

**Fernanda Anselmo Moreira**

Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae)

Phenolic compounds and soluble carbohydrates in the interaction between *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitized by *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae)

**São Paulo**

**2015**



**Fernanda Anselmo Moreira**

VERSÃO CORRIGIDA

O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências

Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae).

Phenolic compounds and soluble carbohydrates in the interaction between *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitized by *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Botânica, na Área de Recursos Econômicos Vegetais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Maria Furlan

**São Paulo**

**2015**

Moreira, Fernanda Anselmo

Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae).

112 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

Palavra-Chave: plantas parasitas, metabólitos secundários, galha.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Profa. Dra. Cláudia Maria Furlan  
Orientadora

*“Dedico esse trabalho a minha amada  
mãe, Lidia, e a minha querida avó, Carmen, que faz tanta falta.”*



## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e forças para concluir este trabalho.

À minha orientadora Cláudia Furlan, primeiramente por ter aceitado me orientar e também pela amizade, dedicação e pelo enorme aprendizado que me proporcionou.

À minha querida mãe, Lidia Anselmo, que me acompanhou, me educou, apoiou, torceu e me incentivou durante toda a minha vida, com amor e paciência.

Aos meus irmãos Everton e Heloisa e a todos os meus demais familiares que sempre torceram por mim, em especial a minha avó Carmen.

Ao Eduardo Lucas, pela companhia, paciência, amizade e amor dedicado.

À Marcela e a Bete pela grande amizade, companhia, auxílio e dedicação, sempre presentes apoiando e me motivando.

Ao Sandro, meu professor de natação, pela sua torcida durante o meu mestrado e pela amizade construída ao longo dos mais de quinze anos que nos conhecemos. Agradeço também a turma da natação pelos momentos de descontração.

À Tânia Regina, Adriana, Malu e Amanda, colegas do Gonçalves Dias, pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Aos professores do laboratório Antonio Salatino, Deborah Santos, Marcelo Ferreira e Maria Luiza Salatino, obrigada pelas contribuições e aprendizagem.

Às técnicas Aline e Mourisa e ao técnico Leandro por todo o auxílio durante a realização do meu projeto.

Ao Gregório Ceccantini e em especial a Luíza Teixeira-Costa pelo auxílio na coleta e pelas contribuições.

Aos meus amigos do laboratório de Fitoquímica Priscila, Alice, Cris, Paula, Miguel, Carol, Carmen, Jocimar, Cinthia e, em especial, Janayne, Kátia, Fê Rezende, Dalila e Wilton.

Aos laboratórios Lafieco e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal.

À FAPESP pela bolsa concedida (2013/23322-3), a CAPES/Proex pelo apoio financeiro e ao Instituto de Biociências da USP pela infraestrutura.

A todos vocês, muito obrigada!



## Índice

I. Introdução .....	1
• Plantas parasitas .....	1
• Mecanismos de defesa da planta hospedeira frente à parasita .....	6
• Metabolismo: fonte de substâncias usadas na defesa vegetal.....	7
• Modelo Vegetal .....	13
II. Justificativa e Hipóteses .....	17
III. Objetivos .....	19
IV. Material e Métodos.....	21
• Coleta do material vegetal .....	21
• Preparo dos extratos.....	21
• Análise quantitativa de substâncias fenólicas totais.....	24
• Análise quantitativa de flavonas e flavonóis.....	24
• Análise quantitativa de flavonoides e fenilpropanoides por CLAE-DAD.....	24
• Análise quantitativa de taninos totais.....	25
• Análise quantitativa de proantocianidinas (taninos condensados).....	25
• Análise quantitativa de carboidratos solúveis .....	26
• Análise quantitativa de amido .....	26
• Determinação da razão carbono/nitrogênio (C/N).....	27
• Análise qualitativa de lipídeos.....	27
• Resposta plástica .....	29
• Análise estatística.....	29
V. Resultados e Discussão.....	31
• Metabólitos primários na interação de parasitismo entre <i>T. guianensis</i> e <i>P. crassifolium</i> .....	31
• Metabólitos secundários na interação de parasitismo entre <i>T. guianensis</i> e <i>P. crassifolium</i> .....	49
VI. Considerações finais.....	71
VII. Conclusões.....	77
VIII. Referências Bibliográficas .....	79
IX. Resumo.....	89
X. Abstract .....	91
XI. Anexo I.....	93



## I. Introdução

- **Plantas parasitas**

Segundo Heide-Jorgensen (2008), plantas parasitas são aquelas que penetram o tecido vivo de outra planta, denominada hospedeira, e dela retiram os recursos necessários para a sua sobrevivência, sendo que, durante essa relação, a planta hospedeira pode sofrer um déficit no seu desempenho. Tais recursos são transferidos da hospedeira para a parasita através de uma estrutura especializada denominada haustório (Press & Graves, 1995).

O haustório é a característica que define as plantas parasitas (Press & Graves, 1995; Watling & Press, 2001; Heide-Jorgensen, 2008). Ele pode ser considerado uma ponte fisiológica e morfológica entre as duas plantas (Press & Graves, 1995) e tem como funções a fixação e invasão dos tecidos da planta hospedeira, além do redirecionamento de recursos para a planta parasita (Kuijt, 1969; Press *et al.*, 1991; Westwood *et al.*, 2010).

Devido as suas características, o haustório possibilita um contato íntimo entre o sistema vascular da planta parasita e o da sua hospedeira (Hibberd & Jeschke, 2001), podendo fazer com que a parasita se conecte ao floema e/ou ao xilema da outra planta (Irving & Cameron, 2009). Desse modo, além de carboidratos (Birschwilks *et al.*, 2006) e minerais (Hibberd & Jeschke, 2001), outros compostos podem ser transferidos através dessa estrutura, tais como, hormônios, toxinas (Kuijt, 1969; Press & Graves, 1995), aminoácidos, ácidos orgânicos (Hibberd & Jeschke, 2001), metabólitos secundários (Wink & Witte, 1993; Rothe *et al.*, 1999), vírus (Birschwilks *et al.*, 2006) e, inclusive, material genético (Gao *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014).

O local em que o haustório se estabelece na hospedeira é uma das formas de classificação das angiospermas parasitas. Outros aspectos que são levados em conta para classificar este grupo de plantas são o grau de dependência em relação à hospedeira e o seu *status* fotossintético (Heide-Jorgensen, 2008; Kaiser *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao local em que o haustório se estabelece, ele pode se instalar na raiz da hospedeira e, então, tais parasitas são chamadas de parasitas de raiz ou ele pode se instalar na parte aérea e, neste caso, essas plantas são denominadas parasitas de parte aérea ou simplesmente parasitas aéreas (Bungard, 2004; Heide-Jorgensen, 2008; Walters, 2011).

Quanto ao grau de dependência em relação à hospedeira, as plantas parasitas podem ser classificadas como obrigatórias ou facultativas. As parasitas facultativas são aquelas que conseguem completar o seu ciclo de vida sem uma planta hospedeira,

entretanto quando têm a oportunidade, parasitam outra planta. As obrigatórias, por sua vez, não são capazes de completar seu ciclo de vida sem uma hospedeira (Press & Graves, 1995; Irving & Cameron, 2009).

Com relação ao *status* fotossintético, uma planta parasita pode ser classificada em hemiparasita ou holoparasita. As hemiparasitas são capazes de realizar fotossíntese, ao menos durante parte do seu ciclo de vida, porém dependem de sua hospedeira para obter nutrientes e água. Já as holoparasitas não produzem quantidades suficientes de fotossintatos para sobreviver e, dessa forma, retiram de sua hospedeira toda a quantidade de fotossintatos de que necessitam (Kuijt, 1969). Geralmente, as hemiparasitas se conectam apenas ao xilema da hospedeira, ao passo que, as holoparasitas podem se conectar ao xilema e, inclusive, ao floema (LeBlanc *et al.*, 2012).

Na tabela 1 é apresentada, de forma simplificada, a classificação de plantas parasitas segundo Heide-Jorgensen (2008).

Tabela 1 – Classificação de plantas parasitas segundo seu grau de dependência, *status* fotossintético e local em que se inserem na hospedeira (Heide-Jorgensen, 2008).

<b>Grau de dependência da hospedeira</b>	<b>Status fotossintético</b>	<b>Local parasitado na hospedeira</b>	<b>Exemplos</b>
Obrigatório	Hemiparasita	Parte aérea Raiz	<i>Cassytha</i> spp. <i>Phoradendron</i> spp. <i>Striga</i> spp.
	Holoparasita	Parte aérea Raiz	<i>Cuscuta</i> spp. <i>Orobancha</i> spp.
Facultativo	Hemiparasita	Raiz	<i>Rhinanthus</i> spp.

As plantas parasitas compreendem cerca de 1% das angiospermas, o que corresponde a aproximadamente 4.500 espécies. Elas estão distribuídas em torno de 270 gêneros dentro de 20 famílias (Press & Phoenix, 2005; Heide-Jorgensen, 2008) e a maior parte delas, cerca de 4.100 espécies, corresponde a hemiparasitas (Heide-Jorgensen, 2008). Elas podem ser encontradas em diferentes formas de vida, tais como arbóreas, arbustivas e herbáceas (Press & Phoenix, 2005) e são amplamente distribuídas nos mais variados ecossistemas terrestres presentes em todos os continentes, com exceção da Antártida (Heide-Jorgensen, 2008).

De acordo com dados moleculares e morfológicos sugere-se que o hábito parasita nas angiospermas apareceu pelo menos 12 ou 13 vezes de forma independente na evolução desse grupo (Barkman *et al.*, 2007; Westwood *et al.*, 2010). A figura 1 apresenta a filogenia proposta pelo APG (*Angiosperm Phylogeny Group*) (Chase & Reveal, 2009).

Nela foram destacadas as ordens e famílias que apresentam plantas com o hábito parasita, de acordo com o proposto por Heide-Jorgensen (2008).

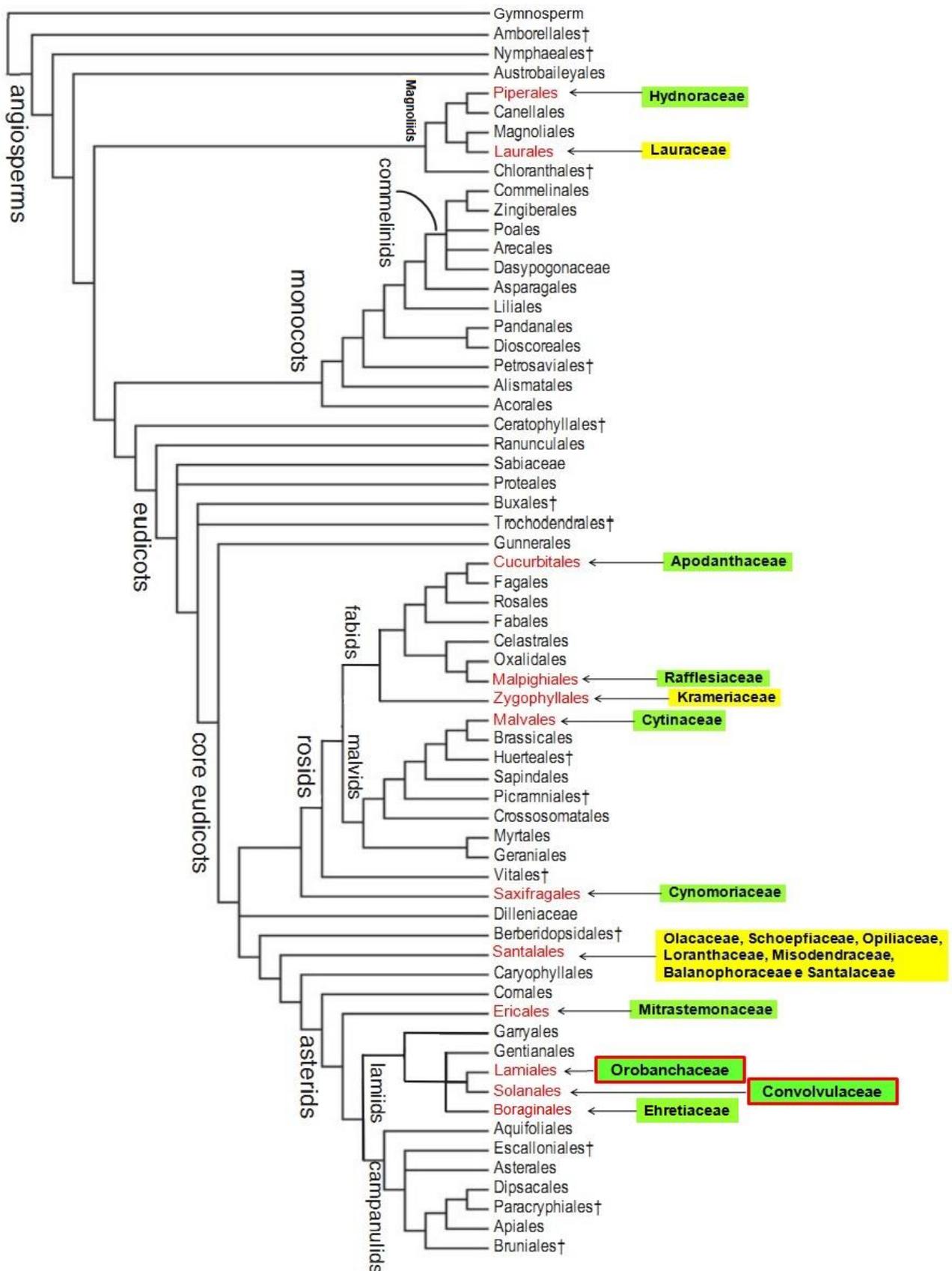
Como é possível observar na figura 1, nem todos os grupos de angiospermas apresentam representantes parasitas. O hábito parasita está presente em magnoliídeas e em muitos grupos de eudicotiledôneas, enquanto que monocotiledôneas e todo o grupo das campanulídeas nunca evoluíram o hábito parasita ou não retiveram nenhum representante (Barkman *et al.*, 2007).

No que diz respeito à variedade de hospedeiras, as plantas parasitas podem ser generalistas ou especialistas. As primeiras se referem àquelas que parasitam uma ampla variedade de plantas, enquanto que as pertencentes ao segundo grupo parasitam poucas espécies, em certos casos restringindo-se apenas a uma espécie (Nickrent & Musselman, 2004; Heide-Jorgensen, 2008).

Muitas famílias botânicas possuem representantes que servem como espécies hospedeiras de outros vegetais. Na realidade, a maioria das espermatófitas é passível de ser parasitada por outras plantas (Heide-Jorgensen, 2008) e, inclusive, algumas plantas parasitas podem ser potenciais hospedeiras de outras plantas parasitas (Heide-Jorgensen, 2008; Mathiasen *et al.*, 2008). Estas últimas, capazes de parasitar outras plantas parasitas, podem pertencer a grupos taxonômicos diferentes (parasita e hospedeira) ou à mesma espécie. No primeiro caso dá-se o nome de epiparasitismo, enquanto que o segundo de autoparasitismo (Heide-Jorgensen, 2008; Calvin & Wilson, 2009).

Independentemente se a hospedeira é ou não uma planta parasita ela será prejudicada pela infestação por plantas parasitas e o grau de prejuízos pode variar entre as duas situações (Heide-Jorgensen, 2008).

As parasitas podem prejudicar o desempenho da hospedeira de diferentes formas, por exemplo, afetando o balanço hídrico e nutricional da hospedeira (Stewart & Press, 1990), aumentando a suscetibilidade ao ataque de patógenos e insetos, reduzindo associações com fungos formadores de micorrizas (Press & Phoenix, 2005) e afetando as taxas de crescimento, reprodução, fotossíntese (Watling & Press, 2001) e de sobrevivência da hospedeira, visto que em certos casos de elevada infestação a hospedeira pode não sobreviver (Aukema, 2003).



**Figura 1:** Filogenia de angiospermas de acordo com APG III. Famílias destacadas em amarelo apresentam representantes hemiparasitas, as destacadas em verde holoparasitas, enquanto que as destacadas em verde com bordas vermelhas têm representantes hemiparasitas e holoparasitas (modificado de Chase & Reveal, 2009).

Essa redução no desempenho da hospedeira pode afetar suas habilidades competitivas com outras plantas, podendo acarretar em alterações na estrutura das comunidades (Press & Phoenix, 2005). Contudo, embora haja efeitos negativos na relação de parasitismo entre plantas, aspectos positivos também podem ser destacados tanto para a hospedeira (Candia *et al.*, 2014) quanto para a comunidade (Press & Phoenix, 2005).

Um exemplo de benefício proporcionado pelas parasitas é a atração de maior quantidade de agentes dispersores que, inclusive, promove a dispersão das sementes da hospedeira e favorece o aumento no seu sucesso reprodutivo (Candia *et al.*, 2014). Além disso, elas propiciam um aumento na quantidade de nutrientes sob formas mais disponíveis para plantas hospedeiras e não hospedeiras (Ndagurwa *et al.*, 2014) e algumas plantas parasitas podem constituir um recurso alimentar atrativo para insetos herbívoros, favorecendo o aumento de sua população na comunidade (Press & Phoenix, 2005).

Como citado anteriormente, plantas parasitas podem provocar sérios danos às suas hospedeiras, inclusive àquelas de interesse econômico (Kaiser *et al.*, 2015). Dos 270 gêneros de plantas parasitas existentes aproximadamente 25 são importantes por parasitarem plantas de relevância econômica (Sharma & Kapoor, 2014).

Alguns exemplos de gêneros com grande impacto econômico na agricultura são *Orobanche*, *Striga* (Yoder, 1999; Heide-Jorgensen, 2008) e *Cuscuta* (Lanini & Kogan, 2005). Além destes gêneros, outros também podem causar sérios prejuízos econômicos, dentre eles aqueles pertencentes ao grupo denominado visco. Os representantes desses principais gêneros de plantas parasitas podem parasitar membros pertencentes a diferentes famílias de importância agrônômica, tais como, girassol (Asteraceae), tomate e batata (Solanaceae), arroz, milho e sorgo (Poaceae), café (Rubiaceae) e espécies de *Citrus* (Rutaceae) (Sauerborn *et al.*, 2007).

Os viscos constituem um grupo polifilético de parasitas aéreas obrigatórias pertencentes a Santalales (Mathiasen *et al.*, 2008; Nickrent, 2011). Alguns exemplos de gêneros de visco de importância econômica são *Arceuthobium*, *Viscum*, *Phoradendron* (Sauerborn *et al.*, 2007) e *Tapinanthus* (Zaroug *et al.*, 2014). Dentre as hospedeiras de interesse econômico que sofrem devido à presença deste grupo de plantas pode-se citar espécies de *Citrus*, cacau (Sauerborn *et al.*, 2007; Mathiasen *et al.*, 2008), outras árvores frutíferas e árvores fornecedoras de madeira (Mathiasen *et al.*, 2008).

Visto que plantas parasitas podem afetar significativamente a produção agrícola, estudos visando essa interação têm despertado interesses (Rispaill *et al.*, 2007). Deste

modo pesquisas sobre os mecanismos de defesa que atuam nessa relação de parasitismo têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver estratégias de controle, principalmente para parasitas de espécies agronomicamente importantes (Lozano-Baena *et al.*, 2007).

- **Mecanismos de defesa da planta hospedeira frente à parasita**

Apesar de certas plantas parasitas constituírem importante impacto econômico de âmbito mundial, ainda há poucos estudos referentes às respostas de defesa das plantas hospedeiras, principalmente quando se compara com o conhecimento atual sobre os mecanismos de defesa contra o ataque de herbívoros e patógenos (Smith *et al.*, 2009; Runyon *et al.*, 2010b).

Essa escassez de informação pode ser justificada devido à complexidade existente nessa relação de parasitismo, visto que ela envolve organismos pertencentes ao mesmo grupo, isto é, duas plantas, acarretando em um compartilhamento de aspectos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos (Lozano-Baena *et al.*, 2007).

Os mecanismos de defesa vegetal frente ao parasitismo por plantas são divididos em mecanismos de pré-ligação, pré-haustorial e pós-haustorial (Walters, 2011).

Os mecanismos de defesa pré-ligação são aqueles que atuam antes da planta parasita formar o haustório. Os mecanismos pré-haustoriais operam interrompendo o progresso de penetração da parasita, impedindo-a de se conectar ao sistema vascular da hospedeira. Os mecanismos pós-haustoriais, por sua vez, são aqueles que agirão após o estabelecimento da parasita com o sistema vascular de sua hospedeira (Walters, 2011).

Trabalhos que avaliam como plantas se defendem ao ataque provocado por plantas parasitas têm verificado que o modo como elas respondem e os mecanismos de defesa utilizados pelas hospedeiras nesta relação se assemelham aqueles utilizados na defesa contra outros grupos de organismos que também obtêm os nutrientes necessários para sua sobrevivência a partir de plantas (Smith *et al.*, 2009; Runyon *et al.*, 2010a).

Durante o ataque por patógenos, por exemplo, lignificação, produção de fitoalexinas e resposta de hipersensibilidade são algumas das respostas empregadas pelas plantas para interromper a infecção por patógenos (Walters, 2011), tais mecanismos também foram observados como respostas de plantas frente à infestação por plantas parasitas (Bringmann *et al.*, 1999; Mohamed *et al.*, 2003; Runyon *et al.*, 2010b). Outro exemplo é a maior produção e liberação de compostos voláteis por plantas parasitadas (Runyon *et al.*, 2008), mecanismo de defesa comum em respostas de plantas contra o ataque por herbívoros (Taiz & Zeiger, 2009; Pinto-Zevallos *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que a defesa de plantas contra plantas parasitas, assim como a qualquer outro fator de estresse, não envolve apenas uma resposta, mas sim uma combinação de alterações que compõem o mecanismo de defesa (Lozano-Baena *et al.*, 2007).

Outras respostas de defesa já relatadas para a relação de parasitismo entre plantas são a redução na produção de estimulantes de germinação (Jamil *et al.*, 2011), deposição de calose, suberização (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006) e produção de metabólitos secundários, especialmente substâncias fenólicas (Hariri *et al.*, 1991; Goldwasser *et al.*, 1999; Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006; Lozano-Baena *et al.*, 2007). Segundo Goldwasser *et al.* (2000), metabólitos secundários são um dos mecanismos de defesa utilizados por plantas resistentes ao ataque por plantas parasitas. Alguns autores sugerem que o mecanismo de ação que envolve aumento de conteúdo de substâncias fenólicas seja pelo desenvolvimento de um ambiente tóxico que poderia provocar o envenenamento da planta parasita (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006; Walters, 2011).

- **Metabolismo: fonte de substâncias usadas na defesa vegetal**

O metabolismo pode ser dividido em metabolismo primário e secundário (Dewick, 2009; Watson, 2014). O metabolismo primário é responsável pela síntese de algumas classes importantes de moléculas, tais como, carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Embora haja pequenas diferenças, as vias responsáveis pela síntese destes metabólitos primários são as mesmas para todos os grupos de organismos vivos, assim como seus produtos finais (Dewick, 2009).

Os carboidratos são importantes por sua função estrutural e por constituírem a principal fonte energética dos organismos vivos através de sua oxidação. As proteínas apresentam uma variedade de funções, tais como, estrutural, enzimática, defesa, transporte e energética (Nelson & Cox, 2011). No que diz respeito à sua função de defesa, pode-se citar uma classe especial de proteínas, as proteínas relacionadas à patogênese (PRP), que são produzidas pelas plantas em resposta a estresses bióticos provocados por diferentes grupos de organismos vivos (Walters, 2011), inclusive plantas parasitas (Castillejo *et al.*, 2004; Zélicourt *et al.*, 2007).

Os ácidos nucleicos, por sua vez, são responsáveis por armazenar e transmitir informações genéticas, enquanto que os lipídeos apresentam função estrutural, energética, de sinalização (Nelson & Cox, 2011) e também estão relacionados à defesa vegetal, visto que o ácido linolênico está envolvido na síntese de ácido jasmônico que, dentre outras funções, é responsável por um sistema de sinalização de defesa (Taiz &

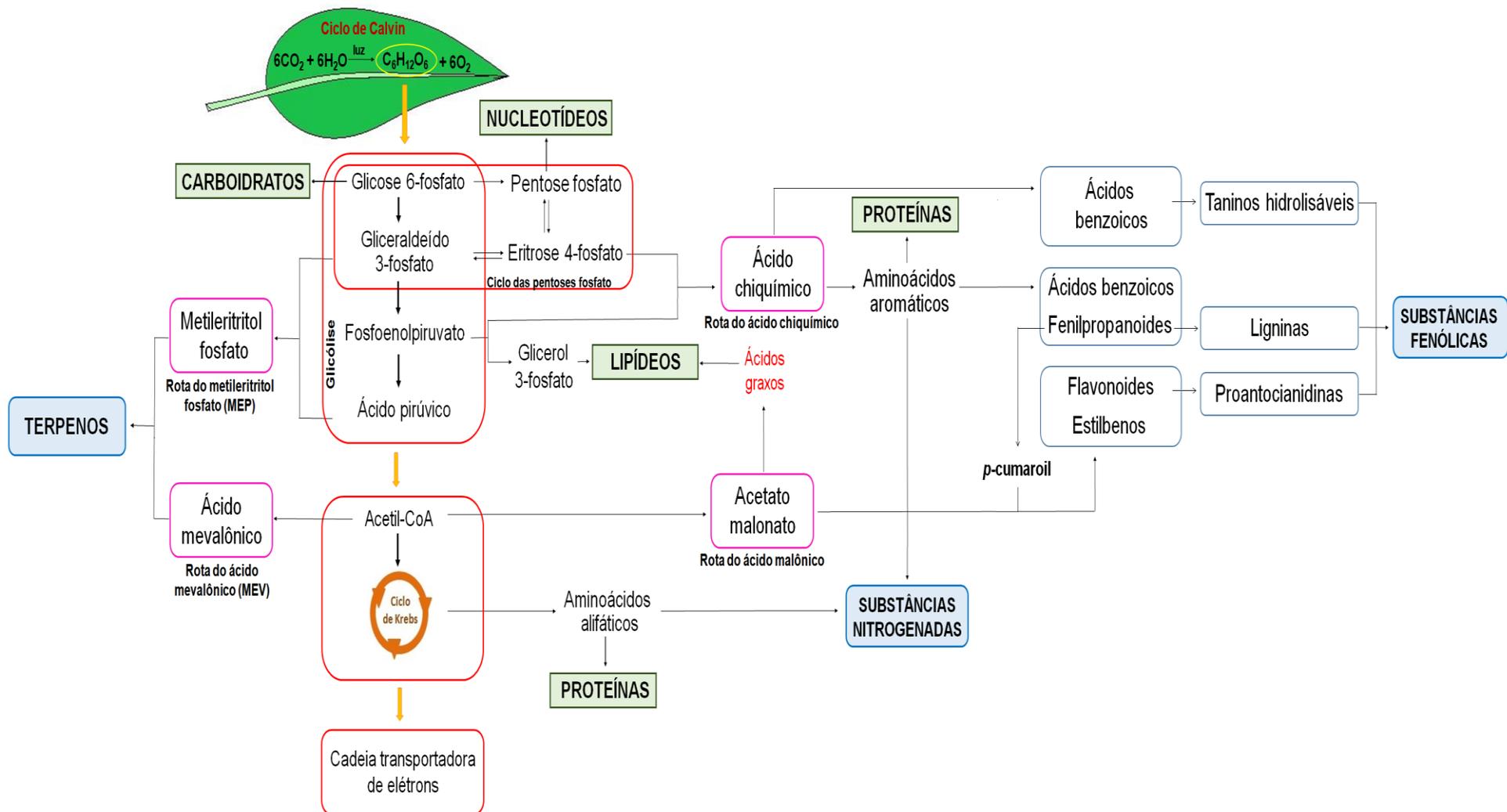
Zeiger, 2009). A síntese de metabólitos secundários é um exemplo de mecanismo de defesa que é induzido pelo ácido jasmônico (Dewick, 2009; Smith *et al.*, 2009; De Geyter *et al.*, 2012).

O metabolismo secundário, contudo, é responsável pela síntese de um conjunto de substâncias que não está diretamente relacionado à geração de energia e constituição de protoplasto, mas que auxilia na sobrevivência e percepção do ambiente externo pela planta (Simões *et al.*, 2010; Watson, 2014). Enquanto os metabólitos primários estão presentes em todos os vegetais, e por isso são considerados de distribuição universal, os metabólitos secundários podem não apresentar o mesmo padrão de distribuição nas plantas, e determinados metabólitos secundários estão restritos apenas a determinados grupos taxonômicos (Buchanan *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2009; Evert & Eichhorn, 2014).

Esses metabólitos são responsáveis por importantes funções ecológicas (Taiz & Zeiger, 2009; Watson, 2014) e podem ser vistos como estratégias químicas dos vegetais, pois é através deles que esses organismos interagem com o ambiente ao seu redor (Harborne, 2003).

Os metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes grupos. Tal categorização se dá por suas semelhanças estruturais e propriedades químicas e não necessariamente por compartilharem a mesma via de biossíntese. Estes grupos são terpenos, substâncias nitrogenadas e substâncias fenólicas. Essas substâncias podem ser sintetizadas a partir de quatro vias de biossíntese (Figura 2): via do metileritritol fosfato (MEP), via do ácido mevalônico (MEV), via do ácido chiquímico e via do ácido malônico (Dewick, 2009; Taiz & Zeiger, 2009). Essas vias metabólicas têm como precursores compostos provenientes do metabolismo vegetal primário (Dewick, 2009) e as interligações entre o metabolismo primário e o secundário podem ser observadas na figura 2.

Os ácidos graxos, embora não sejam considerados metabólitos secundários, são sintetizados a partir da via do acetato malonato (Dewick, 2009). Quimicamente, essas moléculas são ácidos carboxílicos ligados a uma cadeia carbônica que pode ser saturada (quando apresenta apenas ligações simples entre os átomos de carbono) ou insaturada (quando apresentam ligações duplas entre os átomos de carbono) (Kachroo & Kachroo, 2009). Nos vegetais eles são sintetizados nos plastídios (Kachroo & Kachroo, 2009; Taiz & Zeiger, 2009) e nesses organismos a cadeia carbônica geralmente é linear e constituída por um número par de carbonos, sendo que os ácidos graxos mais comuns são aqueles contendo 16 ou 18 átomos de carbono. A composição dos ácidos graxos presente nos lipídeos vegetais pode variar entre as espécies (Taiz & Zeiger, 2009).



**Figura 2:** Esquema geral das vias de biossíntese do metabolismo vegetal secundário e suas conexões com o metabolismo primário. Circulado em vermelho, vias de biossíntese do metabolismo primário e retângulos em verde seus produtos, os metabólitos primários. Delimitado em rosa, vias de biossíntese do metabolismo secundário e retângulos azuis os metabólitos secundários (adaptado de Dewick, 2009; Taiz & Zeiger, 2009).

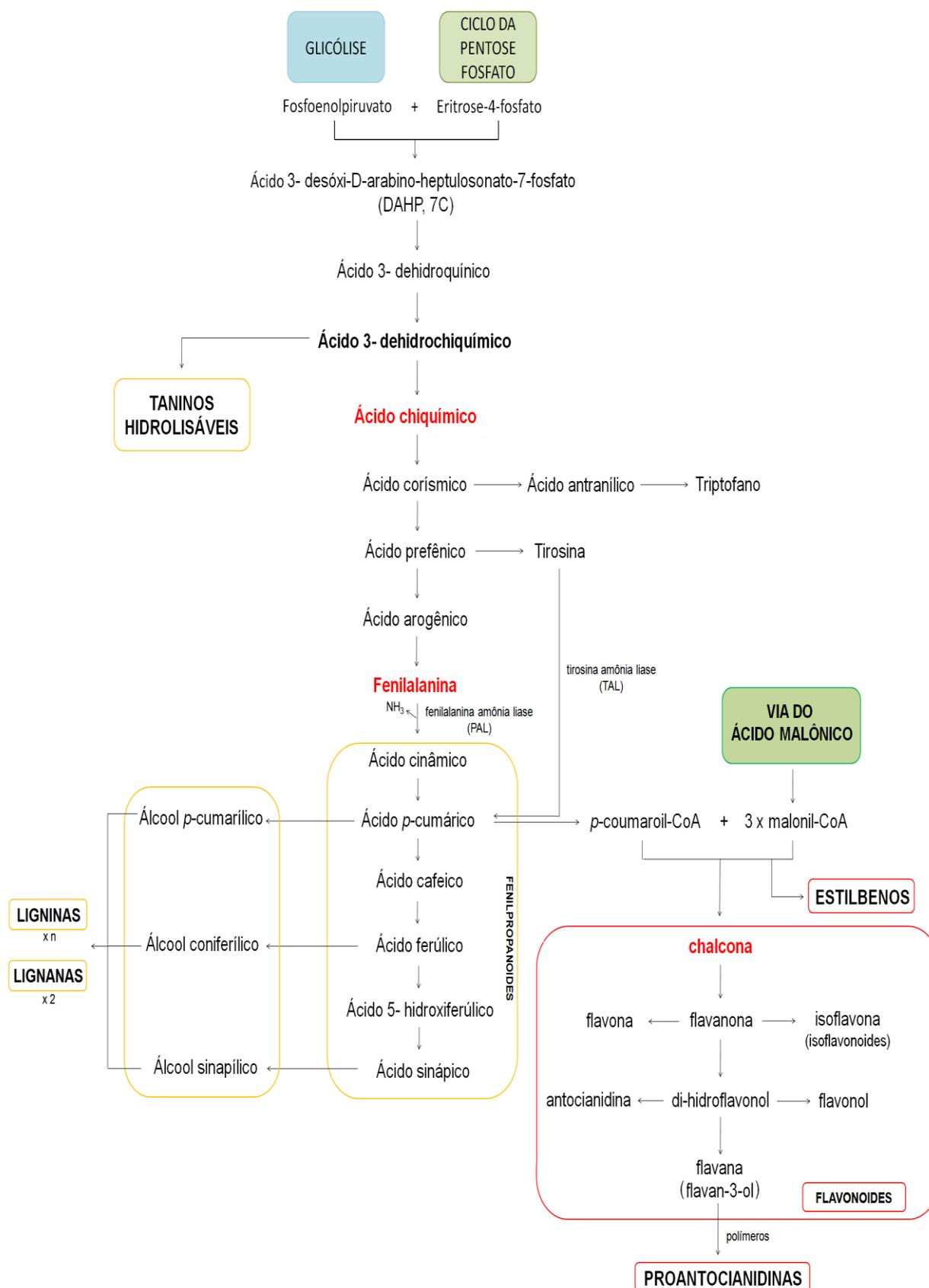
No que diz respeito à biossíntese de metabólitos secundários, os terpenos são sintetizados a partir de duas vias metabólicas: a via do ácido mevalônico e a via do metileritritol fosfato (Dewick, 2009; Taiz & Zeiger, 2009; Walters, 2011). Quanto às substâncias nitrogenadas, a maioria é sintetizada a partir de aminoácidos aromáticos, tais como, tirosina, fenilalanina e triptofano (sintetizados a partir da via do ácido chiquímico), ou a partir de aminoácidos alifáticos, dentre eles, ornitina e lisina (Dewick, 2009). Nesse grupo estão incluídos os metabólitos secundários com nitrogênio em sua estrutura química, tais como, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e alcaloides (Taiz & Zeiger, 2009; Walters, 2011).

As substâncias fenólicas, por sua vez, são assim classificadas por possuírem em comum pelo menos um grupo hidroxílico ligado a um anel benzênico (Watson, 2014). Esse grupo de metabólitos secundários é quimicamente muito diverso e sua biossíntese se dá pela ação de duas vias metabólicas, a via do ácido chiquímico e a via do acetato-malonato (Dewick, 2009).

Essas substâncias exercem várias funções nas plantas, dentre elas, atração de animais polinizadores e dispersores, suporte mecânico, sinalização entre plantas e bactérias simbióticas e proteção contra vários fatores bióticos e abióticos (Taiz & Zeiger, 2009). Algumas das principais classes de substâncias fenólicas são os fenilpropanoides, flavonoides, taninos e ligninas (Simões *et al.*, 2010) que aparecem em destaque na figura 3.

Os fenilpropanoides são caracterizados por apresentarem a estrutura geral  $C_6-C_3$  como esqueleto básico (Simões *et al.*, 2010). A partir deles são formadas outras classes importantes de substâncias fenólicas de organização estrutural mais complexa, tais como, ligninas, lignanas, estilbenos, flavonoides e proantocianidinas (Taiz & Zeiger, 2009). Defesa contra microrganismos patogênicos e insetos, atração de polinizadores, indução de simbioses de raízes de plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio (Ferrer *et al.*, 2008) e ação alelopática são algumas das funções atribuídas a essa classe de fenólicos (Taiz & Zeiger, 2009).

A maior classe de fenólicos é a constituída pelos flavonoides (Taiz & Zeiger, 2009; Watson, 2014) que apresenta mais de 9.000 estruturas descritas na literatura (Ferrer *et al.*, 2008).



**Figura 3:** Esquema geral das vias de biossíntese de substâncias fenólicas. Circulado em amarelo, classes de substâncias fenólicas provenientes estritamente da via do ácido chiquímico. Delimitado em vermelho, classes de substâncias fenólicas oriundas das vias do ácido chiquímico e do ácido malônico, isto é, de biossíntese mista (adaptado de Dewick, 2009).

Os flavonoides são constituídos por 15 átomos de carbono organizados em dois anéis aromáticos, cada um contendo 6 carbonos, interligados a um anel heterocíclico composto por três átomos de carbono. Essa organização estrutural dos flavonoides pode ser representada de forma genérica por C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Vermerris & Nicholson, 2006; Wang *et al.*, 2011) e os diferentes grupos de flavonoides variam conforme o grau de oxidação do anel heterocíclico, ou seja, do anel central (Wang *et al.*, 2011). Os principais grupos de flavonoides são as chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, di-hidroflavonóis, antocianidinas, flavonóis e flavanas (Treutter, 2006; Dewick, 2009), representados na figura 3.

Nas plantas, essas substâncias são responsáveis pela proteção contra radiação ultravioleta, defesa contra microrganismos patogênicos, apresentam ação antioxidante (Treutter, 2006; Simões *et al.*, 2010), auxiliam no estabelecimento de simbioses (bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares) (Treutter, 2006) e estão envolvidos na atração de animais polinizadores e dispersores por proporcionarem a grande variação de cores encontrada nos diferentes órgãos vegetais (Buchanan *et al.*, 2000).

Além das funções descritas acima, também apresentam efeito alelopático podendo desempenhar uma possível função no controle de plantas parasitas (Hassan & Mathesius, 2012), como verificado no trabalho realizado por Hooper *et al.* (2010) em que flavonoides presentes no exsudato das raízes da leguminosa *Desmodium uncinatum* inibiram o crescimento da radícula de plantas parasitas pertencentes ao gênero *Striga*.

Taninos, outra classe de substâncias fenólicas, são historicamente conhecidos por serem utilizados para converter pele de animais em couro. Frequentemente são divididos em taninos condensados (ou proantocianidinas) e em taninos hidrolisáveis (Taiz & Zeiger, 2009; Simões *et al.*, 2010), embora alguns autores considerem mais alguns grupos de taninos (Khanbabae & van Ree, 2001). O primeiro grupo é formado pela polimerização de flavonoides, enquanto que o segundo pela polimerização de ácidos benzoicos com açúcares (Taiz & Zeiger, 2009). Essa classe de metabólitos também está envolvida na defesa química dos vegetais (Taiz & Zeiger, 2009) e o aumento na produção de tais fenólicos geralmente é reportado como um mecanismo de proteção frente à herbivoria e infecções (Khanbabae & van Ree, 2001).

As ligninas, por sua vez, são o segundo composto orgânico presente em maior quantidade nos vegetais, atrás apenas da celulose, sendo assim, pode-se dizer que elas são as substâncias fenólicas mais abundantes nos vegetais. Elas são polímeros constituídos a partir dos alcoóis *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (fenilpropanoides) e

estão presentes nas paredes celulares de tecidos vasculares e de sustentação (Taiz & Zeiger, 2009).

Essa classe de fenólicos exerce importantes funções, tais como, sustentação mecânica, resistência à compressão, auxilia no transporte ascendente da água ao impermeabilizar as paredes celulares (Evert & Eichhorn, 2014) e defesa (Bhuiyan *et al.*, 2009) contra o ataque de vários organismos vivos (Walters, 2011). Quando esses ataques acontecem, a planta pode iniciar um processo de lignificação, aumentando a resistência de suas paredes celulares (Taiz & Zeiger, 2009; Evert & Eichhorn, 2014) como já foi reportado para casos de infestação por plantas parasitas (Walters, 2011).

Diferentes classes de substâncias fenólicas estão envolvidas na defesa vegetal e sabe-se que tais metabólitos são afetados quando as plantas são sujeitas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos (Watson, 2014).

- **Modelo Vegetal**

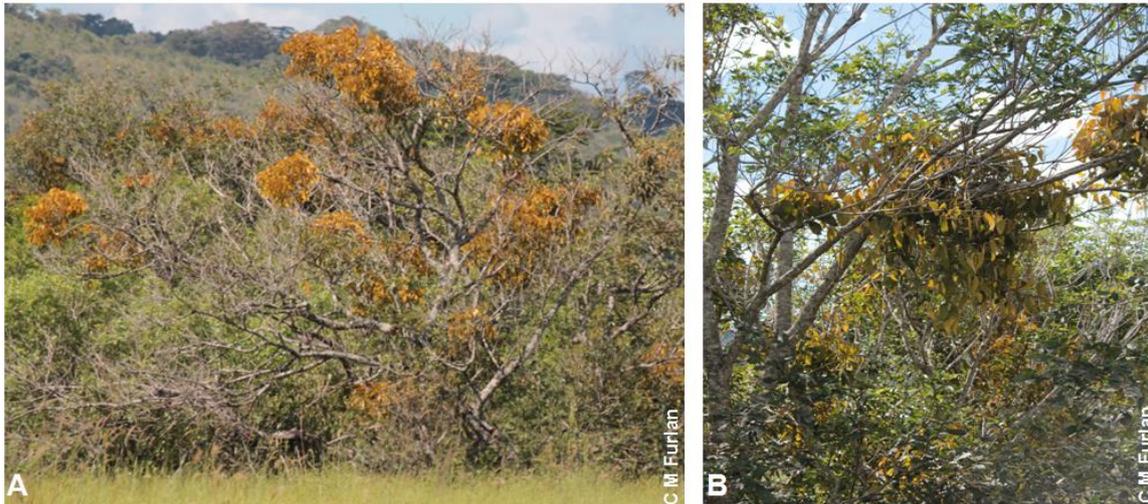
*Phoradendron* é um gênero de plantas parasitas aéreas, dentro do grupo dos viscos e com importância econômica, visto que há relatos na literatura de grandes perdas econômicas em decorrência de parasitismo por várias espécies de *Phoradendron*. Alguns exemplos de hospedeiras de valor econômico afetadas por este gênero são o café, cacau, espécies de *Citrus*, abacateiro, carvalho, dentre outras (Mathiasen *et al.*, 2008).

O gênero apresenta aproximadamente 230 espécies (Kuijt, 2003), destas 64 podem ser encontradas no território brasileiro (Arruda *et al.*, 2012) nos diferentes tipos de ecossistemas. É um dos gêneros conhecidos popularmente como ervas-de-passarinho, com distribuição restrita ao continente americano (Souza & Lorenzi, 2008; Heide-Jorgensen, 2008).

As espécies deste gênero apresentam apenas haustório primário de formato cônico, formando a chamada galha, uma característica que não é exclusiva deste gênero (Kuijt, 1969). No que diz respeito a sua especificidade de hospedeiras, várias espécies são generalistas (Rigon, 2011), embora haja algumas poucas especialistas (Overton, 1997), e ainda é possível encontrar espécies que são epiparasitas (Heide-Jorgensen, 2008) ou autoparasitas (Ehleringer & Schulze *et al.*, 1985).

Há discussões a respeito do posicionamento filogenético do gênero. De acordo com APG III (2009), o gênero está inserido em Santalaceae, entretanto Nickrent (2011) propõe um reposicionamento em Viscaceae. Neste estudo adotamos a classificação proposta pelo APG III (2009).

A espécie *Phoradendron crassifolium* é uma hemiparasita aérea obrigatória (Figura 4) que pode ser encontrada em diferentes países da América Central e América do Sul. Das espécies pertencentes ao gênero, ela é uma das mais comuns, principalmente no Brasil (Kuijt, 2003). No Brasil, a espécie está presente em todas as regiões (Forzza *et al.*, 2010) e apresenta uma ampla variedade de hospedeiras (Rigon, 2011).



**Figura 4:** A- Vista geral de *Tapirira guianensis* parasitada por *Phoradendron crassifolium* (de coloração alaranjada) próximo a um córrego em uma área particular no município de Campanha, MG. B- Detalhe de um ramo infestado de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*.

De acordo com Teixeira-Costa (2015), em levantamento realizado no herbário SPF (Universidade de São Paulo), verificou-se que *P. crassifolium* foi encontrada parasitando espécies de hospedeiras pertencentes a 13 famílias distintas. Em um estudo realizado por Lüttge *et al.* (1998), a espécie foi encontrada parasitando *Ilex cf. affinis* (Aquifoliaceae), *Miconia chamissois* (Melastomataceae) e *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). Em outro trabalho realizado em um remanescente de Mata Atlântica localizado na região sudeste do Brasil, *P. crassifolium* foi encontrada parasitando espécies pertencentes a seis famílias diferentes, são elas: Anacardiaceae (*Lithrea molleoides* e *T. guianensis*), Euphorbiaceae (*Sebastiania commersoniana*), Lauraceae (*Ocotea velloziana*), Peraceae (*Pera glabrata*), Sapotaceae (*Chrysophyllum marginatum*) e Siparunaceae (*Siparuna guianensis*) (Messias *et al.*, 2014).

O gênero *Tapirira* (Anacardiaceae) apresenta em torno de 15 espécies que podem ser encontradas na América do Sul e no México (David *et al.*, 1998). Algumas espécies pertencentes a este gênero, já foram relatadas como hospedeiras de espécies de *Phoradendron*, dentre elas, *T. obtusa* (Arruda *et al.*, 2013) e *T. guianensis* (Messias *et al.*, 2014).

*Tapirira guianensis*, conhecida popularmente como pau-pombo ou peito-de-pombo, é uma espécie arbórea (Figura 4A), nativa, presente em muitas formações florestais brasileiras, principalmente as de terreno úmido (Souza & Lorenzi, 2008).

Essa espécie é usada na medicina popular para o tratamento de infecções cutâneas e foi verificado que seus extratos apresentam atividade antibacteriana, antileishmania, antimalárica (Roumy *et al.*, 2009) e citotóxica (David *et al.*, 1998). Além de sua importância como planta medicinal, *T. guianensis* também é empregada para confecção de artesanatos (Costa *et al.*, 2006), em reflorestamento (Lorenzi, 2014) e como espécie madeireira (Alvino *et al.*, 2005; Cunha & Albuquerque, 2006), demonstrando que tal espécie apresenta valor ambiental e comercial.

No que diz respeito à relação de *P. crassifolium* parasitando *T. guianensis*, estudos realizados por Teixeira-Costa & Ceccantini (2015) indicaram que há um aumento de vasos embolisados, ou seja, não funcionais, em galhos de *T. guianensis* parasitada, demonstrando que essa espécie sofre modificações anatômicas no lenho quando parasitada por *P. crassifolium*, mas pouco é conhecido sobre a interferência do parasitismo por *P. crassifolium* no metabolismo de *T. guianensis*.



## II. Justificativa e Hipóteses

Estudos que levam em consideração o papel de metabólitos secundários na interação entre plantas e herbívoros e/ou patógenos são frequentemente encontrados na literatura (Lattanzio *et al.*, 2006; Mithöfer & Boland, 2012; War *et al.*, 2012), principalmente devido à importância econômica que o ataque provocado por estes organismos representa a plantações de espécies cultivadas (Pimentel *et al.*, 2005; Oerke, 2006). Outro fator importante evidenciado por esses estudos é o potencial dessas substâncias como defensivos agrícolas de origem natural (Daferera *et al.*, 2003; Batish *et al.*, 2008). No entanto, trabalhos relatando a relação de metabólitos secundários em interações de parasitismo entre plantas são mais escassos.

Dessa maneira, estudos que investiguem como a quantidade de metabólitos secundários é afetada quando uma planta é parasitada por outra pode contribuir para o entendimento de como esses compostos atuam, especificamente na interação planta-planta parasita.

Mediante o fato de que os metabólitos secundários atuam como defesas químicas vegetais frente a fatores bióticos e abióticos e que eles são afetados em situações de estresse, este estudo partiu do pressuposto de que o parasitismo de uma espécie vegetal é uma condição de estresse para a planta hospedeira e deve modificar o perfil químico das espécies envolvidas. Portanto, este trabalho baseou-se na premissa de que na relação *T. guianensis* vs. *P. crassifolium* ocorrerá um aumento na quantidade de substâncias fenólicas como resposta de defesa à instalação da parasita. Por outro lado, se a parasita se beneficia com fotossintatos provenientes da hospedeira, metabólitos primários geradores de energia, como açúcares e lipídeos, por exemplo, também seriam afetados com a infestação da hospedeira e eles se encontrariam em menores proporções nos tecidos adjacentes a galha.



### III. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo investigar como as quantidades de algumas classes de metabólitos primários e secundários em *T. guianensis* são alteradas quando a espécie é parasitada por *P. crassifolium*. Mais especificamente, este trabalho teve por objetivos:

- Determinar os conteúdos de taninos, flavonoides e fenilpropanoides em *P. crassifolium* e em folhas e ramos de *T. guianensis* quando parasitada e não parasitada;
- Determinar a relação carbono:nitrogênio em *P. crassifolium* e em folhas e ramos de *T. guianensis* quando parasitada e não parasitada;
- Determinar os teores de carboidratos solúveis, amido e lipídeos em *P. crassifolium* e em folhas e ramos de *T. guianensis* quando parasitada e não parasitada;
- Avaliar, de forma integrativa, como a relação parasítica afeta o metabolismo das espécies envolvidas.



## IV. Material e Métodos

- **Coleta do material vegetal**

Este estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biociências da USP, na pessoa do Prof. Gregório Ceccantini e da Ms. Luiza Teixeira-Costa. O material vegetal foi coletado nos dias 13 e 14 de janeiro de 2014 em uma população situada no município de Campanha, Minas Gerais (latitude 21° 49' 20,06" sul e longitude 45° 25' 03,1" oeste), contendo indivíduos de *T. guianensis* não parasitada e indivíduos parasitados por *P. crassifolium*. A população foi previamente marcada e identificada pelo Laboratório de Anatomia Vegetal e voucher do material vegetal da interação em estudo (GC3501) foi depositado no Herbário do Instituto de Biociências da USP (Herbário SPF).

A partir de nove indivíduos de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* foram obtidos oito grupos, esquematizados na figura 5. Dos ramos infestados de *T. guianensis* (Figura 6A) foram coletadas as folhas (FRI) e os ramos (RI) da hospedeira, além de folhas (FP) e ramos (RP) da parasita, que estão em destaque na figura 5. Os ramos infestados da hospedeira (RI) foram divididos em três porções: região proximal (RPRI), região distal (RDRI) e galha (RGRI) (Figura 6B). Desses mesmos indivíduos de *T. guianensis* parasitada ainda foram obtidos mais dois grupos, um que corresponde aos ramos não infestados (RNI) e o outro as suas respectivas folhas (FRNI).

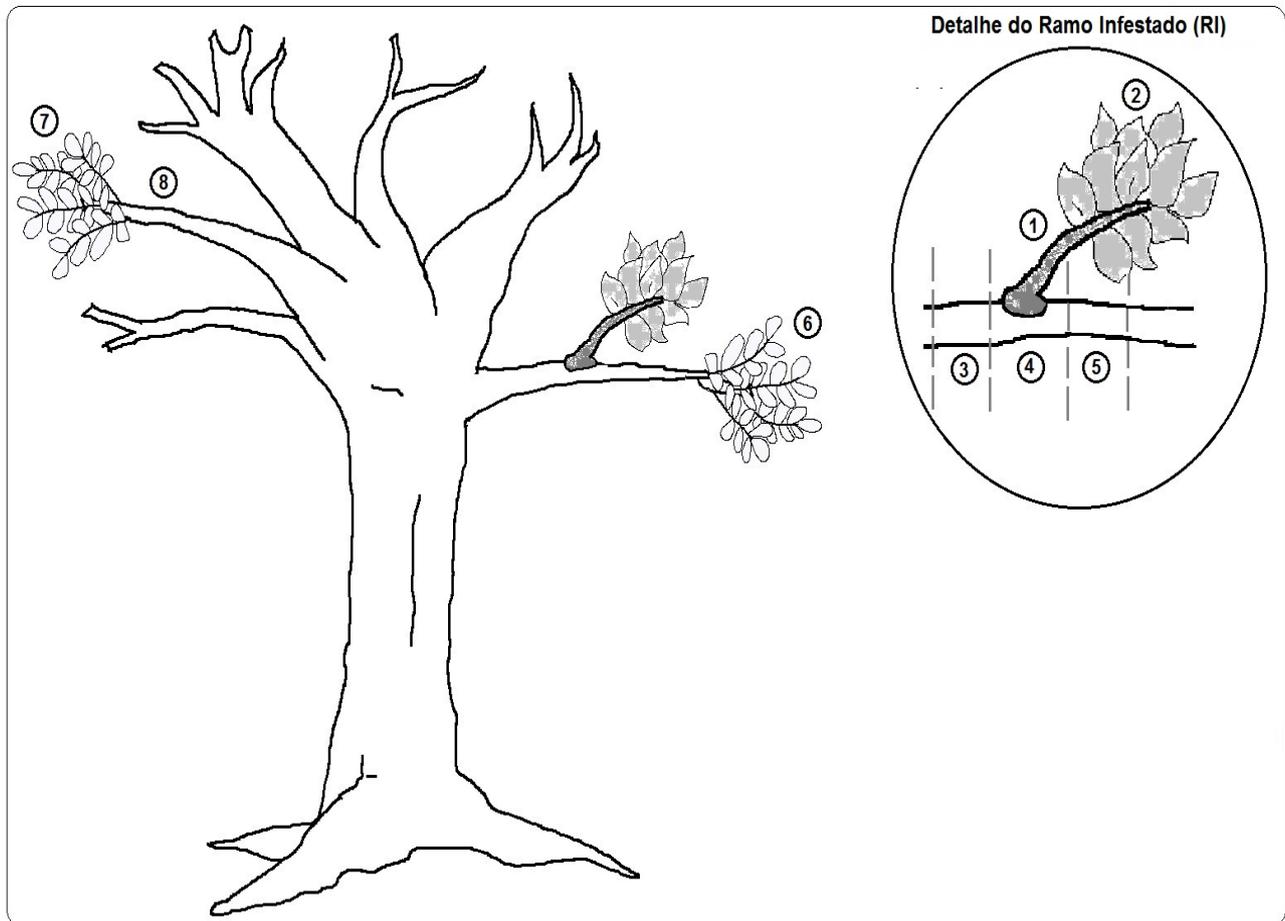
Além destes oito grupos, foram coletados outros dois grupos provenientes de seis indivíduos de *T. guianensis* não parasitada, totalizando dez grupos. Destes indivíduos foram coletados os ramos (RT) e as suas respectivas folhas (FT).

Após a separação do material vegetal para a obtenção de todos os grupos, todas as partes vegetais foram congeladas, liofilizadas, pulverizadas em moinho de bola e mantidas em frascos plásticos opacos a temperatura ambiente até o momento das análises.

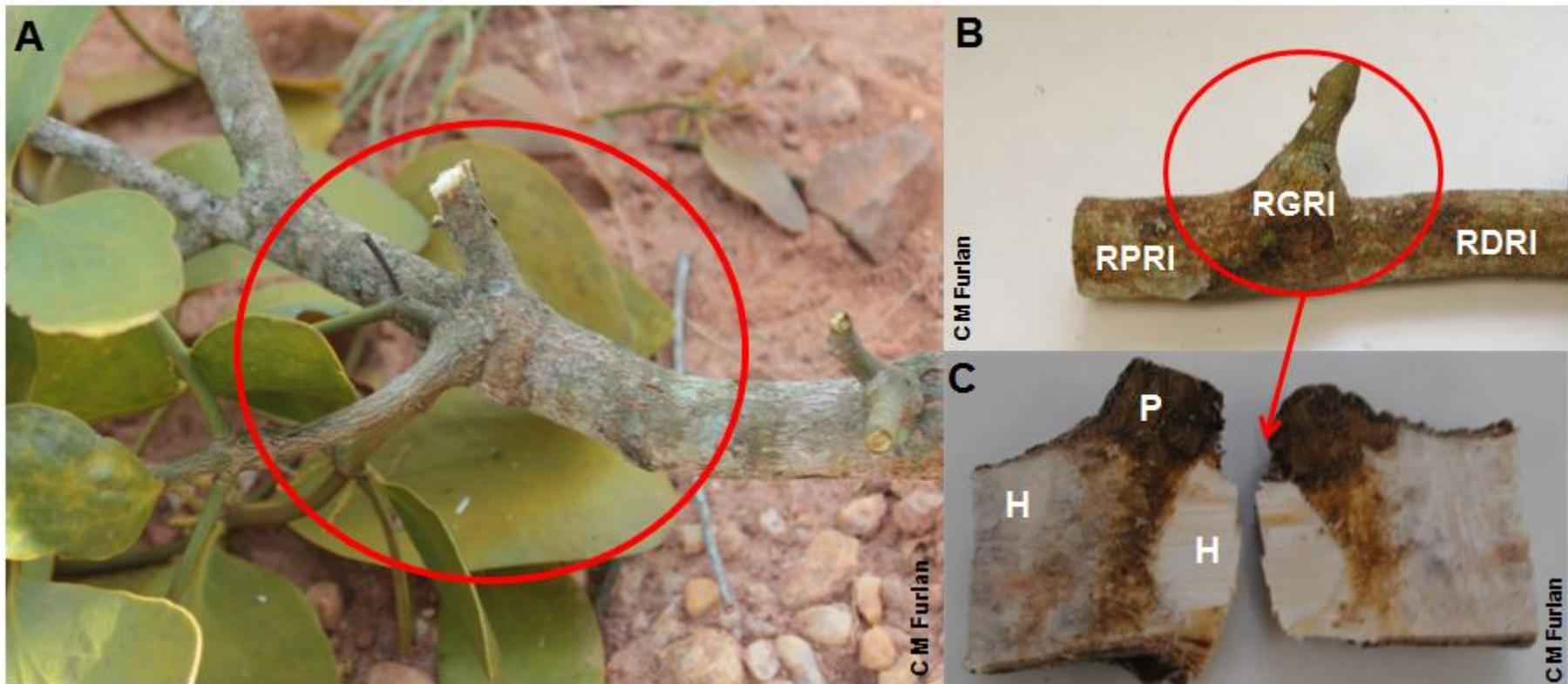
- **Preparo dos extratos**

Exatamente cerca de 100 mg do material vegetal pulverizado de todas as amostras foram extraídos com 15 mL de metanol (MeOH) 80% à 70° C, em banho seco, durante uma hora com agitação regular. O sobrenadante foi filtrado, transferido para balão volumétrico e o volume completado para 25 mL com MeOH 80%, atingindo-se a concentração final de 4 mg mL<sup>-1</sup>. A partir desses extratos foram realizadas as análises de quantificação de substâncias fenólicas em espectrofotômetro UV-visível para microplaca e

em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD) descritas a seguir.



**Figura 5:** Desenho esquemático dos grupos obtidos a partir da coleta de indivíduos de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*. 1- RP, ramo da parasita; 2- FP, folhas da parasita; 3- RPRI, região proximal do ramo infestado; 4- RGRI, região da galha do ramo infestado; 5- RDRI, região distal do ramo infestado; 6- FRI, folhas do ramo infestado; 7- FRNI, folhas do ramo não infestado; e 8- RNI, ramo não infestado.



**Figura 6:** *Tapirira guianensis*. A- Ramo infestado de *T. guianensis*; B- Detalhe do ramo infestado de *T. guianensis* mostrando as regiões proximal, galha e distal; e C- Secção longitudinal da região da galha. RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; RDRI, região distal do ramo infestado; P, tecido da planta parasita; e H, tecido da planta hospedeira.

- **Análise quantitativa de substâncias fenólicas totais**

O conteúdo de substâncias fenólicas totais presente nas amostras foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu modificado por Santos (2014). Em uma microplaca de 96 poços foram transferidos 190  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 10  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu, 50  $\mu\text{L}$  dos extratos previamente diluídos ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 50  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 10%. Como branco foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de metanol 80% seguindo a mesma reação. O material foi homogeneizado e incubado durante 30 minutos a  $40^\circ \text{C}$ , com agitação (120 rpm). Após o período de incubação a absorbância foi determinada em 760 nm usando um espectrofotômetro para microplaca. Todas as amostras, assim como os controles positivo e negativo, foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram comparados com a curva padrão de ácido gálico ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $80,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expressos em porcentagem.

- **Análise quantitativa de flavonas e flavonóis**

O teor de flavonas e flavonóis presente nas amostras foi determinado utilizando o método do cloreto de alumínio, modificado de Santos & Furlan (2013). Em uma microplaca de 96 poços foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  das amostras (os extratos de folhas foram diluídos até atingir a concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  e os de ramos não foram diluídos) e 100  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio 5%. Como branco foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de metanol 80% seguindo a mesma reação. O material foi homogeneizado e a absorbância foi determinada em 405 nm usando um espectrofotômetro para microplaca. Todas as amostras, assim como os controles positivo e negativo, foram realizadas em triplicata. Os resultados foram comparados com a curva padrão de quercetina ( $3,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $84,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expressos em porcentagem.

- **Análise quantitativa de flavonoides e fenilpropanoides por CLAE-DAD**

Flavonoides e fenilpropanoides presentes nos extratos foram quantificados segundo Rezende (2013), com modificações. Para tanto, uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  de cada amostra ( $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (LC1260 – Agilent Technologies) com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Foi utilizada a coluna Zorbax Eclipse Plus C-18 (4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  - Agilent) e fase móvel composta por ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B). O gradiente de solventes utilizado durante as análises começou com 15% de B em A (0-20 minutos), aumentou de 15 para 100% de B em A (20-25 minutos), manteve-se isocrático durante 5 minutos, reduziu de 100 para 15% de B em A (30-32 minutos) e permaneceu isocrático por 3 minutos. O fluxo iniciou em 1,5

mL min<sup>-1</sup> (0-25,1 minutos), diminuiu para 1,0 mL min<sup>-1</sup> (25,2-26,9 minutos) e, por fim, retornou para 1,5 mL min<sup>-1</sup> (27-35 minutos). Os fenilpropanoides foram monitorados em 280 nm, enquanto que os flavonoides em 352 nm.

A quantificação de flavonoides e fenilpropanoides foi realizada utilizando curvas padrões de quercetina (3,0 µg mL<sup>-1</sup> a 120 µg mL<sup>-1</sup>) e ácido *p*-cumárico (1,5 µg mL<sup>-1</sup> a 120 µg mL<sup>-1</sup>), respectivamente, analisados por CLAE-DAD nas mesmas condições descritas acima e os resultados foram expressos em porcentagem. A identificação dos constituintes foi determinada mediante comparação dos tempos de retenção (Tr) e dos espectros de UV dos constituintes presentes nas amostras com os padrões analisados sob as mesmas condições de análise descritas acima.

- **Análise quantitativa de taninos totais**

O teor de taninos totais das amostras foi determinado através do método de precipitação da albumina de soro bovino (BSA) modificado de Waterman & Mole (1994). Em microtubos de 0,5 mL foram transferidos 175 µL de solução BSA (albumina de soro bovino 1 mg mL<sup>-1</sup>, em tampão acetato 0,2 M, pH 5,0) e 50 µL das amostras (4 mg mL<sup>-1</sup>). Como branco foram utilizados 50 µL de metanol 80% seguindo a mesma reação. O material foi homogeneizado e permaneceu em repouso por 10 minutos. Após esse período, centrifugou-se a 10.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 200 µL do reagente SDS (dodecilsulfato de sódio) 1%. O material foi homogeneizado até a completa solubilização do precipitado e, então, foram acrescentados 75 µL do reagente cloreto férrico 0,01 M e ele foi novamente homogeneizado. O material foi transferido para microplacas de 96 poços e incubado durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação a absorbância foi determinada em 520 nm usando um espectrofotômetro para microplaca. Todas as amostras, assim como os controles positivo e negativo, foram realizadas em triplicata. Os resultados foram comparados com a curva padrão de ácido tânico (0,2 a 1,6 mg mL<sup>-1</sup>) e expressos em porcentagem.

- **Análise quantitativa de proantocianidinas (taninos condensados)**

A quantidade de proantocianidinas das amostras foi determinada através do método do butanol ácido, adaptado de Waterman & Mole (1994). Em microtubos de 0,5 mL foram transferidos 200 µL do reagente butanol/ácido clorídrico (HCl) e 40 µL das amostras (4 mg mL<sup>-1</sup>). Como branco foram utilizados 40 µL de metanol 80% seguindo a mesma reação. O material foi homogeneizado e incubado a 95° C durante 30 minutos. Após o período de incubação, o material foi transferido para microplacas de 96 poços e a

absorbância das amostras, em temperatura ambiente, foi determinada em 550 nm usando um espectrofotômetro para microplaca. Todas as amostras, assim como os controles positivo e negativo, foram realizadas em duplicata e para cada amostra e controles foi realizado um branco usando o reagente butanol branco (sem ácido clorídrico). Os resultados foram comparados com a curva padrão de tanino de quebracho (0,6 a 2,4 mg mL<sup>-1</sup>) e expressos em porcentagem.

- **Análise quantitativa de carboidratos solúveis**

A quantidade de carboidratos solúveis presente nas amostras foi determinada através do método de fenol-ácido sulfúrico modificado de Masuko *et al.* (2005). Foram pesados cerca de 10 mg do material vegetal, previamente seco e triturado, em microtubos de 2 mL. Esse material foi extraído com 1,5 mL de etanol 80% em banho-maria a 80° C durante 20 minutos e posteriormente centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para tubos de *speed vac*. Esse procedimento foi realizado sete vezes com o objetivo de extrair a maior quantidade possível de carboidratos solúveis presente nas amostras.

Os microtubos contendo o precipitado foram secos em estufa a 40° C por 24 horas para posterior análise de amido, enquanto que os sobrenadantes recolhidos foram secos em *speed vac*. Este último material foi solubilizado em 1 mL de água ultrapura e transferido para um microtubo de 2 mL ao qual foram adicionados 0,5 mL de clorofórmio para a remoção dos pigmentos lipossolúveis. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos e 0,7 mL da fase superior foi recolhida e transferida para outro microtubo.

Em uma microplaca de 96 poços foram transferidos 30 µL dessa fase superior, 150 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado e 30 µL de fenol 5%. Como branco foram utilizados 30 µL de água ultrapura seguindo a mesma reação. O material foi homogeneizado e incubado durante 5 minutos a 75° C e posteriormente resfriado em banho de gelo por mais 5 minutos. A absorbância foi determinada em 490 nm usando um espectrofotômetro para microplaca. Todas as amostras, assim como os controles positivo e negativo, foram realizadas em triplicata. Os resultados foram comparados com a curva padrão de glicose (100 µg mL<sup>-1</sup> a 1000 µg mL<sup>-1</sup>) e expressos em porcentagem.

- **Análise quantitativa de amido**

O amido presente nas amostras foi quantificado através do método enzimático segundo Amaral *et al.* (2007), com modificações. O precipitado resultante da extração de carboidratos solúveis foi utilizado para essa quantificação. A esse precipitado foram adicionados 500 µL de α-amilase (120 U mL<sup>-1</sup>) termoestável de *Bacillus licheniformis*,

previamente diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5, e então foi incubado a 75° C em banho-maria por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado mais uma vez, totalizando 1 mL de extrato.

Após o segundo período de incubação, as amostras foram resfriadas até atingir 50° C e a elas foram adicionados 500 µL de amiloglicosidase (30 U mL<sup>-1</sup>) de *Aspergillus niger* diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. Esse material foi incubado a 50° C em banho-maria por 30 minutos e o mesmo procedimento foi repetido uma segunda vez, totalizando 2 mL de extrato. Após a segunda incubação a 50° C, os extratos foram colocados em água fervente por 10 minutos e imediatamente resfriados. Em seguida, foram centrifugados a 11.000 rpm durante 2 minutos.

Em uma microplaca de 96 poços foram transferidos 50 µL dos extratos e 250 µL do reagente glicose PAP (Labtest). Como branco foram utilizados 50 µL de água ultrapura seguindo a mesma reação. O material foi homogeneizado e incubado durante 15 minutos a 37° C e a absorbância foi determinada em 490 nm usando um espectrofotômetro para microplaca. Todas as amostras, assim como os controles positivo e negativo, foram realizadas em triplicata. Os resultados foram comparados com a curva padrão de glicose (25 µg mL<sup>-1</sup> a 350 µg mL<sup>-1</sup>) e expressos em porcentagem.

- **Determinação da razão carbono/nitrogênio (C/N)**

Exatamente cerca de 2 mg do material vegetal previamente liofilizado e pulverizado de seis indivíduos de cada grupo foram enviados para o Laboratório de Análise Elementar na Central Analítica do Instituto de Química da USP para análise da porcentagem de carbono e nitrogênio (%CN) mediante o uso de um analisador elementar Perkin-Elmer 2400.

- **Análise qualitativa de lipídeos**

A extração de lipídeos foi realizada de acordo com Ahmad *et al.* (1981). Para tanto, foi pesado exatamente cerca de 1 g de cada amostra previamente pulverizada e liofilizada. As amostras foram envolvidas em papel filtro e os lipídeos foram extraídos em Soxhlet durante 6 horas usando aproximadamente 300 mL de hexano. O solvente do material extraído foi recuperado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C e as amostras foram secas sob corrente de nitrogênio e mantidas em dessecador até obter massa constante para posterior cálculo de rendimento.

Aproximadamente 2 mg do óleo extraído foram transferidos para microtubos e o material foi solubilizado em 1 mL de tolueno. Esse material passou por um processo de transmetilação como descrito em Clemente (2010), com o intuito de tornar os ácidos

graxos mais voláteis durante a análise em cromatógrafo a gás. Para tanto, 30 µL das amostras solubilizadas em tolueno foram transferidas para tubos de vidro com rosca e a eles foram adicionados 4 mL da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5% em metanol e 2 mL de tolueno. O material foi homogeneizado e mantido em banho seco a 80° C durante 4 horas.

Após atingir a temperatura ambiente, o material foi transferido para tubos de centrífuga e a ele foram adicionados 4 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 M e 1 mL de diclorometano com o objetivo de separar a fase orgânica contendo os ácidos graxos. O material foi novamente homogeneizado, centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos e a fase orgânica foi transferida para outro tubo de centrífuga. Esses procedimentos para a remoção da fase orgânica foram repetidos mais duas vezes. Em seguida, foram adicionados 4 mL de água ultrapura às fases orgânicas reunidas e o material foi centrifugado a 5.000 rpm durante 5 minutos. A fase orgânica foi removida, transferida para novo tubo e a ela foi adicionado sulfato de sódio anidro. O material foi mantido em repouso *overnight* em ambiente escuro.

Após o período de repouso, o extrato foi filtrado, evaporado sob corrente de nitrogênio e mantido em freezer a -20° C até o momento da análise. A partir desse processo de transmetilação foram obtidos os ácidos graxos metilados.

A análise dos ácidos graxos que compõem os óleos extraídos foi realizada segundo o método utilizado por Clemente (2010), com modificações. As análises foram realizadas no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM 6850/5975C Agilent) do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP. Os óleos foram retomados em hexano e 1 µL foi injetado em uma coluna capilar de sílica HP-INNOWax (30 m x 0,32 mm x 0,5 µm). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo constante de 1,7 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial do forno foi programada para 150° C, que se manteve durante 5 minutos, e aumentou até 225° C a uma taxa de 15° C min<sup>-1</sup> e, então, passou a aumentar 5° C min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura de 260° C, mantendo-se assim por 7 minutos. As temperaturas do injetor, da fonte iônica e do quadruplo foram 220° C, 280° C e 180° C, respectivamente.

Para a identificação dos ácidos graxos, os espectros obtidos no espectrômetro de massas foram comparados com a biblioteca NIST (presente no equipamento) e com a biblioteca digital AOCS Lipid Library disponível em <http://lipidlibrary.aocs.org/>, além da comparação dos tempos de retenção dos ácidos graxos das amostras com os de amostras autênticas. Os resultados estão expressos em porcentagem relativa entre os ácidos graxos integrados nos cromatogramas.

- **Resposta plástica**

Com o intuito de avaliar como *T. guianensis* é afetada pelo parasitismo por *P. crassifolium* foi utilizado o parâmetro resposta plástica (RP) segundo Barton (2008). A resposta plástica foi calculada para os dois órgãos estudados (folhas e ramos) e as variáveis analisadas foram: substâncias fenólicas totais, flavonas e flavonóis, taninos totais, proantocianidinas, carboidratos solúveis, amido, lipídeos, porcentagem de carbono e nitrogênio e razão C/N.

A resposta plástica foi calculada mediante o uso da equação:  $RP = (VPI - \bar{x} C) / \bar{x} C$ , onde VPI corresponde ao valor da variável analisada na planta infestada e  $\bar{x} C$  é a média desta mesma variável obtida para o grupo controle. Valores de RP menores que zero ( $RP < 0$ ) indicam que o parasitismo provocou um efeito negativo na hospedeira para a variável analisada, valores acima de zero ( $RP > 0$ ), um efeito positivo, enquanto que RP igual a zero ( $RP = 0$ ), indica que a planta parasita não provocou nenhuma alteração na planta hospedeira (Li *et al.*, 2015).

No presente trabalho, para cada variável estudada a resposta plástica, tanto de folhas quanto de ramos, foi calculada com relação a dois controles. Para folhas os controles foram os grupos folhas de *T. guianensis* não parasitada (FT) e folhas de ramos não infestados (FRNI), enquanto que para ramos os controles foram os grupos ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT) e ramos não infestados (RNI).

- **Análise estatística**

A partir dos dados obtidos para todos os dez grupos estudados foram construídos gráficos do tipo *box-plot* para verificar a presença de *outliers*, quando existentes estes foram removidos. Em seguida, esses dados passaram por análises para verificar se a sua distribuição era normal.

Uma vez comprovada a normalidade dos dados, as médias foram comparadas, para cada variável estudada, pela análise de variância simples (ANOVA *One Way*), com o objetivo de verificar se houve ou não diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos analisados. O teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias duas a duas quando a ANOVA mostrou a existência de diferenças entre os grupos. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o programa R (versão 3.2.1).

Além disso, foram realizadas análises multivariadas de componente principal (*Principal Component Analysis*, PCA) a fim de verificar como o conjunto de variáveis estudadas caracteriza os grupos analisados. O programa utilizado para a análise multivariada foi o Fitopac.



## V. Resultados e Discussão

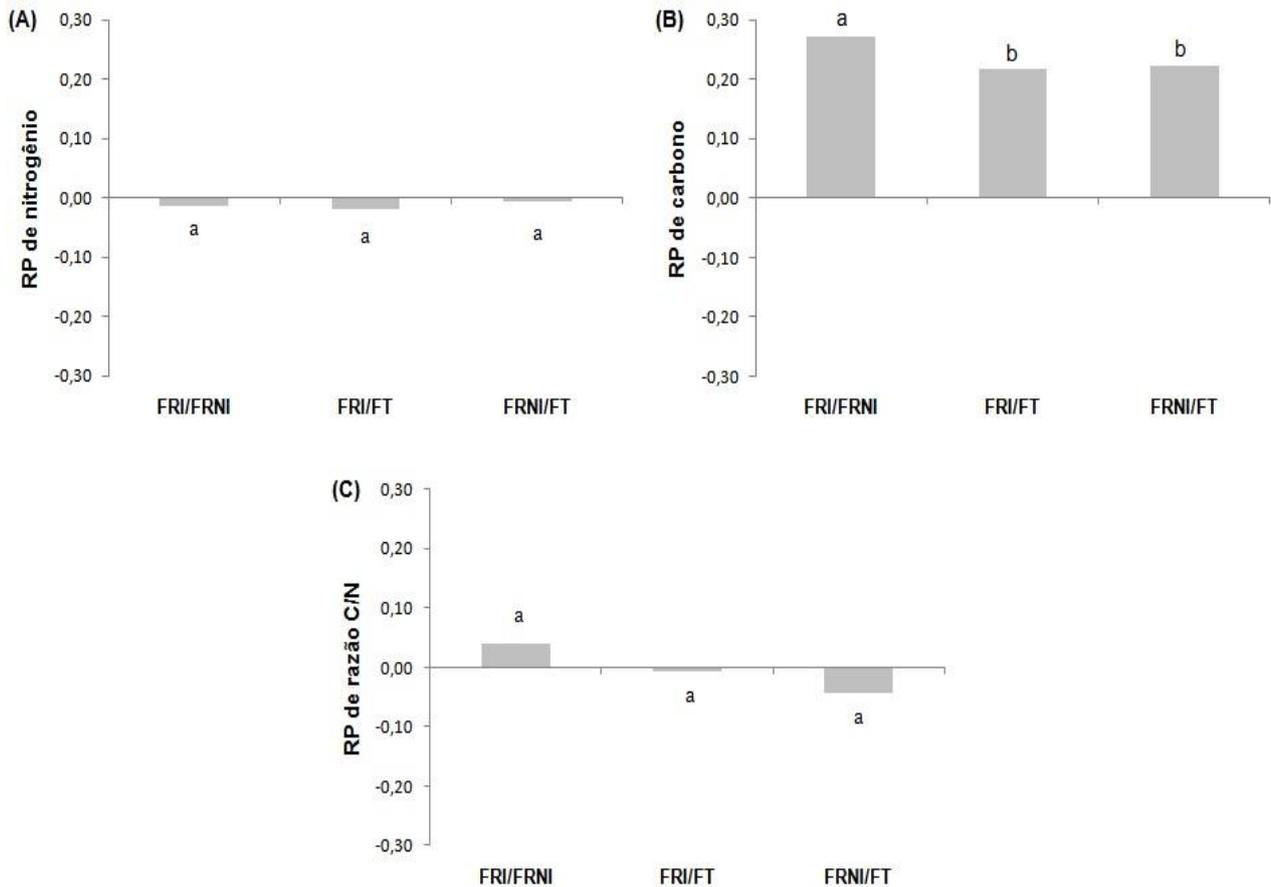
- **Metabólitos primários na interação de parasitismo entre *T. guianensis* e *P. crassifolium***

Nas folhas de *T. guianensis* não foi observada diferença significativa nos teores de carbono e nitrogênio e, conseqüentemente, a razão C/N entre os grupos estudados também não mostrou alterações significativas (Tabela 2). Entretanto, quando analisados os gráficos para resposta plástica para conteúdo de nitrogênio (Figura 7A), parece haver um efeito negativo do parasitismo para as folhas, tanto quando os grupos são comparados com folhas de ramos não infestados (FRNI), como quando comparados com folhas de plantas não parasitadas (FT). Esse resultado indica que há redução dos conteúdos de nitrogênio quando *T. guianensis* esta parasitada por *P. crassifolium*, podendo sugerir translocação desse nutriente no sentido hospedeira-parasita.

Resultados semelhantes foram descritos para *Juniperus osteosperma* parasitada por *Phoradendron juniperinum* em que o conteúdo foliar de nitrogênio não diferiu significativamente entre ramos infestados e não infestados dos mesmos indivíduos de *J. osteosperma* parasitada. Contudo ao comparar o teor de nitrogênio foliar entre indivíduos de *J. osteosperma* parasitada e não parasitada, houve uma redução do teor de nitrogênio nos indivíduos parasitados (Ehleringer *et al.*,1986).

Tabela 2 – Conteúdo de metabólitos primários (%) e razão C/N (média  $\pm$  desvio padrão) em folhas de *T. guianensis* não parasitada (FT, n=6), folhas de ramos não infestados (FRNI, n=9) e folhas de ramos infestados (FRI, n=9) de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* coletadas no município de Campanha, MG. Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Parâmetros	Grupos		
	FT	FRNI	FRI
<b>Nitrogênio</b>	1,29 $\pm$ 0,37 a	1,28 $\pm$ 0,05 a	1,26 $\pm$ 0,22 a
<b>Carbono</b>	46,45 $\pm$ 1,14 a	46,99 $\pm$ 0,74 a	46,75 $\pm$ 0,38 a
<b>Razão C/N</b>	38,40 $\pm$ 10,07 a	36,74 $\pm$ 1,31 a	38,19 $\pm$ 6,33 a
<b>Carboidratos solúveis</b>	24,07 $\pm$ 2,81 b	32,16 $\pm$ 3,81 a	27,52 $\pm$ 2,09 ab
<b>Amido</b>	0,06 $\pm$ 0,04 a	0,10 $\pm$ 0,09 a	0,15 $\pm$ 0,09 a
<b>Lipídeos</b>	5,25 $\pm$ 2,22 a	4,78 $\pm$ 1,37 a	5,21 $\pm$ 1,73 a



**Figura 7:** Resposta plástica (RP) para os parâmetros nitrogênio (A), carbono (B) e razão C/N (C) em folhas de ramos infestados e não infestados de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*. FRI/FRNI: folhas de ramos infestados em relação às folhas de ramos não infestados; FRI/FT: folhas de ramos infestados em relação às folhas de *T. guianensis* não parasitada; e FRNI/FT: folhas de ramos não infestados em relação às folhas de *T. guianensis* não parasitada. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Em estudos realizados por Sangüesa-Barreda *et al.* (2012) também não foi encontrada diferença significativa no conteúdo de nitrogênio e na razão C/N em acículas de indivíduos de *Pinus sylvestris* parasitada e não parasitada por *Viscum album*, uma espécie de visco. Hosseini *et al.* (2008) não observaram alteração significativa na quantidade desse macronutriente em folhas de ramos infestados e não infestados de indivíduos de *Carpinus betulus* parasitada por *V. album* quando comparados entre si e quando comparados com folhas de *C. betulus* saudável (indivíduos totalmente não parasitados). Folhas de ramos de *Acacia raddiana* parasitada e não parasitada pelo visco *Plicosepalus acaciae* também não diferiram quanto ao teor de nitrogênio (Bowie & Ward, 2004). Entretanto, foi verificada diferença significativa entre folhas de indivíduos saudáveis e folhas de ramos infestados de *Parrotia persica* parasitada por *V. album*, sendo que folhas de *P. persica* saudável apresentaram maior teor nitrogênio (Hosseini *et*

*al.*, 2008). Dessa forma, parece haver uma variação na resposta apresentada pela hospedeira quando parasitada no que diz respeito ao conteúdo de nitrogênio foliar.

No presente estudo verificou-se que as regiões proximal (RPRI) e distal (RDRI) dos ramos infestados apresentaram significativamente menores teores de nitrogênio que os ramos de indivíduos de *T. guianensis* não parasitada (RT) e também menores teores quando comparadas aos ramos não infestados da hospedeira (RNI), como pode ser observado na tabela 3.

A galha (RGRI), por sua vez, diferiu significativamente das demais regiões de ramos infestados por apresentar maior conteúdo de nitrogênio. Essa diferença pode ser devido à maior quantidade desse nutriente nos ramos de *P. crassifolium* (RP) (Tabela 4).

Como pode ser observado nas tabelas 3 e 4, ramos da parasita (RP) apresentaram teor mais elevado de nitrogênio do que os grupos de ramos de *T. guianensis* avaliados neste trabalho, sendo que o conteúdo de nitrogênio em RP chegou a ser o dobro do observado para RT e RNI e até cinco vezes superior aos obtidos para RPRI e RDRI.

Contudo, apesar da RGRI ter apresentado maior conteúdo de nitrogênio do que as regiões proximal e distal, os três grupos de ramos infestados foram negativamente afetados pela presença da parasita quando consideramos os resultados de resposta plástica (Figura 8A e 8B).

Ao analisar as figuras 8A e 8B é possível observar que o teor de nitrogênio em ramos infestados foi negativamente afetado pela parasita tanto em relação aos ramos não infestados (RNI) como quando comparados aos ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT), e em ambas as comparações as regiões proximal e distal foram negativamente mais afetadas pela presença de *P. crassifolium* do que a região da galha ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a hipótese de Schulze *et al.* (1984), conhecida como hipótese de parasitismo de nitrogênio, viscos geralmente apresentam maiores taxas de transpiração que suas respectivas hospedeiras como uma estratégia para obter, a partir do xilema da hospedeira, quantidades suficientes de nitrogênio para o seu crescimento. Esse macronutriente é considerado um dos principais nutrientes limitantes para o crescimento de viscos. Marshall *et al.* (1994) avaliaram a taxa de transpiração de diferentes pares de viscos e hospedeiras e verificaram que de fato a taxa de transpiração dos viscos geralmente é superior à de suas hospedeiras.

Tabela 3 – Conteúdo de metabólitos primários (%) e razão C/N (média ± desvio padrão) em ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT, n=6), em ramos não infestados (RNI, n=6) e em ramos infestados (RPRI, RGRI e RDRI, n=9) de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* coletados no município de Campanha, MG. RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; RDRI, região distal do ramo infestado. Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05).

Parâmetros	Grupos				
	RT	RNI	RPRI	RGRI	RDRI
<b>Nitrogênio</b>	0,51 ± 0,17 a	0,58 ± 0,10 a	0,19 ± 0,07 b	0,49 ± 0,09 a	0,27 ± 0,14 b
<b>Carbono</b>	45,31 ± 0,67 a	45,77 ± 0,91 a	46,22 ± 0,75 a	45,83 ± 0,06 a	46,34 ± 0,46 a
<b>Razão C/N</b>	95,17 ± 27,55 b	81,85 ± 15,65 b	269,89 ± 92,76 a	89,23 ± 10,53 b	174,31 ± 67,35 ab
<b>Carboidratos solúveis</b>	19,47 ± 2,43 a	18,96 ± 3,97 a	13,58 ± 1,84 b	13,61 ± 2,69 b	17,87 ± 2,56 a
<b>Amido</b>	2,58 ± 2,24 ab	2,20 ± 3,02 ab	0,18 ± 0,04 b	3,01 ± 1,10 a	0,47 ± 0,42 ab
<b>Lipídeos</b>	1,15 ± 0,32 ab	1,22 ± 0,27 a	0,51 ± 0,13 c	0,86 ± 0,26 b	0,51 ± 0,18 c

Tabela 4 – Conteúdo de metabólitos primários (%) e razão C/N (média  $\pm$  desvio padrão) em folhas (FP) e ramos (RP) de *P. crassifolium* coletados no município de Campanha, MG (n=9).

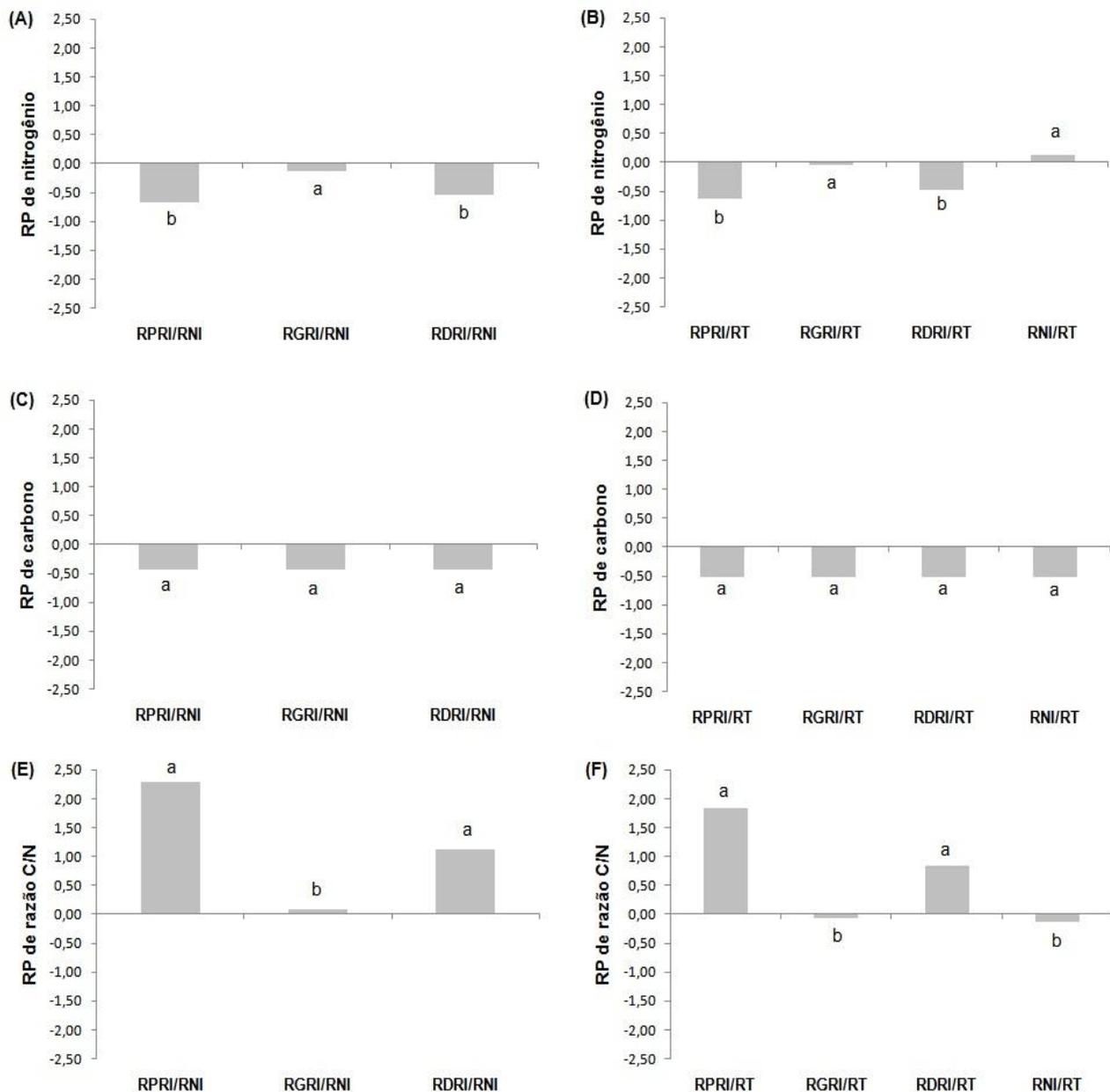
Parâmetros	Grupos	
	FP	RP
<b>Nitrogênio</b>	1,25 $\pm$ 0,20	1,03 $\pm$ 0,16
<b>Carbono</b>	45,63 $\pm$ 1,52	46,79 $\pm$ 0,65
<b>Razão C/N</b>	37,34 $\pm$ 6,37	46,60 $\pm$ 7,47
<b>Carboidratos solúveis</b>	14,22 $\pm$ 2,52	15,54 $\pm$ 4,31
<b>Amido</b>	0,21 $\pm$ 0,14	1,19 $\pm$ 0,58
<b>Lipídeos</b>	5,65 $\pm$ 1,41	3,13 $\pm$ 0,71

No presente trabalho não foram mensuradas as taxas de transpiração de *P. crassifolium* e de *T. guianensis*, mediu-se apenas o teor de nitrogênio. Visto que foi verificado que em outra espécie pertencente ao gênero *Phoradendron* a taxa de transpiração é superior à de sua respectiva hospedeira (Hollinger, 1983) e partindo do pressuposto que a elevada taxa de transpiração observada em viscos é, dentre outros motivos, um mecanismo utilizado por essas plantas parasitas como estratégia para obter nutrientes de suas hospedeiras, pode-se sugerir que o menor conteúdo de nitrogênio presente em ramos infestados de *T. guianensis*, especialmente nas regiões adjacentes à galha, possivelmente se deva a captação de nitrogênio por *P. crassifolium*, a qual pode funcionar como dreno para esse nutriente. Alguns estudos já demonstraram que para algumas espécies há um fluxo de compostos nitrogenados, orgânicos ou inorgânicos, da planta hospedeira para a planta parasita a partir do xilema (Escher *et al.*, 2004b; Escher & Rennenberg, 2006).

Comparando o conteúdo de nitrogênio foliar entre *T. guianensis* e *P. crassifolium* (Figura 9A), não foi encontrada diferença significativa entre esses grupos. Entretanto, ramos da parasita (RP) diferem significativamente dos diferentes grupos de ramos da hospedeira (Figura 9B), contendo maiores quantidades de nitrogênio, como mencionado anteriormente.

Em um estudo realizado por Panvini & Eickmeier (1993) com *Phoradendron leucarpum* em diferentes hospedeiras, verificou-se que esse visco apresentou maiores teores de nitrogênio foliar em todos os pares de visco/hospedeira analisados. Türe *et al.* (2010) também observaram que *V. album* continha maiores quantidades de nitrogênio foliar que suas hospedeiras. Entretanto em outras relações envolvendo outras espécies de visco/planta hospedeira foi a hospedeira quem apresentou as maiores quantidades

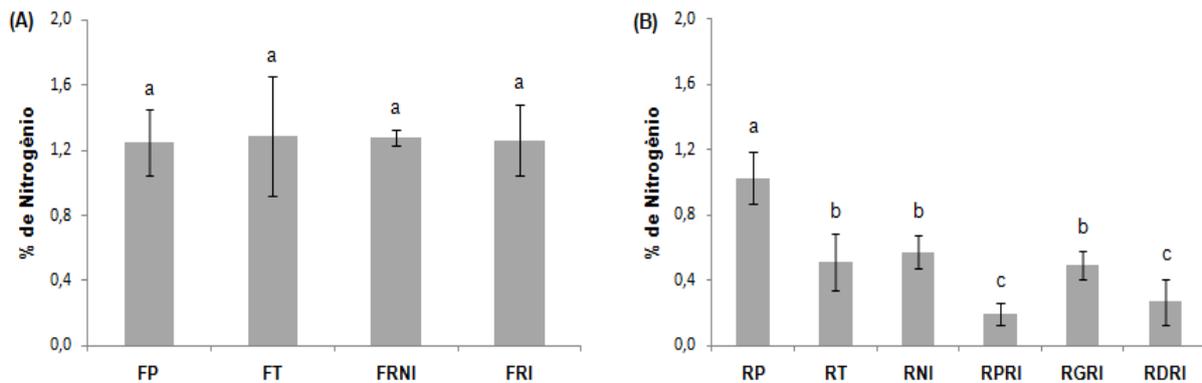
desse macronutriente nas folhas (Bowie & Ward, 2004; Wang *et al.*, 2008). Assim como para a taxa de transpiração, os viscos geralmente também apresentam maiores teores de nutrientes que as suas hospedeiras.



**Figura 8:** Resposta plástica (RP) para os parâmetros nitrogênio (A, B), carbono (C, D) e razão C/N (E, F) em ramos infestados e não infestados de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*. A, C e E: valores analisados em relação a ramos não infestados de *T. guianensis* parasitada (RNI); B, D e F: valores analisados em relação a ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT). Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Wang *et al.* (2008) avaliaram os teores de nitrogênio das folhas de *Tapinanthus oleifolius* (espécie parasita) em diferentes hospedeiras e verificaram casos em que, a

exemplo de *P. crassifolium* e *T. guianensis*, não houve diferença significativa entre parasita e hospedeira.



**Figura 9:** Conteúdo de nitrogênio em folhas (A) e em ramos (B) de *P. crassifolium* e de *T. guianensis*. FP, folhas de *P. crassifolium*; FT, folhas de *T. guianensis* não parasitada; FRNI, folhas de ramos não infestados de *T. guianensis*; FRI, folhas de ramos infestados de *T. guianensis*; RP, ramo de *P. crassifolium*; RT, ramo de *T. guianensis* não parasitada; RNI, ramo não infestado de *T. guianensis*; RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; e RDRI, região distal do ramo infestado. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A razão nitrogênio foliar visco/hospedeira neste trabalho (*P. crassifolium* vs. *T. guianensis*) foi de 0,99 e este valor indica que não houve acúmulo de nitrogênio neste órgão, pois não houve diferença significativa entre as duas plantas. Segundo Panvini & Eickmeier (1993), essa razão pode ser muito variável, diferindo entre espécies de visco e mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Por exemplo, a razão nutriente visco/hospedeira na relação *Plicosepalus acaciae* parasitando *Acacia raddiana* observada por Bowie & Ward (2004) foi de 0,65, enquanto Panvini & Eickmeier (1993) encontraram para *Phoradendron leucarpum* em diferentes hospedeiras uma razão média de 1,70. Esses valores indicam que no primeiro caso a parasita não acumulou nitrogênio, enquanto que no segundo ocorreu acúmulo.

A interação parasítica parece afetar mais claramente os ramos, local onde a parasita se instala, que as folhas. Quando analisamos as razões de conteúdo de nitrogênio *P. crassifolium*/*T. guianensis* para as diferentes regiões dos ramos infestados a razão chega a 5,42 (RP/RPRI), indicando que, ao contrário do verificado para folhas, pode ter havido acúmulo de nitrogênio nos ramos da parasita e houve redução desse nutriente na região adjacente à galha.

Com relação ao teor de carbono em ramos, não houve diferença significativa entre os grupos de ramos de *T. guianensis* (Tabela 3). Por outro lado, diferença significativa foi observada para a razão C/N entre RPRI e os demais grupos de ramos, exceto para RDRI,

provavelmente devido ao menor conteúdo de nitrogênio encontrado na região proximal de ramos infestados. O menor teor de nitrogênio verificado em ramos infestados em relação a RNI culminou em um efeito positivo de resposta plástica para o parâmetro razão C/N, proporcionado pela presença da parasita nos ramos infestados (Figura 8E).

No que diz respeito à resposta plástica para o parâmetro teor de carbono em ramos de *T. guianensis* foi observado um efeito negativo em decorrência da presença da parasita. Esse efeito negativo foi observado para as três regiões de ramos infestados e também para RNI (Figuras 8C e 8D).

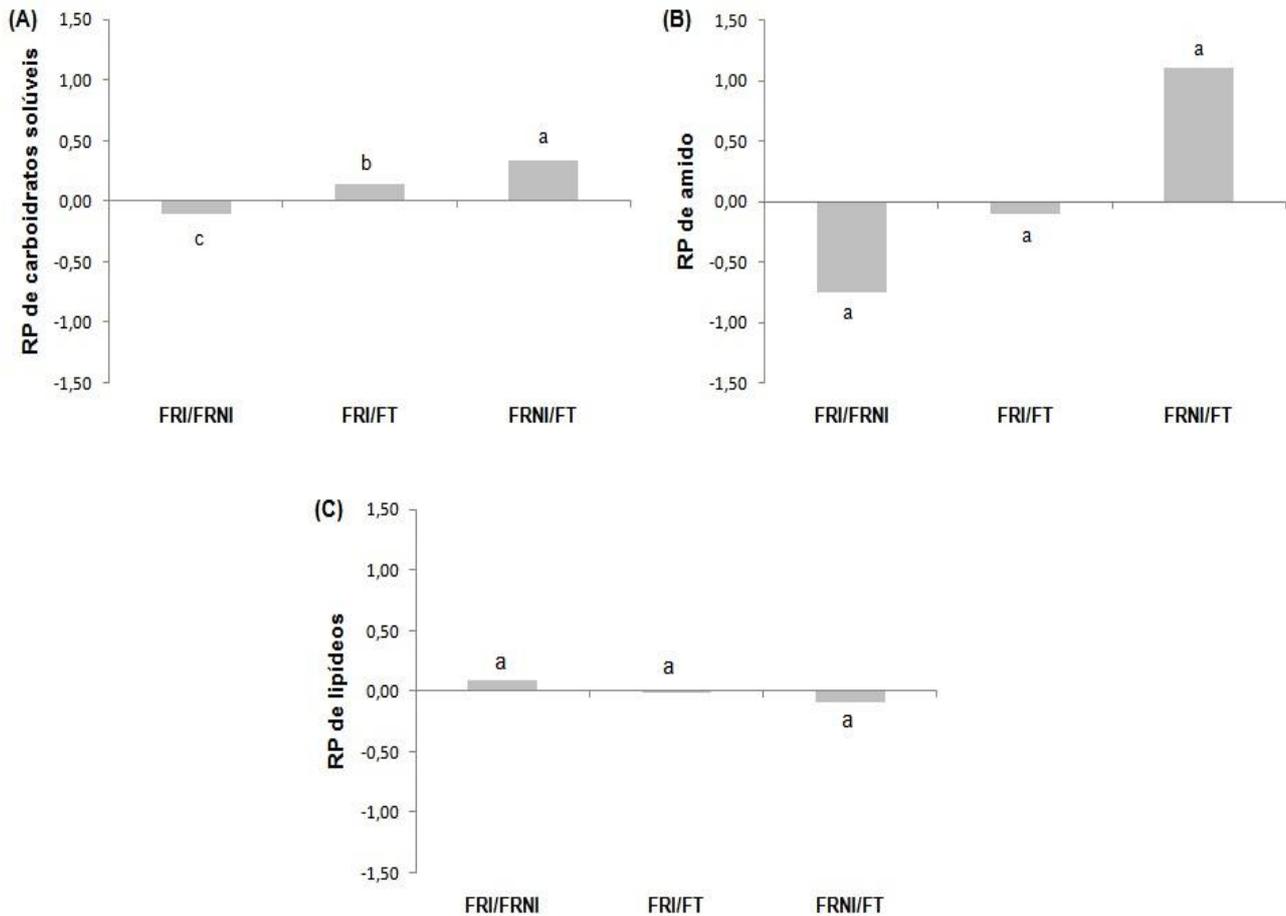
Quanto aos carboidratos solúveis, folhas pertencentes a ramos não infestados (FRNI) apresentaram quantidade significativamente superior dessas substâncias quando comparadas as folhas de indivíduos não parasitados (FT). Na relação de parasitismo envolvendo *Pinus sylvestris* e a hemiparasita *V. album* foi verificada uma redução significativa no conteúdo de carboidratos solúveis em acículas de indivíduos parasitados (Sangüesa-Barreda *et al.*, 2012). Em *T. guianensis*, entretanto, tal redução foi observada apenas ao comparar folhas de ramos infestados (FRI 27,52%) com folhas de ramos não infestados (FRNI 32,16%), sendo que o primeiro grupo foi o que parece apresentar menor teor de carboidratos solúveis, contudo essa redução não foi significativa (Tabela 2).

De acordo com os dados de resposta plástica para a variável carboidratos solúveis em folhas, a planta parasita parece ter exercido um efeito positivo na produção dessas substâncias nas folhas da hospedeira quando comparadas às folhas de *T. guianensis* não parasitada (FT), sendo que esse efeito positivo foi significativamente maior em FRNI que em FRI (Figura 10A). Por outro lado, os resultados de resposta plástica para ramos indicam que *P. crassifolium* exerceu um efeito negativo no teor de carboidratos solúveis em todos os grupos avaliados, principalmente na região proximal do ramo (RPRI) e na região da galha (RGRI), sugerindo que a parasita retira carboidratos solúveis de sua hospedeira (Figura 11A e 11B).

Como pode ser observado na tabela 3, todos os grupos de ramos obtidos a partir de indivíduos de *T. guianensis* parasitada tiveram uma redução no teor de carboidratos solúveis quando comparados aos ramos de *T. guianensis* saudável (RT), isto é, não parasitada, entretanto, essa redução foi significativa apenas para RPRI e RGRI.

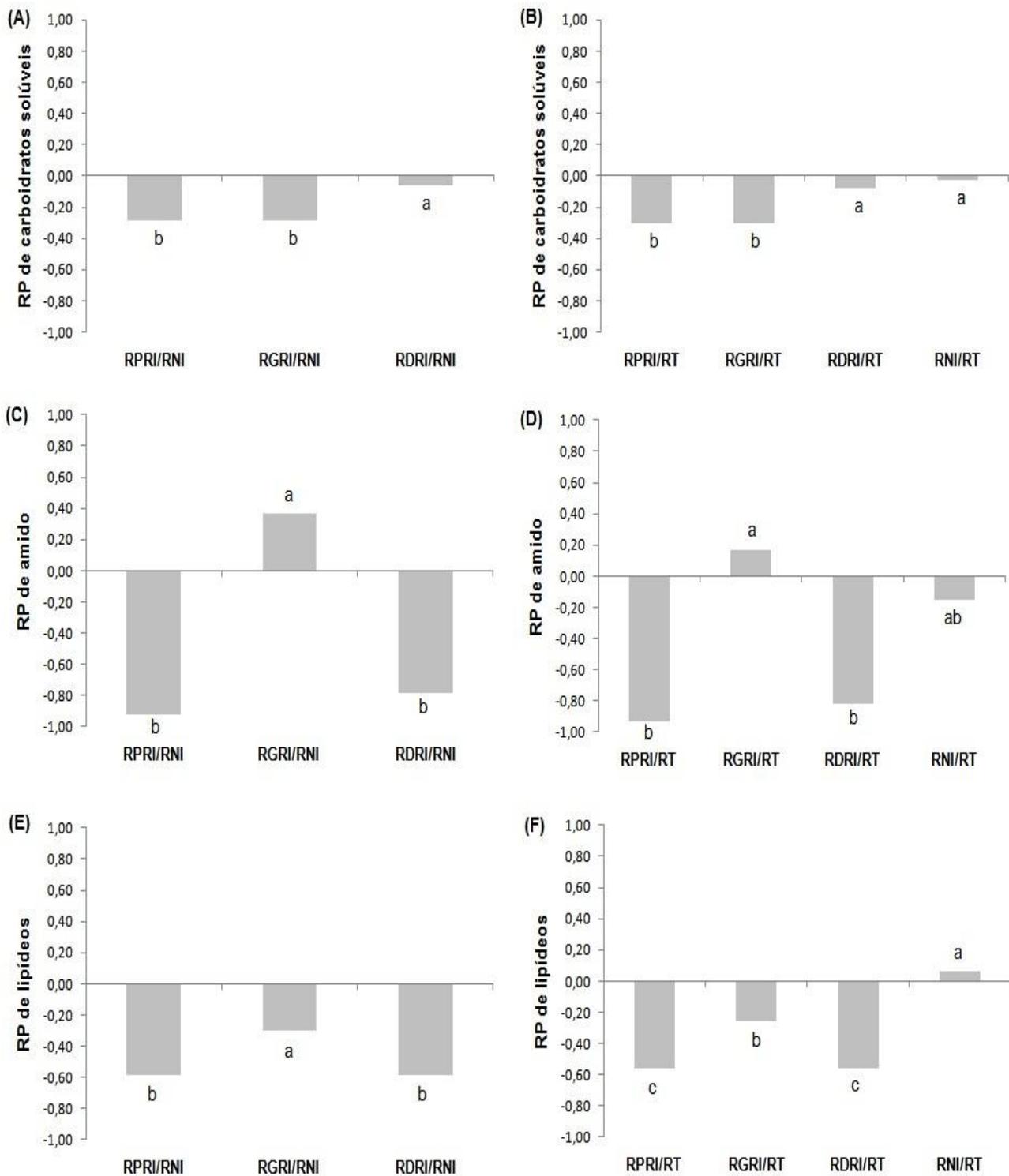
Os viscos compreendem um grupo de plantas parasitas aéreas pertencentes a Santalales (Mathiasen *et al.*, 2008; Nickrent, 2011) que dependem de suas hospedeiras para a obtenção de água e nutrientes. Eles podem ser divididos em dois grupos de acordo com o grau de dependência de carbono heterotrófico: viscos holoparasitas e viscos

hemiparasitas ou viscos que obtêm substâncias provenientes do xilema (Popp & Richter, 1998).



**Figura 10:** Resposta plástica (RP) para os parâmetros carboidratos solúveis (A), amido (B) e lipídeos (C) em folhas de ramos infestados e não infestados de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*. FRI/FRNI: folhas de ramos infestados em relação às folhas de ramos não infestados; FRI/FT: folhas de ramos infestados em relação às folhas de *T. guianensis* não parasitada; e FRNI/FT: folhas de ramos não infestados em relação às folhas de *T. guianensis* não parasitada. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

*Phoradendron* é um gênero de visco que obtém substâncias provenientes do xilema de suas hospedeiras e pensava-se que as espécies pertencentes a esse gênero eram apenas “parasitas de água”, ou seja, não obtêm carbono de suas hospedeiras, pois são autotróficas (Hull & Leonard, 1964). Marshall & Ehleringer (1990) em um estudo realizado com *Phoradendron juniperinum* parasitando *Juniperus osteosperma* estimaram que cerca de 62% do carbono dessa parasita é obtido de sua hospedeira, ou seja, embora *P. juniperinum* seja capaz de obter carbono autotrófico, parte significativa desse elemento é obtida de forma heterotrófica.



**Figura 11:** Resposta plástica (RP) para os parâmetros carboidratos solúveis (A, B), amido (C, D) e lipídeos (E, F) em ramos infestados e não infestados de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*. A, C e E: valores analisados em relação a ramos não infestados de *T. guianensis* (RNI); B, D e F: valores analisados em relação a ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT). Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Segundo Escher & Rennenberg (2006), viscos também são capazes de remover aminoácidos presentes no xilema da hospedeira e usar o esqueleto carbônico destas moléculas orgânicas como fonte de carbono. Além de aminoácidos, essas parasitas também podem obter carbono heterotrófico a partir de carboidratos presentes no xilema (Escher *et al.*, 2004a). Um estudo realizado com *Tapinanthus oleifolius*, um visco parasita de xilema, utilizando análise de ciclitóis presentes no xilema da hospedeira e da parasita, forneceu evidências de que a região do haustório contém carbono proveniente da própria parasita, mas também da hospedeira (Richter *et al.*, 1995).

Não foi objetivo deste estudo verificar se há translocação de fotossintatos da planta hospedeira para a parasita, portanto, as análises realizadas não nos permitem afirmar ou não se são translocados fotossintatos dos tecidos da hospedeira para os tecidos de *P. crassifolium*, o que poderia ser verificado utilizando metodologias que empregam carbono marcado. Entretanto, mediante ao que foi exposto acima e de acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a redução no conteúdo de carboidratos solúveis e de nitrogênio em ramos infestados de *T. guianensis* poderia indicar a captação dos mesmos pela parasita, que atuaria como um dreno não somente de nitrogênio, mas também de carboidratos solúveis. Considera-se como um órgão dreno aquele que não realiza fotossíntese ou que não produz quantidades suficientes de fotossintatos para satisfazer suas necessidades, ao passo que, órgão fonte é aquele que produz fotossintatos em níveis acima de suas necessidades e então podem exportar esse excesso a outros órgãos (Taiz & Zeiger, 2008).

A região distal do ramo infestado (RDRI), apesar de ter apresentado menor conteúdo de carboidratos solúveis quando comparada ao ramo não parasitado (RT), diferença não significativa, diferiu significativamente das regiões proximal e galha apresentando maior teor de carboidratos solúveis.

Estudos anatômicos realizados com *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* comparando as regiões proximal e distal de ramos infestados com ramos não infestados revelaram que há alterações anatômicas em ramos infestados e que na região distal de ramos infestados elas são mais evidentes. Dentre as modificações podem ser citadas que a região distal apresenta maior densidade de vasos, redução no diâmetro do lúmen dos vasos, maior quantidade de vasos embolisados e fibras com paredes mais finas. Os autores sugerem que tais alterações anatômicas poderiam ser provocadas, dentre outros motivos, por um déficit local de açúcar provocado pela captação dessas substâncias pela planta parasita e devido às elevadas concentrações dos hormônios auxina e etileno em

virtude das injúrias e do rompimento do floema provocados durante a penetração da planta parasita (Teixeira-Costa & Ceccantini, 2015).

O fluxo do xilema ocorre da região proximal dos ramos para a região distal, enquanto que o fluxo do floema ocorre na direção oposta. Neste trabalho não foram quantificados separadamente o teor de carboidratos solúveis do floema e do xilema nas três regiões de ramos infestados, quantificou-se apenas o conteúdo total de carboidratos solúveis presente naquela região como um todo.

Espera-se encontrar um teor significativamente superior de carboidratos solúveis no xilema localizado na região proximal do ramo infestado (RPRI), enquanto que para o floema diferença significativa entre as três regiões analisadas de ramos infestados não seria observada, isso porque *P. crassifolium* é uma parasita apenas de xilema, sendo assim o teor de carboidratos presente no floema não seria afetado.

Embora se saiba que carboidratos podem ser encontrados no xilema, grande parte dessas substâncias está presente no floema, visto que folhas correspondem ao órgão fonte de carboidratos produzidos pelo processo de fotossíntese e estes são principalmente transportados para as demais partes da planta via floema. Dessa forma, uma vez que *P. crassifolium* obtém carboidratos presentes no xilema da hospedeira, a região distal (RDRI) deveria apresentar menor teor de carboidratos solúveis. Contudo, neste trabalho observou-se que houve uma redução de carboidratos solúveis no sentido região distal-proximal e tal fato seria condizente se estivéssemos analisando uma parasita de floema, como o que acontece para *Arceuthobium oxycedri* parasitando *Juniperus oxycedrus* (Rey *et al.*, 1991).

Por outro lado, como mencionado acima, o teor de carboidratos solúveis determinado neste trabalho se refere ao total presente em cada uma das três regiões de ramos infestados. Teixeira-Costa & Ceccantini (2015) evidenciaram um maior número de vasos condutores de xilema embolisados, não funcionais, na região distal dos ramos infestados de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*, dessa forma o fluxo de nutrientes no sentido região proximal-distal estaria comprometido.

Partindo da premissa que elementos de tubo crivado condutores de floema também poderiam ser afetados durante a penetração da planta parasita nos tecidos da planta hospedeira, visto que tais estruturas estão localizadas mais externamente que os vasos condutores do xilema, o fluxo de nutrientes no sentido região distal-proximal também estaria comprometido. Dessa forma, sugere-se que parte dos carboidratos solúveis produzidos pelo órgão fonte ficaria alocada na região distal devido à deficiência do fluxo de nutrientes nessa região.

Quanto ao teor de amido, as análises estatísticas do conteúdo de amido presente em FT, FRNI e FRI não revelaram diferença significativa (Tabela 2). Sangüesa-Barreda *et al.* (2012) verificaram que as acículas de *Pinus sylvestris* parasitada por *Vicum album* continham menores teores de amido que as de *P. sylvestris* não parasitada, contudo tal diferença não foi significativa. O teor de amido nas acículas de duas espécies de *Picea*, *P. rubens* e *P. glauca*, também não foi afetado pela presença da parasita *Arceuthobium pusillum*, um visco parasita de floema (Reblin *et al.*, 2006).

Os ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT 2,58%) e os ramos não infestados de indivíduos parasitados (RNI 2,20%) não apresentaram diferença significativa quanto ao teor de amido e esses dois grupos de ramos apresentaram maiores conteúdos desse carboidrato de reserva quando comparados aos dos teores das regiões proximal (RPRI 0,18%) e distal (RDRI 0,47%) de ramos infestados (Tabela 3).

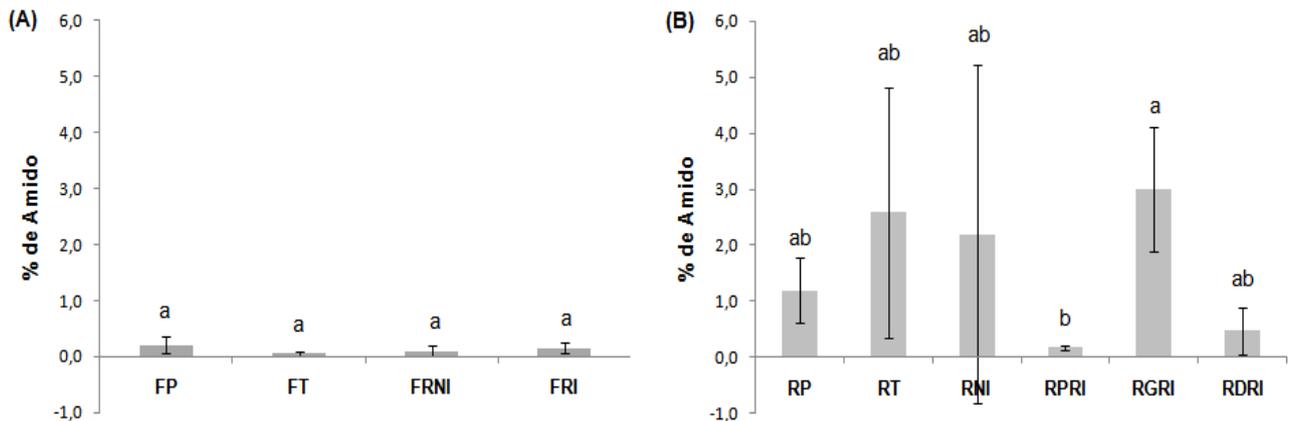
Sangüesa-Barreda *et al.* (2012) não encontraram diferença significativa no teor de amido presente nos ramos de *P. sylvestris* parasitada e não parasitada por *V. album*, embora uma pequena redução no conteúdo de amido em indivíduos parasitados tenha sido observada. Por outro lado, Broshot & Tinnin (1986) observaram um aumento na quantidade de amido em ramos de *Pinus contorta* parasitada por *Arceuthobium americanum*.

No presente trabalho, a redução de amido era esperada, uma vez que redução de carboidratos solúveis foi encontrada em ramos infestados. A região da galha foi a que apresentou o maior conteúdo de amido (RGRI 3,01%) quando comparada às outras duas regiões de ramos infestados (RDRI 0,47% e RPRI 0,18%). Esses valores são, em média, de 6 a 16 vezes maiores do que os encontrados para RDRI e RPRI, respectivamente. Além disso, a galha também apresentou mais amido que RT (2,58%) e RNI (2,20%). Dessa forma, a galha foi o único grupo de ramos obtido a partir de indivíduos de *T. guianensis* parasitada que a planta parasita não exerceu um efeito negativo na resposta plástica para a produção de amido (Figura 11C e 11D), mas sim o inverso, exerceu um efeito positivo, ou seja, houve acúmulo de amido nessa região do ramo infestado.

RGRI corresponde ao local em que a parasita se estabelece na hospedeira, portanto apresenta tecido das duas plantas, hospedeira e parasita (Figura 6C). Conforme pode ser observado na tabela 4, a parasita apresentou 0,21% de amido em suas folhas (FP) e 1,19% em seus ramos (RP). As folhas de *P. crassifolium* não apresentaram conteúdo de amido significativamente maior que o observado em folhas de *T. guianensis* (Figura 12A). Em ramos, por sua vez, a parasita apresentou quantidade superior de amido em relação às regiões proximal e distal dos ramos infestados da hospedeira, mas o teor

de amido nos ramos de *P. crassifolium* representou apenas quase um terço do observado na região da galha (RGRI) (Figura 12B).

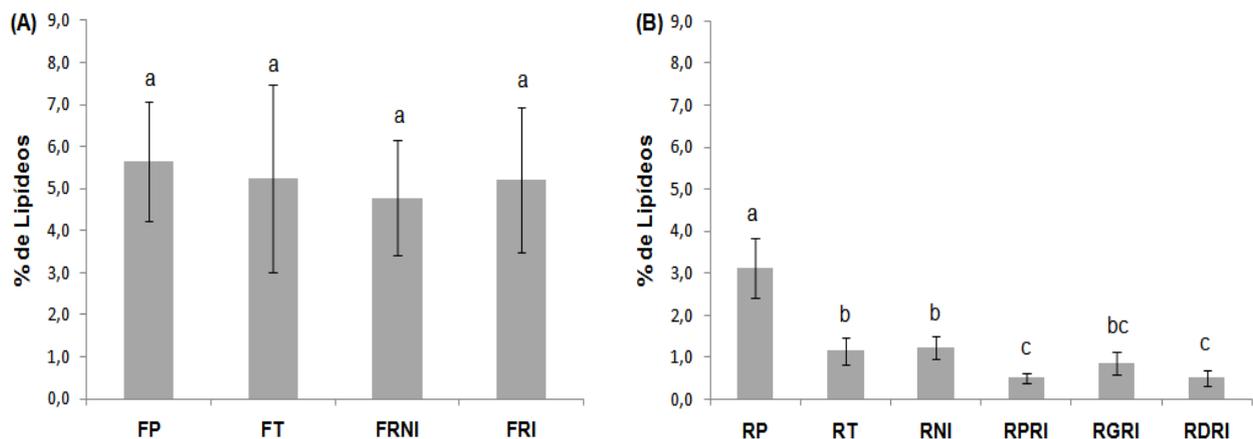
Dessa forma, o maior teor de amido presente na RGRI não poderia ser justificado pela presença do tecido dos ramos da parasita (RP) nessa região. Entretanto, os baixos valores de carboidratos solúveis observado para essa região podem indicar que há maior conteúdo de carbono na forma de carboidrato de reserva na galha, talvez uma estratégia utilizada pela parasita para alocação e realocação de carbono.



**Figura 12:** Conteúdo de amido em folhas (A) e ramos (B) de *P. crassifolium* e de *T. guianensis*. FP, folhas de *P. crassifolium*; FT, folhas de *T. guianensis* não parasitada; FRNI, folhas de ramos não infestados de *T. guianensis*; FRI, folhas de ramos infestados de *T. guianensis*; RP, ramo de *P. crassifolium*; RT, ramo de *T. guianensis* não parasitada; RNI, ramo não infestado de *T. guianensis*; RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; e RDRI, região distal do ramo infestado. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Por fim, no que diz respeito ao teor de lipídeos, os três grupos de folhas de *T. guianensis* (FT, FRNI e FRI) não exibiram diferença significativa no conteúdo dessa classe de metabólitos primários (Tabela 2). Para os ramos, o conteúdo de lipídeos não diferiu significativamente quando consideramos os ramos não infestados (RNI 1,22%) e os ramos de indivíduos não parasitados (RT 1,15%), mas ambos apresentaram conteúdo de lipídeos distinto do observado para as três regiões de ramos infestados (RPRI 0,51%, RGRI 0,86% e RDRI 0,51%), apresentando maiores teores de lipídeos (Tabela 3). Embora a região da galha (RGRI) tenha apresentado teor significativamente superior ao verificado para as regiões proximal (RPRI) e distal (RDRI), observou-se um efeito negativo proporcionado pela presença da planta parasita nestas três regiões quando se analisa a resposta plástica para o parâmetro conteúdo de lipídeos, porém a galha foi significativamente menos afetada (Figura 11E e 11F).

Ao comparar os teores de lipídeos em folhas e ramos de *P. crassifolium* com os de folhas e ramos de *T. guianensis*, pode-se observar que as folhas de ambas as espécies não diferem significativamente em relação a esse parâmetro (Figura 13A). Entretanto, ramos da parasita (RP) contêm significativamente maior conteúdo de lipídeos que os ramos da hospedeira (Figura 13B). Esses resultados podem, novamente, sugerir que haja uma translocação não somente de carboidratos como também de outras substâncias entre a parasita e a hospedeira.



**Figura 13:** Conteúdo de lipídeos em folhas (A) e ramos (B) de *P. crassifolium* e de *T. guianensis*. FP, folhas de *P. crassifolium*; FT, folhas de *T. guianensis* não parasitada; FRNI, folhas de ramos não infestados de *T. guianensis*; FRI, folhas de ramos infestados de *T. guianensis*; RP, ramo de *P. crassifolium*; RT, ramo de *T. guianensis* não parasitada; RNI, ramo não infestado de *T. guianensis*; RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; e RDRI, região distal do ramo infestado. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Além da análise do teor de lipídeos, também foi analisada a composição dos ácidos graxos presentes em folhas e ramos de *T. guianensis* e de *P. crassifolium*. Os resultados estão apresentados nas tabelas 5 a 7 (espectros de massas apresentados no Anexo 1). Os resultados indicam que o perfil de ácidos graxos presente na hospedeira foi afetado pela presença da parasita.

Em folhas de *T. guianensis* foram detectados nove ácidos graxos, sendo que os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) foram encontrados em todos os grupos de folhas (FT, FRNI e FRI). Diferença significativa entre os grupos foi observada apenas para o ácido palmítico, constituinte majoritário em todos os grupos, sendo que as folhas dos ramos infestados (FRI) apresentaram a menor porcentagem relativa deste ácido graxo (Tabela 5). Outro aspecto interessante que deve

ser ressaltado é que os ácidos graxos que correspondem aos constituintes **2, 5, 6, 8 e 9** na tabela 5 estavam ausentes em FT, porém presentes em FRI.

Quanto aos ramos da planta hospedeira, os mesmos nove ácidos graxos encontrados nas folhas foram detectados nos ramos, além do ácido linolênico que foi observado apenas em ramos. A porcentagem relativa de ácido palmítico na região proximal dos ramos infestados (RPRI) foi significativamente diferente da observada nas regiões da galha (RGRI) e distal (RDRI), sendo que o primeiro grupo apresentou menor teor desse ácido graxo. O ácido oleico e um constituinte não identificado (**2**, Tabela 6) também apresentaram diferença significativa entre os grupos de ramos. A região distal dos ramos infestados (RDRI) apresentou menor teor desses ácidos graxos.

Em estudos anteriores com folhas de *T. guianensis* foram detectados os mesmos ácidos graxos encontrados neste trabalho, os ácidos palmítico (hexadecanoico) e esteárico (octadecanoico), mas ambos esterificados com fitol (Correia *et al.*, 2008).

Para *P. crassifolium* foram detectados nove ácidos graxos (Tabela 7), sendo que os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico foram detectados tanto em folhas (FP) como em ramos (RP). O ácido palmítico e um constituinte não identificado (**2**, Tabela 7) foram os ácidos graxos majoritários em ramos e em folhas da espécie parasita, respectivamente.

Marshall & Ehleringer (1990) propuseram em seu trabalho a hipótese do balanço carbono:nitrogênio que prediz que a baixa eficiência fotossintética no uso da água nos viscós é um mecanismo que contribui para o aumento da assimilação de carbono e nitrogênio a partir de sua hospedeira. Carboidratos solúveis, lipídeos e amido sofreram redução em ramos infestados de *T. guianensis*, principalmente as regiões proximal e distal (RPRI e RDRI), exceto carboidratos solúveis que não sofreu redução na região distal. Dessa maneira, a presença de outras substâncias carbonadas poderia justificar os valores semelhantes de conteúdo de carbono que foi observado para as três regiões dos ramos analisadas. Os resultados obtidos neste estudo corroboram a hipótese do balanço carbono:nitrogênio, visto que, *P. crassifolium* parece obter nitrogênio e compostos carbonados de sua hospedeira, *T. guianensis*, que mostrou um claro efeito negativo no teor de nitrogênio e compostos carbonados (carboidratos solúveis, amido e lipídeos).

Tabela 5 – Porcentagem relativa de ácidos graxos (média  $\pm$  desvio padrão) detectados por CG-EM em folhas de ramos infestados (FRI, n=9) e não infestados (FRNI, n=9) de indivíduos de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* e folhas de indivíduos não parasitados (FT, n=6) coletadas no município de Campanha, MG. Tr, tempo de retenção (min.); e NI, constituinte não identificado. Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Constituintes	Tr	Grupos		
		FT	FRNI	FRI
1- Ácido palmítico	9,882	58,77 $\pm$ 14,69 ab	58,16 $\pm$ 13,05 a	34,44 $\pm$ 24,45 b
2 - NI	10,156	-	19,21 $\pm$ 8,64 a	33,23 $\pm$ 18,03 a
3- Ácido esteárico	11,539	26,02 $\pm$ 10,01 a	22,95 $\pm$ 9,87 a	14,84 $\pm$ 11,60 a
4- Ácido oleico	11,747	17,69 $\pm$ 6,44 a	18,91 $\pm$ 3,87 a	11,56 $\pm$ 2,77 a
5- NI	11,824	-	-	6,81 $\pm$ 2,59
6- NI	12,030	-	-	6,09 $\pm$ 1,96
7- Ácido linoleico	12,184	27,97 $\pm$ 4,01 a	13,84 $\pm$ 8,15 a	14,58 $\pm$ 2,70 a
8- NI	12,476	-	-	12,64 $\pm$ 3,47
9- NI	13,113	-	-	13,23 $\pm$ 5,23

Tabela 6 – Porcentagem relativa de ácidos graxos (média ± desvio padrão) detectados por CG-EM em ramos infestados (RPRI, RGRI e RDRI, n=9) e não infestados (RNI, n=9) de indivíduos de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* e ramos de indivíduos não parasitados (RT, n=6) coletados no município de Campanha, MG. RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; RDRI, região distal do ramo infestado; Tr, tempo de retenção (min.); e NI, constituinte não identificado. Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Constituintes	Tr	Grupos				
		RT	RNI	RPRI	RGRI	RDRI
1- Ácido palmítico	9,895	28,40 ± 20,91 ab	35,10 ± 8,16 ab	16,10 ± 11,16 b	38,38 ± 12,68 a	48,06 ± 6,83 a
2- NI	10,158	41,93 ± 6,66 ab	45,42 ± 3,31 a	37,78 ± 12,12 ab	29,16 ± 24,93 ab	13,04 ± 6,55 b
3- Ácido esteárico	11,551	10,46 ± 6,59 a	13,07 ± 8,29 a	13,27 ± 10,71 a	10,73 ± 5,43 a	21,26 ± 14,55 a
4- Ácido oleico	11,759	12,12 ± 5,09 ab	19,01 ± 4,75 ab	13,36 ± 6,14 ab	18,94 ± 1,55 a	10,66 ± 2,54 b
5- NI	11,830	7,80 ± 0,79 a	8,18 ± 1,47 a	6,61 ± 1,43 a	-	-
6- NI	12,033	7,41 ± 0,81 a	8,98 ± 2,29 a	9,08 ± 3,67 a	-	9,43 ± 6,51 a
7- Ácido linoleico	12,194	16,94 ± 11,12 a	19,49 ± 7,41 a	12,29 ± 6,16 a	19,51 ± 9,76 a	14,39 ± 6,99 a
8- NI	12,476	11,27 ± 0,53 a	13,87 ± 4,07 a	13,75 ± 3,47 a	-	-
9- Ácido linolênico	12,825	8,75 ± 0,40 a	6,26 ± 0,34 a	11,50 ± 2,21 a	8,04 ± 3,81 a	-
10- NI	13,112	13,92 ± 5,13 a	15,49 ± 4,80 a	11,30 ± 1,06 a	-	-

Tabela 7 – Porcentagem relativa de ácidos graxos (média  $\pm$  desvio padrão) detectados por CG-EM em folhas (FP) e ramos (RP) de *P. crassifolium* parasitando *T. guianensis* (n=9) coletados no município de Campanha, MG. Tr, tempo de retenção (min.); NI, constituinte não identificado.

Constituintes	Tr	Grupos	
		FP	RP
1- Ácido palmítico	9,886	30,34 $\pm$ 28,55	67,65 $\pm$ 8,01
2- NI	10,152	46,53 $\pm$ 5,21	-
3- Ácido esteárico	11,543	24,33 $\pm$ 3,46	19,28 $\pm$ 8,90
4- Ácido oleico	11,752	12,05 $\pm$ 6,01	12,88 $\pm$ 2,48
5- NI	11,823	8,16 $\pm$ 0,75	-
6- NI	12,026	7,78 $\pm$ 0,16	-
7- Ácido linoleico	12,175	13,97 $\pm$ 4,99	13,39 $\pm$ 1,97
8- NI	12,474	14,45 $\pm$ 1,24	-
9- NI	13,113	15,55 $\pm$ 0,87	-

- **Metabólitos secundários na interação de parasitismo entre *T. guianensis* e *P. crassifolium***

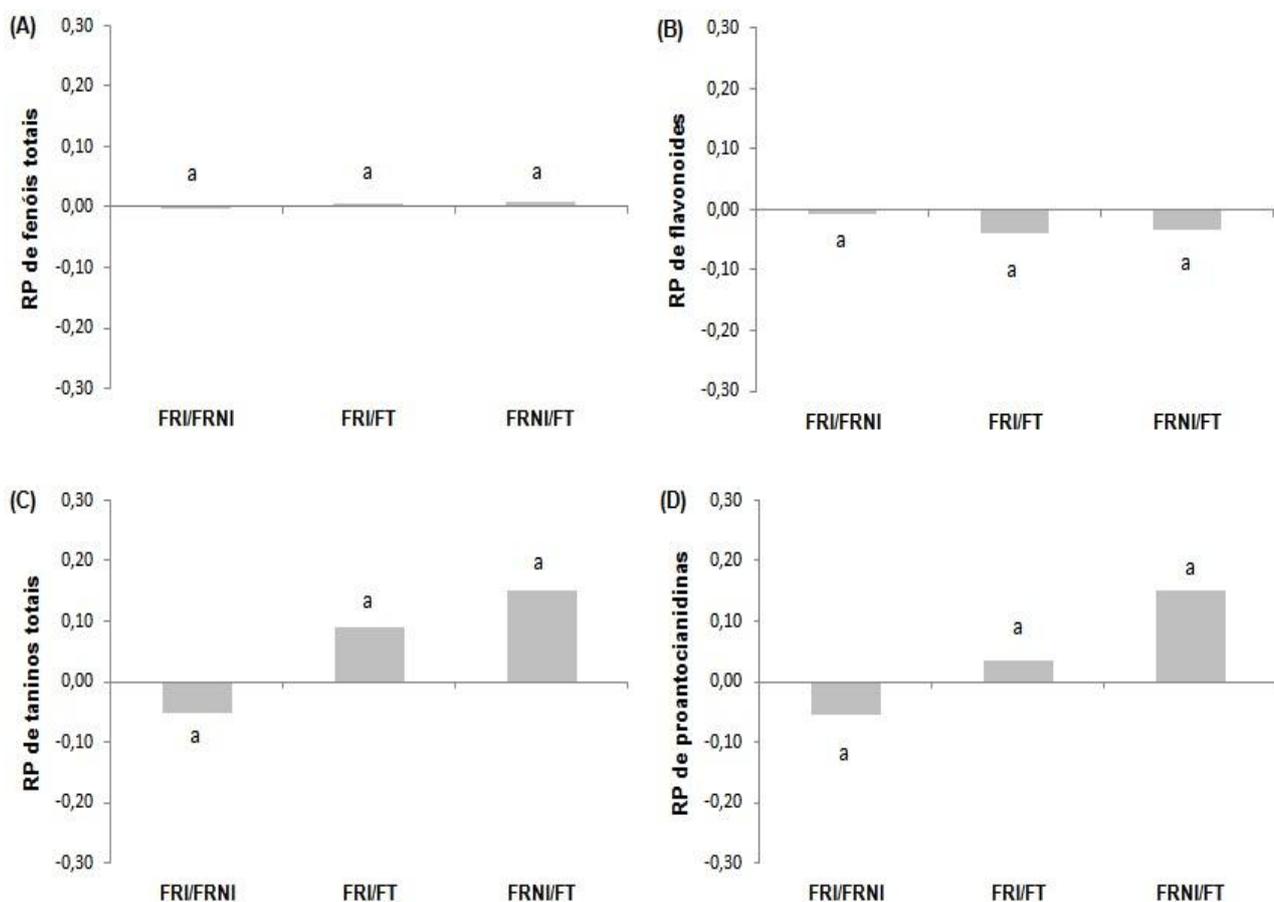
As dosagens de substâncias fenólicas totais, flavonoides e taninos totais nos três grupos de folhas de *T. guianensis* (FT, FRNI e FRI) não demonstraram alterações significativas entre os grupos. Em contrapartida, FRNI e FRI, provenientes de indivíduos parasitados, revelaram maiores teores de proantocianidinas que folhas de *T. guianensis* não parasitada (FT), sendo que FRNI diferiu significativamente de FT (Tabela 8).

Pradeep *et al.* (2014) verificaram resultados diferentes quando estudaram indivíduos de *Mangifera indica* parasitada pelo visco *Dendrophthoe falcata*. Os indivíduos parasitados apresentaram redução no conteúdo foliar de fenólicos totais e aumento no teor de flavonoides quando comparados aos indivíduos de *M. indica* não parasitada.

Tabela 8 – Porcentagem de substâncias fenólicas (média  $\pm$  desvio padrão) de folhas de *T. guianensis* não parasitada (FT, n=6), folhas de ramos não infestados (FRNI, n=9) e folhas de ramos infestados (FRI, n=9) de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* coletadas no município de Campanha, MG. Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Classes Analisadas	Grupos		
	FT	FRNI	FRI
<b>Fenóis totais</b>	16,88 $\pm$ 2,28 a	17,01 $\pm$ 3,49 a	16,99 $\pm$ 1,55 a
<b>Flavonoides</b>	3,60 $\pm$ 1,33 a	3,48 $\pm$ 0,66 a	3,46 $\pm$ 0,76 a
<b>Taninos totais</b>	14,26 $\pm$ 2,63 a	16,40 $\pm$ 3,88 a	15,53 $\pm$ 2,66 a
<b>Proantocianidinas</b>	23,21 $\pm$ 2,71 b	28,96 $\pm$ 3,10 a	26,04 $\pm$ 3,82 ab

Ao analisar os resultados de resposta plástica para folhas de ramos infestados em relação às folhas de ramos não infestados (FRI/FRNI), pode-se observar que a parasita parece não exercer efeito quanto aos teores de substâncias fenólicas totais e flavonoides (Figura 14A e 14B), mas parece exercer efeito desfavorável em relação aos taninos (Figura 14C e 14D). Por outro lado, ao confrontar folhas de indivíduos parasitados e não parasitados (FRI/FT e FRNI/FT) constata-se que a presença de *P. crassifolium* em *T. guianensis* acarretou em um efeito positivo na produção de taninos e um efeito negativo no teor de flavonoides, mas parece, novamente, não ter afetado o conteúdo de substâncias fenólicas totais (Figura 14).



**Figura 14:** Resposta plástica (RP) para os parâmetros substâncias fenólicas totais (A), flavonoides (B), taninos totais (C) e proantocianidinas (D) em folhas de ramos infestados e não infestados de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*. FRI/FRNI: folhas de ramos infestados em relação às folhas de ramos não infestados; FRI/FT: folhas de ramos infestados em relação às folhas de *T. guianensis* não parasitada; e FRNI/FT: folhas de ramos não infestados em relação às folhas de *T. guianensis* não parasitada. Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Com relação aos ramos, os resultados das quantificações das classes de fenólicos não revelaram diferenças significativas entre RT e RNI, embora RNI parece apresentar uma tendência a maior conteúdo de substâncias fenólicas (Tabela 9).

As três regiões de ramos infestados (RPRI, RGRI e RDRI) apresentaram teores de substâncias fenólicas totais significativamente inferiores aos encontrados para RT e RNI (Tabela 9). Li *et al.* (2015) verificaram que indivíduos jovens de *Bidens pilosa* parasitada por *Cuscuta australis* apresentaram menor quantidade de fenólicos totais que indivíduos saudáveis de mesma idade.

Com relação aos taninos totais e proantocianidinas, novamente as regiões proximal, galha e distal apresentaram alteração significativa ao compará-las aos grupos de ramos RT e RNI, apresentando menores conteúdos dessas substâncias.

Os resultados de doseamento de flavonoides para ramos infestados, por sua vez, mostraram um padrão levemente distinto das demais dosagens de substâncias fenólicas. As regiões proximal (RPRI) e distal (RDRI) diferem significativamente de ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT) e de ramos não infestados de *T. guianensis* parasitada (RNI) por conterem menores quantidades de flavonoides, entretanto, a região da galha (RGRI) apresentou teor significativamente maior dessa classe de substâncias fenólicas quando comparada às demais regiões de ramos infestados (Tabela 9).

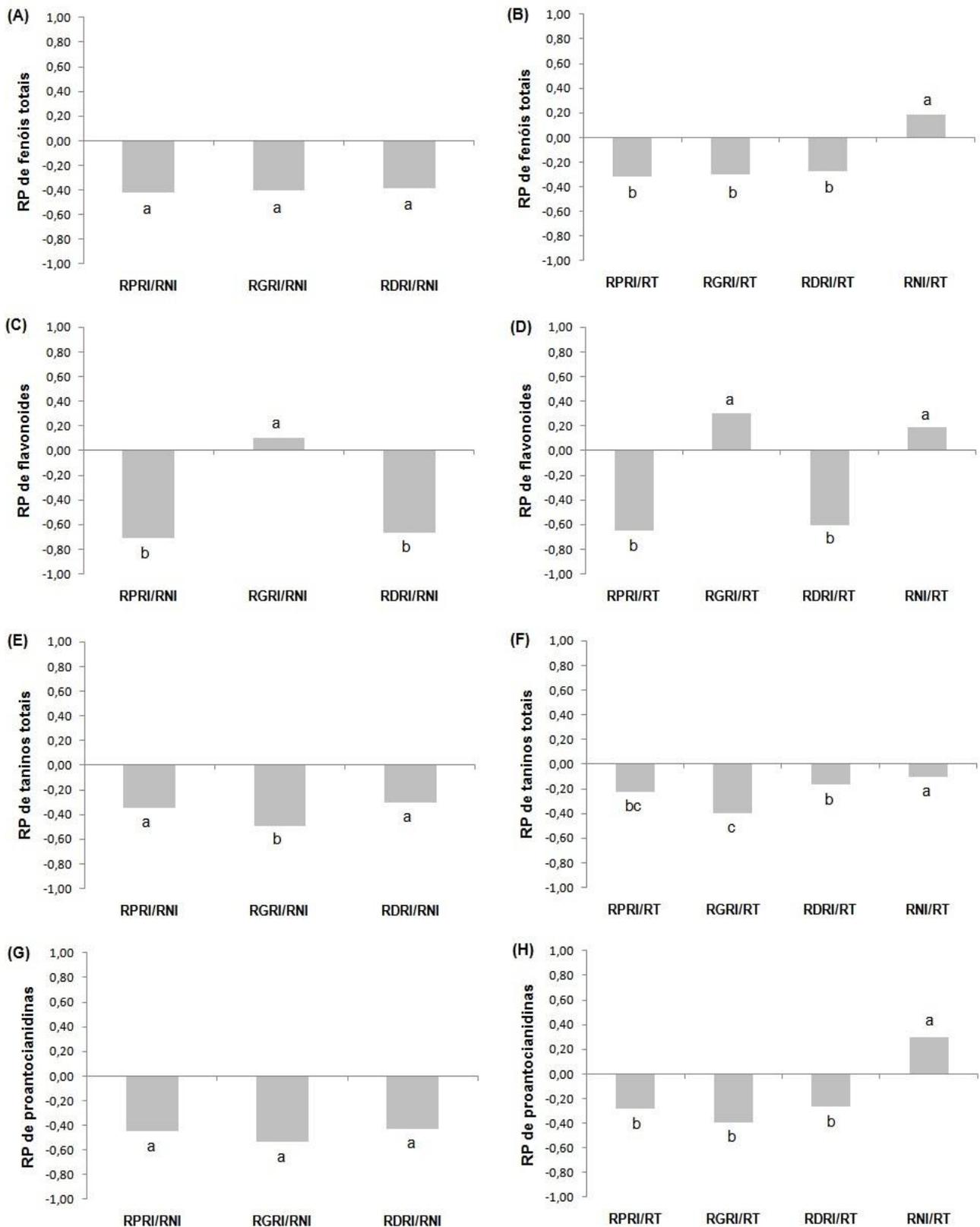
Ao analisar as diferentes regiões dos ramos infestados, a resposta plástica evidenciou um efeito negativo da parasita sobre a hospedeira para todas as classes de substâncias fenólicas analisadas. Comparando as três regiões dos ramos infestados com ramos não infestados de indivíduos parasitados (RNI), nota-se o efeito negativo para as variáveis substâncias fenólicas totais e taninos (totais e proantocianidinas), ou seja, redução dos conteúdos dessas substâncias com a presença da parasita (Figura 15A, 15E e 15G), sendo que para taninos totais *P. crassifolium* afetou especialmente a região da galha que diferiu significativamente das demais regiões de ramos infestados (Figura 15E).

Para a variável conteúdo de flavonoides, a região da galha apresentou um efeito positivo, apresentando maiores teores dessas substâncias quando a interação de parasitismo está estabelecida, diferença estatisticamente significativa e que difere essa região de ramos infestados das outras duas analisadas (Figura 15C).

Analisando a resposta plástica das três regiões dos ramos infestados em relação aos ramos de indivíduos de *T. guianensis* não parasitada (RT), observam-se resultados muito semelhantes aos verificados quando ramos não infestados de indivíduos parasitados (RNI) são utilizados como controle (Figura 15B, 15D, 15F e 15H).

Tabela 9 – Porcentagem de substâncias fenólicas (média  $\pm$  desvio padrão) em ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT, n=6), em ramos não infestados (RNI, n=9) e em ramos infestados (RPRI, RGRI e RDRI, n=9) de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* coletados no município de Campanha, MG. RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; RDRI, região distal do ramo infestado. Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Classes Analisadas	Grupos				
	RT	RNI	RPRI	RGRI	RDRI
<b>Fenóis totais</b>	6,71 $\pm$ 0,72 a	7,95 $\pm$ 1,41 a	4,59 $\pm$ 0,83 b	4,72 $\pm$ 1,11 b	4,90 $\pm$ 0,96 b
<b>Flavonoides</b>	0,27 $\pm$ 0,03 b	0,32 $\pm$ 0,08 ab	0,09 $\pm$ 0,01 c	0,35 $\pm$ 0,04 a	0,11 $\pm$ 0,02 c
<b>Taninos totais</b>	4,08 $\pm$ 0,40 ab	4,71 $\pm$ 0,53 a	3,16 $\pm$ 0,53 cd	2,46 $\pm$ 0,39 d	3,40 $\pm$ 0,67 bc
<b>Proantocianidinas</b>	20,56 $\pm$ 1,48 ab	26,07 $\pm$ 4,89 a	14,40 $\pm$ 1,77 bc	12,15 $\pm$ 3,85 c	14,84 $\pm$ 3,86 bc



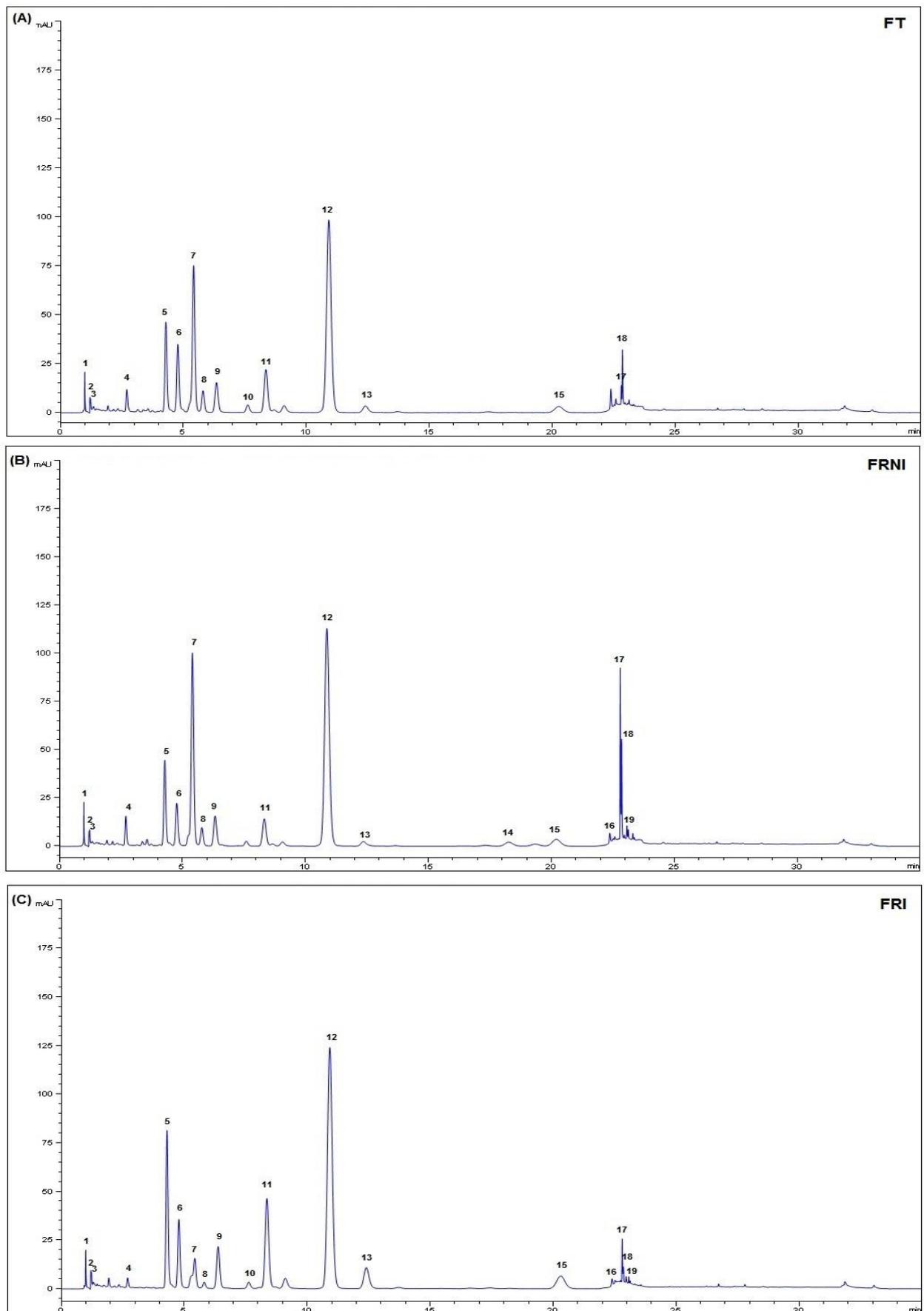
**Figura 15:** Resposta plástica (RP) para os parâmetros substâncias fenólicas totais (A, B), flavonoides (C, D), taninos totais (E, F) e proantocianidinas (G, H) em ramos infestados e não infestados de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*. A, C, E e G: valores analisados em relação a ramos não infestados de *T. guianensis* (RNI); B, D, F e H: valores analisados em relação a ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT). Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Interessantemente, ao analisar a resposta plástica para os ramos não infestados de indivíduos parasitados (RNI) com os ramos de indivíduos não parasitados (RT), a presença da parasita parece induzir a produção de substâncias fenólicas totais, flavonoides e proantocianidinas em ramos ainda não infestados (Figura 15B, 15D e 15H). Esses resultados mostram que quando olhamos o indivíduo parasitado isoladamente, o parasitismo exerce um efeito negativo sobre os conteúdos de substâncias fenólicas nas regiões onde a planta parasita está inserida (RPRI, RGRI e RDRI), mas quando analisamos ramos não infestados desse mesmo indivíduo e comparamos com ramos de indivíduos saudáveis, parece que a presença da parasita, mesmo que em outro ramo desse indivíduo, leva ao acúmulo de substâncias fenólicas nos ramos ainda não infestados. Isso pode sugerir uma resposta sistêmica adquirida, onde o aumento de substâncias fenólicas em ramos não infestados de *T. guianensis* parasitada pode ser um mecanismo de defesa com a finalidade de evitar ou mesmo diminuir novas infestações de um indivíduo já parasitado.

Além dos doseamentos de substâncias fenólicas, os extratos dos diferentes grupos foram analisados por CLAE-DAD a fim de se ter um maior detalhamento sobre quais constituintes fenólicos presentes nos extratos e detectados em 280 e 352 nm sofreriam influência positiva ou negativa da relação parasítica. Nessa análise foram quantificados os constituintes pertencentes às classes dos fenilpropanoides e dos flavonoides, neste último caso, especialmente flavonas e flavonóis. O intuito desta análise não foi uma descrição da composição fenólica das espécies em questão, mas apenas comparar os diferentes grupos de folhas e ramos analisados.

Os grupos de folhas analisados (FT, FRNI e FRI) assemelham-se qualitativamente, como pode ser observado na figura 16, na qual são apresentados os cromatogramas obtidos para cada grupo avaliado. Foram detectados nas folhas da planta hospedeira 19 constituintes, quando analisados os extratos a 352 nm de comprimento de detecção. Na tabela 10 estão listadas as porcentagens obtidas para cada constituinte, não sendo observada alteração significativa nessas porcentagens entre os grupos para nenhuma das substâncias detectadas.

Os grupos de folhas de *T. guianensis* não apresentaram diferença significativa nos teores de constituintes flavonoídicos, corroborando os resultados obtidos pelo doseamento em espectrofotômetro. O conteúdo de fenilpropanoides também não diferiu entre FT, FRNI e FRI (Tabela 10).



**Figura 16:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 352 nm. (A): folhas de *T. guianensis* não parasitada (FT); (B): folhas de ramos não infestados de *T. guianensis* parasitada (FRNI); e (C): folhas de ramos infestados de *T. guianensis* parasitada (FRI).

Tabela 10 – Porcentagem de constituintes fenólicos (média ± desvio padrão) detectados por CLAE-DAD (352 nm) em folhas de *T. guianensis* não parasitada por *P. crassifolium* (FT, n=6), folhas de ramos infestados (FRI, n=9) e não infestados (FRNI, n=9) de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* coletadas no município de Campanha, MG. Tr, tempo de retenção (min.). Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

	<b>Classe de fenólicos</b>	<b>Tr</b>	<b>UV-Visível (nm)</b>	<b>FT</b>	<b>FRNI</b>	<b>FRI</b>
1	Fenilpropanoide	0,977	280	0,02 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a
2	Fenilpropanoide	1,188	275	0,01 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a
3	Ácido gálico	1,213	278	0,02 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a
4	Flavonoide	2,686	263, 298 (om), 358	0,06 ± 0,06 a	0,03 ± 0,01 a	0,03 ± 0,01 a
5	Flavonoide	4,271	265, 292 (om), 352	0,29 ± 0,26 a	0,23 ± 0,12 a	0,24 ± 0,11 a
6	Flavonoide	4,763	265, 292 (om), 352	0,11 ± 0,10 a	0,13 ± 0,04 a	0,12 ± 0,05 a
7	Flavonoide	5,395	260, 298 (om), 350	0,29 ± 0,11 a	0,33 ± 0,28 a	0,31 ± 0,26 a
8	Derivado de quercetina	5,779	258, 268 (om), 292 (om), 352	0,23 ± 0,29 a	0,08 ± 0,06 a	0,06 ± 0,06 a
9	Derivado de quercetina	6,327	258, 268 (om), 302 (om), 352	0,11 ± 0,10 a	0,11 ± 0,05 a	0,11 ± 0,05 a
10	Derivado de quercetina	7,599	258, 268 (om), 292 (om), 352	0,04 ± 0,01 a	-	0,02 ± 0,00 a
11	Derivado de quercetina	8,328	258, 268 (om), 292 (om), 352	0,27 ± 0,13 a	0,20 ± 0,12 a	0,20 ± 0,12 a
12	Quercetrina	10,877	268, 302 (om), 348	0,92 ± 0,54 a	0,88 ± 0,28 a	0,93 ± 0,23 a
13	Derivado de campferol	12,367	262, 292 (om), 348	0,07 ± 0,04 a	0,07 ± 0,03 a	0,08 ± 0,03 a
14	Derivado de campferol	18,272	264, 292 (om), 348	-	0,15 ± 0,04 a	0,20 ± 0,01 a
15	Flavonoide	20,232	262, 288 (om), 322(om), 342	0,07 ± 0,02 a	0,07 ± 0,01 a	0,08 ± 0,02 a
16	Flavonoide	22,350	272, 258	-	0,02 ± 0,00 a	0,01 ± 0,01 a
17	Flavonoide	22,774	265, 290 (om), 349	0,03 ± 0,03 a	0,09 ± 0,07 a	0,14 ± 0,12 a
18	Flavonoide	22,824	265, 292 (om), 349	0,04 ± 0,04 a	0,05 ± 0,03 a	0,04 ± 0,02 a
19	Flavonoide	23,042	268, 292 (om), 342	-	0,01 ± 0,01 a	0,01 ± 0,01 a
	Flavonoides			2,30 ± 0,89 a	2,07 ± 0,43 a	2,22 ± 0,23 a
	Fenilpropanoides			0,05 ± 0,00 a	0,06 ± 0,01 a	0,05 ± 0,00 a
	Total			2,35 ± 0,89 a	2,22 ± 0,36 a	2,27 ± 0,23 a

Na figura 17 os espectros UV-visível das dezenove substâncias detectadas por CLAE-DAD em 352 nm podem ser observados. A maior parte delas apresenta duas bandas de absorção, a banda I em torno de 350 nm e a banda II entre 250 e 260 nm, o que as classifica como flavonoides.

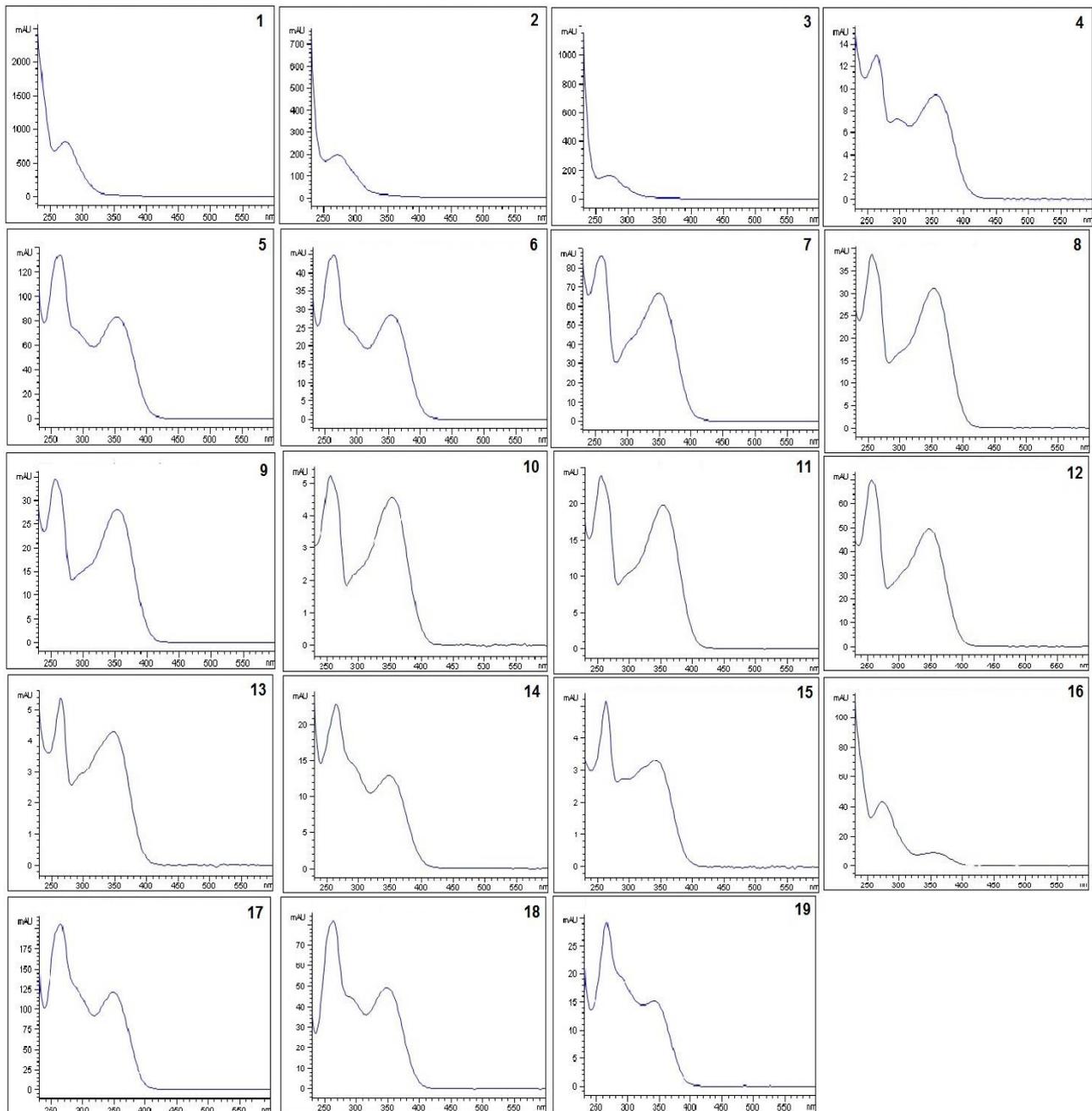
As substâncias **3** e **12** (Tabela 10) correspondem ao ácido gálico e a quercetrina, respectivamente. A quercetrina é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis e já foi descrita anteriormente como constituinte de folhas de *T. guianensis* (Correia *et al.*, 2008). Para os três grupos, o constituinte majoritário detectado em 352 nm foi a quercetrina (FT 0,92%, FRNI 0,88% e FRI 0,93%).

A análise dos espectros UV-visível (Figura 17) permite sugerir que as substâncias de **8** a **11** (Tabela 10) são derivadas de quercetina, enquanto que as substâncias **13** e **14** (Tabela 10) são derivadas de campferol, todas elas pertencentes à classe dos flavonóis.

Trabalhos que discutem como o metabolismo secundário de plantas hospedeiras é afetado pela presença da planta parasita são escassos. Geralmente a abordagem das pesquisas envolvendo mecanismos de defesa na relação planta-planta parasita consiste em comparar cultivares resistentes e suscetíveis para verificar quais são os mecanismos de defesa responsáveis pela resistência e/ou suscetibilidade em determinados cultivares.

Como exemplo, Goldwasser *et al.* (1999), ao comparar o teor de fenólicos nas raízes de um cultivar resistente e de um cultivar suscetível de ervilhaca parasitada e não parasitada pela holoparasita de raiz *Orobancha aegyptiaca*, verificaram que houve um aumento na quantidade de fenólicos em indivíduos parasitados e esse aumento foi maior no cultivar resistente. Outros trabalhos envolvendo plantas parasitas de raiz também relacionaram a presença dessa classe de metabólitos secundários como um mecanismo de defesa frente a essas plantas parasitas (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006; Lozano-Baena *et al.*, 2007). Em uma interação envolvendo *V. album* e dois cultivares de álamo, um resistente e outro suscetível, constatou-se que o cultivar resistente apresentou maior quantidade de flavonoides que o suscetível. Dessa forma, os autores sugeriram que flavonoides, uma importante classe de substâncias fenólicas, constituem um mecanismo de defesa vegetal frente a esse grupo de plantas parasitas (Hariri *et al.*, 1991). Segundo Hariri *et al.* (1991), flavonoides constituiriam um mecanismo de defesa por contribuírem para a rejeição do patógeno em duas formas: agindo como substâncias tóxicas (como ocorre em alguns casos de associações fungo-planta) ou agindo como barreira química para a parasita. Alguns autores sugerem que a liberação de substâncias fenólicas pela planta hospedeira tornaria o ambiente celular quimicamente hostil para as células intrusivas da planta parasita (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2006; Lozano-Baena *et al.*, 2007).

Nesses trabalhos os autores constataram que os cultivares suscetíveis apresentaram menores teores de flavonoides e outros fenólicos que os resistentes, mas eles não compararam as quantidades de tais substâncias em plantas suscetíveis parasitadas e não parasitadas. Segundo Neumann *et al.* (1999) mesmo plantas suscetíveis são capazes de detectar a presença da planta parasita e, embora não sejam capazes de resistir a infestação, elas conseguem ativar mecanismos de defesa.



**Figura 17:** Espectros de absorção UV-visível das substâncias detectadas por CLAE-DAD em 352 nm em folhas de *T. guianensis*. Os números correspondem aos constituintes listados na tabela 10.

No presente trabalho foi verificado que *P. crassifolium* afeta quantitativamente a produção de substâncias fenólicas em *T. guianensis* principalmente nos ramos, local em que se instala. Em ramos infestados foi observado um menor teor de carboidratos solúveis, amido (exceto na galha), lipídeos e nitrogênio, sobretudo nas regiões proximal e distal. Por outro lado, metabólitos secundários destinados para a defesa podem ser realocados para desenvolvimento, crescimento e manutenção do corpo vegetativo quando necessário (Neilson *et al.*, 2013). Portanto, pode-se sugerir que em ramos infestados as substâncias fenólicas foram realocadas para tais finalidades. Contudo, se essa possível realocação foi comandada pela hospedeira ou pela parasita não se sabe.

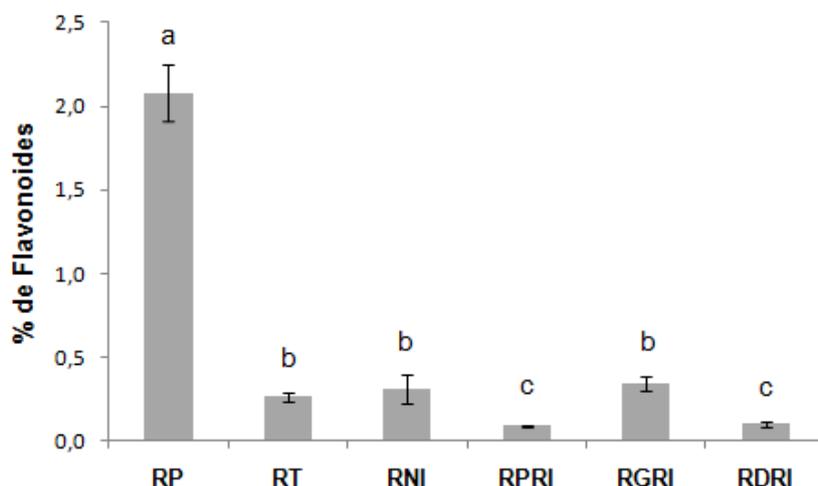
Um estudo integrado envolvendo carbono marcado, monitoramento de carboidratos e substâncias fenólicas durante o estabelecimento e desenvolvimento da parasita na hospedeira permitiria um melhor entendimento sobre a alocação e realocação desses compostos, inclusive, se de fato ela ocorre.

A região da galha apresentou quantidade de flavonoides significativamente superior em relação aos demais grupos de ramos. Essa região é composta pela combinação de tecidos da hospedeira com tecidos da parasita. De fato, ramos de *P. crassifolium* (RP 2,08%) apresentaram teores de flavonoides superiores aos de ramos de *T. guianensis* (RT 0,27%), como pode ser verificado nas tabelas 9 e 11. Essa região pode conter maiores teores de flavonoides devido à presença do tecido da parasita que contém níveis mais elevados dessa classe de fenólicos que os ramos da hospedeira. Em contrapartida, nessa região há a presença do haustório e a sua penetração no tecido da hospedeira é reportada como um dano mecânico (Teixeira-Costa & Ceccantini, 2015) e, segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007), esse tipo de injúria geralmente resulta em aumento na produção de fenólicos e outros metabólitos secundários nas regiões adjacentes ao tecido injuriado.

Tabela 11 – Porcentagem de substâncias fenólicas (média  $\pm$  desvio padrão) em folhas (FP) e ramos (RP) de *P. crassifolium* coletados no município de Campanha, MG (n=9).

Classes Analisadas	Grupos	
	FP	RP
<b>Fenóis totais</b>	9,04 $\pm$ 1,63	5,86 $\pm$ 1,17
<b>Flavonoides</b>	2,95 $\pm$ 0,59	2,08 $\pm$ 0,17
<b>Taninos totais</b>	1,46 $\pm$ 0,17	1,24 $\pm$ 0,12
<b>Proantocianidinas</b>	4,25 $\pm$ 0,87	1,47 $\pm$ 0,67

Na figura 18 está plotado o conteúdo de flavonoides obtido por doseamento nos ramos de *P. crassifolium* e nos diferentes grupos de ramos de *T. guianensis*. Fica claro observar que a planta parasita apresentou até 5 vezes mais flavonoides que o observado para os ramos da planta hospedeira.



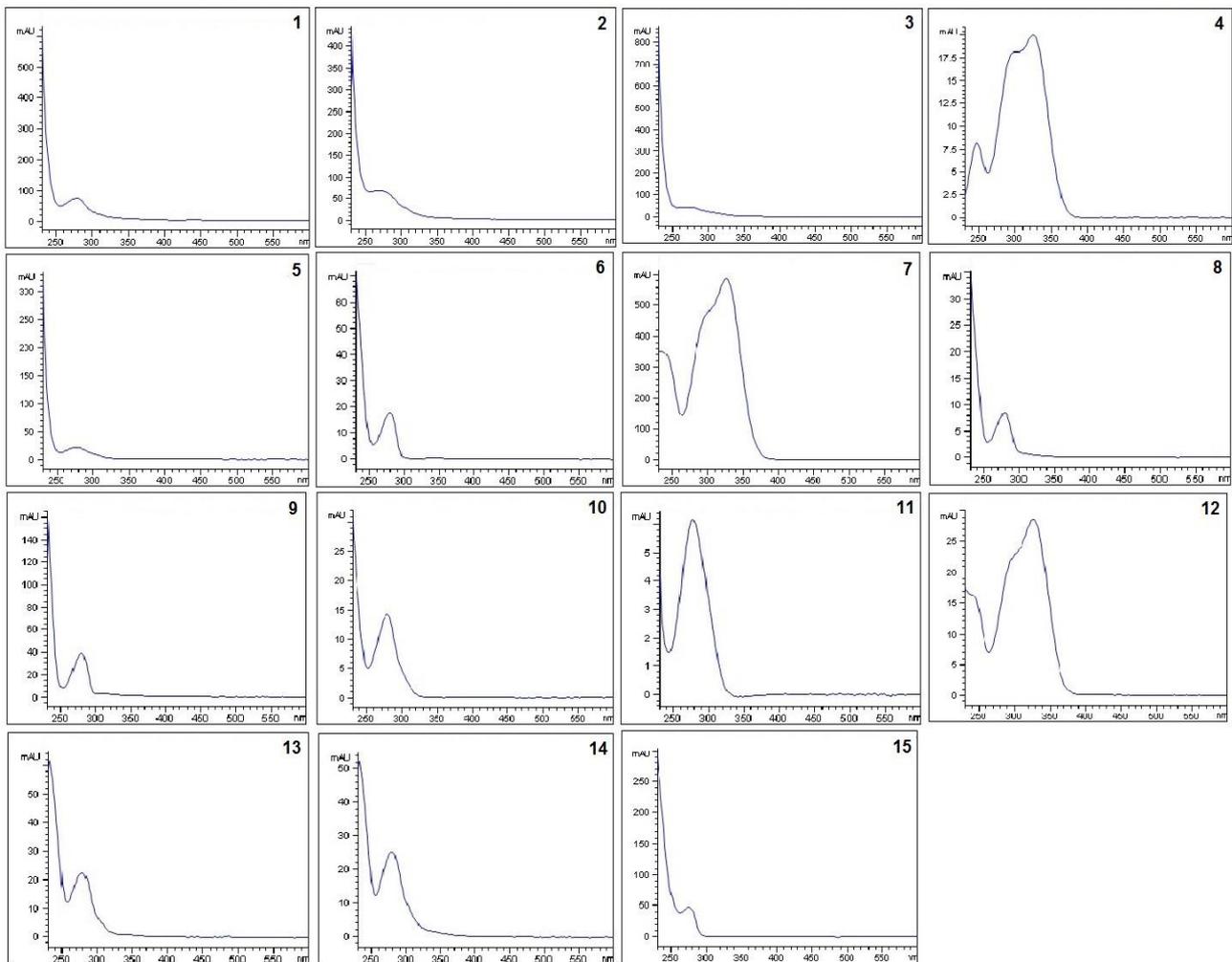
**Figura 18:** Conteúdo de flavonoide (%) em ramos de *P. crassifolium* e de *T. guianensis*. RP, ramo de *P. crassifolium*; RT, ramo de *T. guianensis* não parasitada; RNI, ramo não infestado de *T. guianensis*; RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; e RDRI, região distal do ramo infestado. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Nas análises em CLAE-DAD dos ramos de *T. guianensis* foi possível detectar um total de 15 substâncias em 280 nm (Tabela 12), todas elas pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, entre eles, o ácido gálico, e dos fenilpropanoides, como o ácido clorogênico e outros derivados do ácido hidroxicinâmico (constituintes **4** e **12**, Tabela 12). Os constituintes detectados foram identificados com base nos espectros UV-visível e tempos de retenção de amostras autênticas, mas a maioria das substâncias não apresentou correspondência com os padrões que o Laboratório de Fitoquímica possui. Dessa forma, pelos espectros UV-visível foram sugeridas as classes as quais tais constituintes pertencem. Na figura 19 são apresentados os espectros UV-visível de todas as substâncias detectadas a 280 nm nos ramos da hospedeira.

A substância majoritária para todos os grupos, exceto RGRI, foi o constituinte **13** (Tabela 12), enquanto que para a galha o ácido clorogênico foi o constituinte majoritário do extrato.

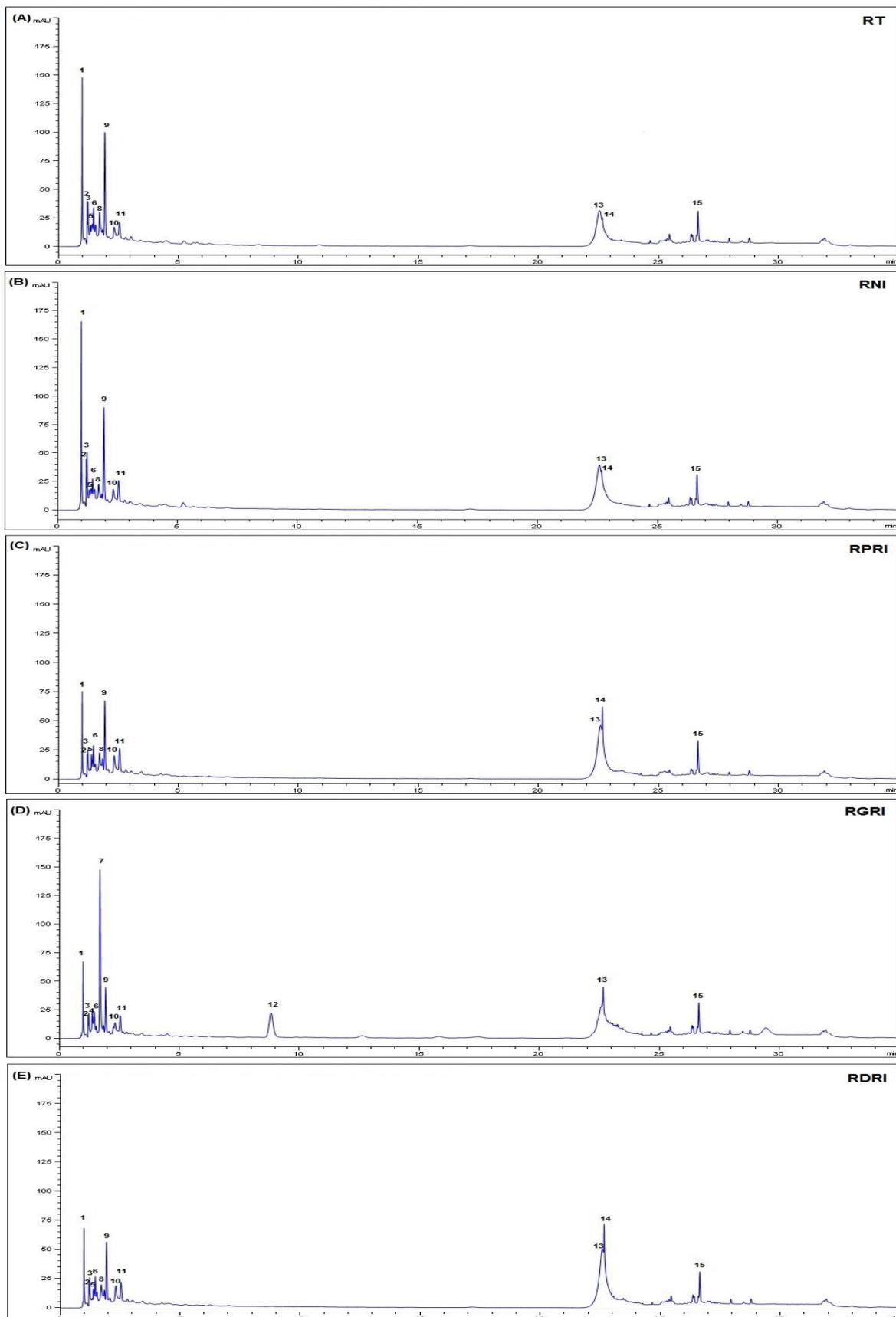
Tabela 12 – Porcentagem de constituintes fenólicos (média ± desvio padrão) detectados por CLAE-DAD (280 nm) em ramos de *T. guianensis* não parasitada por *P. crassifolium* (RT, n=6), ramos infestados (RPRI, RGRI e RDRI, n=9) e ramos não infestados (RNI, n=9) de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium* coletados no município de Campanha, MG. RPRI, região proximal do ramo infestado; RGRI, região da galha do ramo infestado; RDRI, região distal do ramo infestado; Tr, tempo de retenção (min.). Para uma mesma linha, médias seguidas de letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Classe de fenólicos	Tr	UV-Visível (nm)	RT	RNI	RPRI	RGRI	RDRI
1 Fenilpropanoide	0,978	280	0,16 ± 0,04 a	0,19 ± 0,08 a	0,06 ± 0,01 b	0,06 ± 0,01 b	0,06 ± 0,01 b
2 Fenilpropanoide	1,187	275	0,04 ± 0,01 a	0,02 ± 0,01 a	0,02 ± 0,00 b	0,02 ± 0,00 b	0,02 ± 0,00 b
3 Ácido gálico	1,216	278	0,06 ± 0,01 a	0,06 ± 0,02 a	0,03 ± 0,01 b	0,03 ± 0,00 b	0,04 ± 0,01 b
4 Derivado de ácido hidroxicinâmico	1,365	296 (om), 325	-	-	-	0,03 ± 0,01	-
5 Fenilpropanoide	1,381	280	0,03 ± 0,00 a	0,03 ± 0,01 a	0,03 ± 0,00 a	-	0,04 ± 0,00 a
6 Fenilpropanoide	1,447	280	0,04 ± 0,01 ab	0,05 ± 0,01 a	0,03 ± 0,00 b	0,03 ± 0,00 b	0,03 ± 0,00 b
7 Ácido clorogênico	1,682	296 (om), 325	-	-	-	0,19 ± 0,03	-
8 Fenilpropanoide	1,701	280	0,05 ± 0,00 a	0,05 ± 0,01 a	0,04 ± 0,00 b	-	0,04 ± 0,00 b
9 Fenilpropanoide	1,918	280	0,12 ± 0,01 a	0,13 ± 0,02 a	0,08 ± 0,01 b	0,08 ± 0,02 b	0,08 ± 0,01 b
10 Fenilpropanoide	2,307	280	0,04 ± 0,01 a	0,05 ± 0,01 a	0,04 ± 0,00 a	-	0,05 ± 0,00 a
11 Fenilpropanoide	2,528	280	0,04 ± 0,00 a	0,04 ± 0,01 a	0,04 ± 0,01 a	0,05 ± 0,01 a	0,04 ± 0,01 a
12 Derivado de ácido hidroxicinâmico	8,814	296 (om), 325	-	-	-	0,10 ± 0,03	-
13 Fenilpropanoide	22,534	280	0,27 ± 0,08 ab	0,27 ± 0,07 a	0,21 ± 0,06 ac	0,13 ± 0,06 c	0,18 ± 0,03 bc
14 Fenilpropanoide	22,620	280	0,13 ± 0,06 a	0,13 ± 0,04 a	0,10 ± 0,02 a	-	0,13 ± 0,04 a
15 Fenilpropanoide	26,597	275	0,05 ± 0,00 a	0,05 ± 0,00 a	0,05 ± 0,00 a	0,05 ± 0,00 a	0,05 ± 0,00 a
Flavonoides			-	-	-	-	-
Fenilpropanoides			0,89 ± 0,03 ab	1,02 ± 0,16 a	0,67 ± 0,11 b	0,81 ± 0,17b	0,65 ± 0,13 b
Total			0,89 ± 0,03 ab	1,02 ± 0,16 a	0,67 ± 0,11 b	0,81 ± 0,17b	0,65 ± 0,13 b



**Figura 19:** Espectros de absorção UV-visível das substâncias detectadas por CLAE-DAD em 280 nm em ramos de *T. guianensis*. Os números correspondem aos constituintes listados na tabela 12.

Como é possível observar nos cromatogramas dos cinco grupos de ramos de *T. guianensis* analisados no presente trabalho (Figura 20), apenas a região da galha (RGRI) difere qualitativamente dos demais grupos. Deste modo, diferentemente dos outros grupos de ramos (RT, RNI, RPRI e RDRI), a galha apresentou as substâncias **4**, **7** e **12** (Tabela 12), todas elas presentes nos ramos de *P. crassifolium*, resultado apresentado mais adiante. Tal fato não é de surpreender uma vez que a galha é o local em que a parasita se instala na hospedeira, logo é uma região que apresenta tecido das duas plantas.



**Figura 20:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 280 nm de (A): ramo de *T. guianensis* não parasitada (RT); (B): ramo não infestado de *T. guianensis* parasitada (RNI); (C): região proximal do ramo infestado (RPRI); (D): região da galha do ramo infestado (RGRI); e (E): região distal do ramo infestado (RDRI).

Os grupos RT, RNI, RPRI e RDRI não apresentaram diferenças qualitativas, mas alguns de seus constituintes diferem quantitativamente, como pode ser verificado na tabela 12. Os dois grupos de ramos não infestados de *T. guianensis* (RT e RNI) não apresentaram diferença significativa no conteúdo de nenhum dos 12 constituintes comuns aos dois grupos e é interessante ressaltar que esses dois grupos apresentaram quantidades significativamente superiores para algumas das substâncias detectadas (**1**, **2**, **3**, **8** e **9**) quando comparados aos grupos de ramos infestados, dentre elas o ácido gálico (substância **3**, Tabela 12), constituinte de galotaninos. Este resultado corrobora com o encontrado para dosagens de taninos totais onde RT e RNI apresentaram maiores teores que os ramos não infestados (Tabela 9).

Para ramos infestados (RPRI, RGRI e RDRI) não foi verificada diferença significativa entre os constituintes compartilhados pelos três grupos.

Os ramos não infestados da planta hospedeira (RNI) foi o grupo que apresentou o maior teor de fenilpropanoides, juntamente com os ramos dos indivíduos não parasitados (RT), como pode ser observado na tabela 12. Entre esses dois últimos grupos, não foi observada diferença relevante no conteúdo dos diferentes constituintes fenólicos. Entretanto, RNI difere significativamente dos grupos de ramos infestados (RPRI 0,67%, RGRI 0,81% e RDRI 0,65%) que, por sua vez, não apresentaram diferença significativa entre si. Os maiores conteúdos de fenilpropanoides em RT e RNI estão de acordo com as dosagens realizadas em microplaca para substâncias fenólicas totais (Tabela 9), na qual esses grupos também apresentaram os maiores teores dessa classe de substâncias. É importante salientar que não foram detectados flavonoides em ramos quando se utilizou a análise por CLAE-DAD com detecção em 352 nm e, por isso, optou-se em apresentar os resultados apenas das substâncias detectadas em 280 nm. Esse resultado indica que flavonoides das classes das flavonas e flavonóis não ocorrem, ou ocorrem em quantidades abaixo do nível de detecção do equipamento, nos ramos de *T. guianensis*, mas que outras classes podem estar presentes, mas não foram analisadas neste estudo.

Pelas análises em CLAE-DAD com detecção em 352 nm dos extratos de *P. crassifolium* foi possível detectar 9 constituintes, que estão apresentados na tabela 13. As nove substâncias foram detectadas nas folhas (FP), enquanto apenas sete foram encontradas nos extratos de ramos (RP).

Tabela 13 – Porcentagem de constituintes fenólicos (média  $\pm$  desvio padrão) detectados por CLAE-DAD (352 nm) em folhas (FP) e ramos (RP) de *P. crassifolium* (n=9) coletados no município de Campanha, MG. Tr, tempo de retenção (min.).

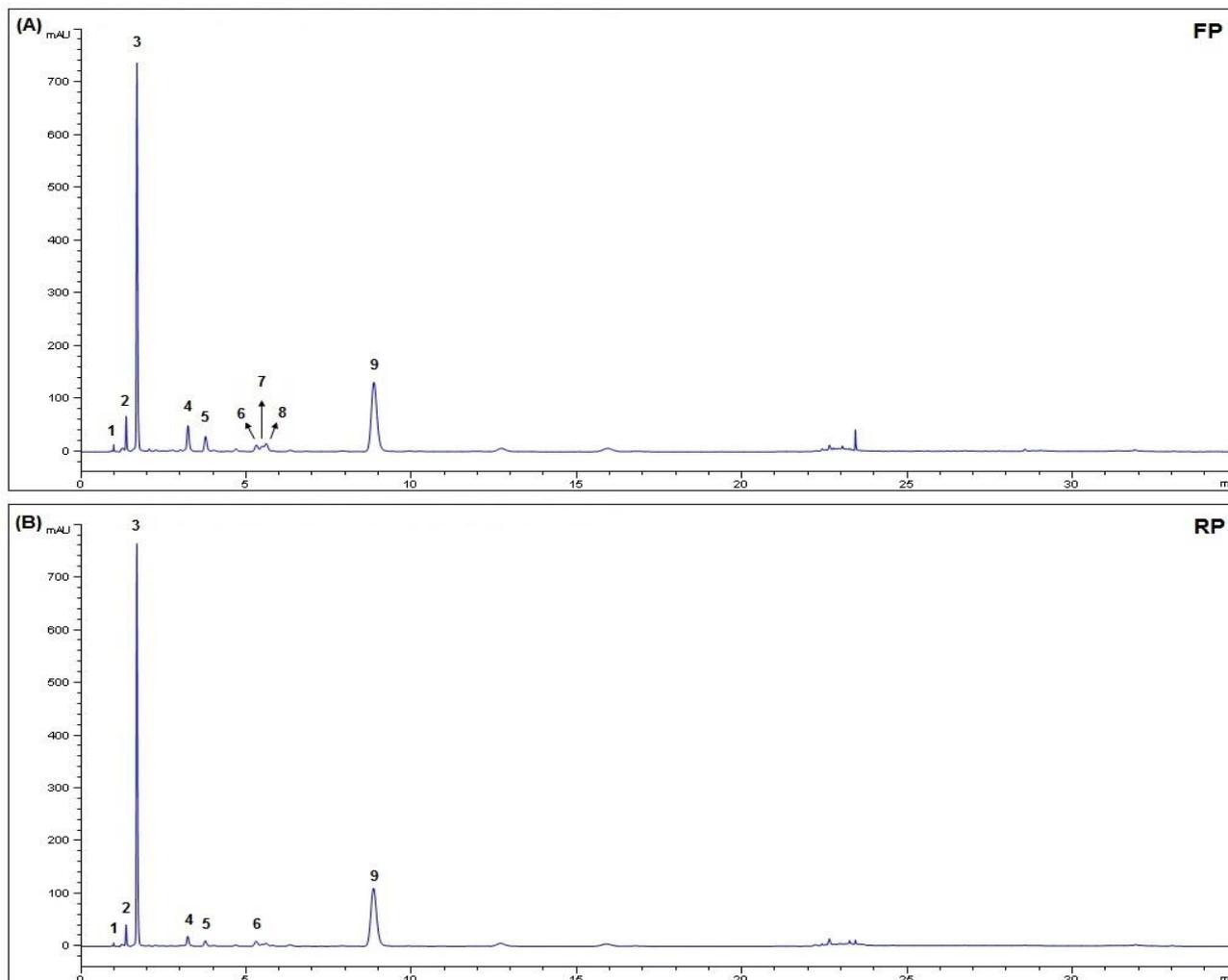
Classe de fenólicos	Tr	UV-Visível (nm)	FP	RP
1 Fenilpropanoide	0,978	280	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
2 Derivado de ácido hidroxicinâmico	1,354	296 (om), 325	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01
3 Ácido clorogênico	1,679	296 (om), 325	0,95 $\pm$ 0,27	1,04 $\pm$ 0,24
4 Iso-orientina	3,220	257 (om), 270, 350	0,18 $\pm$ 0,09	0,04 $\pm$ 0,01
5 Derivado de luteolina	3,751	257, 268 (om), 349	0,12 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,01
6 Rutina	5,289	257, 266 (om), 292 (om), 356	0,07 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01
7 Vitexina	5,472	269, 297 (om), 336	0,07 $\pm$ 0,02	-
8 Derivado de apigenina	5,593	270, 336	0,11 $\pm$ 0,04	-
9 Derivado de ácido hidroxicinâmico	8,839	298 (om), 326	0,55 $\pm$ 0,19	0,41 $\pm$ 0,13
Flavonoides			0,45 $\pm$ 0,24	0,06 $\pm$ 0,05
Fenilpropanoides			1,55 $\pm$ 0,28	1,57 $\pm$ 0,16
Total			2,12 $\pm$ 0,46	1,63 $\pm$ 0,15

A figura 21 traz os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 352 nm para os extratos de folhas e ramos de *P. crassifolium*. Os espectros de UV-visível dos constituintes detectados estão apresentados na figura 22. Deste modo, para a planta parasita, em 352 nm, foram detectados cinco flavonoides e quatro fenilpropanoides. Entre os fenilpropanoides, foi possível identificar apenas a substância **3** que corresponde ao ácido clorogênico, entretanto de acordo com as características do espectro UV-visível das substâncias **2** e **9** (Tabela 13, Figura 22), pode-se sugerir que ambos sejam derivados do ácido hidroxicinâmico. Esses três últimos constituintes também foram detectados na região da galha (RGRI), como mencionado anteriormente.

Quanto aos flavonoides, foi possível identificar um flavonol, a rutina (substância **6**, Tabela 13), e duas flavonas C-glicosiladas, a iso-orientina e a vitexina, substâncias **4** e **7** (Tabela 13), respectivamente. Os flavonoides que correspondem aos constituintes **5** e **8** não foram identificados, mas pela análise de seus espectros UV-visível pode-se sugerir que são derivados de luteolina e apigenina, respectivamente, ambos pertencentes à classe das flavonas (Tabela 13, Figura 22).

Varela *et al.* (2004) analisando *Phoradendron liga* detectou quatro C-glicosilflavonas: apigenina-6-C-glicosídeo (isovitexina), apigenina-6-C-galactosídeo, apigenina-8-C-glicosídeo (vitexina) e luteolina-6-C-xilosídeo-8-C-glicosídeo. López-Martínez *et al.* (2013) estudando extratos de *Phoradendron brachystachyum*, observaram derivados metoxilados de apigenina, como acacetina (apigenina-4'-metil éter) e acacetina

7-metil éter. Tais estudos corroboram os resultados encontrados neste trabalho, com a presença majoritária de flavonas em *P. crassifolium*.

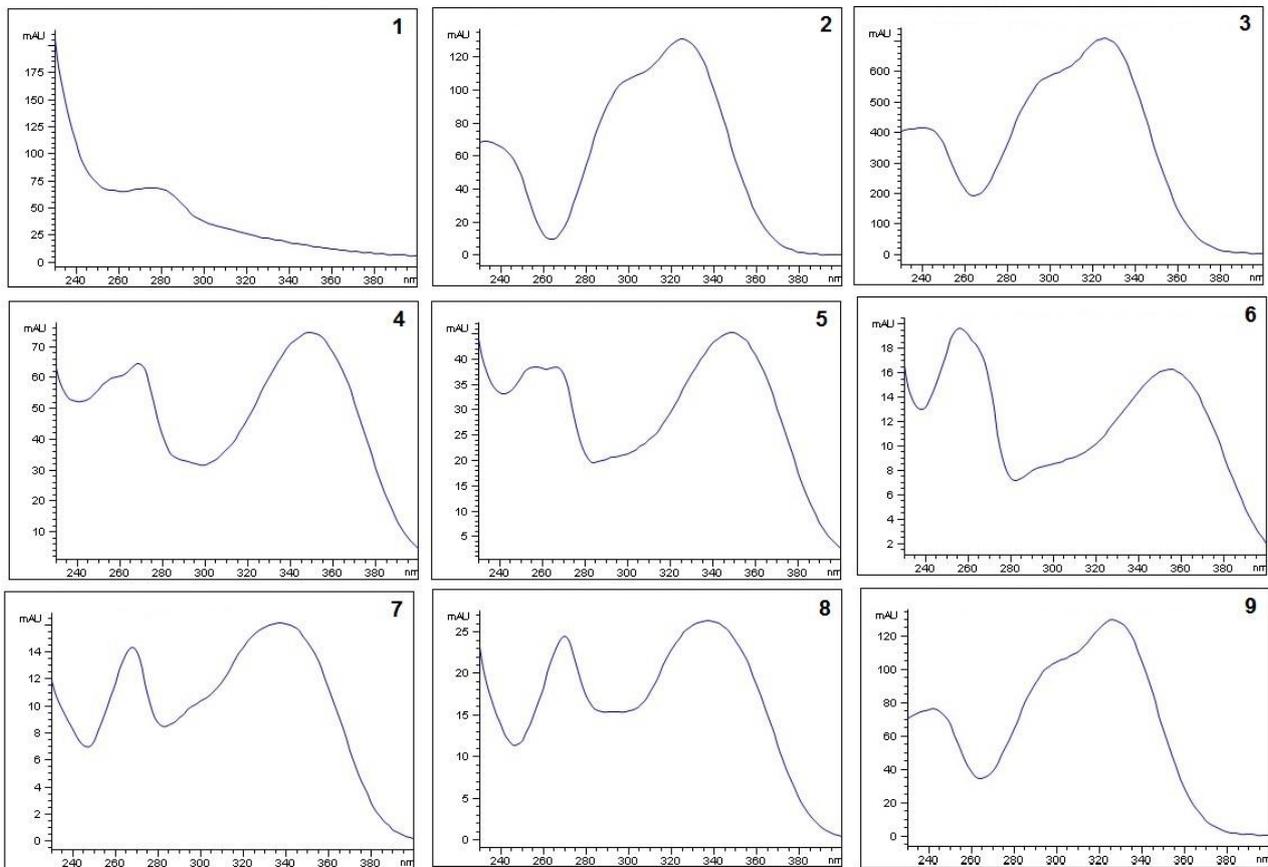


**Figura 21:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 352 nm. (A): folhas de *P. crassifolium* (FP); e (B): ramos de *P. crassifolium* (RP).

Ainda no que diz respeito às análises realizadas em 352 nm para a planta parasita, verificou-se que as folhas apresentaram maiores teores de flavonoides (0,45%) e fenólicos totais (2,12%) que os ramos (0,06% e 1,63%). Quanto aos fenilpropanoides, folhas (1,55%) e ramos (1,57%) apresentaram quantidades semelhantes.

Diferentemente de *T. guianensis*, *P. crassifolium* apresentou flavonoides e fenilpropanoides quando analisados os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 280 nm. Nesse comprimento, foram detectadas 15 substâncias que estão listadas na tabela 14. Em 280 nm, apenas rutina e vitexina, detectadas em 352 nm, não foram detectadas. As oito substâncias (2, 3, 5, 7, 8, 9, 14 e 15) encontradas apenas nesse comprimento de

onda pertencem à classe dos fenilpropanoides. Os espectros UV-visível das 15 substâncias detectadas em 280 nm estão apresentados na figura 23.



**Figura 22:** Espectros de absorção UV-visível das substâncias detectadas por CLAE-DAD em 352 nm de *P. crassifolium*. Os números correspondem aos constituintes listados na tabela 13.

Em ambos os comprimentos analisados, o constituinte mais abundante encontrado tanto em folhas como em ramos de *P. crassifolium* foi o ácido clorogênico. A substância **13** (Tabela 14), um derivado do ácido hidroxicinâmico, foi o segundo composto mais relevante para os dois órgãos analisados da planta parasita em 280 nm (FP 0,63% e RP 0,45%).

Como esperado, foram obtidos maiores valores de fenilpropanoides para folhas (FP 2,25%) e ramos (RP 2,15%) em 280 nm quando comparados aos obtidos em 352 nm, visto que, a banda de absorção dos fenilpropanoides varia entre 280 e 325 nm, como citado anteriormente. Em 280 nm, os flavonoides, por sua vez, foram detectados apenas nas folhas (FP 0,22%) de *P. crassifolium*. Nas folhas foi verificado, ainda, maior abundância de constituintes (15 substâncias) quando comparadas com os ramos (10 substâncias). Na figura 24 é possível observar os cromatogramas obtidos para esses dois órgãos em 280 nm.

Tabela 14 – Porcentagem de constituintes fenólicos (média  $\pm$  desvio padrão) detectados por CLAE-DAD (280 nm) em folhas (FP) e ramos (RP) de *P. crassifolium* (n=9) coletados no município de Campanha, MG. Tr, tempo de retenção (min.).

	Classe de fenólicos	Tr	UV-Visível (nm)	FP	RP
1	Fenilpropanoide	0,977	280	0,04 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
2	Fenilpropanoide	1,188	-	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
3	Fenilpropanoide	1,213	-	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
4	Derivado de ácido hidroxicinâmico	1,354	296 (om), 325	0,07 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01
5	Fenilpropanoide	1,432	268	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02
6	Ácido clorogênico	1,679	296 (om), 325	1,17 $\pm$ 0,33	1,28 $\pm$ 0,29
7	Fenilpropanoide	1,846	280	0,04 $\pm$ 0,00	-
8	Fenilpropanoide	2,472	315	0,06 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01
9	Fenilpropanoide	2,615	280	0,08 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01
10	Iso-orientina	3,222	257 (om), 270, 350	0,11 $\pm$ 0,05	-
11	Derivado de luteolina	3,755	258, 269 (om), 348	0,07 $\pm$ 0,02	-
12	Derivado de apigenina	5,593	270, 336	0,08 $\pm$ 0,01	-
13	Derivado de ácido hidroxicinâmico	8,839	298 (om), 326	0,63 $\pm$ 0,22	0,45 $\pm$ 0,15
14	Fenilpropanoide	15,904	313	0,15 $\pm$ 0,03	-
15	Fenilpropanoide	26,599	275	0,06 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00
	Flavonoides			0,22 $\pm$ 0,13	-
	Fenilpropanoides			2,25 $\pm$ 0,39	2,15 $\pm$ 0,18
	Total			2,64 $\pm$ 0,61	2,15 $\pm$ 0,18

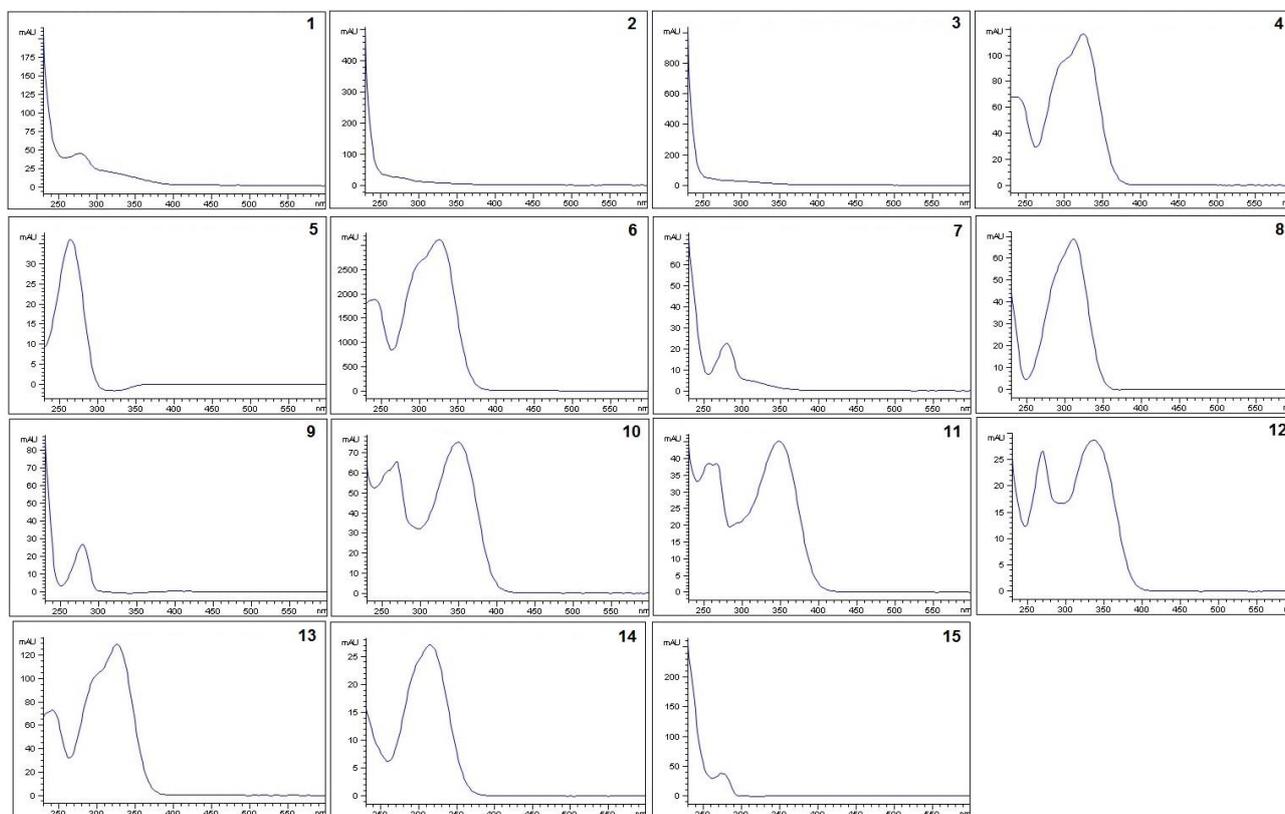
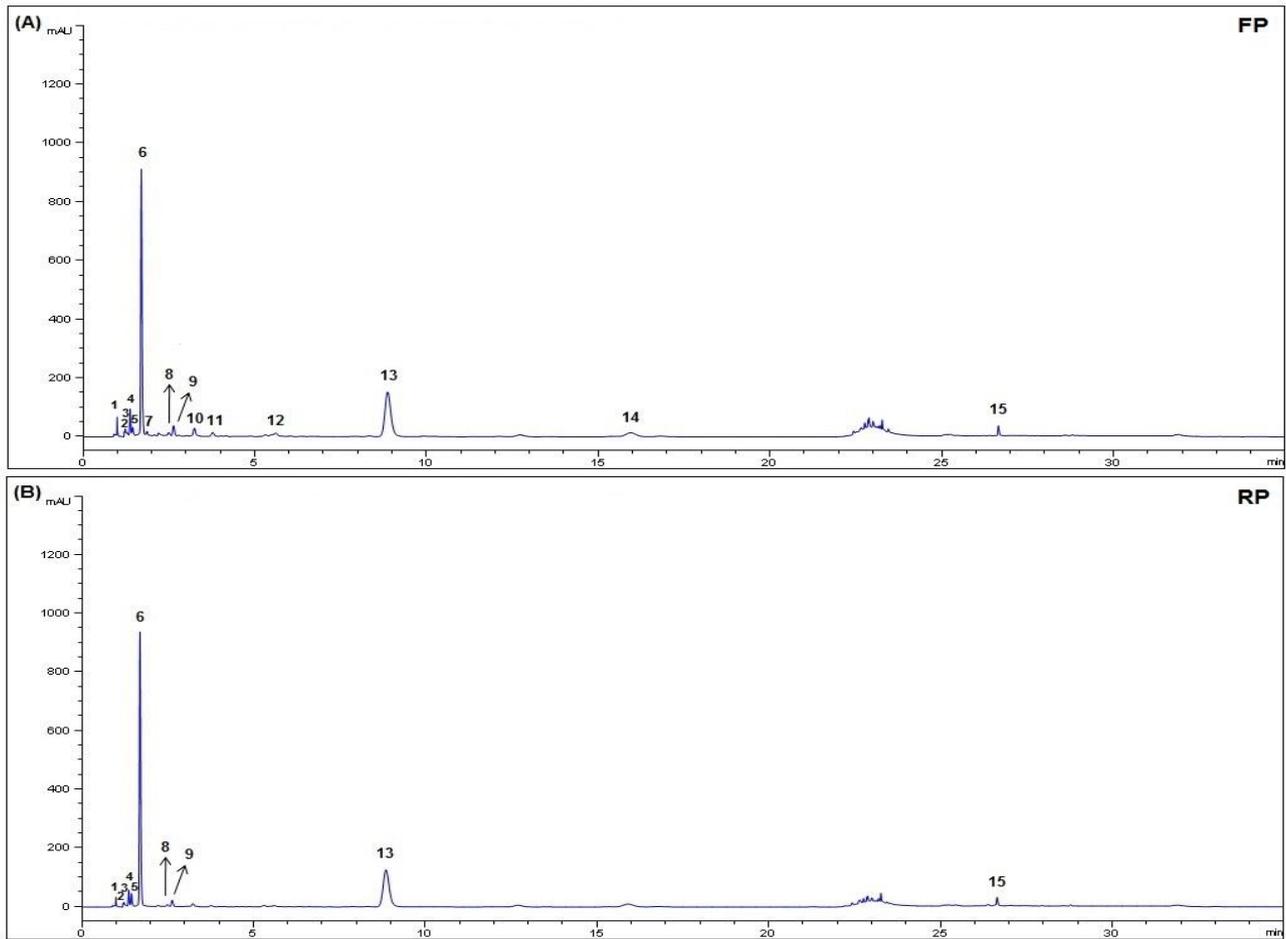


Figura 23: Espectros de absorção UV-visível das substâncias detectadas por CLAE-DAD em 280 nm de *P. crassifolium*. Os números correspondem aos constituintes listados na tabela 14.



**Figura 24:** Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 280 nm. (A): folhas de *P. crassifolium* (FP); e (B): ramos de *P. crassifolium* (RP).

Novamente, pelos resultados obtidos pela análise em CLAE-DAD, *P. crassifolium* afetou qualitativamente e quantitativamente a produção de substâncias fenólicas em *T. guianensis* principalmente nos ramos, local em que se instala. A região da galha é a que mais se diferencia qualitativamente das demais regiões de ramos infestados, pois apresenta ácido clorogênico, detectado somente em *P. crassifolium*. Outros fenilpropanoides detectados mostraram conteúdos reduzidos nos tecidos das três regiões analisadas dos ramos infestados de *T. guianensis*. Em ramos infestados também foi observado um menor teor de carboidratos solúveis, amido (exceto na galha), lipídeos e nitrogênio, sobretudo nas regiões proximal e distal.

A região da galha apresentou quantidade de flavonoides significativamente superior em relação aos demais grupos de ramos quando analisados por doseamento, método menos específico que CLAE. Nessa última análise, nenhum flavonoide foi detectado, nem em 352 nm nem em 280 nm, em nenhum tecido do ramo da hospedeira. Esse resultado indica que fenilpropanoides são os constituintes majoritários nesses tecidos, mascarando

a presença de flavonoides que devem ocorrer em quantidades abaixo das detectadas pela análise e, por isso, não integrados pelo programa. Tal resultado pode indicar, ainda, que outras classes de flavonoides que não somente flavonas e flavonóis estejam presentes nos ramos da hospedeira e que absorvem em comprimentos não analisados, mas que reagem com o cloreto de alumínio no ensaio de doseamento. Em contrapartida, como mencionado anteriormente, a região onde há a penetração do haustório no tecido da hospedeira é reportada como uma região de intenso dano mecânico (Teixeira-Costa & Ceccantini, 2015) o qual geralmente resulta em aumento na produção de fenólicos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). De fato parece haver uma tendência a maior quantidade de fenilpropanoides na região da galha em relação às duas regiões adjacentes, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

## VI. Considerações finais

A presença da interação parasítica entre *P. crassifolium* e *T. guianensis* afetou quimicamente folhas e ramos da hospedeira, sendo que os ramos em que a parasita se estabeleceu foi o local em que os efeitos negativos foram mais evidentes. A presença da parasita provocou significativa redução nos conteúdos de carboidratos solúveis, amido, lipídeos e nitrogênio nos ramos infestados. Aparentemente esse visco age como um órgão dreno que além de translocar nitrogênio também obtém carbono de sua hospedeira.

A redução de nitrogênio nos tecidos parasitados era esperada, pois se sabe que viscos dependem de suas hospedeiras para a obtenção de água e nutrientes e que nitrogênio constitui um dos principais fatores limitantes para o crescimento desse grupo de plantas parasitas. Entretanto, a significativa redução de carboidratos solúveis não era esperada, pois durante muito tempo pensou-se que viscos parasitas de xilema obtinham carbono apenas de forma autotrófica. Os resultados deste estudo corroboram outros que demonstraram que viscos parasitas de xilema podem obter quantidades significativas de carbono a partir de suas hospedeiras.

A região da galha apresentou maiores teores de materiais de reserva que as demais regiões dos ramos infestados, sugerindo que essa região, em que ocorre o contato entre as duas plantas, possa ser usada pela parasita como um local de armazenamento de reserva energética para alocação e realocação de carbono.

Quanto ao impacto da parasita no metabolismo secundário de *T. guianensis*, verificou-se que *P. crassifolium* também afetou negativamente os ramos infestados em seus conteúdos de substâncias fenólicas. Houve redução de todas as classes de fenólicos avaliadas em ramos infestados, exceto na galha onde foi observado maior conteúdo de flavonoides. Tal resultado, aliado às maiores quantidades de amido e lipídeos, aponta a região da galha como a mais afetada pela relação parasítica, diferindo extremamente das demais regiões de ramos infestados e de ramos não parasitados.

Esperava-se encontrar maiores teores de substâncias fenólicas nos ramos infestados, visto que, muitos fenólicos são usados pelas plantas como mecanismo de defesa frente a diversos fatores bióticos e abióticos. Alguns autores apontam o aumento de substâncias fenólicas em tecidos injuriados, além de sugerirem o acúmulo dessas substâncias como um mecanismo a fim de tornar o ambiente celular mais tóxico ao organismo invasor. Entretanto, tal resultado não foi observado neste estudo, pelo contrário, apenas o conteúdo de flavonoides foi maior na região da galha que nas demais regiões dos ramos infestados. Duas sugestões são propostas para o aumento de

flavonoides observado nessa região: 1. a presença nessa região do tecido da parasita que contém maiores teores de flavonoides que ramos da hospedeira; e 2. o aumento de flavonoides é uma resposta da hospedeira frente à injúria sofrida nesses tecidos em virtude da penetração do haustório e essas substâncias agiram como antioxidantes de espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas em resposta ao estresse.

Outro aspecto interessante observado na relação *T. guianensis* vs. *P. crassifolium* foi que ramos não infestados de indivíduos parasitados de *T. guianensis* parecem sofrer acúmulo de substâncias fenólicas, o que pode levar a sugerir um mecanismo de defesa usado pela hospedeira com o intuito de evitar ou mesmo diminuir novas infestações de um indivíduo já parasitado, aumentando, principalmente, seus conteúdos de taninos.

Mediante tais evidências, pode-se propor que essa redução de substâncias fenólicas em ramos infestados se deva a uma possível realocação de carbono para crescimento, desenvolvimento e manutenção do ramo da hospedeira, assim como defesa de ramos ainda não infestados.

Para melhor compreensão de como as diferentes variáveis analisadas caracterizam os ramos de *T. guianensis*, órgão mais afetado pela parasita, foi realizada uma análise multivariada de componente principal (PCA) utilizando os dados de 11 variáveis, são elas: substâncias fenólicas totais, flavonoides, taninos totais, proantocianidinas, fenilpropanoides, carboidratos solúveis, amido, lipídeos, carbono, nitrogênio e razão C/N.

O resultado da PCA mostrou que 68% da variabilidade verificada nos dados podem ser explicadas pelos dois primeiros eixos. Na tabela 15 estão listados os valores das variâncias explicadas por essa análise e podemos notar que os valores encontrados estão acima dos valores esperados, comprovando a robustez da análise.

Na figura 25 pode-se observar que os grupos de ramos estão distribuídos ao longo do eixo 1 de acordo com a presença ou ausência da parasita nos mesmos. No extremo do lado positivo do eixo 1 estão posicionados os grupos que correspondem aos ramos não infestados (RNI) e aos ramos não parasitados (RT), enquanto que no lado negativo encontram-se os grupos de ramos infestados (RPRI, RGRI e RDRI).

Na tabela 16, estão listados os coeficientes de correlação de Pearson para as 11 variáveis analisadas e como elas influenciam na distribuição dos grupos de ramos ao longo dos dois primeiros eixos (apresentados na figura 25). Para o eixo 1, as variáveis que mais influenciaram a distribuição dos grupos foram os conteúdos de substâncias fenólicas (FT, por doseamento) e de fenilpropanoides (FE, por CLAE-DAD), embora outras variáveis como taninos (TT e PR) e nitrogênio (N) também apresentaram valores de correlação acima de 0,300.

Tabela 15 – Porcentagem de variância explicada e esperada (estimada pelo teste de vara quebrada) na análise de PCA para a interação *T. guianensis* vs. *P. crassifolium*. CP, componente principal.

CP	% de variância	% de variância acumulada	% de variância esperada
1	49,148	49,138	27,453
2	18,829	67,967	18,363
3	10,000	77,967	13,817
4	8,139	86,106	10,787
5	4,139	90,245	8,514
6	3,750	93,995	6,696
7	2,757	96,751	5,181
8	1,495	98,246	3,882
9	0,817	99,064	2,746
10	0,595	99,659	1,736
11	0,341	100,000	0,826

Outro aspecto interessante é que as amostras de ramos não infestados de *T. guianensis* parasitada (RNI) foram posicionadas mais próximas ao extremo do lado positivo do eixo 1 do que ramos de *T. guianensis* não parasitada (RT), indicando que RNI apresentou maior teor de fenólicos (taninos totais, proantocianidinas, fenóis totais e fenilpropanoides) que RT. Este resultado reforça uma possível resposta sistêmica adquirida com o objetivo de diminuir ou mesmo evitar infestações em ramos ainda não infestados por *P. crassifolium*.

Tabela 16 – Coeficientes de correlação de Pearson entre as 11 variáveis analisadas e os eixos 1 e 2 da análise de PCA. Em cinza, destaque para os vetores de maior influência em cada eixo. FT, fenol total; FL, flavonoide; TT, tanino total; PR, proantocianidina; FE, fenilpropanoide; CS, carboidrato solúvel; AM, amido; LP, lipídeo; C, carbono; N nitrogênio; e C/N, razão C/N.

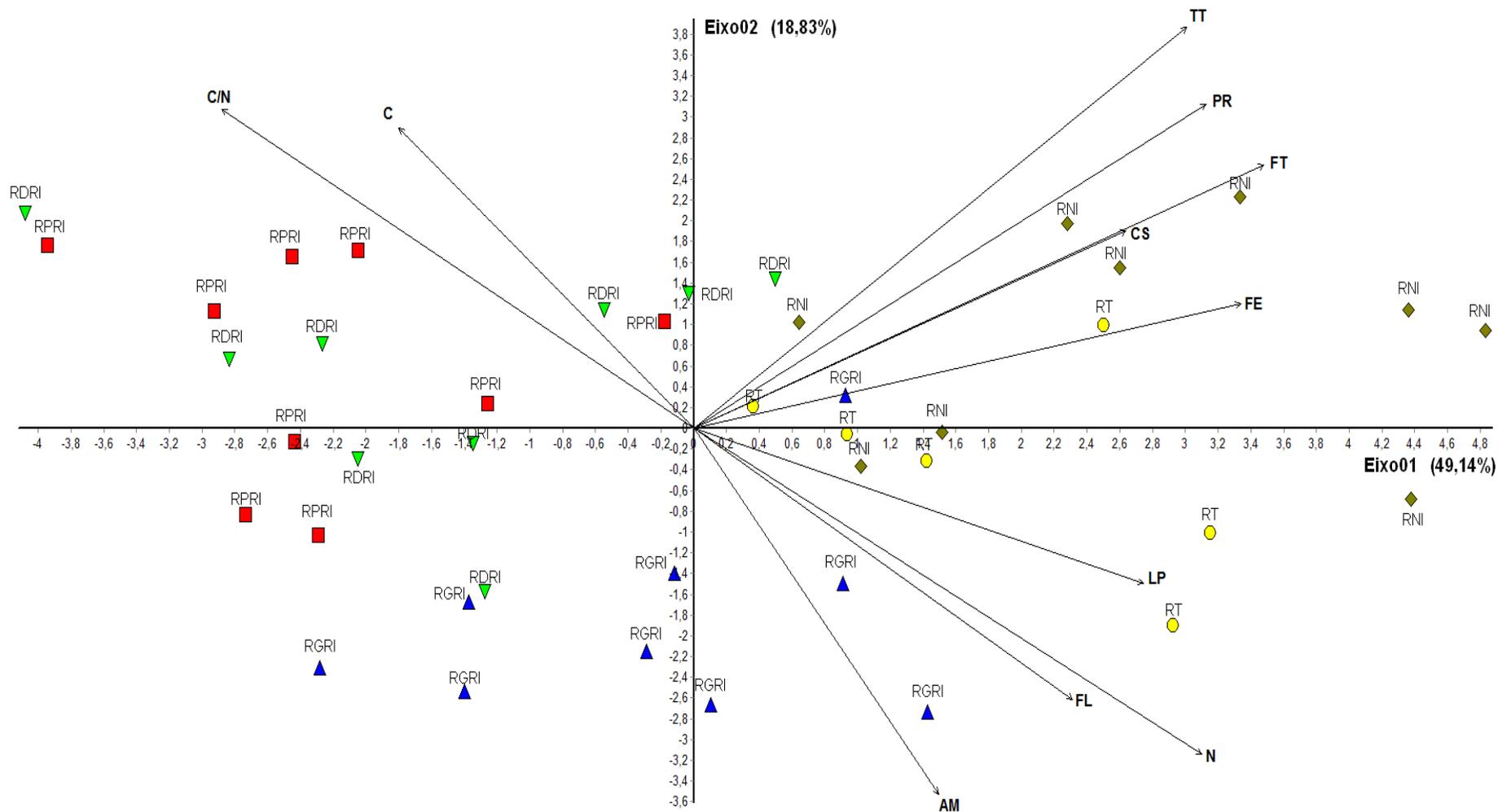
Variáveis	Eixo 1	Eixo 2
FT	0,377	0,274
FL	0,250	-0,283
TT	0,326	0,418
PR	0,339	0,338
FE	0,361	0,129
CS	0,286	0,206
AM	0,162	-0,382
LP	0,297	-0,162
C	-0,195	0,313
N	0,336	-0,340
C/N	-0,312	0,332

No eixo 2, por sua vez, a distribuição dos grupos se deu de acordo com a presença de tecidos da parasita no grupo analisado, ou seja, no lado positivo estão os grupos que apresentam apenas tecidos da hospedeira (RT, RNI, RPRI e RDRI), ao passo que, no lado negativo está posicionado o grupo que contém o tecido da parasita (RGRI). A

distribuição dos grupos de ramos no eixo 2 foi influenciada sobretudo pelos teores de amido (AM), nitrogênio (N) e taninos totais (TT). De fato, a região da galha diferiu principalmente das regiões proximal e distal por apresentar maiores teores de amido e nitrogênio e menores teores de taninos totais. Dessa forma, a região da galha, que apresenta tecido tanto da hospedeira como da parasita, parece apresentar conteúdos para essas três variáveis influenciados pela presença do tecido da parasita.

Em suma, como postulado no início do estudo, *P. crassifolium* afeta tanto o metabolismo primário como o secundário de sua hospedeira, *T. guianensis*. Entretanto, refutamos nossa hipótese inicial de que as quantidades de substâncias fenólicas seriam aumentadas pela presença do parasitismo, uma vez que os grupos de ramos de indivíduos não parasitados e o de ramos não infestados dos indivíduos parasitados foram os que apresentaram os maiores conteúdos de substâncias fenólicas (tanto total como das classes analisadas). Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer, por exemplo, se de fato a parasita transloca carbono, nitrogênio e outras substâncias a partir da hospedeira, se a parasita consegue comandar ações no metabolismo de *T. guianensis* e qual o nível de sua influência no metabolismo da hospedeira.

Por fim, vale ressaltar que este projeto foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Anatomia de Plantas Vasculares do Instituto de Biociências da USP, no qual a mestra Luiza Teixeira-Costa estudou os impactos anatômicos provocados por *P. crassifolium* em *T. guianensis*. A integração dos resultados obtidos por ambas as dissertações auxiliarão na melhor compreensão da interação parasítica do modelo estudado. Tais fatos demonstram os benefícios da realização de estudos multidisciplinares na melhor compreensão de estudos que envolvam interações ecológicas.



**Figura 25:** Análise de componente principal de 11 variáveis (FT, fenol total; FL, flavonoide; TT, tanino total; PR, proantocianidina; FE, fenilpropanoide; CS, carboidrato solúvel; AM, amido; LP, lipídeo; C, carbono; N, nitrogênio; e C/N, razão C/N) avaliadas nos cinco grupos de ramos provenientes de *T. guianensis*: RT (●), ramo de *T. guianensis* não parasitada; RNI (◆), ramo não infestado de *T. guianensis* parasitada por *P. crassifolium*; RPRI (■), região proximal do ramo infestado; RGRI (▲), região da galha do ramo infestado; e RDRI (▼), região distal do ramo infestado.



## VII. Conclusões

- *P. crassifolium* afetou quimicamente as folhas e os ramos de indivíduos parasitados de *T. guianensis* quando comparados aos não parasitados, porém ramos, local em que a parasita se estabelece, é o órgão mais drasticamente afetado quando comparado às folhas.
- Houve redução significativa no conteúdo de nitrogênio, algo esperado, visto que vasos parasitas de xilema dependem de suas hospedeiras para obtenção de água e nutrientes.
- Observou-se menor teor de carboidratos solúveis em ramos infestados, algo não esperado, já que durante muito tempo pensou-se que vasos parasitas de xilema obtinham carbono apenas de forma autotrófica. Os resultados obtidos neste estudo corroboram os poucos relatos na literatura de que espécies de *Phoradendron* também obtêm carbono de forma heterotrófica.
- Sugere-se que o maior teor de material de reserva observado na região da galha seja uma possível estratégia de alocação e realocação de carbono pela planta parasita.
- A hipótese de que ramos infestados apresentariam maior teor de substâncias fenólicas foi refutada e os menores conteúdos de carboidratos solúveis e materiais de reserva observados nos ramos infestados podem ter influenciado na síntese de substâncias fenólicas resultando na redução observada nestes mesmos ramos.
- O maior teor de substâncias fenólicas observado em ramos não infestados de indivíduos parasitados de *T. guianensis* (RNI) sugere o mecanismo de resposta sistêmica adquirida, no qual maiores teores de substâncias fenólicas poderiam funcionar como um mecanismo de defesa da planta hospedeira para diminuir ou mesmo evitar novas infestações em ramos ainda não infestados.



## VIII. Referências Bibliográficas

Ahmad, M. U.; Husain, S. K.; Osman, S. M. Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.58, n.6, p.673-674, 1981.

Alvino, F. O.; Silva, M. F. F.; Rayol, B. P. Potencial uso das espécies arbóreas de uma floresta secundária, na Zona Bragantina, Pará, Brasil. **Acta Amazonica**. v.35, n.4, p.413-420, 2005.

Amaral, L. I. V.; Gaspar, M.; Costa, P. M. F.; Aidar, M. P. M.; Buckeridge, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**. v.34, n.4, p.425-431, 2007.

Arruda, R.; Fadini, R. F.; Carvalho, L. N.; Del-Claro, K.; Mourão, F. A.; Jacobi, C. M.; Teodoro, G. S.; Berg, E. V. D.; Caires, C. M. ; Dettke, G. A. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasilica**. v.26, n.2, p.264-274, 2012.

Arruda, R.; Lunardelli, C.; Kitagawa, C.; Caires, C. S.; Teodoro, G. S.; Mourão, F. A. Two mistletoes are too many? Interspecific occurrence of mistletoes on the same host tree. **Acta Botanica Brasilica**. v.27, n.1, p.226-230, 2013.

Aukema, J. E. Vectors, viscin, and Viscaceae: mistletoes as parasites, mutualists, and resources. **Frontiers in Ecology and the Environment**. v.1, n.3, p.212-219, 2003.

Barkman, T. J.; McNeal, J. R.; Lim, S. H.; Coat, G.; Croom, H. B.; Young, N. D.; dePamphilis, C. W. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. **BCM Evolutionary Biology**. v.7, 2007. doi: 10.1186/1471-2148-7-248

Barton, K. E. Phenotypic plasticity in seedling defense strategies: compensatory growth and chemical induction. **Oikos**. v.117, n.6, p.917-925, 2008.

Batish, D. R.; Singh, H. P.; Kohli, R. K.; Kaur, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**. v.256, n.12, p.2166-2174, 2008.

Bhuiyan, N. H.; Selvaraj, G.; Wei, Y.; King, J. Role of lignification in plant defense. **Plant Signaling & Behavior**. v.4, n.2, p.158-159, 2009.

Birschwilks, M.; Haupt, S.; Hofius, D.; Neumann, S. Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. **Journal of Experimental Botany**. v.57, n.4, p.911-921, 2006.

Bowie, M.; Ward, D. Water and nutrient status of the mistletoe *Plicosepalus acaciae* parasitic on isolated Neveg Desert populations of *Acacia raddiana* differing in level of mortality. **Journal of Arid Environments**. v.56, n. 3, p.487-508, 2004.

Bringmann, G.; Schlauer, J.; Rückert, M.; Wiesen, B.; Ehrenfeld, K.; Proksch, P.; Czygan, F.-C. Host-derived acetogenins involved in the incompatible parasitic relationship between *Cuscuta reflexa* (Convolvulaceae) and *Ancistrocladus heyneanus* (Ancistrocladaceae). **Plant Biology**. v.1, n.5, p.581-584, 1999.

Broshot, N. E.; Tinnin, R. O. The effect of dwarf mistletoe on starch concentrations in the twigs and needles of lodgepole pine. **Canadian Journal of Forest Research**. v.16, n.3, p.658-660, 1986.

Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

Bungard, R. A. Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. **BioEssays**. v.26, n.3, p.235-247, 2004.

Calvin, C. L.; Wilson, C. A. Epiparasitism in *Phoradendron durangense* and *P. falcatum* (Viscaceae). **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**. v.27, n.1, p.1-12, 2009.

Candia, A. B.; Medel, R.; Fontúrbel, F. E. Indirect positive effects of a parasitic plant on host pollination and seed dispersal. **Oikos**. v.123, n.11, p.1371-1376, 2014.

Castillejo, M. A.; Amiour, N.; Dumas-Gaudot, E.; Rubiales, D.; Jorrín, J. V. A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). **Phytochemistry**. v.65, n.12, p.1817-1828, 2004.

Chase, M. W.; Reveal, J. L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.161, n.2, p.122-127, 2009.

Clemente, M. S. **Análise da variação genética de populações de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* por AFLP e da composição de ácidos graxos de sementes**. 2010. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Orientadora: Salatino, M. L. F.), para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Correia, S. J. David, J. M.; Silva, E. P.; David, J. P.; Lopes, L. M. X.; Guedes, M. L. S. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. **Química Nova**. v.31, n.8, p.2056-2059, 2008.

Costa, L. C. B.; Rocha, E. A.; Silva, L. A. M.; Jardim, J. G.; Silva, D. C.; Gaião, L. O.; Moreira, R. C. T. Levantamento preliminar das espécies vegetais com potencial econômico no Parque Municipal da Boa Esperança, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v.25, n.2, p.184-191, 2006.

Cunha, L. V. F. C.; Albuquerque, U. P. Quantitative ethnobotany in an atlantic forest fragment of northeastern Brazil – implications to conservation. **Environmental Monitoring and Assessment**. v.114, p.1-25, 2006.

Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**. v.22, n.1, p.39-44, 2003.

David, J. M.; Chávez, J. P.; Chai, H.-B.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. Two new cytotoxic compounds from *Tapirira guianensis*. **Journal of Natural Products**. v.61, n.2, p.287-289, 1998.

De Geyter, N.; Gholami, A.; Goormachtig, S.; Goossens, A. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. **Trends in Plant Science**. v.17, n.6, p.349-359, 2012.

Dewick, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 539p.

Echevarría-Zomeño, S.; Pérez-de-Luque, A.; Jorrín, J.; Maldonado, A. M. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobancha cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies. **Journal of Experimental Botany**. v.57, n.15, p.4189-4200, 2006.

Ehleringer, J. R.; Cook, C. S.; Tieszen, L. L. Comparative water use and nitrogen relationships in a mistletoe and its host. **Oecologia**. v.68, n.2, p.279-284, 1986.

Ehleringer, J. R.; Schulze, E.-D. Mineral concentrations in an autoparasitic *Phoradendron californicum* growing on a parasitic *P. californicum* and its host, *Cercidium floridum*. **American Journal of Botany**. v.72, n.4, p.568-571, 1985.

Escher, P.; Eiblmeier, M.; Hetzger, I.; Rennenberg, H. Seasonal and spatial variation of carbohydrates in mistletoes (*Viscum album*) and the xylem sap of its hosts (*Populus x euamericana* and *Abies alba*). **Physiologia Plantarum**. v.120, n.2, p.212-219, 2004a.

Escher, P.; Eiblmeier, M.; Rennenberg, H. Differences in the influx of glutamine and nitrate into *Viscum album* from xylem sap of its hosts. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.42, n.9, p.739-744, 2004b.

Escher, P.; Rennenberg, H. Influx of double labelled glutamine into mistletoes (*Viscum album*) from the xylem sap of its host (*Abies alba*). **Plant Physiology and Biochemistry**. v.44, n.11, p.880-884, 2006.

Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. **Raven: Biologia Vegetal**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 856p.

Ferrer, J.-L.; Austin, M. B.; Stewart Jr., C.; Noel, J. P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.46, n.3, p.356-370, 2008.

Forzza, R. C.; Baumgratz, J. F. A.; Bicudo, C. E. M.; Carvalho Jr., A. A.; Costa, A.; Costa, D. P.; Hopkins, M.; Leitman, P. M.; Lohmann, L. G.; Maia, L. C.; Martinelli, G.; Menezes, M.; Morim, M. P.; Coelho, M. A. N.; Peixoto, A. L.; Pirani, J. R.; Prado, J.; Queiroz, L. P.; Souza, V. C.; Stehmann, J. R.; Sylvestre, L. S.; Walter, B. M. T.; Zappi, D. (Ed.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 1699p.

Gao, C.; Ren, X.; Mason, A. S.; Liu, H.; Xiao, M.; Li, J.; Fu, D. Horizontal gene transfer in plants. **Functional & Integrative Genomics**. v.14, n.1, p.23-29, 2014.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v.30, n.2, p.374-381, 2007.

- Goldwasser, Y.; Hershenhorn, J.; Plakhine, D.; Kleifeld, Y.; Rubin, B. Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanchae aegyptiaca*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.54, n.3, p.87-96, 1999.
- Goldwasser, Y.; Plakhine, D.; Kleifeld, Y.; Zamski, E.; Rubin, B. The differential susceptibility of vetch (*Vicia spp.*) to *Orobanchae aegyptiaca*: anatomical studies. **Annals of Botany**. v.85, n.2, p.257-262, 2000.
- Harborne, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4 ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2003. 384p.
- Hariri, E. B.; Sallé, G.; Andary, C. Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). **Protoplasma**. v.162, n.1, p.20-26, 1991.
- Hassan, S.; Mathesius, U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**. v.63, n.9, p.3429-3444, 2012.
- Heide-Jorgensen, H. S. **Parasitic Flowering Plants**. Leiden: Brill, 2008. 438p.
- Hibberd, J. M.; Jeschke, W. D. Solute flux into parasitic plants. **Journal of Experimental Botany**. v.52, n.363, p.2043-2049, 2001.
- Hollinger, D. Y. Photosynthesis and water relations of the mistletoe, *Phoradendron villosum*, and its host, the California valley oak, *Quercus lobata*. **Oecologia**. v.60, n.3, p.396-400, 1983.
- Hooper, A. M.; Tsanuo, M. K.; Chamberlain, K.; Tittcomb, K.; Scholes, J.; Hassanali, A.; Khan, Z. R. Pickett, J. A. Isoschaftoside, a C-glycosylflavonoid from *Desmodium uncinatum* root exudate, is an allelochemical against the developmental of *Striga*. **Phytochemistry**. v.71, n.8, p.904-908, 2010.
- Hosseini, S. M.; Kartoolinejad, D.; Mirnia, S. K.; Tabibzadeh, Z.; Akbarinia, M.; Shayanmehr, F. The European mistletoe effects on leaves and nutritional elements of two host species in Hyrcanian Forests. **Silva Lusitana**. v.16, n.2, p.229-237, 2008.
- Hull, R. J., Leonard, O. A. Physiological aspects of parasitism in mistletoes (*Arceuthobium* and *Phoradendron*). I. The Carbohydrate Nutrition of Mistletoes. **Plant Physiology**. v.39, n.6, p.996-1007, 1964.
- Irving, L. J.; Cameron, D. D. You are what you eat: interactions between root parasitic and their hosts. **Advances in Botanical Research**. v.50, p.87-138, 2009.
- Jamil, M.; Rodenburg, J.; Charnikhova, T.; Bouwmeester, H. J. Pre-attachment *Striga hermonthica* resistance of new rice for Africa (NERICA) cultivars based on low strigolactone production. **New Phytologist**. v.192, n.4, p.964-975, 2011.
- Kachroo, A.; Kachroo, P. Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. **Annual Review of Phytopathology**. v.47, p.153-176, 2009.

- Kaiser, B.; Vogg, G.; Fürst, U. B.; Albert, M. Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. **Frontiers in Plant Science**. v.6, 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00045
- Khanbabaee, K.; van Ree, T. Tannins: classification and definition. **Natural Product Reports**. v.18, n.6, p.641-649, 2001.
- Kim, G.; LeBlanc, M. L.; Wafula, E. K.; dePamphilis, C. W.; Westwood, J. H. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. **Science**. v.345, n.6198, p.808-811, 2014.
- Kuijt, J. Monograph of *Phoradendron* (Viscaceae). **Systematic Botany Monographs**. v.66, 2003.
- Kuijt, J. **The biology of parasitic flowering plants**. Berkeley: University of California Press, 1969. 246p.
- Lanini, W. T.; Kogan, M. Biology and management of *Cuscuta* in crops. **Ciencia e Investigación Agraria**. v.32, n.3, p.127-141, 2005.
- Lattanzio, V.; Lattanzio, V. M. T.; Cardinali, A. Role of phenolic in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in Research**. v.661, p.23-67, 2006.
- LeBlanc, M.; Kim, G.; Westwood, J. H. RNA trafficking in parasitic plant systems. **Frontiers in Plant Science**. v.3, 2012. doi:10.3389/fpls.2012.00203
- Li, J.; Yang, B.; Yan, Q.; Zhang, J.; Yan, M.; Li, M. Effects of a native parasitic plant on an exotic invader decrease with increasing host age. **AoB Plants**. v.7, 2015. doi:10.1093/aobpla/plv031
- López-Martínez, S.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S.; León-Rivera, I.; Rios, M. Y. Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). **Natural Product Research**. v.27, n.2, p.130-136, 2013.
- Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 6 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. 384p.
- Lozano-Baena, M. D.; Prats, E.; Moreno, M. T.; Rubiales, D.; Pérez-de-Luque, A. *Medicago truncatula* as a model for nonhost resistance in legume-parasitic plant interacts. **Plant Physiology**. v.145, n.2, p.437-449, 2007.
- Lüttge, U.; Haridasan, M.; Fernandes, G. W.; Mattos, E. A.; Trimborn, P.; Franco, A. C.; Caldas, L. S.; Ziegler, H. Photosynthesis of mistletoes in relation to their hosts at various site in tropical Brazil. **Trees**. v.12, n.3, p.167-174, 1998.
- Marshall, J. D.; Ehleringer, J. R. Are xylem-tapping mistletoes partially heterotrophic? **Oecologia**. v.84, n.2, p.244-248, 1990.

Marshall, J. D.; Ehleringer, J. R.; Schulze, E.-D.; Farquhar, G. Carbon isotope composition, gas exchange and heterotrophy in Australian mistletoes. **Functional Ecology**. v.8, n.2, p.237-241, 1994.

Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S.-I.; Lee, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**. v.339, n.1, p.69-72, 2005.

Mathiasen, R. L.; Nickrent, D. L.; Shaw, D. C.; Watson, D. M. Mistletoes: pathology, systematics, ecology, and management. **Plant Disease**. v.92, n.7, p.988-1006, 2008.

Messias, P. A.; Vidal Jr., J. D.; Koch, I.; Christianini, A. V. Host specificity and experimental assessment of the early establishment of the mistletoes *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae) in a fragment of Atlantic Forest in southeast Brazil. **Acta Botanica Brasilica**. v.28, n.4, p.577-582, 2014.

Mithöfer, A.; Boland, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**. v.63, p.431-450, 2012.

Mohamed, A.; Ellicott, A.; Housley, T. L.; Ejeta, G. Hypersensitive response to *Striga* infection in *Sorghum*. **Crop Science**. v.43, n.4, p.1320-1324, 2003.

Ndagurwa, H. G. T.; Dube, J. S.; Mlambo, D. The influence of mistletoes on nutrient cycling in a semi-arid savanna, southwest Zimbabwe. **Plant Ecology**. v.215, n.1, p.15-26, 2014.

Neilson, E. H.; Goodger, J. Q. D.; Woodrow, I. E.; Moller, B. L. Plant chemical defense: at what cost? **Trends in Plant Science**. v.18, n.5, p.250-258, 2013.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

Neumann, U.; Vian, B.; Weber, H. C.; Sallé, G. Interface between haustoria of parasitic members of the Scrophulariaceae and their hosts: a histochemical and immunocytochemical approach. **Protoplasma**. v.207, n.1-2, p.84-97, 1999.

Nickrent, D. L. Santalales (Including Mistletoes). **Encyclopedia of Life Sciences**. 2011. doi:10.1002/9780470015902.a0003714.pub2

Nickrent, D. L.; Musselman, L. J. Introduction to parasitic flowering plants. 2004. doi: 10.1094/PHI-I-2004-0330-01. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/parasiticplants.aspx>.

Oerke, E.-C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**. v.144, n.1, p.31-43, 2006.

Overton, J. M. Host specialization and partial reproductive isolation in desert mistletoe (*Phoradendron californicum*). **The Southwestern Naturalist**. v.42, n.2, p.201-209, 1997.

Panvini, A. D.; Eickmeier, W. G. Nutrient and water relations of the mistletoe *Phoradendron leucarpum* (Viscaceae): how tightly are they integrated? **American Journal of Botany**. v.80, n.8, p.872-878, 1993.

- Pimentel, D.; Zuniga, R.; Morrison, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**. v.52, n.3, p.273-288, 2005.
- Pinto-Zevallos, D. M.; Martins, C. B. C.; Pellegrino, A. C.; Zarbin, P. H. G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**. v.36, n.9, p.1395-1405, 2013.
- Popp, M.; Richter, A. Ecophysiology of xylem-tapping mistletoes. **Progress in Botany**. v.59, p.659-674, 1998.
- Pradeep, D. P.; Meenu Krishnan, V. G.; Aswathy, J. M.; Greeshma, M.; Greeshma, G. M.; Krishnan, R.; Lubaina, A. S.; Murugan, K. Interaction between hemiparasitic – *Dendrophthoe falcata* (L.) Etting. on *Mangifera indica* Linn. – some observations. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.3, n.6, p.585-607, 2014.
- Press, M. C.; Graves, J. D. **Parasitic Plants**. London: Chapman & Hall, 1995. 292p.
- Press, M. C.; Phoenix, G. K. Impacts of parasitic plants on natural communities. **New Phytologist**. v.166, n.3, p.737-751, 2005.
- Press, M. C.; Smith, S.; Stewart, G. R. Carbon acquisition and assimilation in parasitic plants. **Functional Ecology**. v.5, n.2, p.278-283, 1991.
- Reblin, J. S.; Logan, B. A.; Tissue, D. T. Impact of eastern dwarf mistletoe (*Arceuthobium pusillum*) infection on the needles of red spruce (*Picea rubens*) and white spruce (*Picea glauca*): oxygen exchange, morphology and composition. **Tree Physiology**. v.26, n.10, p.1325-1332, 2006.
- Rey, L.; Sadik, A.; Fer, A.; Renaudin, S. Trophic relations of the dwarf mistletoe *Arceuthobium oxycedri* with its host *Juniperus oxycedrus*. **Journal of Plant Physiology**. v.138, n.4, p.411-416, 1991.
- Rezende, F. M. **Efeito da atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato**. 2013. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Orientadora: Furlan, C. M.), para a obtenção do título de Mestre em Botânica.
- Richter, A.; Popp, M.; Mensen, R.; Stewart, G. R.; von Willert D. J. Heterotrophic carbon gain of the parasitic angiosperm *Tapinanthus oleifolius*. **Australian Journal of Plant Physiology**. v.22, n.4, p.537-544, 1995.
- Rigon, J. **O gênero *Phoradendron* Nutt. (Viscaceae) no estado do Paraná, Brasil**. 2011. Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (Orientador: Cervi, A. C.), para a obtenção do título de Mestre em Botânica.
- Rispail, N.; Dita, M.-A.; González-Verdejo, C.; Pérez-de-Luque, A.; Castillejo, M.-A.; Prats, E.; Román, B.; Jorrín, J.; Rubiales, D. Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. **New Phytologist**. v.173, n.4, p.703-712, 2007.

Rothe, K.; Diettrich, B.; Rahfeld, B.; Luckner, M. Uptake of phloem-specific cardenolides by *Cuscuta* sp. growing on *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. **Phytochemistry**. v.51, n.3, p.357-361, 1999.

Roumy, V.; Fabre, N.; Portet, B.; Bourdy, G.; Acebey, L.; Vigor, C.; Valentin, A.; Moulis, C. Four anti-protozoal and anti-bacterial compounds from *Tapirira guianensis*. **Phytochemistry**. v.70, n.2, p.305-311, 2009.

Runyon, J. B.; Mescher, M. C.; de Moraes, C. M. Parasitism by *Cuscuta pentagona* attenuates host plant defenses against insect herbivores. **Plant Physiology**. v.146, n.3, p.987-995, 2008.

Runyon, J. B.; Mescher, M. C.; de Moraes, C. M. Plant defenses against parasitic plant show similarities to those induced by herbivores and pathogens. **Plant Signaling & Behavior**. v.5, n.8, p.929-931, 2010a.

Runyon, J. B.; Mescher, M. C.; Felton, G. W.; de Moraes, C. M. Parasitism by *Cuscuta pentagona* sequentially induces JA and SA defense pathways in tomato. **Plant, Cell and Environment**. v.33, n.2, p.290-303, 2010b.

Sangüesa-Barreda, G.; Linares, J. C.; Camarero, J. J. Mistletoe effects on Scots pine decline following drought events: insights from within-tree spatial patterns, growth and carbohydrates. **Tree Physiology**. v.32, n.5, p.585-598, 2012.

Santos, A. C. R.; Furlan, C. M. Levels of phenolic compounds in *Tibouchina pulchra* after fumigation with ozone. **Atmospheric Pollution Research**. v.4, n.3, p.250-256, 2013.

Santos, K. P. ***Croton sphaerogynus* Baill.: substâncias fenólicas e atividades biológicas**. 2014. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Orientadora: Furlan, C. M.), para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Sauerborn, J.; Müller-Stöver, D.; Hershenhorn, J. The role of biological control in managing parasitic weeds. **Crop Protection**. v.26, n.3, p.246-254, 2007.

Schulze, E.-D.; Turner, N. C.; Glatzel, G. Carbon, water and nutrient relations of two mistletoes and their hosts: A hypothesis. **Plant, Cell and Environment**. v.7, n.5, p.293-299, 1984.

Sharma, Y. P.; Kapoor, V. Parasitic angiosperms and biology of *Cuscuta* species - an overview. **Review of Plant Pathology**. v.6, p.577-608, 2014.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

Smith, J. L.; de Moraes, C. M.; Mescher, M. C. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. **Pest Management Science**. v.65, n.5, 497-503, 2009.

- Souza, V. C.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704p.
- Stewart, G. R.; Press, M. C. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review of Plant Biology**. v.41, p.127-151, 1990.
- Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- Teixeira-Costa, L. **Aspectos anatômicos e funcionais da interação entre duas espécies do gênero *Phoradendron* (Santalaceae) e suas hospedeiras**. 2015. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Orientador: Ceccantini, G. C. T.), para a obtenção do título de Mestre em Botânica.
- Teixeira-Costa, L.; Ceccantini, G. Embolism increase and anatomical modifications caused by a parasitic plant: *Phoradendron crassifolium* (Santalaceae) on *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). **IAWA Journal**. v.36, n.2, p.138-151, 2015.
- Treutter, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**. v.4, n.3, p.147-157, 2006.
- Türe, C.; Böcük, H.; Asan, Z. Nutritional relationships between hemi-parasitic mistletoe and some of its deciduous hosts in different habitats. **Biologia**. v.65, n.5, p.859-867, 2010.
- Varela, B. G.; Fernández, T.; Ricco, R. A.; Zolezzi, P. C.; Hajos, S. E.; Gurni, A. A.; Alvarez, E.; Wagner, M. L. *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. **Journal of Ethnopharmacology**. v.94, n.1, p.109-116, 2004.
- Vermerris, W.; Nicholson, R. **Phenolic Compound Biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006. 276p.
- Walters, D. R. **Plant defense: warding off attack by pathogens, herbivores, and parasitic plants**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. 236p.
- Wang, Y.; Chen, S.; Yu, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.91, n.4, p.949-956, 2011.
- Wang, L.; Kgope, B.; D'Odorico, P.; Macko, S. A. Carbon and nitrogen parasitism by a xylem-tapping mistletoe (*Tapinanthus oleifolius*) along the Kalahari Transect: a stable isotope study. **African Journal of Ecology**. v.46, n.4, p.540-546, 2008.
- War, A. R.; Paulraj, M. G.; Ahmad, T.; Buhroo, A. A.; Hussain, B.; Ignacimuthu, S.; Sharma, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**. v.7, n.10, p.1306-1320, 2012.
- Waterman, P. G.; Mole, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 238p.
- Watling, J. R.; Press, M. C. Impacts of infection by parasitic angiosperms on host photosynthesis. **Plant Biology**. v.3, n.3, p.244-250, 2001.

Watson, R. R. (Ed.). **Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation**. London: Academic Press, 2014. 331p.

Westwood, J. H.; Yoder, J. I.; Timko, M. P.; dePamphilis, C. W. The evolution of parasitism in plants. **Trends in Plant Science**. v.15, n.4, p.227-235, 2010.

Wink, M.; Witte, L. Quinolizidine alkaloids in *Genista acanthoclada* and its holoparasite, *Cuscuta palaestina*. **Journal of Chemical Ecology**. v.19, n.3, p.441-448, 1993.

Yoder, J. I. Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**. v.2, n.1, p.65-70, 1999.

Zaroug, M. S.; Zahran, E. B.; Abbasher, A. A. Distribution and host range of mistletoe (*Tapinanthus globiferus*) (A. Rich.) VanTieghem along the blue Nile Banks in Central Sudan. **International Journal of Scientific & Technology Research**. v.3, n.3, p.1-5, 2014.

Zélicourt, A.; Letousey, P.; Thoiron, S.; Campion, C.; Simoneau, P.; Elmorjani, K.; Marion, D.; Simier, P.; Delavault, P. Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. **Planta**. v.226, n.3, p.591-600, 2007.

## IX. Resumo

Plantas parasitas são aquelas que retiram os recursos necessários para a sua sobrevivência de outras plantas (hospedeiras) por meio de uma estrutura denominada haustório, que permite que a parasita se conecte ao sistema vascular da hospedeira. As plantas podem responder ao ataque parasita ativando alguns mecanismos de defesa, dentre eles, a produção de substâncias fenólicas. Os viscos constituem um grupo de plantas parasitas aéreas pertencentes a Santalales que podem ser divididos em viscos holoparasitas ou hemiparasitas. Alguns gêneros de viscos são de importância econômica, dentre eles, *Phoradendron*, um gênero de visco hemiparasita. Esse trabalho teve como objetivos determinar os conteúdos de taninos, flavonoides, fenilpropanoides, carboidratos solúveis, amido, lipídeos e a razão carbono/nitrogênio, além de avaliar como a relação parasítica afeta o metabolismo das espécies envolvidas. Para tanto, coletou-se no município de Campanha (MG) folhas e ramos de seis indivíduos não parasitados de *Tapirira guianensis* (FT e RT) e, a partir de nove indivíduos parasitados de *T. guianensis*, foram coletados ramos e folhas de *Phoradendron crassifolium* (RP e FP), ramos não infestados da hospedeira e suas folhas (RNI e FRNI) e ramos infestados de *T. guianensis* e suas folhas (RI e FRI), sendo que ramos infestados foram divididos em região proximal, galha e distal (RPRI, RGRI e RDRI). Como principais resultados estão o aumento no teor de proantocianidinas e de carboidratos solúveis em FRNI e FRI em relação a FT. Ramos infestados sofreram redução nos conteúdos de carboidratos solúveis, amido, lipídeos, nitrogênio e substâncias fenólicas, exceto na região da galha (RGRI) em que aumentos de amido e flavonoides foram verificados. Observou-se ainda que RNI parece ter sofrido um acúmulo de substâncias fenólicas. O conjunto dos resultados obtidos mostra que *P. crassifolium* afeta o metabolismo primário e o secundário de *T. guianensis*, com influência mais pronunciada nos ramos que nas folhas da hospedeira. Pode-se sugerir que a parasita obtém nitrogênio e carboidratos solúveis de sua hospedeira e que pode ocorrer uma possível realocação de carbono para crescimento, desenvolvimento, manutenção e, ainda, defesa de ramos não infestados. Além disso, sugere-se que o acúmulo de fenólicos em ramos não infestados (RNI) possa ser um mecanismo de defesa usado pela hospedeira com o objetivo de evitar, ou mesmo diminuir, novas infestações em ramos ainda não parasitados.

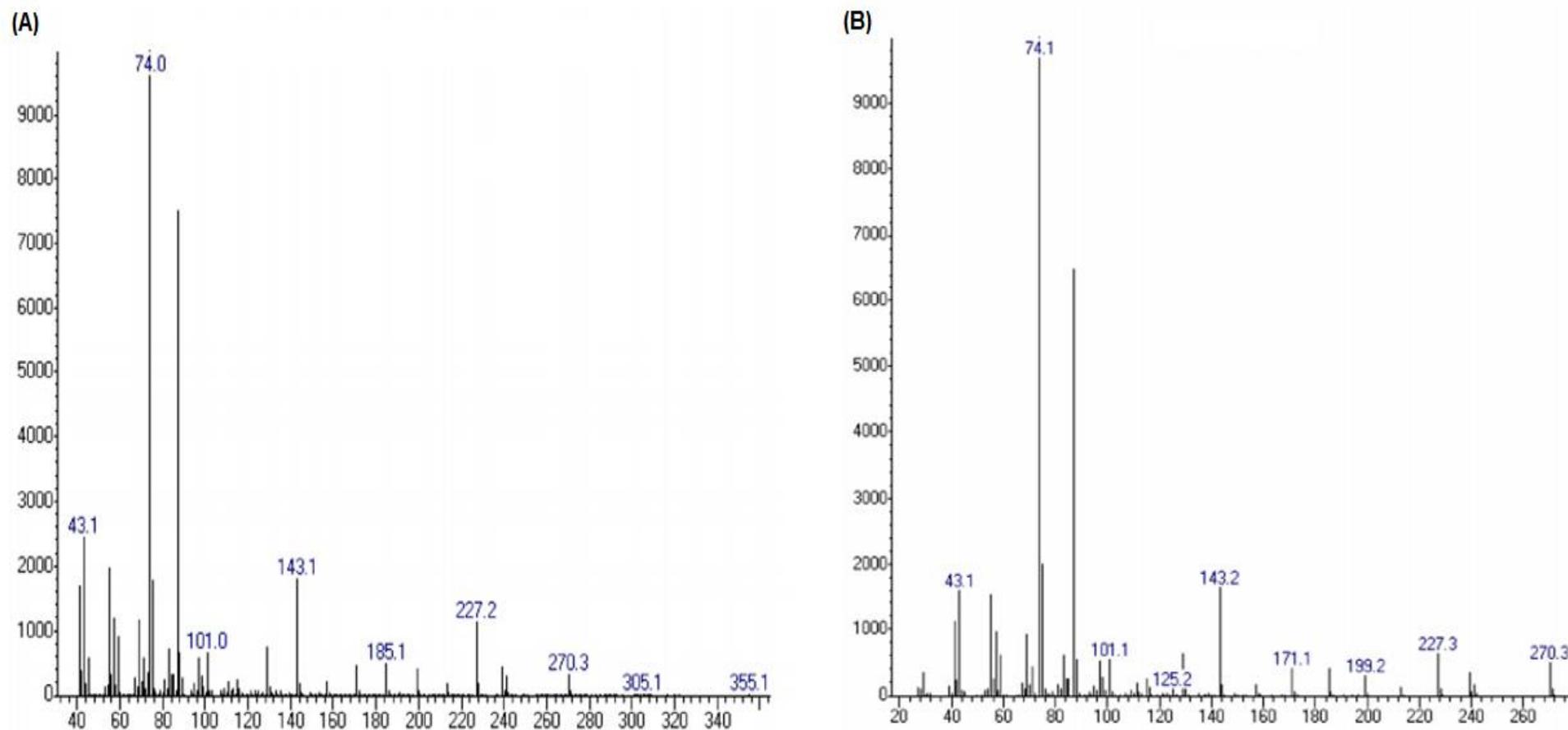


## X. Abstract

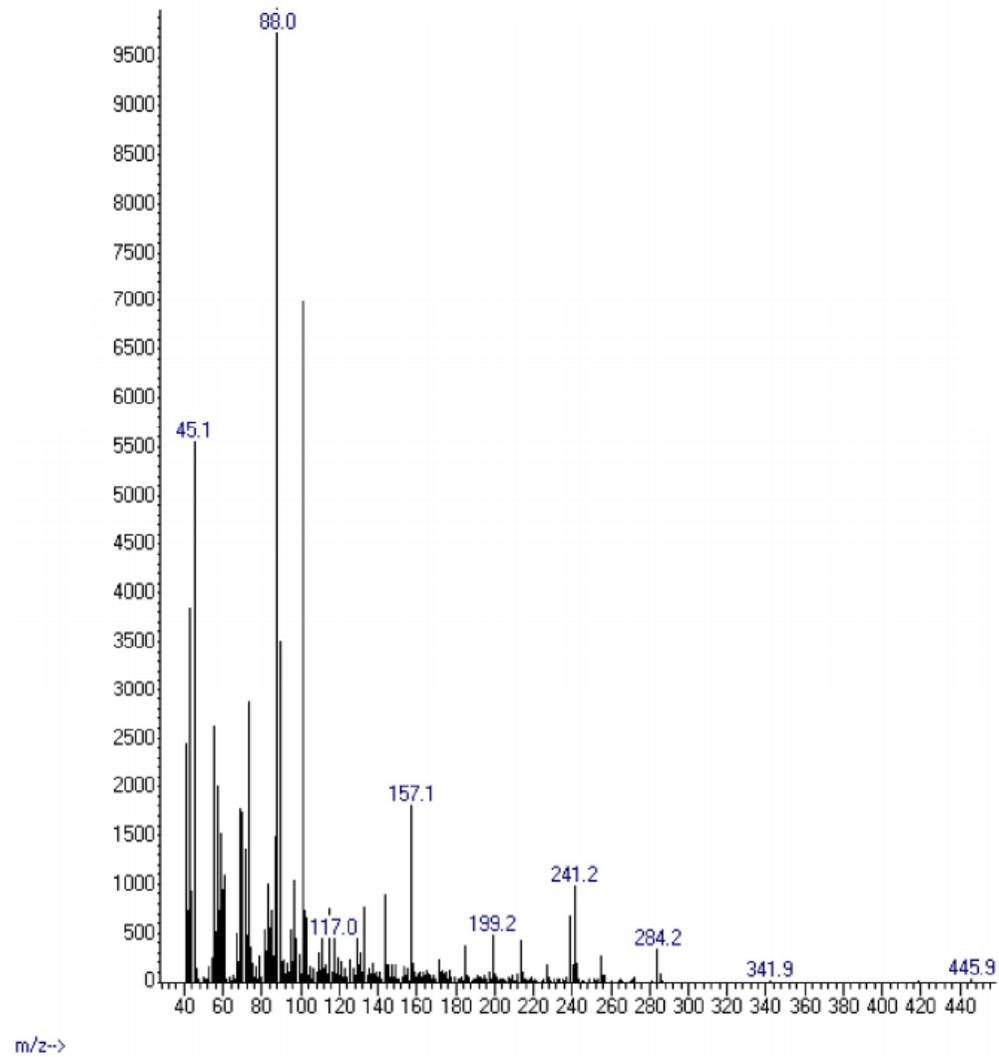
Parasitic plants are those that withdraw necessary resources for its survival from other plants (hosts) through a structure so-called haustorium which enables the parasite to connect to the host's vascular system. Plants can respond to the parasite attack activating some defense mechanisms, including the production of phenolic compounds. Mistletoes are a group of stem parasitic plants belonging to Santalales that can be grouped into holoparasite or hemiparasite mistletoes. Some mistletoes genera are of economic importance among them *Phoradendron*, a hemiparasite mistletoe. This study aimed to determine the contents of tannins, flavonoids, phenylpropanoids, soluble carbohydrates, starch, lipids, the carbon/nitrogen ratio and evaluate how the parasitic relationship affects the metabolism of the involved species. Were collected in Campanha (MG) leaves and branches from six non-parasitized individuals of *Tapirira guianensis*, host plant (LT and BT). From nine parasitized individuals of *T. guianensis* were collected branches and leaves of *Phoradendron crassifolium*, the parasitic plant (BP and LP), non-infested host branches and their leaves (NIHB and NIHB-L) and infested branches and their leaves (IHB and IHB-L). Infested branches of *T. guianensis* were divided into proximal, gall, and distal regions (IHB-P, IHB-G and IHB-D). Main results were an increase in the proanthocyanidin and soluble carbohydrates content in NIHB-L and IHB-L in relation to LT. There was a reduction of soluble carbohydrate, starch, lipids, nitrogen, and phenolic compounds in infested branches, except in the gall region (IHB-G), which showed an increase of flavonoids and starch contents. It was also observed that NIHB appears to accumulate phenolic compounds. Results showed that *P. crassifolium* affects the primary and secondary metabolism of *T. guianensis*, and branches were affected more intense than the leaves. It can be suggested that the parasite withdraws nitrogen and soluble carbohydrates from its host and this could result in possible carbon relocation for growth, development, maintenance, and also defense of branches not yet infested. In addition, it could be suggested the accumulation of phenolic compounds in non-infested branches (NIHB) as a defense mechanism used by the host in order to prevent or even reduce new infestations of an individual already parasitized.



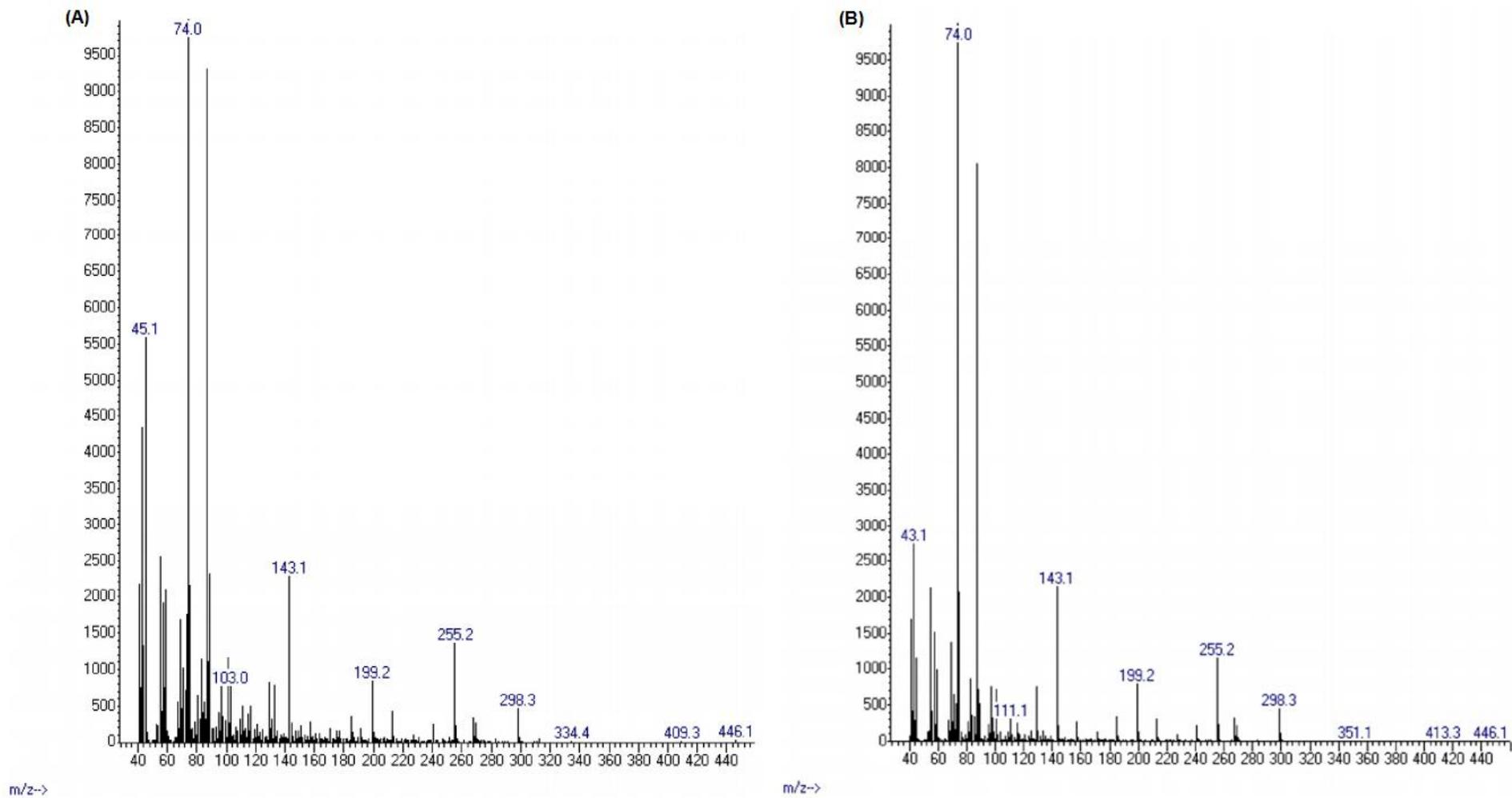
## XI. Anexo I



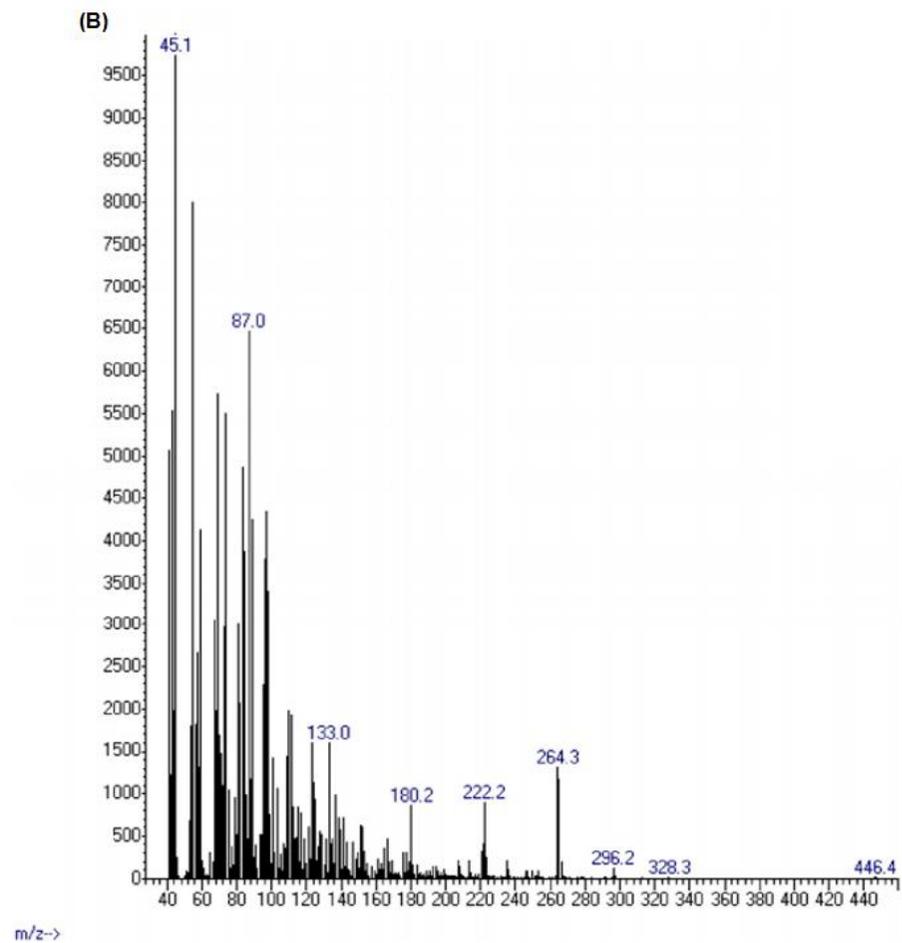
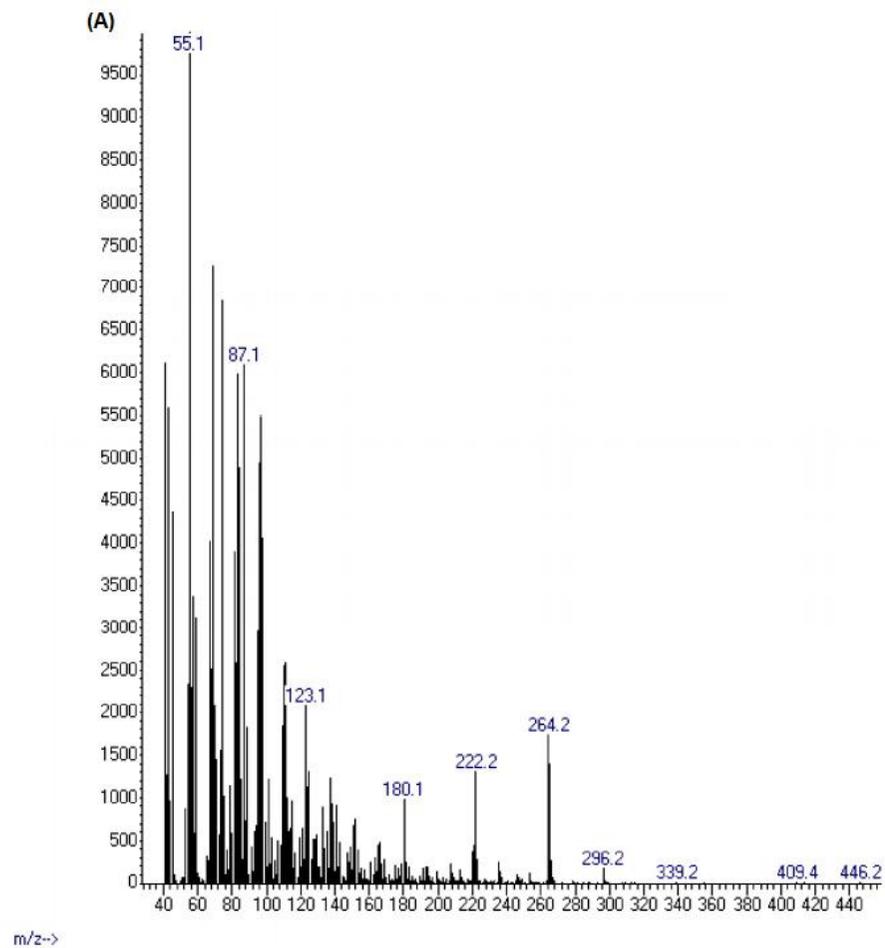
**Figura A1:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 9,8 minutos (A) e espectro de massas do padrão éster metílico do ácido palmítico (B).



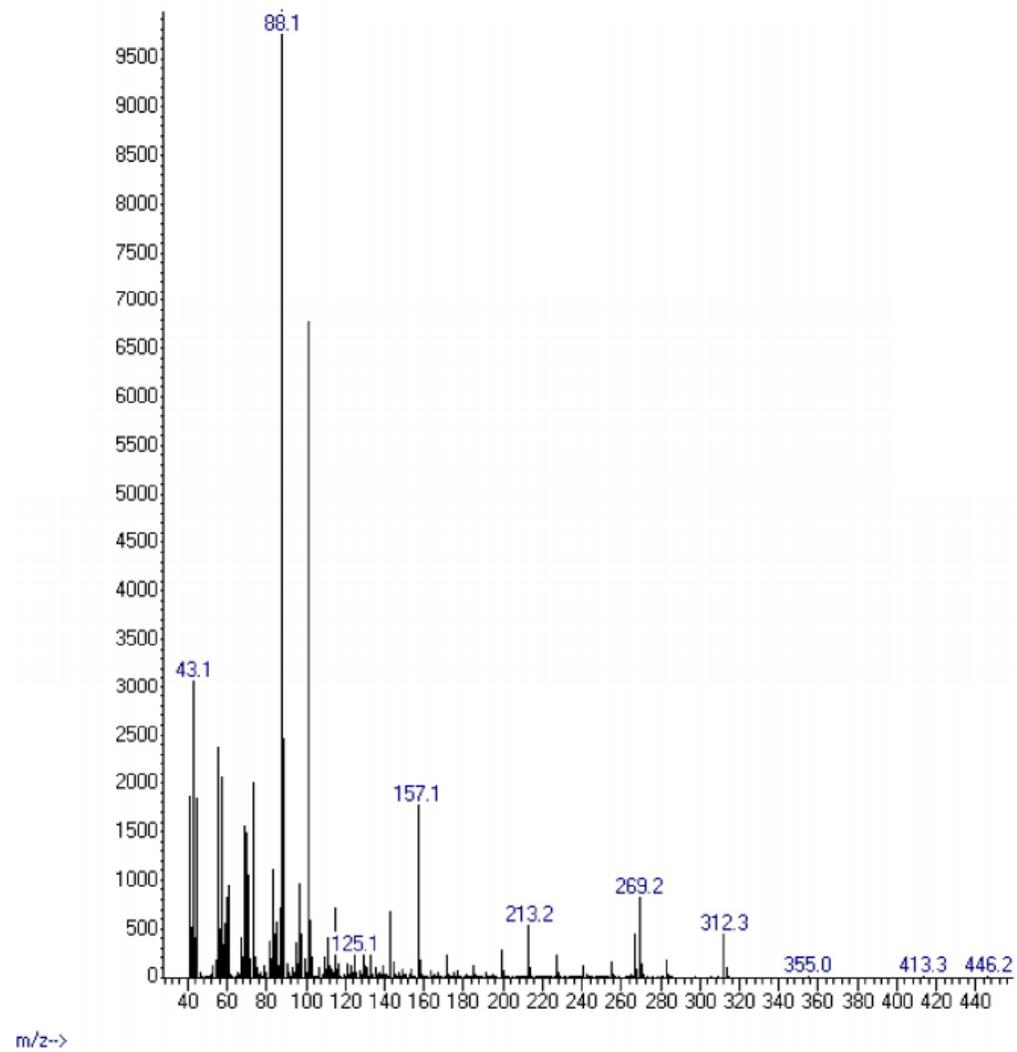
**Figura A2:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 10,1 minutos.



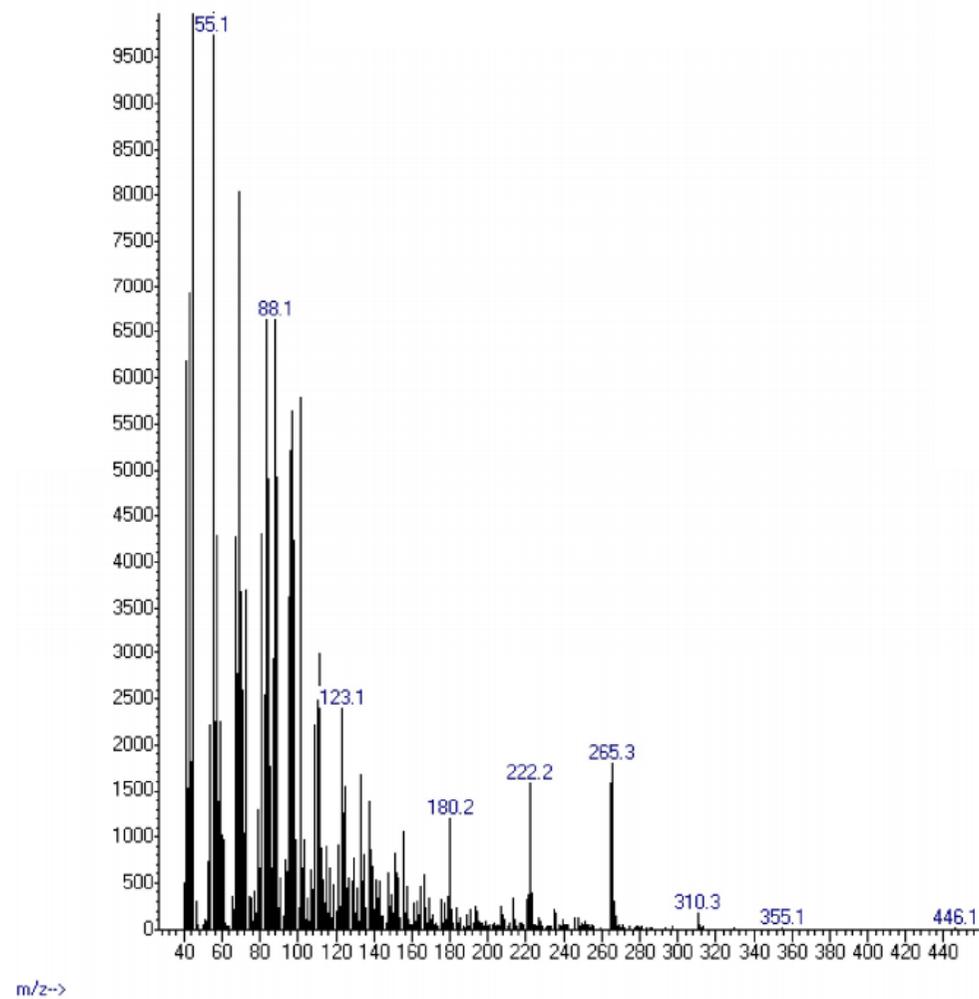
**Figura A3:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 11,5 minutos (A) e espectro de massas do padrão éster metílico do ácido esteárico (B).



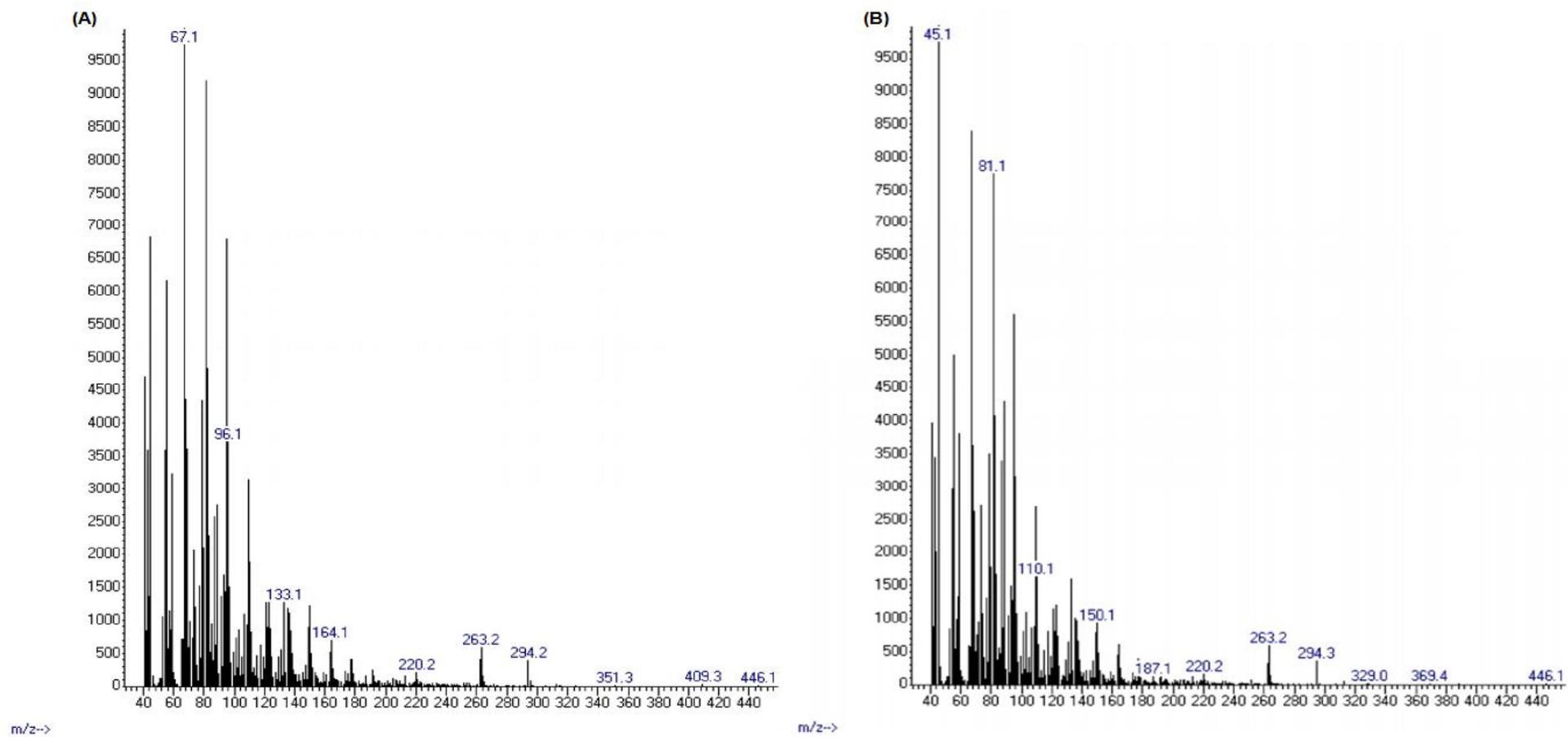
**Figura A4:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 11,7 minutos (A) e espectro de massas do padrão éster metílico do ácido oleico (B).



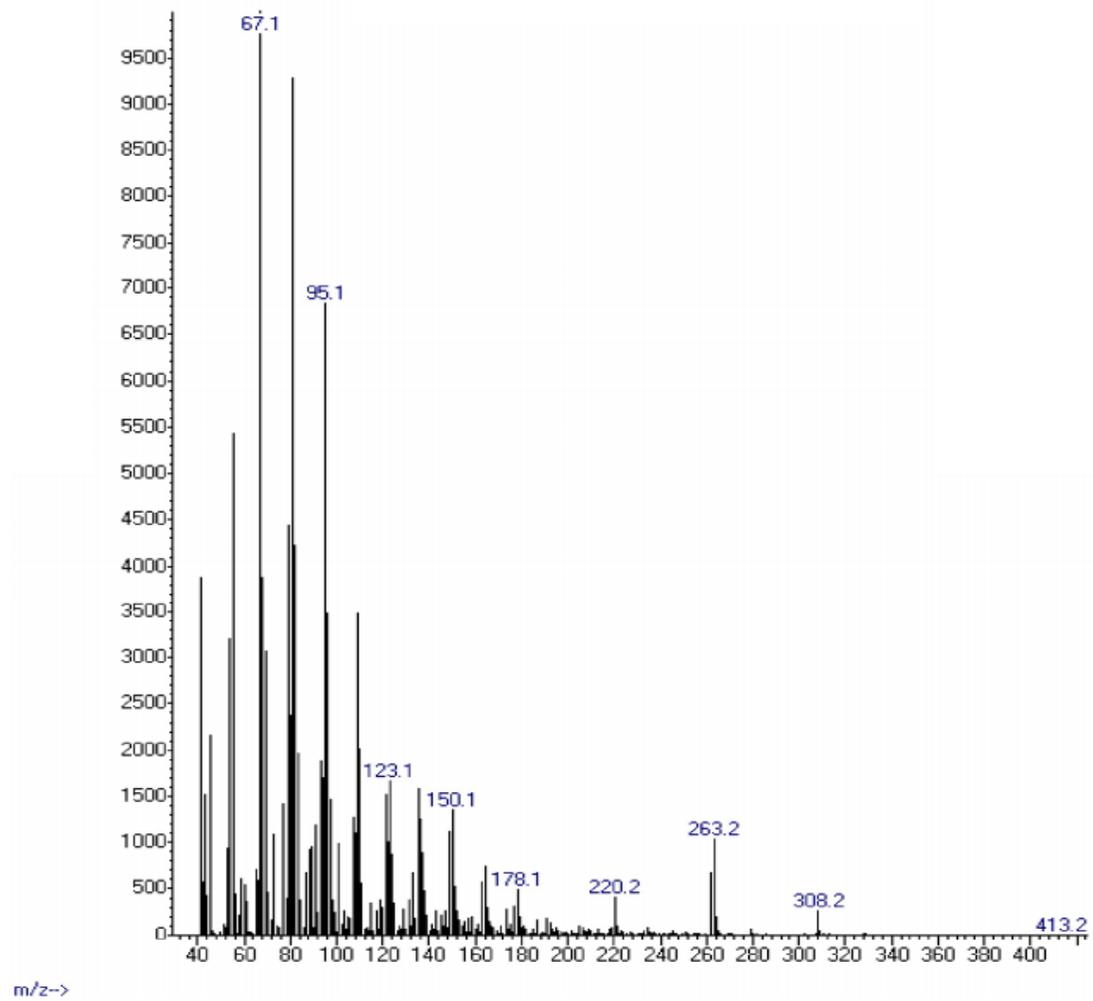
**Figura A5:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 11,8 minutos.



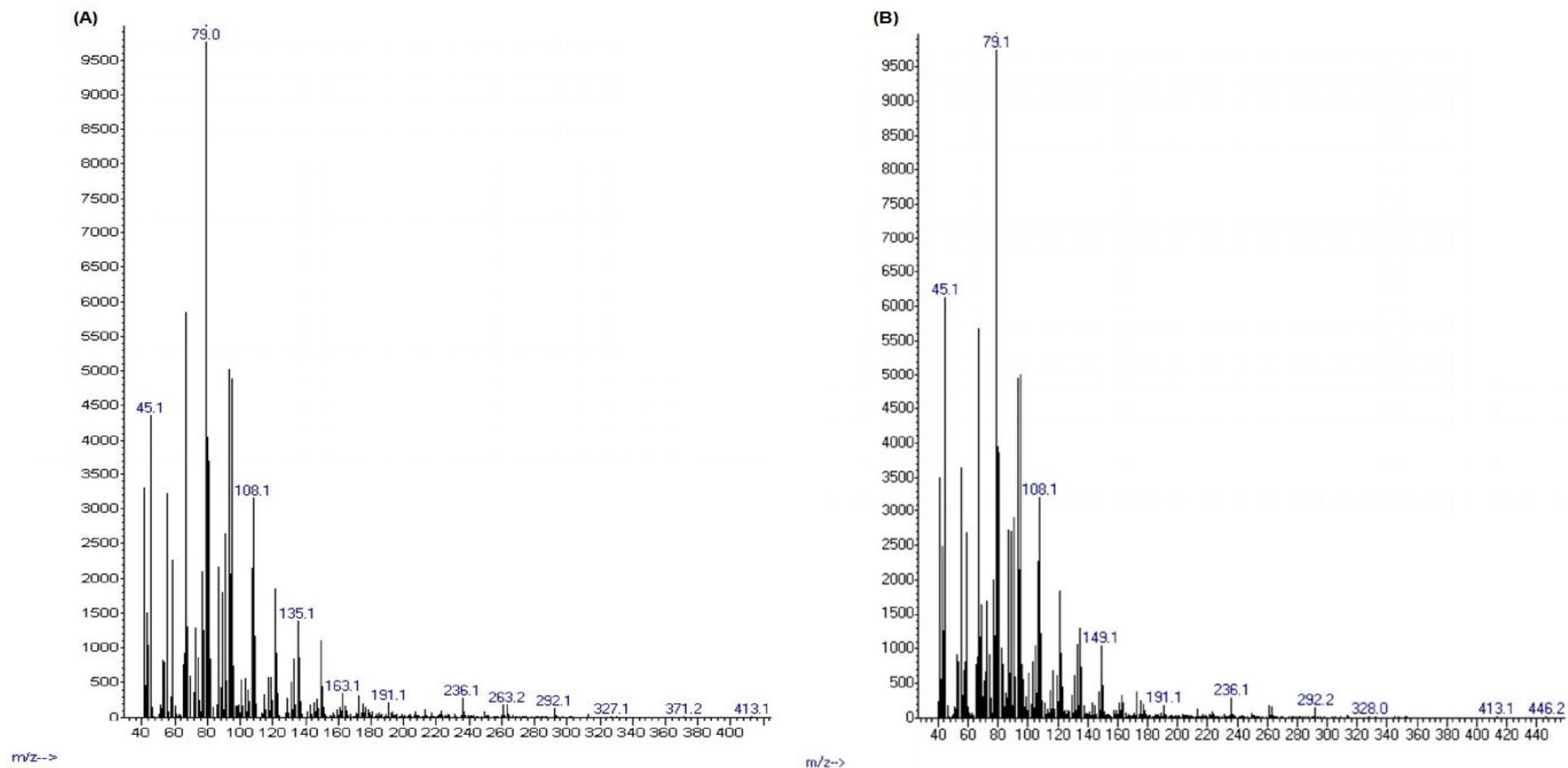
**Figura A6:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 12,0 minutos.



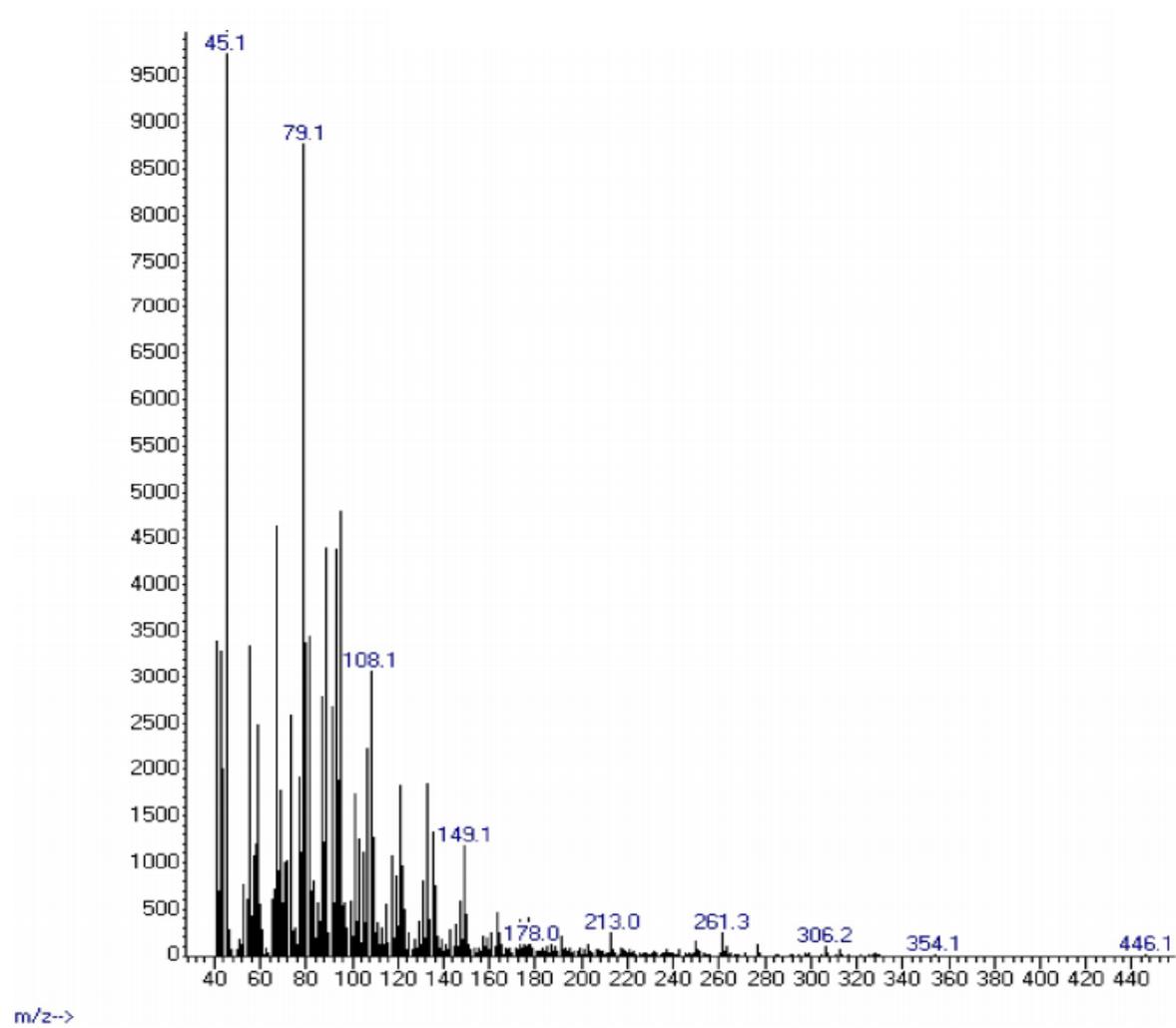
**Figura A7:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 12,1 minutos (A) e espectro de massas do padrão éster metílico do ácido linoleico (B).



**Figura A8:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 12,4 minutos.



**Figura A9:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 12,8 minutos (A) e espectro de massas do padrão éster metílico do ácido linolênico (B).



**Figura A10:** Espectro de massas obtido a partir de CG-EM do constituinte com tempo de retenção de 13,1 minutos.