© 2013 Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (2): 162 - 175
ISSN 0717 7917
www.blacpma.usach.cl

Artículo Original | Original Article

Dinámica de polifenoles y estudio anatomo-histoquímico en *Schinus longifolius* (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae) en respuesta a la infección por *Calophya mammifex* (Hemiptera – Calophyidae)

[Dynamics of polyphenols and anatomical and histochemical study in *Schinus longifolius* (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae) in response to infection by *Calophya mammifex* (Hemiptera - Calophyidae)]

Ignacio AGUDELO, Marcelo Luis WAGNER, Alberto Ángel GURNI & Rafael Alejandro RICCO

Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junin 954 (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
Contactos | Contacts: Rafael Alejandro RICCO - E-mail address: raricco@ffyb.uba.ar

Abstract
Total phenols, total tannins, proanthocyanidins, total flavonoids and total hydroxycinnamic acids of healthy leaves and galls of *Schinus longifolius* (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae) infected by *Calophya mammifex* (Hemiptera - Calophyidae) were analized. The gall presents a qualitative and quantitative change in the polyphenols analysed, with a reduction of phenols, tannins, flavonoids and hydroxycinnamic acids and an increased content of proanthocyanidins, whose monomer yielded cyanidin after acid cleavage. An anatomical survey was performed and clusters of sclereids and an increased vascular development respect of the healthy leaf were found. An histochemical survey showed a differential expression of polyphenolic compounds in their tissues. *C. mammifex* could use the gall as a shelter against adverse weather conditions and predators, and also provide food with less potentially harmful compounds in the early stages of its development.

Keywords: *Calophya mammifex*, Galls, Polyphenols, *Schinus longifolius*.

Resumen
Se analizaron los fenoles totales, taninos totales, proantocianidinas, flavonoides totales y ácidos hidroxicinámicos totales de hojas sanas y agallas de *Schinus longifolius* (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae) infectado por *Calophya mammifex* (Hemiptera - Calophyidae). La agalla presenta una variación cuali-cuantitativa de los polifenoles estudiados, con una disminución de los fenoles, taninos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos y un aumento en el contenido de proantocianidinas, cuyo monómero se transforma en cianidina luego del clivaje ácido. Se realizó además un análisis anatómico de la agalla donde se encontraron acúmulos de esclereidas y un mayor desarrollo vascular respecto de la hoja sana y un ensayo histoquímico que mostró una expresión diferencial de metabolitos polifenólicos en sus tejidos. *C. mammifex* utiliza la agalla como refugio contra las condiciones climáticas adversas y predadores y provee además de alimento con menos compuestos potencialmente perjudiciales en las etapas tempranas de su desarrollo.

Palabras Clave: Agallas, *Calophya mammifex*, Polifenoles, *Schinus longifolius*.

Recibido | Received: 23 de Abril de 2012.
Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 10 de Agosto de 2012.
Publicado en línea | Published online: 30 de Marzo de 2013
Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: I Agudelo, ML Wagner, AA Gurni, RA Ricco. 2013. Dinámica de polifenoles y estudio anatomo-histoquímico en *Schinus longifolius* (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae) en respuesta a la infección por *Calophya mammifex* (Hemiptera – Calophyidae). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 12(2): 162 – 175.

INTRODUCCIÓN

Schinus longifolius (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae), conocido con los nombres vulgares de "molle", "incienso" y "trementina", es un árbol o arbusto cuyas hojas, bajo la forma de infusión, son empleadas como expectorante y purgante en la medicina tradicional. Es una especie que se desarrolla en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y noreste de la Argentina, particularmente en las barrancas del Paraná (Lahitte *et al.*, 2004; Cabrera y Zardini, 1978). A menudo se encuentra parasitado por insectos galígenos de diversos órdenes, entre los que se encuentra *Calophya mammifex* (Hemiptera - Calophyidae).

Calophya es un género constituído por individuos que se alimentan de especies de Anacardiaceae, Burseraceae y Rutaceae (Hodkinson, 1989 en Aguilar-Ortigoza y Sosa, 2004). Una hipótesis sobre la relación coevolutiva entre *Calophya* y algunas especies de Anacardiaceae fue desarrollada por Burckhardt y Basset, 2000. En ésta familia (Anacardiaceae), la presencia de fenoles tóxicos constituirían una defensa química contra el ataque de los insectos y de vertebrados (Joel, 1980; Mitchell, 1990). Éstos compuestos, además, pueden restringir el crecimiento de hongos patógenos del género *Alternaria* (Cojocaru *et al.*, 1986).

Las agallas o cecidias son estructuras anormales desarrolladas a partir de los tejidos u órganos de las plantas por la acción específica a la presencia o actividad de un organismo inductor (Meyer, 1987). Son ejemplos de fenotipos extendidos, cuyo desarrollo es en gran parte controlado por los genes del insecto (Stone and Schönrogge, 2003). Bajo la acción del agente cecidógeno se produce la reacción de la planta que incluye el desarrollo anormal o patológico de sus células, tejidos u órganos (fenómenos de hipertrofia e hiperplasia). El resultado de dicha interacción se expresa además como variaciones cuali-cuantitativas en los aleloquímicos normalmente producidos, con el fin de utilizar esta estructura como alimento y refugio (Stone and Schönrogge, 2003; Hartley, 1998; Hartley and Lawton, 1992; Bronner, 1977; Shorthouse, 1986).

El término polifenol, en sentido amplio, es empleado frecuentemente para referirse a aquellos compuestos que poseen en su molécula anillos aromáticos y varios hidroxilos fenólicos, indistintamente de su peso molecular. En sentido estricto, una definición clásica del término polifenol describe a compuestos solubles en agua, con masa molecular entre 500 a 3000-4000 Da, que poseen 12 a 16 grupos hidroxilos fenólicos, en 5 a 7 anillos aromáticos por cada 1000 Da de masa molecular relativa. Se aplica a: (1) las proantocianidinas (taninos condensados), (2) galotaninos y elagitaninos (taninos hidrolizables), (3) florotaninos. Esta definición ha ido modificándose con el tiempo, ampliando los límites de compuestos que hoy serían considerados como "verdaderos" polifenoles, entre los que se incluyen los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, compuestos involucrados en el presente trabajo (Quideau *et al*., 2011).

Los compuestos fenólicos desempeñan un rol importante en casi todas las interacciones, bióticas y abióticas, que una planta establece con su entorno (Waterman and Mole, 1994), constituyendo los principales metabolitos de la interacción planta-insecto (Matsuki, 1996; Waterman and Mole, 1994; Simmonds, 2001, 2003). En esta interacción están involucrados las proantocianidinas y otros flavonoides de menor peso molecular, como los flavonoles, las flavonas y las isoflavonas (Harborne and Williams, 2000).

En lo que respecta a los estudios fitoquímicos realizados en *S. longifolius*, es muy escasa la información de la que se dispone (Frontera y Tomas, 1994).

El objetivo del presente trabajo es estudiar la dinámica de compuestos fenólicos en hojas de ejemplares de *Schinus longifolius* infectados por *Calophya mammifex* (Hemiptera – Calophyidae) y analizar su posible función en la relación planta-insecto.

Agalla foliar

Calophya mammifex (10x)

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron hojas sanas y agallas de ejemplares de *Schinus longifolius* infectados por *Calophya mammifex* (Hemiptera – Calophyidae), recolectados en el barrio La Florida, Zárate, Provincia de Buenos Aires. Todos los ejemplares se encontraban en el mismo estado fenológico. Tanto insecto como planta fueron identificados por claves taxonómicas (Burckhard and Basset, 2000; Cabrera y Zardini, 1978). Ejemplares de referencia se encuentran depositados en el herbario de Museo de Farmacobotánica Juan A. Dominguez (Serie 2012/9-BAF, Serie 2012/10-BAF).

Obtención del extracto original metanólico (EOM)

Se partió de 200 mg de material seco y molido. La extracción se llevó a cabo con 10 mL de metanol 80%, a temperatura ambiente, durante 24 h. Posteriormente se filtró y se descartó el marco. El extracto así obtenido (EOM) fue utilizado en todos los ensayos.

Perfil bidimensional de los polifenoles

Fue realizado por medio de cromatografías bidimensionales en capa delgada de celulosa (TLC y HPTLC), según metodología estandar (Mabry *et al.*, 1970, Markham, 1982).

Para el análisis de los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos se empleó el sistema de solventes TBA (terbutanol-ácido acético-agua, 3:1:1) para la primera dimensión y ácido acético 15% para la segunda dimensión. Los cromatogramas se observaron a la luz ultravioleta antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco y revelados con el reactivo de productos naturales (NP 1% en metanol) (Wagner and Bladt, 1996)

Para el estudio de las proantocianidinas (taninos condensados) se realizaron cromatografías bidimensionales empleando como sistema de solventes secBAA (butanol secundario-ácido acético-agua, 6:1:2) para la primera dimensión y ácido acético 6% para la segunda dimensión. Se empleó como revelador el reactivo de vainillina-ácido clorhídrico (vainillina al 5% en etanol-ácido clorhídrico concentrado, 4:1), con posterior calentamiento (5 min a 100ºC) (Markham, 1982).

Cuantificación de los fenoles totales

Fueron determinados mediante el método de Folin–Ciocalteu de acuerdo con el protocolo empleado por Ricco *et al*., 2011. El contenido de los taninos totales fue expresado como equivalentes de ácido gálico (GAE - mg ácido gálico / g material seco). Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de los taninos totales

El contenido de los taninos totales fue determinado por el procedimiento de Folin–Ciocalteu, luego de remover los taninos mediante su precipitación con solución de seroalbúmina bovina (BSA). Los valores obtenidos fueron restados de los correspondientes a los fenoles totales obteniéndose el total de fenoles que se comportan como taninos (taninos totales) (Ricco *et al*., 2011). El contenido de los taninos totales fue expresado como equivalentes de ácido tánico (GAE - mg ácido gálico / g material seco). Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de taninos condensados (proantocianidinas)

Los taninos condensados fueron determinados mediante la reacción de la proantocianidina, según el método descripto en Ricco *et al*., 2011. Las

proantocianidinas se expresaron como absorbancia a 550 nm. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado.

Cuantificación de los flavonoides totales

Se realizó según la técnica descripta en Ho *et al*., 2012. Brevemente, 0,5 mL del extracto se mezcló con 1,5 mL de etanol al 95%. Se añadió a 0,1 mL de solución acuosa de cloruro de aluminio 10% (p/v) y 0,1 mL de solución acuosa de acetato de potasio 1M. Se adicionó agua destilada hasta un volumen de 5 mL, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia se determinó a 415 nm. El contenido de flavonoides se expresó cono mg rutina / g material seco.

Cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos totales

Se determinó mediante una modificación de la metodología descripta por Dao and Friedman, 1992, según el protocolo descripto en Ricco *et al*., 2011. Se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico. Los valores se expresaron como equivalentes de ácido clorogénico (mg de ácido clorogénico/g material seco). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Caracterización de las proantocianidinas

La caracterización de las proantocianidinas fue efectuada según las técnicas estándar de Mabry *et al*., 1970 y Markham, 1982, con las modificaciones descriptas en Ricco *et al.*, 2011, comparando con testigos de cianidina, delfinidina y apigeninidina, mediante co-cromatografías y espectroscopía UV-visible.

Análisis macroscópico y microscópico

Obtención de disociados

Partiendo de material fresco se realizó una disociación (maceración) empleando NaOH 5%. El método consiste en someter el material vegetal a la acción de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5%, durante 5 min, a ebullición. Luego de enfriar, se lava el material disociado con agua destilada y se observa al microscopio.

El disociado es observado mediante el empleo de:

- Microscopía de campo claro (análisis general).
- Microscopía de luz polarizada (análisis de cristales).

Obtención de cortes

A partir de material fresco, se realizaron cortes mediante el empleo de un micrótomo de deslizamiento.

Los cortes fueron observados mediante el empleo de:

- Microscopía de campo claro (análisis general y reacciones histoquímicas para almidón, fenoles totales, flavonoides y proantocianidinas).
- Microscopía de luz polarizada (análisis de almidón y cristales).
- Microscopía de fluorescencia (autofluorescencia de tejidos, localización de flavonoides (reacción con NP)).

Análisis histoquímico

Sobre los cortes se efectuaron las siguientes reacciones histoquímicas:

- Lugol (0,5 g I_2 + 1 g KI en 10 mL de agua) para la detección de almidón.
- NP (solución al 1% en metanol del éster β-etilamino del ácido difenilbórico) para la detección de flavonoides.
- Vainillina/HCl (solución de vainillina al 1% en etanol + HCl conc., 4:1) para la detección de proantocianidinas.

Análisis estadístico

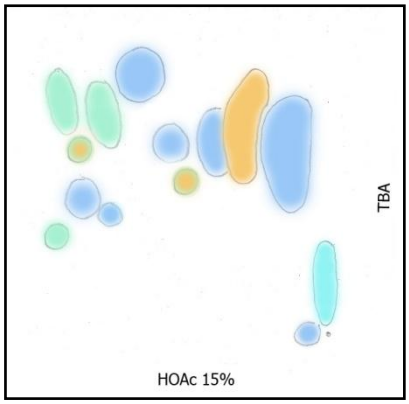
Los resultados fueron expresados como media ± desvío estandar. Se consideraron diferencias significativas con $p < 0,05$. Se empleó el programa Graph Pad Prism®.

RESULTADOS

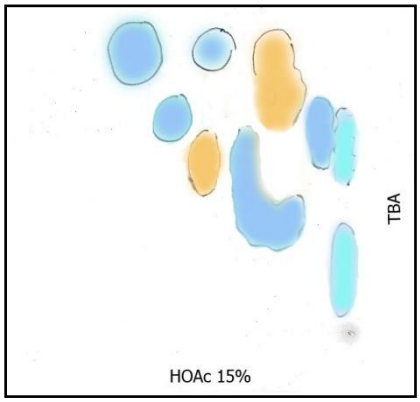
Estudio fitoquímico

En el análisis del perfil bidimensional de los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, se observa una variación de tipo cuali-cuantitativo determinada por una disminución de estos metabolitos en los extractos provenientes de las agallas (Figura 1). Estos resultados son concordantes con los provenientes del análisis cuantitativo donde las concentraciones de fenoles totales, taninos totales, flavonoides totales y ácidos hidroxicinámicos totales se ven disminuidas en los extractos derivados de las agallas.

Figura 1
Reacción con NP. Los compuestos celestes y verdes corresponden a los ácidos hidroxicinámicos. Los compuestos amarillo-anaranjados a los flavonoides.



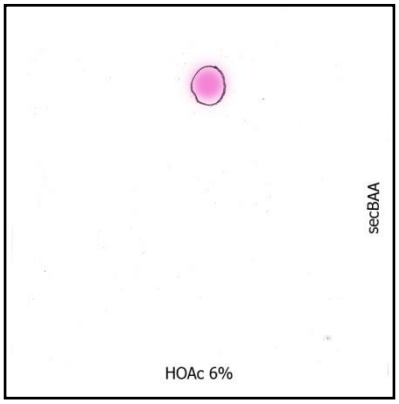
Perfil hoja sana



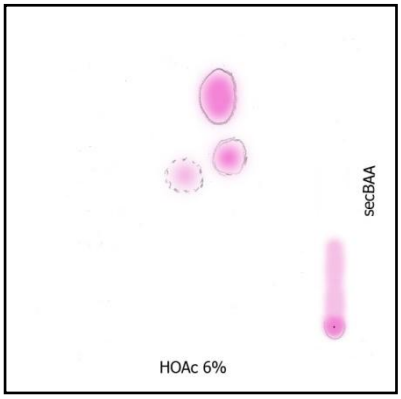
Perfil agalla

En el análisis del perfil de proantocianidinas también se observa una modificación cuali-cuantitativa, pero en éste caso la agalla presenta una alta concentración de proantocianidinas acompañada de una mayor complejidad de compuestos (monómeros y oligómeros), respecto de lo observado para las hojas sanas (Figura 2). Estos resultados son concordantes con la cuantificación de las proantocianidinas, donde las agallas duplican en concentración a las hojas sanas.

Figura 2
Reacción de la vainillina. Las proantocianidinas se observan de color púrpura.



Perfil hoja sana

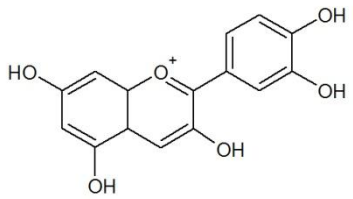


Perfil agalla

Como resultado del clivaje ácido del extracto original proveniente de las agallas y hojas sanas, se determinó la presencia de cianidina, compuesto proveniente del tanino condensado procianidina.

Compuesto:	Cianidina
Color visible:	Magenta
Rf. forestal (x100):	50
Rf. fórmico (x100):	25
Rf. BAA (x100):	70
$\lambda_{max\ MeOH/HCl}$:	536 nm
Reacción $AlCl_3$:	Positiva

El resultado del análisis fisicoquímico se detalla a continuación:



Los resultados de la cuantificación de los fenoles, los taninos, las proantocianidinas, los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1
Cuantificación de los fenoles totales, los taninos totales, las proantocianidinas, los flavonoides totales y los ácidos hidroxicinámicos totales

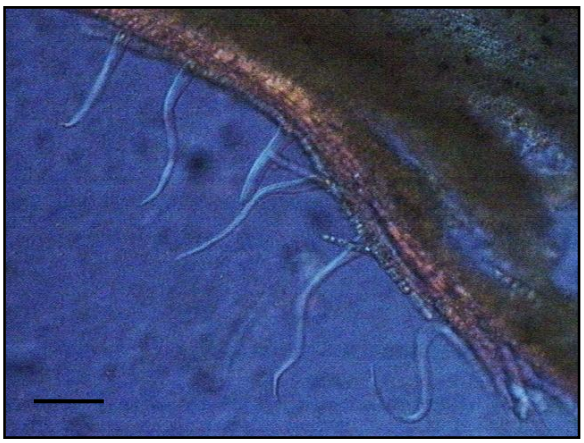
Muestra	Fenoles totales mg ác gálico/g mat. seco	Taninos totales mg ác. gálico/g mat. seco	Proantocianidinas D.O. 550 nm	Flavonoides totales mg rutina/g mat. seco	Ác. hidroxicinámicos totales mg ác. clorogénico/g mat. seco
Hoja sana	205,80 ± 15,11	151,14 ± 16,92	0,5497 ± 0,0375	1,11 ± 0,10	10,81 ± 0,56
Agalla	147,32 ± 11,76	110,70 ± 12,09	1,294 ± 0,130	0,46 ± 0,03	7,48 ± 0,38

Estudio anatómico e histoquímico

La hoja sana es de estructura bifacial, con epidermis uniestratificadas, donde se observa la presencia de dos tipos de tricomas: unicelulares tectores (Foto 1) y glandulares claviformes constituidos por un pie unicelular y una cabeza pluricelular (Foto 2). Los tricomas se encuentran dispersos en toda la hoja, pero con una mayor densidad a nivel de la base. Presenta, además, un mesófilo constituido por un parénquima (clorénquima) en empalizada en relación con la epidermis superior (adaxial) y de un parénquima (clorénquima) esponjoso en contacto con la epidermis inferior (abaxial). Se observa la presencia de cristales (de oxalato de calcio) con forma de drusas (Foto 3). La nervadura central es biconvexa y presenta colénquima. En el floema se observa la presencia de conductos resiníferos. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Perrota y Arambarri, 2004.

Foto 1
Tricoma tector, unicelular

(A) Microscopía campo claro (400x)
Escala: 25 µm



(B) Microscopía de contraste de fase (200x)
Escala: 50 µm

Foto 2
Tricoma glandular: pie unicelular, cabeza pluricelular (400x). Escala: 25 µm

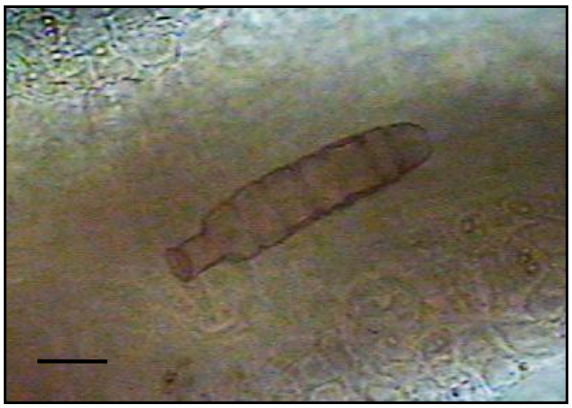
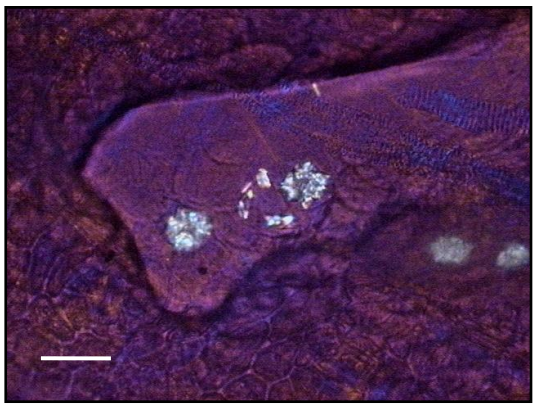


Foto 3
Cristal de oxalato de calcio (drusa). Microscopía de luz polarizada (400x). Escala: 10 µm



Las agallas están constituídas principalmente por una epidermis uniestratificada, que presenta tricomas similares a los detallados para la hoja sana, más la presencia de tricomas tectores unidos por sus bases en grupos de dos o tres (Foto 4). El parénquima (clorénquima) está constituído por células isodiamétricas. Se observa, además, la presencia de cristales (drusas), grupos de células de paredes lignificadas (esclereidas, Foto 5) y un gran desarrollo del sistema vascular (Foto 6).

Foto 4
Tricomas tectores presentes en la agalla. (200x). Escala: 50 µm

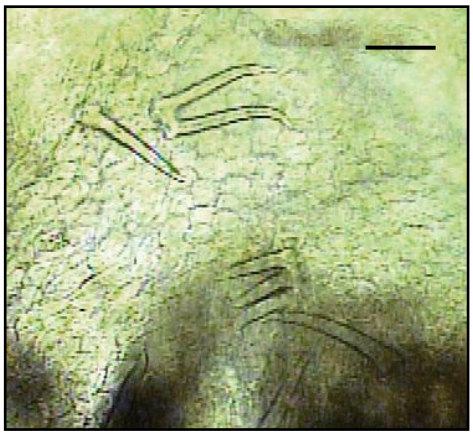
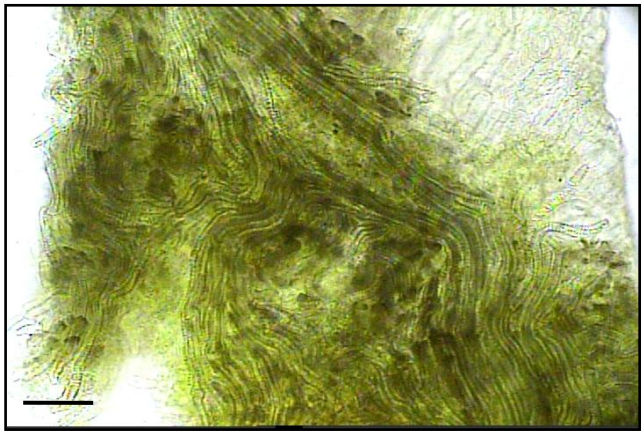


Foto 5
Tejido esclerenquimático: esclereidas en agalla (100x). Escala: 100 µm

Foto 6
Vascularización en agalla (100x). Escala: 100 µm



En lo que respecta al estudio histoquímico, la reacción de lugol resultó negativa, tanto para la hoja sana cómo para la agalla. Éste resultado es concordante con la ausencia de almidón de reserva en las hojas.

La reacción de las proantocianidinas, en las hojas sanas, se limita a los tricomas glandulares y a los tejidos vasculares, con escaso desarrollo a nivel del parénquima (Foto 7 y Foto 8). Por el contrario, en la agalla la reacción es positiva a nivel del parénquima, con mayor intensidad en las células del parénquima ubicadas inmediatamente por debajo de la epidermis de la agalla resultando también positiva para los tricomas glandulares (Fotos 9a, 9b).

Foto 7
Reacción de caracterización de proantocianidinas en tricoma glandular (400x).
Escala: 25 µm

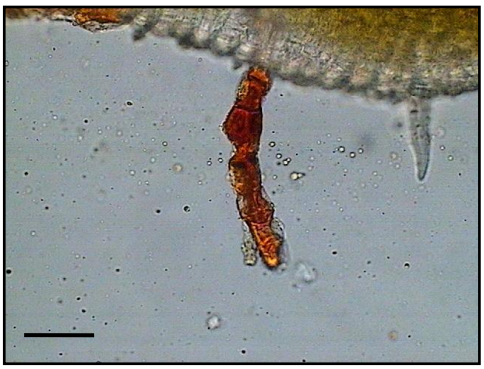


Foto 8
Reacción de caracterización de proantocianidinas en la hoja sana (100x).
Escala: 100 µm

Foto 9
Reacción de caracterización de proantocianidinas en agalla.

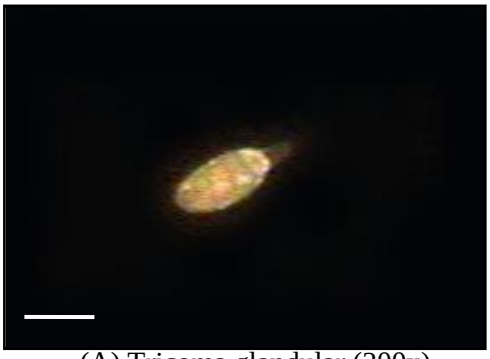
(A) Tricoma glandular (400x)
Escala: 25 µm

(B) Parénquima (100x)
Escala: 50 µm

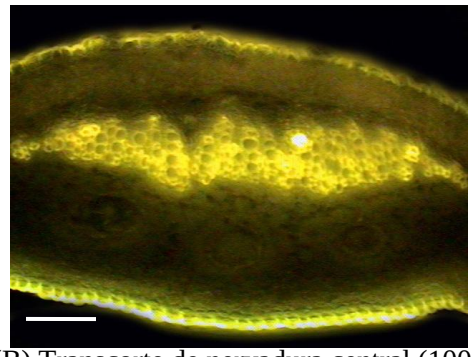
La reacción para flavonoides (reactivo de productos naturales, NP) en la hoja sana es positiva en los tricomas glandulares, limitándose la reacción a las células que constituyen la cabeza glandular, cutícula y a nivel del tejido conductor (Foto 10).

Para la agalla, la reacción es positiva en los tricomas glandulares y en el parénquima asociado a la epidermis (Foto 11).

Foto 10
Reacción de caracterización de flavonoides. Microscopía de fluorescencia.



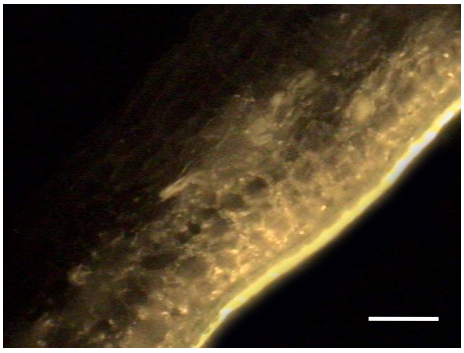
(A) Tricoma glandular (200x)
Escala: 50 µm



(B) Transcorte de nervadura central (100x)
Escala: 100 µm

Foto 11
Reacción de caracterización de flavonoides. Microscopía de fluorescencia.

(A) Tricoma glandular (200x)
Escala: 50 µm



B) Transcorte (100x)
Escala: 50 µm

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos podrían ser analizados en el contexto de las diferentes hipótesis que intentan explicar la dinámica de la interacción planta - insecto galígeno:

(a) ***Hipótesis de la nutrición***. Según esta hipótesis, las agallas proporcionan una nutrición mejorada debido a que pueden contener tejidos altamente diferenciados con menor concentración de compuestos de defensa (Cornell, 1983; Price *et al.*, 1987; Whitham, 1992). El tejido nutritivo suele contener altos niveles de compuestos solubles, como azúcares y aminoácidos, pero puede haber un alto grado de variabilidad espacial y temporal asociados en la composición del tejido de la agalla cuando se compara con el tejido de la hoja sana (Birch *et al.*, 1992).

Cuando se analizan las agallas foliares producidas por *Calophya mammifex*, ésta posee menores concentraciones de fenoles, taninos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, respecto de las hojas sanas (Tabla 1), resultados concordantes con lo anteriormente mencionado. Como puede observarse en el estudio histoquímico, los flavonoides y las proantocianidinas no se presentan en concentraciones apreciables a nivel del parénquima mas interno (Foto 9 y Foto 11), cercano a las larvas del insecto, constituyendo este tejido una fuente de alimento con escasa concentración en compuestos de defensa y probada actividad antinutriente. Contrariamente, los altos niveles de compuestos fenólicos en los tejidos del huésped próximos a la agalla pueden constituir una defensa contra los insectos gallígenos (Westphal *et al.*, 1981), situación que se ve reflejada en las hojas sanas (Tabla 1), determinando una evidente variación espacial en el metabolismo de los polifenoles.

(b) ***Hipótesis microambiental***. Establece que los tejidos pueden actuar para proteger el cecidógeno de condiciones abióticas desfavorables, como la desecación y el stress hídrico y térmico, entre otros (Cornell, 1983; Price *et al.*, 1987; Blanche, 2000). A tal efecto, puede observarse en la agalla el desarrollo de un tejido esclerenquimático (Foto 5), cuyas células de paredes engrosadas, actuarían en la protección contra condiciones ambientales adversas.

(c) ***Hipótesis del enemigo***. Sostiene que las agallas constituirían, en principio, estructuras de protección contra los ataques de los enemigos naturales, particularmente frente a parasitoides y hongos. En agallas totalmente cerradas, los ataques deben tener lugar a través de los tejidos de la agalla. Diversos rasgos estructurales, como el aumento de la dureza de la vesícula (Stone *et al.*, 2002; Weis, 1982), el aumento del espesor de los tejidos que constituyen la vesícula (Stone *et al.*, 2002; Abrahamson and Weis, 1997; Rossi *et al.*, 1992; Zwölfer and Arnold-Rinehart, 1994), el revestimiento externo de pelos (Dixon *et al.*, 1998), entre otros, permiten reducir significativamente la vulnerabilidad a un ataque por enemigos

naturales. En éste caso, se determinó en la agalla la presencia de grupos de esclereidas (Foto 5), que constituyen una defensa estructural contra el ataque de diferentes predadores y hongos entomopatógenos, como así también se observó la presencia de tricomas tectores (involucrados en la defensa mecánica) (Foto 4). Por otro lado, la alta concentración de flavonoides y proantocianidinas, localizadas en los tricomas glandulares y en el parénquima subepidérmico (Fotos 9a, 9b), cumplen una función de defensa, creando una zona con alta concentración de éstos metabolitos, que restringe el ataque de predadores y de hongos entomopatógenos, con el objeto de permitir el normal desarrollo del insecto. Estas observaciones están de acuerdo con los trabajos realizados por otros autores, tales como Martin and Martin, 1982; Heil *et al.*, 2002 y Taper and Case, 1987. Si bien la agalla presenta menores concentraciones de taninos totales respecto de las hojas sanas, gran parte de esos taninos corresponden a proantocianidinas (taninos condensados) que, en el perfil bidimensional, demostraron tener mayor peso molecular que los hallados en las hojas sanas (Figura 2), constituyendo parte del mecanismo de defensa mencionado.

Por lo tanto, en lo que respecta a los metabolitos fenólicos involucrados en la interacción planta – insecto, la evidencia experimental muestra que los insectos galígenos son capaces de manipular la asignación de los recursos vegetales en su beneficio.

Otro aspecto a destacar es el desarrollo del sistema vascular en los tejidos de la agalla (neovascularización, Foto 6), constituyendo una adaptación espacial similar a aquella desarrollada en los procesos tumorales. Esta expansión del sistema vascular permite un mayor movimiento de compuestos carbonados y nitrogenados hacia la agalla, con el fin de ser empleados de acuerdo a sus necesidades nutricionales (crecimiento) y defensa del insecto galígeno.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo provee un punto de partida para futuros estudios de ecología química que involucre a estas especies. Es de interés resaltar que no se han realizado anteriormente estudios químicos sobre esta relación interespecífica. Estos resultados ponen de manifiesto que la dinámica de los polifenoles de las agallas de *Schinus longifolius* está dominada por el insecto galígeno.

Por otro lado, debido al empleo de esta especie en la medicina tradicional, es importante considerar el estado fitosanitario del material empleado en la obtención de las preparaciones, dado que los diferentes perfiles de polifenoles observados podrían modificar su actividad biológica.

REFERENCIAS

Abrahamson WG, Weis AE. 1997. **Evolutionary ecology across three trophic levels: goldenrod, gall makers and natural enemies**. Monographs in population biology. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.

Aguilar-Ortigoza CJ, Sosa V. 2004. The evolution of toxic phenolic compounds in a group of Anacardiaceae genera. **Taxon** 53: 357 - 364.

Birch ML, Brewer J, Rohfritsch O. 1992. **Biology of *Dasineura affinis* (Cecidomyiidae) and influence of its gall on *Viola odorata*.** In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds). Biology of insect-induced galls. Oxford University Press, New York, USA.

Blanche KR. 2000. Diversity of insect-induced galls along a temperature-rainfall gradient in the tropical savannah region of the Northern territory, Australia. **Aust Ecol** 25: 311 - 318.

Bronner R. 1977. Contribution a l'etude histochimique des tissue nourriciers des zoocecidies. **Marcellia** 40: 1 - 134.

Burckhard D, Basset Y. 2000. The jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) associated with *Schinus* (Anacardiaceae): systematics, biogeography and host plant relationships. **J Nat Hist** 34: 57 - 155.

Cabrera AL, Zardini EM. 1978. **Manual de las plantas de los alrededores de Buenos Aires.** Buenos Aires, Argentina.

Cojocaru M, Droby S, Glotter E, Goldman A, Gottlieb HE, Jacoby B, Prusky D. 1986. 5-(12-Heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. **Phytochemistry** 25: 1093 - 1095.

Cornell HV. 1983. The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipinae. Why and how? **Am Midl Nat** 110: 225 - 234.

Dao L, Friedman M. 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. **J Agric Food Chem** 40: 2152 - 2150.

Dixon KA, Lerma RR, Craig TP, Hughes KA. 1998. Gall morphology and community composition in *Asphondylia flocossa* (Cecidomyiidae) galls on *Atriplex polycarpa* (Chenopodiaceae). **Environ Entomol** 27: 592 - 599.

Frontera MA, Tomas MA. 1994. Estudio químico de la planta *Schinus longifolius* L. **An Asoc Quim Arg** 82: 365 - 370.

Harbone JB, Williams C. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochem** 55: 481 - 504.

Hartley SE, Lawton JH. 1992. Host-plant manipulation by gall-insects: a test of the nutrition hypothesis. **J Anim Ecol** 61: 113 - 119.

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

Heil M, Baumann B, Andary C, Linsenmair KE, Mc Key D. 2002. Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defense. Revisiting and old problem. **Naturwissenschaften** 89: 519 - 524.

Ho YC, Yu HT, Su NW. 2012. Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content. **J Agric Food Chem** 60: 2674 - 2681.

Joel DM. 1980. Resin ducts in the mango fruit: a defense system. **J Exp Bot** 31: 1707 - 1718

Lahitte HB, Hurrell JA, Belgrano MJ, Sankowski LS, Haloua P, Mehltreter K. 2004. **Biota Rioplatense II, Plantas Medicinales Rioplatenses**, Editorial LOLA, Buenos Aires, Argentina.

Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. **The systematic identification of the flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin and New York, New York, USA.

Markham KR. 1982. **Techniques of Flavonoid Identification.** Academic Press, London, UK.

Martin JS, Martin MM. 1982. Tannin assays in ecological studies: Lack of correlation between phenolics, proanthocyanidins and protein-precipitating constituents in mature foliage of six oak species. **Oecologia** 54: 205 - 211.

Matsuki M. 1996. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. **Aust J Bot** 44: 613 - 634.

Meyer J. 1987. **Plant Galls and Gall Inducers**. Gebrüder Borntraeger. Berlin, Stuttgard, Germany.

Mitchell JD. 1990. The poisonous *Anacardiaceae* genera of the world. **Adv Econ Bot** 8: 103 - 129.

Perrota VG, Arambarri AM. 2004. *Schinus longifolia* var. *longifolia* (Anacardiaceae): Anatomía Foliar y Caulinar. **Acta Farm Bonaerense** 23: 142 - 147.

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

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C and Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. **Angew Chem Int** 50: 586 - 621.

Ricco RA, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner ML y Gurni AA. 2011. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 325 - 332.

Rossi AM, Stiling PD, Strong DR, Johnson DM. 1992. Does gall diameter affect parasitism of *Asphondylia borrichiae* (Diptera: Cecidomyiidae). **Ecol Entomol** 17: 149 - 154.

Shorthouse JD. 1986. Significance of nutritive cells in insect galls. **Proc Entomol Soc Wash** 88: 368 - 375.

Simmonds M. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytochemistry** 56: 451 - 252.

Simmonds M. 2003. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry** 64: 21 - 30.

Stone GN, Schönrogge K, Atkinson RJ, Bellido D, Pujade-Villar J. 2002. The population

biology of oak gall wasps (Hynenoptera – Cynipidae). **Annu Rev Entomol** 47: 633 - 668.

Stone G, Schönrogge K. 2003. The adaptative significance of insect gall morphology. **Trends Ecol Evol** 18: 512 - 522.

Taper ML, Case TJ. 1987. Interactions between oak tannins and parasite community structure: Unexpected benefits of tannins to cynipid gall-wasps. **Oecologia** 71: 254 - 261.

Wagner H, Bladt S. 1996. **Plant drug analisys. A thin layer chromatography atlas**. Second edition. Springer-Verlag. Berlin, Germany.

Waterman P and Mole S. 1994. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Blackwell Scientific Publication (ed.), Oxford, UK.

Weis AE. 1982. Use of a symbiotic fungus by the gall maker *Asteromyia carbonifera* to inhibit attack by the parasitoid *Torymus capite*. **Ecology** 63: 1602 - 1605.

Westphal E, Bronner R, Le Ret M. 1981. Changes in leaves of susceptible and resistant *Solanum dulcamara* infested by the gall mite *Eriophyes cladophthirus* (Acarina, Eriphyoidea). **Can J Bot** 59: 875 - 882

Whitham TG. 1992. **Ecology of pemphigus gall aphids. In biology of insect-induced galls** (Shorthouse JD. and Rohfritsch O., Eds). Oxford University Press, New York, USA.

Zwölfer H, Arnold-Rinehart J. 1994. **Parasitoids as a driving force in the evolution of the gall size of *Urophora* on *Cardueae* hosts. In Plant Galls: Organisms, Interactions, Populations** (Williams MAJ, Ed.). Clarendon Press, Oxford, UK.