



Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica

Michelle de Lima Detoni

**GALHAS EM *Calliandra brevipes* Benth (FABACEAE: MIMOSOIDAE): UMA ABORDAGEM
METABÓLICA EM UM NOVO MODELO VEGETAL CO-HABITADO POR DISTINTOS HIMENOPTEROS
GALHADORES**

Juiz de Fora
2009

Michelle de Lima Detoni

**GALHAS EM *Calliandra brevipes* Benth (FABACEAE: MIMOSOIDAE): UMA ABORDAGEM
METABÓLICA EM UM NOVO MODELO VEGETAL CO-HABITADO POR DISTINTOS HIMENOPTEROS
GALHADORES**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética e Biotecnologia) da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética e Biotecnologia).

Orientadora: Prof^a. Dsc. Eveline Gomes Vasconcelos

Co-Orientador: Prof. Dsc. Geraldo L. Gonçalves Soares

Juiz de Fora

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Detoni, Michelle de Lima.

Galhas em *Calliandra brevipes* Benth (FABACEAE: MIMOSOIDAE):
uma abordagem metabólica em um novo modelo vegetal
co-habitado por distintos himenópteros galhadores / Michelle de
Lima Detoni. -- 2009.

99 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade
Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Biotecnologia. I. Título.

CDU 57.08

Michelle de Lima Detoni

**GALHAS EM *Calliandra brevipes* Benth (FABACEAE: MIMOSOIDAE): UMA ABORDAGEM
METABÓLICA EM UM NOVO MODELO VEGETAL CO-HABITADO POR DISTINTOS HIMENOPTEROS
GALHADORES**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética e Biotecnologia) da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética e Biotecnologia).

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dsc. Eveline Gomes Vasconcelos (Orientadora)

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dsc. Luciana Moreira Chedier
Universidade Presidente Antônio Carlos

Profa. Dsc. Priscila de Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico estes escritos a todos aqueles que me ajudaram ao longo deste estudo. Não importando a forma: material, intelectual, emocional ou espiritual. Nem importando os nomes!

Amado e Eterno Amigo...

Agradecemos por tudo o que temos e por tudo o que não temos.

Agradecemos pelo que temos...

E que nos foi dado para que pudéssemos distribuí-los, como sejam nossa atenção, amizade, compaixão, amor e a chance de poder servir ao próximo, em Teu Nome.

Agradecemos pelo que não temos...

Apesar de querermos, pois já sabemos que nos seria motivo de escândalo e por esse motivo nos foram negado.

Pedimos misericórdia...

Pelos que receberam... como ferramenta de resgate ou depuração, para que sejam vitoriosos em suas provas.

Pelos que têm... e não perceberam que precisam distribuir.

Pelos que detém o poder... e não sabem como usá-lo.

Pelos que galgaram posição de chefia... e não sabem delegar com discernimento.

Pelos que têm voz... e não sabem falar de amor.

Pelos que têm inteligência... e não a usam para ensinar.

Pelos que não têm o quê ofertar mas, mesmo assim, têm orgulho... por não estarem pior.

Pedimos que distribua Tua Paz...

Entre os que, inconformados, estão presos ao leito, ao cárcere, à debilidade física e mental, às doenças degenerativas e terminais por não compreenderem... a Tua Justiça que resgata, hoje, males causados no ontem.

Pedimos, por fim, por nós mesmos...

Para que não tropeçemos em nosso conhecimento germinal da Tua Boa Nova,

Para que a soberba, o orgulho e a vaidade não façam de nós a propaganda nefasta do Teu Evangelho e...

Para que possamos, com humildade, falarmos em Teu Nome.

psicografada por Regina Casses/2004

RESUMO

Calliandra brevipes apresenta uma galha globosa (GG) e uma fusiforme (GF), induzidas por *Tanaostigmodes mecanga* e *T. ringueleti*, respectivamente. As variações sazonais no conteúdo fenólico de ambas as galhas, de caule e folha não galhados (CS e FS, respectivamente) foram analisadas durante 12 meses. O perfil de variação do teor fenólico nos tecidos galhados e não galhados de *C. brevipes* foi similar ao longo do período analisado, apresentando-se fortemente influenciado pelas variações na precipitação pluviométrica, ocorrendo maior acúmulo fenólico quando o vegetal estava sob estresse hídrico. Os conteúdos fenólicos de ambas as galhas foram similares e, no período de drásticas mudanças na precipitação pluviométrica, estes sofreram alterações significativamente menores do que as sofridas pelos tecidos não galhados, sugerindo que as duas espécies de *Tanaostigmodes* modulam o conteúdo fenólico no tecido galhado de maneira similar. Assim, notou-se que as alterações no conteúdo fenólico podem estar primariamente associadas às mudanças pluviométricas, constituindo uma defesa direta contra o estresse hídrico. Na triagem de metabólitos secundários, flavonóides, cumarinas e taninos foram detectados em tecidos galhados e não galhados de *C. brevipes*. Saponinas foram encontradas somente em amostras de tecidos não galhado, mostrando que as galhas apresentam menor toxicidade para o herbívoro. Triterpenóides foram encontrados em GG e esteróides em GF, sugerindo que cada galhador explora diferencialmente o metabolismo do hospedeiro. Adicionalmente, o conteúdo de flavonóides e a atividade antioxidante também estavam diferenciados em ambas as galhas, sendo maiores na galha fusiforme. Na análise cromatográfica e densitométrica de carboidratos, GG e GF apresentaram conteúdos de sacarose, glicose e frutose maiores do que os encontrados em tecidos não galhados, 1,5-3 vezes e 2 vezes, respectivamente. A análise de saponinas e carboidratos evidenciou que ambas as galhas apresentam menor toxicidade e constituem uma fonte mais nutritiva para o herbívoro do que o tecido não galhado. O fracionamento e a análise densitométrica de proteínas, detectou polipeptídeos comuns a ambas as galhas (80, 69, 61, 52, 32 kDa) provavelmente essenciais para a organização básica desta neoformação, bem como específicos a cada uma (galha globosa: 97, 75, 34 kDa; galha

fusiforme: 40, 33 kDa) que podem estar associadas aos distintos morfotipos e suas vias metabólicas. Em conjunto, a análise de proteínas, flavonóides e a atividade antioxidante mostram que cada galhador manipula o hospedeiro de maneira peculiar, mesmo quando duas espécies galhadoras filogeneticamente tão próximas parasitam um hospedeiro comum. Quanto à análise fosfolitolítica, CS hidrolisou igualmente ATP, ADP, UDP ou GDP. Na GG, o UDP, GDP, e ADP foram hidrolisados aproximadamente 1,5-3 vezes mais do que no CS, já o AMP foi 10 vezes mais hidrolisado na GG. Em conjunto, estes dados confirmam que este tecido exacerba os mecanismos capazes de hidrolisar nucleotídeos, possivelmente devido sua maior atividade metabólica. Atividades ADPásica e UDPásica de CS e GG foram 10-32% estimuladas por 5 mM de Ca^{2+} , e inibidas pela adição de 5 mM EDTA ou EGTA (88 a 100%), confirmando a dependência destas atividades à cátons bivalentes. Uma pequena inibição por ortovanadato foi detectada sugerindo a presença de P-ATPases, enquanto azida sódica, DCCD e bafilomicina não inibiram significativamente a atividade ATPásica. Uma apirase de 75 kDa foi identificada em CS e GG de *C. brevipes*, e provavelmente contribuiu com a atividade fosfolitolítica observada. Foi constatada a presença de apirase e de atividade ADPásica nas células nutritivas que delineiam a câmara larvar por microscopia de imunofluorescência e citoquímica, respectivamente. A alta atividade apirásica na galha globosa de *C. brevipes* pode estar associada à biossíntese de carboidratos, recuperação de nucleosídeos e/ou proliferação celular, contribuindo assim, para a nutrição e sobrevivência do galhador.

Palavras-chave: Metabólitos vegetais. Fenóis. Proteína. Carboidrato. Nucleotídeos. Apirase. Interação inseto-planta.

ABSTRACT

Calliandra brevipes presents globose (GG) and fusiform galls (GF) induced by *Tanaostigmodes mecanga* and *T. ringueleti*, respectively. The seasonal changes in phenolic content of both galls, and in non-galled stem and leaf were analyzed over one year. The phenolic variation profile of galled or non-galled tissues of *C. brevipes* was similar during the analyzed period, but it is strongly influenced by the variations in the pluviometric levels increasing during hydric stress. The phenolic levels were in similar amounts between the two galls and, in the period of drastic changes in pluviometric levels, the alterations were significantly higher in non-galled tissues when compared to the galled tissues, suggesting that the two distinct species of *Tanaostigmodes* manipulate the phenolic level in a similar way. Therefore, the alterations in phenolic contents could be primarily associated to the pluviometric changes, constituting a direct defense against the hydric stress. The phytochemical screening showed the presence of flavonoids, coumarins and tannins in galled and non-galled samples. Saponins were found only in non-galled samples, suggesting that the galled tissues are less toxic to the herbivory. Triterpenoids were detected in GG, but not in GF, suggesting that each inducer explore in a different way the plant metabolism. In addition, flavonoids content and antioxidant activity were differentiated in both galls, being significantly higher in fusiform gall. Chromatographic and densitometric analyses showed that GG and GF present sucrose, glucose and fructose contents 1.5-3 and 2 times higher, respectively than those found in non galled tissue. The secondary metabolites and carbohydrate analyses evidenced that both galls tissues are less toxic and constitute a better nutrient source for the herbivory than the non-galled tissues. Protein fractionation and densitometric analysis showed common polypeptides to both galls (80, 69, 61, 52, 32 kDa) possibly essentials for their basic neoformations, and specific polypeptides in either globose (globose: 97, 75, 34 kDa) or fusiform gall (40, 33 kDa), which could be associated to the different gall morphotypes and their metabolic pathways. Together, the protein, flavonoid and antioxidant analyses showed that each inducer, although closer phylogenetically, manipulate the host by specific pathways in the same plant. Phosphohydrolytic analysis showed that CS equally hydrolyzed either ATP, ADP, UDP or GDP. In GG, the UDP,

GDP, and ADP were hydrolyzed approximately 1.5-3 folds higher than that found in CS. AMP hydrolyzes was 10 folds higher in GG confirming that this tissue increase their mechanisms capable of hydrolyzing nucleotides. ADPase and UDPase activities from CS and GG were 10-32% stimulated by 5 mM calcium, and inhibited by the addition of 5 mM EDTA or EGTA (88 to 100%), thus confirming the divalent cation dependence. Little ATPase inhibition by orthovanadate was detected suggesting the presence of a P-type ATPase, while sodium azide, dicyclohexylcarbodiimide, and bafilomycin did not affect significantly the ATPase activity. A band of 75 kDa was recognized by polyclonal anti-potato apyrase antibodies in CS or GG, confirming the presence of an apyrase in *Calliandra brevipes*. By immunofluorescence microscopy, using anti-potato apyrase antibodies, and by cytochemical techniques, using ADP as substrate, the apyrase was located on the external surface and inside of the nutritive cells that compose the central chamber. The high apyrase activity in globose gall of *C. brevipes* could be participating in carbohydrate biosynthesis, in the salvage pathway of nucleosides and/or cell proliferation, for the feeding and survival of the insect.

Keywords: Plant metabolites. Phenol. Protein. Carbohydrate. Nucleotides. Apyrase. Insect-plant interaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Diversidade de morfotipos de galhas em Minas Gerais	25
Figura 2 <i>Calliandra brevipes</i> : Galha Fusiforme e Galha Globosa	32
Figura 3 Variação sazonal e comparação do conteúdo fenólico em tecidos não galhados e galhados de <i>C. brevipes</i>	46
Figura 4 Conteúdo fenólico de amostras de tecidos não galhados e galhados de <i>C. brevipes</i> coletados em fevereiro e abril de 2004	47
Figura 5 Conteúdo fenólico de amostras de tecidos não galhados e galhados de <i>C. brevipes</i> em abril de 2008	49
Figura 6 Conteúdo de flavonóides e atividade antioxidante detectada em tecidos não galhados e galhados de <i>C. brevipes</i>	52
Figura 7 Perfil de carboidratos em amostras de tecidos galhados e não galhados de <i>C. brevipes</i>	54
Figura 8 Conteúdo de proteínas em amostras de tecidos galhados e não galhados de <i>C. brevipes</i>	56
Figura 9 Perfil protéico em amostras de tecidos galhados e não galhados de <i>C. brevipes</i>	57
Figura 10 Identificação de apirase em caule não galhado e galha globosa de <i>C. brevipes</i>	64
Figura 11 Localização imunocitoquímica de apirase em galha globosa de <i>C. brevipes</i>	66
Figura 12 Localização citoquímica de atividade apirásica em galha globosa de <i>C. brevipes</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Metabólitos secundários detectados em extrato etanólico de <i>C. brevipes</i>	50
Tabela 2 Atividade fosfohidrolítica de amostras de tecidos de caule não galhado e galha globosa de <i>C. brevipes</i>	59
Tabela 3 Efeitos dos inibidores sobre a hidrólise de ATP	60
Tabela 4 Análise da dependência das atividades ADPásica e UDPásica à cátiões bivalentes	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADP – Difosfato de adenosina
AMP – Monofosfato de adenosina
ATP – Trifosfato de adenosina
 Ca^{2+} – íons cálcio
 CaCl_2 – Cloreto de Cálcio
 Cl_{50} – Concentração de Inibição de 50% da atividade oxidante
CS – Caule não galhado de *C. brevipes*
DCCD – N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAT – Equivalente a ácido tânico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA – Ácido etilenoglicol tetra-acético
E-NTPDase – Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
E-NTP – Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
ER – Equivalente a rutina
FS – Folha não galhada de *C. brevipes*
kDa – quiloDaltons
GF – Galha Fusiforme de *C. brevipes*
GG – Galha Globosa de *C. brevipes*
GDP – Difosfato de Guanina
GTP – Trifosfato de Guanina
HCl – Ácido clorídrico
 Mg^{2+} – íons magnésio
NCBI – “National Center Biotechnology Information”
NTPDase – Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
Page – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS – Tampão fosfato salino
 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ – Nitrato de Chumbo II
PCR – Reação em cadeia da polimerase

Pi – Fosfato inorgânico

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

p-NPP – p-nitrofenil fosfato

RPM – Rotações por minuto

SD – Desvio padrão

SDS – Dodecil sulfato de sódio

sp – Espécie

Tris – tris-hidroximetil-aminometano

UDP – Difosfato de Uracila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Aspectos Gerais	18
1.2 Aspectos ecológicos da cecidogênese.....	20
1.3 Aspectos econômicos da cecidogênese	21
1.4 Aspectos Morfológicos e Anatômicos da cecidogênese.....	23
1.5 Alterações do metabolismo primário e secundário providas da cecidogênese	25
1.6 Apirase em plantas.....	28
1.7 Galhas em <i>Calliandra brevipes</i> Benth	29
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivos gerais.....	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Material.....	36
3.2 Obtenção das amostras de <i>C. brevipes</i>	37
3.3 Análise de fitocompostos, atividade antioxidante e de carboidratos em extratos etanólicos de <i>C. brevipes</i>	37
3.4. Análise quantitativa e qualitativa de proteínas	39
3.5 Determinação da atividade fosfohidrolítica e caracterização de atividade apirásica em <i>C. brevipes</i>	40
3.5.1 Dependência da atividade fosfohidrolítica a íons bivalentes	40
3.5.2 Detecção de apirase por “Western Blots”	41
3.5.3 Detecção de apirase por microscopia de imunofluorescência.....	42
3.5.4 Detecção de atividade ADPásica <i>in situ</i>	42
3.6 Análise estatística	43
4 RESULTADOS	
4.1 Variação sazonal do conteúdo fenólico de amostras de tecidos galhados e não galhados de <i>C. brevipes</i>	44

4.2	Análise do conteúdo fenólico e triagem fitoquímica em amostras de tecidos galhados e não galhados de <i>C. brevipes</i>	48
4.3	Análise cromatográfica de carboidratos	53
4.4	Análise de proteínas.....	55
4.5	Caracterização de atividade fosfohidrolítica em amostras de caule não galhado e galha globosa de <i>C.brevipes</i>	
4.5.1	Análise de Substrato	58
4.5.2	Efeitos de inibidores clássicos de ATPases sobre a atividade fosfohidrolítica	60
4.5.3	Dependência da atividade fosfohidrolítica aos cátions bivalentes.....	61
4.5.4	Identificação de uma isoforma de apirase em <i>C. brevipes</i> através da imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de <i>Solanum tuberosum</i>	63
4.5.5	Localização de apirase em galha globosa de <i>C. brevipes</i>	65
5	DISCUSSÃO	
5.1	Mudanças no conteúdo fenólico de tecidos galhados de <i>C. brevipes</i> estão possivelmente associadas ao estresse abiótico.....	68
5.2	Análise das alterações do conteúdo de carboidratos e proteínas induzidas por galhadores em <i>Calliandra brevipes</i>	73
5.3	Identificação de uma isoforma de apirase em caule sadio e galha globosa de <i>Calliandra brevipes</i>	75
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	83
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

No curso da evolução foram se estabelecendo uma série de relações intrincadas e de interdependência adaptativa entre espécies animais e vegetais. Dentre estas interações, a mais conhecida popularmente é a herbivoria, possivelmente iniciada quando alguns ancestrais artrópodes saprófagos se alimentavam de esporos das primeiras linhagens vegetais. Atualmente, as relações de herbivoria podem ser genéricas, nas quais os insetos podem consumir vários órgãos de diferentes espécimes vegetais; ou altamente especializadas, nas quais o herbívoro alimenta-se de uma planta e/ou tecido específico. Adicionalmente, algumas espécies de insetos possuem um papel fundamental nos processos de polinização e dispersão das espécies vegetais (EDWARDS e WRATTEN, 1980; HARBONE, 1994; CORNELISSEN e FERNANDES, 2003).

1.1. Aspectos Gerais

As relações entre os vegetais e os animais são, provavelmente, ainda mais antigas do que a herbivoria, podendo ser benéficas ou deletérias para as espécies envolvidas (JOLIVET, 1998; CORNELISSEN e FERNANDES, 2003). Atualmente, são inúmeras e complexas as relações existentes entre animais e vegetais (parasitismo, comensalismo, herbivorismo), sendo grande parte destas provinda da interação entre insetos e plantas. O quadro co-evolutivo destas relações iniciou-se possivelmente no cenário químico, onde a liberação de diversos compostos voláteis pelo vegetal acabou exercendo uma função sinalizadora. Estas substâncias provindas do metabolismo

secundário tornaram plausível a ampliação da interação inseto-planta, propiciando assim um alto grau de diversificação destas inter-relações (EDWARDS e WRATTEN, 1980; HARBONE, 1994). Desta forma, faz-se importante a análise não só dos aspectos estruturais do desenvolvimento evolutivo, mas também da resposta metabólica que um vegetal apresenta frente à interação com um organismo associado.

Além destes metabólitos secundários liberados pelas plantas, diversos outros caracteres oriundos da pressão co-evolutiva se estabeleceram. Devido à imobilidade dos vegetais, foram selecionadas algumas características que detinham ou diminuíaam o estresse causado por fatores ambientais. Normalmente, os vegetais respondem ao estresse ambiental mediante ativação/inibição de determinadas vias metabólicas, podendo ocorrer uma manifestação oxidativa, durante a qual são geradas formas reativas de oxigênio, como superóxido, peróxido e radicais hidroxila (RIZZARDI *et al.*, 2003). Em relação aos fatores bióticos, os recursos vegetais de defesa constituem um sistema complexo, envolvendo o escape, a resistência e a tolerância aos herbívoros. Algumas plantas tornaram-se caducifólias, sendo capazes de perder suas folhas em épocas onde a herbivoria é mais intensa, tornando-se assim temporariamente indisponíveis. Já os mecanismos de resistência do vegetal envolvem a presença de barreiras estruturais (tricomas, cascas) ou metabólitos de defesa que dificultam o ataque de seus predadores, patógenos e parasitos (LEVIN, 1973; JOHNSON, 1975; EDWARDS e WRATTEN, 1980; HARBONE, 1994; CORNELISSEN e FERNANDES, 2003). Finalmente, como mecanismo de tolerância, os vegetais podem suportar os danos da herbivoria mediante características fisiológicas que reduzam os efeitos de seus atacantes, como o brotamento de novos órgãos vegetativos com maior taxa de crescimento em relação aos anteriores que foram danificados (EDWARDS e WRATTEN, 1980; HARBONE, 1994; PANDA e KHUSH, 1995). Atualmente, alguns estudos têm ressaltado também a importância dos metabólitos primários nestas interações, nas quais a presença de alguns peptídeos pode ser fundamental na resposta do vegetal frente a diferentes patógenos (DANGL e JONES, 2001; JONES e DANGL, 2006).

Mesmo utilizando-se destas diversas estratégias de defesa, as células, tecidos e órgãos de muitas plantas estão sujeitos aos efeitos de uma série de fatores que podem

resultar em doença, perda de função do órgão lesado ou em crescimento patológico. Um exemplo altamente especializado proveniente da interação inseto-planta é a formação da galha ou cecídia, um crescimento vegetal atípico originado na interação entre um indutor e sua planta hospedeira (MANI, 1964). Na cecidogênese, os galhadores induzem uma série de alterações metabólicas e anatômicas no tecido do hospedeiro, provendo para si ou para sua prole abrigo e fonte de alimento (ISAIAS, 1998, SOARES e KAPLAN, 2000).

1.2. Aspectos ecológicos da cecidogênese

As galhas são induzidas nas mais diversas espécies vegetais, sendo encontradas em algas, fungos, líquens, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (MANI, 1964). Os galhadores são também amplamente diversificados, incluindo fungos, bactérias, vírus, nematóides, aracnídeos e insetos, sendo estes últimos os principais responsáveis pela formação de galhas. Dentre os insetos, os mais representativos são os dípteros, coleópteros, hemípteros e lepidópteros (MANI, 1964; OCCHIONI, 1979; FERNANDES e MARTINS, 1985). As galhas induzidas por insetos podem ser encontradas em todos os órgãos vegetais, desde as partes subterrâneas até as aéreas, tanto em órgãos vegetativos quanto reprodutivos, sendo mais freqüentes em folhas. Em alguns casos, parte do vegetal pode senescer como resultado do intenso ataque de herbívoros galhadores, e em casos extremos, pode ocorrer à morte do organismo hospedeiro, como já foi observado em carvalhos atacados por cinipídeos (TAFT e BISSING, 1988).

Ao contrário dos herbívoros livres, que são obrigados a enfrentar todo o arsenal anti-herbívoro, movendo-se e alimentando-se na superfície da planta, os cecidógenos em geral são sedentários, podendo obter seu alimento diretamente de feixes vasculares, de células do tecido nutritivo e/ou de hifas de fungos endofíticos. Os insetos galhadores induzem a formação da galha redirecionando o crescimento e o

metabolismo da planta hospedeira em seu benefício (MEYER e MARESQUELLE, 1983), fazendo com que ela funcione como um dreno ativo de nutrientes (ABRAHAMSON e WEIS, 1987). Nenhuma outra espécie de inseto fitófago, a não ser a galhadora, é competente para estimular a planta a fornecer uma corrente estável de substâncias nutritivas para o sítio de alimentação (SHORTHOUSE, 1986).

Dessa maneira, os galhadores possuem uma grande vantagem adaptativa em relação a outros fitófagos, pois garantem um suprimento quase ilimitado para sua sobrevivência em um ambiente altamente competitivo que é o cenário inseto-planta. A complexidade morfológica e fisiológica, caracterizada por um grande número de adaptações mecânicas e/ou químicas, faz das galhas modelos naturais de grande valor para o estudo da interação inseto-planta (KRAUS *et al.*, 1998). Desta maneira, a formação da galha representa uma das mais complexas interações conhecidas entre insetos e vegetais, tendo esta associação grande importância ecológica por permitir que os indutores colonizem os mais variados ambientes (FERNANDES e PRICE, 1988; SHORTHOUSE e ROFRISTSH, 1992).

1.3 Aspectos econômicos da cecidogênese

Os insetos adaptados à formação de galhas obtêm algumas vantagens adaptativas sobre os demais herbívoros (abrigo e fonte de alimento) obtidas mediante indução de uma série de alterações morfo-anatômicas e metabólicas nos tecidos da planta hospedeira, que culminam com a formação da galha. As galhas funcionam como dreno de metabólitos e por consequência, acabam competindo com outros drenos ativos do vegetal, como as flores, sementes e frutos. Esta competição por metabólitos resulta, na maioria das vezes, em alguns prejuízos para o vegetal.

Foi observada que a presença de galhas induzidas por *Tomoplagia rudolphi* (Tephridae, Díptera) em *Vernonia polyanthes* Less ocasiona redução no peso e na percentagem de germinação das sementes, diminuindo a viabilidade principalmente das

sementes localizadas após a galha. Tal perda no potencial reprodutivo foi atribuída ao redirecionamento para a galha de recursos necessários a reprodução da planta, resultado semelhante foi observado em *Salix* sp. e em *Mirabilis linearis* Heimerl atacados por galhadores. Galhas provocadas por nematóides também causam grandes prejuízos agrícolas, por funcionarem também como drenos ativos, diminuindo a vitalidade dos grãos. Além disso, por drenar o aporte nutritivo do vegetal, as galhas podem enfraquecer as plantas hospedeiras, dificultando seu desenvolvimento e tornando-as mais susceptíveis ao ataque de outros patógenos (SILVA, GIOVANNA e FERNANDES, 1995).

Devido a esta interferência direta na vitalidade dos vegetais, as galhas podem ser usadas como agentes biológicos para o controle do crescimento populacional de ervas daninhas. Uma grande vantagem deste agente no controle biológico é sua utilização nos mais diversos ambientes, podendo ocorrer também em meio aquático, onde o controle por agrotóxicos é desfavorável. No Canadá, a ocorrência da erva daninha *Sonchus arvensis* em trigais causa grandes prejuízos na produção deste cereal, sendo o uso de agrotóxico pouco eficiente e de reduzida duração. Neste caso, tem sido adotado o controle biológico realizado por dípteros galhadores que colocam seus ovos dentro dos botões florais desta erva daninha. Ao se alimentarem, as larvas transformam estes órgãos em galhas e consomem os ovários, afetando assim a vitalidade e a disseminação deste espécime vegetal (FERNANDES e MARTINS, 1985).

Nos trabalhos de conservação de áreas naturais, o estudo de galhas proporciona conhecimento sobre os aspectos biológicos e ecológicos das interações galhador-hospedeiro. Tem sido observado que quando os galhadores estão impossibilitados de interagir com suas plantas hospedeiras silvestres, seja por desmatamento ou por outros motivos, eles migram em busca de novas espécies hospedeiras. Provavelmente, mediante transferências deste tipo, alguns cecidógenos passaram a parasitar espécies economicamente importantes como a mandioca, a manga, o algodão e o eucalipto (FERNANDES e MARTINS, 1985).

1.4 Aspectos morfológicos e anatômicos da cecidogênese

Nas regiões tropicais, onde é maior a biodiversidade de insetos galhadores, as galhas chamam atenção pela grande variedade de formas, cores e tamanhos observados na natureza, resultantes de diversas interações espécie-específicas (Figura 1) (FERNANDES, TAMEIRÃO-NETO e MARTINS, 1988; MANI, 2000; MAIA e FERNANDES, 2004). Cada morfotipo de galha apresenta características específicas que o difere dos demais, apresentando ou não tricomas (glandulares e/ou não-glandulares), sendo séssil ou pedunculado, uni- ou multilocular, tendo número e tipo variado de camadas teciduais. Alguns autores defendem a idéia de que há uma íntima associação entre a morfologia da galha e o táxon do inseto indutor (MANI, 1964; MEYER e MARESQUELLE, 1983; MEYER, 1987; MAIA e FERNANDES, 2004); outros acreditam que a resposta morfogenética está diretamente relacionada à planta hospedeira (PRICE, FERNANDES e WARRING, 1987; DODSON, 1991; ISAÍAS, 1998). Recentemente, em estudos realizados por Cook e Gullan (2008) foi demonstrado que não só a espécie galhadora influencia no morfotipo da galha, mas também o sexo do indutor, por exemplo, galhas induzidas por fêmeas de *Apiomorpha pharetrata* apresentam forma ovóide, enquanto aquelas induzidas pelos machos possuem morfologia tubuliforme.

As galhas são caracterizadas por células, tecidos ou órgãos vegetais desenvolvidos patologicamente por hipertrofia e/ou hiperplasia celulares induzidas por fatores químicos e/ou mecânicos, como a secreção de enzimas digestivas e fitormônios ou pelo efeito direto do aparelho bucal de um organismo indutor (particularmente nas galhas induzidas por insetos) (MANI, 1964; FERNANDES e MARTINS, 1985). A formação das diversas galhas envolve complexas alterações no desenvolvimento, na diferenciação e no crescimento celular dos tecidos encontrados nos órgãos sadios (MEYER e MARESQUELLE, 1983).

Algumas galhas se apresentam, aparentemente, como uma massa de células parenquimáticas hipertrofiadas, enquanto outras apresentam um surpreendente grau de diferenciação. Neste último caso, estão as galhas induzidas por himenópteros, as quais

podem variar quanto a sua morfologia mantendo a organização interna dos tecidos (SHORTHOUSE e ROFRITSH, 1992). Os tecidos encontrados em todas as galhas de cinipídeos incluem camadas de células nutritivas citoplasmaticamente densas que delimitam a câmara larval, circundadas externamente por uma camada de parênquima vacuolar. Na maioria dos casos, estes dois tecidos são encapsulados por uma camada de esclerênquima que pode estar delimitando a câmara larvar. As células nutritivas são características das galhas de insetos e além de nutrir o galhador, estocam substâncias energéticas (carboidratos e lipídeos) provavelmente essenciais para o desenvolvimento do indutor e/ou de sua prole (SHORTHOUSE, 1986). O parênquima vacuolar é convertido em células nutritivas de acordo com o crescimento do indutor (BRONNER, 1992). Assim, a associação galhador/planta hospedeira pode ser definida em termos de alimentação e abrigo, e a importância relativa destes termos varia de acordo com o grupo de insetos e plantas em questão (SHORTHOUSE e ROFRITSH, 1992).

A formação de galhas é uma das interações inseto-planta que mais desperta atenção, por ser evidente a mudança estrutural nos tecidos da planta hospedeira (MANI, 1964; MEYER, 1987; FERNANDES e PRICE, 1988; SHORTHOUSE e ROFRITSH, 1992). Um dos pontos iniciais para deduções acerca da evolução das diversas interdependências entre insetos e vegetais, e em especial para a cecidiologia, é o estudo morfológico, que constitui o primeiro passo para a criação de hipóteses acerca das adaptações evolutivas de insetos galhadores (THIÉBAUT, 2000).

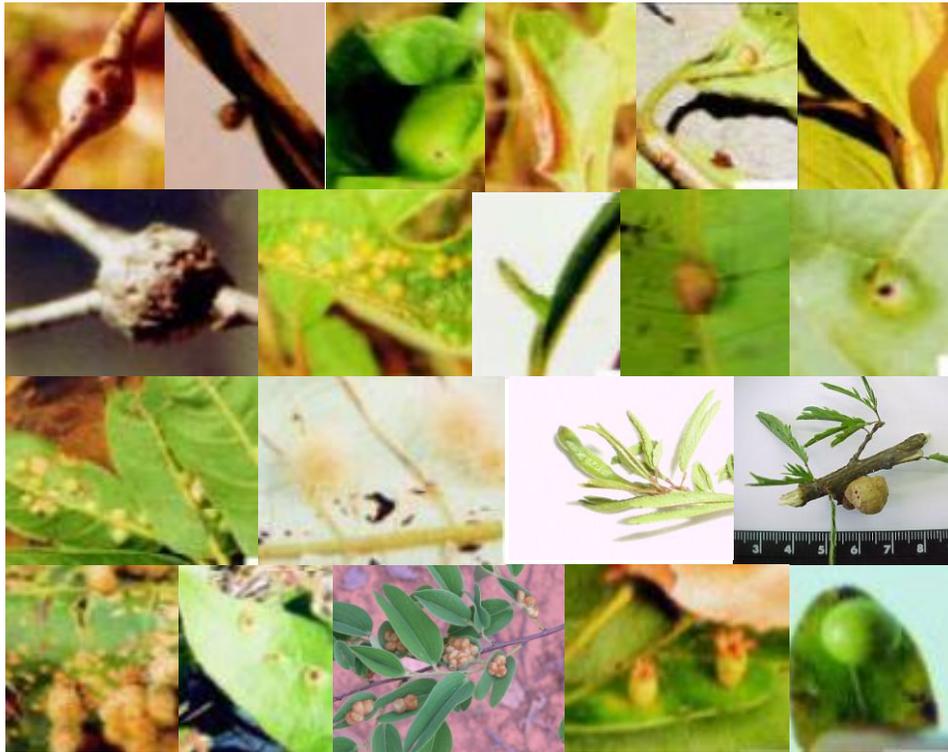


Figura 1 – Diversidade de galhas em espécies vegetais encontradas em Minas Gerais (Fonte: Acervo Pessoal; MAIA e FERNANDES, 2004).

1.5 Alterações do Metabolismo Primário e Secundário providas da cecidogênese

Analogamente à modificação estrutural, a indução da galha resulta em uma série de alterações químicas relacionadas às drásticas transformações metabólicas necessárias ao desenvolvimento e manutenção deste crescimento atípico (HARTLEY, 1998; ALLISON e SCHULTZ, 2005). Se, por um lado, as alterações anatômicas decorrentes do processo são bem evidentes, por outro as alterações metabólicas são mais difíceis de serem observadas. É importante ressaltar que as alterações metabólicas ocorrem tanto ao nível de metabolismo primário quanto secundário.

Segundo Hermes e Mattson (1992) devido à competição por cadeia carbônica, o investimento do vegetal na síntese de compostos secundários pode levar à diminuição na produção de metabólitos primários e, por consequência, no crescimento do vegetal.

As alterações químicas oriundas da cecidogênese têm sido registradas em vários estudos, e em algumas galhas tem-se observado a influência dos insetos indutores no metabolismo de fenóis e proteínas (ARDUIN, KRAUS e VENTURELLI, 1991; HARTLEY, 1998; SHÖNROGGE, HARPER e LICHTENSTEIN, 2000; SOARES *et al.*, 2000). Os derivados fenólicos compreendem uma das principais classes de metabólitos associados às galhas, merecendo destaque entre eles, os flavonóides e os taninos hidrolisáveis. A produção de substâncias fenólicas é tida como um mecanismo de defesa contra a herbivoria (MANI, 1964; PRICE, FERNANDES e WARRING, 1987; HARBORNE, 1994), muito embora, alguns autores postulem que herbívoros possam utilizar esses e outros metabólitos secundários para deterem seus próprios predadores (BJÖRKMAN, 2000; CORNELISSEN e FERNANDES, 2001). Mais recentemente, foi sugerido que a produção de derivados fenólicos, em especial a de flavonóides, pode constituir uma defesa contra o estresse oxidativo e não uma reação direta contra o galhador (SOARES *et al.*, 2000). A contradição aparente, encontrada nos diversos trabalhos, em relação à alteração provocada pelo fator biótico sobre o acúmulo de metabólitos secundários pelo vegetal, pode estar vinculada a não consideração da influência dos fatores abióticos sobre o metabolismo vegetal nestes diversos trabalhos. Dessa maneira, as alterações observadas por estes autores podem estar primeiramente associadas a estresses ambientais (U.V., temperatura, precipitação pluviométrica, etc.) e não diretamente a interação inseto-planta.

Assim, merece destaque a capacidade dos metabólitos secundários em limitar a colonização e a alimentação da maioria dos fitófagos que ocorrem no ambiente (PANDA e KHUSH, 1995). Por outro lado, os metabólitos secundários não atuam somente em estratégias de defesa, podendo desempenhar diferentes funções nas diversas interações inseto/planta, agindo também como sinalizadores químicos na polinização e na dispersão de frutos e sementes (ROSENTHAL e BERENBAUN, 1991). Apoiado neste enfoque de ataque/defesa, alguns trabalhos mostram que em diversos herbívoros foram selecionadas uma série de estratégias que evitam ou mesmo inibam a

ação nociva dos metabólitos secundários (HERMS e MATTSON, 1992; HARBONE, 1994; KARBAN e BALDWIN, 1997).

Nas células de galhas induzidas por *Agrobacterium tumefaciens* em *Arabidopsis thaliana* foi registrado um aumento nas taxas de transcrição e tradução, indicando uma elevada atividade metabólica nestes tecidos (DEEKEN *et al.*, 2006). Registros similares foram encontrados em galhas entomógenas, onde as células próximas à câmara larvar apresentaram citoplasma mais denso do que as demais, mostrando-se ricas em ribossomos, além de proteínas, lipídeos e amido (ISAÍAS, 1998; SOARES *et al.*, 2000). Adicionalmente, tem-se registrado o catabolismo de amido nas camadas teciduais internas de galhas entomógenas, com a formação de um gradiente quantitativo decrescente das camadas teciduais internas em relação às externas da galha (BRONNER, 1992). Em relação aos carboidratos solúveis, alguns estudos têm relatado uma maior concentração em tecidos galhados do que em folhas sadias (HARTLEY, 1998; MOTTA *et al.*, 2005). Tal entendimento é corroborado pelos estudos de Schönrogge, Harper e Lichtenstein (2000), nos quais as galhas diferiram quantitativamente e qualitativamente do tecido sadio em relação a seu perfil protéico, e apresentaram algumas proteínas específicas da galha possivelmente relacionadas a seu desenvolvimento e manutenção. Interessantemente, foi constatada também uma diferença quanto às proteínas detectadas nas camadas teciduais internas (células nutritivas) e externas (células epidérmicas e parenquimáticas) constituintes da galha. Recentemente, foi demonstrado um aumento na atividade enzimática da peroxidase e da invertase nos tecidos da galha, relacionadas respectivamente à síntese de polifenóis e a força de dreno deste tecido (REHILL e SCHULTZ, 2003; ALLISON e SCHULTZ, 2005).

Nesse contexto, o estudo associado das alterações estruturais e metabólicas pode contribuir para o conhecimento mais profundo das relações entre os insetos indutores de galhas e suas plantas hospedeiras (MANI, 1964). Devido à especificidade desta interação, galhas expressando morfotipos distintos em um mesmo hospedeiro podem funcionar como modelo de estudo para verificar o controle diferencial dos parasitos galhadores sobre as potencialidades das células vegetais (MOURA, 2003).

1.6 Apirase em plantas

As apirases, também chamadas de ATP difosfohidrolases, NTPases ou CD39, encontradas em plantas, invertebrados, mamíferos, parasitas, bactérias e fungos, são enzimas que hidrolisam nucleosídeos di- e trifosfatados aos mononucleotídeos correspondentes, sob a ativação de cátions bivalentes, sendo insensíveis ao ortovanadato, um inibidor comumente usado para ATPases de transporte (PLESNER, 1995; VASCONCELOS *et al.*, 1996; ROUX e STEINEBRUNNER, 2007). As apirases podem conter diferentes níveis de glicosilação, podendo tal característica estar associada à regulação de sua atividade enzimática (CHRISTOFORIDIS, PAPAMARCAKI e TSOLAS, 1996; SMITH e KIRLEY, 1999; ZHONG *et al.*, 2001).

Uma das primeiras proteínas desta família a ser purificada foi a apirase de batata, *Solanum tuberosum* (TRAVERSO-CORI, CHAIRMOVICH e CORI, 1965). Nas diversas variedades de *S. tuberosum* (var. Ultimus, Desirée ou Pimpernel) existem diferentes isoformas de apirases, que divergem na razão de atividade ATPásica/ADPásica, na ativação por íons metálicos bivalentes e em suas localizações sub-celulares (KETTLUN *et al.*, 1992a,b). A apirase de *S. tuberosum* não é altamente glicosilada, sendo evidenciada em sua estrutura a existência de apenas dois sítios potenciais de N-glicosilação (HANDA e GUIDOTTI, 1996). O papel fisiológico da apirase de *S. tuberosum* está relacionado principalmente à hidrólise de nucleosídeos difosfatados produzidos durante os diferentes passos de síntese de amido. Em plantas, tanto a síntese de sacarose como a de amido envolve reações reversíveis liberando UDP ou ADP como produtos, que inibem as reações das glicosiltransferases. A apirase, aparentemente, ativa tais reações pela remoção destes produtos inibitórios (FANTA *et al.*, 1988; ANICH *et al.*, 1990). Recentemente, três isoformas foram identificadas em *S. tuberosum*, e associadas à regulação da síntese de parede celular e amido (RIEWE *et al.* 2008).

Apirases foram também isoladas em grão de bico (*Cicer arietinum*) (VARA e SERRANO, 1981), caule de ervilha (*Pisum sativum*) (TOGNOLI e MARRÉ, 1981), raiz de ervilha (*Dolichos biflorus*) (ETZLER *et al.*, 1999), semente de soja (*Glycine max*) (DAY *et al.*, 2000) e em uma erva forrageira considerada modelo para estudo em Leguminosas (*Medicago truncatula*) (COHN *et al.*, 2001). Em ervilha, esta enzima relacionada inicialmente às respostas ao fitocromo (CHEN e ROUX, 1986; CHEN, DATTA e ROUX, 1987), mostrou-se também envolvida na recuperação de fosfato da matriz extracelular (THOMAS *et al.*, 1999). A apirase purificada de raiz do legume *Dolichos biflorus*, chamada de lectina nucleotídeo fosfohidrolase (LNP), foi relacionada aos sinais de nodulação produzidos pela bactéria *Bradyrhizobium spp.* (ETZLER *et al.*, 1999; COHN, DAY e STACEY, 1998). A apirase (LNP) de *D. biflorus* foi localizada por imunofluorescência na superfície da raiz, o sítio primário de infecção rhizobial, apresentando exacerbação em sua atividade ATPásica (ETZLER *et al.*, 1999). Em soja, foram caracterizadas duas apirases associadas à membrana plasmática, sendo a transcrição de uma delas ativada por *Rhizobium sp.* (DAY *et al.*, 2000).

1.7 Galhas em *Calliandra brevipes* Benth

Segundo MANI (1964), as plantas hospedeiras de galhas pertencem a praticamente todos os ramos do Reino Vegetal, sendo que 98% das plantas galhadas estudadas são angiospermas. Fabaceae é de grande interesse, por ter o maior número de infestações por galhas na América do Sul, África e Índia (MANI, 1964; MEYER, 1987). Também denominadas de leguminosas, as Fabaceae constituem a segunda família vegetal mais importante do ponto de vista do uso econômico de suas espécies, sendo superada apenas pelas gramíneas (Poaceae). Inúmeras espécies leguminosas são utilizadas na alimentação humana e animal (*Arachis hypogaea* – amendoim, *Glycine max* – soja, *Medicago sativa* - alfafa, *Phaseolus vulgaris* – feijão) e muitas delas constituem a base alimentar de milhões de pessoas em diversas partes do mundo.

Vários gêneros possuem espécies medicinais (*Bauhinia* sp.), ou tóxicas (*Astragalus* sp.) e dentre elas, várias são fontes de matéria-prima utilizada industrialmente, tais como *Acacia* sp., *Hymenaea* sp. e *Indigofera* sp.. Espécies deste último gênero são produtoras de um pigmento azul índigo muito usado pela indústria têxtil (MABBERLEY, 1997; JUDD *et al.*, 1999).

Calliandra brevipes Benth (Figura 2) é uma espécie vegetal nativa do Brasil pertencente à Fabaceae e amplamente utilizada para fins ornamentais. Esta espécie é um arbusto lenhoso muito ramificado, variando geralmente de 1 a 2 metros de altura, que possui flores pequenas, numerosas, reunidas em inflorescências capituliformes, das quais se destacam os estames longos e coloridos (cor de rosa e brancos) (LORENZI e SOUSA, 1995). O perfil químico de Fabaceae é caracterizado, em ordem de importância, pela ocorrência de derivados da via do chiquimato (derivados fenólicos), mevalonato (principalmente triterpenóides e esteróides) e acetato (alcalóides pirrolizidínicos, ácidos aminados não protéicos), incluindo metabólitos de via metabólica mista (chiquimato/acetato, chiquimato/acetato/mevalonato) (HARBORNE, 1971). Dentre esses derivados de via mista destacam-se os flavonóides, cuja diversidade entre as Fabaceae é provavelmente a maior observada entre todas as linhagens vegetais (BARREIROS e DAN, 1990; SOARES, 1996). Nas espécies desse grupo são encontrados todos os tipos estruturais flavonoídicos, mas merece destaque a grande ocorrência dos isoflavonóides (isoflavonas, pterocarpanos etc) e neoflavonóides, esses últimos virtualmente exclusivos das Fabaceae (HARBORNE, 1971). É importante salientar que espécies do gênero *Calliandra* são produtoras de saponinas (NAKAMURA, TAKEDA e OGIHARA, 1994) e que alguns desses derivados terpenoídicos são citados como potentes moluscidas (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995).

No Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora foi detectada em *Calliandra brevipes* a presença de dois tipos de galhas entomógenas, induzidas por duas espécies distintas do gênero *Tanaostigmodes*: *T. ringueleti* e *T. mecanga* (PENTEADO-DIAS e CARVALHO, 2008). Segundo Carvalho, Isaías e Soares (2005), a leguminosa *C. brevipes* apresenta dois morfotipos de galhas, uma de origem caulinar (prevalente), denominada globosa e outra provavelmente de origem foliar, designada fusiforme

(Figura 2). Caracteristicamente a forma globosa é sésil e arredondada, apresenta vários indutores em uma mesma galha (politálama), ao passo que a fusiforme possui um pedúnculo comprido e estreito, semelhante morfológicamente ao pecíolo das folhas, o qual é ligado aos ramos jovens, sendo o terço final alargado; no seu interior é encontrado apenas um indutor (monotálama). Comparados aos tecidos sadios, os dois tipos de galhas exibem feixes vasculares desorganizados, hiperplasia e hipertrofia das células parenquimáticas, além da formação de um esclerênquima conspícuo, que na galha fusiforme envolve o parênquima adjacente à câmara, sendo formado por braquiesclereides de paredes espessadas e conteúdo citoplasmático evidente. O tecido nutritivo típico de himenopterocecídeos, rico em substâncias lipídicas, mostrou-se presente em ambas às galhas.

Segundo idéias clássicas da cecidiologia, galhas causadas por indutores pertencentes a diferentes táxons apresentam diferentes padrões de desenvolvimento, enquanto que galhas induzidas por um mesmo táxon em um hospedeiro determinado apresentam, via de regra, um tipo morfológico bem determinado (MANI, 1964; MEYER, 1987; REDFERN e ASKEW, 1992). Neste caso, apesar das galhas ocorrentes na planta hospedeira serem induzidas por galhadores pertencentes a um mesmo gênero, elas apresentam características morfológicas diferentes.

Acompanhando o padrão descrito para galhas de himenópteros por REDFERN e ASKEW (1992), a análise histoquímica da galha globosa de *C. brevipes* revelou a presença de amido distribuído de maneira decrescente do córtex para o tecido nutritivo da câmara larval (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005). Por outro lado, gotículas lipídicas foram detectadas pela reação com o *Sudan Red B* muito freqüentemente nas células adjacentes as câmaras larvais em ambas as galhas, porém mais nitidamente nas amostras de galha globosa. Pelo conteúdo lipídico, essa porção parenquimática das galhas, próxima à câmara larvar, pode ser caracterizada como o tecido nutritivo. É importante salientar que o parênquima medular das amostras de caule sadio apresentou reação negativa para o *Sudan red B*; e nas folhas sadias, a reação para substâncias lipídicas foi positiva apenas para a cutícula (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005).



Figura 2 - *Calliandra brevipes* Benth no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, (A) Galha fusiforme; (B) Galha globosa. (Material depositado sob a forma de excicata nº 31454 no herbário CESJ da referida universidade (Fonte: Acervo Pessoal)

As galhas podem drenar diferencialmente o aporte nutritivo recebido, o que pode explicar a grande quantidade de lipídeos na galha globosa, sendo que sua localização favorece esse dreno energético. Estando a galha globosa situada no ramo caulinar, este morfotipo de galha receberia todo o aporte energético sintetizado nas folhas e que teoricamente seria translocado para todo o corpo vegetativo. No período de intenso suprimento de nutrientes, a galha globosa pode estar convertendo o amido (que acumula nos estágios finais de desenvolvimento) em lipídeos. Sob tal aspecto, o tecido nutritivo de ambas as galhas, e principalmente da galha globosa, pode ter elevados níveis enzimáticos responsáveis pelo acúmulo temporário de amido e/ou capazes de

executar a conversão do amido em substâncias lipídicas. Toda essa gama de transformações bioquímicas provavelmente envolve etapas que permitem uma grande troca de informações recíprocas do sistema galhador/planta (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005).

Assim, as galhas de *C. brevipes* apresentam tipos morfológicos bem distintos associados a impactos anatômicos e histoquímicos semelhantes (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005; PENTEADO-DIAS e CARVALHO, 2008). Há indícios da participação tanto da planta hospedeira como do galhador no processo de cecidogênese, sugerindo que a formação do tecido da galha não é apenas resultado do fenótipo estendido do galhador (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005). Devido à grande especificidade da interação entre o inseto indutor da galha e a planta, as galhas induzidas por diferentes espécies de himenópteros co-habitando *C. brevipes* podem funcionar como modelo para estudar o controle diferencial do galhador sobre as células do hospedeiro (MOURA, 2003). Foi então de interesse desse trabalho analisar as diferenças do conteúdo de fenóis, proteínas e carboidratos em amostras de tecido sadio e galhado de *C. brevipes*. Além disso, foi também explorada a atividade fosfolitolítica nestes tecidos e, em particular, a atividade apirásica, devido à associação desta enzima com a síntese de amido e de parede celular em plantas e com os sinais de nodulação em diferentes espécies vegetais, nos levando a conhecer alguns aspectos metabólicos de ambas as galhas nunca antes explorados.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL:

2.1.1 Analisar os aspectos metabólicos em um novo modelo vegetal co-habitado por distintos himenópteros galhadores.

2.2 ESPECÍFICOS:

2.2.1 Relacionar o teor fenólico nos tecidos galhados e não-galhados de *Calliandra brevipes* com a variação de fatores abióticos (temperatura e precipitação pluviométrica) durante 12 meses;

2.2.2 Analisar as alterações no perfil fitoquímico, no conteúdo de fenóis, flavonóides e na atividade antioxidante induzidas por diferentes himenópteros galhadores em *C. brevipes*;

2.2.3 Analisar as alterações relacionadas ao conteúdo de glicose, frutose e sacarose induzidas por diferentes himenópteros galhadores em *C. brevipes*;

2.2.4 Analisar as alterações relacionadas ao conteúdo e perfil protéicos induzidas por diferentes himenópteros galhadores em *C. brevipes*;

2.2.5 Caracterizar atividade fosfohidrolítica em caule e galha globosa de *C. brevipes*;

2.2.6 Caracterizar a atividade apirásica em caule sadio e galha globosa de *C. brevipes*;

2.2.7 Observar, através de “Western blots”, se existe imunoreatividade cruzada entre anticorpos anti-apirase de batata e os tecidos caulinar e de galha globosa de *C. brevipes*;

2.2.8 Localizar por imunocitoquímica e microscopia de imunofluorescência a apirase em galha globosa de *C. brevipes*;

2.2.9 Detectar a atividade apirásica *in situ* através de técnicas citoquímicas e de microscopia óptica

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Sephadex-G-100, Sephadex-G-50, Kit-ECL, filmes para autoradiografia, membranas de nitrocelulose e marcadores de peso molecular foram obtidos da Invitrogen e Amersham-Biosciences. Nucleotídeos, p-NPP, EDTA, EGTA, leupeptina, pepstatina, inibidor de tripsina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), carboximetil celulose (CM), azida sódica, N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCCD), bafilomicina e ortovanadato de sódio foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). Todos os demais reagentes utilizados também foram da mais alta qualidade analítica.

Apirase pura de batata (*Solanum tuberosum*) foi no Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas (Departamento de Bioquímica/UFJF) de acordo com método previamente descrito, mediante precipitação por sulfato de amônio, colunas de gel filtração (Sephadex-G-100 e Sephadex-G-50) e coluna de troca iônica (carboximetil celulose; TRAVERSO-CORI, CHAIRMOVICH e CORI, 1965; KETTLUN *et al.*, 1982). A apirase pura de batata (*S. tuberosum*) foi usada para a produção de anticorpos anti-apirase de batata em coelhos brancos (Nova Zelândia), usando-se 3 inóculos de 100 µg de apirase de batata, com intervalos de 15 dias, sendo o primeiro inóculo associado a Adjuvante de Freund completo e os outros dois com Adjuvante de Freund incompleto.

3.2. Obtenção das amostras de *Calliandra brevipes*

Amostras de *C. brevipes* foram coletadas no *campus* da Universidade Federal de Juiz de Fora, localizado no sudeste do Estado de Minas Gerais (21°41'S e 43°20'W), Brasil. Em campo, os espécimes foram divididos em 3 grupos e em cada grupo foram selecionados e marcados 10 indivíduos para serem amostrados. Uma exsicata de referência da espécie em estudo foi depositada no Herbário da UFJF (CESJ) sob nº 31454. Caule e folhas não galhados, bem como galhas fusiformes e globosas maduras (comprimento e diâmetro maior que 1 cm, respectivamente) foram cuidadosamente removidos dos indivíduos marcados de *C. brevipes* e lavados com água destilada, sendo posteriormente processados no Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas (Departamento de Bioquímica/UFJF) de acordo com a análise a ser realizada.

3.3. Análise de fitocompostos, atividade antioxidante e carboidratos em extratos etanólicos de *C.brevipes*

A avaliação da variação sazonal do conteúdo fenólico foi investigada no período de agosto de 2003 a agosto de 2004. Após a coleta, 1 g de cada amostra vegetal foi triturado e submetido à extração com 20 ml de etanol-água (1:1 v/v) à 60°C por 1 h. No extrato etanólico obtido foi medido o conteúdo de fenóis totais pelo Método de Folin-Dennis (WATERMAN e MOLE, 1994), usando ácido tânico como padrão. O conteúdo

de fenóis totais, obtido de 3 experimentos diferentes feitos em triplicatas, foi expresso em mg equivalente de ácido tânico (EAT)/g de tecido fresco. Os dados de precipitação e temperatura do período em estudo foram obtidos na estação de meteorologia do Departamento de Geociências da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em abril de 2008 foi realizada nova coleta de amostras de caule e folhas não galhados e de galhas globosa e fusiforme, sendo realizado novamente extratos etanólicos destes materiais vegetais como supracitado. Nestes extratos, foi realizada a detecção de compostos secundários e carboidratos redutores, bem como uma nova dosagem de fenóis totais, flavonóides e determinação de atividade antioxidante. Para o perfil fitoquímico foi utilizado o protocolo descrito por Matos (1997). O conteúdo de fenóis totais foi medido como descrito anteriormente e o conteúdo de flavonóides foi determinado como descrito por Miliauskas *et al.* (2004), e expresso em mg equivalente de rutina (ER)/g tecido fresco. Os dados foram obtidos de 5 experimentos diferentes feitos em triplicatas.

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos foi determinada com base na habilidade de reação com o radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) (GOVIDARAJAN *et al.*, 2003). A atividade antioxidante das amostras foi expressa como IC₅₀ (Concentração Inibitória), o qual é definido como a concentração (µg/ml) da amostra requerida para inibir a formação de radicais DPPH em 50%. Os dados foram obtidos de 5 experimentos diferentes realizados em triplicatas.

A análise de carboidratos foi realizada mediante de cromatografia em papel, na qual uma alíquota (20 µl) de cada extrato etanólico obtido de caule e folha não galhados, ou de galhas fusiforme e globosa, foi aplicado em papel Whatman nº 1, utilizando acetato de etila:2-propanol:H₂O (5:2:1, v/v) por 24 horas. Os carboidratos foram revelados pela reação alcalina com nitrato de prata (TREVELYAN, PROCTER e HARRISON, 1950), e quantificadas por densitometria pelo *Quick Scan 2000* (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA). A densitometria foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.4. Análise Quantitativa e Qualitativa de Proteínas

A coleta do material para a análise do conteúdo protéico das amostras de caule e folhas sadios e das galhas globosa e fusiforme foi realizada em abril de 2008. Para a análise de proteínas, após a coleta, as galhas foram dissecadas para remoção das larvas, pupas e insetos. Em seguida, as amostras foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas, utilizando-se de gral e pistilo. O pulverizado foi homogeneizado em 5 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 8 % de sacarose com leupeptina (0,5 µg/l), pepstatina (0,07 µg/l), inibidor de tripsina (50 µg/l) e PMSF (2 µg/l), com subsequente centrifugação a 2500 rpm usando centrífuga clínica. O sobrenadante obtido foi então estocado a -20° C até o momento do uso. O conteúdo protéico das amostras foi medido mediante do método de Bradford (1976). Os dados foram obtidos de 3 experimentos diferentes realizados em triplicatas.

Para a análise qualitativa, as amostras proteicas foram precipitadas com ácido tricloroacético 10% e lavadas por centrifugação com água destilada. As proteínas precipitadas foram ressuspendidas com o mesmo tampão de sacarose utilizado anteriormente, e submetidas a uma nova dosagem protéica. Em seguida, 100 µg de proteínas de cada amostra de *C. brevipes* e uma alíquota de 5 µg de apirase de batata foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % com 0,1 % de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o método descrito por Laemmli (1970) usando-se uma cuba de eletroforese *Mini-Protean III Cell* (BIORAD). Marcadores de peso molecular foram também aplicados. Subseqüentemente, as bandas protéicas foram coradas pelo *Coomassie blue R*, analisadas e posteriormente coradas pelo Método da Prata (HARLOW e LANE, 1988). Uma análise densitométrica foi efetuada no gel corado pelo *Coomassie-blue*, utilizando-se o software *Image Quant TL* (Amersham Biosciences).

3.5. Determinação da atividade fosfohidrolítica e caracterização de atividade apirásica em *C. brevipes*

Para análise da atividade fosfohidrolítica foram usadas as amostras de tecidos sadios e galhados de *C. brevipes* coletados em abril de 2007. Para os experimentos foi usado um meio de reação padrão contendo succinato de potássio 50 mM, pH 6,5, CaCl_2 5 mM e 0,01 mg de proteína/ml, conforme descrito por Ketlun *et al.* (1992a). O ensaio hidrolítico foi iniciado pela adição de substrato (ATP, ADP, UDP, GTP ou GDP; 4 mM), sendo incubado por 45 min à 37°C. A reação foi interrompida pela adição de HCl 0,1 N, sendo a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada medida espectrofotometricamente de acordo com Taussky e Schorr (1953). Para observar a contribuição de diferentes enzimas na quantidade de Pi liberado, ensaios foram também realizados na presença de 4 mM de AMP, pirofosfato de sódio ou p-nitrofenilfosfato. Os efeitos de inibidores específicos para outras ATPases, como o ortovanadato de sódio (100 μM), bafilomicina A (5 μM), N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCCD; 100 μM) e azida sódica (1 mM), foram também testados. Adicionalmente, a atividade ATPásica foi testada na presença e na ausência de 2,5% de DMSO, o solvente usado para solubilizar o DCCD, e nenhuma alteração pôde ser observada. Os dados foram obtidos de 5 experimentos diferentes realizados em triplicatas.

3.5.1 Dependência da atividade fosfohidrolítica a íons bivalentes

Com intuito de verificar a dependência da atividade fosfohidrolítica a íons bivalentes, as atividades UTPásica e ADPásica foram medidas no mesmo tampão succinato de potássio, pH 6,5, na presença de Ca^{2+} (5mM), Mg^{2+} (5mM), EDTA (5 mM, quelante de Mg^{2+}) e EGTA (5mM, quelante de Ca^{2+}), sob as mesmas condições experimentais descritas acima. Os dados foram obtidos de 5 experimentos diferentes realizados em triplicatas.

3.5.2 Detecção de apirase por “Western Blots”

Visando confirmar a presença de apirase nos tecidos de *C. brevipes*, procedeu-se a realização de “Western blots”. Para a realização da eletroforese, alíquotas contendo 100 μg de proteínas de cada amostra biológica (galha, caule saudável, larva/pulpa, inseto), e 1 μg de apirase purificada de batata (controle positivo) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10 % com 0,1 % de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o método descrito por Laemmli (1970) usando-se uma cuba de eletroforese *Mini-Protean III Cell* (BIORAD). Marcadores de peso molecular pré-corados foram também aplicados.

Em seguida, as proteínas do gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (com poros de 1,45 μm). Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, esta foi cuidadosamente retirada da câmara e mergulhada em tampão PBS suplementada com 3% de caseína, mais 0,1% de Tween-20, durante 2 horas, para bloqueio. A membrana de nitrocelulose foi cortada e as tiras foram incubadas por 12 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação (Mesa agitadora TE141/Tecnal) com soro de coelho diluído 1:2000 no mesmo tampão de bloqueio, sem o Tween-20. As membranas foram então lavadas em 3 etapas de 10 minutos cada, com tampão PBS mais 0,1% Tween-20 e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho acoplados à peroxidase. As membranas foram novamente lavadas, e para a

revelação foi utilizado o Luminol como substrato e filmes de raio-X GBR para autoradiografia (Kodak), de acordo com as instruções do fabricante (kit ECL/Amersham Pharmacia, UK).

3.5.3. Detecção de apirase por microscopia de imunofluorescência

Para a detecção de apirase por imunocitoquímica, caule saudável e galha globosa foram congelados em *Tissue-Tek OCT* por imersão em nitrogênio líquido, sendo posteriormente realizado o corte do material em criostato. Os cortes (10 μm) foram aderidos a lâminas de vidro previamente tratadas com polilisina L e fixados em acetona por 30 min a -20°C . Após secagem, os cortes foram bloqueados por incubação em PBS contendo 2 % de caseína, 2,5 % de soro albumina bovina e 8 % soro fetal por 45 min à temperatura ambiente, e em seguida o material foi lavado três vezes com PBS. Os cortes foram incubados durante 12 h à 4°C com anticorpos anti-apirase contidos em soro de coelho diluído 1:2000 em PBS. As lâminas foram lavadas duas vezes por 15 min sob agitação, em PBS e incubadas por 60 min à 37°C com anticorpos anti-IgG de coelho conjugados ao TRITC, diluído 1:800 em PBS. Como controle, os cortes foram incubados somente com o anticorpo secundário. Para análise, foi usado um microscópio de imunofluorescência (Olympus BX-50).

3.5.4 Detecção de atividade ADPásica *in situ*

Para a detecção de apirase por imunocitoquímica, caule sadio e tecido galhado foram congelados em *Tissue-Tek OCT* por imersão em nitrogênio líquido, sendo posteriormente realizado o corte do material em criostato. Os cortes (10 μm) foram aderidos a lâminas de vidro previamente tratadas com polilisina L e fixados em acetona por 30min à -20°C . Após secagem, os cortes foram incubados em meio de reação para atividade enzimática, contendo 50 mM de succinato de potássio, pH 6,5, 5 mM de CaCl_2 , 2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, suplementado com inibidores de ATPases (ortovanadato; 100 μM), fosfatases (levamisole; 1 mM) e nucleotidase (molibdato de amônio; 100 μM), e 3 mM de ADP por 1 h à 37°C . A especificidade da reação foi observada comparando-se o teste a uma lâmina controle feita sem a adição do substrato. As lâminas foram observadas em um microscópio óptico e fotografadas.

3.6 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos foram analisados usando A-NOVA para determinar a diferença entre os grupos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Para estas análises estatísticas foi utilizado o *GraphPad Prism Software* (version 4).

4. RESULTADOS

4.1. Variação sazonal do conteúdo fenólico de amostras de tecidos galhados e não galhados de *C. brevipes*

Os níveis fenólicos foram medidos bimestralmente de agosto de 2003 a agosto de 2004 em amostras de caule (CS) e folha (FS) não galhados, e comparados aos encontrados em amostras de galhas globosa (GG) e fusiforme (GF) de *C. brevipes*. No período analisado, a temperatura na região não variou excessivamente (15,9 a 21,2° C), sendo a mínima registrada em agosto de 2003, e a máxima em dezembro de 2003 (Figura 3C). Por outro lado, a região foi afetada por diferentes níveis de precipitação pluviométrica. A precipitação aumentou de agosto de 2003 a fevereiro de 2004, concomitante a um leve aumento na temperatura (Figura 3C). Após este período, a precipitação pluviométrica reduziu progressivamente, e em agosto de 2004 foi registrado o nível mais baixo (Figura 3C).

No período analisado, os níveis fenólicos da folha não galhada (FS) foram significativamente ($P < 0,05$) maiores que aqueles encontrados no caule não galhado (CS) de agosto de 2003 a abril de 2004, e somente em junho de 2004, os níveis fenólicos entre estas amostras foram similares (Figura 3A). Após este período, os níveis fenólicos aumentaram em ambas as amostras, e uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre elas pode ser novamente observada em agosto de 2004 (Figura 3A).

Por outro lado, os níveis fenólicos reduziram significativamente ($P < 0,05$) nos dois tecidos não galhados (caule e folhas) entre fevereiro e abril de 2004 (Figura 3A), concomitante com a redução da precipitação pluviométrica (Figura 3C; 386,5 a 199,7 mm). É interessante observar que com a contínua redução dos níveis de precipitação, os níveis fenólicos aumentaram novamente (Figura 3; 25 a 2 mm).

Mudanças sazonais dos níveis fenólicos nas amostras de tecidos de ambas as galhas foram também analisadas. Estatisticamente, o nível fenólico nos tecidos galhados (GG e GF) foi similar ao encontrado no caule não galhado (CS) durante todo o período analisado, exceto em abril de 2004 quando ocorreu redução drástica dos níveis fenólicos na amostra de tecido caulinar não galhado (Figura 3A, B).

As galhas globosa (GG) e fusiforme (GF) mantiveram entre elas níveis similares de compostos fenólicos de agosto de 2003 a fevereiro de 2004 (Figura 3B), e similares ao encontrado na amostra de caule não galhado (Figura 3A; CS). De fevereiro a abril de 2004, simultâneo à redução de precipitação pluviométrica (Figura 3C), os níveis fenólicos reduziram significativamente ($P < 0,05$) e de maneira similar entre os tecidos galhados (Figura 3B). Como destacado na Figura 4A, no mês de fevereiro de 2004 a amostra de tecido de folha não galhada (FS; $211,9 \pm 8,52$ mg TAE/g) mostrou nível significativamente ($P < 0,001$) superior quando comparado ao encontrado na amostra de tecidos caulinar não galhado (CS; $111,9 \pm 5,32$ mg TAE/g). Nesta análise, os níveis fenólicos de amostras de tecidos de caule não galhado, galha globosa (GG; $152,4 \pm 10,65$ mg TAE/g; $P < 0,05$) e galha fusiforme (GF; $142,9 \pm 17,04$ mg TAE/g) foram similares estatisticamente (Figura 4A). No mês de abril de 2004 (Fig. 4B) a amostra de tecido de folha não galhada (FS; $95,24 \pm 8,52$ mg TAE/g) mostrou nível significativamente maior quando comparado ao encontrado na amostra de tecidos caulinar não galhado (CS; $19,05 \pm 2,13$ mg TAE/g; $P < 0,001$) e de galha globosa (GG; $76,19 \pm 4,26$ mg TAE/g; $P < 0,05$), e similar ao encontrado na galha fusiforme (GF; $80,95 \pm 2,13$ mg TAE/g). Neste mês, os níveis fenólicos das amostras de tecidos de galhas globosa e fusiforme estavam similares entre eles, e significativamente ($P < 0,05$) maiores que aqueles encontrados no tecido caulinar não galhado (Figura 4B). Quando os níveis fenólicos das amostras coletadas no mês de fevereiro foram comparados aos encontrados nas respectivas amostras coletadas no mês de abril, observou-se redução significativa ($P < 0,001$) em todas elas.

Após esse período, na presença de contínua redução da precipitação pluviométrica, os níveis fenólicos dos tecidos galhados (CS e FS) aumentaram novamente, sendo detectado o seu nível máximo em agosto de 2004 (Figura 3B).

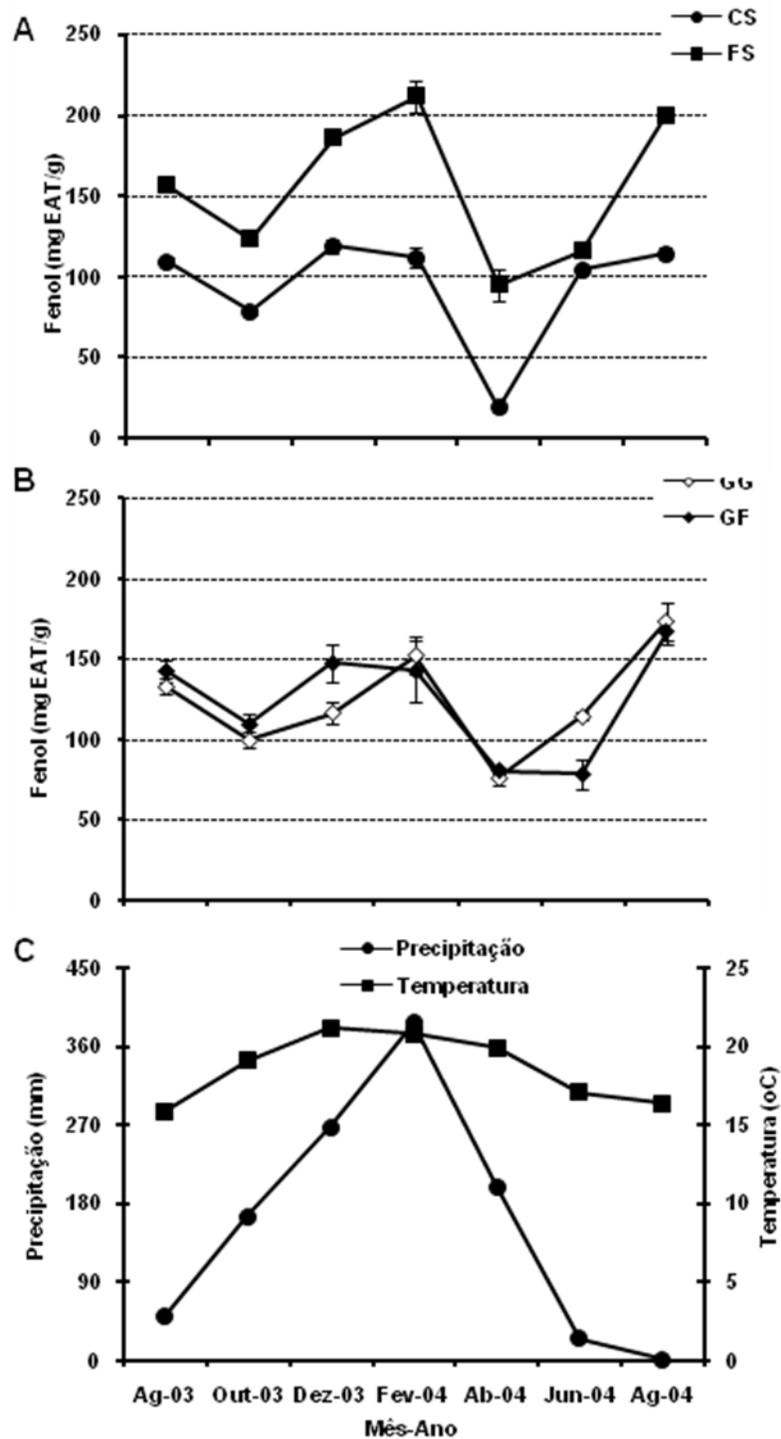


Figura 3 – Variação sazonal (C) e conteúdo fenólico em tecidos não galhados (A) e galhados (B) de *C. brevipes*. A concentração de fenólicos foi medida em caule (CS) e folha (FS) não galhados, e em tecidos de galha globosa (GG) e fusiforme (GF), usando o método de Folin-Dennis. Os resultados foram expressos como mg EAT/g, sendo a média de 3 experimentos diferentes feitos em triplicatas. As diferenças significativas descritas foram determinadas por ANOVA.

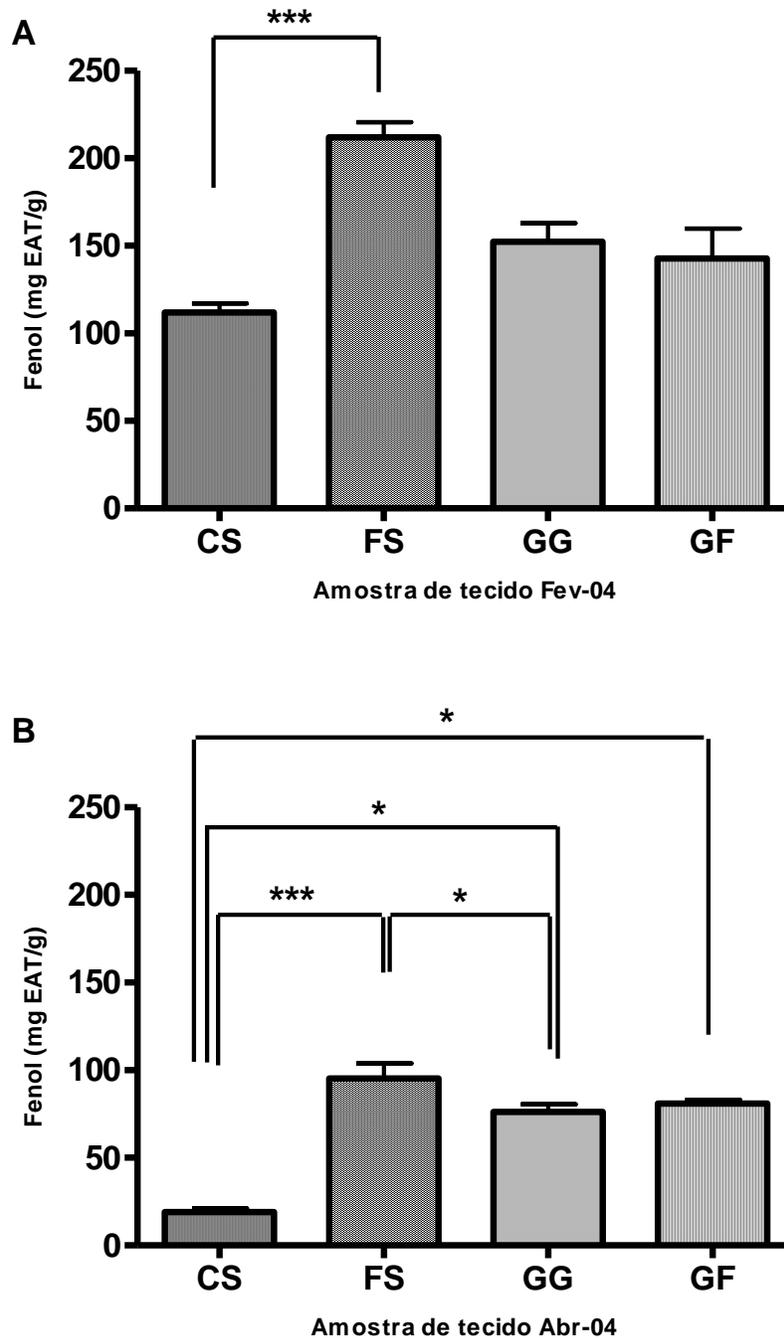


Figura 4 – Conteúdo fenólico de amostras de tecidos não galhados e galhados de *C. brevipes* coletados em fevereiro (A) e abril (B) de 2004. A concentração de fenólicos foi medida em amostras de tecidos de caule (CS) ou folha (FS) não galhados, e das galhas globosa (GG) e fusiforme (GF), usando o método de Folin-Dennis. A concentração de fenólicos de cada amostra foi medida em 3 experimentos diferentes, feitos em triplicatas, e os resultados foram expressos como mg EAT/g. Os valores de P são $< 0.05^*$ e 0.001^{***} , determinados por A-NOVA.

4.2. Análise do conteúdo fenólico e triagem fitoquímica em amostras de tecidos galhados e não galhados de *C. brevipes*

De acordo com a análise sazonal de fenólico foi observado que no mês de abril de 2004 a planta hospedeira da galha encontrava-se possivelmente sob menor estresse abiótico. Coincidentemente com este fator, neste período foram observadas as maiores diferenças dos níveis fenólicos entre as amostras analisadas. Naquele mês, foram registradas as médias de 19,9° C de temperatura e 199,7 mm de precipitação pluviométrica (Figura 3C).

Em abril de 2008, uma nova coleta de material foi realizada para avaliação do conteúdo fenólico e triagem fitoquímica. O nível fenólico na amostra de tecido de folha não galhada (FS; $17,78 \pm 2,16$ mg EAT/g) foi significativamente ($P < 0,001$) maior que o encontrado nas amostras de tecido caulinar não galhado (CS; $11,33 \pm 0,74$ mg EAT/g) e de galha globosa (GG; $13,52 \pm 1,29$ mg EAT/g), similar ao encontrado na amostra de galha fusiforme (Figura 5; GF; $15,69 \pm 2,33$ mg EAT/g). Os níveis fenólicos encontrados na galha globosa ($P < 0,05$) e na galha fusiforme ($P < 0,001$), os quais foram similares entre si, mostraram-se significativamente maiores que os encontrados no tecido caulinar não galhado (Figura 5). Portanto, o perfil de variação de conteúdo fenólico entre as amostras foi similar quando comparada àquela realizada em abril de 2004.

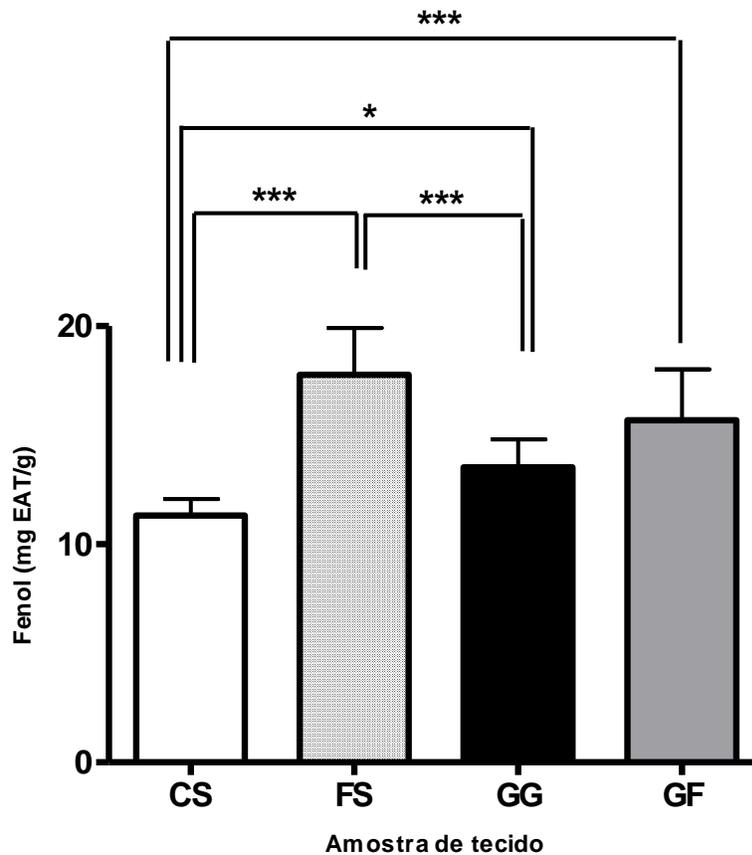


Figura 5 – Conteúdo fenólico de amostras de tecidos não galhados e galhados de *C. brevipes* em abril de 2008. A concentração de fenólicos foi medida em amostras de tecidos de caule (CS) ou folha (FS) não galhados, e das galhas globosa (GG) e fusiforme (GF), usando o método de Folin-Dennis. A concentração de fenólicos de cada amostra foi medida em 5 experimentos diferentes, feitos em triplicatas, e os resultados foram expressos como mg EAT/g. Os valores de P são < 0,05* e 0,001***, determinados por ANOVA.

Uma triagem de metabólitos secundários foi realizada, sendo detectados dentre os derivados fenólicos: cumarinas, taninos e flavonóides nas amostras de tecidos de caule (CS) e folha (FS) não galhados e de galhas globosa (GG) e fusiforme (GF). Catequinas e flavononas foram encontradas em amostras de tecido de caule não galhado (CS) e das duas galhas (GG, GF) de *Calliandra brevipes*, mas não em amostras de tecido de folha não galhada (Tabela 1).

Outros metabólitos secundários foram também avaliados, e as saponinas foram encontradas somente em amostras de tecidos de caule (CS) e folha (FS) não galhados. Esteróides foram detectados em amostras de tecidos não galhados (CS e FS) e de galha fusiforme (GF), enquanto os triterpenóides foram somente detectados em amostras de tecidos de galha globosa. Antraquinonas e alcalóides não foram detectados nas amostras de tecidos analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Metabólitos secundários detectados em extrato etanólico de *C. brevipes*. Caule Sadio (CS), Folha não galhada (FS), Galha globosa (GG), Galha fusiforme (GF).

Amostras	Metabólitos secundários ^a									
	Derivados fenólicos						Outros			
	C	Ta	F	An	Ca	Fl	Al	Tr	St	Sa
CS	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
FS	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
GG	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
GF	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-

^a Metabólitos secundários: C, Cumarinas; Ta, Taninos; F, Flavonoides; An, Antraquinonas; Ca, Catequinas; Fl, Flavononas; Al, Alcalóides; Tr, Triterpenóides; St, esteróis; Sa, Saponinas.

Os conteúdos de flavonóides, um derivado fenólico presente em todas as amostras (Tabela 1), foram diferentes entre elas (Figura 6). A amostra de tecido foliar não galhado (FS; $33,43 \pm 1,10$ mg ER/g de tecido fresco) apresentou o maior ($P < 0,001$) conteúdo em flavonóides, seguida pela amostra de tecido de galha fusiforme (GF; $26,76 \pm 0,56$ mg ER/g de tecido fresco). Estes valores foram significativamente ($P < 0,001$) maiores que aqueles encontrados em amostras de tecidos de caule não galhado (CS; $5,51 \pm 0,26$ mg ER/g de tecido fresco) e de galha globosa (GG; $1,59 \pm 0,11$ mg ER/g de tecido fresco), isto é, de 5 a 20 vezes maiores (Figura 6).

A atividade antioxidante das amostras foi também analisada, e relacionada ao conteúdo de flavonóides (Figura 6). As amostras de tecidos de folha não galhada (FS; $IC_{50} = 12,69 \pm 3,70$ μ g/ml) e de galha fusiforme (GF; $IC_{50} = 64,67 \pm 2,54$ μ g/ml) mostraram as mais altas atividades antioxidantes, significativamente ($P < 0,001$) maiores que aquelas encontradas nas outras amostras (Figura 4). As amostras de tecidos de caule não galhado (CS; $IC_{50} = 157,10 \pm 12,09$ μ g/ml) e de galha globosa (GG; $IC_{50} = 117,10 \pm 13,98$ μ g/ml) exibiram atividades antioxidantes de 2 a 10 vezes menores quando comparadas àquelas encontradas nas amostras de tecidos de folha não galhada (FS) e de galha fusiforme (Figura 6; GF).

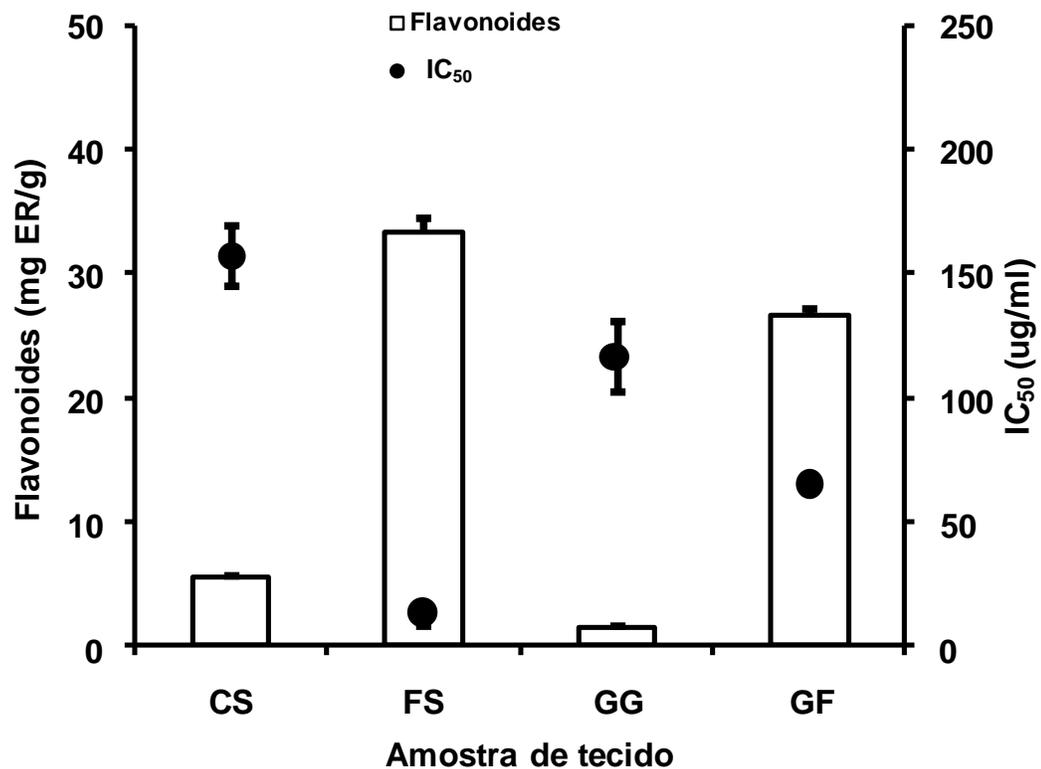
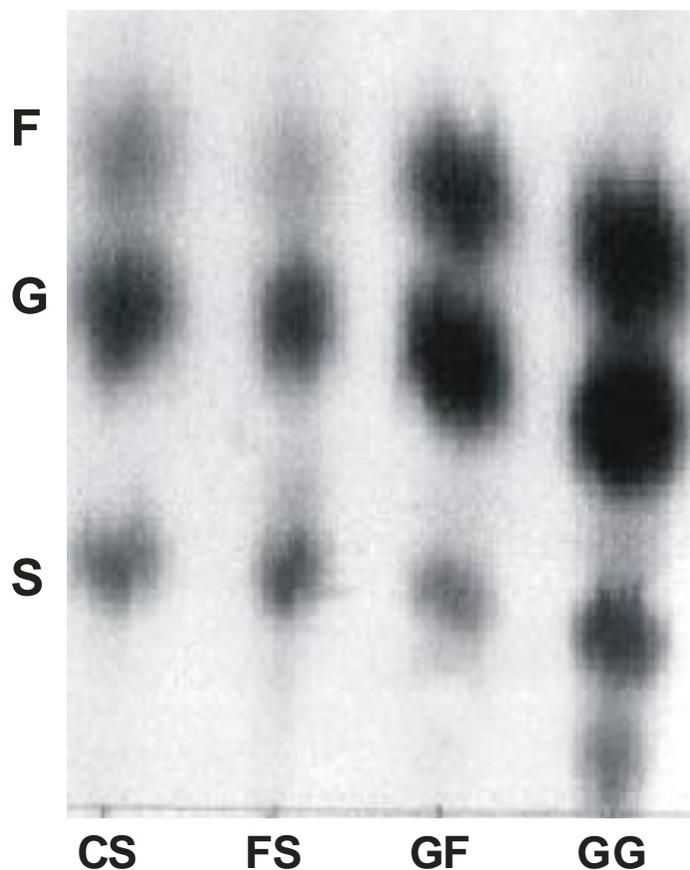


Figura 6 – Conteúdo de flavonóides e capacidade antioxidante detectada em tecidos não galhados e galhados de *C. brevipes*. No eixo esquerdo, o conteúdo de flavonóides foi determinado em amostras de tecidos de caule (CS) ou folha (FS) não galhados, galha globosa (GG) e galha fusiforme (GF), e expressos em mg/g de tecido total, em equivalente de rutina (RE). Adicionalmente, a atividade neutralizante de radical livre destas amostras foi determinada baseada em sua habilidade de reagir com o radical livre DPPH estável. No eixo direito, a atividade antioxidante das amostras foi expressa como IC₅₀ (concentração inibitória), a qual foi definida como a concentração (µg/ml) de amostra requerida para inibir em 50% a formação do radical DPPH.

4.3. Análise cromatográfica de carboidratos

No material coletado em abril de 2008 foi realizada análise cromatográfica e densitométrica de carboidratos, sendo detectada a presença de frutose, glicose e sacarose em todas as amostras de tecidos analisados (Figura 7, A e B). Nas amostras de tecidos de caule (CS) e folha (FS) não galhados, os conteúdos de frutose, glicose e sacarose foram similares (Figura 7, A e B). Na amostra de tecido de galha fusiforme (GF), o conteúdo de frutose foi aproximadamente 2 vezes maior que o encontrado em tecidos não galhados (CS e FS), enquanto os conteúdos de glicose e sacarose mostraram valores similares quando comparados a estes mesmos tecidos. Na amostra de tecido de galha globosa (GG), o conteúdo de frutose foi aproximadamente 3 vezes maior que aqueles encontrados em CS e FS, e os conteúdos de glicose e sacarose estavam 40 e 45-75% maiores, respectivamente, quando comparados ao conteúdo encontrado nestes tecidos não galhados. A galha globosa (GG) apresentou conteúdos de frutose e sacarose aproximadamente 50% maiores quando comparados aos encontrados na galha fusiforme (Figura 7, A e B; GF).

A**B**

Amostra de tecido	Quantidade de carboidrato (Unidade de área)		
	F	G	S
CS	536	1034	522
FS	465	1079	619
GF	1031	1243	621
GG	1545	1492	914

Figura 7 – Perfil de carboidratos em amostras de tecidos galhados e não galhados de *C. brevipes*. Frutose (F), glicose (G) e sacarose (S) foram identificadas em amostras de tecidos de caule (CS) ou folha (FS) não galhados, e em galhas globosa (GG) e fusiforme (GF) por cromatografia (A). Análise densitométrica foi realizada usando um *Vertical Scan Analyzer* (QuickScan, Beckman-Coulter, USA), e os valores foram expressos em unidade de área (B).

4.4. Análise de proteínas

O conteúdo protéico de amostras de tecidos não galhados (caule e folha) e galhados (galhas fusiforme e globosa) de *C. brevipes* foi quantificado em material vegetal coletado em abril de 2008. Os resultados mostram que o conteúdo protéico da amostra de tecido de folha não galhada (FS; $1,250 \pm 0,295$ mg/g) foi significativamente maior ($P < 0,05$) que o encontrado no de caule não galhado (CS; $0,426 \pm 0,058$ mg/g), galha globosa (GG; $0,302 \pm 0,095$ mg/g) e de galha fusiforme (GF; $0,467 \pm 0,024$ mg/g). Nenhuma diferença significativa foi observada nos conteúdos protéicos das amostras de tecidos de caule não galhado (CS) e das galhas globosa (GG) e fusiforme (Figura 8; GF).

As proteínas das amostras de tecidos foram precipitadas com o ácido tricloroacético, fracionadas por SDS-PAGE e coradas pelo Coomassie blue (Figura 9A). Através de densitometria, uma análise quantitativa das bandas protéicas foi efetuada (Fig. 9B) e uma banda de aproximadamente 27 kDa foi visualizada nas amostras de tecidos não galhados (poços CS e FS) e galhados (Figura 9A; poços GG e GF). A quantidade deste polipeptídeo foi similar entre o caule sadio (CS; $5,32 \mu\text{g}$) e a galha globosa (GG; $5,75 \mu\text{g}$), e maiores que as encontradas em amostras de tecido de folha não galhada (FS; $1,74 \mu\text{g}$) e de galha fusiforme (Figura 9B; GF, $2,7 \mu\text{g}$). Nos dois tecidos não galhados (poços CS e FS), somente a banda de 27 kDa foi quantitativamente representativa, indicando que outros polipeptídeos estavam em menor quantidade, abaixo da sensibilidade limite do método de coloração empregado (Figura 9A)

A visualização direta de outros polipeptídeos corados pelo Coomassie-blue mostrou que algumas bandas foram comuns aos dois tecidos galhados (GG e GF), enquanto outras foram específicas a cada um destes morfotipos de galha (Figura 9A). Foi possível a observação de polipeptídeos de aproximadamente 80, 69, 52 e 32 kDa

em ambas as galhas, não detectados nos tecidos não galhados (Figura 9A; comparar poços GG e GF com CS e FS). A análise densitométrica mostrou que as quantidades dos polipeptídeos de 80 e 69 kDa estavam duas vezes maiores na galha fusiforme (GF) quando comparadas com as detectadas na galha globosa (GG), enquanto as bandas de 52 e 32 kDa estavam em maior quantidade, cerca de 3 vezes mais, neste último tecido (Figura 9B).

Bandas de aproximadamente 97, 75 e 34 kDa foram detectadas apenas na galha globosa, enquanto os polipeptídeos de 40 e 33 kDa foram específicos da galha fusiforme (Figura 9A, poços GG e FG). É interessante ressaltar que o gel corado pelo Coomassie-blue, também submetido à coloração pela prata apresentou o mesmo perfil aqui citado (dados não mostrados).

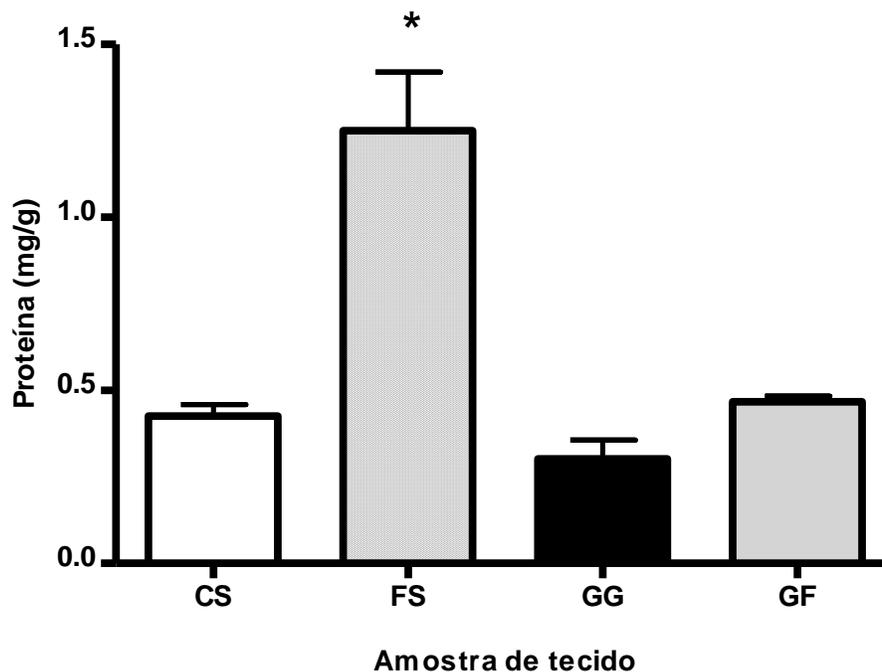


Figura 8 – Conteúdo protéico em amostras de tecidos de caule (CS) ou folha (FS) não galhados e de galhas globosa (GG) e fusiforme (GF) de *C. brevipes*. A quantidade de proteínas em cada amostra foi medida em 3 preparações diferentes, e em triplicatas. Os resultados foram expressos em mg/g de tecido total. O valor de $P < 0,05^*$ foi determinado por A-NOVA.

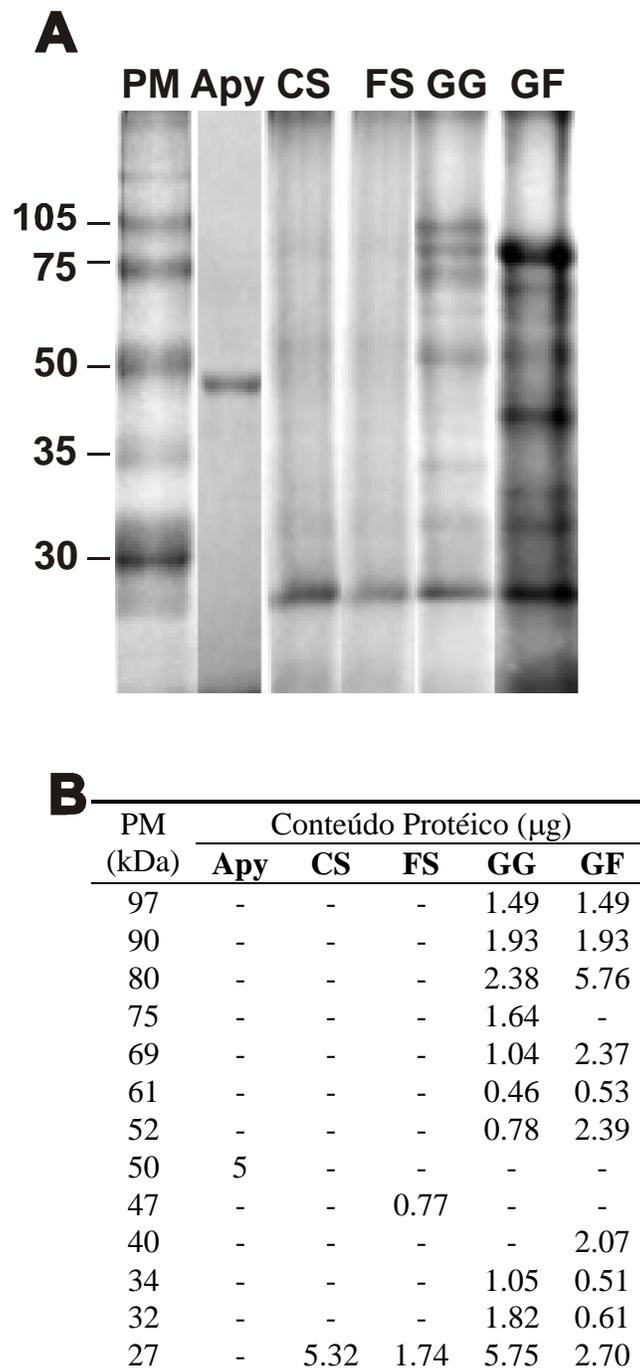


Figura 9 – Perfil de polipeptídeos em amostras de tecidos de caule (CS) ou folha (FS) não galhados e de galhas globosa (GG) e fusiforme (FG) de *C. brevipes*. (A) Amostras de proteínas precipitadas por ácido tricloroacético foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS e coradas pelo *Coomassie blue*; (B) A análise densitométrica foi realizada pelo *ImageQuant TL* (Amersham Biosciences), usando 5 μg de uma proteína pura padrão (Apy; 50 kDa) como parâmetro.

4.5. Caracterização de atividade fosfohidrolítica em amostras de tecido de caule galhado e não galhado de *C. brevipes*

4.5.1. Análise de substrato

A caracterização de atividade fosfohidrolítica foi efetuada em material de caule não galhado e galha globosa coletado em abril de 2007. A escolha de apenas um morfotipo de galha, e seu tecido de origem, deveu-se a representatividade da galha globosa durante todo o ano, principalmente nesta época em que foi efetuada a coleta. Uma atividade fosfohidrolítica para nucleosídeos di- e trifosfatados foi detectada em amostras de tecido do caule não galhado (CS; Tabela 2), sendo responsável pela hidrólise tanto de ATP como de ADP, numa extensão de 1013 ± 522 nmol Pi/mg.min ($n= 22$) e 818 ± 150 nmol Pi/mg.min ($n= 16$), respectivamente. Esta amostra de tecido foi também capaz de hidrolisar UDP (1075 nmol Pi/mg.min), GDP (1221 nmol Pi/mg.min) e, em menor extensão, GTP (Tabela 2; 139 nmolPi/mg.min).

Usando as mesmas condições experimentais descritas para as amostras de tecido não galhado, amostras de tecido de galha globosa (GG) também hidrolisaram ATP (1006 ± 409 nmol Pi/mg.min), ADP (1825 ± 609 nmol Pi/mg.min), UDP (2155 ± 841 nmol Pi/mg.min), GDP (1800 ± 1200 nmol Pi/mg.min) e GTP (201 nmol Pi/mg.min) (Tabela 2). A atividade fosfohidrolítica para os nucleosídeos difosfatados ADP, GDP e UDP mostrou-se aproximadamente 2 vezes maior em amostras de tecido de galha globosa quando comparada ao caule não galhado (Tabela 2).

Pirofosfato de sódio, 5'-AMP e p-NPP foram também usados como substratos nas mesmas condições experimentais (Tabela 2). A hidrólise de 5'-AMP (52 ± 47 nmol

Pi/mg.min) foi detectada em amostras de tecido de caule não galhado, possivelmente relacionada à presença de uma atividade 5'-nucleotidásica (Tabela 2). Na galha globosa, a hidrólise de 5'-AMP (581 ± 35 nmol Pi/mg.min) foi 10 vezes maior que aquela encontrada em tecido de caule não galhado.

Pequena quantidade de Pi foi liberada quando pirofosfato de sódio (115 nmol Pi/mg.min) ou p-NPP (144 nmol Pi/mg.min) foi usado como substrato para a amostra de tecido não galhado. Resultados similares foram encontrados para a amostra de tecido de galha globosa, que hidrolisou pirofosfato de sódio (103 nmol Pi/mg.min) ou p-NPP (179 nmol Pi/mg.min) em pequena extensão (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade fosfohidrolítica de amostras de tecidos de caule não galhado e galha globosa de *C. brevipes*. A atividade foi medida em meio de reação padrão na presença de 5 mM de CaCl_2 . Os valores representam a atividade relativa para o número de determinações mostradas entre parênteses, usando diferentes preparações.

Substrato (3 mM)	Caule não galhado (atividade relativa)	Galha globosa (atividade relativa)
ATP	1,00 (22)	1,00 (16)
ADP	0,80 (16)	1,85 (18)
UDP	1,06 (02)	2,14 (06)
GTP	0,14 (02)	0,20 (02)
GDP	1,21 (02)	1,79 (06)
5'-AMP	0,05 (04)	0,58 (04)
PPi*	0,11 (02)	0,10 (02)
p-NPP**	0,14 (02)	0,18 (02)

PPi*, pirofosfato inorgânico; p-NPP**, p-nitrofenilfosfato.

4.5.2. Efeito de inibidores clássicos de ATPases sobre a atividade fosfohidrolítica

Inibidores clássicos de ATPases de diferentes organismos foram testados (Tabela 4). A adição de ortovanadato (100 μM), um inibidor de ATPases do tipo P, inibiu aproximadamente 26 e 12% da atividade ATPásica de caule não galhado e galha globosa, respectivamente, sugerindo um efeito direto de uma ATPase do tipo P nestes tecidos (Tabela 4). Bafilomicina A (5 μM), um antibiótico macrolídeo inibidor de ATPases vacuolares), N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (100 μM) e azida sódica (1 mM; inibidores de ATPases mitocondriais) foram também testados e nenhuma inibição significativa pode ser observada (Tabela 4).

Tabela 3 – Efeitos dos inibidores sobre a hidrólise de ATP – A atividade ATPásica de amostras de caule não galhado ou de galha globosa de *C. brevipes* foi medida em meio de reação padrão na ausência (Controle) ou na presença de inibidores clássicos de ATPases. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 determinações em duplicatas, usando diferentes preparações. A atividade relativa é mostrada entre parênteses.

Composto (concentração)	Atividade fosfohidrolítica (atividade relativa)	
	Caule não galhado	Galha globosa
Controle	723,16 \pm 130,47 (1,00)	1073,40 \pm 47,10 (1,00)
Ortovanadato (100 μM)	536,72 \pm 110,90 (0,74)	889,83 \pm 202,47 (0,83)
Bafilomicina (10 μM)	1344,63 \pm 115,40 (1,86)	1005,65 \pm 280,52 (0,94)
DCCD (100 μM)	720,34 \pm 130,47 (0,99)	1019,77 \pm 433,83 (0,95)
Azida sódica (1 mM)	683,62 \pm 32,61 (0,95)	991,52 \pm 48,93 (0,92)

4.5.3. Dependência da atividade fosfohidrolítica aos cátions bivalentes

As atividades ADPásica e UDPásica das amostras de tecidos de caule não galhado e galha globosa mostraram de 10 a 32% de ativação quando 5 mM de CaCl_2 foi adicionado, enquanto a adição de 5 mM de MgCl_2 reduziu de 7 a 24% estas atividades, sugerindo a presença de íons bivalentes como contaminantes endógenos e uma competição destes íons para o mesmo sítio de ativação (Tabela 3).

As atividades ADPásica e UDPásica endógenas presentes na amostra de caule não galhado ou na galha globosa medidas na ausência de íons bivalentes (Controle) foram removidas quase completamente pela adição de 5 mM de EDTA (88 a 97%) ou 5 mM de EGTA (94 a 99%), confirmando assim a dependência destas atividades aos cátions bivalentes (Tabela 3).

A hidrólise de nucleosídeos di- e trifosfatados, associados à dependência aos íons bivalentes, sugeriram fortemente que o caule e a galha globosa de *C. brevipes* têm uma atividade apirásica.

Tabela 4 – Análise da dependência das atividades ADPásica e UDPásica à cátions bivalentes. A atividade fosfohidrolítica foi medida em meio de reação padrão na ausência (Controle) ou na presença de CaCl_2 , MgCl_2 , EGTA ou EDTA. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 determinações em duplicadas, usando diferentes preparações. A atividade relativa ao controle é mostrada entre parênteses.

Substrato	Composto adicionado (5 mM)	Atividade fosfohidrolítica nmol Pi/mg.min (atividade relativa)	
		Caule não galhado	Galha globosa
ADP	Controle	894,90 \pm 60,64 (1,00)	1341,83 \pm 92,06 (1,00)
	CaCl_2	1075,82 \pm 61,93 (1,20)	1767,06 \pm 76,16 (1,32)
	MgCl_2	678,43 \pm 69,14 (0,76)	1108,89 \pm 19,41 (0,83)
	EGTA	4,77 \pm 6,75 (0,005)	78,82 \pm 17,93 (0,06)
	EDTA	105,23 \pm 5,55 (0,12)	46,79 \pm 14,60 (0,04)
UDP	Controle	912,9 \pm 213,88 (1,00)	1369,15 \pm 36,79 (1,00)
	CaCl_2	1007,32 \pm 75,05 (1,10)	1739,61 \pm 21,26 (1,27)
	MgCl_2	754,64 \pm 111,47 (0,83)	1274,77 \pm 26,99 (0,93)
	EGTA	58,56 \pm 5,55 (0,06)	23,26 \pm 26,62 (0,02)
	EDTA	24,90 \pm 35,21 (0,03)	51,63 \pm 5,36 (0,04)

4.5.4. Identificação de uma isoforma de apirase em *C. brevipes* através da imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de *Solanum tuberosum*

Para a confirmação da presença e determinação do peso molecular de uma isoforma de apirase, possivelmente relacionada à atividade fosfohidrolítica observada nas amostras de *C. brevipes*, anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra a apirase de batata *S. tuberosum* foram usados em “Western blots” (Fig. 10B). Uma banda difusa de aproximadamente 75 kDa foi reconhecida pelos anticorpos anti-apirase de batata (soro diluído 1:2000) em amostras de tecidos de caule não galhado (CS) e galhado (GG) de *C. brevipes* (Figura 9B, poços CS e GG). Na amostra de tecido galhado (Figura 10B; poço GG) uma banda de 52 kDa, de massa molecular similar à apirase de *S. tuberosum* (Figura 10B, poço Apy), foi também reconhecida, sugerindo ser esta uma forma deglicosilada da apirase de *C. brevipes*. Bandas de 75 e 52 kDa foram também detectadas entre os polipeptídeos corados pelo Comassie blue de amostra de galha globosa fracionada por SDS-PAGE (Figura 10A, poço GG). Nenhuma imunoreatividade pôde ser observada em amostras de larvas, pulpas ou insetos retirados das galhas (dados não mostrados), descartando a hipótese de ser esta apirase pertencente ao galhador. Estes resultados confirmaram a identidade da apirase em caule não galhado e galhado de *C. brevipes*.

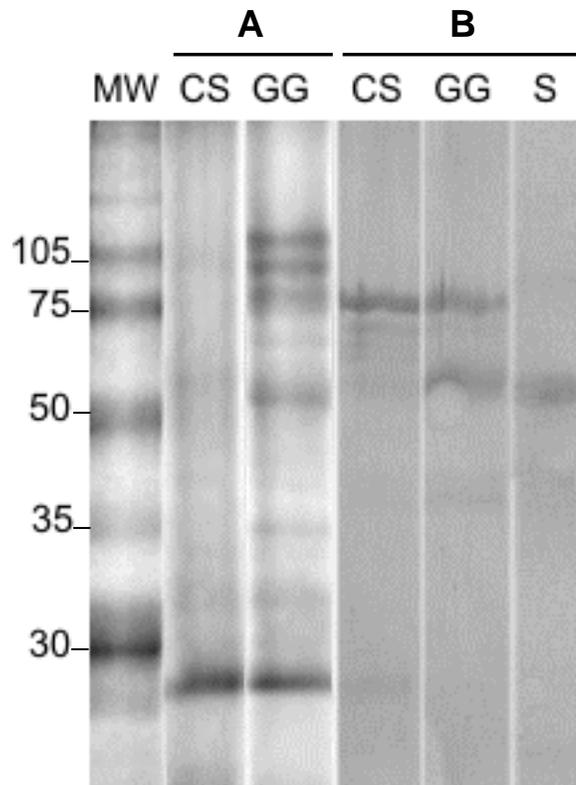


Figura 10 – Identificação de apirase em caule não galhado e galha globosa de *C. brevipes* por imunoreatividade cruzada com anticorpos anti-apirase de batata. As proteínas de amostras de tecido de caule não galhado (CS) e de galha globosa (GG) foram precipitadas por ácido tricloroacético e fracionadas por SDS-PAGE. Em (A), o gel foi corado pelo Coomassie blue. Em (B), as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e desenvolvidas com anticorpos anti-apirase (soro diluído 1:2000) e reveladas por quimioluminescência com anticorpos secundários acoplados à peroxidase e Luminol como substrato, usando o Kit ECL. A apirase de batata (S; 1 μ g) foi usada como controle positivo. MW, padrão de peso molecular.

4.5.5. Localização de apirase em galha globosa de *C. brevipes*

Imunolocalização de apirase no tecido de galha globosa foi obtida por imunocitoquímica usando anticorpos anti-apirase de batata (Figura 11). Nos cortes histológicos (10 μm) de galha globosa, incubados com anticorpos anti-apirase de batata e anticorpos anti-IgG de coelho conjugados ao TRITC, pode-se observar os núcleos marcados e a integridade celular (Figura 11 A). Na figura 11 B, foi detectada uma forte marcação predominantemente na superfície externa e dentro das células nutritivas que compõem a câmara larval, identificando uma apirase neste sítio. Nenhuma reatividade foi observada no controle, incubado apenas com o anticorpo secundário (dados não mostrados).

A localização *in situ* de atividade apirásica no tecido de galha globosa foi também obtida por citoquímica (Figura 12). Cortes histológicos (10 μm) de tecido de galha globosa foram incubados em meio de reação padrão, suplementado com inibidores de ATPases (ortovanadato), fosfatases (levamisole) e nucleotidase (molibdato de amônio), e o ADP como substrato. A atividade ADPásica foi observada pela deposição de grânulos eletrodensos de fosfato de chumbo homoganeamente distribuídos na superfície externa e dentro das células nutritivas que compõem a câmara larval (Figura 12B), confirmando a localização da apirase feita por imunocitoquímica. Depósitos de grânulos eletrodensos de fosfato de chumbo foram também observados espalhados no loco da câmara central. O controle feito sem a adição do ADP mostra a ausência de fosfato de chumbo, confirmando a especificidade do experimento executado (Figura 12A).

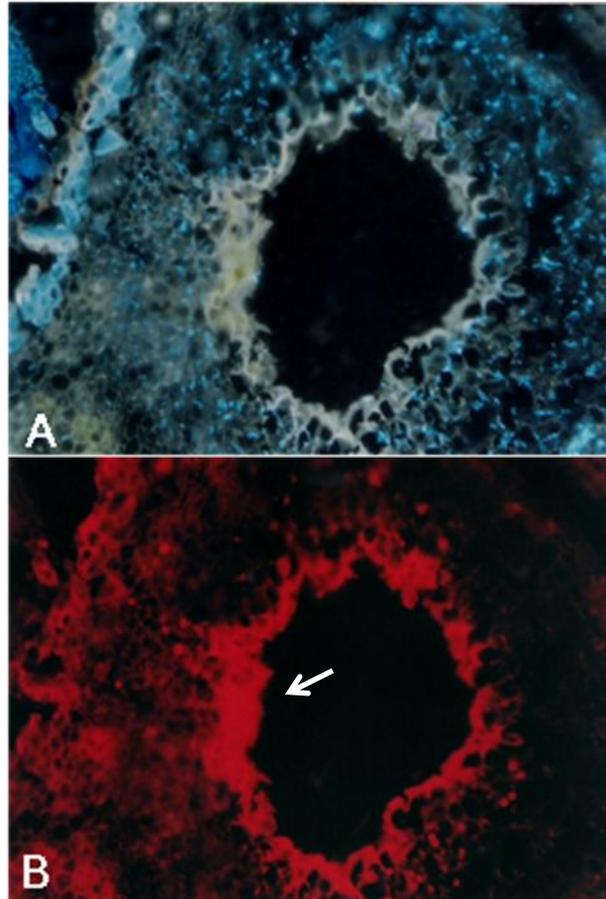


Figura 11 – Localização imunocitoquímica de apirase em galha globosa de *C. brevipes*. Anticorpos anti-apirase de batata e anticorpos secundários conjugados ao TRITC foram usados para detecção de apirase sobre cortes ($10\ \mu\text{m}$) de galha globosa. As imagens, obtidas por microscopia de fluorescência mostram em (B) o aspecto geral do tecido galhado com uma fluorescência homogeneamente distribuída na superfície externa e dentro das células nutritivas da câmara central (setas). Em (A), imagem do tecido galhado em DAP, que revela a integridade do tecido galhado. (Aumento: 100X).

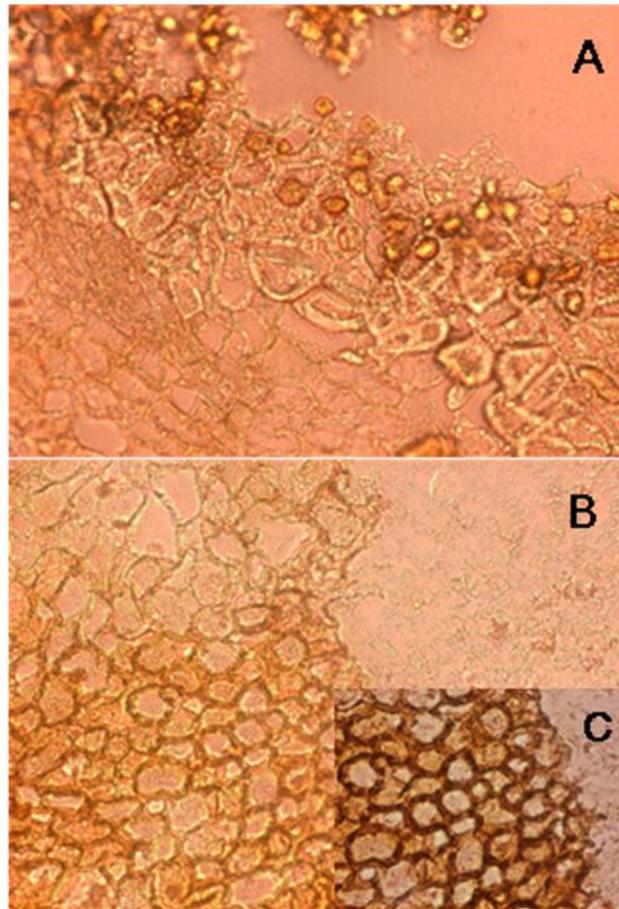


Figura 12 – Localização citoquímica de atividade apirásica em galha globosa de *C. brevipes*. Corte de galha globosa (10 μm) foi incubado em meio de reação padrão suplementado com ortovanadato, levamisole e molibdato de amônio, e o ADP como substrato. Por microscopia óptica foram observados depósitos de fosfato de chumbo eletrodensos homogeneamente distribuídos sobre a superfície externa e dentro das células nutritivas que compõem a câmara central, e do lado de fora, espalhados dentro do loco da câmara central (B). Sem a adição de ADP, o controle mostrou ausência de depósitos eletrodensos de fosfato de chumbo (A). Em (C), foi feito um *insert* evidenciando os grânulos eletrodensos de fosfato de chumbo. (Aumento: 400X).

5 DISCUSSÃO

5.1 Mudanças no conteúdo fenólico de tecidos galhados e não galhados de *Calliandra brevipes* estão possivelmente associadas ao estresse abiótico

Em *Calliandra brevipes* foram detectados dois morfotipos de galhas entomógenas, um globoso e um fusiforme, sendo o primeiro mais prevalente. A galha globosa é de origem caulinar e induzida por *Tanaostigmodes mecanga*, e a galha fusiforme, por sua vez, é possivelmente de origem foliar, sendo induzida por *Tanaostigmodes ringueleti* (PENTEADO-DIAS e CARVALHO, 2008). Tem sido descrito, em outros trabalhos, que cada inseto galhador tem a habilidade de manipular o crescimento e o desenvolvimento do tecido vegetal em seu benefício (CUEVAS-REYS *et al.*, 2003, 2004; WEIS, WALTON e CREGO, 1988; CORNELL, 1983). Segundo Nyman e Julkunen-Titto (2000), os insetos controlam também as propriedades químicas das galhas induzindo a proliferação de tecidos vegetais para sua nutrição. Nas células nutritivas, a maioria dos compostos tóxicos é encontrada em concentração menor que a existente nos tecidos não galhados.

Dentre os metabólitos vegetais que podem prejudicar a sobrevivência dos insetos galhadores e/ou impedir a formação de galhas, merece destaque a classe dos derivados fenólicos (FERNANDES *et al.*, 1990). Alguns trabalhos sugerem que altos níveis de compostos fenólicos podem compor um mecanismo de defesa vegetal contra os galhadores, enquanto outros mostram que estes indutores podem utilizar tais compostos em seu benefício contra seus predadores naturais (FERNANDES *et al.*, 1990). Tais compostos provindos do metabolismo secundário podem também interferir na expressão gênica, na atividade hormonal e no crescimento do vegetal (RAY e

LALORAYA, 1984; RANADE e DAVID, 1985; PRINSEN, RIIDELSHEIM e ONCKELEN, 1991). A variabilidade química dos metabólitos de defesa pode aumentar grandemente pela ocorrência de compostos derivados do metabolismo primário, como os glicoconjugados, que podem ter diferentes efeitos nos herbívoros (HARBONE e GRAYER, 1993).

Adicionalmente, estes metabólitos vegetais podem estar atuando na defesa contra o estresse provindo de fatores ambientais que afetam o metabolismo da planta, podendo levar a alterações em seu crescimento e em seu desenvolvimento (BOYER, 1982). Dessa maneira, ao analisarmos as alterações metabólicas vegetais provindas de um estresse biótico, não podemos deixar de levar em consideração a contribuição dos fatores abióticos nesse sistema. Um dos principais fatores ambientais responsáveis por alterações no metabolismo do vegetal é o estresse hídrico (BOYER, 1982), que em geral leva a um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (DAT *et al.*, 2000). Assim, sabe-se que a sobrevivência sob estresse hídrico está intimamente associada com a capacidade do vegetal em driblar este estresse oxidativo (LASCANO *et al.*, 2001), seja através da ativação de enzimas antioxidantes (BARTOLI *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2008) ou ainda através do acúmulo de outras substâncias que minimizem os efeitos danosos provocados pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio.

Para avaliar a influência de fatores abióticos sobre o acúmulo de substâncias fenólicas em *C. brevipes*, o conteúdo fenólico foi mensurado bimestralmente de agosto de 2003 a agosto de 2004 em amostras de tecidos de caule e folha não galhados, e em galhas globosa e fusiforme, sendo o teor fenólico dos diferentes tecidos comparados. Durante a maior parte do período analisado, os níveis fenólicos da folha não galhada estavam significativamente maiores do que aqueles encontrados no caule não galhado e em ambas as galhas. O elevado nível fenólico no tecido foliar não galhado pode estar relacionado à maior atividade fotossintética deste tecido, uma vez que é nos cloroplastos que ocorre a maior parte da via do chiquimato, rota metabólica responsável pela produção de compostos fenólicos (WINK, 1999; STALIKAS 2007).

É interessante observar que os níveis fenólicos entre fevereiro e abril de 2004 reduziram significativamente em ambos os tecidos não galhados, coincidente com a

redução na precipitação pluviométrica. No entanto, seus níveis elevaram-se novamente com a contínua redução dos níveis de precipitação nos meses de junho a agosto de 2004. O perfil de variação do conteúdo fenólico nos tecidos de galhas foi similar ao do tecido não galhado, indicando que o acúmulo de derivados fenólicos pode estar relacionado a uma resposta do vegetal frente ao estresse hídrico.

Tem sido registrado que os compostos fenólicos possuem a capacidade de capturarem radicais livres produzidos pelo transporte de elétrons no sistema fotossintético (HARBORNE 1994; KANDSWAMI e MIDDLETON, 1994; STALIKAS 2007). Devido a tal propriedade, alguns autores sugerem que o acúmulo de compostos fenólicos no tecido da galha pode constituir uma defesa contra o estresse oxidativo (SOARES *et al.* 2000). Nesse estudo, pode-se observar que o acúmulo de derivados fenólicos nos tecidos vegetais de *C.brevipes* está primariamente associado às mudanças de precipitação pluviométrica, ou seja, os fenóis podem estar constituindo uma defesa direta contra os radicais livres gerados pelo estresse hídrico.

Adicionalmente, foi constatado que os perfis de variação de conteúdo fenólico foram mais drásticos nas amostras de tecidos de folha e caule não galhados que naqueles observados nas amostras de tecidos de galhas globosa e fusiforme (Figura 1, A e B). Previamente foi demonstrado por histoquímica um predomínio de fenólicos no parênquima cortical e nutritivo das duas galhas (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES. 2005). Segundo Carvalho, Isaías e Soares (2005), os indutores de galhas em *C. brevipipes* apresentam um alto grau de adaptação à presença de derivados fenólicos, a despeito do seu potencial tóxico, anti-nutricional e fagoinibidor previamente descritos (HARBONE, 1994). Assim, é também possível que os insetos indutores da galha manipulem, regulando a concentração e a distribuição de fenólicos no tecido galhado, limitando a quantidade destes compostos tóxicos no tecido nutritivo para o seu próprio benefício.

Como mostrado, os níveis fenólicos de galha globosa e fusiforme foram similares entre eles durante todo o período analisado, de agosto de 2003 a agosto de 2004. Estes resultados sugeriram que as duas espécies distintas de *Tanaostigmodes* manipulam similarmente a produção de fenóis. Estes dados, no entanto, não excluíram diferenças de conteúdo individual de seus derivados, estimulando a análise dos

mesmos em um período no qual o teor de fenóis totais sofre uma menor influência de fatores ambientais. Desta maneira, nova coleta de material para avaliação do conteúdo fenólico e triagem fitoquímica foi realizada em abril de 2008. Nesta nova análise, o nível fenólico na amostra de tecido de folha não galhada estava significativamente ($P < 0,001$) maior que o encontrado nas amostras de tecido caulinar não galhado e de galha globosa, corroborando com o observado na análise anterior e com a hipótese de que tecidos foliares apresentam maior conteúdo fenólico devido sua maior atividade fotossintética. A galha fusiforme apresentou conteúdo fenólico similar ao encontrado na amostra de folha não galhada, o que pode estar relacionado à origem deste crescimento vegetal. Os níveis fenólicos encontrados na galha globosa ($P < 0,05$) e na galha fusiforme ($P < 0,001$), os quais estavam similares entre eles, mostraram-se significativamente maiores que os encontrados no tecido caulinar não galhado, perfil similar ao encontrado na análise efetuada em abril de 2004.

A triagem de metabólitos secundários detectou a presença de alguns derivados fenólicos, como flavonóides, cumarinas e taninos, em todas as amostras de *C. brevipes*. Cumarinas e flavonóides protegem as plantas contra a radiação UV-B e estão envolvidos nos processos de reconhecimento/defesa de patógenos (CROTEAU, KUTCHAN, e LEWIS 2000). A deposição de taninos condensados contribui significativamente para o estabelecimento de propriedades, como coloração, qualidade e resistência, características da madeira (CROTEAU, KUTCHAN, e LEWIS 2000). A presença destes compostos está possivelmente relacionada à importância funcional de cada um deles, desempenhando papel semelhante na manutenção estrutural e metabólica tanto de tecidos sadios como de tecidos galhados de *C. brevipes*. Outros derivados fenólicos, como catequinas e flavononas, foram detectados em caule não galhado, galhas globosa e fusiforme. As flavononas, um importante intermediário no metabolismo dos flavonóides, pode não ter sido detectada na folha não galhada provavelmente devido à uma elevada isomerização destes compostos em fitoalexinas, compostos com ação anti-herbívora amplamente encontradas em Fabaceae.

Triterpenóides foram detectados somente em galha globosa. Triterpenóides foram previamente identificados como compostos de defesa contra patógenos e/ou herbívoros (CROTEAU, KUTCHAN, e LEWIS 2000), e estão possivelmente associados

a uma resposta da galha contra o elevado número da espécie Braconidae, um fitófago que também co-habita a galha globosa (PENTEADO-DIAS e CARVALHO, 2008). Saponinas foram detectadas somente em amostras de tecidos de caule e folhas não galhados. Associado às saponinas tem sido descrito vários efeitos biológicos anti-herbívoros, tais como a inibição da degradação de proteínas e absorção de vitaminas e aminoácidos no intestino (FRANCIS *et al.*, 2002). A detecção dessas substâncias em *C. brevipes* é coerente com o padrão fitoquímico de espécies da família Fabaceae, especialmente as pertencentes à subfamília Mimosoidae (HARBONE, 1971; DAN, KAPLAN e GOTTLIEB, 1995). A distinta composição fitoquímica detectada entre os diferentes tecidos analisados está possivelmente relacionada à exploração diferenciada das diversas rotas metabólicas de acordo com a necessidade de cada tecido. Em vários casos, as plantas utilizam somente um pequeno segmento de determinada rota metabólica que produz substrato para um ou mais ramos metabólicos, que se tornaram vias ativas somente em determinados tecidos (CROTEAU, KUTCHAN, e LEWIS 2000).

Interessantemente, os conteúdos de flavonóides em amostras de tecidos de folha não galhada e de galha fusiforme foram significativamente maiores que aqueles encontrados em galha globosa e caule não galhado. Adicionalmente, a capacidade antioxidante do tecido foliar não galhado e da galha fusiforme também se mostrou exacerbada em comparação aos demais tecidos. O elevado conteúdo de flavonóides e a alta capacidade antioxidante dos tecidos de origem foliar (galhados e não galhados) pode ser um indicativo de que os flavonóides estejam constituindo uma defesa contra o estresse oxidativo em *C. brevipes*. Estes resultados corroboram com a hipótese de Soares *et al.* (2000) de que em galhas os derivados fenólicos poderiam constituir uma defesa contra o estresse oxidativo, compostos que já foram descritos como capazes de neutralizar os radicais livres (STALIKAS 2007). Por outro lado, o conteúdo de flavonóides e a atividade antioxidante apresentaram-se menores em amostras de galha globosa, sugerindo uma exploração metabólica diferenciada entre os dois morfotipos de galhas.

Diferenças metabólicas importantes foram observadas por nós em galhas induzidas por diferentes espécies de *Tanaostigmodes* em uma mesma espécie hospedeira. Adicionalmente, como previamente observado por técnicas histoquímicas,

compostos fenólicos estão localizados distantes do tecido nutritivo (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005). Tais observações sugerem que, embora os indutores da galha não promovam alterações no teor de fenóis totais, possivelmente eles são capazes de manipular a composição e distribuição destes compostos tóxicos em seu próprio benefício, mantendo-os distante do tecido nutritivo. Como uma consequência, estas substâncias não entram em contato com a larva e podem ainda proteger a galha contra seus inimigos naturais. Em conjunto, estes resultados mostram que cada galhador induz a exploração de diferentes rotas metabólicas pelos tecidos galhados.

5.2. Análise das alterações do conteúdo de carboidratos e proteínas induzidas por galhadores em *Calliandra brevipes*

Os resultados obtidos nessa dissertação mostraram que em galha fusiforme existe um conteúdo de frutose aproximadamente 2 vezes maior que o encontrado em tecidos não galhados, enquanto os conteúdos de glicose e sacarose foram similares a estes tecidos. A amostra de tecido de galha globosa foi a que mostrou o maior conteúdo em carboidratos, estando o de frutose aproximadamente 3 vezes maior que em tecidos não galhados, e o de glicose e sacarose 40 e 45-75% maiores, respectivamente, quando comparados a estes mesmos tecidos. A galha globosa ainda apresentou conteúdos de frutose e sacarose aproximadamente 50% maiores quando comparados aos encontrados na galha fusiforme. Este alto teor de carboidratos nos tecidos galhados deve-se possivelmente a uma elevada produção de monossacarídeos e a elevada atividade da enzima invertase, uma enzima que está associada à força de dreno fisiológico em vegetais e cuja atividade enzimática já foi descrita como aumentada em tecido galhado (REHILL e SCHULTZ, 2003; ALLISON e SCHULTZ, 2005). A principal forma de transporte de esqueleto carbônico em vegetais é a sacarose, um dissacarídeo não redutor composto de glicose e frutose, que é possivelmente também drenado para o tecido galhado (LARSON, 1998). Como

observado por Carvalho, Isaías e Soares (2005), nas duas galhas de *C.brevipes*, as células nutritivas mais próximas à câmara larval apresentavam elevado teor lipídico, enquanto as mais distantes do lúmen apresentavam acúmulo de amido. Estando a galha globosa situada no ramo caulinar, este morfotipo de galha receberia todo o aporte energético sintetizado nas folhas e que teoricamente seria translocado para todo o corpo vegetativo. No período de intenso suprimento de nutrientes, a galha globosa pode estar usando sua reserva de amido para a síntese de lipídeos (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005). Toda essa gama de transformações bioquímicas provavelmente envolve etapas que permitem uma grande troca de informações recíprocas do sistema galhador/planta (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005). Em conjunto, estes resultados estão em concordância com a hipótese nutritiva, a qual declara que os indutores de galha controlam o nível de nutrientes no tecido galhado para o seu próprio benefício (PRICE, FERNANDES e WARRING, 1987; HARTLEY e LAWTON, 1992).

Sob tal aspecto, o tecido nutritivo de ambas as galhas, e principalmente da galha globosa, pode ter elevados níveis enzimáticos responsáveis pelo acúmulo temporário de amido e/ou capazes de executar a conversão do amido em substâncias lipídicas. Alterações no acúmulo de metabólitos secundários e carboidratos estão diretamente relacionados às vias biossintéticas e/ou de transporte destes metabólitos, as quais necessitam da participação de diversas proteínas. Desta maneira, foi de interesse avaliar as alterações promovidas pelos diferentes galhadores nos conteúdos de proteínas das galhas globosa e fusiforme de *C. brevipes*. O maior conteúdo protéico foi observado em amostras de tecido de folha não galhada quando comparado aos outros tecidos, confirmando que a folha apresenta a mais eficiente propriedade biossintética, enquanto o conteúdo protéico total foi similar entre as amostras de tecidos de caule sadio e de galhas globosa e fusiforme.

O fracionamento das amostras de proteínas por SDS-PAGE, no entanto, permitiu a revelação de maiores diferenças entre as amostras analisadas. O fracionamento das proteínas das amostras de tecidos galhados mostrou alguns polipeptídeos comuns entre elas, sugerindo que estas proteínas podem ser essenciais para o desenvolvimento da galha e/ou da larva. Por outro lado, polipeptídeos específicos a cada morfotipo de galha foram detectados, podendo estar associados às diferentes vias

metabólicas exploradas por cada morfotipo. Estas diferenças protéicas encontradas em relação aos diferentes morfotipos de galhas vêm corroborar com a variação na composição de metabólitos secundários em ambas as galhas, sugerindo fortemente que cada inseto indutor manipula determinadas vias metabólicas de maneira específica. Resultados similares têm sido encontrados por outros autores (SHÖNROGGE, HARPER e LICHTENSTEIN, 2000; HARPER *et al.*, 2004). A identificação molecular destas proteínas poderá contribuir para elucidar como a larva dirige o desenvolvimento da planta permitindo a formação da galha.

5.3. Identificação de uma isoforma de apirase em caule sadio e galha globosa de *Calliandra brevipes*

Uma isoforma de apirase de massa molecular de aproximadamente 75 kDa foi identificada em caule e em galha globosa de *C. brevipes*. Esta é a primeira descrição de uma isoforma de apirase nesta espécie vegetal e em tecido galhado. O meio de ensaio padrão escolhido para os experimentos de caracterização da atividade apirásica continha 5 mM de CaCl_2 em tampão succinato de potássio, pH 6,5, uma condição similar à usada para a identificação de isoformas de apirase em batata *S. tuberosum* (KETTLUN *et al.*, 1992a). Sob estas condições iônicas, amostras de tecidos de caule e de galha globosa hidrolisaram ATP, ADP, UTP, UDP, GTP e GDP, uma característica que é comum às apirases de diversas origens (PLESNER, 1995).

As atividades ADPásica e UDPásica mostraram de 10 a 32% de ativação quando 5 mM de CaCl_2 foi adicionado. A ativação da apirase por íons bivalentes foi confirmada pelo uso de 5 mM de EDTA ou EGTA, que foram adicionados ao meio de reação na ausência de íons bivalentes. EDTA quela especificamente cátions bivalentes tais como Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , tendo por este último uma menor afinidade quando comparada ao Mg^{2+} e Mn^{2+} . Por outro lado, o EGTA quela preferencialmente Ca^{2+} , sendo útil no estudo de processos dependentes deste íon. As atividades ADPásica e

UDPásica endógenas das amostras foram removidas quase completamente pelo EDTA ou EGTA assim confirmando a dependência destas atividades aos cátions bivalentes, outra característica comum às apirases de diversas origens (PLESNER, 1995). A hidrólise de nucleosídeos di- e trifosfatados ativada por íons bivalentes sugeriu fortemente que uma atividade apirásica foi a responsável pela alta atividade hidrolítica observada em amostras de tecidos de caule e de galha globosa de *C. brevipes*.

É interessante observar que o caule de *C. brevipes* contém uma atividade fosfohidrolítica que foi igualmente efetiva na degradação de ATP, ADP, UDP e GDP (ver Tabela I). Na amostra de tecido de galha globosa foram encontradas atividades ADPásica, UDPásica e GDPásica aproximadamente 2 vezes maiores quando comparadas àquelas de amostras de tecido de caule, mostrando que o potencial catalítico da enzima apirase em galha globosa está aumentado.

Para a confirmação da identidade da apirase de caule e galha globosa foram utilizados anticorpos anti-apirase de batata em “Western blots”, que identificaram nos dois tecidos uma banda difusa com massa molecular de aproximadamente 75 kDa. A imunoreatividade cruzada entre os anticorpos anti-apirase de batata e a apirase de caule e de galha globosa indicou a existência de epitopos conservados entre estas proteínas e que fazem parte de uma mesma família de proteínas, as NTPDases, que incluem enzimas com diferentes localizações sub-celulares e diferentes especificidades para a quebra de nucleotídeos (HANDA e GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS *et al.* 1996, 2008). Uma banda adicional de 52 kDa, também reativa com os anticorpos anti-apirase de batata, foi detectada na galha globosa. É interessante observar que as bandas de 75 e 52 kDa foram também visualizadas entre os polipetídeos corados pelo Coomassie blue em amostras de tecido de galha globosa fracionado pelo SDS-PAGE, mas não em amostras de tecido caulinar não galhado. Estas bandas coradas possivelmente correspondem àquelas bandas imunoreativas de mesma massa molecular, sugerindo que na galha globosa a apirase é expressa em maior quantidade que no caule, o sítio de origem deste morfotipo de galha.

Hipóteses foram levantadas quanto a identificação deste segundo polipeptídeo de 52 kDa na galha globosa. A primeira delas é a possibilidade da existência de outra isoforma de apirase, o que estaria contribuindo com a exacerbação da hidrólise dos

nucleotídeos. As isoformas de apirase isoladas de batata *S. tuberosum*, as primeiras a serem purificadas, estão entre as mais estudadas (TRAVERSO-CORI, CHAIRMOVICH e CORI, 1965; VALENZUELA *et al.* 1973; KETTLUN *et al.* 1981, 1982; MANCILLA *et al.* 1984; KETTLUN *et al.* 1992a, 1992b; ESPINOSA *et al.* 2000; KETTLUN *et al.* 2000, 2005). Isoformas diferentes têm sido caracterizadas nas variedades 'pimpernel' e 'desirée' de *S. tuberosum*, as quais têm massa molecular aproximada de 49 kDa, mas diferem em seus pontos isoelétricos (pI) e na razão de atividade ATPásica/ADPásica (KETTLUN *et al.* 1982; MANCILLA *et al.* 1984). A isoforma de apirase da variedade 'pimpernel' tem um pI of 8,74 e hidrolisa ATP 10 vezes mais que o ADP, enquanto a isoforma da variedade 'desirée' tem um pI de 6,69 e hidrolisa os dois nucleotídeos na mesma razão (KETTLUN *et al.* 1982; MANCILLA *et al.* 1984). Na variedade 'ultimus', ao menos 2 isoformas co-existem, as quais têm massa molecular de 48 kDa e 46,5 kDa e a razão de atividades ATPásica/ADPásica de 1 e 10, respectivamente, e com diferentes localizações sub-celulares (KETTLUN *et al.* 1992a, 1992b). Os genes de isoformas de apirases têm sido identificados em várias outras espécies de plantas tais como *P. sativum* (ervilha), *Glycine soja* (soja), *Medicago truncatula*, *Dolichos biflorus*, *Arabidopsis thaliana* e *Lotus japonicus* e suas seqüências de aminoácidos foram depositadas no banco de dados do NCBI. Domínios conservados de alta homologia foram observados entre as seqüências de aminoácidos das isoformas de apirase de batata, com 92 a 98% de identidade e 96 a 99% de similaridade entre elas. A identidade da apirase de batata com outras apirases de plantas variou de 44 a 56%, com 70 a 75% de similaridade (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2008). Portanto, aquele segundo polipetídeo poderia corresponder a outra isoforma de apirase, expressa em grande quantidade apenas na galha globosa, e também imunoreativa com anticorpos anti-apirase de batata.

Foi demonstrado que a atividade da ecto-apirase de músculo esquelético de galinha, rato, porco ou de humanos é controlada por estágios de oligomerização funcionando como dímeros, trímeros ou tetrâmeros (STOUT e KIRLEY 1996; FAILER *et al.* 2003). Outra possibilidade para o encontro de 2 bandas polipetílicas na galha globosa é que elas sejam subunidades de uma forma multimérica da proteína. No entanto, se assim fosse, esta banda teria sido também reconhecida pelos anticorpos

anti-apirase de batata nas amostras de tecido de caule. Portanto, esta hipótese pode ser inicialmente descartada.

A isoforma de apirase pura obtida em nosso laboratório, e que foi usada para a produção dos anticorpos em coelho, é originada de batata obtida no comércio local, e tem peso molecular de aproximadamente 52 kDa e a razão de atividade ATPásica/ADPásica de aproximadamente 1 (FARIA-PINTO *et al.*, 2004; PENIDO *et al.*, 2007). É interessante ressaltar que os epitopos reativos da apirase de batata *S. tuberosum* são protéicos, pois após a purificação não se evidenciou qualquer porção carboidrato (KETLLUN *et al.* 1982; HANDA e GUIDOTTI, 1996). Portanto, a melhor hipótese é que a isoforma de apirase de 75 kDa identificada no caule de *C. brevipes* tenha também a razão de atividade ATPásica/ADPásica de aproximadamente 1, sendo aquela banda adicional reativa de 52 kDa encontrada na galha globosa a sua correspondente forma deglicosilada. O maior ou menor grau de glicosilação de apirases pode ser o determinante (a) de diferentes cargas líquidas negativas; (b) da estabilidade da conformação e de atividade catalítica; e/ou (c) da solubilidade da proteína ou de sua inserção na membrana (PAULSON, 1989; ZIMMERMANN 1999). A contribuição da glicosilação na atividade catalítica depende da natureza de cada enzima em particular (PAULSON 1989; VARKI, 1993), e pode ser que a atividade apirásica da galha globosa esteja sendo regulada por níveis diferentes de glicosilação. No entanto, estudos mais conclusivos são necessários para afirmar se as duas bandas polipeptídicas observadas em amostras de tecido de galha globosa são isoformas diferentes, ou formas protéicas em estágios diferentes de glicosilação.

Outras atividades fosfohidrolíticas foram investigadas neste trabalho. Uma atividade 5'-nucleotidásica foi detectada em amostras de tecido de caule pela hidrólise de AMP (52 ± 47 nmol Pi/mg.min), correspondente a ~ 5 % da atividade ATPásica (1013 ± 522 nmol Pi/mg.min) encontrada neste tecido. Na galha globosa, a hidrólise de 5'-AMP (581 ± 35 nmol Pi/mg.min) foi ~10 vezes maior que aquela encontrada em tecido de caule não galhado, e correspondente a ~50% da atividade ATPásica. Outros polipeptídeos foram identificados pelo Coomassie blue em galha globosa ou fusiforme, mas não em amostras de tecido caulinar, sugerindo que outras proteínas são

expressas em maior quantidade no tecido galhado, sendo que uma 5' nucleotidase poderia ser uma deles.

As 5'-nucleotidases são enzimas que catalisam a hidrólise do fosfato esterificado na posição 5' da ribose ou desoxiribose dos nucleotídeos, e são encontradas em uma variedade de espécies em diferentes localizações celulares (ZIMMERMANN, 1992). A hidrólise de mononucleotídeos por uma 5'-nucleotidase pode promover a elevação do fosfato inorgânico medido no meio de reação durante os nossos experimentos. No entanto, esta atividade hidrolítica possivelmente não foi a responsável pela elevação de atividade GDPásica, ADPásica ou UDPásica da galha globosa, desde que a hidrólise de ATP ou GTP, que também é hidrolisado por nucleotidases a AMP e GMP, respectivamente, não estava aumentada quando comparada ao tecido caulinar não galhado.

Fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações monoéster de fosfato liberando um álcool e um fosfato em pH ácido ou alcalino e transfosforilações (JOYCE e GRISOLIA, 1960). Nesses experimentos, foi detectada uma atividade fosfatásica em amostras de tecido de caule e de galha globosa, observada pela hidrólise do p-NPP, correspondente a aproximadamente 16% da atividade ATPásica encontrada nestas amostras, não contribuindo significativamente para a quantidade de Pi observada em nossos ensaios, e nem mostrando-se aumentada no tecido galhado. A presença de uma pirofosfatase inorgânica, que catalisa a hidrólise de difosfato resultando como produto 2 fosfatos, não foi representativa em nossas condições experimentais, uma vez que a quantidade de Pi liberado quando P₂ (pirofosfato inorgânico) foi usado como substrato (ver Tabela 2) foi < 10% da atividade total observada nas amostras de tecidos de caule e galha globosa de *C. brevipes*.

Para avaliar a contribuição de atividade de outras ATPases nas amostras de tecido de caule ou de galha globosa os ensaios foram feitos na presença de inibidores clássicos, em concentrações maiores que aquelas necessárias para inibir as respectivas enzimas. O ortovanadato de sódio (100 µM), um análogo de fosfato inorgânico e clássico inibidor de ATPases do tipo P em mamíferos e plantas (CARAFOLI, 1991; EVANS e WILLIAMS, 1998), foi capaz de inibir aproximadamente

16-26% das atividades ATPásicas encontradas nestas preparações, sugerindo o efeito direto de uma ATPase de transporte sobre o substrato ATP.

A adição de diciclohexilcarbodiimida (DCCD), conhecido inibidor de ATPase mitocondrial e ATPase dos tipo V (PEDERSON e CARAFOLI 1987; WEBER e SENIOR 1998), a bafilomicina A, um inibidor macrolídeo de ATPase vacuolar (BOWMAN, SIEBERS e ALTENDORF, 1988) ou a azida sódica (1 mM), um inibidor de ATPase mitocondrial (BUSSE *et al.* 1980; COIMBRA *et al.*, 2002), não foram capazes de inibir a atividade ATPásica. Embora não seja comum o uso destes inibidores para a caracterização de ATPases em plantas, estes resultados corroboraram a ausência de uma contribuição destas ATPases sobre a hidrólise do ATP em nossas condições experimentais.

Tendo em vista a exacerbação da atividade apirásica nos tecidos da galha globosa quando comparada ao do caule, houve interesse em verificar a localização desta enzima na galha globosa para tentar inferir a respeito de sua importância neste tecido. Uma típica galha globosa de *C. brevipes* é uma pequena cúpula de aproximadamente 8 mm de comprimento que cresce na superfície do caule. Uma galha totalmente formada contém vários tipos de tecidos que são organizados em camadas. Uma camada de células nutritivas delinea a câmara central, o sítio primário de manipulação do inseto, e protege a larva, sendo uma rica origem de proteínas, carboidratos e outros nutrientes necessários para seu crescimento e desenvolvimento (CARVALHO, ISAÍAS e SOARES, 2005). A apirase foi localizada por imunocitoquímica e citoquímica na superfície externa e dentro das células nutritivas que compõem a câmara larval. O uso de 100 μ M de molibdato de amônio, um inibidor de 5'-nucleotidases (GOTTLIEB e DWYER, 1983), 1 mM de levamisole, um inibidor de fosfatases (KHODAPARAST-SHARIFI e SNOW, 1989) e 100 μ M de ortovanadato ao meio de reação padrão usado para a localização citoquímica de apirase em galha globosa não afetou a atividade ADPásica *in situ* visualizada na galha globosa, descartando a possibilidade de que este substrato poderia ser hidrolisado inespecificamente por outras enzimas.

A localização da apirase na galha, associada à alta atividade apirásica em ensaios colorimétricos, confirmaram que a galha globosa de *C. brevipes* tem

mecanismos capazes de hidrolisar nucleosídeos di- e trifosfatados. A alta atividade de 5'-nucleotidásica para o substrato AMP evidenciou que a catálise de mononucleotídeos de purina pode ser também importante no metabolismo deste tecido. Existem evidências de que ATP extracelular e outros nucleotídeos estão relacionados à sinalização celular, aos mecanismos de defesa, e ao crescimento e ao desenvolvimento do vegetal (LEW e DEARNALEY, 2000; THOMAS *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2003; DEMIDCHIK *et al.*, 2003; KIM, SIVAGURU e STACEY, 2006; ROUX e STEINEBRUNNER, 2007). Como sinalizador na defesa vegetal, o ATP citosólico é liberado para matriz extracelular após estímulo mecânico induzido pelo herbívoro, disparando um segundo mensageiro intracelular (Ca^{2+}) e por conseqüência uma série de outras reações que contribuem na defesa do vegetal (ROUX e STEINEBRUNNER, 2007). A concentração de nucleotídeos em tecidos de diversos organismos é modulada primariamente por ecto-nucleotidases, tais como apirase, nucleotidase, e pirofosfatase/fosfodiesterase. Em mamíferos estas enzimas têm sido identificadas como parte de um sistema complexo que controla a razão de nucleotídeo/nucleosídeo em várias condições fisiológicas e patológicas (GENDRON *et al.*, 2002; BUFFON *et al.*, 2007).

As isoformas de apirase de batata *S. tuberosum* estão envolvidas na regulação da síntese de proteínas da parede celular e síntese de amido (ANICH *et al.* 1990; KETTLUN *et al.*, 2005; RIEWE *et al.* 2008). Cada espécie de inseto galhador tem a habilidade de manipular o crescimento e o desenvolvimento de tecido de planta e modificar a qualidade nutricional do hospedeiro e metabólitos da planta para a sua própria proteção (FERNANDES e PRICE, 1992). É possível, portanto, que a associação das atividades catalíticas de apirase e nucleotidase seja importante para o desenvolvimento da larva e do morfotipo da galha globosa. Um possível papel fisiológico da apirase em tecido galhado poderia estar relacionado aos caminhos de biossíntese de carboidratos e/ou degradação de nucleotídeos em torno da larva, a qual poderia estar usando estes substratos para a sua alimentação e sobrevivência. Adicionalmente, uma contribuição de ATPases do tipo P foi também mostrada. A identificação molecular destas proteínas em tecido de galhas poderia contribuir para o entendimento da interação inseto-planta.

Análises *in silico* foram recentemente efetuadas em uma tentativa de determinar a relação estrutural entre a apirase de batata e outros membros da família das apirases (FARIA-PINTO *et al.*, 2008). Entre as apirases de mamíferos, a que demonstrou maior identidade (29 a 31%) com a apirase de batata foi as NTPDase 5 e 6, que mostrou domínios particulares de alta identidade entre elas (FARIA-PINTO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que NTPDases de mamíferos, e com mais evidências a NTPDase 5, estão envolvidas na proliferação de células tumorais (GENDRON *et al.*, 2002; BUFFON *et al.*, 2007). Os insetos indutores de galha têm a habilidade de alterar o desenvolvimento de tecidos de plantas causando hiperplasia e hipertrofia, formando um crescimento do tipo tumor (MOURA, 2003). Portanto, a apirase de galha de *C. brevipes* pode estar também participando dos mecanismos de proliferação celular. Esta hipótese funcional deverá ser explorada, e o estudo de apirase de *C. brevipes* em nível molecular é um dos objetivos de estudo no Laboratório de Estrutura e função de proteínas (Departamento de bioquímica/UFJF). Atualmente, o gene desta isoforma identificada em tecido não galhado e de galha globosa está sendo clonado. Nosso objetivo é a expressão heteróloga, em quantidade e pureza adequadas, para o estudo cinético e funcional desta enzima neste sistema biológico.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Calliandra brevipes apresenta dois morfotipos de galha, um globoso e um fusiforme, induzidos por *Tanaostigmodes mecanga* e *T. ringueleti*, respectivamente. As variações sazonais no conteúdo fenólico dos dois morfotipos de galha, bem como do tecido de caule e folha não galhados foram analisadas durante o período de 12 meses. O perfil de variação do teor de fenóis totais nos tecidos galhados e não galhados de *C. brevipes* foi similar ao longo do ano, apresentando-se fortemente influenciado pelas variações na precipitação pluviométrica, ocorrendo maior acúmulo de fenóis durante os períodos em que o vegetal estava sob estresse hídrico. Foi também observado que o conteúdo fenólico foi similar em ambas as galhas, e que no período de drásticas mudanças na precipitação pluviométrica, as alterações foram significativamente menores nos tecidos galhados quando comparados aos não galhados, sugerindo que as duas espécies de *Tanaostigmodes* modulam o conteúdo fenólico no tecido galhado de maneira similar em seu benefício. Dessa maneira notou-se que as alterações no conteúdo fenólico podem estar primariamente associadas às mudanças pluviométricas na região estudada, constituindo uma defesa direta contra o estresse hídrico.

A análise para a detecção de metabólitos secundários constatou a presença de derivados fenólicos, como flavonóides, cumarinas e taninos nas amostras de tecido galhado e não galhado de *C. brevipes*. Interessantemente, saponinas foram encontradas somente em amostras de tecidos não galhado, mostrando que o tecido galhado apresenta provavelmente menor toxidez para o herbívoro. Triterpenóides foram somente encontrados na galha globosa, e não na galha fusiforme, sugerindo que cada inseto galhador explora diferencialmente o metabolismo do hospedeiro em seu benefício. Adicionalmente, o conteúdo de flavonóides e a atividade antioxidante também estavam diferenciados em ambas as galhas, sendo maiores na galha fusiforme do que na globosa. Na análise de carboidratos feita por cromatografia e densitometria,

a galha globosa e a galha fusiforme apresentaram um conteúdo de sacarose, glicose e frutose maiores do que os encontrados nas amostras de tecido não galhado, 1,5-3 vezes e 2 vezes, respectivamente em cada galha. A análise pontual dos metabólitos secundários e de carboidratos evidenciou que ambas as galhas apresentam menor toxidez e constituem uma fonte mais rica em nutrientes para os insetos que dela se alimentam do que o tecido não galhado.

O fracionamento de proteínas por SDS-PAGE, associado à análise densitométrica, mostrou polipeptídeos comuns (80, 69, 61, 52, 32 kDa) e específicos a galha globosa (97, 75, 34 kDa) ou fusiforme (40, 33 kDa), sugerindo que de maneira geral as proteínas comuns detectadas são essenciais para a organização de ambas as galhas, enquanto as proteínas específicas podem estar associadas aos distintos morfotipos e suas vias metabólicas. Em conjunto, a análise de proteínas, flavonóides e a atividade antioxidante mostram que cada galhador manipula o hospedeiro de maneira peculiar em seu próprio benefício, o que foi constatado mesmo quando duas espécies de galhadores filogeneticamente tão próximas, pertencentes ao mesmo gênero, parasitam a mesma espécie vegetal. Estas alterações estão possivelmente associadas ao eficiente dreno fisiológico e a maior atividade metabólica das galhas.

Quanto à análise fosfohidrolítica, o caule não galhado hidrolisou igualmente ATP, ADP, UDP ou GDP. Na galha globosa, o UDP, GDP, e ADP foram hidrolisados aproximadamente 1,5-3 vezes mais do que no caule não galhado. O AMP foi 10 vezes mais hidrolisado na galha globosa confirmando que este tecido exacerba os mecanismos capazes de hidrolisar nucleotídeos, possivelmente devido sua maior atividade metabólica. Atividades ADPase e UDPase do caule não galhado e da galha globosa foram 10-32% estimuladas por 5 mM de Ca^{2+} , e quase completamente removidas pela adição de 5 mM EDTA ou EGTA (88 to 100%), confirmando então a dependência a cátions bivalentes. Uma pequena taxa de inibição por ortovanadato foi detectada sugerindo a presença de P-ATPases nas amostras, enquanto azida sódica, DCCD e bafilomicina não inibiram significativamente a atividade ATPásica. Uma apirase de 75 kDa foi identificada nos tecidos de caule não galhado e de galha globosa de *C. brevipes*, e provavelmente este polipeptídeo contribuiu para a atividade fosfohidrolítica apresentada por estes tecidos. Por microscopia de imunofluorescência, pode-se

constatar a presença de apirase predominantemente nas células nutritivas que compõem a câmara larval. Através de técnicas citoquímicas, a atividade ADPásica foi identificada como um depósito denso de fosfato de chumbo homogeneamente distribuído na superfície externa e dentro das células nutritivas. A alta atividade apirásica na galha globosa de *C. brevipes* pode estar associada a biossíntese de carboidratos, recuperação de nucleosídeos e/ou a proliferação celular, contribuindo assim, para a nutrição e sobrevivência do galhador.

No presente trabalho foi detectada pela primeira vez uma isoforma de apirase em tecido não galhado (caule) e em galha globosa de *Calliandra brevipes*, a qual teve sua atividade exacerbada no tecido galhado possivelmente relacionada com a nutrição do galhador e/ou com a formação da cecídia. Portanto, o estudo da apirase em nível molecular pode ser uma ferramenta importante no entendimento da relação inseto-planta, estudo este já iniciado pela equipe do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas (Departamento de Bioquímica/UFJF).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSON, W.G.; WEIS, A. 1987. Nutritional ecology of arthropod gall makers, p. 223-238. in: **Nutritional Ecology of Insects, Mites, Spiders and Related Invertebrates**. SLANSKY JR., F. & RODRIGUEZ, J.D. (Ed.). John Wiley & Sons Inc., New York. 1016p.
- ALLISON, S.D.; SCHULTZ, J.C. 2005. Biochemical responses of chestnut oak to a galling cynipid. **Journal of Chemical Ecology**, **31(1)**:151-166.
- ANICH, M.; FANTA, N.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A.M.; VALENZUELA, M.A.; TRAVERSO-CORI, A. 1990. Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, **29 (5)**: 1411-1415.
- ARDUIN, M.; KRAUS, J.E.; VENTURELLI, M. 1991. Estudo morfológico de galha achatada em folha de *Struthanthus vulgaris* (Loranthaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **14**: 147-156.
- BARREIROS, EL.; DAN, A.M.M.S. 1990. **Flavonóides como marcadores sistemáticos da família Leguminosae**. Tese de Doutorado. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- BARTOLI, C.G.; GÓMEZ, F.; GERGOFF, G.; GUIAMÉT, J.J. 2005. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. **Journal of Experimental Botany**, **56**: 1269-1276.
- BJÖRKMAN, C. 2000. Interactive effects of host resistance and drought stress on the performance of a gall-making aphid living on Norway spruce. **Oecologia**, **123**: 223-231.
- BOWLER, C.; FLUHR, R. 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science, London**, **5(6)**: 241-246.
- BOWMAN, E.M.; SIEBERS, A.; ALTENDORF, K. 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **85**: 7972-7976.
- BOYER, J. S. 1982. Plant productivity and environment. **Science**, **218**: 443-448.

- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, **72**: 248.
- BRONNER, R. 1992. The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids, p. 118-140. In: **Biology of Insect-Induced Galls**. SHORTHOUSE, J.D.; ROHFRICTSCH, O. (ed.). Oxford University Press, Oxford. 285p.
- BUFFON, A.; WINK M.R.; RIBEIRO V.B.; CASALI E.A.; LIBERMANN, A.T.; ZERBINI, L.F.; ROBSON, S.C.; SARKIS J.J.F. 2007. NTPDase and ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1770**: 1259-1265.
- BUSSE, D.; POHL, B.; BARTEL, H.; BUSCHMANN, F. 1980. The Mg²⁺-dependent adenosine triphosphatase activity in the brush border of rabbit kidney cortex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **201**: 147-159.
- CARAFOLI, E. 1991. Calcium pump of the plasma membrane. **Physiological Reviews**, **71**: 129-153.
- CARVALHO, F.M.; ISAIAS, R.M.S.; SOARES, G.L.G. 2005. **Estudos morfológicos de galhas entomógenas de *Calliandra brevipes* Benth (Fabaceae: Mimosoidae)**. Dissertação de Mestrado. Pós Graduação em Comportamento Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 65 p.
- CHEN, Y.R.; ROUX, S.J. 1986. Characterization of nucleoside triphosphatase activity in isolated pea nuclei and its photoreversible regulation by light. **Plant Physiology**, **81**: 609-613.
- CHEN, Y.R.; DATTA, N.; ROUX, S.J. 1987. Purification and partial characterization of a calmodulin-stimulated nucleoside triphosphatase from *pea nuclei*. **Journal of Biological Chemistry**, **262**: 10689-10694.
- CHRISTOFORIDIS, S.; PAPAMARCAKI, T.; TSOLAS, O. 1996. Human placental ATP diphosphohydrolase is a highly N-glycosylated plasma membrane enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1282**: 257-262.
- COHN, J.; DAY, R.B.; STACEY, G. 1998. Legume nodule organogenesis. **Trends in Plant Science**. **3**: 105-110.
- COHN, J.R.; UHM, T.; RAMU, S.; NAM, Y-W.; KIM, D-J.; K., PENMETSA, R.V.; WOOD, T.C.; DENNY, R.L.; YOUNG, N.D.; COOK, D.R.; STACEY, G. 2001. Differential regulation of a family of apyrase genes from *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, **125**: 2104-2119.
- COIMBRA, E.S.; GONALVES-DA-COSTA, S.C.; CORTE-REAL, S.; DE FREITAS, F.G.R.; DURO, A.C.; SOUZA, C.S.F.; SILVA-SANTOS, M.I.; VASCONCELOS, E.G. 2002. Characterization and cytochemical localization of an ATP

- diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, **124**: 137-143.
- COOK, L.G.; GULLAN, P.J. 2008. Insect, not plant, determines gall morphology in the *Apiomorpha pharetrata* species-group (Hemiptera: Coccoidea). **Australian Journal of Ecology**, **47**: 51-57.
- CORNELISSEN, T.G.; FERNANDES, G.W. 2001. Induced defences in the neotropical tree *Bauhinia brevipes* (Vog.) to herbivory: effects of damage-induced changes on leaf quality and insect attack. **Trees**, **15**: 236-241.
- CORNELISSEN, T.G.; FERNANDES, G.W. 2003. Insetos herbívoros e plantas: de inimigos a parceiros? **Ciência Hoje**, **32 (192)**: 24-30.
- CORNELL, H.V. 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipinae (Hymenoptera): why and how? **The American Midland Naturalist**. **110**: 225-234.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites) In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville : American Society of Plant Physiologists, 1250-1318.
- CUEVAS-REYES, P.; SIEBE, C.; MARTÍNEZ-RAMOS, M.; OYAMA, K. 2003. Species richness of gall-forming insects in a tropical rain forest: Correlations with plant diversity and soil fertility. **Biodiversity Conservation**, **12**: 411-422.
- CUEVAS-REYES, P.; QUESADA, M.; HANSON, P.; DIRZO, R.; OYAMA, K. 2004. Diversity of gall-inducing insects in a Mexican tropical dry forest: The importance of plant species richness, life-forms, host plant age and plant density. **Journal of Ecology**, **92**: 707-716.
- DAN, A. M. M. S.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. 1995. Phytlogenetic Alliances of Leguminosae via Flavonoidal Similarities among Angiosperm Families. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, **67(3)**: 443-447.
- DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, **411**: 826-833.
- DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **57**: 779-795).
- DAY, R.B.; MCALVIN, C.B.; LOH, J.T.; DENNY, R.L.; WOOD, T.C.; YOUNG, N.D.; STACY, G. 2000. Differential expression of two soybean apyrases:one of which is an early nodulin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **13**: 1053-1070.

- DEEKEN, R.; ENGELMANN, J.C.; EFETOVA, M.; CZIRJAK, T.; MÜLLER, T.; KAISER, W.M.; TIETZ, O.; KRISCHKE, M.; MUELLER, M.J.; PALME, K.; DANDEKAR, T.; HEDRICH, R. 2006. An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. **The Plant Cell**, **18**: 3617-3634.
- DEMIDCHIK, V.; NICHOLS, C.; OLIYNYK, M.; DARK, A.; GLOVER, B.J.; DAVIES, J.M. 2003. Is ATP a signaling agent in plants? **Plant Physiology**, **133**: 456-461.
- DODSON, G. 1991. Control of gall morphology: tephritid gallformers (*Aciurina* spp.) on rabbitbrush (*Chrysothamnus*). **Ecological Entomology**, **16**: 177-181.
- EDWARDS, J.D.; WRATTEN, S.D. 1980. **Ecology of insect-plant interactions**. The Camelot Press, Southampton 60p.
- ESPINOSA, V.; KETTLUN, A.M.; ZANOCCO, A.; CARDEMIL, E.; VALENZUELA, M.A. 2000. Fluorescence studies of ATP diphosphohydrolase from *Solanum tuberosum* var. Desirée. **Phytochemistry**, **54**: 995-1001
- ETZLER, M.E.; KALSI, G.; EQING, N.N.; ROBERTS, N.J.; DAY, R.B.; MURPHY, J.B. 1999. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **96**: 5856-5861.
- EVANS, D.E.; WILLIAMS, L.E. 1998. P-type calcium ATPases in higher plants – biochemical, molecular and functional properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1376**: 1-25.
- FAILER, B.U.; ASCHRAFI, A.; SCHMALZING, G.; ZIMMERMANN, H. 2003. Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase 2 after heterologous expression in *Xenopus* oocytes. **European Journal of Biochemistry**, **270**: 1802-1809.
- FANTA, N.; ANICH, M.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A.M.; VALENZUELA, M.A.; TRAVERSO-CORI, A. 1988. Starch, adenine nucleotides and apyrase changes during potato tuber development. **Arch. Biol. Med. Exp.**, **21**: 129-133.
- FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M.N.; LENZI, H.L.; MOTA, E.M.; PENIDO, M.L.O.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. **Parasitology**, **129**: 51-57.
- FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F.A.; MOLICA, A.M.; MONTESANO, M.A.; MARQUES, M.J.; ROCHA, M.O.C.; GOMES, J.A.S.; ENK, M.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P.M.Z.; NETO, S.M.; FRANCO, O.L.; VASCONCELOS, E.G. 2008. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasites ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, **135**: 943-953.

- FENG, H.; DUAN, J.; LI, H.; LIANG, H.; LI, X.; HAN, N. 2008. Alternative Respiratory Pathway under Drought is Partially Mediated by Hydrogen Peroxide and Contributes to Antioxidant Protection in Wheat Leaves. **Plant Production Science**, **11(1)**: 59-66.
- FERNANDES, G.W.; MARTINS, R. P. 1985. As galhas: Tumores de Plantas. **Ciência hoje**, **4 (19)**: 58-64.
- FERNANDES, G.W.; PRICE, P.W. 1988. Biogeographical gradients in galling species richness tests of hypotheses. **Oecologia**, **76**: 161-167.
- FERNANDES, G.W.; TAMEIRÃO-NETO, E.; MARTINS, R.P. 1988. Ocorrência e caracterização de galhas entomógenas na vegetação do Campus Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoologia**, **5**: 11-29.
- FERNANDES, G. W. ; PRESZLER, R. W. ; GRIM, T. N. 1990. The occurrence of crystals in a cynipid leaf gall on *Quercus turbinella*. **Beitraege zur Biologie der Pflanzen**, **65**: 377-383.
- FERNANDES, G.W.; PRICE, P.W. 1992. The adaptative significance of insect gall distributions: survivorship of species in xeric and mesic habitats. **Oecologia**, **90**: 14-20.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, **88**: 587-605.
- GENDRON, F.P.; BENREZZAK, O.; KRUGH, B.W.; KONG, Q.; WEISMAN, G.A.; BEAUDOIN, A.R. 2002. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. **Current Drug Targets**, **3**: 229-245.
- GOTTLIEB, M.; DWYER, D.M. 1983. Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular Biochemical Parasitology**, **7**: 303-317.
- GOVIDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A.K.S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*, **Biol. Pharm. Bull.** **26**: 1424–1427.
- HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1102-1156.
- HANDA, M.; GUIDOTTI, G. 1996. Purification and cloning of soluble ATP diphosphohydrolase (apyrase) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). **Biochememical Biophysical Research Communications**, **218**: 916-923.

- HARBONE J.B. 1971. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**, J.B. Harbone, D. Boulter, B. L. Turner. Academic Press, London 1971; 277
- HARBONE, J.B.; GRAYER, R.J. 1993. Flavanoids and insects. In **The Flavanoids: Advances in Research since 1980**, (ed) Harbone JB, London: Chapman and Hall.
- HARBONE, J.B. 1994. **Introduction to ecological biochemistry**. 4^a ed. Academic Press, London, 318p.
- HARLOW, E.; LANE, D. 1988. **Antibodies: A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- HARPER, L.G., SHÖNROGGE, K., LYM, K.Y., FRANCIS, P., LICHTENSTEIN C.P. 2004. Cynipid galls: insect-induced modifications of plant development create novel plant organs. **Plant, Cell and Environment** **27**: 327:335.
- HARTLEY, S.E. 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrient and secondary compounds controlled by the gall-former? **Oecologia**, **113**, 492-501.
- HARTLEY, S.E. e LAWTON, J.H. 1992. Host-plant manipulation by insects: a test of the nutrition hypothesis. **Journal of Animal Ecology**, **61**: 133-119.
- HERMS, D.A. e MATTSON, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quaternary Review of Botanic**, **67**: 283-335.
- HOSTETTMANN, K; MARSTON, A. 1995. **Saponins**. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press; 1995. pp. 1–548.
- ISAIAS, R. M. S. 1998. **Galhas entomógenas em *Macherium* (Leguminosae-Papillionoideae): anatomia e histoquímica**. Tese de Doutorado. USP. São Paulo, 168p.
- JOHNSON, H.B. 1975. Plant pubescence: an ecological perspective. **Botanic Review**, **41**: 233-258.
- JOLIVET, P. 1998. **Interrelationship between insects and plants**. CRC Press, Boca Raton, 308pp.
- JONES J.D.G.; DANGL, J.L. 2006. The plant immune system. **Nature Reviews**, **444**: 323-329.
- JOYCE, B.K.; GRISOLIA, S. 1960. Purification and properties of a nonspecific acid phosphatase from wheat germ. **Journal of Biological Chememistry**, **235**: 2278-2281.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. 1999. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.J.R. 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **366**: 351-376.
- KARBAN, R. & BALDWIN, I.T. 1997. **Induced responses to herbivory**. Chicago, The University of Chicago Press. 330p.
- KETTLUN, A.M., URRÁ, R., LEYTON, M., VALENZUELA, M.A., MANCILLA, M., TRAVERSO-CORI, A. 1992a. Purification and characterization of two isoapyrases from *Solanum tuberosum* var. *Ultimus*. **Phytochemistry**, **31**: 3691-3696.
- KETTLUN, A.M.; URIBE, L.; SILVA, S.; RIVERA, J.; VALENZUELA, M.A.; TRAVERSO-CORI, A. 1981. Chemical modification of aromatic, acid and basic amino acids of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. **Archivos de Biología Y Medicina Experimentales**, **14**: 171-175
- KETTLUN, A.M., LEYTON, M., VALENZUELA, M.A., MANCILLA, M.; TRAVERSO-CORI, A. 1992b. Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, **31**: 1889-1894.
- KETTLUN, A.M., URIBE, L., CALVO, V., SILVA, S., RIBERA, J., MANCILLA, M., VALENZUELA, M.A.; TRAVERSO-CORI, A. 1982. Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, **21**: 551-558.
- KETTLUN, A.M.; ESPINOSA, V.; ZANOCCO, A.; VALENZUELA, M.A. 2000. Studies on ATP diphosphohydrolase-binding sites by intrinsic fluorescence. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **33**: 725-729
- KETTLUN, A.M.; ESPINOSA, V.; GARCIA, L.; VALENZUELA, M.A. 2005. Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. **Phytochemistry**, **66**: 975-982
- KHODAPARAST-SHARIFI, S.H.; SNOW, L.D. 1989. Levamisole inhibition of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase of bovine milk fat globule membranes. **International Journal of Biochemistry**, **21**: 401-405.
- KIM, S.Y.; SIVAGURU, M.; STACEY, G. 2006. Extracellular ATP in Plants. Visualization, Localizatin, and Analysis of Physiological Significance in Growth and Signaling. **Plant Physiology**, **142**: 984-992.
- KRAUS, J.E.; ISAÍAS, R.M.S.; VECCHI, C.; FERNANDES, G.W. 1998. Structure of insect galls on two sympatric subspecies of *Chrysothamnus nauseosus* (Pall. Ex. Pursh) Britton (Asteraceae). **Botânica São Paulo**, **21(2)**: 251-263.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. **Nature**, **227**: 680-685.

- LARSON, K.C. 1998. The impact of two gall-forming arthropods on the photosynthetic rates of their hosts. **Oecologia**, **115**: 161-166.
- LASCANO, H.R.; ANTONICELLI, G.E.; LUNA, C.M.; MELCHIORRE, M.N.; GOMEZ, L.D.; RACCA, R.W.; TRIPPI, V.S.; CASANO, L.M. 2001. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: Field and in vitro studies. **Australian Journal of Plant Physiology**, **28**: 1095-1102.
- LEVIN, D.A. 1973. The role of trichomes in plant defense. **Quaternary Review Biology**, **48**: 3-15.
- LEW, R.R.; DEARNALEY, J.D.W. 2000. Extracellular nucleotide effects on the electrical properties of growing *Arabidopsis thaliana* root hairs. **Plant Science**, **153**: 1-6.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. 1995. **Plantas ornamentais no Brasil - ornamentais, herbáceas e trepadeiras**. Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa-SP, 720p.
- MABBERLEY, D.J. 1997. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. Cambridge University Press, Cambridge. 858p.
- MAIA, V.C.; FERNANDES, G.W. 2004. Insect galls from Serra de São José (Tiradentes, MG, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, **64 (3A)**: 423-445.
- MANCILLA, M.; KETTLUN, A.M.; VALENZUELA, M.A.; TRAVERSO-CORI, A. 1984. Structural studies of two apyrases from *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, **23**: 1397-1400.
- MANI, M.S. 1964. **Ecology of plant galls**. The Hague. Dr. W. Junk Publishers, 434p., ill
- MANI, M.S. 2000. **Plant galls of India**. Science Publishers, Inc. 477p.
- MATOS, F.J.A. 1997. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza Edições UFC, 2 ed., 141p.
- MEYER, J.; MARESQUALLE, H.J. 1983. **Anatomie des galles**. Gebrüder Borntraeger. Berlin. 662p.
- MEYER, J. 1987. **Plant galls and gall inducers**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 291p. il.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237.
- MITCHELL-OLDS, T. *et al.* 1998. Chemical ecology in the molecular era. **Trends in Plant Science**, London, v.3, n.9, p.362-365.

- MOTTA, L.B.; KRAUS, J.E.; SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F. 2005. Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **33**: 971-981.
- MOURA, M.L.Z.D. 2003. **Resistência, susceptibilidade e indução de galhas em *Lantana camara* L. (Verbenaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 92p.
- NAKAMURA, T.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y. 1994. Studies on the constituents of *Calliandra anomala* (Kunth) Macbr. II. Structure elucidation of four acylates triterpenoidal saponins. **Chemical Pharmacology Bull**, **42(5)**: 1111-1115.
- NYMAN, T.; JULKUNEN-TITTO, R. 2000. Manipulation of phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **97 (24)**: 13184-13187.
- OCCHIONI, P. 1979. "Galhas", "Cecídios" ou "Tumores Vegetais" em plantas nativas da flora do Brasil. **Leandra** **8**: 5-35.
- PANDA, N.; KHUSH, G.S. 1995. **Host plant resistance to insects**. CAB International, Wallingford. 352p.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. 1995. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, cap.22, p.417-453.
- PAULSON, J.C. 1989. Glycoproteins: what are the sugar chains for? **Trends in Biochemical Sciences**, **14**: 272-276.
- PEDERSON, P.L.; CARAFOLI, E. 1987. Ion motive ATPases. **Trends in Biochemical Sciences**, **12**: 146-150.
- PENIDO, M.L.; RESENDE, D.M.; VIANELLO, M.A.; BORDIN, F.H.S.; JACINTO, A.A.; DIAS, W.D.; MONTESANO, M.A.; NELSON, D.L.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. 2007. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, **570**: 10-17
- PENTEADO-DIAS, A.M.; CARVALHO, F.M. 2008. News species of Hymenoptera associated with galls on *Calliandra brevipes* Benth. (Fabaceae: Mimosoidea) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** **52 (3)**: 305-310.
- PLESNER, L. 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. **International Review of Cytology**, **158**: 141-214.

- PRICE, P. W.; FERNANDES, G.W.; WARRING, G.L. 1987. Adaptive nature of insect galls. **Environmental Entomology**, **16**: 15-24.
- PRINSEN, E.; RIIDELSHEIM, P.; ONCKELEN H. V. 1991. Extraction, purification and analysis of endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid. In I Negrutiu, G Gharti-Chhetri, eds, **A Laboratory Guide for Cellular and Molecular Plant Biology**. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp 198-209
- RANADE, S.; DAVID, S.B. 1985. Quinones as plant growth regulators. **Plant Growth Regulation**, **3**: 3-13.
- RAY, S.D.; LALORAYA, M.M. 1984. Interaction of gibberellic acid, abscisic acid and phenolic compounds in the control of hypocotyls growth of *Amaranthus caudatus* seedlings. **Canadian Journal of Botany**, **62**: 2047-2052.
- REDFERN, M.; ASKEW, R.R. 1992. **Plant Galls**. Richmond Pub. Slough. 99p
- REHILL, B.J.; SCULTZ, J.C. 2003. Enhanced invertase activities in the galls of *Hormaphis hamamelidis*. **Journal of Chemical Ecology**, **29 (12)**: 2703-2720.
- RIEWE, D.; GROSMAN, L.; FERNIE, A.R.; WUCKE, C.; GEIGENBERGER, P. 2008. The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth and development. **Plant Physiology**, **147**: 1092-1109.
- ROSENTHAL, G.A.; BERENBAUM, M.R. 1991. **Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites: ecological and evolutionary processes**. 2^a ed. Vol. 1. Academic Press, New York. 961p.
- ROUX, S.J.; STEINEBRUNNER, I. 2007. Extracellular ATP: an unsuspected role as a signaler in plants. **Trends in Plant Science**, **12(11)**: 522-527.
- SHORTHOUSE, J.D. 1986. Significance of nutritive cells in insect galls. **Proceedings of Entomological Society (Washington)** **88**: 368-375.
- SHORTHOUSE, J.D.; ROFRISTSH, O. 1992. **Biology of insect-induced galls**. Oxford University, Press Oxford, 285p.
- SHÖNROGGE, K.; HARPER, L.J.; LICHTENSTEIN, C.P. 2000. The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): similarities between cynipid galls and seeds. **Plant, Cell and Environment**, **23**: 215-222.
- SILVA, I.M.; GIOVANNA, I.A.; FERNANDES, G.W. 1995. Os tumores e seus impactos nas plantas. **Ciência Hoje**, **18 (108)**: 29-30.
- SMITH, T.M.; KIRLEY, T.L. 1999. Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase. **Biochemistry**, **38**: 1509-1516.

- SOARES, G.L.G.; KAPLAN, M.A.C. 1996. **Flavonóides como Indicadores de Tendências Filogenéticas em Linhagens Vegetais**. Tese de Doutorado. Doutorado em Ciências (Química de Produtos Naturais). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
- SOARES, G.L.G.; ISAIAS, R.M.S.; GONÇALVES, S.J.M.R.; CHRISTIANO, J.C.S. 2000. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zoociências, 2**: 103-116.
- STALIKAS, C.D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science, 30**: 3268-3295.
- STOUT, J.G.; KIRLEY, T.L. 1996. Control of cell membrane ecto-ATPase by oligomerization state: intermolecular cross-linking modulates ATPase activity. **Biochemistry, 35**: 8289-8298.
- TAFT, J.B.; BISSING, D.R. 1988. Developmental anatomy of the horned oak gall induced by *Callirhytis cornigera* on *Quercus palustris* (pin oak). **American Journal of Botany, 75**: 26-36.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2002. **Plant Physiology**. Sinauer Associates. 679p.
- TANG, W.; BRADY, S.R.; SUN, Y.; MUDAY, G.K.; ROUX, S.J. 2003. Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport. **Plant Physiology, 131**: 147-154.
- TAUSSKY, H.M.; SHORR, E. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **Journal of Biological Chemistry, 202**: 675-685.
- THIÉBAUT, M. 2000. A foliar morphometric approach to the study of Salicaceae. **Botanic Review, 66**: 423-439.
- THOMAS, C.; SUN, Y.; NAUS, K.; LLOYD, A.; ROUX, S.J. 1999. Apyrase functions in plant phosphate nutrition and mobilizes phosphate from extracellular ATP. **Plant Physiology, 119**: 543-551.
- THOMAS, C.; RAJAGOPAL, A.; WINDSOR, B.; DUDLER, R.; LLOYD, A.; ROUX, S.J. 2000. A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. **Plant Cell, 12**: 519-534.
- TOGNOLI, L.; MARRÉ, E. 1981. Purification and characterization of a divalent cation-activated ATP-ADPase from pea stem microsomes. **Biochimica et Biophysica Acta, 642**: 1-14.
- TRAVERSO-CORI, A.; CHAIRMOVICH, H.; CORI, O. 1965. Different molecular forms of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics, 137**: 133-142.

- TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, **166**: 444.
- VALENZUELA, M.A.; DEL CAMPO, G.; MARIN, E.; TRAVERSO-CORI, A. 1973. Effects of protein-modifying reagents on an isoenzyme of potato apyrase. **The Biochemical Journal**, **133**: 755-763.
- VARA, F.; SERRANO, R. 1981. Purification and characterization of a membrane-bound ATP-diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chick-pea) roots. **Biochemical Journal**, **197**: 637-643.
- VARKI, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, **3 (2)**: 97-130.
- VASCONCELOS, E.G.; FERREIRA, S.T.; CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W.; KETTLUN, A.M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, **271**: 22139-22145.
- VASCONCELOS, E.G.; FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F.A.; PENIDO, M.L.; GONÇALVES-DA-COSTA, S.C.; COELHO, P.M.Z. 2008. "Potato Apyrase: A New Tool for Parasitic Disease Research" In special issue of "**Potato Biotechnology**" in FVCSB (P Tennant and N Benkeblia, eds). Global Science Books Ltd., UK. (*In press*)
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. 1994. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford.Blackwell Scientific Publications. 238p.
- WEBER, J.; SENIOR, A.E. 1998. Effects of the inhibitors azide, dicyclohexylcarbodiimide, and aurovertin on nucleoside binding to the three F1-ATPase catalytic sites measured using specific tryptophan probes. **Journal of Biological Chemistry**, **273**: 33210-33215.
- WEIS, A.E.; WALTON, R.; CREGO, C. L. 1988. Reactive plant tissue sites and the population biology of gall makers. **Annual Review of Entomology**, **33**: 467-486.
- WINK, M. 1999. Biochemistry of plant secondary metabolism annual. **Annual Plant Reviews (2)**. Sheffield. Academic Press. 374p.
- ZHONG, K.; MALHOTRA, R.; WOODRUFF, R.; GUIDOTTI, G. 2001. Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly. The N-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization. **Journal of Biological Chemistry**, **276**: 41518-41525.
- ZIMMERMANN, H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochemical Journal**, **285**: 345-365.

ZIMMERMANN, H. 1999. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, **20**: 231-236.