1964), com o seu desenvolvimento dependente do estímulo químico e alimentar contínuo do indutor (Mani 1964; Meyer & Maresquelle 1983; Bronner 1992). O desenvolvimento de galhas é desencadeado por alterações estruturais, metabólicas e fisiológicas (Ferreira et al. 2018; Ferreira et al. 2019; Costa et al. 2021; Guedes et al. 2022), gerando variações na diferenciação celular, ocorrência de compostos primários e secundários, na composição da parede celular, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como no desempenho quântico da fotossíntese (Carneiro et al. 2014; Oliveira et al. 2017; Teixeira et al. 2018; Kot e Kmiec 2020; Silva et al. 2021).

Na formação das galhas, processos de hipertrofia celular e hiperplasia tecidual caracterizam o desenvolvimento da estrutura, bem como, a compartimentalização dos tecidos (Carneiro et al. 2014). Assim, galhas induzidas por cecidomyiídeos, geralmente apresentam tecidos funcionalmente compartimentalizados, associados a diferentes metabólitos (Bragança et al. 2017; Costa et al. 2021). Os compostos primários como, açúcares, lipídeos e proteínas, são comumente reconhecidos em galhas, funcionando como reserva em tecidos de armazenamento e, como fonte energética nos tecidos nutritivos, enquanto que compostos secundários atuam na defesa contra inimigos naturais (Oliveira et al. 2010; Guimarães et al. 2013; Bragança et al. 2017; Kuster et al. 2020), e na dissipação de estresse oxidativo (Isaias et al. 2015; Guedes et al. 2022).

Além dos mecanismos de rediferenciação celular envolvidos no crescimento e expansão da galha, a orientação da sua morfologia depende da composição da parede celular (Carneiro et al. 2014). A parede celular é constituída por microfibrilas de celulose, hemiceluloses, glicoproteínas e pectinas (Xu et al. 2011; Ant et al. 2013; Voiniciuc et al. 2018). Açúcares ligados a polissacarídeos como xilanos, heteromananos, e xiloglucanos configuram as hemiceluloses (Gilbert 2010), que atuam

no desenvolvimento vegetal (Liepman et al. 2007), enquanto que proteínas, como as arabinogalactanas e as extensinas estruturam paredes celulares (Voiniciuc et al. 2018). As pectinas classificadas como homogalacturonanos (HGAs), rhamnogalacturonanos I (RG-I), e rhamnogalacturonanos II (RG-II) (Ridley et al. 2001; Hart and Kindel 1970), estão envolvidas no desenvolvimento celular, de tecidos e órgãos, regulando o crescimento e a expansão celular (Caffall and Mohnen 2009).

O desenvolvimento de galhas pode gerar um aumento na produção de EROs (espécies reativas do oxigênio) em relação ao órgão não galhado (Isaias et al. 2015), como de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH^\cdot) (Mittler et al. 2022). As EROs possuem alta reatividade, e, por isso, podem interagir com os componentes celulares, como DNA, RNA, organelas e membrana celular, degradando-os (Mittler et al. 2022), podendo assim levar a peroxidação lipídica (Alché 2019). Para isso, compostos antioxidantes como a peroxidase, catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase (Apel e Hirt 2004) e compostos fenólicos (Isaias et al. 2015) atuam na eliminação dessas moléculas, dissipando o estresse oxidativo (El-Beltagi et al. 2011). A lignificação de parede celular em galhas parece ser outra forma de dissipação de moléculas estressoras (Kuster et al. 2020).

Os altos níveis de estresse estão diretamente relacionados ao funcionamento do aparato fotossintético, geralmente reduzindo o rendimento quântico da fotossíntese, como demonstrado para galhas induzidas por *Eugeniomyia dispar* (Diptera, Cecidomyiidae) nas folhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) (Rezende et al. 2018). Essa redução na fotossíntese é muitas vezes associada à redução dos pigmentos cloroplastídicos, principalmente pela redução da concentração de clorofila (Kuster et al. 2022), dada pela diluição de pigmentos resultado da hipertrofia celular (Oliveira et al. 2017).

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae), é uma espécie de relevância econômica tanto no Brasil como no exterior, sendo fonte de renda para agricultores familiares em diversos Estados brasileiros e importante recurso alimentar no mundo (Oliveira e Lima 2006; Rosa et al. 2014). Devido à importância econômica, existem diversos estudos evidenciando as doenças associadas a essa cultura, como as galhas que podem ocorrer tanto nas raízes como nas folhas da mandioca, provocadas por nematoides e insetos, respectivamente (Oliveira e Lima 2006; Rosa et al. 2014;

Durães & Araújo 2020). As galhas foliares da mandioca são comumente induzidas pela mosca-da-galha, *Iatrophobia brasiliensis* Rübsaamen, que é um díptero da família Cecidomyiidae (Maia 2021) (Hernandez 2011; Durães et al. 2020).

Manihot esculenta é uma espécie nativa do Brasil (Flora do Brasil, 2020), com grande distribuição e variedades da espécie pelos diferentes biomas brasileiros, inclusive contribuindo para a biodiversidade do Cerrado. O Cerrado é amplo e complexo (Silva & Bates 2002), ressaltado por Araújo (2011) como sendo favorável para o estudo das relações entre insetos galhadores e plantas hospedeiras, uma vez que parece existir uma preferência dos insetos galhadores por plantas em condições de estresse. Assim, sabendo-se da importância da diversidade florística e fisionômica do Cerrado para a biodiversidade (Ribeiro & Walter 2008), também é relevante ponderar o quanto a riqueza de insetos e suas formas de interação são pouco conhecidas, o que reforça a necessidade de estudos.

Frente ao exposto, a presente dissertação busca avaliar as modificações morfofuncionais promovidas por *Iatrophobia brasiliensis* Rübsaamen (Diptera, Cecidomyiidae) na formação das galhas de mandioca, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae), por meio de análises de anatomia, histoquímica, fotossíntese, imunocitoquímica da parede celular, níveis de estresse oxidativo e vias de dissipação de estresse. Para tal, a dissertação foi dividida em dois capítulos, assim distribuída:

1- Nutritive tissue rich in reserves in the cell wall and protoplast: the case of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) galls induced by *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera, Cecidomyiidae);

2- Sistemas antioxidantes das galhas de *Manihot esculenta* reduzem o estresse oxidativo e melhora o rendimento quântico da fotossíntese.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alché JD (2019) A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. Redox Biology 23, 101–136. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review Plant Biology* 55:373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>

Araújo WS (2011) Padrões de diversidade e insetos galhadores no Cerrado: a importância da comunidade de plantas. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ecologia e Evolução.

Bragança GP, Oliveira DC, Isaias RMS (2017) Compartmentalization of Metabolites and Enzymatic Mediation in Nutritive Cells of Cecidomyiidae Galls on *Piper arbureum* Aubl. (Piperaceae). *Journal of Plant Studies* 6:1. <https://doi.org/10.5539/jps.v6n1p11>

Bronner R (1992) The role of nutritive cells in nutrition of cynipids and cecidomyiids. In *Biology of insect-induced galls*. Edited by J.D. Shorthouse, and O. Rohfritsch. Oxford University Press, New York, N.Y. 118–140.

Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344:1879-1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>

Carneiro RGS, Oliveira DC, Isaias RMS (2014) Developmental anatomy and immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium myrtoides* (Myrtaceae) towards the globoid galls of *Nothotrioza myrtoides* (Triozidae). *Plant Cell Rep* 33: 2093–2106. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1683-7>

Carneiro RGS, Pacheco P, Isaias RMS (2015) Could the Extended Phenotype Extend to the Cellular and Subcellular Levels in Insect-Induced Galls?. *Plos One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129331>

Costa EC, Oliveira DC, Ferreira DKL, Isaias RMS (2021) Structural and Nutritional Peculiarities Related to Lifespan Differences on Four *Lopesia* Induced Bivalve-Shaped Galls on the Single Super-Host *Mimosa gemmulata*. *Original Research* 12, 660557. <https://doi:10.3389/fpls.2021.660557>

Durães MS, Araújo WS (2020) Effects of structural complexity and habitat type on the gall distribution of *Jatrophobia brasiliensis* (Rübsaamen, 1907) (Diptera, Cecidomyiidae) in two host-species of *Manihot* (Euphorbiaceae). *Entomological Communications*. <https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec02003>

- El-Beltagi HS, Kesba, HH, Abdel-Alim, AI, Al-Sayed, AA (2011) Effect of root-knot nematode and two species of crown gall on antioxidant activity of grape leaves. *African Journal of Biotechnology* 10(57), 12202-12210. <https://doi:10.5897/AJB11.1170>
- Ferreira BG, Oliveira DC, Moreira ASFP, Faria AP, Guedes LM, França MGC, Álvarez R, Isaias RMS (2018) Antioxidant metabolism in galls due to the extended phenotypes of the associated organisms. *Plos one* 13(10): e0205364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205364>
- Ferreira BG, Álvarez R, Bragança GP, Alvarenga DR, Pérez- Hidalgo N, Isaias RMS (2019) Feeding and Other Gall Facets: Patterns and Determinants in Gall Structure. *Bot Rev* 85:78–106. <https://doi.org/10.1007/s12229-019-09207-w>
- Flora of Brazil (2020) Flora of Brazil 2020 under construction. Rio de Janeiro (BR): Botanical Garden of Rio de Janeiro, 2017. Available in: <http://floradobrasil.jbr.gov.br/>
- Formiga AT, Oliveira DC, Ferreira BG, Magalhães TA, Castro AC, Fernandes W, Isaias RMS (2013) The role of pectin composition of cell walls in the determination of the new shape- functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma* 250: 899-908. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0473-8>
- Gilbert HJ (2010) The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiology* 153: 444- 455. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156646>
- Guimarães ALA, Bizarri CHB, Barbosa LS, Nakamura MJ, Ramos MFS, Vieira ACM (2013) Characterisation of the effects of leaf galls of *Clusiamyia nítida* (Cecidomyiidae) on *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae): Anatomical aspects and chemical analysis of essential oil. *Flora* 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.03.001>
- Guedes LM, Torres S, Saez-Carillo K, Becerra J, Pérez CI, Aguilera N (2022) High antioxidant activity of phenolic compounds dampens oxidative stress in *Espinosa nothofagi* galls induced on *Nothofagus obliqua* buds. *Plant Science*. 314, 111114. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111114>
- Hart DA, Kindel PK (1970) A novel reaction involved in the degradation of apiogalacturonans from *Lemna minor* and the isolation of Apibiose as a product. *Biochemistry* 9:10. <https://doi.org/10.1021/bi00812a024>

Hernández JFR (2011) La mosca de las agallas (*Jatrophobia brasiliensis*) en el cultivo de yucca. Revista de la Universidad de La Salle (56):277-288.

Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS (2011) Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). Botany (Ottawa. Print) 89: 581-592. <https://doi.org/10.1139/b11-048>

Isaias RMS, Oliveira DC, Moreira ASFP, Soares GLG, Carneiro RGS (2015) The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. Biochimica et Biophysica Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>

Kot I, Kmiec K, (2020) Poplar Tree Response to Feeding by the Petiole Gall Aphid *Pemphigus spyrothecae* Pass. Insects 11, 282. <https://doi:10.3390/insects11050282>

Kuster VC, Rezende UC, Cardoso JCF, Isaias RMS, Oliveira DC (2020) How Galling Organisms Manipulate the Secondary Metabolites in the Host Plant Tissues? A Histochemical Overview in Neotropical Gall Systems. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_29

Kuster VC, Fernandes CJC, Moreira ASFP, Isaias RMS, Oliveira DC (2022) Assessing oxidative stress and photosynthetic activity in leaf galls induced by different species of galling insect on *Aspidosperma* spp.. Biologia. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01167-8>

Liepmann AH, Nairn JC, Willats WGT, Sorensen I, Roberts AW, Keegstra K (2007) Functional Genomic Analysis Supports Conservation of Function Among Cellulose Synthase- Like A Gene Family Members and Suggests Diverse Roles of Mannans in Plants. Plant Physiology 143:1881-1893. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093989>

Lozano JC, Bellotti A, Reyes JA, Howeler R, Leihner D, Doll J (1981) Field Problems in Cassava. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 72-116. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10568/54043>

Maia VC (2021) Cecidomyiidae (Diptera, Insecta): richness of species and distribution in Brazil. Biota Neotrop 21(2). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1038>

Mani MS (1964) Ecology of plant galls. The Hague: Dr. W. Junk Publishers.

Meyer J, Maresquelle HJ (1983) Anatomie des galles. Berlin: Gebrüder Borntraeger.

Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, Breusegem FV (2022) Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Plant stress responses* v 23. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>

Oliveira DC, Isaias RMS (2007) Relações entre a ontogenia foliolar e idade dos tecidos para o valor adaptativo de galhas em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Oliveira DC, Isaias RMS (2010) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 76(2): 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.011>

Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMS (2014) Variation in the Degree of Pectin Methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* Kidney- Shaped Gall. *Plos one* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094588>

Oliveira DC, Moreira ASFP, Isaias RMS, Martini V, Rezende UC (2017) Sink status and photosynthetic rate of the leaflet galls induced by *Bystracoccus mataybae* (Eriococcidae) on *Matayba guianensis* (Sapindaceae). *Frontiers in Plant Science* 8:1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01249>

Oliveira MRV, Lima LHC (2006) Moscas- brancas na cultura da mandioca no Brasil. Embrapa.

Price PW, Waring GL, Fernandes GW (1986) Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88: 361-363.

Rezende UC, Moreira ASFP, Kuster VC, Oliveira DC (2018) Structural, histochemical and photosynthetic profiles of galls induced by *Eugeniomyia dispar* (Diptera, Cecidomyiidae) on the leaves of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae). *Revista de Biologia Tropical* 66:1469. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32531>

Ribeiro JF, Walter BMT (2008) The main phytophysiognomies of the Cerrado Biome. *Cerrado: Ecology and Flora* 6:174-178.

- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)
- Rohfritsch O, Anthony, M (1992) Strategies on gall induction by two groups of homopterans. In: Shorthouse J.D. & Rohfritsch O. (Eds.). *Biology of insect induced galls*.
- Rosa JMO, Oliveira SA, Jordão AL, Siviero A, Oliveira CMG (2014) Phytoparasitic nematodes associated with cassava in the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica* 44 (2): 271-275. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672014000200013>
- Silva JMC, Bates JM (2002) Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience* 52:3.
- Silva AFM, Lana LG, Kuster VC, Oliveira DC (2021) Chemical composition of cell wall changes during developmental stages of galls on *Matayba guianensis* (Sapindaceae): perspectives obtained by immunocytochemistry analysis. *The Science of Nature* 108:16. <https://doi.org/10.1007/s00114-021-01732-2>
- Teixeira CT, Oliveira DC, Kuster VC, Isaias RMS (2018) Immunocytochemical demonstration of cell wall components related to tissue compartments in the globoid galls induced by *Clinodiplosis* sp. (Cecidomyiidae) on *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). *Botany*. <https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0123>
- Voiniciuc C, Pauly M, Usadel B (2018) Monitoring Polysaccharide Dynamics in the Plant Cell Wall. *Plant Physiology* 176:2590-2600. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01776>
- Williats WGA, Marcus SE, Knox JP (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1-5) - α -L-arabian. *Carbohydr Res* 308:149-152. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00070-6)
- Xu C, Zhao L, Pan X, Samaj J (2011) Developmental Localization and Methylesterification of Pectin Epitopes during Somatic Embryogenesis of Banana (*Musa* spp. AAA). *Plos one* 6:8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022992>

2. CAPÍTULO I

Nutritive tissue rich in reserves in the cell wall and protoplast: the case of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) galls induced by *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera, Cecidomyiidae)

Chapter in article format and submitted to the Protoplasma

ABSTRACT

The galls can offer shelter, protection, and an adequate diet for the gall-inducing organisms. Herein, we evaluated the structure of *Manihot esculenta* leaves and galls induced by *Iatrophobia brasiliensis* in order to identify metabolic and cell wall composition changes. We expected to find a complex gall with high primary metabolism in a typical nutritive tissue. Non-galled leaves and galls were subjected to anatomical, histochemical, and immunocytochemical analyses to evaluate the structural features, primary and secondary metabolites, and glycoproteins, pectins, and hemicelluloses in the cell wall. The gall is cylindrical, with a uniseriate epidermis, a larval chamber, and a parenchymatic cortex divided into outer and inner compartments. The outer compartment has large cells with intercellular spaces and stocks starch and is designated as storage tissue. Reducing sugars, proteins, phenolic compounds, and alkaloids were detected in the protoplast of inner tissue cells of galls, named nutritive tissue, which presents five layers of compact and small cells. Cell walls with esterified homogalacturonans (HGs) occurred in some cells of the galls indicating the continuous biosynthesis of HGs. For both non-galled leaves and galls, galactans and xyloglucans were broadly labeled on the cell walls, indicating a cell growth capacity and cell wall stiffness, respectively. The cell wall of the nutritive tissue had wide labeling for glycoproteins, HGs, heteroxylans, and xyloglucans, which can be used as source for the diet of the galling insect. *Manihot esculenta* galls have compartments specialized in the protection and feeding of the galling insect, structured by nutritive tissue rich in resource compounds, in the cell walls and protoplast.

Keywords: Cassava. Hemicellulose. Pectin. Protein. Sugar.

2.1 INTRODUCTION

Gall-inducing organisms manipulate the host plant tissue to form galls through changes in their morphogenetic patterns (Mani 1964; Oliveira et al. 2016). This new plant organ (Shorthouse and Rohfritsch 2005) can offer shelter, protection against natural enemies and abiotic factors, and food to the gall-inducing organisms (Price et al. 1986; Rohfritsch and Anthony 1992). The histological, cytological, and histochemical profiles of galls, as well as the distribution of cell wall epitopes in gall tissues, have been intensely studied due to the importance of recognizing gall-inducer's impact on the host plant (Oliveira et al. 2010; Dias et al. 2013; Bomfim et al. 2019; Martini et al. 2019; Naves et al. 2021; Silva et al. 2021; Teixeira et al. 2022; Kuster et al. 2022; Vilela et al. 2023). In a histological view, galls can have simple tissue arrangement with poor differentiation, or a compartmentalized structure with a high tissue complexity, with complex galls may be identified by the occurrence of redifferentiation of a 'nutritive-like tissue', presence of mechanical layers, redifferentiation of other ground system cell types, changes in epidermis and promeristematic activity (Ferreira et al. 2019).

The nutritive tissue usually occurs surrounding the larval chamber, accumulating primary metabolites such as proteins, lipids, reducing sugars, and starch, which are helpful for the diet of the gall-inducing organism (Bronner 1990; Oliveira et al. 2016; Rezende et al. 2018; Ferreira et al. 2019). From a cytological perspective, the nutritive cells have thin cell walls and dense cell cytoplasm related to the nutrition of the gall inducer (Mani 1964; Bronner 1990), normally with a higher metabolic rate than other compartments once they produce distinct metabolites (Schönrogge and Lichtenstein 2001). The outer cortex or storage (reserve) tissue has large and vacuolated cells, as well as thin to thick cell walls (Mani 1964; Ferreira et al. 2015; Bragança et al. 2017). As an example of gall tissue compartmentalization, *Mimosa gemmulata* Barneby (Fabaceae) galls induced by Cecidomyiidae have a nutritive tissue with reducing sugars useful for feeding the gall inducer and storage tissue with starch grains (Costa et al. 2021). Thus, the metabolite accumulation and tissue compartmentalization are influenced by the complex mechanism of cell division and expansion, as well as the processes of cell hypertrophy and tissue hyperplasia, which are associated with the dynamic properties of the cell walls (Carneiro et al. 2014).

The cell wall consists of cellulose microfibrils, hemicelluloses, glycoproteins, and pectins (Xu et al. 2011; Ant et al. 2013; Voiniciuc et al. 2018). Pectins are involved in tissue and organ development, cell adhesion, growth regulation, and cell expansion (Caffall and Mohnen 2009; Carneiro et al. 2014). They can be classified mostly as homogalacturonans (HGs), rhamnogalacturonans I (RG-I), and rhamnogalacturonans II (RG-II) (Ridley et al. 2001; Hart and Kindel 1970). In *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae), the globoid shape of galls induced by *Nothotrioza myrtoidis* Burck. (Hemiptera: Psylloidea) was directly associated with the composition of pectins in the cell wall (Carneiro et al. 2014). For globoid leaf galls on *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) induced by *Clinodiplosis* sp. (Cecidomyiidae), the labeling of different epitopes of pectins and the degree of methylesterification of HGs indicated the changes of developmental stages and the maintenance of cell vitality, even after the end of gall development (Teixeira et al. 2018). The proteins also structure the cell walls, especially extensins and arabinogalactan proteins (AGPs) (Voiniciuc et al. 2018). Extensins form a network through intermolecular cross-links, which form a barrier in defense against pathogens, while AGP can operate on the plant's vegetative and reproductive growth, as well as on its development (Showater and Basu 2016). Hemicelluloses are polysaccharides linked by sugar groups such as mannans, xylans and xyloglucans (Gilbert 2010), which play a primary role in signaling plant growth and development (Liepman et al. 2007) and in cell elongation and expansion (Scheller and Ulvskov 2010). For galls, hemicelluloses when present in nutritive tissue have been associated with galling insect nutrition, reflecting a considerable energy resource in galls formed by dipterans (Bragança et al. 2020; Costa et al. 2021). The hemicelluloses from cell walls may be degraded by enzymes produced by some groups of insects, which provide resources to feed herbivorous insects (Calderón-Córtés et al. 2012). Herein, we performed a detailed and comparative anatomical, histochemical and immunocytochemical analysis to understand the cellular and tissue metabolism of two gall compartments induced by Diptera on an important economic plant species in Brazil.

Manihot esculenta Crantz (Euphorbiaceae) is a native species of Brazil (Flora do Brasil 2020) and a food resource of great importance to the world (Oliveira and Lima 2006; Rosa et al. 2014; Walnut et al. 2021), which causes leaf yellowing, stunted growth, and reduced size of the roots with high infestation of galls in *M. esculenta* leaves (Farias and Bellotti 2006). The galling insect *I. brasiliensis* is commonly found

in different cassava crops (Hernández 2011), being the best-known inducer of their leaf galls (Lozano et al. 1981; Hernandez 2011; Durães and Araújo 2020). As a Cecidomyiidae, *I. brasiliensis* has a scraping-sucking feeding habit, damaging the cells on which they feed (Oliveira et al. 2016). So, the current study seeks to evaluate the mature leaf galls of *M. esculenta* induced by *I. brasiliensis* from an anatomical, histochemical and immunocytochemical point of view, in order to answer the following questions: i) Are the galls induced by *I. brasiliensis* structurally complex, as well as with primary metabolites accumulating in a typical nutritive tissue? And ii) Does a large amount of metabolites, that is associated with the high metabolism, of nutritive tissue reflect the presence of methylesterified HGs and hemicelluloses? We hypothesize that the mature galls of *M. esculenta* are complex, based on Ferreira et al. (2019), and with high occurrence of energy reserves in both compartments, cell walls with non-methylesterified pectins and rich in hemicelluloses, both structuring the cell walls of galls and supporting the galling insect diet.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Study area and host plant-insect system

The study was carried out at “Fazenda São José”, located 90 km away from the Jataí municipality, Goiás State (18°27'43"S/ 51°37'10" W), Brazil, which has a small area planted with *M. esculenta* for family consumption. The gall formation on *M. esculenta* Crantz induced by *I. brasiliensis* (Fig. 1A-D) begins with egg deposition by the adult female on leaf surfaces, followed by subsequent hatching of eggs and initiation of larval feeding on host plant tissues (Álvarez et al. 2012; Scareli-Santos et al. 2018; Flora do Brasil 2020). The induction promotes the development of a cylindrical and elongated gall with a generally green color (Durães and Araújo 2020). For the current study, non-galled leaves of the 3rd node and galls of *Manihot esculenta* subspecies *esculenta* (Fig. 1A-D), both mature, were collected for histological, histochemical and immunocytochemical analyses (n= 3 plants per treatment). We consider mature galls those that have reached their maximum size morphologically (About 7 mm of height

and 4 mm of width), in which the inducing insect is in the larval stage in high feeding activity.

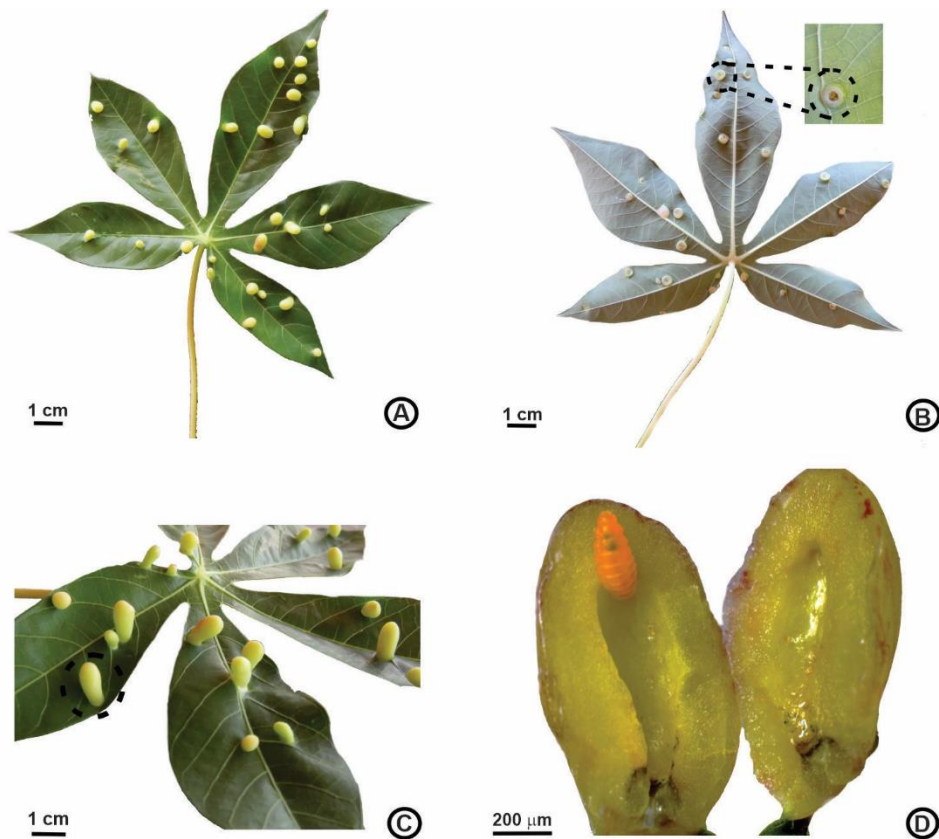


Fig. 1. Galls on *Manihot esculenta* leaf. A- Galls on adaxial leaf surface; B- Ostiole of galls on abaxial leaf surface; C- Detail of galls (in the black circle) on adaxial leaf surface; D- Gall in longitudinal section showing the larval chamber with a gall inducer.

2.2.2 Morphological and histological analyses

For the morphological analyses, 35 mature galls were collected in the field and measured for height and width using the 150 mm Digimess[®] digital caliper. The fresh and fixed mature galls with their gall inducer were photographed under a Leica M165C stereoscopic microscope coupled to a Leica[®] DFC295 digital camera.

For histological analyses, fragments of the median internervial region of the non-galled leaves (n= 3) and the galls (n= 3) were fixed in FAA₇₀ (formalin, acetic acid and 70% ethanol, 1:1:18 v/v) (Johansen 1940) for 48 h and stored in 70% alcohol. The samples were dehydrated in ethyl series, included in 2-hydroxyethyl methacrylate

(Historesin, Leica[®] Instruments, Heidelberg), transversal and longitudinal sectioned in rotary microtome (Leica[®] RM2235) at 5 µm and stained with 0.05% toluidine blue, pH 4.7 (O'Brien et al. 1964). The slides were mounted in Entellan[®] and photographed under a light microscope (Leica[®] DM750) coupled with a digital camera (Leica[®] ICC50 HD).

2.2.3 Histochemical analyses

Histochemical analyses were performed on freshly collected samples from the median internerval region of the non-galled leaves (n= 3) and the median portion of the galls (n= 3), which were freehand cross-cut with a razor. A freehand cut control, i.e., the fresh plant sample sectioned, without fixation, inclusion, or staining, was also made. Only the starch test was performed on the samples embedded in Historesin. Just metabolites from the protoplast of cells were considered as a result. For the detection of proteins, the samples were subjected to Xilidine Ponceau for 15 min, with subsequent washing in 3% acetic acid for 5 min (Mazia et al. 1953). Red indicates a positive result. Lipids were detected by Sudan III in 70% alcohol for 5 min (Sass 1951). Orange to reddish color indicates a positive result. For starch detection, Lugol solution was used for 10 min (Johansen 1940). Black to purple color indicates a positive result. Reducing sugars were evaluated by Fehling's reagent, with subsequent heating of the blade until pre-boiling (Sass 1951). Orange to reddish color indicates a positive result. The total phenolic compounds were identified by the solution of Iron Chloride III (Johansen 1940), after 15 min of reaction. Black labeling indicates positive results. The alkaloids were detected by Dragendorff's reagent for 15 min with washing in 5% sodium nitrite (Svendsen and Verpoorte 1983). Brown staining indicates positive result. All samples were mounted in distilled water or in the reagent itself and photographed later under a light microscope (Leica DM750) coupled with a digital camera (Leica ICC50 HD).

2.2.4 Immunocytochemical analyses

For the immunocytochemical analyses, plant samples (n= 3 per treatment) were processed according to the methodology described in the item "histological analyses", but without staining and mounting the slides. For the labeling of hemicellulose epitopes,

the samples were immersed in 10 ug ml⁻¹ of pectate lyase (Sigma-Aldrich) in 2 mM of CaCl₂ buffer, 50 mM of 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS) (Sigma-Aldrich, USA), at pH 10, for 2 h. Then, the procedure was similar to all samples, with the immersion of the samples in a blocking solution of 3% w/v of powdered milk (Molico[®]) / phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min. The samples were incubated in primary monoclonal antibodies LM1, LM2, LM5, LM6, LM11, LM15, LM19, LM20 and LM21 (Centre for Plant Sciences, University of Leeds, UK) for 2 h (Table 1). After primary incubation, the sections were washed in PBS, with subsequent incubation in the secondary antibody FITC (1:100 in 3% w/v of powdered milk/PBS) for 2 h in the dark. Slides without incubation with the primary antibody were used as controls. At the end of the process, all slides were washed in PBS and mounted on 50% glycerin. The samples were then analyzed under a Leica DM4000 LED coupled with an HD monochromatic camera (DFC3000 G) and FITC filter with an excitation/emission peak wavelength at 495/517 nm. We also used a DAPI filter with excitation/emission peak at 358/463 nm for autofluorescence localization in a second set of control tests (Chomick et al. 2014) using an overlap function of the microscope software to better show the results of monoclonal antibodies. Thus, the positive (+) results were labeled green with a FITC filter, and the negative (-) results were labeled blue with a DAPI filter. All samples were photographed under the same conditions. The fluorescence intensity of the epitopes was defined by grayscale methodology, using ImageJ software version 1.51k (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), and the measurements were performed in triplicate for each tissue. Three categories of intensity were established based on the highest and lowest values: negative (0 Gy), weak (≤ 10 Gy), moderate (11-19 Gy) and intense (≥ 20 Gy).

Table 1. Monoclonal antibodies and their respective epitopes for the recognition of proteins, pectins and hemicelluloses.

Antibodies Monoclonal	Epitopes	References
LM1	Extensins	Smallwood et al. (1996)
LM2	Arabinogalactan- proteins (AGP)	Smallwood et al. (1996) e Yates et al. (1996)
LM5	(1 → 4) β-D- galactans	Jones et al. (1997) e Orfla e Knox (2000)

LM6	(1 → 5) - α -L- arabinans	Williats et al. (1998); Orfla e Knox (2000); Orfla et al. (2001) e Verherbruggen et al. (2009)
LM19	Non-methylesterified homogalacturonan (HG)	Verherbruggen et al. (2009)
LM20	Methylesterified homogalacturonan (HG)	Verherbruggen et al. (2009)
LM11	Heteroxylans	McCartney et al. (2005)
LM15	Xyloglucans	Marcus et al. (2008)
LM21	Xyloglucan- heteromannans	Marcus et al. (2010)

2.3 RESULTS

2.3.1 Morphology and anatomy

The galls have cylindrical morphotype (Fig. 1A-D), with an average height of 6.9 ± 0.92 mm, and average width of 3.6 ± 0.46 mm. The galls are usually whitish to pinkish (Fig. 1A-D), projected towards the adaxial leaf surface (Fig. 1A, C) and with an ostiole, on the abaxial leaf surface that opens after complete gall maturation (Fig. 1B). Each open gall had only one larval chamber, with only one gall inducer inside (Fig. 1D).

The non-galled leaf is hypostomatic, with a uniseriate epidermis (Fig. 2A). It has a dorsiventral mesophyll, with palisade parenchyma with one layer of cells and spongy parenchyma with three to five layers (Fig. 2A), as well as collateral vascular bundles (Fig. 2A) and barely visible laticifers. The gall shows a uniseriate epidermis, with a parenchymal cortex with storage and nutritive compartments (Fig. 2B-E). The mature gall showed a closed ostiole (Fig. 2B). The storage cortex has about twenty-two to twenty-eight layers of visually large cells with intercellular spaces, collateral vascular bundles, and laticifers (Fig. 2C, D). In the transverse section, the gall has just one rounded and central larval chamber (Fig. 2C). The nutritive cortex surrounds the larval chamber and has three to five layers of compact and small cells with dense cytoplasm, with an innermost being a uniseriate epidermis (Fig. 2E).

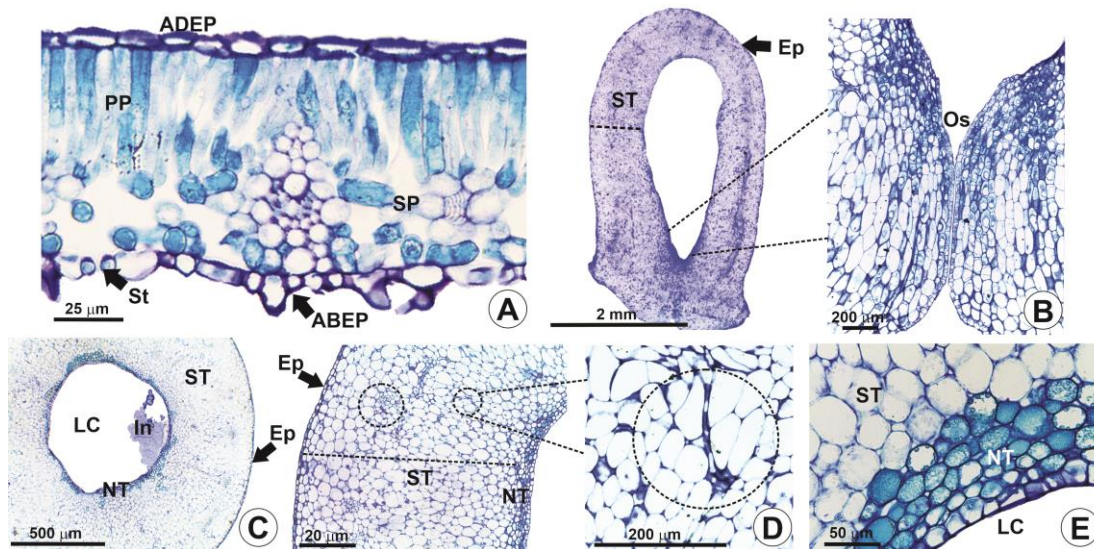


Fig. 2. Anatomical features of the non-galled leaves (A) of *Manihot esculenta* and its gall (B-E), induced by *Iatrophobia brasiliensis*. A, C, D, E- Transversal section; B- Longitudinal section; A- Uniseriate epidermis, dorsiventral mesophyll and collateral vascular bundle. Stomata occur only on the abaxial face; B- General structure of gall, with detail of ostiole; C- Parenchymatic cortex and larval chamber with inducer; D- Detail of the cortex with collateral vascular bundles (dotted, to the left), as well as of the laticifer (dotted, on the right); E- Detail of the storage and nutritive cortex. Abbreviations: ST- Storage tissue; NT- Nutritive tissue; LC- Larval chamber; Co- Cortex; Ep- Epidermis; ADEP- Epidermis on the adaxial face; ABEP- Epidermis on the abaxial face; St- Stomata; VB- Vascular bundle; In- Inducer; SP- Spongy parenchyma; PP- Palisade parenchyma.

2.3.2 Histochemistry

The non-galled leaf has lipid droplets in the cells of the epidermis on the abaxial surface and in the mesophyll, while proteins were stained exclusively in the mesophyll. Starch grains were marked in the palisade and spongy parenchyma (Fig. 3A). Phenolic compounds and alkaloids were not stained in the non-galled leaves. In the gall, the histochemistry results allowed classifying the outer cortex as storage tissue and the inner cortex as nutritive tissue. Starch grains were detected in the storage tissue (Fig. 3B) and in cells near to nutritive tissue (Fig. 3C). Reducing sugars occurred only in the epidermal cells of the adaxial face in the non-galled leaves (Fig. 3D), while in the galls,

reducing sugars (Fig. 3E, F) and proteins (Fig. 3G, H) were detected in the vascular bundles and nutritive tissue. Alkaloids (Fig. 3I, J) and phenolic compounds (Fig. 3K, L) were labeled in the epidermis, vascular bundles, and nutritive tissue.

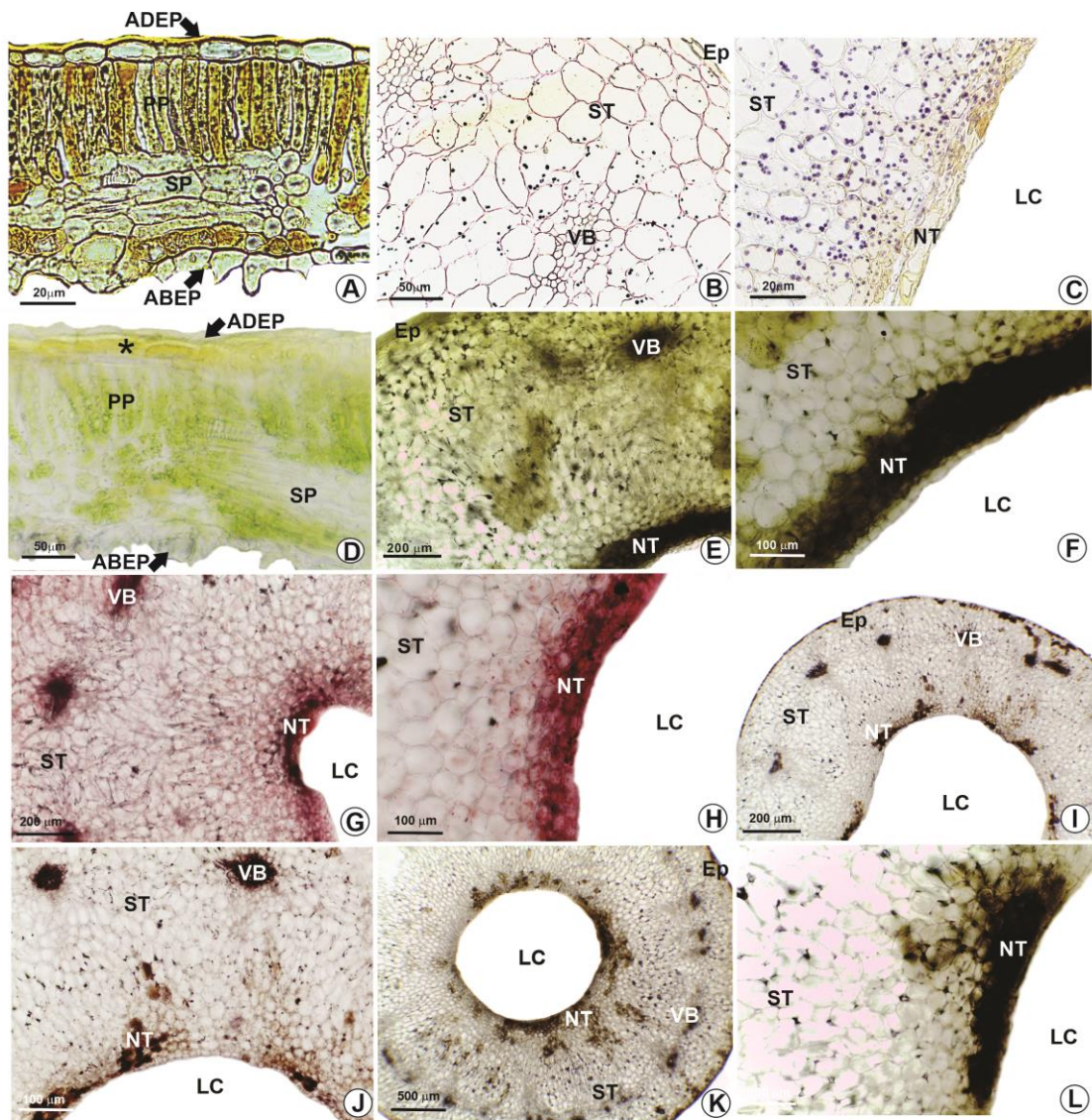


Fig. 3. Positive histochemical results in the non-galled leaves (A) of *Manihot esculenta* and its gall, induced by *Iatrophobia brasiliensis*. A, D- Non-galled leaves; B, C, E-L- Gall; A- Starch in the mesophyll; B- Detail of starch in the outer cortex; C- Detail of starch in the inner cortex; D- Reducing sugars in the epidermis; E- Reducing sugars in the vascular bundles and inner cortex; F- Detail of the reducing sugars in the inner cortex; G- Proteins in the vascular bundles and inner cortex; H- Detail of proteins in the inner cortex; I- Alkaloids in the epidermis, vascular bundles and inner cortex; J- Detail of alkaloids in the vascular bundle and inner cortex; K- Phenolic compounds in the outer and inner cortex; L- Detail of phenolic compounds in the inner cortex.

Abbreviations: ADEP- Epidermis on the adaxial face; ABEP- Epidermis on the abaxial face; PP- Palisade parenchyma; SP- Spongy parenchyma; ST- Storage tissue; NT- Nutritive tissue; LC- larval chamber; Ep- Epidermis; VB- Vascular bundle. *Positive result to reducing sugars.

2.3.3 Immunocytochemistry

In the non-galled leaves, epitopes of extensins and AGP were weakly and moderately labeled, respectively, by LM1 and LM2 in the cell walls of the epidermis on the adaxial face and the spongy parenchyma (Table 2). The epitopes of (1→4)-β-D-galactan and (1→5)-α-L-arabinan, recognized by LM5 and LM6, were weakly labeled in all tissues, except for vascular bundles, which were moderately labeled by LM5 (Fig. 4A, B; Table 2). Non-methyl-esterified homogalacturonans (HGs), recognized by LM19, were moderately labeled on the cell walls of the epidermis on the adaxial surface and in the mesophyll cells (Table 2). No labeling of methylesterified HGs, recognized by LM20, was observed in the tissues of the non-galled leaf (Table 2). Heteroxylan epitopes, recognized by LM11, were weakly labeled in the cell walls of the epidermis of the adaxial surface and the spongy parenchyma of the non-galled leaves (Table 2), while xyloglucans, identified by LM15, were weakly recognized in all tissues. Epitopes of heteromannans, recognized by LM21, were not labeled on any non-galled leaf tissues (Table 2).

Table 2. Fluorescence intensity of epitopes of proteins (LM1 and LM2), pectins (LM5, LM6, LM19 and LM20) and hemicelluloses (LM11, LM15 and LM21) in the cell walls of the non-galled leaves of *Manihot esculenta* and its galls induced by *Iatrophobia brasiliensis*.

Tissues	Antibodies								
	LM1	LM2	LM5	LM6	LM19	LM20	LM11	LM15	LM21
<i>Non-galled leaf</i>									
Adaxial epidermis	+	++	+	+	++	-	+	+	-
Palisade	-	-	+	+	++	-	-	+	-

parenchyma									
Spongy parenchyma	+	++	+	+	++	-	+	+	-
parenchyma									
Vascular bundle	-	-	++	+	-	-	-	+	-
Abaxial epidermis	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Gall</i>									
Epidermis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Storage tissue	-	-	++	+	-	-	-	-	-
Vascular bundle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nutritive tissue	+	+	+++	+	+	++	+	+	+

Reaction intensity: negative (-), weak (+), moderate (++) and intense (+++).

In gall, epitopes of extensins and AGP, recognized by LM1 and LM2, were weakly labeled on the cell walls of the epidermis and nutritive tissue (Fig. 4C, D; Table 2). The epitopes of (1→4)-β-D-galactans, recognized by LM5, were weakly, moderately, and intensely labeled, respectively, in the cell walls of the epidermis, storage and nutritive tissues (Fig. 4E, F; Table 2). Epitopes of (1→5)-α-L-arabinan, recognized by LM6, were weakly labeled in the epidermis, outer and inner cortex (Fig. 4G; Table 2). Xyloglucan epitopes, recognized by LM15, were weakly labeled in the cell walls of the epidermis and nutritive tissue (Fig. 4H; Table 2). Epitopes of heteroxylans and heteromannans, recognized respectively by LM11 and LM21, showed equally weak markings for the cell walls of the epidermis and nutritive tissue (Table 2). Non-methylesterified HGs, recognized by LM19, and methylesterified HGs, recognized by LM20, were weakly to moderately labeled in the epidermis and nutritive tissue of the galls (Fig. 4I, J; Table 2).

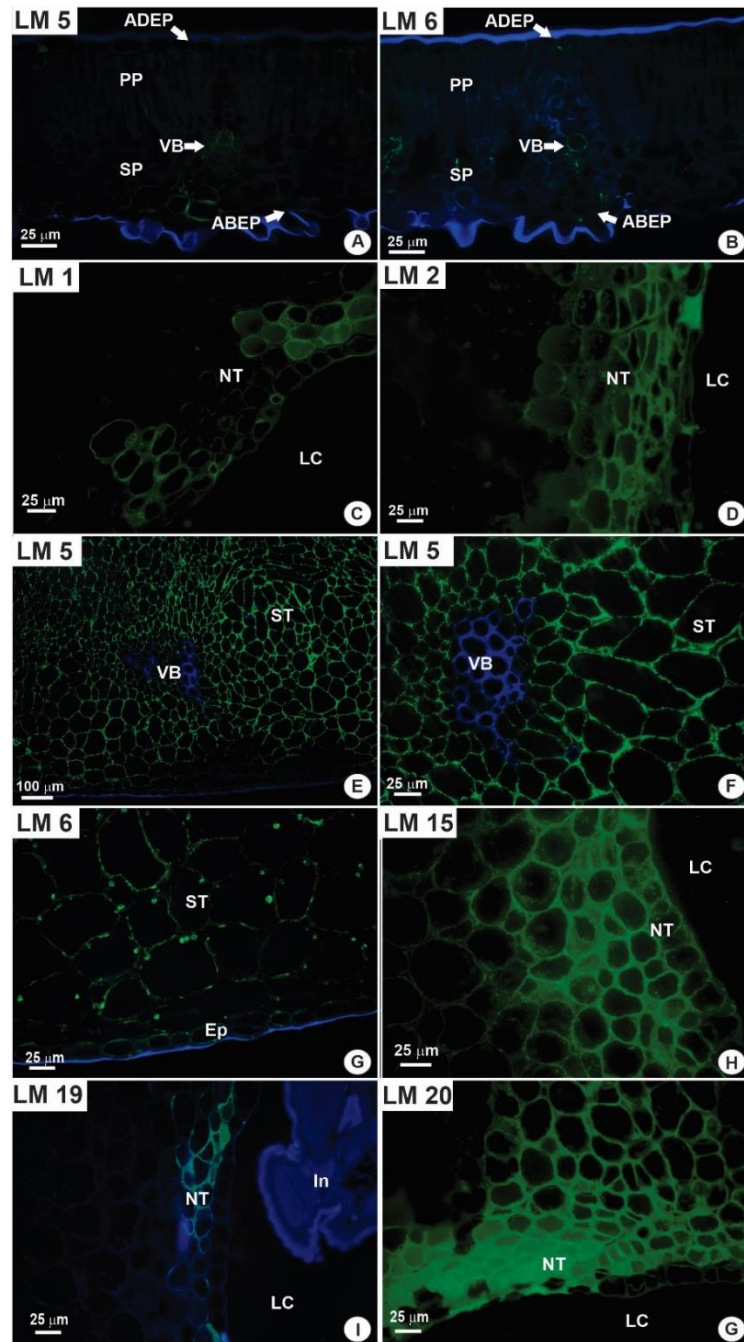


Fig. 4. Immunocytochemical results of proteins, pectins, and hemicelluloses in the cell walls of the non-galled leaves (NGL) of *Manihot esculenta* and its galls, induced by *Iatrophobia brasiliensis*. A- Non-galled leaf with (1→4)-β-D-galactans weakly labeled in the epidermis and mesophyll, and moderately labeled in the vascular bundle; B- Non-galled leaf with (1 → 5) -α-L- arabinans weakly labeled in all tissues. D- Gall with extensins weakly labeled in nutritive tissue; E- Gall with arabinogalactan-proteins weakly labeled in nutritive tissue; E, F- Gall with (1→4)-β-D-galactans moderately labeled in storage tissue; G- Gall with (1 → 5) -α-L- arabinans weakly labeled in

storage tissue; H- Gall with xyloglucans weakly labeled in nutritive tissue; I- Gall with non-methylesterified HGs weakly labeled in nutritive tissue; J- Gall with methylesterified HGs moderately labeled in nutritive tissue. *Green color indicates the presence of the epitope and blue color indicates absence. Abbreviations: ST- Storage tissue; NT- Nutritive tissue; LC- Larval chamber; Ep- Epidermis; ABEP- Epidermis on the abaxial face; ADEP- Epidermis on the adaxial face; VF- Vascular bundle; In- Inducer; SP- Spongy parenchyma; PP- Palisade parenchyma.

2.4 DISCUSSION

The *M. esculenta* leaf galls have a typical nutritive tissue rich in carbohydrates and proteins in the cell walls and protoplast. This cecidomyiid gall has an outer cortex as storage tissue and the innermost cell as typical nutritive tissue with a differential histochemical gradient, as pointed out in the literature (Guimarães et al. 2013; Bragança et al. 2017; Bragança et al. 2020; Costa et al. 2021). The histochemical and anatomical profiles can be associated with cell wall epitope distributions that evidence adaptive histo-functional compartments in the gall. Based on the cell wall analysis, there is a balance between stiffness and flexibility in the cell walls of *M. esculenta* galls, as well as xyloglucans and other compounds that may be useful to feed the gall inducer, once the polysaccharides in the cell walls can be consumed.

2.4.1 Histo-functional compartmentalization of the cortex

Galls induced by *I. brasiliensis* on *M. esculenta* are complex, based on Ferreira et al. (2019), and compartmentalized, with a high accumulation of metabolites in their cortex. The cortex of *M. esculenta* gall is just parenchymatic, as also reported for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) galls induced by *Eugeniamyia dispar* Gen. N. and SP. N. (Rezende et al. 2018). However, *M. esculenta* gall has storage and nutritive tissues identified by the cellular size, degree of compaction, and accumulation of primary and secondary metabolites. Histo-functional compartmentalization with the presence of a typical nutritive tissue in the cortex as herein observed is common for Diptera-induced

galls and plays important functional roles, especially the nutrition of the gall inducer (Ferreira et al. 2019).

Reducing sugars and proteins have been often detected in the nutritive tissue of galls induced by Cecidomyiidae (Oliveira et al. 2010; Formiga et al. 2011; Ferreira and Isaias 2014), as well as carbohydrates, such as in *Aspidosperma spruceanum* Benth. leaf galls induced by a Cecidomyiidae (Oliveira et al. 2010). The primary metabolites were also reported here in the nutritive tissue of *M. esculenta* galls, which may be related to the feeding habit of *Iatrophobia brasiliensis*, which is usually sucking disrupted-cell fluid for galling insects of the order Diptera (Oliveira et al. 2016; Ferreira et al. 2019). The establishment of a gradient with high concentrations of primary compounds in the nutritive tissue confirms its high metabolic and physiological activity (Guimarães et al. 2013), promoted by the continuous chemical stimulus of the galling organism. The reducing sugars and proteins in vascular bundles of *M. esculenta* galls may indicate a greater supply of metabolites for galls, reinforcing their role as physiological sinks, since they are able to intensify the flow of nutrients useful for gall inducer feeding and gall development (Shorthouse et al. 2005). Starch grains are complex polysaccharides usually found in galls after the gall inducer stops or decreases their feeding activity since there is a reduction in gall metabolism (Bronner 1992), as well as from a strong sink created by the galls. This complex polysaccharide is commonly reported in the storage tissue of the gall, as in the four morphotypes of *Lopesia* Rübsaamen spp. - *Mimosa gemmulata* Barneby system, which was also detected in the nutritive tissue of the globoid bivalve morphotype (Costa et al. 2021), being broken down into glucose, sucrose and fructose and consumed for gall metabolic maintenance or feeding activity of the galling insect (Oliveira and Isaias 2010). For some galls, starch grains occur in cells that surround the larval chamber, forming after the female reaches adulthood (Oliveira et al. 2017). For the *M. esculenta* galls, starch grains occurred throughout the cortex, which may be a strategy to remain metabolically active to support rapid larval growth and gall development.

Phenolic compounds are reported in the different plant organs and are functionally related to protection from biotic and abiotic stresses (Corso 2020) and to the dissipation of oxidative stress, as previously pointed out for galls of *Aspidosperma* spp. (Kuster et al. 2022) and discussed in a general way for galls (Isaias et al. 2015). In addition, phenolics may also promote the growth and development of plant organs

(Beran et al. 2019), as demonstrated with galls induced by *Bystracoccus mataybae* Hodgson, Isaias & Oliveira (Hemiptera) (Silva et al. 2019). They are less detected in the inner cortex (Kuster et al. 2019), however, the amount between inner and outer cortex can be similar, as reported for galls of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. (Myrtaceae) induced by *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) (Isaias et al. 2018), supporting tissue homeostasis once they scavenge free radicals (Lattanzio et al. 2006; Oliveira et al. 2016). For *M. esculenta* galls, phenolics occurred in the nutritive tissue, as also reported for galls induced by *Schizomyia macrocapillata* Maia (Diptera) in *Bauhinia brevipes* Vogel (Fabaceae) (Sá et al. 2009), which may indicate a role of dissipation of oxidative stress, normally high in inner compartments. Alkaloids act as a chemical barrier against herbivory because they have a bitter taste and toxic nature (Trigo 2011), so this defense role against attack of predators is attributed to the alkaloids marked in the epidermis of the *M. esculenta* galls. Furthermore, the labeling of alkaloids and phenolics only in the galls seems that galling insect enhances the synthesis pathway of these metabolites. Alkaloids also are reported in such galling plant tissues and can also be produced by the insect, as in the case of ants (Fox and Adams 2021).

2.4.2 Immunocytochemistry of the cell walls: pectins, proteins and hemicelluloses

The extensins, recognized by LM1, and ramogalacturonans (RGs) with side chains of (1→5)- α -L-arabinans, recognized by LM6, are related to the end of cell growth since they limit the expansion process, acting, respectively, in the reinforcement of the cell wall (Cassab 1998; Sabba and Lulai 2005) and in the increase of adhesion, especially in the middle lamella (Brummell et al. 2004; Caffall and Mohnen 2009). The LM6 antibody was largely labeled in mature non-galled tissues and in the epidermis and nutritive tissue of galls, and could be a good indicator of cell maturation for *M. esculenta* compared to LM1, which was labeled in some tissues. RGs with side chains of (1 → 4) β -D-galactan, recognized by LM5, may provide an increase in cellular flexibility, involved in the process of cell extension (McCartney et al. 2003). This epitope was marked at different levels in all tissues of the non-galled leaves, and in the galls, except for the vascular bundles, indicating that despite the final size of the gall, the ability to elongate and grow is maintained. LM5 labeling on mature galls has already been reported for *Baccharopelma dracunculifoliae* Burckhardt et al., 2004

(Oliveira et al. 2014) and in the globoid galls of *Croton floribundus* (Teixeira et al. 2018), occurring in the cortical parenchyma. The moderate to intense labeling of (1 → 4) β-D-galactan in the storage and nutritive, of the *M. esculenta* galls may suggest the flexibility of cell walls for the exit of the gall inducer, since their ostiole is smaller than the adult galling insect.

The HGs are deposited in the cell walls in high methyl-esterified form, indicating a young status of the cell, occurring as a natural process of cell maturation that is accompanied by the demethylesterification of HGs (Micheli 2001). For *M. esculenta* leaves, epitopes of non-methylesterified HGs were recognized by LM19 in the epidermis and palisade and spongy parenchyma, suggesting that HGs undergo demethylesterification by the action of pectin methylesterases (PMEs) (Micheli 2001). This process indicates that the cell wall has gained in cell stiffening typical of mature cell walls (Albersheim et al. 2011), which is promoted by binding with calcium bridges that form high-viscosity matrix gels (Willats et al. 2001; Wolf et al. 2009). For *M. esculenta* galls, the fluorescence was more intense for epitopes with methylesterified HGs, recognized by LM20, in the nutritive cells, which demonstrates the maintenance of cell expansion capacity and characteristics of juvenile cells (Sotiriou et al. 2016; Teixeira et al. 2018).

The xyloglucans, recognized by LM15, characterize mature cells and indicate reduced cell expansion capacity and increased cell wall stiffness (Voiniciuc et al. 2018; Bragança et al. 2020). In addition, in the cell walls of the nutritive tissue of *Inga ingoides* (Rich.) Willd. galls, the xyloglucans were associated with the nutrition of the galling herbivore (Bragança et al. 2020), which may be related to *M. esculenta* galls, since the labeling also happens in its nutritive cells. Another epitope labeled in the nutritive cells, the heteromannans, was not recognized in any compartment of the three morphotypes of galls formed in *I. ingoides* (Bragança et al. 2020), with the same occurring for the gall induced by nematodes and mites in *Miconia albicans* (Sw.) Steud. and *Miconia Ibaguensis* (Bonpl.) Triana (Ferreira et al. 2019). The labeling of these epitopes on *M. esculenta* galls, expands the possible hemicellulose used in the feeding of gall inducers.

The ability of phytophagous insects to use cell wall polysaccharides as an energy source, by symbiosis or endogenous enzymes that can degrade these chemical

constituents (Watanabe and Tokuda 2010), has been researched for decades (Bignell 1977). In germline processes, non-cellulosic polysaccharides are used as carbohydrate reserves (Harris 2006), since xyloglucans can be used by the embryo with the same functionality as starch (Hayashi 1989). The degradation of hemicelluloses can form different pentoses and hexoses, constituting a variety of sugars, which can be mediated by the action of endoenzymes, exoenzymes, and auxiliary enzymes, which cleave the main chain releasing monomeric sugars and the side chains forming monosaccharides and disaccharides (Aro et al. 2005). So, the digestion of the cell walls by herbivorous insects, by a complex enzymatic group, such as endogenous cellulases, hemicellulases and pectinases (Calderón-Córtés et al. 2012) may provide flowed sugars. From the gall induction point of view, these sugars may be used as a food resource for the feeding of gall inducer, which makes us believe that the broad labeling of hemicelluloses in the cell walls of the nutritive cells of *M. esculenta* galls can be associated with the feeding of *I. brasiliensis*.

2.5 CONCLUSION

Herein, we report a histo-functional compartmentalization of the cortex of *M. esculenta* galls, mostly associated with the distribution of primary and secondary metabolites between outer and inner compartments. So, there is tissue complexity of *M. esculenta* galls, but it is lower than reported for other galls induced by Cecidomyiidae, according to the definitions of complexity in galls described by Ferreira et al. (2019). For the formation of *M. esculenta* galls, the cell walls of the leaves were restructured regarding the presence of proteins, pectins and hemicelluloses, with varied level of methylesterification of HGs among the tissues. The labeling of RGs with (1→5)- α -L-arabinans and (1→4)- β -D-galactans on the gall cell walls evidence balance between stiffness and flexibility. The nutritive tissue showed wide labeling of non-cellulosic components, especially xyloglucans, which can be useful to feed the gall inducer.

2.6 REFERENCES

- Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A (2010) Plant cell walls: from chemistry to biology. New York: Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9780203833476>
- Álvarez E, Bellotti A, Calvert L, Arias B, Cadavid LF, Pineda B, Llano G, Cuervo M (2012) Practical handbook for managing cassava diseases, pests, and nutritional disorders. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) p.89. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10568/88236>
- Amorim DO, Ferreira BG, Fleury G (2017). Plant potentialities determine anatomical and histochemical diversity in *Mikania glomerata* Spreng. galls. Brazilian Journal of Botany 40: 517–527. <https://doi.org/10.1007/s40415-016-0357-9>
- Beran F, Köllner TG, Gershenzon J, Tholl D (2019) Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. New Phytologist 223: 52-67. <https://doi.org/10.1111/nph.15718>
- Bomfim PMS, Cardoso JCF, Rezende U, Martini VC, Oliveira DC (2019) Red galls: the different stories of two gall types on the same host. Plant Biology v. 21, p. 284-291. <https://doi.org/10.1111/plb.12915>
- Bragança GPP, Alencar CF, Freitas MSC, Isaias RMS (2020) Hemicelluloses and associated compounds determine gall functional traits. Plant Biology. <https://doi.org/10.1111/plb.13151>.
- Bronner R (1992) The role of nutritive cells in nutrition of cynipids and cecidomyiids. In Biology of insect-induced galls. Edited by J.D. Shorthouse, and O. Rohfritsch. Oxford University Press, New York, N.Y. 118–140.
- Bronner R (1977) “Contribution à l’étude Histochimique des Tissus Nourriciers des Zooecidies”. Marcellia 40:1-134.
- Brummell DA, Cin VD, Crisosto CH, Labavitch JM (2004) Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. J. Exp. Bot 55:2029–2039. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh227>

- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344:1879-1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Calderón-Cortés N, Quesada M, Watanabe H, Cano-Camacho H, Oyama K (2012) Endogenous Plant Cell Wall Digestion: A Key Mechanism in Insect Evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 43:45-71. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411160312>
- Carneiro RGS, Oliveira DC, Isaias RMS (2014) Developmental anatomy and immunocytochemistry reveal the neo-ontogenesis of the leaf tissues of *Psidium myrtoides* (Myrtaceae) towards the globoid galls of *Nothotrioza myrtoides* (Triozidae). *Plant Cell Rep* 33: 2093–2106. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1683-7>
- Carneiro RGS, Pacheco P, Isaias RMS (2015) Could the Extended Phenotype Extend to the Cellular and Subcellular Levels in Insect-Induced Galls? *Plos One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129331>
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 281–309. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.281>
- Corso M, Perreau F, Mouille G, Lepiniec L (2020) Specialized Phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Journal Pre-proop*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110471>
- Chomick G, Bidel LPR, Jay-Allemand C (2014) Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. *Flora* 209: 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.01.001>
- Dias GG, Moreira GRP, Ferreira BG, Isaias RMS (2013) Why do the galls induced by *Calophya duvauae* Scott on *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) change colors? *Biochemical Systematics and Ecology* 48, 111- 122. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.12.013>
- Durães MS, Araújo WS (2020) Effects of structural complexity and habitat type on the gall distribution of *Jatrophobia brasiliensis* (Rübsaamen, 1907) (Diptera, Cecidomyiidae) in two host-species of *Manihot* (Euphorbiaceae). *Entomological Communications*. <https://doi.org/10.37486/2675-1305.ec02003>

- Farias ARN, Bellotti AC (2006) Pragas e seu controle. In: Souza LS, Farias ARN, Mattos PLP, Fukuda WMG (ed) Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 591-671.
- Ferreira BG, Isaias RMS (2014) Floral-like destiny induced by a galling Cecidomyiidae on the axillary buds of *Marcetia taxifolia* (Melastomataceae). *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 209(8):391–400. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.06.004>
- Ferreira BG, Álvarez R, Bragança GP, Alvarenga DR, Pérez- Hidalgo N, Isaias RMS (2019) Feeding and Other Gall Facets: Patterns and Determinants in Gall Structure. *Bot. Rev* 85:78–106. <https://doi.org/10.1007/s12229-019-09207-w>
- Flora of Brazil (2020) Flora of Brazil 2020 under construction. Rio de Janeiro (BR): Botanical Garden of Rio de Janeiro, 2017. Available in: <http://floradobrasil.jbr.gov.br/>
- Flor IC, Maia VC (2022) Cecidomyiidae (Diptera) in the State of Santa Catarina, Brazil. *Entomological Communications* 4: ec04003. <https://doi.org/10.37486/26751305.ec04003>
- Formiga AT, Soares GLG, Isaias RMS (2011) Responses of the Host Plant Tissues to Gall Induction in *Aspidosperma spruceanum* Müell. Arg. (Apocynaceae). *American Journal of Plant Sciences* 02(06):823–834. <https://doi.org/10.4236/ajps.2011.26097>
- Formiga AT, Oliveira DC, Ferreira BG, Magalhães TA, Castro AC, Fernandes W, Isaias RMS (2013) The role of pectin composition of cell walls in the determination of the new shape- functional design in galls of *Baccharis reticularia* (Asteraceae). *Protoplasma* 250: 899-908. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0473-8>
- Gilbert HJ (2010) The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiology* 153: 444- 455. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156646>
- Guimarães ALA, Bizarri CHB, Barbosa LS, Nakamura MJ, Ramos MFS, Vieira ACM (2013) Characterisation of the effects of leaf galls of *Clusiamyia nitida* (Cecidomyiidae) on *Clusia lanceolata* Cambess. (Clusiaceae): Anatomical aspects and chemical analysis of essential oil. *Flora* 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.03.001>

- Hart DA, Kindel PK (1970) A novel reaction involved in the degradation of apiogalacturonans from *Lemna minor* and the isolation of Apibiose as a product. *Biochemistry* 9:10. [https://doi.org/ 10.1021/bi00812a024](https://doi.org/10.1021/bi00812a024)
- Hernández JFR (2011) La mosca de las agallas (*Jatrophobia brasiliensis*) en el cultivo de yucca. *Revista de la Universidad de La Salle* (56):277-288.
- Isaias RMS, Oliveira DC, Carneiro RGS (2011) Role of *Euphalerus ostreoides* (Hemiptera: Psylloidea) in manipulating leaflet ontogenesis of *Lonchocarpus muehlbergianus* (Fabaceae). *Botany (Ottawa. Print)* 89: 581-592. [https://doi.org/ 10.1139/b11-048](https://doi.org/10.1139/b11-048)
- Isaias RMS, Carneiro RGS, Oliveira DC, Santos JC (2013) Illustrated and Annotated Checklist of Brazilian Gall Morphotypes. *Neotrop Entomol* 42: 230-239. [https://doi.org/ 10.1007/s13744-013-0115-7](https://doi.org/10.1007/s13744-013-0115-7)
- Isaias RMS, Carneiro RGS, Santos JC, Oliveira DC (2014) Gall Morphotypes in the Neotropics and the Need to Standardize Them *Springer* 4. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8783-34>
- Isaias RMDS, Ferreira BG, Alvarenga DRD, Barbosa LR, Salminen JP, Steinbauer MJ (2018) Functional compartmentalisation of nutrients and phenolics in the tissues of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). *Austral Entomology* 57: 238-246. <https://doi.org/10.1111/aen.12336>.
- Isaias RMS, Oliveira DC, Moreira ASFP, Soares GLG, Carneiro RGS (2015) The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. *Biochimica et Biophysica Acta*. [https://doi.org/ 10.1016/j.bbagen.2015.03.007](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007)
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw- Hill.
- Jones L, Seymour GB, Kno, JP (1997) Localization of pecticgalactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1R4) b-D-galactan. *Plant Physiol* 113:1405–1412. [https://doi.org/10. 1104/pp.113.4.1405](https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1405)
- Knox PJ, Linstead PJ, King J, Cooper C, Roberts K (1990) Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Plant*,181: 512-521.

Kuster VC, Costa RU, Fernandes JCC, Isaias RMS, Oliveira DC (2019) How Galling Organisms Manipulate the Secondary Metabolites in the Host Plant Tissues?: A Histochemical Overview in Neotropical Gall Systems 1-20. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-629>

Kuster VC, Fernandes CJC, Moreira ASFP, Isaias RMS, Oliveira DC (2022) Assessing oxidative stress and photosynthetic activity in leaf galls induced by different species of galling insect on *Aspidosperma* spp. *Biologia*. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01167-8>

Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: Imperato, F (ed) *Phytochemistry: Advances in Research*, Research Signpost, Kerala, pp 23–67.

Liepman AH, Nairn JC, Willats WGT, Sorensen I, Roberts AW, Keegstra K (2007) Functional Genomic Analysis Supports Conservation of Function Among Cellulose Synthase- Like A Gene Family Members and Suggests Diverse Roles of Mannans in Plants. *Plant Physiology* 143:1881-1893. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093989>

Lozano JC, Bellotti A, Reyes JA, Howeler R, Leihner D, Doll J (1981) Field Problems in Cassava. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)* 72-116. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10568/54043>

Maia VC, Fernandes GW (2007) *Myrciariamyia admirabilis*, a new species of gall midge (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae). *Zootaxa* 1554:41-48. <https://doi.org/10.5281/zenodo.178187>

Maia VC (2021) Cecidomyiidae (Diptera, Insecta): richness of species and distribution in Brazil. *Biota Neotrop* 21(2). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1038>

McCartney L, Steele-King CG, Jordan E, Knox P (2003) Cell wall pectic (1-4)-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J* 33: 447–454. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01640.x>

McCartney L, Marcus SE, Knox JP (2005) Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J Histochem Cytochem* 53:543–546. <https://doi.org/10.1369/jhc.4B6578.2005>

Magalhães TA, Oliveira DC, Suzuki AYM, Isaias RMS (2013) Patterns of cell elongation in the determination of the final shape in galls of *Baccharopelma*

dracunculifoliae (Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). Protoplasma. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0574-z>

Mani MS (1964) Ecology of plant galls. The Hague: Dr. W. Junk Publishers.

Marcus SE, Blake AW, Benians TA, Lee KJ, Poyser C, Donaldson L, Leroux O, Rogowski A, Petersen HL, Boraston A, Harry J, Gilbert HJ, Willats WGT, Knox J P (2010) Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *Plant J* 64:191–203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2010.04319.x>

Marcus S E, Verhertbruggen Y, Hervé C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WG, Knox JP (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol* 22:8:60. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-60>

Martini VC, Moreira ASFP, Kuster VC, Oliveira DC (2019) Galling insects as phenotype manipulators of cell wall composition during the development of galls induced on leaves of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *South African Journal of Botany* 127: 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.006>

Mazia D, Brewer PA, Alfert M (1953) The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol Bull* 104: 57-67.

Meyer J, Maresquelle HJ (1983) Anatomie des galles. Berlin: Gebrüder Borntraeger.

Naves GFS, Kuster VC, Machado M, Santos PD, Martini VC, Oliveira DC (2021) Metabolite investments and stress levels among tissue compartments of *Palaeomystella olygophaga* (Lepidoptera) galls on *Macairea radula* (Melastomataceae). *Australian Journal of Botany* 69:1-17. <https://doi.org/10.1071/BT20128>

Nogueira AS, Jesus APM, Almeida RHC, Ferreira LE, Santos MAS (2021) Socioeconomic characterization of the cassava production system of family farmers in the municipality of São Francisco do Pará. *Research, Society and Development* 10:13. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21355>

Oliveira DC, Isaias RMS (2010a) Redifferentiation of leaflet tissues during midrib gall development in *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 76(2): 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.011>

- Oliveira DC, Isaias RMS, Moreira ASFP, Magalhães TA, Lemos-Filho JP (2010) Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. Galls capable of altering leaf photosynthesis?. *Plant Science* 180: 489-495. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.005>
- Oliveira DC, Isaias RMS, Fernandes GW, Ferreira BG, Carneiro RGS, Fuzaro L (2016) Manipulation of host plant cells and tissues by gall-inducing insects and adaptive strategies used by different feeding guilds. *Journal of Insect Physiology* 84: 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.012>
- Oliveira DC, Magalhães TA, Ferreira BG, Teixeira CT, Formiga AT, Fernandes GW, Isaias RMS (2014) Variation in the Degree of Pectin Methylesterification during the development of *Baccharis dracunculifolia* Kidney- Shaped Gall. *Plos one* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094588>
- Oliveira DC, Moreira ASFP, Isaias RMS, Martini V, Rezende UC (2017) Sink status and photosynthetic rate of the leaflet galls induced by *Bystracoccus mataybae* (Eriococcidae) on *Matayba guianensis* (Sapindaceae). *Frontiers in Plant Science* 8:1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01249>
- Orfila C, Knox JP (2000) Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol*, 122:775–781. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.775>
- Orfila C, Seymour GB, Willats WGT, Huxham MI, Jarvis MC, Dover CJ, Thompson AJ, Knox JP (2001) Altered middle lamella homogalacturonan and disrupted deposition of (1→5) -alpha-L-arabinan in the pericarp of Cnr, a ripening mutant of tomato. *Plant Physiol* 126:210–221. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.210>
- Price PW, Waring GL, Fernandes GW (1986) Hypotheses on the adaptive nature of galls. *Proceedings of Entomological Society of Washington* 88: 361-363.
- Rezende UC, Moreira ASFP, Kuster VC, Oliveira DC (2018) Structural, histochemical and photosynthetic profiles of galls induced by *Eugeniamyia dispar* (Diptera, Cecidomyiidae) on the leaves of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae). *Revista de Biologia Tropical* 66:1469. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32531>

- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57:929-967. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00113-3)
- Rohfritsch O, Shorthouse JD (1982) Insect Galls. *Molecular Biology of Plant Tumors* 5:132-138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394380-4.50011-6>
- Rohfritsch O, Anthony, M (1992) Strategies on gall induction by two groups of homopterans. In: Shorthouse J.D. & Rohfritsch O. (Eds.). *Biology of insect induced galls*.
- Ribeiro JF, Walter BMT (2008) The main phytophysiognomies of the Cerrado Biome. *Cerrado: Ecology and Flora* 6:174-178.
- Rosa JMO, Oliveira SA, Jordão AL, Siviero A, Oliveira CMG (2014) Phytoparasitic nematodes associated with cassava in the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica* 44 (2): 271-275. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672014000200013>
- Sá CEM, Silveira FAO, Santos JC, Isaias RMS, Fernandes GW (2009) Anatomical and developmental aspects of leaf galls induced by *Schizomyia macrocapillata* Maia (Diptera: Cecidomyiidae) on *Bauhinia brevipes* Vogel (Fabaceae). *Revista Brasil. Bot* 32:319-327. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000200011>
- Sabba RP, Lulai EC (2005) Immunocytological analysis of potato tuber periderm and changes in pectin and extension epitopes associated with periderm maturation. *J Amer. Soc. Hort. Sci* 130: 936- 942.
- Sass JE (1951) *Botanical microtechnique*. Ames: Iowa State College Press.
- Scareli-Santos C, Silva PC, Carneiro AS, Dantas SP (2018) Galls in *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae): Evaluation of impacts on host plant architecture and productivity. *Challenges Magazine* 5:02. <https://doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2018vol5n2p51>
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schönrogge K, Harper LJ, Lichtenstein CP (2001) The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): Similarities between cynipid galls and seeds.

Plant Cell & Environment 23: 215-222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00543.x>

Shorthouse JD, Wool D, Raman A (2005) Gall-inducing insects—nature's most sophisticated herbivores. Basic Appl Ecol 6:407–411. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2005.07.001>

Showalter AM, Basu D (2016) Extensin and Arabinogalactan- Protein Biosynthesis: Glycosyltransferases, Research Challenges, and Biosensors. Frontiers in Plant Science 7. <https://doi.org/10.3389/fpla.2016.00814>

Silva AFM, Kuster VC, Rezende UC, Oliveira DC (2019) The early developmental stages of gall-inducing insects define final gall structural and histochemical profiles: the case of *Bystracoccus mataybae* galls on *Matayba guianensis*. Botany 00:1-12 (0000). <https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0017>

Silva AFM, Lana LG, Kuster VC, Oliveira DC (2021) Chemical composition of cell wall changes during developmental stages of galls on *Matayba guianensis* (Sapindaceae): perspectives obtained by immunocytochemistry analysis. The Science of Nature 108:16. <https://doi.org/10.1007/s00114-021-01732-2>

Smallwood M, Yates EA, Willats WGA, Martin H, Knox JP (1996) Immunochemical comparison of membrane associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. Planta 198:452–459. <https://doi.org/10.1007/BF00620063>

Sotiriou P, Giannoutsou E, Panteris E, Apostolakos P, Galatis B (2016) Cell wall matrix polysaccharide distribution and cortical micro-tubule organization: two factors controlling mesophyll cell morphogenesis in land plants. Ann Bot 117:401–419. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv187>

Svendsen AB, Verpoorte R (1983) Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific New York: Publishing Company.

Teixeira CT, Oliveira DC, Kuster VC, Isaias RMS (2018) Immunocytochemical demonstration of cell wall components related to tissue compartments in the globoid galls induced by *Clinodiplosis* sp. (Cecidomyiidae) on *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). Botany. <https://doi.org/10.1139/cjb-2017-0123>

- Teixeira CT, Kuster VC, Carneiro RGS, Cardoso JCF, Isaias RMS (2022) Anatomical profiles validate gall morphospecies under similar morphotypes. *Journal Of Plant Research* 135:1. <https://doi.org/10.1007/s10265-022-01397-6>
- Trigo JR (2011) Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. *Phytochem Rev* 10:83-98. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9191-z>
- Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordan-Ortiz JJ, Knox P (2009) An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research* 344: 1858-1862. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.11.010>
- Vilela RMIF, Martini VC, Oliveira RM, Oliveira DC (2023) Galls induced by a root-knot nematode in *Petroselinum crispum* (Mill.): impacts on host development, histology, and cell wall dynamics. *Protoplasma* 260:1. <https://doi.org/10.1007/s00709-023-01849-3>
- Voiniciuc C, Pauly M, Usadel B (2018) Monitoring Polysaccharide Dynamics in the Plant Cell Wall. *Plant Physiology* 176:2590-2600. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01776>
- Williats WGA, Marcus SE, Knox JP (1998) Generation of monoclonal antibody specific to (1–5) - α -L-arabian. *Carbohydr Res* 308:149–152. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00070-6)
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47:9-27. <https://doi.org/10.1023/A:1010662911148>
- Wolf S, Mouille G, Pelloux J (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol Plant* 2:851–860. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>
- Xu C, Zhao L, Pan X, Samaj J (2011) Developmental Localization and Methylesterification of Pectin Epitopes during Somatic Embryogenesis of Banana (*Musa* spp. AAA). *Plos one* 6:8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022992>
- Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Dell A, Mackie W, Knox JP (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6:131–139. <https://doi.org/10.1093/glycob/6.2.131>

3. CAPÍTULO II

Sistemas antioxidantes das galhas de *Manihot esculenta* reduzem o estresse oxidativo e melhora o rendimento quântico da fotossíntese

Capítulo em formato de artigo e nas normas da revista “Biochemical Systematics and Ecology”

RESUMO

Galhas são formadas pela indução de organismos externos, como os insetos, mediada pela produção aumentada de estresse oxidativo. O estresse é sinalizador do desenvolvimento vegetal, porém em níveis elevados pode causar danos celulares, e levar a morte celular. O impacto do estresse oxidativo pode ser avaliado por meio da fluorescência da clorofila *a*, bem como melhor entendimento frente a atividade de enzimas antioxidantes. O presente estudo busca avaliar o estresse oxidativo e as vias de dissipação em galhas induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* nas folhas de *Manihot esculenta*, bem como o seu impacto no sistema fotossintético. Para tal, folhas não galhadas e galhas maduras foram utilizadas. Para as análises histológicas, as amostras foram fixadas, incluídas em resina, seccionadas em micrótomo, coradas com azul de toluidina e montadas em Entellan©. Para a avaliação fotossintética, Handy FluorCam – PSI foi utilizado para determinar a fluorescência da clorofila *a*, associado com a concentração de pigmentos cloroplastídicos com o uso do extrator acetona 80%. Para avaliar o nível de estresse oxidativo, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o malondialdeído, bem como as enzimas antioxidantes catalase, peroxidase inespecífica, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase, foram quantificados. *I. brasiliensis* induz galhas em *M. esculenta* com menor estresse em relação ao órgão hospedeiro, apresentando sistema enzimático de defesa antioxidante mais eficiente do que na folha, principalmente pela maior atividade de POX e SOD nos tecidos da galha. Esse estresse oxidativo parece ter influenciado na eficiência fotossintética das folhas, levando a maiores valores de $(F'_m - F)/F'_m$ e (F_v/F_m) nas galhas.

PALAVRAS-CHAVE: Clorofila; Defesa; Enzimas.

ABSTRACT

Galls are formed by the induction of external organisms, such as insects, with their formation dependent on the control of oxidative stress. The stress is a sign of plant development, but at high levels it can trigger lipid peroxidation, cell damage and genetic changes, which in last degree can lead to cell death. The impact of oxidative stress can be assessed through chlorophyll *a* fluorescence, as well as a better understanding of the activity of antioxidant enzymes. The current study seeks to evaluate oxidative stress and dissipation pathways in galls induced by *Iatrophobia brasiliensis* on *Manihot esculenta* leaves, as well as its impact on the photosynthetic system. So, non-galled leaves and mature galls were used. For histological analyses, the samples were fixed, embedded in resin, sectioned using a microtome, stained with toluidine blue and mounted in Entellan©. For the photosynthetic evaluation, Handy FluorCam – PSI was used to determine the chlorophyll *a* fluorescence, which was associated with the concentration of chloroplast pigments using the 80% acetone as extractor. To evaluate the level of oxidative stress, superoxide anion, hydrogen peroxide and malondialdehyde, as well as the antioxidant enzymes, i.e., catalase, non-specific peroxidase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase, were quantified. *I. brasiliensis* induces galls in *M. esculenta* with less stress than the host organ, presenting a more efficient enzymatic antioxidant defense system than in the leaf, mainly due to the greater activity of POX and SOD in the gall tissues. This oxidative stress appears to have influenced the photosynthetic efficiency of the leaves, leading to higher values of $(F'_m - F)/F'_m$ e (F_v/F_m) in the galls.

KEYWORDS: Chlorophyll; Defense; Enzymes.

3.1 INTRODUÇÃO

O balanço de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio de sistemas antioxidantes em plantas faz parte de um refinado equilíbrio redox que pode mediar vários aspectos do desenvolvimento vegetal, desde o metabolismo até a expressão genética (Foyer e Noctor 2013). As EROs atuam no reconhecimento do estresse, e por meio de redes de sinalização ativam mecanismos de defesa como resposta (Mittler et al. 2022). O sistema antioxidante permite que as EROs funcionem como sinalizadoras, e, ao mesmo tempo, regulem o tempo de vida útil celular (Foyer e Noctor 2013). A sinalização mediada por EROs ocorre em níveis adequados, não excedendo limites citotóxicos ou citostáticos (Mittler 2016). Em caso de desequilíbrio redox, as EROs podem desencadear modificações no RNA e no DNA, como mutações gênicas a sua total inativação, oxidação de ácidos graxos e proteínas e morte celular (Oliveira e Schoffen 2010; Cerný et al. 2018; Sytykiewicz et al. 2019; Mittler et al. 2022). As EROs tem papel fundamental no desenvolvimento das galhas, podendo atuar como sinalizadores moleculares e dentro de um sistema cujo estresse oxidativo seja controlado de forma efetiva em comparação ao órgão hospedeiro não galhado (Isaias et al. 2015).

As galhas são induzidas por bactérias, fungos, nematoides, e, principalmente, por insetos (Mani 1964; Isaias et al. 2013), através do contínuo estímulo do indutor na planta hospedeira (Isaias et al. 2014; Guedes et al. 2019). Modificações estruturais e metabólicas são desencadeadas nos tecidos da planta hospedeira, levando a formação de galhas com diferentes níveis de complexidade e distribuição de metabólitos primários e secundários (Bragança et al 2017; Isaias et al. 2018; Silva et al. 2019; Kuster et al. 2020), o que geralmente leva a uma distinta ocorrência de EROs nos tecidos da galha e do órgão não galhado, como demonstrado para as galhas de *Matayba guianensis* (Oliveira et al. 2017).

Peróxido de hidrogênio é frequentemente histolocalizado em compartimentos teciduais das galhas, com maior marcação em tecidos com alta taxa metabólica, como feixes vasculares e tecidos nutritivos (Guedes et al. 2022). Esses radicais livres se não controlados podem gerar espécies reativas de carbonila (RCS), como o malondialdeído (MDA), indicando peroxidação lipídica e um estado de estresse oxidativo mais avançado (Alché 2019). A peroxidação lipídica é decorrente do desbalanço entre

produção e remoção de EROs dos tecidos (Morales e Munné-Bosch 2019), sendo especulado que ocorra em maior proporção em galhas por serem decorrentes de uma relação parasítica, como demonstrado para galhas foliares de *Aspidosperma spruceanum* (Kuster et al. 2022). Entretanto, em galhas de *Populus nigra*, apesar da alta concentração de H₂O₂, não ocorreu peroxidação lipídica aumentada (Kot e Kmiéc 2020). Desta forma, compostos antioxidantes tem sido demonstrados em galhas e relacionados com a homeostase tecidual (Isaias et al. 2015), como os fenólicos (Guedes et al. 2022) e as enzimas antioxidantes (Kot et al. 2019).

Fenólicos (Isaias et al. 2015), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) (Apel e Hirt 2004) são biomoléculas que atuam no sistema antioxidante em plantas, captando ou degradando EROs (El-Beltagi et al. 2011). Em galhas induzidas por *Leptocybe invasa* (Hymenoptera, Eulophidae) em *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae), os fenólicos foram associados com a homeostase do tecido em resposta ao aumento de EROs (Isaias et al. 2018). Enquanto que no sistema *Schinus polygama* (Anacardiaceae) - Calóffideos (Hemiptera, Calophyidae), os fenólicos parecem mediar o desenvolvimento vegetal (Guedes et al. 2019).

No caso das enzimas antioxidantes, a metaloproteína SOD está presente em todos os organismos aeróbicos nos diferentes compartimentos subcelulares propícios a oxidação mediada por EROs, como, peroxissomo, mitocôndria e cloroplasto (Mittler et al. 2022; Gill e Tuteja 2010), catalisando o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que, posteriormente, é transformado em água e oxigênio pela CAT e APX (Arbona et al. 2003). A CAT pode estar presente nos cloroplastos, mitocôndrias, citosol, e principalmente nos peroxissomos, onde ocorre a maior produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A CAT, então, atua na eliminação de H₂O₂ (Zaid e Wani 2019), enquanto que a APX pode estar associada à modulação de EROs para a sinalização (Apel e Hirt 2004; Mittler et al. 2002). Dentre as enzimas antioxidantes, a SOD e a APX parecem ser indispensáveis na tolerância da planta ao aumento do estresse oxidativo (El-Beltagi et al. 2011), estando relacionada a primeira linha de defesa aos efeitos tóxicos e no controle do estresse gerado por diferentes fatores abióticos, respectivamente (Gill e Tuteja 2010; Zaid e Wani 2019). Aqui, buscamos avaliar se as enzimas SOD, APX e CAT estariam relacionadas a primeira linha de defesa antioxidante de plantas hospedeiras sujeitas ao ataque de insetos galhadores e estabelecimento de galhas.

O sistema antioxidante em plantas pode ser superado como consequência de eventos abióticos, como alta intensidade luminosa, seca e salinidade, ou por ataques biológicos, como por insetos, bactérias e vírus (Alché 2019). Em galhas, o desbalanço homeostático celular associado com modificações morfofuncionais pode reduzir o rendimento quântico da fotossíntese, como demonstrado para galhas induzidas por *Eugeniomyia dispar* (Diptera, Cecidomyiidae) nas folhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) (Rezende et al. 2018). A redução de parâmetros fotoquímicos em galhas também tem sido associada com menor concentração de pigmentos cloroplastídicos (Kuster et al. 2022), geralmente em decorrência da diluição dos pigmentos resultado da hipertrofia celular (Oliveira et al. 2017).

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae), possui galhas foliares cilíndricas formadas pela mosca-da-galha *Iatrophobia brasiliensis* Rübsaamen, (Diptera, Cecidomyiidae) (Durães e Araújo 2020; Maia 2021). A ecologia dessa interação parasítica tem sido estudada (Hernandez 2011; Durães et al. 2020), entretanto não há entendimento sobre o estresse biótico gerado e seu impacto no aparato fotossintético. Desse modo, o presente trabalho buscou investigar os níveis de estresse oxidativo e as vias de dissipação na galha de mandioca, *Manihot esculenta* subespécies *esculenta* Crantz (Euphorbiaceae), bem como o seu impacto local na fotossíntese da folha.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de coleta e sistema estudado

Manihot esculenta subespécies *esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) (Flora do Brasil 2020), é popularmente conhecida como mandioca e é amplamente distribuída pelo Brasil, sendo importante cultivar agrícola (Rosa et al. 2014). *Iatrophobia brasiliensis* Rübsaamen é um díptero da família Cecidomyiidae (Maia 2021), comumente chamado por mosca-da-galha e o principal indutor de galhas na mandioca (Hernandez 2011; Durães et al. 2020). As galhas da mandioca são formadas nas folhas, possuem morfotipo cilíndrico e com coloração que varia de verde claro a arroxeado (Figura 1).

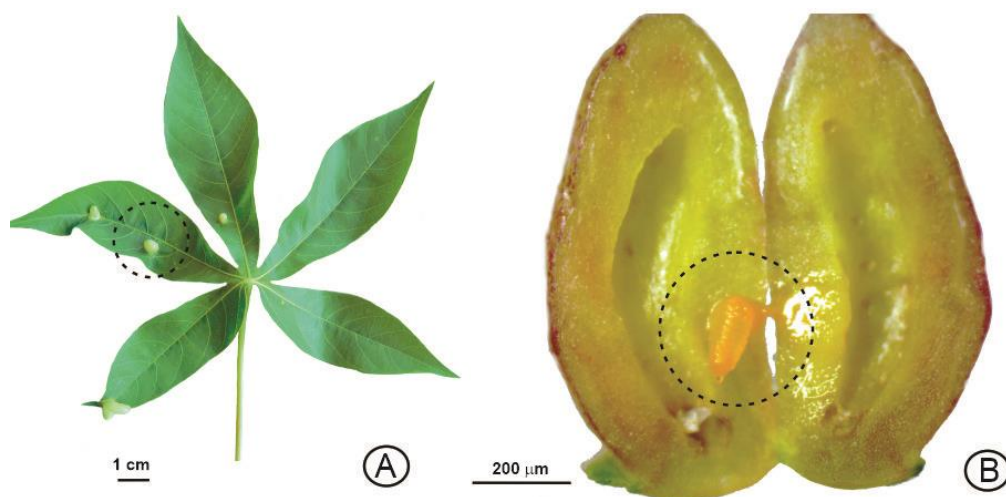


Figura 1. Morfologia da folha de *Manihot esculenta* subspecies *esculenta* e da galha formada por *Iatrophobia brasiliensis* (A-B). A- Visão geral da folha com galhas; e B- Detalhe para a galha em corte longitudinal, com destaque para o indutor.

Para o presente estudo, folhas não galhadas do 3º nó e galhas (Figura 1), ambas maduras, foram coletadas de 10 indivíduos de mandioca presentes em uma propriedade rural a 90 km do município de Jataí (18°27'43"S/ 51°37'10" W), estado de Goiás, Brasil. Avaliou-se o nível de estresse e as vias de dissipação, bem como quanto o rendimento quântico e demais parâmetros fotoquímicos associados (n= 3 – 8 por tratamento). As amostras vegetais para análises estruturais e bioquímicas foram coletadas de janeiro a março de 2022, enquanto que as análises fisiológicas foram desenvolvidas em fevereiro de 2022. Galhas maduras são aquelas que chegaram ao final do seu desenvolvimento e que apresentavam inseto indutor na fase larval.

3.2.2 Perfil anatômico

Fragments da região internerval mediana das folhas não galhadas (n=3) e do terço mediano das galhas (n=3) foram fixadas em FAA₇₀ (formaldeído, ácido acético e etanol a 70%, 1:1:18 v/v) (Johansen 1940) por 48 h e armazenados em álcool 70%. As amostras foram posteriormente desidratadas em série etílica, incluídas em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica® Instruments, Heidelberg), seccionadas transversalmente (perpendicular ao maior eixo da lâmina foliar para folhas não galhadas e longitudinal à lâmina foliar para galhas) em micrótomo rotativo (Leica ® RM2235) a 5 μm e coradas

com azul de toluidina 0.05%, pH 4.7 (O'Brien et al. 1964). As lâminas foram montadas em Entellan® e fotografadas em microscópio de luz (Leica ® DM750) com câmera digital acoplada (Leica ® ICC50 HD).

3.2.3 *Histolocalização de H₂O₂*

A realização da análise histoquímica para marcação de estresse ocorreu com a utilização de amostras vegetais frescas e recém-coletadas (n= 6), sendo os cortes feitos à mão livre. Fragmentos de folhas não galhadas e galhas foram submetidos ao 3,3' diaminobenzidina (DAB), que marca H₂O₂, por 20 minutos no escuro (Rosseti e Bonnatti 2001). Posteriormente, as amostras foram lavadas e montadas em água destilada. Todas as amostras foram fotografadas em microscópio de luz (Leica DM750) com câmera digital acoplada (Leica ICC50 HD).

3.2.4 *Quantificação do estresse*

Para a quantificação de moléculas estressantes, amostras de folhas não galhadas e de galhas (n=6) foram coletadas, inseridas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas posteriormente em ultrafreezer a -80°C.

Para quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram pesadas 0,100 g das amostras, maceradas em nitrogênio líquido com homogeneização em tampão fosfato de potássio 50 mM (Ph 6,5) e hidroxilamina 1mM, e posteriormente centrifugadas a 10,000 xg for 15 min a 4 °C (Kuo e Kao 2003). O sobrenadante foi adicionado ao meio de reação constituído de 100µM FeNH₄(SO₄), 25 mM de ácido sulfúrico, 250 µM de xilenol laranja e 100 mM de sorbitol (Gay e Gerbicki 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorbância foi determinada em 560 nm. A concentração de H₂O₂ foi estimada com base em uma curva padrão de H₂O₂ e foi expressa em nmol g⁻¹ de peso fresco.

A concentração de ânion superóxido (O₂⁻) foi determinada em 0,100 g das amostras, com subsequente homogeneização em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), contendo 1 mM de dietilditiocarbamato de sódio (DDC). O homogeneizado foi

centrifugado a 22000 xg por 20 min a 4 °C. Após a centrifugação, 0,1 ml do sobrenadante foi adicionado a 1,9 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), DDC 1 mM de azul de p-nitro-tetrazólio 0,25 mM. A concentração de O_2^- foi determinada pela absorbância do produto, subtraída da absorbância inicial na análise que foi medida a 540 nm ($ABS\ 540\ min^{-1}\ g^{-1}\ FM$) (Chaitanya e Naithani 1994).

Malondealdeído (MDA) foi quantificado nos tecidos baseado no protocolo descrito por Cakmak e Horst (1991). 0,150 g das amostras vegetais foram maceradas em nitrogênio líquido em almofariz, sendo o material subsequentemente homogeneizado em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (m/v). Posteriormente o homogeneizado foi centrifugado a 15000 xg, durante 20 min, a 4 °C. Após a centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbúrico 0,5% (m/v) e incubado em banho maria a 95 °C, por 30 min. Após esse período, a reação foi pausada em banho de gelo e as amostras novamente centrifugadas a 9000 xg, por 5 min, a 15 °C. A concentração do MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ e expressa em $\mu mol\ kg^{-1}$ de massa fresca (Heath e Packer 1968).

3.2.5 *Quantificação de moléculas dissipadoras de estresse*

Extrato enzimático foi produzido para determinação da atividade das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX). 0,250 g de amostras vegetais foram macerados em nitrogênio líquido em almofariz, sendo adicionado no homogeneizado 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 5 % (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 15000 xg, por 20 min, a 4 °C e o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações enzimáticas. A concentração de proteína em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), a fim de se obter a curva padrão.

Para determinar a atividade da CAT utilizou-se o método de Cakmak e Marshner (1992). A mistura da reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 Mm (Ph 7,0) e de H_2O_2 em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 50 μL dos extratos das amostras, no qual a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 240

nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm (Anderson et al. 1995) foi usado para determinar a atividade da CAT, a qual foi expressa em nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981), com algumas modificações. 50 µL das amostras foram adicionadas a uma solução composta por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H₂O₂ 1 mM e ascorbato 0,8 mM, sendo o volume final corrigido para 2 mL. A reação foi medida pela oxidação do H₂O₂ dependente do ascorbato a 290 nM, durante 5 min, a 25°C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹, foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 µL das amostras em 1,94 mL de mistura de reação constituída de água destilada 50 µL, tampão fosfato de sódio 50 nM (Ph 7,8), metionina 13 nM, azul de p-nitro-tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 nM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al. 1993). A reação ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nM (Giannopolittis e Ries 1977). O controle teve suas absorbâncias medidas a 560 nM, utilizando mistura de reação mantidas no escuro por 5 min. Os valores obtidos foram subtraídos das leituras das amostras das repetições dos tratamentos que receberam iluminação. A atividade da SOD foi expressa em unidades de SOD por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da POX foi determinada pela metodologia proposta por Kar e Misha (1976), pela oxidação do pirogalol. A mistura da reação foi constituída de água destilada, tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 nM e H₂O₂ nM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL da amostra, e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 420 nM, durante 1 min, a 25 °C (Chance e Maehley 1955). A atividade da POX foi expressa em µmol de purpurogalina produzida min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A determinação da concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFST) foi baseada em amostras de 0,1 g, que foram maceradas com nitrogênio líquido seguido da adição de 1 mL de metanol 80%. A solução permaneceu por 4 h em mesa agitadora a

300 rpm em temperatura ambiente e, posteriormente, foi centrifugada a 17000 xg por 30 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de CFST. A concentração de CFST foi determinada através do método desenvolvido por Zieslin e Bem Zaken (1993), com algumas modificações. A reação foi iniciada com a adição de Fenol Folin-Ciocalteu 0,2 M a 150 µL da amostra, seguida da incubação a 25°C por 5 min e adição de carbonato de sódio 0,1 M. Essa mistura de reação foi incubada por 10 min a 25°C. Logo após a adição de 1 mL de água deionizada a essa mistura de reação, foi realizada a incubação a 25°C por 1 h. A absorbância foi obtida a 725 nm e a concentração de CFST foi realizada com base em uma curva de calibração usando ácido gálico como padrão.

3.2.6 Determinação da atividade fotossintética e pigmentos cloroplastídicos

A medição da fluorescência da clorofila *a* (n= 8) ocorreu diretamente na área de coleta e com a utilização do equipamento portátil Handy FluorCam – PSI (Photon Systems Instruments, República Tcheca). As medições foram obtidas entre 8.00 e 10.00 h da manhã após adaptação ao escuro por 30 minutos (Rascher et al. 2000), em folhas não galhadas e nas galhas. Com o auxílio do software Fluorcam7 (Photon Systems Instruments) foram obtidos os seguintes parâmetros: F_0 = fluorescência mínima no estado adaptado ao escuro; F_m = fluorescência máxima no estado adaptado ao escuro; F_v/F_m = rendimento quântico máximo; NPQ = quenching não fotoquímica durante adaptação à luz; R_{fd} = razão de declínio de fluorescência em estado estacionário e $(F'_m - F')/F'_m$ = eficiência operacional PSII.

A concentração dos pigmentos cloroplastídicos (n= 8) foram obtidos a partir de discos foliares de 1 cm², imersos em acetona 80% por 48 horas e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos em centrífuga Fanen Mod. 206 BL. A leitura da absorbância do sobrenadante a 470, 646 e 663 nm foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Spectronic Mod. Genesys 10 UV) e o cálculo da clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides realizados de acordo com Lichtenthaler e Wellburn (1983).

3.2.7 Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade e homocedasticidade. Como não houve desvios, os dados não passaram por nenhuma transformação. Assim, os dados coletados foram submetidos a análise de variância ANOVA para testar a diferença entre os tratamentos. Para as análises, o tecido galhado ou não galhado foi usado como variável preditora, e para testar o estresse foram usadas como variáveis respostas a quantificação de peróxido de hidrogênio, a quantificação de ânion superóxido e quantificação de malondialdeído. Para as de moléculas envolvidas na dissipação do estresse foram usadas como variável resposta a atividade das enzimas antioxidantes, e atividades dos compostos fenólicos. Para todas as análises, considerou-se 5% de significância. As análises foram feitas usando o programa estatístico R (R Core Team 2021). Os gráficos foram feitos usando o pacote “ggplot2” (Wickham 2011).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Perfil anatômico e histolocalização do estresse

A folha não galhada de *M. esculenta* possui epiderme unisseriada, cutícula delgada e pequenos pelos na face abaxial (Figura 1A). É hipostomática, com mesofilo dorsiventral e feixes vasculares colaterais (Figura 1A). A galha apresenta epiderme unisseriada e córtex exclusivamente parenquimático (Figura 1B), dividido em compartimentos de armazenamento (externo) e de nutrição (interno). O peróxido de hidrogênio foi marcado principalmente na parede celular do parênquima paliçádico e na epiderme na face abaxial, porém também ocorre nos demais tecidos (Figura 1 C). Na galha, a marcação do estresse se concentra a epiderme, feixes vasculares e compartimento nutritivo (Figura 1 D).

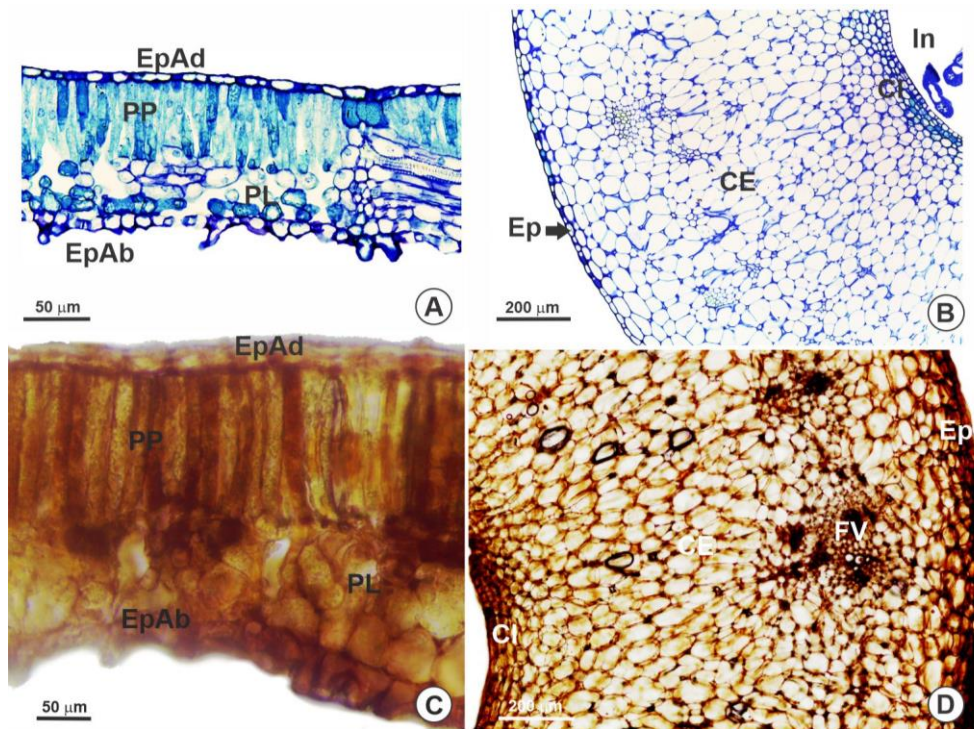


Figura 2. Anatomia (A-B) e histolocalização de peróxido de hidrogênio (C-D) em folhas não galhadas (A, C) de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas (B, D) induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Marcação marrom nas imagens “C” e “D” indica resultado positivo para peróxido de hidrogênio. EpAd: epiderme adaxial; EpAb: epiderme abaxial; PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; Ep: epiderme; CE: córtex externo; CI: córtex interno; In: indutor; Fv: feixe vascular.

3.3.2 Espécies reativas do oxigênio e malondialdeído

A quantificação de moléculas estressoras indica maior estresse nas folhas em relação às galhas (Figura 3A, B, C). A concentração de H_2O_2 foi duas vezes maior na folha ($530,61 \pm 44,50 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$) do que na galha ($233,68 \pm 34,45 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$) (Figura 3A), sendo o mesmo verificado para O_2^- (Figura 3B). A concentração de MDA foi quatro vezes maior na folha ($0,25 \pm 0,08 \text{ nmol g}^{-1} \text{MF}$) em relação à galha ($0,06 \pm 0,007 \text{ nmol g}^{-1} \text{MF}$).

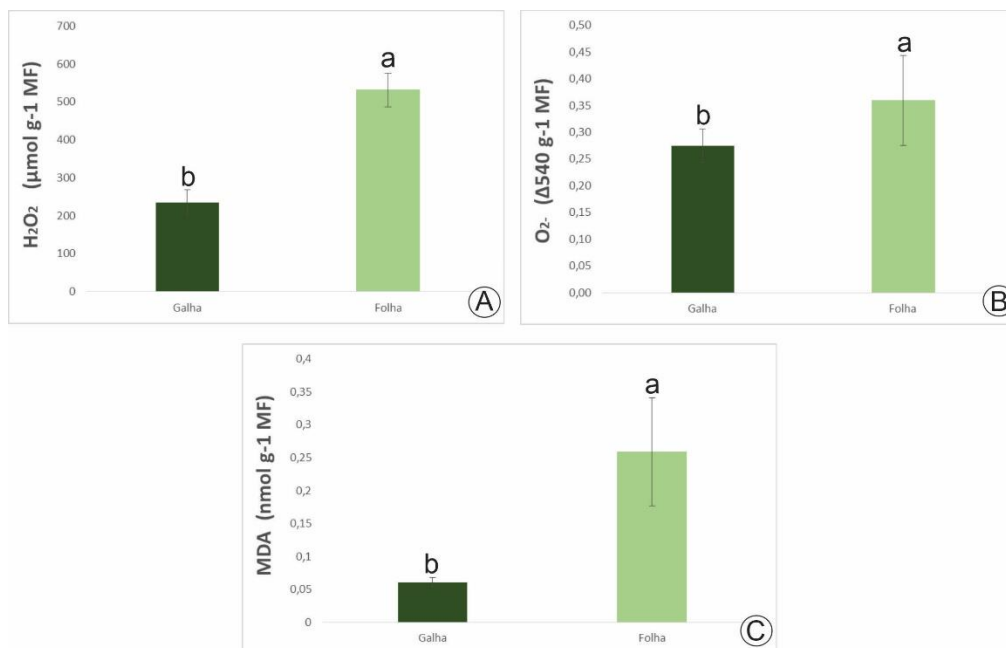


Figura 4. Quantificação de estresse em folhas de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas. A- Quantificação de peróxido de hidrogênio; B- Quantificação de ânion superóxido; C- Quantificação de malondialdeído.

3.3.3 Enzimas antioxidantes e compostos fenólicos

A atividade enzimática da CAT (Figura 4A) e da APX (Figura 4B) foi maior nas folhas em relação as galhas, diferente do encontrado para POX (Figura 4C) e SOD (Figura 4D), que foram mais elevados nas galhas. Na POX (Figura 4C), a galha apresentou média de $3,54 \pm 0,74 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$, enquanto que na folha foi de $1,34 \pm 0,60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$. Para a SOD (Figura 4D), a galha obteve média de $1,27 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \pm 1,17 \text{prot}$ e à folha de $0,23 \pm 0,20 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$. Os teores de compostos fenólicos (Figura 4E) foram maiores na folha ($372,99 \pm 9,23 \text{mg/kg}$) em relação à galha ($233,1 \pm 78,964 \text{mg/kg}$).

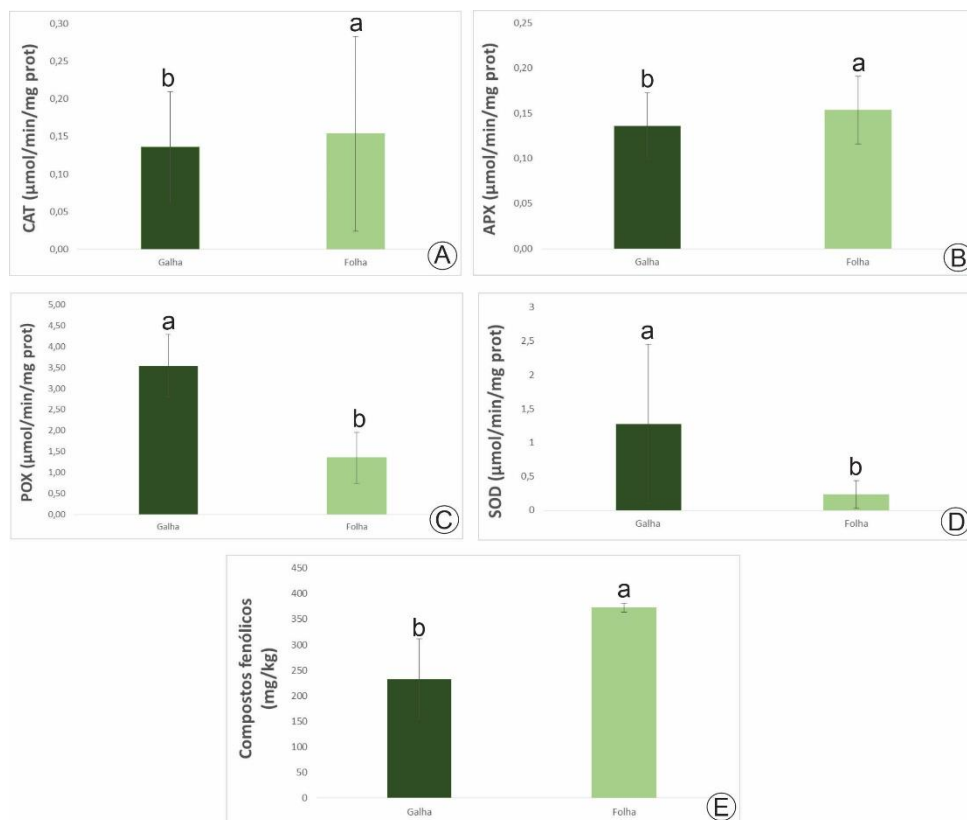


Figura 5. Quantificação de moléculas envolvidas na dissipação do estresse em folhas de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas, medido pela atividade de enzimas antioxidantes (A-D) e de compostos fenólicos (E); A- Atividade da enzima antioxidante CAT; B- Atividade antioxidante APX; C- Atividade antioxidante POX; D- Atividade antioxidante SOD; E- Atividade dos compostos fenólicos. CAT: catalase; APX: ascorbato peroxidase; POX: peroxidase; SOD: superóxido dismutase.

3.3.4 Pigmentos cloroplastídicos e parâmetros fotossintéticos

Para todos os parâmetros analisados, as folhas obtiveram valores superiores às galhas. A concentração da clorofila “a” nas folhas ($4046,07^a \pm 11,08$) foi cerca de 70 x maior que nas galhas, com $56,67 \pm 18,20$ (Tabela 1).

Tabela 1. Teores de pigmentos cloroplastídicos em folhas não galhadas de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae). Os dados representam valores da média \pm desvio padrão.

	Folha Madura	Galha Madura
Total clorofila ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)	5443,89 \pm 1489,45 ^a	101,88 \pm 32,13 ^b
Clorofila a	4046,07 \pm 11,08 ^a	56,67 \pm 18,20 ^b
Clorofila b	1237,77 \pm 380,32 ^a	27,37 \pm 10,08 ^b
Clorofila a/b	3,33 \pm 0,40 ^a	2,12 \pm 0,35 ^b
Carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$)	160,04 \pm 40,92 ^a	17,83 \pm 5,50 ^b
Total clorofila/carotenoides	34,05 \pm 4,70 ^a	5,94 \pm 1,55 ^b

* Médias seguidas pela mesma letra indicam que não houve significância ($p < 0,05$).

A fluorescência mínima do PSII no estado adaptado ao escuro (F_0) (Figura 4A, C) apresentou maiores valores para as folhas, $80,49 \pm 10,89$, que nas galhas, $56,10 \pm 9,21$, sendo o mesmo resultado percebido para a fluorescência máxima de PSII no estado adaptado ao escuro (F_m) (Figura 4B, D), com folhas com $221,49 \pm 64,94$ e galha com $167,45 \pm 43,93$. O rendimento quântico do fotossistema II em estado estacionário adaptado à luz, o $(F'_m - F)/F'_m$ (Figura 4E, G) e o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) (Figura 4F, H) foram maiores na galha que nas folhas. A dissipação não fotoquímica de energia (NPQ) (Figura 4I, K) foi maior nas folhas, com $1,65 \pm 0,72$, enquanto as galhas obtiveram $1,24 \pm 0,28$. O R_{fd} (Figura 4J, L) demonstrou menor nas folhas, com $2,46 \pm 1,03$, que galhas, com $2,16 \pm 0,29$.

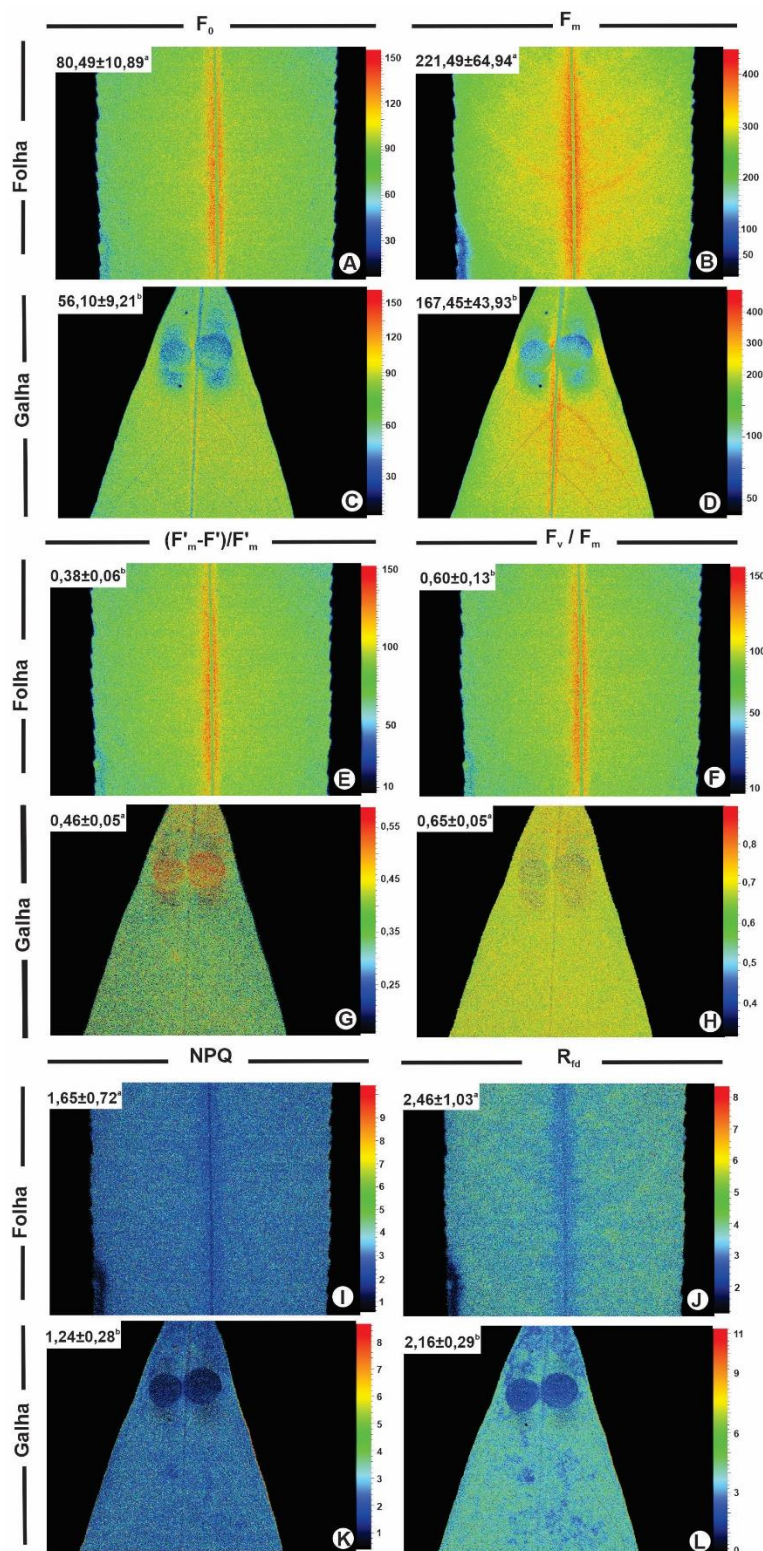


Figura 3. Fluorescência da clorofila *a* em folhas (A, C, E, G, I, K) de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) e em suas galhas (B, D, F, H, J, L) induzidas por *Iatrophobia brasiliensis* (Diptera: Cecidomyiidae). Os dados representam valores da média \pm desvio padrão. F_0 : fluorescência mínima adaptado ao escuro; F_m : fluorescência máxima adaptado ao escuro; F_v/F_m : rendimento quântico máximo;

NPQ: extinção não fotoquímica durante adaptação à luz; Rfd: taxa de declínio de fluorescência em curso estável; $(F'm-F'')/F'm$: eficiência operacional de PSII.

* Médias seguidas pela mesma letra no comparativo entre folha não galhada e galha no mesmo parâmetro indicam que não houve significância ($p < 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

A avaliação dos níveis de estresse oxidativo nas galhas de *Manihot esculenta* revelou resultados contrários ao esperado, com menor concentração de EROs e malondialdeído em comparação a folha da planta hospedeira. O menor estresse oxidativo parece ter relação com a maior atividade de enzimas antioxidantes do tipo POX e SOD, que podem ter influenciado nos melhores valores de rendimento quântico nas galhas.

3.4.1 As galhas possuem menor estresse oxidativo devido a maior atividade de enzimas dissipadoras de estresse

Um maior estresse em galhas em relação ao órgão hospedeiro não galhado vem sendo reportado (Oliveira et al. 2010; Isaias et al. 2015; Kmiéc et al. 2018; Kot e Kmiéc 2020), e são relacionados às maiores taxas de crescimento e respiração nos tecidos da galha (Ferreira et al. 2018) e a atividade alimentar do galhador (Kmiéc et al. 2018), ou seja, a atividade parasítica. Entretanto, trabalhos mais recentes demonstram que há uma maior complexidade na produção e captação de moléculas estressoras em galhas, podendo ocorrer estresse maior, menor ou igual entre as galhas e o órgão hospedeiro (Kuster et al. 2022). Para *Manihot esculenta*, o estresse oxidativo foi maior nas folhas que nas galhas, o que pode significar alta produção de EROs pelas reações redox dos cloroplastos da folha (Zaid e Wani 2019; Rajput et al. 2021; Mittler et al. 2022).

As EROs foram mais presentes nas folhas de *M. esculenta*, marcadas intensamente pelo teste DAB no tecido clorofiliano. Esse alto estresse oxidativo foi produzido mesmo com maiores valores de compostos fenólicos, que é um composto antioxidante atuante na captação de radicais livres (Bedetti et al. 2014; Guedes et al. 2022), o que pode indicar que o arsenal de enzimas antioxidantes presente ameniza de

forma moderada o estresse nos tecidos. Para as galhas, a marcação ocorreu principalmente nos feixes vasculares e no tecido nutritivo, o que pode ter relação com o fato da galha ser um dreno fisiológico (Abrahamson e McCrea 1986; Hartnett e Abrahamson) e com o hábito alimentar dos Dipteras do tipo “sucking disrupted - cell fluids” (Ferreira et al. 2019). Em galhas de *Aspidosperma australe*, *A. macrocarpon* e *A. tomentosum*, o H_2O_2 foram detectados nesses mesmos tecidos (Kuster et al. 2022), assim como no entorno da câmara larval de galhas em *Eugenia uniflora* (Rezende et al. 2018).

EROs podem levar a peroxidação lipídica, degradação de componentes celulares, respostas de hipersensibilidade e consequente morte celular, o que pode ser evitado pela ação de enzimas antioxidantes que catalisam a degradação dessas moléculas (Rajput et al. 2021; Ramzan et al. 2021; Huchzermeyer et al. 2022). As peroxidases podem ser produzidas e ativadas com a alta produção de EROs (Liu et al. 2010) principalmente quando a sua concentração se torna danosa as células (Zaid e Wani 2019; Mittler et al. 2022), como demonstrado para cultivares de *Capsicum annuum* em resposta a ação de patógenos (Ramzan et al. 2021). Para as galhas de *M. esculenta*, a POX e a SOD tiveram maior atividade, demonstrando papel fundamental na degradação do peróxido de hidrogênio e do superóxido, respectivamente (Gill e Tuteja 2010; Zaid e Wani 2019). Esse arsenal de enzimas antioxidantes nas galhas pode ter relação com o alto estresse aqui demonstrado para as folhas de *M. esculenta*, reduzindo o estresse no início da indução e permitindo o desenvolvimento e maturação da galha. A SOD também teve maior atividade em quatro genótipos de *M. esculenta* em resposta ao estresse hídrico (Zhu et al. 2020), o que pode demonstrar que essa enzima é a primeira linha de defesa de *M. esculenta* a estresses bióticos e abióticos.

A SOD catalisa a dismutação de O_2^- (ânio superóxido) em O_2 e H_2O_2 , formando um composto em estado de oxidação mais alta (O_2) e outro (H_2O_2) em estado mais baixo (Rajput et al. 2021). SOD faz parte da eliminação de EROs em plantas em resposta ao estresse oxidativo (Huchzermeyer et al. 2022), sendo que nas galhas de *M. esculenta* o estresse promovido por O_2^- parece ser controlado pela maior atividade dessa enzima, refletindo em valores menores que nas folhas. As peroxidases do tipo POX podem ser secretadas no vacúolo ou espaço extracelular, catabolizando H_2O_2 e promovendo a homeostase redox, além de estarem envolvidas nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, como na reticulação e afrouxamento da parede celular,

lignificação, suberização e catabolismo de auxinas (Rajput et al. 2021). Nas galhas de *M. esculenta*, a POX parece ter uma relação com a dissipação de H_2O_2 produzida pela atividade da SOD, que com o menor metabolismo das galhas maduras aqui estudadas podem ter refletido na menor marcação de estresse oxidativo. A atividade da SOD e POX também foi demonstrada em *Alternaria alternata* em resposta ao acúmulo de H_2O_2 e O_2^- proveniente do ataque do fungo (Taheri et al. 2014), diferentemente de Khattab (2007), que retratou a redução de SOD, CAT e APX nas folhas de *Brassica oleracea* atacadas por pulgões sugadores de floema, e aumento de outros antioxidantes, como ácido ascórbico.

Em folhas de *M. esculenta*, a atividade de CAT e APX foram superiores em relação às galhas, sendo responsáveis em converter H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Rajput et al. 2021). A baixa atividade de APX também foi relatada para as galhas de *Quercus robur* (Kot et al. 2019) e de *Populus nigra* (Kot e Kmiéc 2020). Para as galhas maduras de *Ulmus pupila*, o decréscimo na atividade de APX e inativação de CAT foram associados aos altos níveis de radicais livres, peroxidação lipídica e vazamento de eletrólitos (Kmiéc et al. 2018).

3.4.2 As galhas possuem maior rendimento quântico do fotossistema mesmo com menor concentração de pigmentos cloroplastídicos

As galhas de *M. esculenta* são formadas especialmente por tecido parenquimático não clorofiliano, sendo observados cloroplastos apenas nas camadas subepidérmicas. Isso demonstra uma mudança de funcionalidade da folha, que é especializada na fotossíntese (Lawson e Milliken 2023), para a galha, que é especializada na nutrição do galhador e proteção do sistema (Stone e Schönrogge 2003), o que explica a drástica redução de clorofilas e carotenoides nas galhas de *M. esculenta*. Essa redução é típica para a maioria das galhas foliares, como em galhas de *Aspidosperma* spp., *Matayba guianensis* e *Eugenia uniflora* (Oliveira et al. 2011; Oliveira et al. 2017; Rezende et al. 2018; Kuster et al. 2022), sendo geralmente associado com o aumento de tecidos não clorofilados (Oliveira et al. 2011), como demonstrado também no presente estudo.

A diminuição nos teores de clorofila nos tecidos das galhas geralmente provoca diminuição da eficiência quântica, como reportado para o $(F'_m - F')/F'_m$ e F_v/F_m em galhas verdes de *Matayba guianensis* em relação as suas folhas (Oliveira et al. 2017). F_v/F_m entre 0.75 e 0.85 indicam valores de rendimento quântico típicos (Björkman e Demmig 1987), sendo que para plantas tropicais valores abaixo de 0.8 sugerem fotoinibição (Lüttge et al. 1998). Aqui, as folhas de *M. esculenta* ficaram próximas a 0.60, o que indica alta fotoinibição para o período de análise, ou seja, das 8:00 às 10:00 h. Essa fotoinibição pode ter relação com os altos índices de EROs e malondialdeído aqui demonstrados para as folhas, o que pode indicar que as vias de dissipação de excesso de energia são insuficientes, o que faz aumentar significativamente o estresse oxidativo (Alché 2019). Contrariamente e de forma não esperada, as galhas mostraram menor fotoinibição, com valores médios de 0.65, o que pode ter relação com o robusto sistema enzimático de dissipação de estresse nas galhas de *M. esculenta*, com destaque para a maior atividade de POX e SOD.

Diversos mecanismos operam na dissipação do excesso de energia não utilizada no PSII, como uma dissipação não fotoquímica de energia, aqui medido pelo NPQ (Papageorgiou e Govindjee 2014), e pelos carotenoides, que dissipam energia durante o ciclo da xantofila (Demmig-Adams et al. 1996). Aqui, as galhas de *M. esculenta* apresentaram menores valores de ambos os parâmetros em relação às folhas, como demonstrado para outros 4 tipos de galhas em *Aspidosperma* spp. (Kuster et al. 2022) e para galhas de *Miconia albicans* e *M. ibaguensis* (Ferreira et al. 2018). Assim como para as clorofilas, os menores níveis de carotenoides nas galhas de *M. esculenta* pode ter relação com a pouca ocorrência de tecidos fotossintéticos (Oliveira et al. 2011). Além disso, Kuster et al. (2022) citaram que a redução do NPQ em galhas pode ser um indicativo de que vias alternativas atuam na dissipação de estresse, aqui confirmado pelos maiores níveis de POX e SOD nas galhas de *M. esculenta*. Entretanto, em *Matayba guianensis* (Oliveira et al. 2017) e em *Eugenia uniflora* (Rezende et al. 2018) o NPQ foi maior e igual na galha em relação as folhas, respectivamente, o que indica que essa via de dissipação de energia é eficiente em outros sistemas.

O R_{fd} é um parâmetro empírico usado para avaliar a vitalidade da planta (Lichtenthaler e Miehe 1997), fornecendo informações que permitem avaliar a capacidade e o desempenho fotossintético por toda a área foliar (Buschmann e Lichtenthaler 1998). Os valores desse parâmetro são frequentemente menores em galhas

(Rezende et al. 2018; Martini et al. 2020; Kuster et al. 2022) e geralmente associados ao seu maior estresse (Bomfim et al. 2018; Ferreira et al. 2018). Para as galhas de *M. esculenta*, o R_{fd} foi menor para galhas em relação às folhas, mesmo apresentando menor marcação de estresse oxidativo, isto é, EROs e malondialdeído, o que pode indicar que os radicais livres não são os principais promotores da perda de vitalidade fotossintética nesse sistema. Buschmann e Lichtenthaler (1998) relataram que folhas jovens ativas fotossinteticamente apresentam valores de R_{fd} geralmente entre 3 a 5, podendo diminuir com a interrupção do transporte de elétrons. As folhas de *M. esculenta* apresentaram médias inferiores a 3, o que pode indicar problemas na cadeia transportadora de elétrons.

3.5 CONCLUSÃO

Nas galhas de *M. esculenta* houve um controle maior na produção de EROs e formação de malondialdeído em relação as folhas, o que pode ter relação com a alta atividade de POX e SOD. A maior produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e malondialdeído nas folhas de *M. esculenta* parecem ter afetado o seu rendimento quântico do PSII, o tornando inferior ao da galha. O presente estudo traz novidades sobre estresse em galhas e vias de dissipação, mostrando maior complexidade desses processos quando se amplia o acesso ao sistema antioxidante nas galhas.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamson., WG, McCrea KD, 1986. Nutrient and biomass allocation in Solidago altissima: effects of two stem gallmakers, fertilization, and ramet isolation. Oecologia 68: 174-180. <https://doi.org/10.1007/BF00384784>

Alché., JD, 2019. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. Redox Biology. 23, 101–136. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>

Anderson., MD, Prasad, TK, Stewart, CRJP, 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*. 109, 1247-1257.

Apel., K, Hirt, H, 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review Plant Biology*. 55, 373– 399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>

Arbona., V, Flors, V, Jacas, J, García-Agustín, P, Gómez-Cadenas, A, 2003. Enzymatic and Non-enzymatic Antioxidant Responses of Carrizo citrange, a Salt-Sensitive Citrus Rootstock, to Different Levels of Salinity. *Plant Cell Physiol*. 44(4): 388–394. <https://doi: 10.1093/pcp/pcg059>

Baxter., A, Mittler, R, Suzuki, N, 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*. 65, 5, 1229–1240. <https://doi: 10.1093/jxb/ert375>

Bedetti., CS, Modolo, LV, Isaias, RMS, 2014. The role of phenolics in the control of auxin in galls of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) MacBr (Fabaceae: Mimosoideae). *Biochemical Systematics and Ecology*. v 55, p 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.02.016>

Boanares., D, da-Silva, CJ, Isaias, RMS, França, MGC, 2019. Oxidative metabolism in plants from Brazilian rupestrian fields and its relation with foliar water uptake in dry and rainy seasons. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.12.005>

Björkman., O, Demmig, B, 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plant of diverse origins. *Plant*, 170(4): 489-504. <https://doi.org/10.1007/BF00402983>

Bradford., MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254. Bragança., GP, Oliveira, DC, Isaias, RMS, 2017. Compartmentalization of Metabolites and Enzymatic Mediation in Nutritive Cells of Cecidomyiidae Galls on *Piper Arboreum* Aubl. (Piperaceae). *Journal of Plant Studies*. 6, 1. <http://dx.doi.org/10.5539/jps.v6n1p11>

Buschmann., C, Lichtenthaler, HK, 1998. Principles and Characteristics of Multi-Colour Fluorescence Imaging of Plants. *Journal of Plant Physiology*. 152, 297- 314. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80144-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80144-2)

Cakmak., I, Marschner, H, 1992. Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiology*. 1222-1227. [doi: 10.1104/pp.98.4.1222](https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1222).

Cerný., M, Habánová, H, Berka, M, Luklová, M, Brzobohatý, B, 2018. Hydrogen peroxide: Its role in plant biology and crosstalk with signalling networks. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2812. [doi:10.3390/ijms19092812](https://doi.org/10.3390/ijms19092812)

Chaitanya., KSK, Naithani, SC, 1994. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f. *New Phytologist*. 126:623-627.

Chance., B, Maehley, AC, 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology*, 2, 764-775.

Del Longo., OT, González, CA, Pastori., GM, Trippi, VS, 1993. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology*, 34, 1023-1028.

Del Rio., D, Stewart, AJ, Pellegrini, N, 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*. 15, 316–328. [doi:10.1016/j.numecd.2005.05.003](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003)

Demmig-Adams., B, Gilmore, AM, Adams, WW, 1996. Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J*. 10, 403–412. [https://doi: 10.1096/fasebj.10.4.8647339](https://doi.org/10.1096/fasebj.10.4.8647339)

Durães., MS, Araújo, WS, 2020. Effects of structural complexity and habitat type on the gall distribution of *Jatrophobia brasiliensis* (Rübsaamen, 1907) (Diptera, Cecidomyiidae) in two host-species of *Manihot* (Euphorbiaceae). *Entomological Communications*.

- El-Beltagi., HS, Kesba, HH, Abdel-Alim, AI, Al-Sayed, AA, 2011. Effect of root-knot nematode and two species of crown gall on antioxidant activity of grape leaves. *African Journal of Biotechnology*. 10(57), 12202-12210. <https://doi:10.5897/AJB11.1170>
- Ferreira., BG, Oliveira DC, Moreira, ASFP, Faria, AP, Guedes, M, França, MGC, Álvarez, R, Isaias, RMS, 2018. Antioxidant metabolism in galls due to the extended phenotypes of the associated organisms. *Plos one*. 13 (10): e0205364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205364>
- Ferreira, BG., Álvarez, R, Bragança, GP, Alvarenga, DR, Pérez-Hidalgo, N, Isaias, RMS, 2019. Feeding and Other Gall Facets: Patterns and Determinants in Gall Structure. *Botanical Review*. v. 85, p. 78-106. <https://doi.org/10.1007/S12229-019-09207-W>.
- Flora do Brasil. Flora do Brasil 2020 em construção. Rio de Janeiro (BR): Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017. <http://floradobrasil.jbr.gov.br/>
- Gay., C, Gebicki, JM, 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* 284: 217-220.
- Giannopolitis., CN, Ries, SK, 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59, 309-314.
- Gill., SS, Tuteja, N, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 909-930. <https://doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Guedes., LM, Aguilera, N, Ferreira, BG, Riquelme, S, Sáez-Carrillo, K, Becerra, J, Pérez, C, Bustos, E, Isaias, RMS, 2019. Spatiotemporal variation in phenolic levels in galls of calophyids on *Schinus polygama* (Anacardiaceae). *Journal of Plant Research*. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01118-6>
- Guedes., LM, Torres, S, Saez-Carillo, K, Becerra, J, Pérez, CI, Aguilera, N, 2022. High antioxidant activity of phenolic compounds dampens oxidative stress in *Espinosa nothofagi* galls induced on *Nothofagus obliqua* buds. *Plant Science*. 314, 111114. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111114>

- Hartnett., DC, Abrahamson, WG, 1979. The effects of stem gall insects on life history patterns in *Solidago Canadensis*. Ecology. 60 (5) 910-917. <https://doi.org/10.2307/1936859>
- Hasanuzzaman., M, Bhuyan, MHMB, Zulfiqar, F, Raza, A, Mohsin, SM, Mahmud, JA, Fujita, M, Fotopoulos, V, 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. Antioxidants. 9, 681. <https://doi:10.3390/antiox9080681>
- Heath., RL, Packer, L, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives Biochemistry and Biophysics, 125, 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hernández., JFR. La mosca de las agallas (*Jatrophobia brasiliensis*) en el cultivo de yucca, 2011. Revista de la Universidad de La Salle. 2011, 56.
- Huchzermeyer., B, Menghani, E, Khardia, P, Shilu, A, 2022. Metabolic Pathway of Natural Antioxidants, Antioxidant Enzymes and ROS Production. Antioxidants. 11, 761. <https://doi.org/10.3390/antiox11040761>
- Isaias., RMS, Carneiro, RGS, Oliveira, DC, Santos, JC, 2013. Illustrated and Annotated Checklist of Brazilian Gall Morphotypes. Neotropical Entomology, 42: 230-239. [doi: 10.1007/s13744-013-0115-7](https://doi.org/10.1007/s13744-013-0115-7).
- Isaias., RMS, Carneiro, RGS, Santos, JC, Oliveira, DC, 2014. Gall Morphotypes in the Neotropics and the Need to Standardize Them. Springer. 4. [doi: 10.1007/978-94-017-8783-34](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8783-34).
- Isaias., RMS, Oliveira, DC, Moreira, ASFP, Geraldo Luiz Gonçalves Soares, GLG, Carneiro, RGS, 2015. The imbalance of redox homeostasis in arthropod-induced plant galls: Mechanisms of stress generation and dissipation. Biochimica et Biophysica Acta. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.03.007>
- Johansen., DA, 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw- Hill.
- Kar., M, Misha, D, 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. 57, 315-319.

- Khatab., H, 2007. The Defense Mechanism of Cabbage Plant Against Phloem-Sucking Aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 1(1): 56-62.
- Kmieć., K, Rubinowska, K, Golan, K, 2018. *Tetraneura ulmi* (Hemiptera: Eriosomatinae) Induces Oxidative Stress and Alters Antioxidant Enzyme Activities in Elm Leaves. *Environmental Entomology*. 1-8. [https://doi: 10.1093/ee/nvy055](https://doi.org/10.1093/ee/nvy055)
- Kot., I, Rubinowska, K, 2018. Physiological response of pedunculate oak trees to gall-inducing Cynipidae. *Environmental Entomology*. 47: 669–675. [https://doi: 10.1093/ee/nvy047](https://doi.org/10.1093/ee/nvy047)
- Kot., I, Sempruch, C, Rubinowska, K, Michalek, W, 2019. Effect of *Neuroterus quercusbaccarum* (L.) galls on physiological and biochemical response of *Quercus robur* leaves. *Bulletin of Entomological Research*. 1- 10. [https://doi:10.1017/S0007485319000221](https://doi.org/10.1017/S0007485319000221)
- Kot., I, , Kmieć, K, 2020. Poplar Tree Response to Feeding by the Petiole Gall Aphid *Pemphigus spyrothecae* Pass. *Insects*. 11, 282. [https://doi:10.3390/insects11050282](https://doi.org/10.3390/insects11050282)
- Kuo., MC, Kao, CH, 2003. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*. 46: 149-152.
- Kuster., VC, Rezende, UC, Cardoso, JCF, Isaias, RMS, Oliveira, DC, 2020. How Gallling Organisms Manipulate the Secondary Metabolites in the Host Plant Tissues? A Histochemical Overview in Neotropical Gall Systems. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_29
- Kuster., VC, Cardoso, JCF, Moreira, ASFP, Isaias, RMS, Oliveira, DC, 2022. Assessing oxidative stress and photosynthetic activity in leaf galls induced by diferent species of galling insect on *Aspidosperma* spp.. *Biologia*. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01167-8>
- Lawson., T, Milliken, AL, 2023. Photosynthesis– beyond the leaf. *New Phytologist*, 238: 55-61. <https://doi.org/10.1111/nph.18671>

- Lichtenthaler., HK, Wellburn., AR, 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transaction*, 11: 591–592.
- Lichtenthaler., HK, Miehe., JA, 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science*. 2, 316-320. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)89954-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)89954-2)
- Liu., X, Williams, CE, Nemacheck, JA, Wang, H, Subramanyam, S, Zheng, C, Chen, MS, 2010. Reactive Oxygen Species Are Involved in Plant Defense against a Gall Midge. *Plant Physiology*. Vol 152, pp 985–999. <https://doi/10.1104/pp.109.150656>
- Lüttge., U, 1997. *Physiological Ecology of Tropical Plants*. <https://doi/10.1007/978-3-662-03340-1>
- Maia., VC, 2021. Cecidomyiidae (Diptera, Insecta): richness of species and distribution in Brazil. *Biota Neotropical*. 21(2). [doi: 10.1590/1676-0611-BN-2020-1038](https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1038)
- Mani., MS, 1964. *Ecology of plant galls*. The Hague: Dr. W. Junk Publishers.
- Martini., V, Moreira, ASFP, Kuster, VC, Oliveira, DC, 2020. Photochemical performance and source-sink relationships in galls induced by *Pseudophacopteron longicaudatum* (Hemiptera) on leaves of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *Photosynthetica*. 58 (3): 827-835. <https://doi: 10.32615/ps.2020.033>
- Mittapalli., O, Neal, JJ, Shukle, RH, 2007. Antioxidant defense response in a galling insect. *PNAS*. 104, 6, 1889–1894. <https://doi: 10.1073/pnas.0604722104>
- Mittler., R, Vanderauwera, S, Suzuki, N, Miller, G, Tognetti, VB, Vandepoele, K, Gollery, M, Shulaev, V, Breusegem, FV, 2011. ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science*. 16, 6. <https://doi:10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Mittler., R, Zandalinas, SI, Fichman, Y, Breusegem, FV, 2022. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Plant stress responses*. v 23. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
- Morales., M, Munné-Bosch, S, 2019. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiology*. 180, 1246–1250. <https://doi:10.1104/pp.19.00405>

Nakano., KJP, Asada, C, 1981. Physiology, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22, 867-880.

O'Brien., TP, Feder, N, McCully, ME, 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O Protoplasma*. 368-373, 59.

Oliveira., DC, Christiano, JCS, Soares, GLG, Isaias, RMS, 2006. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl.(Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides*Crawf.(Hemiptera: Psyllidae). *Brazilian Journal of Botany*. v 29, pp 657-667. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000400015>

Oliveira., DC, Magalhães, TA, Carneiro, RGS, Alvim, MN, Isaias, RMS, 2010. Do Cecidomyiidae galls of *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae) fit the pre-established cytological and histochemical patterns?. *Protoplasma*. 242:81–93. <https://doi: 10.1007/s00709-010-0128-6>

Oliveira., DC, Carneiro, RGS, Magalhães, TA, Isaias, RMS, 2011. Cytological and histochemical gradients on two *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae)—Cecidomyiidae gall systems. *Protoplasma*. 248:829–837. <https://doi:10.1007/s00709-010-0258-x>

Oliveira., DC, Moreira, ASFP, Isaias, RMS, Martini, V, Rezende, UC, 2017. Sink Status and Photosynthetic Rate of the Leaflet Galls Induced by *Bystracoccus mataybae* (Eriococcidae) on *Matayba guianensis* (Sapindaceae). *Frontiers in Plant Science*. 8. <https://doi: 10.3389/fpls.2017.01249>

Oliveira., MCD, Schoffen, JPF, 2010. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53, 1333–1342. doi:10.1590/S1516-89132010000600009

Papageorgiou., GC, Govindjee, 2014. The Non-Photochemical Quenching of the Electronically Excited State of Chlorophyll a in Plants: Definitions, Timelines, Viewpoints, Open Questions, volume 40, ed. Barbara Demmig-Adams, William Adams III, Gyozo Garab, Govindjee, Nova York, pp. 01-44. <https://doi: 10.1007/978-94-017-9032-1>

R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Acessado em 20 Janeiro de 2023.

Rajput., VD, Harish, Singh, RK, Verma, KK, Sharma, L , Quiroz-Figueroa, FR, Meena, M, Gour, VS, Minkina, T, Sushkova, S, Mandzhieva, S, 2021. Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology*. 10, 267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>

Ramzan., M, Sana, S, Javaid, N, Shah, AA, Ejaz, S, Malik, WN, AhmadYasin, N, Alamri, S, Siddiqui, MH, Datta, R, Fahad, S, Tahir, N, Mubeen, S, Ahmed, N, Ali, MA, El Sabagh, A, Danish, S, 2021. Mitigation of bacterial spot disease induced biotic stress in *Capsicum annuum* L. cultivars via antioxidant enzymes and isoforms. *Scientific Reports*. 11:9445. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88797-1>

Rascher., U, Liebig, M, Lüttge, U, 2000. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field. *Plant, Cell and Environmental*. 23: 1397-1405, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00650.x>

Rezende., UC, Moreira, ASFP, Kuster, VC, Oliveira, DC, 2018. Structural, histochemical and photosynthetic profiles of galls induced by *Eugeniamyia dispar* (Diptera: Cecidomyiidae) on the leaves of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae). *Biologia Tropical*. 66(4): 1469-1480. <https://doi:10.15517/rbt.v66i4.32531>

Rosa., JMO, Oliveira, SA, Jordão, AL, Siviero, A, Oliveira, CMG, 2014. Nematoides fitoparasitas associados à mandioca na Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*. 44 (2) 271-275.

Rosseti., S, Bonnatti PM, 2001. *In situ* histochemical monitoring of ozone-and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39: 433-442.

Silva., AFM, Kuster, VC, Rezende, UC, Oliveira, DC, 2019. The early developmental stages of gall-inducing insects define final gall structural and histochemical profiles: the case of *Bystracoccus mataybae* galls on *Matayba guianensis*. *Botany*, 00:1-12 (0000). <https://doi.org/10.1139/CJB-2019-0017>

- Sytykiewicz., H, Łukasik, I, Goławska, S, Chrzanowski, G, 2019. Aphid-Triggered Changes in Oxidative Damage Markers of Nucleic Acids, Proteins, and Lipids in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings. *International Journal Molecular Sciences*. 20, 3742. <https://doi:10.3390/ijms20153742>
- Stone., GN, Schönrogge, K, 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Ecology and Evolution*. 18, 10. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00247-7)
- Taheri., P, Irannejad, A, Goldani, M, Tarighi, S, 2014. Oxidative burst and enzymatic antioxidant systems in rice plants during interaction with *Alternaria alternata*. *European Journal of Plant Pathology*. 140:829–839. <https://doi: 10.1007/s10658-014-0512-8>
- Wickham., H, 2011. *ggplot2*. 3(2), 180–185. <https://doi:10.1002/wics.147>
- Zaid., A, Wani, SH, 2019. *Reactive Oxygen Species Generation, Scavenging and Signaling in Plant Defense Responses*. Springer. v 7, p 111-125. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-27165-7>
- Zhu., Y, Luo, X, Nawaz, G, Yin, J, Yang, J, 2020. Physiological and Biochemical Responses of four cassava cultivars to drought stress. 10: 6968. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63809-8>
- Zieslin., N, Ben, ZRJPP, 1993. Biochemistry, Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*. 31, 333-339.

4. CONCLUSÃO GERAL

As galhas de *M. esculenta* são formadas baseadas em diferentes níveis de reestruturação celular e tecidual, apresentando típica compartimentalização tecidual de galhas induzidas por Cecidomyiídeos, assim como a recorrência de metabólitos primários destinados a alimentação do herbívoro, e metabólitos secundários a proteção e dissipação de estresse. E ainda, a composição da parede celular demonstra uma disponibilidade de recursos que parecem ser associados com a alimentação do indutor, aqui demonstrados pela elevada marcação no tecido nutritivo de componentes não

celulósicos, principalmente os xiloglucanos. Além disso, o presente estudo amplia o conhecimento sobre estresse em galhas e as vias de dissipação, envolvidas no equilíbrio homeostático, ressaltando a complexidade dos mecanismos utilizados pela galha para manter a sua estrutura e funcionalidade.