

Variación en el contenido de clorofilas, carotenos y antocianos en agallas inducidas por *Neolithus* spp. (Hemiptera: Psyllidae) sobre *Sapium haematospermum* (Euphorbiaceae)

Variation in the Content of Chlorophylls, Carotenoids and Anthocyanins in Galls Induced by *Neolithus* spp. (Hemiptera: Psyllidae) in *Sapium haematospermum* (Euphorbiaceae)

Agudelo, Ignacio*; Marcelo Wagner; Rafael Ricco

Cátedra de Farmacobotánica, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

* Autor corresponsal: iagudelo@ffyb.uba.ar

► **Resumen** — Agudelo, Ignacio; Marcelo Wagner; Rafael Ricco. 2017. "Variación en el contenido de clorofilas, carotenos y antocianos en agallas inducidas por *Neolithus* spp (Hemiptera: Psyllidae) sobre *Sapium haematospermum* (Euphorbiaceae)". *Lilloa* 54 (2). *Sapium haematospermum* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) es un árbol nativo de América del Sur que suele ser infestado por psílidos del género *Neolithus*, los cuales generan agallas en sus hojas. El insecto induce cambios anatómicos y bioquímicos que resultan en la formación de una nueva estructura con una disposición de tejidos característica que cumple la función de proteger al huésped. Se obtuvieron fotografías de agallas rojas, verdes y frutos. Se realizaron mediciones espectrofotométricas de clorofila a y b, carotenoides y antocianos totales sobre agallas rojas, verdes y hojas sanas. Se efectuaron cortes transversales para conocer la localización tisular de los pigmentos y se caracterizó el aglicón principal mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos. Las agallas tuvieron una concentración de clorofilas totales y carotenoides mucho más baja que la de las hojas sanas. Los antocianos se encontraron únicamente en la epidermis de la agalla roja, donde se registró mayor concentración de estos compuestos, cuyo aglicón fue principalmente cianidina. La hoja sana y la agalla verde no tuvieron cantidades detectables de estos pigmentos. Las agallas registraron concentraciones menores de pigmentos fotosintéticos, lo que da idea del carácter de sumidero de fotoasimilatos de estas estructuras. Los antocianos corresponden a glicósidos de cianidina principalmente y se ubican en la epidermis externa; debido a esta localización cumplirían una función relacionada con la defensa aposemática frente a predadores y la protección frente a la radiación UV.

Palabras clave: *Sapium*, psílido, agallas inducidas por insectos, antocianos, cianidin, pigmento fotosintético.

► **Abstract** — Agudelo, Ignacio; Marcelo Wagner; Rafael Ricco. 2017. "Variation in the content of chlorophylls, carotenoids and anthocyanins in galls induced by *Neolithus* spp (Hemiptera: Psyllidae) in *Sapium haematospermum* (Euphorbiaceae)". *Lilloa* 54 (2). *Sapium haematospermum* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) is a tree native to South America and is usually infested by psyllids of the *Neolithus* genus, which induce the formation of galls in its leaves. The insect induces anatomical and biochemical changes that form a new structure with a particular tissue arrangement to protect the host. Photographs of red galls, green galls and mature fruit were obtained. Chlorophyll a and b, carotenoid pigments and anthocyanins were measured by spectrophotometric techniques. Also transversal cuts were performed in order to know the histological disposition of the anthocyanin compounds; the aglycone compound was characterized by chromatographic and spectrophotometric methods.

Galls had a lower concentration of chlorophylls and carotenoids compared to healthy leaves. Anthocyanins were found in the external epidermis of red galls; this organ had the largest concentration of these pigments and the main aglycone was cyanidin. Green galls and healthy leaves didn't have a detectable amount of these substances. Galls had a lower concentration of photosynthetic pigments; this is an indicator of a reduced photosynthesis typical of photoassimilates sinks. The anthocyanins are mainly cyanidin glycosides and are located in the external epidermis; this indicates and aposematic and/or an UV-protection function.

Keywords: *Sapium*, psyllid, insect induced plant galls, anthocyanin, cyanidin, photosynthetic pigment.

INTRODUCCIÓN

Sapium haemospermum Müll. Arg. (Euphorbiaceae) es un árbol laticífero propio de las regiones subtropicales de América del Sur. Puede llegar a medir 10 metros de altura y posee corteza lisa y clara y hojas pecioladas. Su fruto es una cápsula piriforme que se abre dejando a la vista tres semillas de color rojo. Es muy frecuente en lugares húmedos y forma parte de las selvas en galería de la Argentina (Cabrera y Zardini, 1978). Su látex posee proteasas y es empleado en la medicina popular contra el dolor de muelas (Lahitte, 1998).

Es infectado por psílidos del género *Neolithus* que producen agallas en las partes verdes de la planta como hojas y frutos inmaduros; dichas agallas pueden estar solas o asociadas y presentarse en color verde o rojo. (Schneeberger, 1973).

Las agallas son estructuras anómalas inducidas por insectos los cuales las emplean como refugio para llevar a cabo parte de su ciclo vital, obteniendo de esta manera tres ventajas principales: protección de las condiciones ambientales, protección contra depredadores y una nutrición mejorada (Shorthouse y Rohfritsch, 1992; Hartley, 1998; Stone y Schönrogge, 2003). Estas características llevan a alteraciones no sólo físicas sino también en la expresión de metabolitos secundarios (Braganca *et al.*, 2016 ; Nyman y Julkunen-Tiito, 2000; Guedes *et al.*, 2016; Rand *et al.*, 2017).

Los antocianos son metabolitos secundarios coloreados de naturaleza polifenólica y, junto con los carotenos y las betalainas, son los principales pigmentos de color distinto del verde dentro de los vegetales superio-

res. Poseen numerosas funciones fisiológicas y ecológicas relacionadas con la fotoprotección, el aposematismo y la antioxidación de las estructuras subcelulares (Gould, 2004). Muchas agallas inducidas por insectos son coloreadas en algún momento de su ciclo vital, aunque el rol específico de esta coloración ha sido motivo de controversia entre investigadores (White, 2010; Steyn *et al.*, 2002)

Además, las agallas son sumideros de fotoasimilatos y tienden a tener un carácter heterótrofo dentro de la planta debido a la acción del insecto inductor. Por esta razón suelen tener alteraciones en su contenido de clorofila y carotenoides (Huang *et al.*, 2011 y 2014; Castro *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo es conocer la variación en el contenido de clorofila a, clorofila b, carotenos y antocianos en agallas verdes, rojas y hojas sanas y, en el caso de los antocianos, conocer su ubicación anatómica y la naturaleza química del aglicón mayoritario y de esta manera establecer las funciones que cumplirían estos compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL RECOLECTADO

ARGENTINA. Prov. Buenos Aires, Partido de Zárate, -34.087237S -59.028389°, 0 m snm, 07-II-2017, BAF IJA002. Se identificó el material en base a las guías taxonómicas de Cabrera (Cabrera y Zardini, 1978).

CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A, CLOROFILA B Y CAROTENOIDES

Se analizó el contenido de clorofila a, b y carotenoides, a partir de extractos elaborados con 1 gramo de material fresco en 100

ml de acetona 80%, por el método espectrofotométrico de Lichtenthaler y Wellburn (1983).

CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS

Se realizó mediante la técnica de cuantificación por espectroscopía diferencial, según una modificación de la técnica de Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2008). Se elaboró un extracto de material fresco al 1% con metanol: ácido clorhídrico (100:0.1). Brevemente, a una alícuota del extracto (100 μ l) se le adicionó una solución buffer KCl pH 1,0 (1900 μ l). Se realizaron las lecturas a 520 nm y 700 nm. Luego se efectuaron nuevamente las lecturas en buffer acetato de sodio pH 4,5 (100 μ l de extracto en 1900 μ l de buffer). Se calcularon las diferencias de absorbancia: (A520 nm – A700 nm)pH1 – (A520 nm – A700 nm) pH 4,5. Se expresó el contenido de antocianos como antocianos totales equivalentes a cianidina-3-glucósido (ug de cianidina-3-glucósido/g material fresco).

CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANIDINAS

Se elaboró un extracto al 1% de material fresco con metanol: ácido clorhídrico (99:1) como solvente, el cual fue llevado a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El residuo se redisolvió en 5 mL de HCl 2N y se llevó posteriormente a 100° C en un baño de agua durante una hora. Los antocianos se hidrolizan y se liberan antocianidinas, las que son extraídas con alcohol amílico. Se aislaron estas agliconas mediante cromatografía en capa delgada (TLC y HPTLC) de celulosa de la fracción amílica, en los solventes Forestal (ácido acético-ácido clorhídrico-agua, 30:3:10) y Fórmico (ácido fórmico- ácido clorhídrico-agua, 5:2:3). Se realizaron cromatografías en TLC y HPTLC de celulosa empleando distintos solventes: Fórmico, Forestal y BAA (butanol-ácido acético-agua, 6:1:2), frente a un testigo de cianidina. También se emplearon métodos de espectroscopía UV-visible; se observó el espectro del extracto empleado para la cuantificación de antocianos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron las diferencias entre órganos y entre individuos mediante el test de Tukey empleando el software embebido open source en la página web http://astat-sa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/. Se estableció la significancia estadística en $p < 0.05$.

UBICACIÓN HISTOLÓGICA DE ANTOCIANOS

Se realizaron cortes a mano alzada sin ningún tipo de tratamiento para conocer la ubicación de los pigmentos caracterizados.

RESULTADOS

Las agallas verdes, rojas y frutos maduros se encuentran en las figs. 1, 2 y 3 respectivamente. Los resultados de las mediciones se encuentran en los gráficos 1 y 2; en todos los casos observados las diferencias observadas en todas las mediciones fueron estadísticamente significativas.

La anatomía de las agallas rojas (Fig. 4), agallas verdes (Fig. 5 y 6) y hojas sanas (Fig. 7 y 8), se observa que todos los órganos tienen cloroplastos, pero que únicamente la agalla roja tiene pigmentos de color rojo ubicados en la epidermis externa.

Los resultados observados en los cromatogramas (Fig. 9 y 10) y en el análisis espectroscópico UV del extracto a cuantificar (Fig. 10 y 11) señalan la presencia de cianidina en el hidrolizado; en este último ensayo se observa un pico de absorbancia a 536 nm.

DISCUSIÓN

La disminución en el contenido de clorofilas totales y la ausencia de parénquima en empalizada dan en la agalla idea de una función fotosintética disminuida. Las agallas forman sumideros de fotoasimilatos, que serían empleados para mantener la estructura y como fuente de energía para el insecto. Sin embargo, se han reportado agallas con características similares pero que tienen tasas de fotosíntesis similares a las hojas sanas (Oliveira *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*,

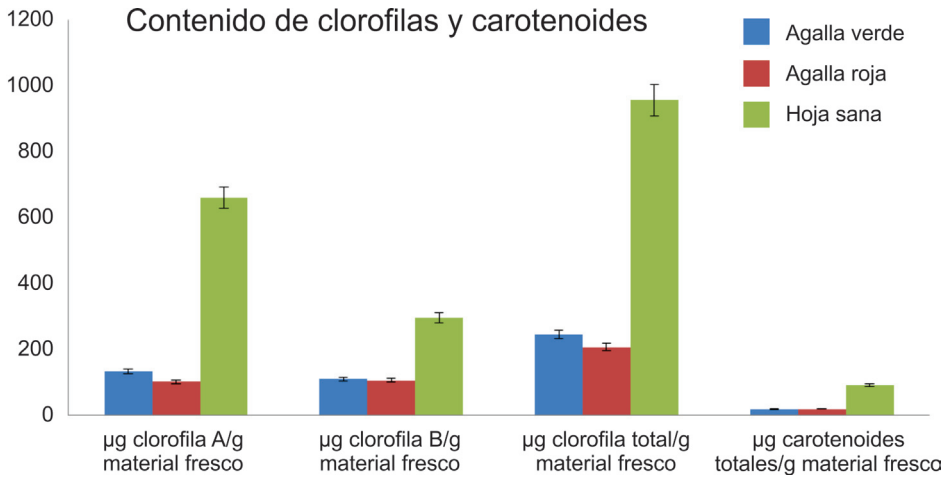


Gráfico 1. Contenido de clorofila a y b, clorofila total y carotenoides totales en agalla roja, agalla verde y hoja sana.

2010). De acuerdo a lo propuesto por otros autores, la fotosíntesis de la agalla, por pequeña que fuera, independizaría aunque sea parcialmente a los huéspedes de los fotoasimilatos producidos por las estructuras sanas, y reduciría la competencia entre individuos por estos recursos (Haiden *et al.*, 2012).

Si bien existen numerosas hipótesis respecto del color de las agallas, la ubicación epidérmica de estos pigmentos indicaría una función o funciones relacionadas con la in-

teracción con factores abióticos y bióticos en vez de un rol de protección del mesofilo. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el color de las agallas inducidas por *Neolithus* spp. sobre *S. haematospermum* es producido principalmente por glicósidos de cianidina, dada la coincidencia entre el espectro observado y el reportado por Harborne (1973) y Markham (1982) para esta sustancia. Esta antocianidina es una de las más frecuentes en el reino vegetal y en esta

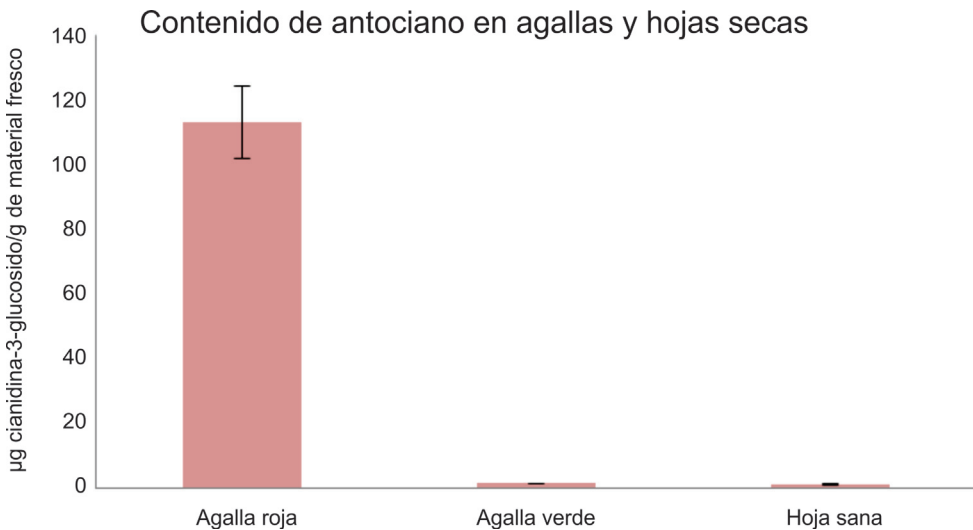


Gráfico 2. Contenido de antocianos totales en agalla verde, roja y hoja sana.



Fig. 1. *Sapium haematospermum*. Agalla verde.



Fig. 2. *Sapium haematospermum*. Agalla roja.



Fig. 3. *Sapium haematospermum*. Fruto con semillas coloreadas.

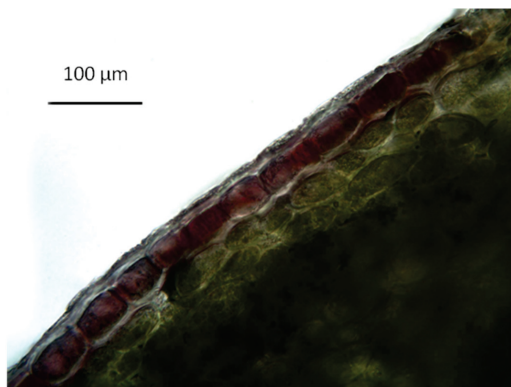


Fig. 4. Epidermis externa de agallas rojas (200X).

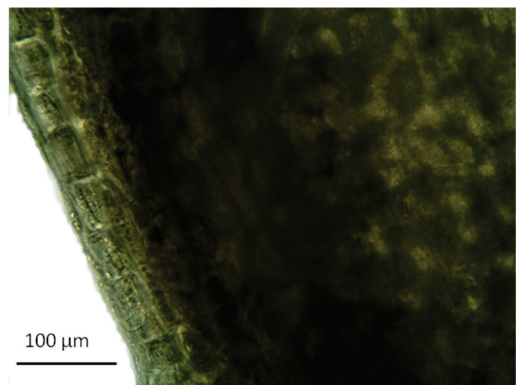


Fig. 5. Epidermis externa de la agalla verde (200X).

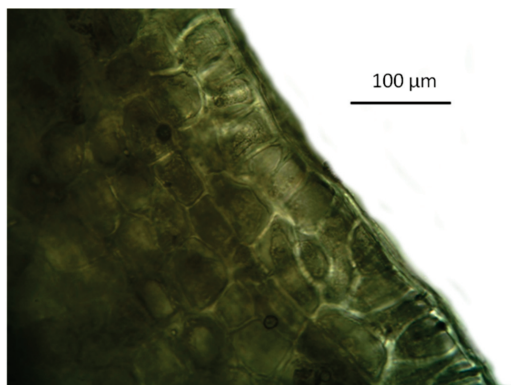


Fig. 6. Epidermis interna de la agalla verde (200X).

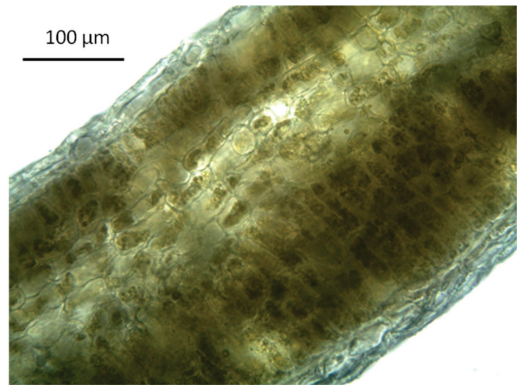


Fig. 7. Anatomía foliar de hoja sana (200X).

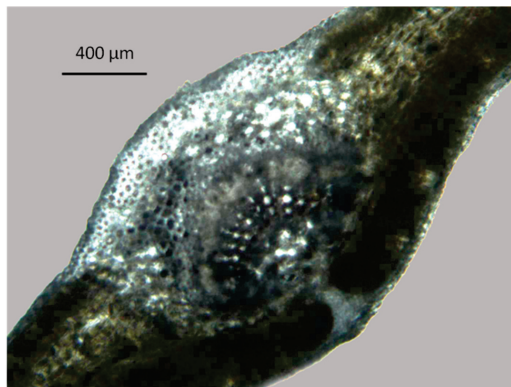


Fig. 8. Haz central de la hoja sana (50X).

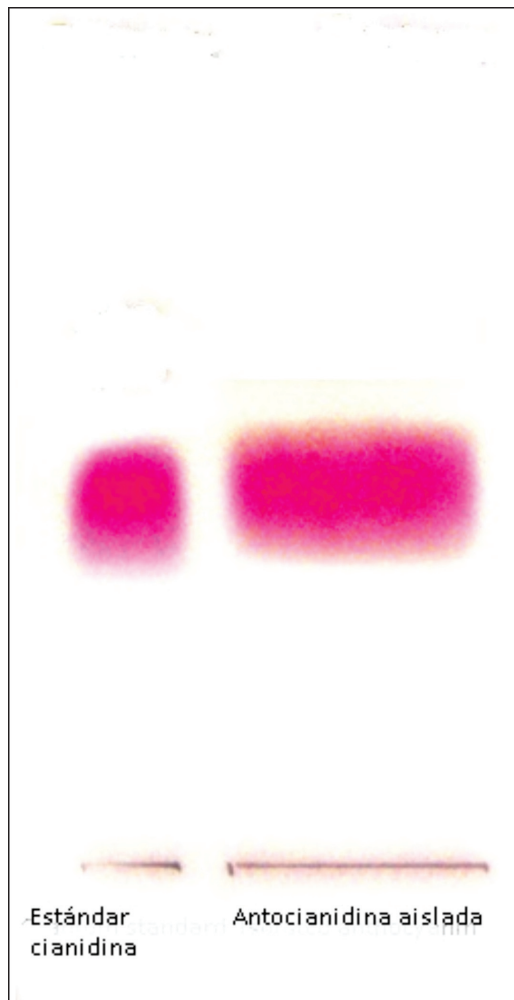


Fig. 9. TLC del hidrolizado de la agalla roja (FE: Celulosa, FM: Forestal).

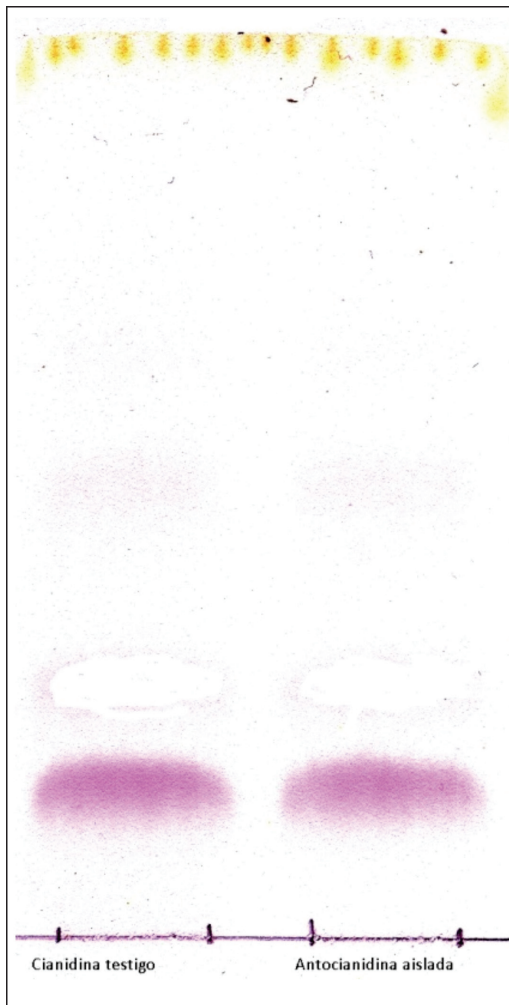


Fig. 10. TLC del hidrolizado de la agalla roja (FE: Celulosa, FM: Fórmico).

interacción podría tener un rol aposemático debido a que las semillas de este árbol son rojas también. Como se mencionó antes, estos pigmentos suelen tener un rol relacionado con la antioxidación y se ha postulado que poseerían propiedades protectoras contra el estallido oxidativo y la fotoinhibición (Agati *et al.*, 2012). En este caso puntual, si existiera un rol relacionado con la inhibición de la fotosíntesis sería razonable ver un incremento en la cantidad de carotenos, que también poseen un rol antioxidante. A pesar de esto, la configuración ortodihidroxi en el anillo B tiene un poder antioxidante mayor que los análogos monohidroxilados; la radiación UVB

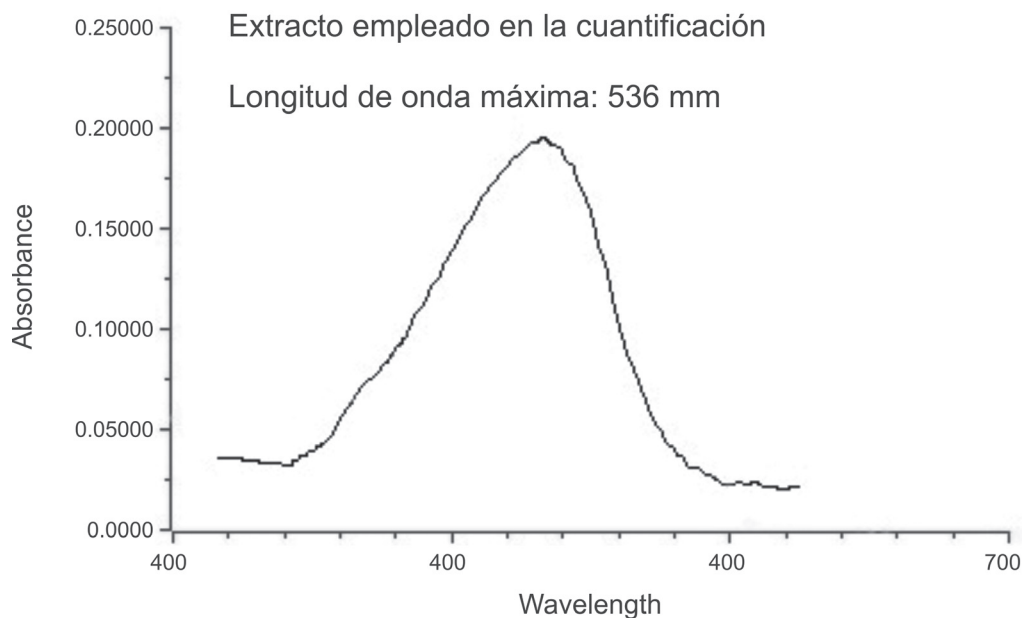


Fig. 11. Espectro UV del extracto cuantificado.

suele aumentar la producción de compuestos polifenólicos con esta configuración (Vanderauwera, 2005; Halbwirth, 2010).

Cabe destacar que estudios ecológicos previos indican que las semillas son consumidas por pájaros de diversas familias como Emberizidae y Tyrannidae (Peña y Pensiero, 2003); esto le resta fuerza a la hipótesis del aposematismo, a pesar de la notable similitud entre las semillas exhibidas por el fruto abierto dehiscente y las agallas rojas. Quizás este aposematismo no esté relacionado con la herbivoría sino con la acción de himenópteros parasitoides, y los glicósidos de cianidina enmascaren la agalla frente a estos predadores.

Otro posible rol está relacionado con la capacidad de bloquear la radiación UV. Algunos autores señalan que ciertos sistemas de agallas inducidas por psílidos son rojos mientras el inductor es joven, y se vuelven verdes en la madurez del insecto (Dias *et al.*, 2013). No debe descartarse que este compuesto polifenólico coloreado tenga numerosas funciones durante un período específico; la absorción de longitudes de onda dañinas para las ninfas durante estadios larvales tem-

pranos disminuiría la mortalidad y mejoraría la performance de los futuros adultos. La presencia de este pigmento específicamente en la epidermis brinda sustento a esta hipótesis.

Son necesarios estudios de ecológicos para conocer el impacto de la herbivoría y el parasitoidismo sobre las agallas rojas, verdes y las semillas de *S. haematospermum*, así como estudios de naturaleza química para conocer el contenido de metabolitos primarios y secundarios de estas estructuras y de naturaleza anatómica e histoquímica para saber si existen diferencias en el desarrollo de haces vasculares y tubos laticíferos, ya que los primeros son importantes para la nutrición de las ninfas y los segundos tienen una función defensiva frente a predadores. Schneeberger ha realizado un trabajo pionero al respecto, que debería ser ampliado para conocer los gradientes histoquímicos de metabolitos primarios y secundarios.

CONCLUSIONES

Las agallas inducidas por *Neolithus spp.* sobre *S. haematospermum* son deficientes en

clorofila y carotenos aunque son necesarios estudios de tasa fotosintética para determinar en qué grado estas estructuras actúan como sumidero de fotoasimilatos; las agallas de color rojo tienen presencia de glicósidos de cianidina, que cumplirían un rol en la defensa de la agalla frente a predadores externos y condiciones ambientales adversas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Lic. Nicolás Kuzmanich del Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba (Córdoba, Argentina) por su apoyo bibliográfico. Este trabajo fue financiado con un subsidio UBA 20020130100641BA (Programación Científica 2014-2017).

BIBLIOGRAFÍA

- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196: 67-76.
- Bragança G. P., Oliveira D. C., Isaias R. M. D. S. 2016. Compartmentalization of Metabolites and Enzymatic Mediation in Nutritive Cells of Cecidomyiidae Galls on *Piper arboreum* Aubl. (Piperaceae). *Journal of Plant Studies* 6 (1): 11.
- Cabrera A. L., Zardini E. M. 1979. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Ed. Acme. Buenos Aires, 278 pp.
- Castro A., Oliveira D., Moreira A., Lemos-Filho J., Isaias R. 2012. Source-sink relationship and photosynthesis in the horn-shaped gall and its host plant *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 83: 121-126.
- Dias G. G., Moreira G. R. P., Ferreira B. G., Isaias R. M. D. S. 2013. Why do the galls induced by *Calophya duvauae* Scott on *Schinus molle* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae) change colors?. *Biochemical Systematics and Ecology* 48: 111-122.
- Fernandes G., Coelho M., Lüttge U. 2010. Photosynthetic efficiency of *Clusia arrudae* leaf tissue with and without Cecidomyiidae galls. *Brazilian Journal of Biology* 70 (3): 723-728.
- Gould K. S. 2004. Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2004 (5): 314-320.
- Guedes L. M., Aguilera N., Becerra J., Hernández V., Isaias R. M. D. S. 2016. Leaf and stem galls of *Schinus molle* (Cav.) Cabrera (Anacardiaceae): Anatomical and chemical implications. *Biochemical Systematics and Ecology* 69: 266-273.
- Haiden S. A., Hoffmann J. H., Cramer M. D. 2012. Benefits of photosynthesis for insects in galls. *Oecologia* 170 (4): 987-997.
- Halbwirth H. 2010. The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 11 (2): 595-621.
- Harborne J. B. 1973. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman & Hall, London, 64 pp.
- Hartley S. E. 1998. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? *Oecologia* 113 (4): 492-501.
- Huang M. Y., Lin K. H., Yang M. M., Chou H. M., Yang C. M., Chang Y. T. 2011. Chlorophyll Fluorescence, Spectral Properties, and Pigment Composition of Galls on Leaves of *Machilus thunbergii*. *International Journal of Plant Sciences* 172 (3): 323-329.
- Huang M. Y., Huang W. D., Chou H. M., Chen C. C., Chang Y. T., Yang C. M. 2014. Herbivorous insects alter the chlorophyll metabolism of galls on host plants. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17 (3): 431-434.
- Korus A. 2012. Effect Of Preliminary And Technological Treatments On The Content Of Chlorophylls And Carotenoids In Kale (*Brassica Oleracea* var. *acephala*). *Journal of Food Processing and Preservation* 37 (4): 335-344.
- Lahitte H. B. 1998. Plantas medicinales rioplatenses: plantas nativas y naturalizadas utilizadas en medicina popular en la región del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense. Editorial L.O.L.A. Buenos Aires.
- Lee J., Rennaker C., Wrolstad R. E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 110 (3): 782-786.
- Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls in leaf extracts in dif-

- ferent solvents. *Biochemical Society Transactions* 11 (5): 591-592.
- Markham K. R. 1982. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press. London, 51 pp.
- Nyman T., Julkunen-Tiitto R. 2000. Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (24): 13184-13187.
- Oliveira D. C. D., Isaias R. M. D. S., Moreira A. S. F. P., Magalhães T. A., Lemos-Filho J. P. D. 2011. Is the oxidative stress caused by *Aspidosperma* spp. galls capable of altering leaf photosynthesis?. *Plant Science* 180 (3): 489-495.
- Peña M. R., Pensiero J. F. 2003. Contribución de la flora en los hábitos alimentarios de las aves de un bosque del centro de la Provincia de Santa Fe, Argentina. *Ornitología Neotropical* 14: 499-513.
- Rand K., Bar E., Ari M. B., Davidovich-Rikanti R., Dudareva N., Inbar M., Lewinsohn E. 2017. Differences in Monoterpene Biosynthesis and Accumulation in *Pistacia palaestina* Leaves and Aphid-Induced Galls. *Journal of Chemical Ecology* 43 (2): 143-152.
- Schneeberger M. E. 1973. Alteraciones Anatómicas en Hojas de *Sapium Haematospermum* Muell. Arg. ("Curupi") Originadas por Agallas. *Natura Neotropicalis* 1 (4): 61-72.
- Shorthouse J. D., Rohfritsch O. 1992. *Biology of insect-induced galls*. Oxford University Press. New York, pp. 60-86.
- Steyn W. J., Wand S. J. E., Holcroft D. M., Jacobs G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155 (3): 349-361.
- Stone G. N., Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (10): 512-522.
- Vanderauwera S. 2005. Genome-Wide Analysis of Hydrogen Peroxide-Regulated Gene Expression in Arabidopsis Reveals a High Light-Induced Transcriptional Cluster Involved in Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Physiology* 139 (2): 806-821.
- Wellburn A. R., Lichtenthaler H. 1984. Formulae and Program to Determine Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents. *Advances in Photosynthesis Research* Vol 2 9-12 pp. Martinus Nijhoff. Paisés Bajos.
- White T. C. R. 2010. Why do many galls have conspicuous colours? An alternative hypothesis revisited. *Arthropod-Plant Interactions* 4 (3): 149-150.