

**JULIANA DE LANNA PASSOS**

**AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS ISOLADOS DO FUNGO *Corynespora cassicola* (Berk & Curt.) Wei. E ALTERAÇÕES ANATÔMICAS CAUSADAS POR ESSE EM *Lantana camara* L. (VERBENACEAE)**

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para a obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004**

**JULIANA DE LANNA PASSOS**

**AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS ISOLADOS DO FUNGO *Corynespora cassicola* (Berk & Curt.) Wei. E ALTERAÇÕES ANATÔMICAS CAUSADAS POR ESSE EM *Lantana camara* L. (VERBENACEAE)**

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para a obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2004

---

Prof. Robert Weingart Barreto  
**(Conselheiro)**

---

Prof. Rosane M. Aguiar Euclides  
**(Conselheira)**

---

Prof. Eldo A. Monteiro da Silva

---

Prof. Renata Maria Strozi Alves Meira

---

Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa  
**(Orientador)**

“ Se o bom de viver é estar vivo  
Ter amor, ter abrigo  
Ter sonhos, ter motivos,  
Pra cantar...”  
*Herbert Viana*

“ Mas é preciso ter manha,  
É preciso ter graça  
É preciso ter sonho sempre  
Quem traz na pele essa marca  
Possuí a estranha mania de ter fé na vida”  
*Milton Nascimento*

Dedico esta conquista aos meus pais Nilce e Deco ,  
aos meus irmãos Marco Aurélio,  
Eduardo, Leonardo e Luciana e,  
a minha sobrinha Clara.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao Professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pela orientação, pelo apoio e estímulo, por sua amizade e confiança.

Aos meus conselheiros, os professores Robert Weingart Barreto, Rosane Maria Aguiar Euclides e, em especial ao professor Eldo Antônio Monteiro da Silva, pela orientação, pelas sugestões e, incentivo.

Ao professor Blas Lotina-Hensen pelos ensinamentos e simpatia e, a Beatriz King Dias pela realização dos testes biológico.

Ao professor Oliver W. Howarth, da Universidade de Warwick, pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear e ajuda na elucidação do composto isolado.

Ao professor Eduardo E. Borges, do Departamento de Engenharia Florestal – Setor de Dendrologia, por permitir a realização dos testes de germinação e aos funcionários, pela atenção dispensada na realização do trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM) e a Cláudia Vanetti pela possibilidade de trabalho e pela ajuda, respectivamente.

Aos professores Elson S. de Alvarenga pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear e disponibilidade, a professora Vanderlúcia F. de Paula pelas correções e sugestões.

Aos Técnicos Antônio Carlos da Silva, Eduardo Rezende, José Luiz, Márcio Alvarenga e Lúcia Helena e tantos outros pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos Tiago, Maryluze e Marco Antônio minha eterna amizade e gratidão e, aos colegas do LASA pela ajuda e pelos bons momentos.

Aos professores do Departamento de Botânica, pelo apoio, especialmente à professora Renata Maria Strozi Meira, pela disponibilidade e pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal que muito contribuíram para meu aprendizado.

Aos amigos de turma pelas brincadeiras e amizade e, também ao Rogerinho pelo carinho e atenção.

Aos funcionários da Biologia Vegetal por se mostrarem sempre prontos a me auxiliar.

Ao Técnico da Clínica de Doença de Plantas, José Orlando, que me socorreu em muitos momentos e, pela amizade e carinho com que sempre me recebeu.

A todos da Clínica de Doenças de Plantas que sempre se mostraram dispostos a me ajudar e, em especial ao Olinto pela amizade e por toda ajuda prestada.

As grandes amigas que aqui conheci, Renata Lidemman e Andréia Barroncas por todo carinho, atenção e apoio.

A Maria Auxiliadora e Luiz Henrique, que me receberam na minha chegada a Viçosa.

À minha amiga Camila pela paciência, pela presença, pelo carinho e pela amizade e, a Jeanne que a sua maneira também vivenciou e colaborou com esta caminhada.

Ao meu orientador durante toda a graduação e também amigo, Geraldo L. Soares, a quem devo todo o incentivo e compreensão.

Aos meus eternos amigos, Leonardo D. Meireles e Fabiano M. Vieira por estarem sempre presentes na minha vida.

A meus familiares: Nilce e Deco (por me perdoarem a ausência), Marco Aurélio (por me socorrer sempre que precisei), Eduardo e Leonardo (pelo apoio e torcida), Luciana (pela torcida, por me divertir com suas “chatices” e também pela dicas importantíssimas...) e, a Clara (por alegrar a todos nós).

A Deus por ter me dado forças para continuar mesmo diante de todas as dificuldades e sofrimentos.

Aos demais amigos, familiares e, a todos que possibilitaram de alguma forma que este trabalho chegasse ao fim.

Muito Obrigada.

## **BIOGRAFIA**

Juliana de Lanna Passos, filha de José Vieira Passos e Nilce Fonseca de Lanna Passos, nasceu em Belo Horizonte, no Estado de Minas Gerais, em 04 de agosto de 1975.

Em 2002, recebeu o título de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em abril de 2002 iniciou na Universidade Federal de Viçosa, o curso de Mestrado em Botânica, tendo concluído o mesmo em 20 de fevereiro de 2004.

Em fevereiro de 2004 concluiu os requisitos para a obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CPr	Cromatografia preparativa
CE	Extrato etanólico de <i>Corynespora cassiicola</i>
CAE	Extrato em acetato de etila de <i>Corynespora cassiicola</i>
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
COSY	“Correlated Spectroscopy”
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Coherence”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
IV	Infravermelho
	Deformação axial
	s Deformação angular
m/z	Razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica
M.E.V.	Microscopia Eletrônica de Varredura
nOe	“Nuclear Overhauser Effect”
Rf	Fator de retenção em cromatografia em camada delgada
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
	d     duplete

	dd	duplo dupleteo
	<i>J</i>	constante de acoplamento escalar
	m	multipleto
	q	quarteto
	s	simpleto
		deslocamento químico
Tf		Temperatura de fusão
Tr		Tempo de retenção (minutos)

## ÍNDICE

	Pág.
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO 1 - ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR <i>Corynespora cassiicola</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1. Procedimentos gerais.....	8
2.2. Obtenção dos extratos.....	9
2.3. Estudo dos constituintes químicos de <i>Corynespora cassiicola</i> .....	11
2.3.1. Fracionamento do extrato acetato de etila.....	11
2.3.2. Determinação dos constituintes químicos da fração CAE(1):2	14
2.3.3. Determinação dos constituintes químicos da fração CAE(1):3	16
2.3.4. Análise de ácidos graxos e triacilglicerídios, por cromatografia em fase gasosa, presentes nas frações CAE(1):1 e CAE(1):2.....	16
2.3.4.1. Transesterificação de ésteres de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando metóxido de sódio/metanol.....	16
2.3.4.2. Esterificação de ácidos graxos utilizando BF <sub>3</sub> /metanol.....	17

2.4.	Bioensaios.....	18
2.4.1.	Inibição do desenvolvimento radicular de alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) em placa de Petri.....	18
2.4.2.	Bioensaio para determinação do potencial herbicida do extrato CAE e CE, utilizando-se as espécies <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Amaranthus hypochondriacus</i> , <i>Physalis ixocarpa</i> e <i>Trifolium alexandrinum</i> .....	19
2.4.3.	Avaliação da síntese de ATP.....	20
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1.	Obtenção dos extratos com acetato de etila (CAE) e etanol (CE) e avaliação da atividade fitotóxica dos mesmos.....	22
3.2.	Identificação dos constituintes químicos presentes nas frações CAE(1):1 e CAE(1):2.....	22
3.3.	Fracionamento por cromatografia em coluna de CAE(1):2 e CAE(1):3.....	32
3.3.1.	Isolamento e identificação do composto CAE(5):1 da fração CAE(1):2.....	32
3.3.2.	Estudo da fração CAE(1):3.....	41
3.4.	Bioensaios.....	44
3.4.1.	Teste de inibição do desenvolvimento radicular de alface.....	44
3.4.2.	Avaliação da inibição da síntese de ATP pelos extratos CAE e CE.....	45
3.4.3.	Potencial herbicida do extrato CAE e CE.....	46
3.4.4.	Inibição do desenvolvimento radicular de alface das frações obtidas do extrato CAE.....	51
3.4.5.	Avaliação da inibição da síntese de ATP pelas frações do extrato CAE.....	52
3.4.6.	Avaliação da inibição da síntese de ATP pelo composto ergostatetra4,6,8(14),22-en-3-ona.....	53
3.4.7.	Avaliação da inibição da síntese de ATP pelas frações CAE(8):1-19, CAE(8):20-21 e CAE(8):22-31.....	54
4.	CONCLUSÕES.....	56
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

CAPÍTULO 2 – ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM *Lantana camara* L.  
(VERBENACEAE) CAUSADAS POR *Corynespora*  
*cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. f. sp *lantanae*

1.	INTRODUÇÃO.....	61
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1.	Obtenção da suspensão com conídios, suspensão sem conídios e emulsão.....	64
2.2.	Alterações foliares.....	65
3.	RESULTADOS.....	68
3.1.	Considerações gerais.....	68
3.2.	Anatomia da folha de <i>L. camara</i> .....	68
3.3.	Observação ultra-estrutural (MEV) da interação fungo-planta.....	69
3.4.	Estudo dos sítios de penetração e infecção dos tecidos (por meio de técnica de clarificação) .....	73
3.5.	Penetração e colonização do fungo sob microscopia fotônica.....	75
3.6.	Testes histoquímicos .....	76
4.	DISCUSSÕES.....	81
5.	CONCLUSÕES.....	86
6.	CONCLUSÕES GERAIS.....	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

## RESUMO

PASSOS, Juliana de Lanna, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004.

**Avaliação da fitotoxicidade dos compostos isolados do fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. e alterações anatômicas causadas por esse em *Lantana camara* L. (VERBENACEAE)** Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Conselheiros: Rosane M. Aguiar Euclides e Robert Weingart Barreto.

*Lantana camara* L. é conhecida mundialmente como uma planta daninha extremamente agressiva. Originária da América tropical e subtropical, sua dispersão pelo mundo é devido, principalmente, a sua utilização como planta ornamental. A distribuição pantropical desta invasora e sua reconhecida nocividade estimularam a busca por inimigos naturais no seu centro de origem. Estudos da micobiota associada a *L. camara* L. revelaram a presença de *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae* como um patógeno severo desta planta, o qual é capaz de provocar desfolhas e debilitação das plantas atacadas. Estudos anteriores indicaram a presença de uma fitotoxina envolvida na patogenicidade do fungo. Com o objetivo de isolar, identificar e testar a atividade fitotóxica de compostos produzidos pelo fungo foram feitos estudos fitoquímicos dos extratos obtidos a partir de grãos de arroz colonizados pelo fungo. A interação hospedeiro-patógeno foi investigada por observações feitas com microscopia de luz e eletrônica de varredura. Os testes biológicos dos extratos do fungo *C. cassiicola* isolado do tomateiro, revelaram fitotoxidez que foi atribuída à presença de ácidos graxos e do esteróide isolado, ergostatetra<sub>4,6,8(14),22-en-3-ona</sub>, nas frações estudadas. Os extratos, ao serem submetidos a ensaios biológicos, apresentaram atividades fitotóxicas em teste preliminares de inibição do

desenvolvimento radicular de alface; germinação, crescimento de parte aérea e crescimento de raízes de espécies de plantas daninhas e plantas cultivadas; e sobre a síntese de ATP. O extrato CE também mostrou conter substâncias tóxicas, em teste de inibição do desenvolvimento radicular de alface e síntese de ATP. Este estudo foi uma investigação para o entendimento da interação *C. cassicola/L. camara* L. Não foram observadas alterações estruturais, após a aplicação do filtrado sem conídios e da emulsão preparada a partir do extrato CAE. O surgimento de necrose foi verificado, após 24 horas da inoculação, com a suspensão de conídios e a via de penetração preferencial do fungo é intercelular. Outros sítios de penetração do fungo observados foram: pelo complexo estomático, entre a lateral da célula-guarda e a célula epidérmica subsidiária, através do complexo epidérmico, o qual inclui a penetração através do tricoma (glandular ou tector). A planta demonstrou reação de hipersensibilidade ao patógeno através de espessamento das paredes da epiderme, granulação do citoplasma e formação de um tecido de cicatrização. A epiderme da face abaxial e o parênquima lacunoso foram os tecidos mais afetados. As células dos tecidos onde se observou a presença de hifas sofreram desorganização, algumas apresentaram hiperplasia, outras se tornaram amorfas e plasmolizadas. Observou-se a formação de almofadas apressoriais. Os testes histoquímicos para lipídeos, proteínas e compostos fenólicos não revelaram diferenças entre fragmentos foliares referentes ao controle e ao tratamento.

## ABSTRACT

PASSOS, Juliana de Lanna, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2004.

**Evaluation of the phytotoxicity of the isolated compounds of the fungus *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei and the anatomical alterations caused in *Lantana camara* L. (VERBENACEAE)** Adviser: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Committee Members: Rosane M. Aguiar Euclides and Robert Weingart Barreto.

*Lantana camara* L. is known worldwide as an extremely aggressive weed. Originated from tropical and subtropical America, its global dispersion is mainly due to its use as an ornamental plant. Its pantropical distribution and recognized harmfulness have stimulated the search for natural enemies in its center of origin. Studies on the microbiota associated to *L. camara* L. have revealed the presence of *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae* as a severe pathogen of this plant, capable of causing severe defoliation and weakening of the attacked plants. Previous studies indicated the presence of a phytotoxin involved in the pathogenicity of the fungus. Aiming to isolate, identify and test the phytotoxic activity of compounds produced by the fungus, phytochemical studies were carried out of the extracts obtained from rice grains colonized by the fungus. The host-pathogen interaction was investigated through observations made under light and scanning electronic microscopy. The biological tests of the extracts of the fungus *C. cassiicola* isolated from tomato revealed phytotoxicity which was attributed to the presence of fatty acids and the isolated steroid, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona in the fractions studied. When submitted to biological assays, the extracts presented phytotoxic activities in preliminary tests on lettuce root development inhibition; germination, aerial part

growth and root growth of weeds and cultivated plant species as well as on ATP synthesis. The CE extract was also found to contain toxic substances that inhibited lettuce root development and ATP synthesis. This study aimed to investigate and understand *C. cassicola/L. camara* L. interaction. No structural alterations were observed after application of the filtrate without conidia and the emulsion prepared from the extract CAE. Necrosis was verified after 24 hours of inoculation, following the suspension of conidia, with the preferable penetration channel of the fungus being intercellular. Other sites where fungus penetration occurred were: the stomata complex, between the guard cell lateral and the subsidiary epidermis cell, the epidermis complex, which includes penetration through the trichome (glandular or non-glandular). The plant showed a hypersensitivity reaction to the pathogen through thickening of the epidermis walls, cytoplasm granulation and formation of a cicatrization tissue. The abaxial face epidermis and the lacunary parenthema were the most affected tissues. The tissue cells where the presence of hyphae was observed underwent disorganization, with some presenting hiperplasia and others becoming amorphous and plasmolysed. The formation of appressorial pads was also observed. The histochemical tests for lipids, proteins, and phenolic compounds did not reveal differences among the foliar fragments related to the control and treatment.

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas daninhas são responsáveis pela redução entre 30 a 40% da produção agrícola em regiões tropicais, interferem na pecuária, na eficiência produtiva dos sistemas agrícolas, podendo também afetar, direta ou indiretamente, a saúde humana e de animais domésticos (LORENZI, 1991). O controle químico de plantas daninhas, introduzido na década de 40, tem sido um campo dinâmico de pesquisas que requer constantes inovações. Devido à necessidade de mais ferramentas para o seu controle, com comportamento ambiental apropriado, que possam reduzir os danos para humanos e o meio ambiente, e capaz de superar a resistência de algumas plantas daninhas a herbicidas, novos programas de síntese química têm surgido, levando a obtenção de inúmeros compostos (DUKE *et al.*, 2000).

Microorganismos, como os fungos, têm se mostrando uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas (DUKE *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1997; PILLMOOR, 1998). Embora alguns herbicidas biológicos microbianos (bioherbicidas) tenham sido desenvolvidos (GREAVES, 1996), os produtos fitotóxicos isolados de microrganismos possuem muitas vantagens sobre o uso de organismos vivos, tais como, a logística de estocagem, a aplicação, a formulação e o tempo de meia-vida. Com vistas a esses fatores, as fitotoxinas de origem microbianas têm sido muito utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos herbicidas (GREAVES, 1996). O uso potencial de fitotoxinas naturais tem revelado novas ferramentas para o manejo de plantas daninhas devido à elucidação de seus mecanismos de ação. Os produtos naturais tendem a ter modos de ação diferentes dos herbicidas sintéticos. Estudando respostas das plantas para um composto pode-se obter importantes

informações para processos fisiológicos afetados por um composto é possível descobrir novos mecanismos de ação (DAYAN, 2000).

A planta daninha conhecida como lantana, *Lantana camara* L. (Verbenaceae), infesta milhões de hectares de pastagens e terras produtivas em 47 países (HOLM *et al.*, 1977). *L. camara* L. é uma planta daninha nativa do Continente Americano, bastante freqüente no Brasil (LORENZI, 1991). Existem muitas doenças nessa planta daninha causada por fungos (BARRETO *et al.*, 1995). Em Estância Betânia e Guaraguaçu, no estado do Paraná, foram observadas lesões foliares em indivíduos de *L. camara*, provocando a desfolha da planta infectada. Esse foi o primeiro relato para o Brasil da presença de *Corynespora cassiicola*, um fungo mitospórico, agente causal da mancha alvo (Target Spot) atacando lantana (PEREIRA & BARRETO, 2000).

*Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. causa manchas foliares em mais de 70 espécies no mundo (SILVA *et al.*, 1998). Embora vários autores considerem *C. cassiicola* como um patógeno “inespecífico”, a existência de especialização fisiológica foi reconhecida (SPENCER & WALTER, 1969). Alguns autores, segundo ONESIROSAN *et al.* (1975), relataram a presença de uma toxina secretada pelo micélio de *C. cassiicola*. Assim, abre-se uma perspectiva para a investigação, com a possibilidade de isolamento e identificação de constituintes químicos para uso como herbicida específico.

A anatomia dos órgãos vegetais da família Verbenaceae já se encontra descrita na literatura (METCALFE & CHALK, 1957; SOLEREDER, 1908) e, sendo a espécie *L. camara* L. o alvo desta pesquisa, sua anatomia foliar será, agora, explorada segundo a perspectiva da interação hospedeiro-patógeno. Os estudos anatômicos relacionados à patogênese são de importância fundamental para o entendimento dos mecanismos de resistência em diversos patossistemas (JERBA, 2003).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, R. W., EVANS, H.C., ELLISON, C. A. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. **Mycological Research**, v. 99, n. 7, p. 769-782, 1995.
- DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigation the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, nº 9, p. 2079-2094, 2000.
- DUKE, O. S.; ABBAS, H. K.; AMAGASA, T.; TANAKA, T. Phytotoxins Of Microbial Origin With Potential For Use As Herbicides. In: COPPING, L. G. (Ed.). **Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996, p.82-113.
- DUKE, O. S.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. **Crop Protection**, v. 19, p. 583-589, 2000.
- GREAVES, M. P. Microbial herbicides: factors in development. In: COPPING, L. G. (Ed.). **Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996, p.444-467.
- HOLM, L. G.; PLUCKNETT, D. L.; PANCHO, J. V.; HERBERGER, J. P. **The World's Worst Weeds**. University of Hawaii Press, Honolulu, 1977, 609 p.
- JERBA, V. F. **Anatomia e ultra-estrutura foliar de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e sua relação com a resistência à antracnose**. 2003. 108 p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- KIMURA, Y.; MISUNO, T.; SHIMADA, A. Penedione and penihidrone, new plantgrowth regulators produced by the fungus *Penicillium sp.* **Tetrahedron**, v.38, nº 3, p.469-472, 1997.

- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2ªed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 1991, 440 p.
- METCALFE, C. R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons.** Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1957, p.1030-1041.
- ONERISORAN, P. T.; MABUNI, C. T.; DURBIN, R. D.; MORIN, R. B.; RICH, D. H.; ARNY, D. C. Toxin production by *Corynespora cassiicola*. **Physiology Plant Pathology**, v.5, p. 289-295, 1975.
- PEREIRA, J.M.; BARRETO, R.W. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. **Mycopathology**, v. 151, p. 71-80, 2000.
- PILLMOOR, J. B. Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. **Pesticide Science**. v.52, p.75-80, 1998.
- SPENCER, J. A.& WALTER, H. J. Variations in certain isolates de *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v.59, p.58-60, 1969.
- SILVA, W.P.K.; DEVERALL, B.J.; LYON, B.R. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantation in Sri Lanka. **Plant Pathology**, v.47, p.267-277, 1998.
- SOLEREDER, S. **Systematic anatomy of the dicotyledons.** Oxford: Oxford Press, v.2, 1908,1182 p.

## CAPÍTULO 1

### ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Corynespora cassicola*

#### 1. INTRODUÇÃO

As plantas superiores continuam tendo importância crescente como fontes de novos agroquímicos em potencial, particularmente, de novos inseticidas (ARNASON *et al.*, 1989). Da mesma forma, microrganismos, como fungos e bactérias, têm sido amplamente estudados à procura de novas moléculas que possam ser utilizadas no controle de pragas agrícolas ou como modelo para a síntese de novos compostos ativos. Estima-se que, anualmente, aproximadamente 100 patentes são submetidas, envolvendo a descoberta de produtos naturais com potencial uso na agricultura, horticultura ou silvicultura (PILLMOOR *et al.*, 1993).

Apesar de um grande número de produtos naturais, com comprovada atividade fitotóxica, terem sido isolados de plantas superiores (DAKSHINI & EINHELLIG, 1995), poucos herbicidas comerciais foram derivados destas fontes. Um exemplo, é o caso da cinmetilina, herbicida seletivo para o controle de gramíneas em plantações de arroz, aplicado a uma taxa de apenas 25-100 g/ha. Esse composto é análogo ao monoterpeneo 1,8-cineol, composto natural altamente fitotóxico. Uma mistura de mais de 200 compostos, obtida pela policloração do monoterpeneo canfeno, também foi comercializada, durante muito tempo, como inseticida e herbicida.

A artemisinina, outro terpeno com comprovada atividade antimalarial, isolada da planta de *Artemisia annua* L., também teve sua atividade fitotóxica avaliada. Apresenta atividade herbicida equivalente a cinmetilina, mas devido à complexidade de sua estrutura, não foi desenvolvida comercialmente (DUKE *et al.*, 1987).

Microrganismos, como os fungos, têm se mostrado uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas (DUKE *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1997; PILLMOOR, 1998). Embora alguns herbicidas biológicos microbianos (bioerbicidas) tenham sido desenvolvidos (GREAVES, 1996), os produtos fitotóxicos isolados de microorganismos possuem muitas vantagens sobre os agentes de biocontrole vivos. Geralmente, a logística de estocagem, a aplicação, a formulação e o tempo de meia-vida favorecem as toxinas quando comparados aos microorganismos vivos. Além disso, a possibilidade de disseminação de alguma doença para espécies não-alvo, não existe no caso das toxinas. Os fatores ambientais apresentam maior influência sobre a eficácia de um produto envolvendo microorganismos vivos do que sobre toxinas isoladas. Com vistas a esses fatores, as fitotoxinas de origem microbianas têm sido muito utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos herbicidas.

A anisomucina, um composto isolado de *Streptomyces spp.*, foi o primeiro produto natural de origem microbiana que resultou em um herbicida comercial. Apesar desse composto ser muito fitotóxico para diversas plantas daninhas, e não tóxico para várias culturas, não chegou a ser comercializado. Entretanto, alterações sintéticas da anisomucina resultaram no herbicida NK-049 (3,3'-dimetil-4-metoxibenzofenona), que é um herbicida amplamente utilizado em plantações de arroz (STONARD & MILLER-WIDEMAN, 1995).

O primeiro produto de origem microbiana introduzido no mercado foi o bialaphos. É um herbicida não seletivo que mata tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, sendo aplicado em doses relativamente baixas (0,84-1,68 kg/ha). Os peptídeos, também de ocorrência natural, possuem atividade herbicida. Baseado nas estruturas dessas fitotoxinas naturais, a Indústria Hoechst AG desenvolveu o herbicida sintético, comercializado com o nome de glufosinato. Esse herbicida é um potente inibidor da enzima glutamina sintase (GS), responsável pela assimilação de amônia. A inibição dessa enzima resulta em acumulação de amônia no solo, causando toxicidade para as plantas.

Recentemente, PEREIRA & BARRETO (2000) relataram a ocorrência do fungo *C. cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. atacando a planta daninha *Lantana camara* L. Esse foi o primeiro relato da presença de *C. cassiicola*, um fungo mitospórico, agente causal da mancha alvo (Target Spot), nessa planta no Brasil. *C. cassiicola*, segundo SILVA *et al.* (1998), apresenta uma grande gama de hospedeiros, tendo sido relatada a ocorrência de manchas foliares causadas por este fungo em mais de 70 espécies de plantas. *C. cassiicola* tem sido relatado em um grande número de culturas economicamente importantes em países tropicais e subtropicais (BRETON *et al.*, 2000), entre as quais pode se citar o caupi, mamoeiro, cacauero, seringueira, juta, além de plantas nativas onde causa manchas foliares, em plantas adultas e em mudas mantidas em viveiro (DUARTE *et al.*, 1983). Durante a última década, o patógeno tem causado extensos danos a plantações de borracha e tornou-se um fator limitante à sua produção na Ásia. No Brasil, *C. cassiicola* foi também isolado de *Hydrangea macrophylla* (Thunb) Ser., *Commelina benghalensis* L., *Lycopersicon esculentum* Mill e *Glycine max* (L.) Merr. (PEREIRA *et al.*, 2003). Embora vários autores tratem esse fungo como um patógeno “inespecífico”, a existência de especialização fisiológica foi reconhecida (SPENCER & WALTER, 1969).

Alguns autores, segundo ONESIROSAN *et al.* (1975), relataram a presença de uma fitotoxina secretada pelo micélio de *C. cassiicola*. Essa toxina secretada pelo fungo pode ser conduzida célula a célula, quando se inocula o filtrado derivado de conídios, e causar os mesmos sintomas de necrose foliar, que a inoculação direta dos conídios provoca. A produção de toxina em filtrados da cultura do fungo foi confirmada (BRETON *et al.*, 2000; PEREIRA, *et al.*, 2003). Segundo BRETON *et al.* (2000), a toxina denominada cassicolin reproduz sintomas da doença foliar similares às observadas, após inoculação com o fungo. A morte de células distantes das hifas durante início da necrose demonstra provavelmente a presença e difusão de uma toxina produzida por *C. cassiicola*. Esta toxina mostrou um papel chave no estabelecimento inicial do fungo. Assim, abriu-se uma perspectiva para a investigação, com a possibilidade de isolamento e caracterização da substância ativa para uso como herbicida específico. Assim, um dos objetivos que estimularam a realização deste trabalho foi à possibilidade de se isolar e identificar constituintes químicos do fungo *Corynespora cassiicola* e determinar a atividade fitotóxica dos mesmos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Procedimentos gerais

Todos os fracionamentos e isolamentos foram realizados no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), no Departamento de Química da UFV. Para as separações cromatográficas, em coluna, utilizou-se sílica gel de 70-270 mesh como fase suporte. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica gel 60 com indicador F<sub>254</sub>. As placas foram preparadas no próprio laboratório, com 2,5 mm de espessura, utilizando-se uma mistura de 2:1 de sílica/água.

As placas de CCD foram reveladas sob radiação ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm e  $\lambda = 365$  nm), e com solução de ácido fosfomolibdico (12 g de 2 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.20 MoO<sub>3</sub>.48 H<sub>2</sub>O / 250 mL de etanol).

Todas as frações foram concentradas à pressão reduzida em evaporador rotatório.

Os espectros no Infravermelho (IV) foram registrados em espectrômetro Perkin Elmer FTIR 1000, no Departamento de Química (UFV), na região de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Para as amostras sólidas foram utilizadas pastilhas de KBr e as oleosas foram analisadas como filmes em placas de NaCl.

Os cromatogramas em fase gasosa foram obtidos injetando-se 1 L da amostra em Cromatógrafo a Gás Shimadzu GC 17-A, equipado com detector de ionização de chama (FID), ou em um equipamento CG/EM Shimadzu CGEM QP5050A.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de carbono 13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em aparelho Varian Mercury 300 (300 MHz), do Departamento de Química da UFV, utilizando-se  $\text{CDCl}_3$  como solvente.

As análises de síntese de ATP, transporte de elétrons e de determinação do potencial herbicida foram realizadas no Departamento de Bioquímica da Universidade Autônoma do México (UNAM), uma vez que a UFV conta com um convênio de cooperação firmado com esta instituição.

## **2.2. Obtenção dos extratos**

O isolado do fungo *C. cassiicola* utilizado neste trabalho foi originalmente obtido de plantas de tomateiro doentes e encontra-se depositado na Coleção de Culturas Fúngicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (JMP 217), e está acondicionado em vidros, contendo sílica gel, em geladeira.

Os fungos foram cultivados em meio de cultura de vegetais-ágar (CVA) à temperatura de aproximadamente 25 °C (PEREIRA, 2001- Figura 1). Após seu desenvolvimento, discos da cultura do fungo foram retirados das placas e semeados em sacos plásticos, contendo grãos de arroz comum, tipo B, esterilizados. Os grãos de arroz foram preparados da seguinte forma: 350 gramas de arroz foram colocados em cada saco de polipropileno, sendo os mesmos, em seguida, umedecidos com 150 mL de água destilada e autoclavados a 120 °C por 20 min. Após esfriar, os sacos foram mantidos, por 10 minutos, em câmara de fluxo laminar sob luz UV germicida para garantir a esterilização externa destes. Em seguida, cada saco foi semeado com cinco discos da cultura do fungo de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. O semeio também foi realizado na câmara de fluxo laminar, onde os sacos foram deixados para evitar-se uma possível contaminação. Os sacos foram fechados com argolas de PVC, que foram introduzidas em sua extremidade como um anel, para que se pudessem

virar as bordas dos sacos e possibilitar a introdução do chumaço de algodão. Em seguida, forrou-se com jornal o chumaço de algodão, prendendo-o com gomas de borracha. Assim, os sacos foram levados para câmara com temperatura controlada a  $25 \pm 3 \text{ }^\circ \text{C}$ , onde foram mantidos por, aproximadamente, 15 dias, até que a colonização do arroz fosse efetuada. O conteúdo dos sacos foi periodicamente revolvido pela pressão dos dedos.

Inicialmente, uma amostra de 7,5 Kg do meio sólido colonizado com o fungo foi submetida à extração, em aparelho Soxhlet, com acetato de etila seguido de etanol. Os extratos obtidos, denominados CAE e CE, respectivamente, foram concentrados sob pressão reduzida, em evaporador rotativo. Cada um dos extratos foi submetido a testes para a avaliação da atividade fitotóxica sobre plantas.



Figura 1 - *Corynespora cassicola* cultivado em meio CVA em placa de Petri, após 7 dias.

## 2.3. Estudo dos constituintes químicos de *Corynespora cassicola*

### 2.3.1. Fracionamento do extrato acetato de etila

O extrato preparado com acetato de etila, CAE, foi submetido ao fracionamento em uma coluna filtrante (funil de vidro sinterizado e kitazato - Figura 2). Utilizou-se 400 g de sílica e um volume total de 9 L de solvente. Obteve-se desta filtração seis frações, que foram agrupadas de acordo com o solvente utilizado: hexano (2 L), fração CAE(1):1; diclorometano (3 L), fração CAE(1):2; hexano:acetato (1:1) (1 L), fração CAE(1):3; acetato de etila (1 L), fração CAE(1):4; acetato de etila:metanol (1:1)(1 L), fração CAE(1):5; metanol (1 L), fração CAE(1):6 (Figura 3A). Todo o fracionamento subsequente (Figura 3A, 3B e 3C) foi acompanhado de análise das frações por espectroscopia no infravermelho (IV) e por cromatografia em camada delgada (CCD) a fim de direcionar o estudo para as frações mais propensas ao isolamento e identificação de algum constituinte fitotóxico.

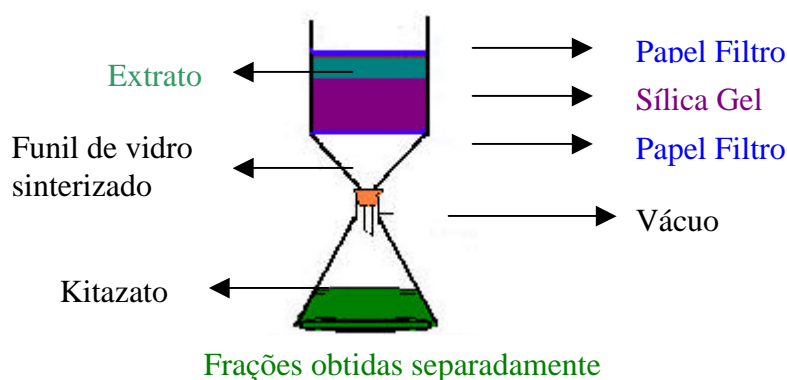


Figura 2. Esquema da coluna filtrante utilizada para o fracionamento do extrato acetato de etila do fungo, *C. cassicola*.

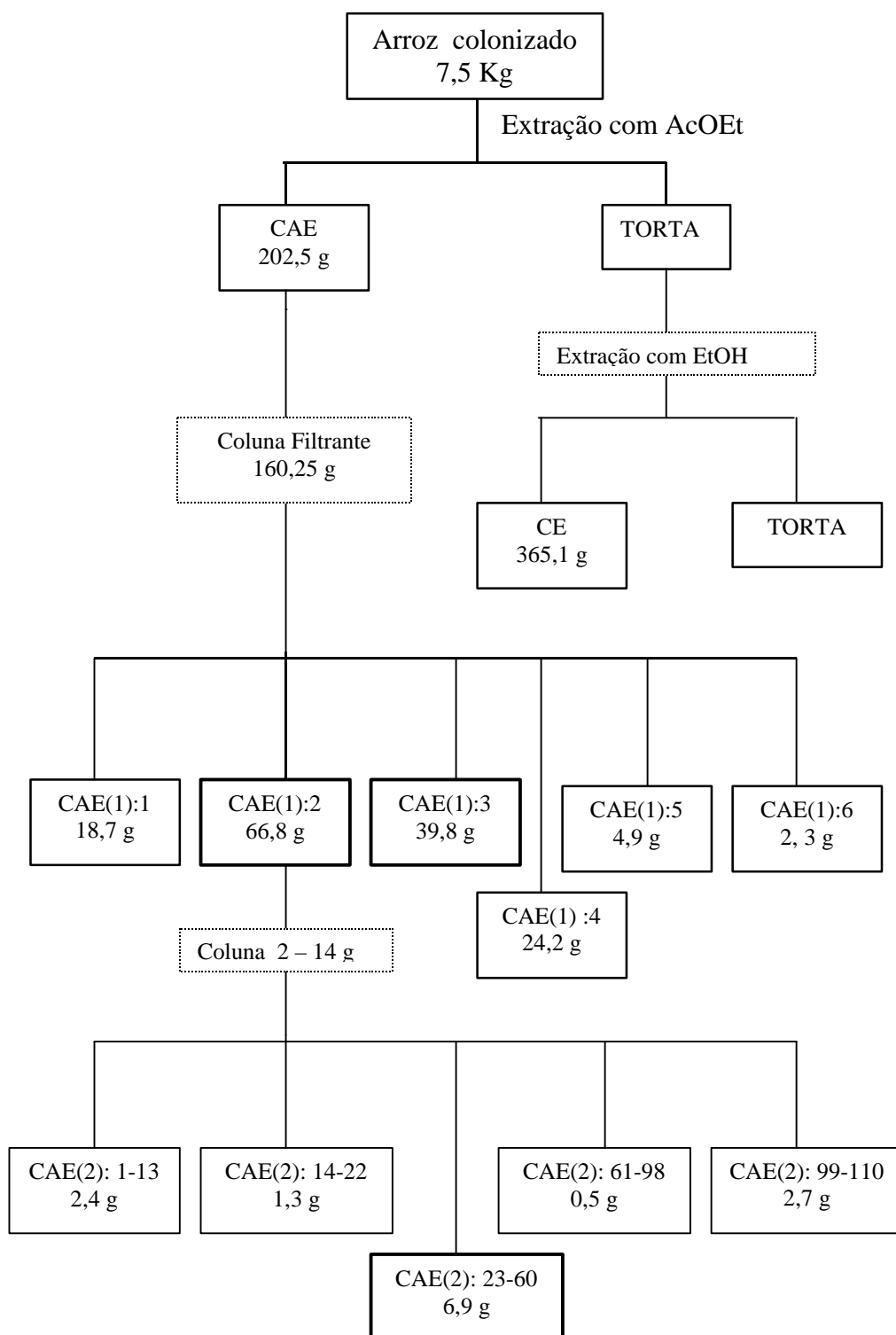


Figura 3A. Fluxograma das frações obtidas a partir da extração do arroz colonizado com o fungo *C. cassiicola* e fracionamento do extrato acetato de etila.

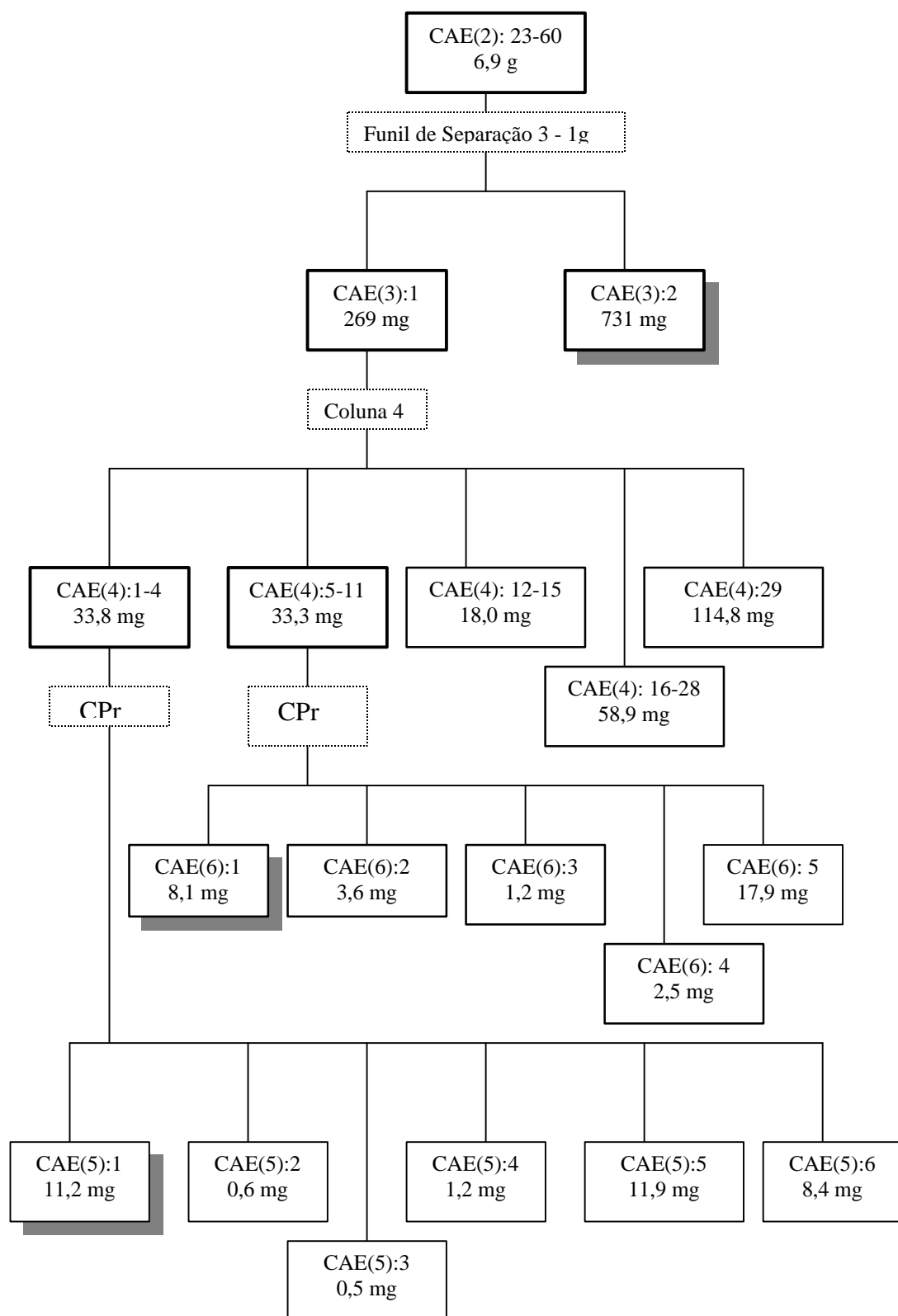


Figura 3B. Continuação do fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila do arroz colonizado com o fungo *C. cassiicola*.

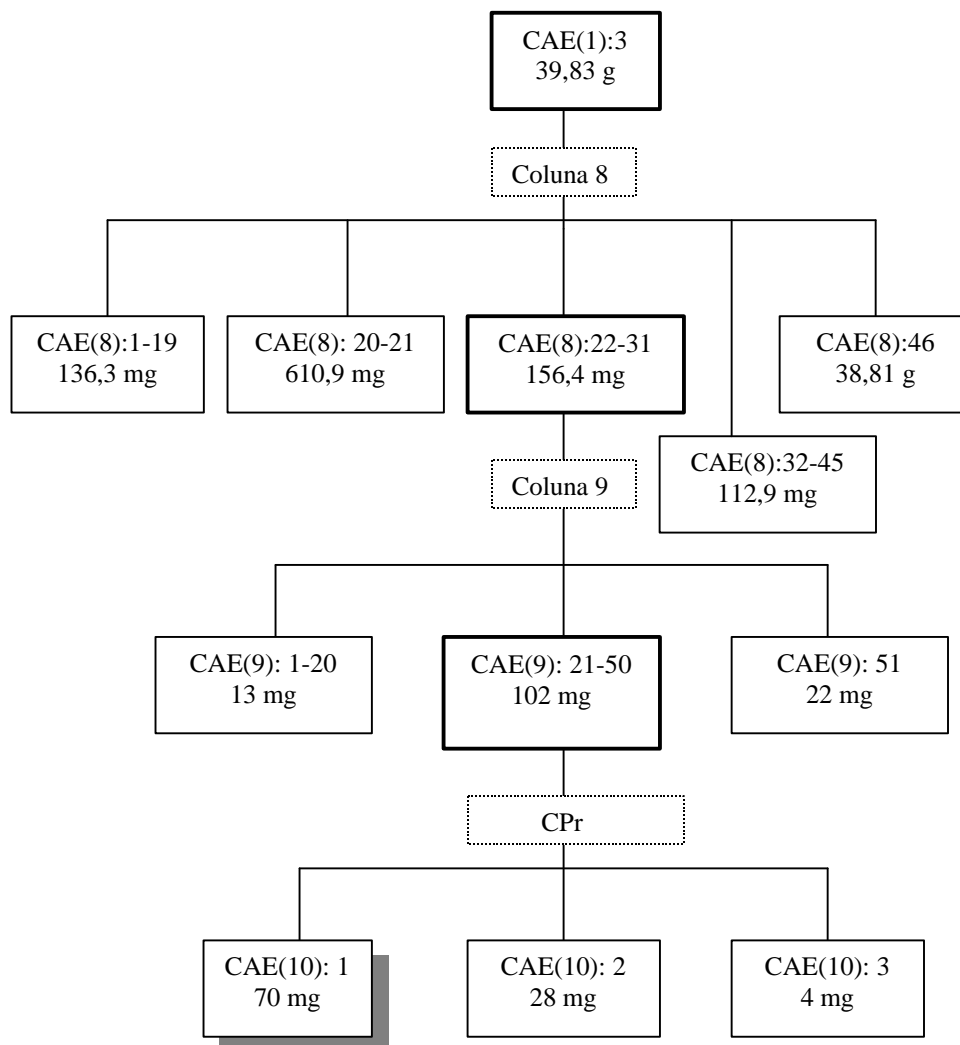


Figura 3C. Continuação do fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila do arroz colonizado com o fungo *C. cassiicola*.

### 2.3.2. Determinação dos constituintes químicos da fração CAE(1):2

A fração CAE(1):2 foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna (CC). O fluxograma apresentado nas Figuras 3A e 3B ilustra o procedimento realizado. Os solventes foram utilizados em ordem crescente de polaridade. O volume total utilizado foi 4 L de solvente sendo 1,6 L de hexano:acetato de etila (3:1); 1,6 L de hexano:acetato (2:1) e 800 mL de metanol para uma massa de 160 g

de sílica. Obteve-se deste procedimento cinco grupos de frações (CAE(2):1-13; CAE(2):14-22; CAE(2):23-60; CAE(2):61-98; CAE(2):99-110). A fim de isolar da fração CAE(2):23-60 um composto fluorescente, observado quando a placa cromatográfica foi visualizada sob luz ultravioleta de  $\lambda = 365$  nm, dissolveu-se 1 g da fração CAE(2):23-60 em 10 mL de éter dietílico e procedeu-se a extração com solução aquosa de NaOH a 2 M (3 x 4 mL). Nesse estágio, observou-se a formação de um precipitado (CAE(3):2) que foi removido por filtração. A fase orgânica foi então lavada com solução saturada de NaCl (3 x 4 mL), seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>) e filtrada. Esse resíduo orgânico (269 mg) obtido, denominado fração CAE(3):1, contendo um composto fluorescente, foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, enquanto a outra fração obtida (CAE(3):2) foi caracterizada por meio de espectroscopia no IV. O solvente utilizado para eluir a fração CAE(3):1 foi hexano: acetato de etila (1:1; 900 mL) e utilizou-se como fase estacionária 20 g de sílica gel. Obtiveram-se deste fracionamento cinco frações: CAE(4):1-4; CAE(4):5-11; CAE(4):12-15; CAE(4):16-28; CAE(4):29. A fração CAE(4):1-4 foi aplicada em placa cromatográfica preparativa de onde foi possível isolar o composto fluorescente de interesse denominado (CAE(5):1). Para este procedimento foi utilizado uma placa cromatográfica preparativa de sílica gel (20 x 20 cm) com espessura de 1,0 mm, a qual foi eluída com 200 mL de hexano:acetato de etila (5:1).

O composto isolado foi caracterizado por meio de análise no infravermelho, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C), COSY, HETCOR, HMBC e HMQC. Para análise em CG-EM utilizou-se uma coluna cromatográfica DB-1 (30 m, 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m). O fluxo de gás de arraste (He) foi 1,6 mL/min. A temperatura utilizada do injetor foi 290 °C e da interface 290 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, programada para aumentar 4 °C. min<sup>-1</sup>, até atingir 285 °C, permanecendo constante por 4 min. Utilizou-se razão de split 1/5 e o tempo total de análise foi de 96 min. A razão massa/carga variou entre 30 e 600.

A fração CAE(4):5-11 também foi aplicada em placa preparativa, a qual foi eluída com hexano:acetato de etila (6:1) resultando no isolamento de um composto denominado CAE(6):1.

### **2.3.3. Determinação dos constituintes químicos da fração CAE(1):3**

A amostra CAE(1):3 também foi fracionada por CC (Figura 3C) e utilizou-se como eluente 5 L de hexano:acetato de etila (6:1) e 5 litros de hexano:acetato de etila (1:1). As frações obtidas CAE(8):1-19, CAE(8):20-21 e CAE(8):22-31, foram analisadas por cromatografia em fase gasosa. Cerca de 50 mg de cada amostra foram dissolvidas em 0,5 mL de clorofórmio, sendo injetado no cromatógrafo somente 1 L. Utilizou-se uma coluna DB-1 (30 m, 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m). O fluxo de gás de arraste (He) foi de 1,6 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura utilizada do injetor foi 290 °C e da interface 290 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, 4 °C por minuto até atingir 285 °C, permanecendo constante por 4 minutos. Utilizou-se razão de split 1/10. O tempo total de análise foi de 96 min.

A fração CAE(8):22-31, além de ser analisada por CG, foi também submetida a fracionamento por CC de sílica gel, utilizando-se como eluente 1,6 L de hexano:acetato de etila (7:1) e 1 L de hexano:acetato de etila (4:1) e, como fase estacionária, 14 g de sílica gel. Este fracionamento resultou no agrupamento de três novas frações, conforme Figura 3C. A fração CAE(9):21-50, foi submetida a CPr, utilizando-se uma placa preparativa de sílica gel (20 x 20 cm) com 1,0 mm de espessura. Essa placa foi eluída com 200 mL de hexano:acetato de etila (6:1), resultando no isolamento de um composto fluorescente, denominado CAE(10):1.

### **2.3.4. Análise de ácidos graxos e triacilglicerídios, por cromatografia em fase gasosa, presentes nas frações CAE(1):1 e CAE(1):2**

#### **2.3.4.1. Transesterificação de ésteres de ácidos graxos para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando metóxido de sódio/metanol**

Em um tubo de ensaio, colocou-se 20 mg da amostra CAE(1):2 e 0,5 mL de THF (tetraidrofurano). Em seguida, foi adicionado 1 mL de metóxido de sódio a 0,5 M (60 mg de sódio metálico e 5 mL de metanol anidro). O tubo foi aquecido, em

banho maria, durante 20 min. a 50 °C. Após o aquecimento, foi adicionado ainda ao tubo de ensaio 50 µL de ácido acético e, posteriormente, 3 mL de água. Em um funil de separação, os ésteres metílicos foram, então, extraídos com 5 mL hexano (por duas vezes). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Submeteu-se o material a filtração, seguida da remoção do solvente por destilação à pressão reduzida em evaporador rotativo. Posteriormente, a fração obtida foi dissolvida em 0,25 mL de hexano, para sua injeção em cromatógrafo de fase gasosa.

Para análise por CG-EM utilizou-se coluna cromatográfica DB-5 (30 m, 0,32; 0,25 µm). O fluxo de gás de arraste (He) foi 1,6 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura utilizada do injetor foi 220 °C e da interface 240 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, aumentando de 3 °C. min<sup>-1</sup> até atingir 290 °C, permanecendo constante por 26 min., resultando num tempo de análise de 102 minutos. Utilizou-se razão de split 1/30 e a razão massa/carga variou entre 30 e 350.

#### **2.3.4.2 Esterificação de ácidos graxos utilizando BF<sub>3</sub>/metanol**

Em um tubo de ensaio, colocou-se 20 mg da amostra CAE(1):1 ou CAE(1):2 e em seguida adicionou-se 1,0 mL de BF<sub>3</sub> (trifluoreto de boro)/metanol (14% de BF<sub>3</sub> em metanol). Posteriormente, o tubo foi aquecido, em banho maria, por 20 minutos a 60 °C. Após seu resfriamento, a extração foi realizada com 12 mL de hexano. A fase orgânica obtida foi, então, lavada com 10 mL de solução saturada de NaCl (por duas vezes) e seca com sulfato de sódio anidro. O material foi então filtrado e concentrado em evaporador rotativo. Os ésteres metílicos assim obtidos foram dissolvidos em 1,0 mL de hexano, para posterior injeção em cromatógrafo em fase gasosa.

A análise em CG-EM foi realizada nas condições descritas no item 2.3.4.1.

## **2.4. Bioensaios**

### **2.4.1. Inibição do desenvolvimento radicular de alface (*Lactuca sativa*) em placa de Petri**

Ensaio biológico foram realizados, a fim de sistematizar o estudo das frações. Para isso, realizou-se primeiramente o teste de difusão em meio sólido com os extratos CAE e CE e, com as frações CAE(1):1, CAE(1):2, CAE(1):3, CAE(1):4, CAE(1):5, CAE(1):6, no qual utilizou-se semente de alface e metodologia citada na literatura (EINHELLIG, 1983). A parcela experimental constituiu-se de placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, contendo 1 disco de papel filtro e 20 sementes cada. Os tratamentos consistiram de soluções dos extratos e frações, em metanol, na concentração de 100 e 1000 ppm, além da testemunha, tratada apenas com metanol. Para isso, foram distribuídas nas placas, alíquotas de 2 mL de cada solução e, estas foram levadas à capela, à temperatura ambiente, para a completa evaporação do solvente. Posteriormente, foram dispostos sobre papel filtro 20 sementes da planta teste e adicionados 2 mL de água destilada. As placas foram vedadas e acondicionadas em câmara climática MA 402 (Marconi), à temperatura de 25 ° C, sob lâmpada fluorescente (8 x 40 Watts). O processo de inibição da germinação foi acompanhado, em intervalos de 24 h, por um período de três dias e, ao final deste período, todas as raízes foram medidas para se avaliar o crescimento destas. As porcentagens de inibição foram calculadas com base nos dados obtidos nos experimentos controles, realizados nas mesmas condições dos tratamentos.

Todo o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 repetições. As análises estatísticas foram realizadas através de comparações pelo Teste de Tukey.

#### **2.4.2. Bioensaio para determinação do potencial herbicida do extrato CAE e CE, utilizando-se as espécies *Lolium multiflorum*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Physalis ixocarpa* e *Trifolium alexandrinum***

Os extratos CAE e CE foram testados no crescimento e germinação de quatro espécies padrões, sendo duas monocotiledôneas (*Lolium multiflorum* e *Amaranthus hypochondriacus*) e duas dicotiledôneas (*Physalis ixocarpa* e *Trifolium alexandrinum*). As sementes das espécies testadas foram obtidas no Mercado Central, México DF, México e pré-selecionadas por uniformidade, sendo que aquelas fora do padrão, ou danificadas, foram descartadas (MACÍAS *et al.*, 2000c). As sementes foram dispostas em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, contendo 1 disco de papel filtro Whatman nº1, como suporte e, 50 sementes em cada placa. A solução estoque de cada extrato foi preparada usando 20 mM de DMSO como agente solubilizante. Esta solução foi então diluída obtendo-se as soluções a 50 e 100 ppm. Em cada placa foram adicionados 10 mL da solução teste ou do controle. O controle foi preparado com água deionizada e as mesmas concentrações de DMSO. As placas foram vedadas e permaneceram acondicionadas no escuro a 25 °C. Em todos os casos, os valores de pH foram ajustados para 7,0 com 1 N NaOH.

O processo de inibição da germinação foi acompanhado por um período de dois dias e, ao final de cinco dias, todas as raízes e caules foram medidos para se avaliar o crescimento destes órgãos. As porcentagens de inibição foram calculadas com base nos dados obtidos nos experimentos controles, realizados nas mesmas condições dos tratamentos. Portanto, zero representa o controle, valores positivos representam estímulo e negativos representam inibição da variável estudada. Cada tratamento foi realizado com 4 repetições e, totalmente ao acaso. As análises estatísticas das variáveis quantitativas foram submetidas a análises de variância e realizaram-se comparações pelo Teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

### 2.4.3. Avaliação da síntese de ATP

Um dos bioensaios utilizados para se determinar a fitotoxicidade de compostos candidatos a herbicidas é o teste de determinação da síntese de ATP em cloroplastos isolados de espinafre (ACHINE *et al.*, 1999a). Para a realização deste bioensaio os cloroplastos foram isolados a partir de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L) conforme metodologia descrita por ACHINE *et al.* (1999b) . A extração dos cloroplastos foi realizada em folhas livres da nervura central e das extremidades basal e apical (25 g) que foram trituradas em liquidificador e submetidas à extração com 100 mL do seguinte meio: 400 mmol L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol L<sup>-1</sup> KCl e 30 mmol L<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>-tricina em pH 8,0 (1 mol L<sup>-1</sup> KOH). O meio foi homogeneizado e filtrado com o auxílio de quatro camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado (3500x), o sobrenadante eliminado e o sólido contendo os cloroplastos dissolvidos em 1 mL de meio constituído por: 100 mmol L<sup>-1</sup> de sorbitol, 10 mmol L<sup>-1</sup> de KCl, 5 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> e 1mmol L<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>-tricina em pH 8,0 (1 mmol L<sup>-1</sup> KOH).

Para determinar a concentração da clorofila foram pipetados 50  $\mu$ L da solução de cloroplastos para um tubo de centrífuga contendo 3 mL de acetona. A amostra foi mantida no escuro por cinco minutos e depois submetida à centrifugação clínica. Foram feitas medidas de absorvâncias do sobrenadante nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm (ROMAGNI *et al.*, 2000). Finalmente, a concentração de clorofila foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Clorofila ( } \mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663})$$

Foram realizados ensaios para avaliar a inibição causada pelos extratos CAE, CE, e pelas frações CAE(1):1, CAE(1):2, CAE(1):3, CAE(1):4, CAE(1):5, CAE(1):6 e CAE(5):1 na síntese de ATP (ACHINE *et al.* 1999b). Para esta avaliação os dados foram medidos, com o pH ajustado entre 8 e 8,1, usando uma combinação de microeletrodos conectados a um potenciômetro, Corning Potentiometer, com escala expandida. O meio de reação utilizado foi: 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de clorofila, 100 mmol L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O , 10 mmol L<sup>-1</sup> KCl, 1 mmol L<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>-tricina, pH 8

(1 mmol L<sup>-1</sup> KOH), na presença de 1 mmol L<sup>-1</sup> ADP e 3 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. A reação iniciou-se com iluminação saturada de 350 Watts. Nesse meio, 100 μmol L<sup>-1</sup> de paraquat dicloreto (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio) foi usado como acceptor de elétrons para a síntese de ATP. Para avaliar a ação das amostras na inibição da síntese de ATP, estas foram adicionadas ao meio reacional em concentrações de até 300 μg L<sup>-1</sup> e as medidas comparadas com o controle (1200 μmol L<sup>-1</sup> ATP mg Chl h<sup>-1</sup>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Obtenção dos extratos com acetato de etila (CAE) e etanol (CE) e avaliação da atividade fitotóxica dos mesmos

O arroz colonizado com o fungo *C. cassiicola* foi submetido a extrações sucessivas, com acetato de etila e hexano, em aparelho do tipo Soxhlet. Desta forma, obteve-se 202 g de CAE e 365 g de CE. Ambos os extratos apresentavam consistência pastosa, coloração amarronzada e odor característico. Como forma de orientar o estudo dos extratos obtidos utilizou-se o teste de inibição do desenvolvimento radicular de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.).

#### 3.2. Identificação dos constituintes químicos presentes nas frações CAE(1):1 e CAE(1):2

Pelo espectro no infravermelho da fração CAE(1):1 (Figura 4) observou-se a presença de bandas características de ácidos graxos (  $\text{C-H}$  em 2923 e 2852  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{C=O}$  em 1708  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{C-H}$  em 1470  $\text{cm}^{-1}$  e  $\text{(CH}_2\text{)}_n$ ;  $n > 4$  em 720  $\text{cm}^{-1}$ ). Verificou-se ainda uma banda fraca de absorção em 1740  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de pequena quantidade de triacilglicerídeo na amostra. Pelo espectro no infravermelho da fração CAE(1):2 (Figura 5) observou-se a presença de bandas características de ácidos graxos (  $\text{C-H}$  em 2923 e 2852  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{C=O}$  em 1710  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\text{C-O}$  em 1166  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\text{C-H}$  em 1470  $\text{cm}^{-1}$  e  $\text{(CH}_2\text{)}_n$ ;  $n > 4$  em 720  $\text{cm}^{-1}$ ). Todavia, pela Figura 5,

observa-se também a presença de triacilglicerídeos caracterizados pela banda forte de absorção em  $1740\text{ cm}^{-1}$  na amostra. A banda de intensidade fraca em  $3007\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de insaturações (ligações duplas) nos constituintes dessas frações. Essas frações foram esterificadas por tratamento com trifluoreto de boro em metanol ( $\text{BF}_3/\text{metanol}$ ) tendo todos os seus constituintes derivados de ácidos e ésteres graxos convertidos em seus respectivos ésteres metílicos e em seguida submetida à análise por cromatografia em fase gasosa. Para isso utilizou-se um cromatógrafo com detector de ionização de chamas e outro com detector de massa. A identificação dos compostos foi feita também comparando-se os tempos de retenção com os de vários padrões de ésteres metílicos injetados separadamente, conforme mostrado na Figura 6. Pela análise do cromatogramas das Figuras 6, 7 e 8 foi possível identificar na fração CAE(1):1 e CAE(1):2 os seguintes ésteres metílicos: (1) miristato de metila, (2) palmitoleato de metila, (3) palmitato de metila, (4) linoleato de metila, (5) linolenato de metila, (6) estearato de metila e (8) icosonoato de metila, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Correlação entre os tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos com aqueles obtidos para as amostras CAE(1):1 e CAE(1):2, após tratadas com  $\text{BF}_3/\text{metanol}$

nº de c : insaturações	padrões	CAE(1):		CAE(1):2	
	TR	TR	área %	TR	área %
C 14:0	37,892 (1)	37,822 (1)	1,2	37,827 (1)	0,7
C 16:1*	----- (2)	-----	---	44,242 (2)	0,6
C 16:0	45,029 (3)	45,009 (3)	46,7	45,043 (3)	25,0
C 18:2	50,515 (4)	50,484 (4)	9,2	50,557 (4)	30,0
C 18:3	50,728 (5)	50,698 (5)	26,4	50,761 (5)	28,1
C 18:0	51,585 (6)	51,532 (6)	13,9	51,546 (6)	6,7
**	----- (7)	50,865 (7)	1,4	50,894 (7)	1,7
C 20:0	57,566 (8)	57,539 (8)	0,7	57,544 (8)	0,2

\* Este ácido foi identificado segundo a biblioteca do programa Willey 229.00.

\*\* Este ácido não foi identificado devido à falta de padrão.

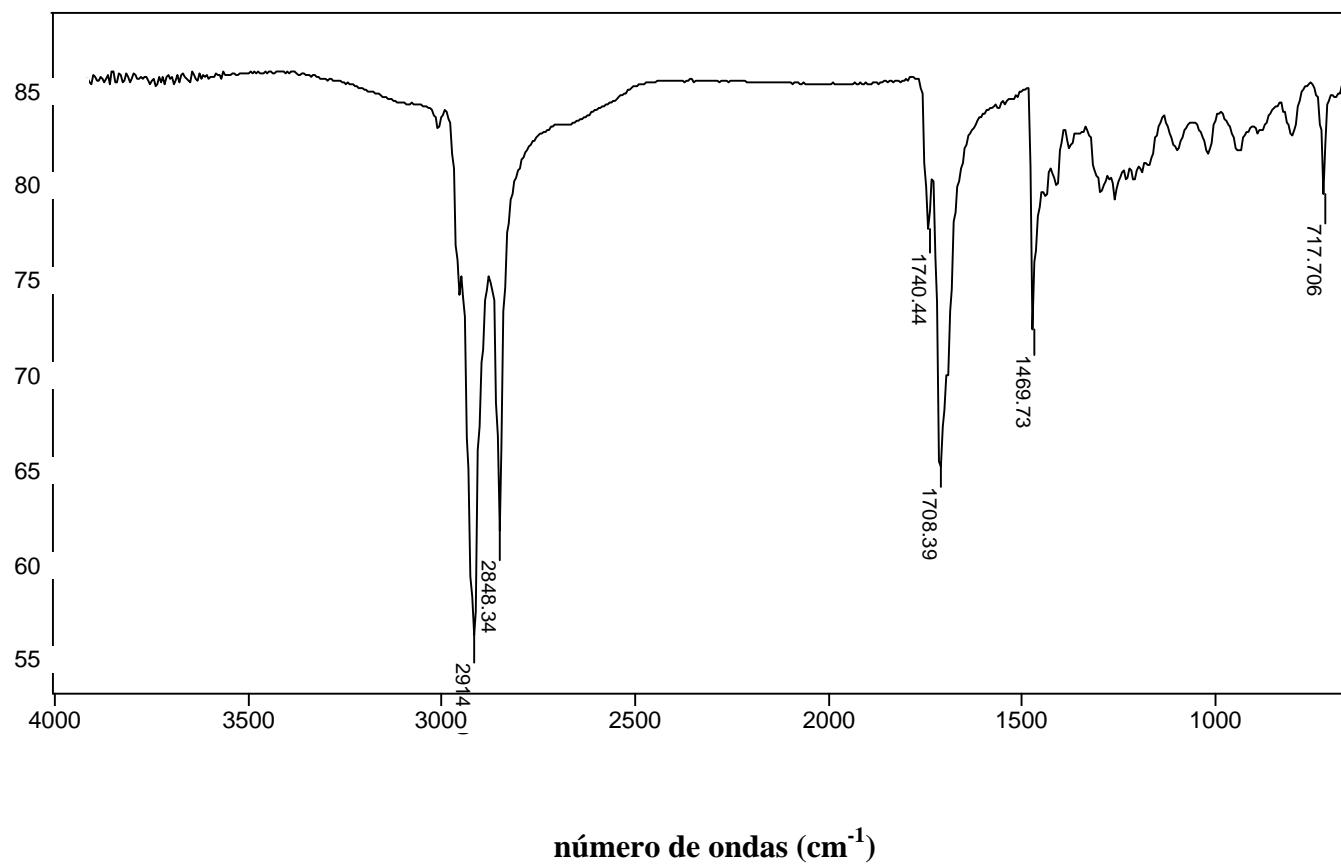


Figura 4. Espectro mo IV (NaCl) da fração CAE(1):1.

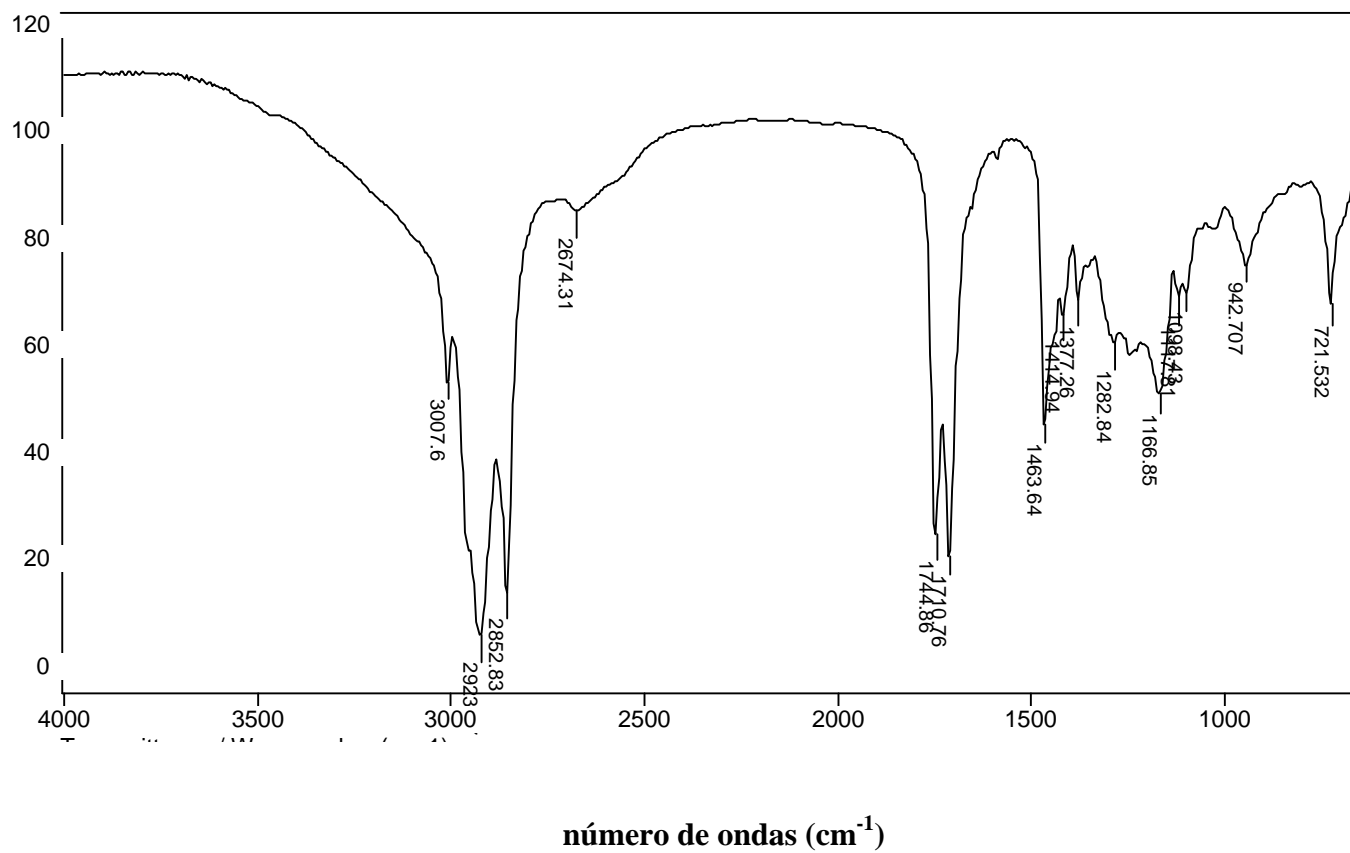


Figura 5. Espectro mo IV (NaCl) da fração CAE(1):2.

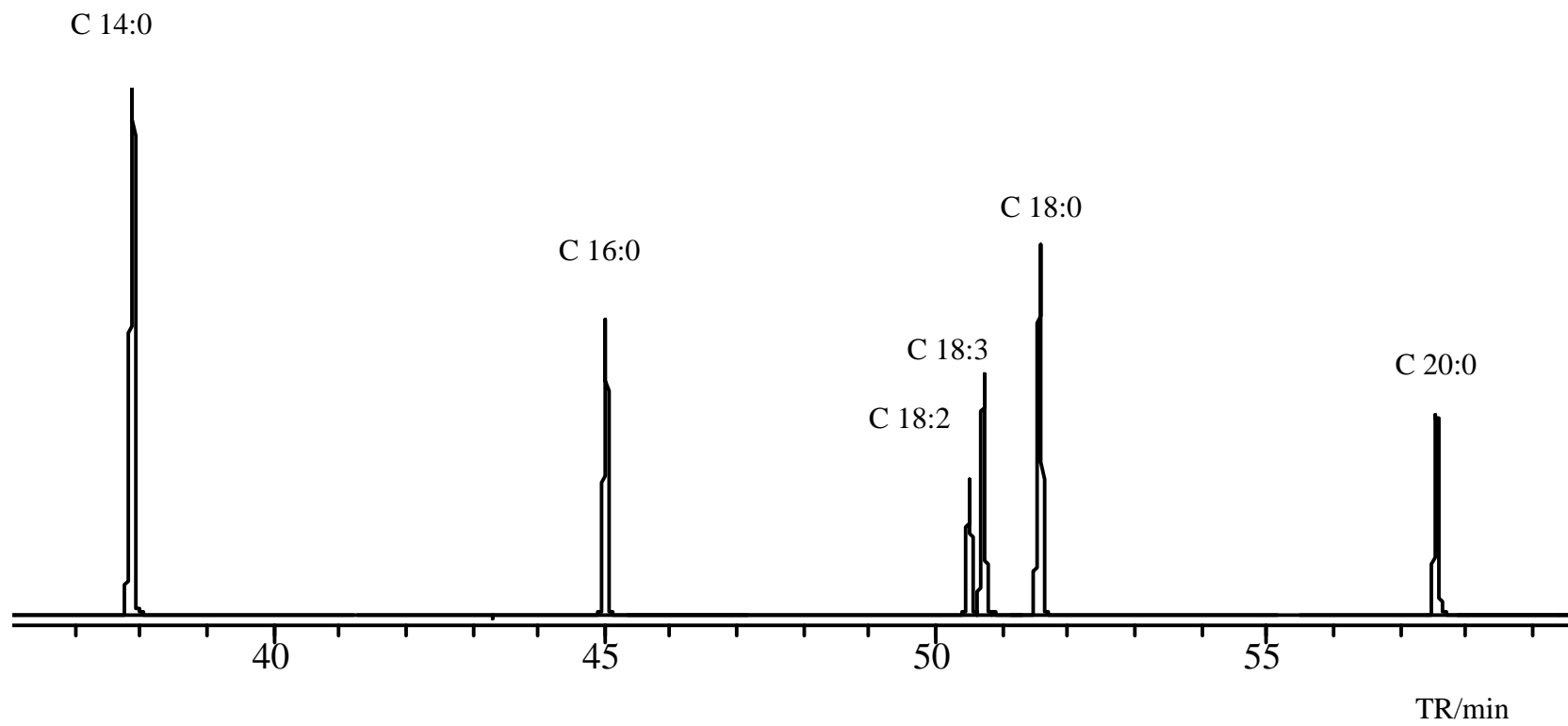


Figura 6. Cromatograma dos padrões injetados de ésteres metílicos em CG-MS (coluna DB5).

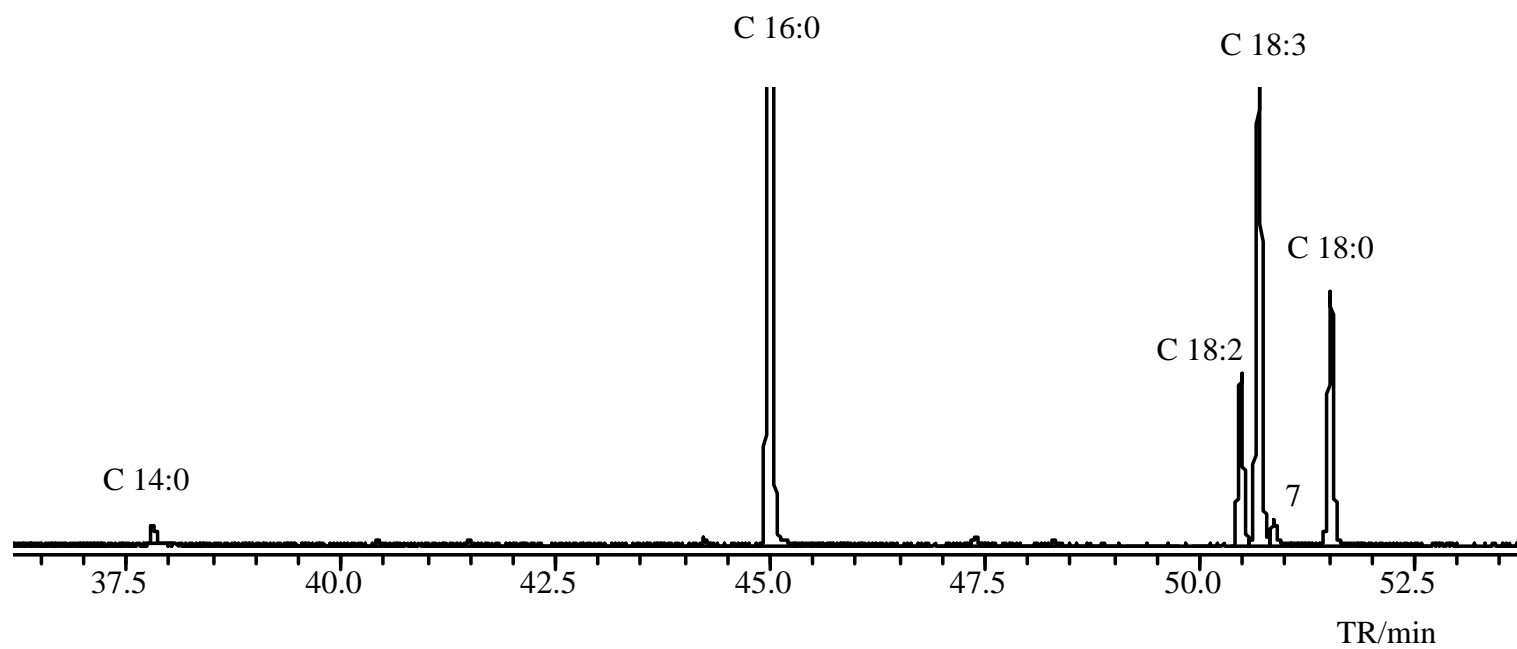


Figura 7. Cromatograma dos ésteres metílicos obtidos após esterificação da fração CAE(1):1, com  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  e separação destes por cromatografia em fase gasosa (coluna DB5).

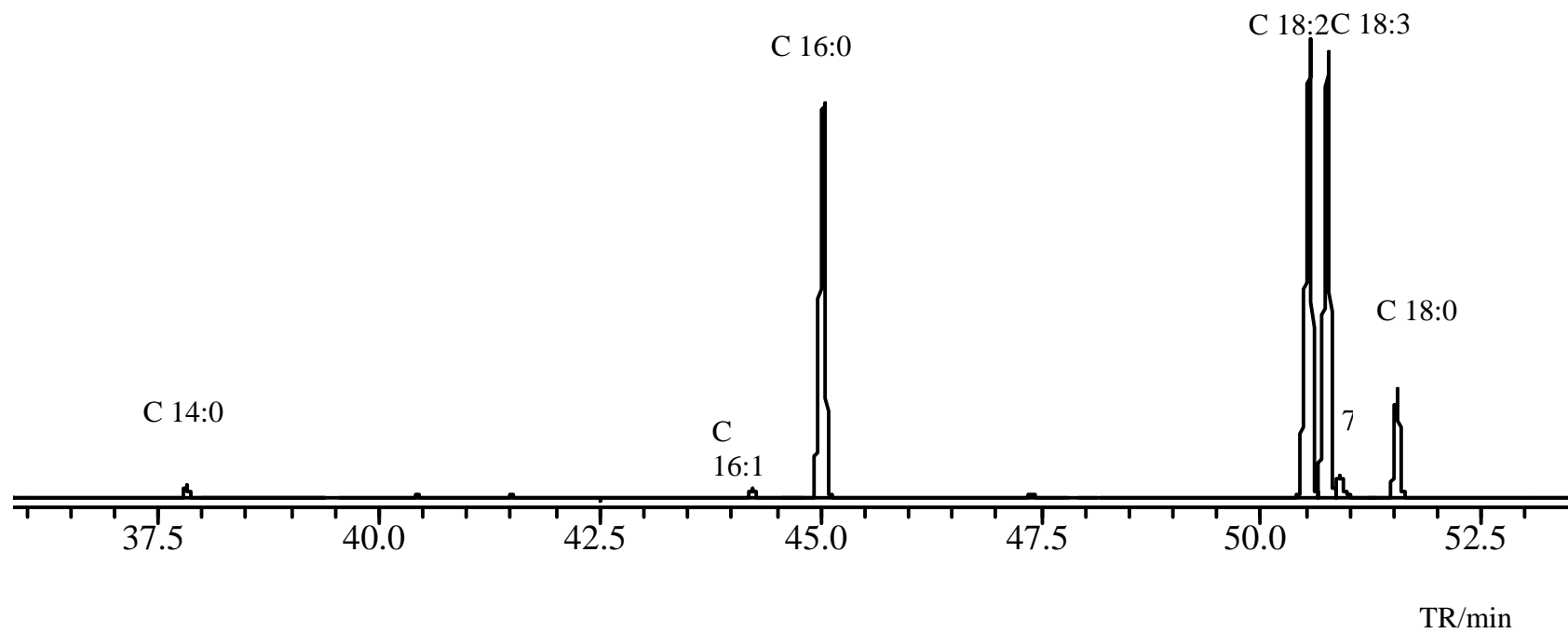


Figura 8. Cromatograma dos ésteres metílicos obtidos após esterificação da fração CAE(1):2, com  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  e separação destes por cromatografia em fase gasosa (coluna DB5).

Os ésteres metílicos identificados nas frações CAE(1):1 e CAE(1):2 representam cerca de 98 e 91% das amostras. Sendo assim, fica evidenciado que a grande atividade fitotóxica apresentada por estas frações e que foram observadas no teste de síntese de ATP é, provavelmente, devido à presença de ácidos graxos. As frações CAE(1):1 e CAE(1):2, no teste de inibição do crescimento da raiz de alface, reduziram em aproximadamente 35 e 37 %, respectivamente, o seu desenvolvimento mostrando novamente sua fitotoxicidade.

Portanto, as frações CAE(1):1 e CAE(1):2 de *C. cassiicola* isolado de planta de tomateiro mostrou tratar-se, na sua maioria, de uma mistura de ácidos graxos e triacilglicerídeos com grande atividade fitotóxica. Todavia, deve-se chamar a atenção para o fato de que a fração CAE(1):2, quando analisada por CCD sob luz UV ( $\lambda = 360$  nm), revelou a presença de uma substância fluorescente ( $R_f = 0,30$ ,  $CHCl_3$ ), que foi isolada, conforme discutido a seguir.

Entretanto, considerando que a fração CAE(1):2 é formada em grande parte, por triacilglicerídeo conforme evidenciado pela forte banda de absorção em  $1740\text{ cm}^{-1}$ , esta fração foi tratada com metóxido de sódio/metanol visando identificar com mais detalhe a sua composição, uma vez que os ácidos graxos não são esterificados com este reagente.

Pela análise dos cromatogramas (Figuras 6 e 9) foi possível identificar nesta fração os seguintes ésteres metílicos: (1) miristato de metila, (2) palmitoleato de metila (3) palmitato de metila, (4) linoleato de metila, (5) linolenato de metila, (6) estearato de metila e (8) icosonoato de metila, apresentados na Tabela 2.

Os ésteres metílicos identificados somam 90% da amostra injetada, o que demonstra sua grande contribuição na fitotoxicidade desta fração. Desta forma, pode-se concluir que estes compostos são uma parcela significativamente importante, que contribui na diminuição da taxa de crescimento das sementes de alface e na inibição da síntese de ATP, como foi verificada anteriormente para a fração que lhes deu origem.

Estudos atuais têm revelado que os ácidos graxos têm um importante papel na esporogênese de fungos (CALVO *et al.*, 1999). *C. cassiicola* reproduz-se assexuadamente formando conídios que derivam de estruturas chamadas conidióforos. Tais esporos são um excelente meio de propagação e servem como uma forma de inóculo primário. O ácido linoléico tem efeito esporogênico comprovado em *Neurospora crassa* (ROEDER *et al.*, 1982) e *Aspergillus sp.*

(CALVO *et al.*, 1999). Em *A. flavus* e *A. parasiticus* observou-se um incremento no desenvolvimento de conídios. Segundo CALVO *et al.* (1999), esses resultados sugerem que o ácido linoléico e/ou seus derivados podem conservar sinais moleculares que modulam a esporulação em fungos. Por outro lado, esses mesmos ácidos graxos podem ser muitas vezes tóxicos para espécies vegetais, como pôde ser comprovado por TSO (1964). Este autor relatou que ácidos graxos insaturados podem inibir o desenvolvimento de gemas axilares em tabaco. O ácido linoléico e oléico destroem tecidos de folhas maduras e gemas axilares quando aplicados nesta planta. ALSAADAWI *et al.* (1983) identificaram ácidos graxos em *Polygonum aviculare* com ação fitotóxica contra *Cynodon dactylon*: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linoléico, ácido esteárico e ácido icosanóico que também foram isolados em *C. cassicola*. Segundo este autor, os sais de sódio dos ácidos citados acima inibiram significativamente o crescimento das raízes de *C. dactylon* nas concentrações de 5, 10, 30 e 50 ppm. Observou-se ainda que o incremento nas duplas ligações aumentava à sua toxicidade. Outra constatação foi que estes ácidos graxos apresentavam relativa resistência a decomposição e permaneciam no solo por tempo suficiente para afetar o crescimento de plantas e microorganismos, pelo menos até a próxima estação. Esta alta resistência certamente confere aos organismos que produzem tais ácidos vantagens competitivas e adaptativas.

Tabela 2. Correlação entre os tempos de retenção de ésteres metílicos com aqueles obtidos para a amostra da fração CAE(1):2

Nº de C : insaturações	padrões	CAE(1):2	
	TR	TR	área %
C 14:0	37,892 (1)	37,828 (1)	0,86
C 16:1*	----- (2)	44,245 (2)	1,48
C 16:0	45,029 (3)	45,044 (3)	24,43
C 18:2	50,515 (4)	50,533 (4)	17,99
C 18:3	50,728 (5)	50,770 (5)	33,53
C 18:0	51,585 (6)	51,556 (6)	9,12
**	----- (7)	50,898 (7)	1,54
C 20:0	57,566 (8)	57,541 (8)	3,32

\* Este ácido foi identificado segundo a biblioteca do programa CG-EM Post run Analysis.

\*\* Este ácido não foi identificado devido à falta de padrão.

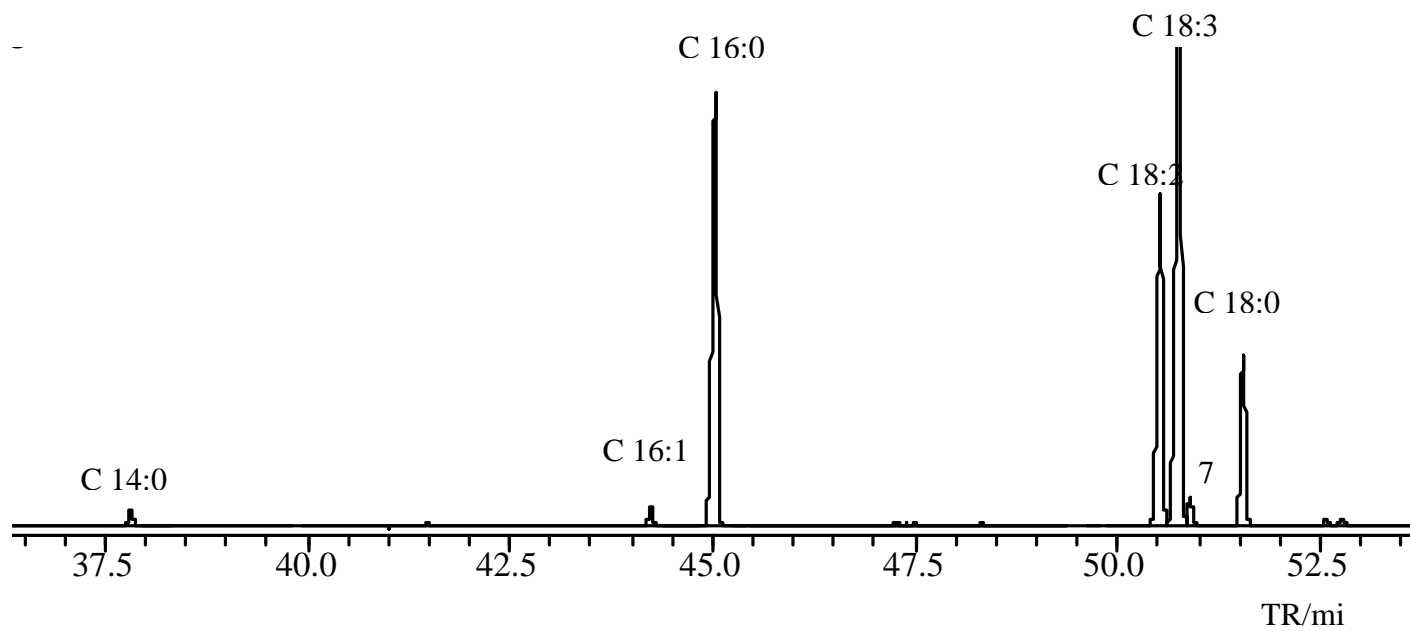


Figura 9. Cromatograma dos ésteres metílicos obtidos após transesterificação da fração CAE(1):2 com MeONa/MeOHM e separação destes por cromatografia em fase gasosa (coluna DB5).

### 3.3. Fracionamento por cromatografia em coluna de CAE(1):2 e CAE(1):3

#### 3.3.1. Isolamento e identificação do composto CAE(5):1 da fração CAE(1):2

A fração CAE(1):2 foi anteriormente esterificada e analisada por CG-EM, sendo possível identificar, na sua maioria, ésteres de ácidos graxos, por comparação com padrões de ésteres metílicos destes.

Parte da fração CAE(1):2, constituída principalmente de ésteres de ácidos graxos, foi tratada com solução de NaOH (2 M), para facilitar a separação de um de seus constituintes, cujo R<sub>f</sub> era muito próximo daquele dos ésteres graxos. Após tratamento com solução de NaOH, a fração dissolvida em 10 ml de éter etílico foi transferida para um funil de separação, onde observou-se a separação de duas fases. A fase orgânica contendo um composto fluorescente foi denominada de CAE(3):1 e a fase aquosa, contendo sais de ácidos graxos, foi denominada de CAE(3):2. A fração CAE(3):2 foi tratada com HCl para obtenção dos respectivos ácidos graxos, os quais foram caracterizados por IV (Figura 10) onde observou-se a presença de bandas características de ésteres de ácidos graxos (  $\text{C}=\text{O}$  em  $1738\text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{O}$  em  $1101\text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{H}$  em  $2925$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{C}-\text{H}$  em  $1461\text{ cm}^{-1}$  e  $(\text{CH}_2)_n$ ;  $n>4$  em  $720\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\text{O}-\text{H}$  em  $3443\text{ cm}^{-1}$ .

Na fração CAE(3):2 foi observado um composto fluorescente que motivou o fracionamento da mesma. Várias colunas em série foram usadas. As preparações das colunas eram baseadas em CCD e luz ultravioleta, bem como o monitoramento da eluição da coluna. O composto isolado, CAE(5):1, apresentou uma coloração azulada sob luz ultravioleta de comprimento de onda 365 nm que se tornava negro ao ser revelado com solução de ácido fosfomolibdico. O referido composto apresentou um RF=0,30, quando analisado por CCD, usando como eluente o clorofórmio. A análise da amostra por espectroscopia de massa (Figura 11) mostrou que o composto em questão apresentava massa molecular igual a 392 e íon molecular de moderada abundância. Pela observação da massa do composto foi possível determinar sua fórmula molecular como  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}$ . Sendo o material de origem fúngica, devido ao número de carbonos ( $\text{C}_{28}$ ) e pelo índice de deficiência de hidrogênio (índice=9) foi possível sugerir a natureza esteroidal da molécula, que pôde ser confirmada

posteriormente. A sua natureza fluorescente sugere a presença de duplas conjugadas (Figura 12).

Pelo espectro no infravermelho (Figura 13), constatou-se uma banda forte carbonílica em  $1665\text{ cm}^{-1}$ , compatível com a presença de um grupo cetona - insaturado.

Analisando o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 14) constatou-se a presença de 28 sinais. Pode-se confirmar a presença de carbonila - em 199,5. Em 124,4 observa-se o sinal do carbono metínico C4. Verifica-se também a presença de C23 em 124,4, C 24 em 42,8 e C25 em 30,0. Segundo o espectro de DEPT contam de 6 grupos metílicos, 6 carbonos metilênicos e 10 carbonos metínicos e 6 carbonos não hidrogenados. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 15) apresenta sinais referentes aos hidrogênios de 6 metilas ( $\text{CH}_3$ ) alifáticas na região de 0,82-1,05 (Figura 16), sendo que em 0,82 verifica-se um duplete com  $J=5,1\text{ Hz}$  referente a H26, em 0,84 verifica-se um duplete com  $J=4,8\text{ Hz}$  referente a H-27, em 0,92 verifica-se um duplete com  $J=6,9\text{ Hz}$  referente a H-28, em 0,96 verifica-se um simpleto referente a H-18, em 0,99 verifica-se um simpleto, referente a H-19 e em 1,05 verificou-se um duplete com  $J=6,6\text{ Hz}$ , referente a H-21. Observou-se, ainda, na região de 1,20-2,60 um conjunto de sinais atribuídos aos hidrogênios alifáticos. Em 5,23 verificou-se um multiplete integrando para 2 hidrogênios referentes a H-22 e H-23. Na região de hidrogênios olefínicos observa-se um simpleto em 5,73 referente a H-4. Em 6,03 verifica-se um duplete integrando para um hidrogênio que pode ser atribuído a H-6, que acopla com H7, um duplete observado em 6,6, com  $J=9,6\text{ Hz}$ .

Pela fragmentação do composto (Figura 11), observada pelo espectro de massas, fica evidente que se trata de um esteróide com 4 anéis e 5 duplas ligações. O pico observado em  $m/z=268$  é atribuído ao fragmento originado de uma clivagem na cadeia lateral do referido composto e um rearranjo (Figura 17).

Através de comparações de dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos da literatura com aqueles das Figuras 14 e 15 e os dados da Tabela 3, obtidos para o composto isolado (CAE(5):1), foi possível elucidar sua estrutura, como ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona (Figura 12) o qual já havia sido isolado anteriormente (CHOBOT *et al.*, 1997; COOKS *et al.*, 1970; JINMING *et al.*, 2001; KAWAHARA

*et al.*, 1994) e também de outros fungos tais como: *Acremonium coenophialum* (DAVIS *et al.*, 1986), *Alternaria alternata* (SEITZ & PAUKSTELIS, 1977),

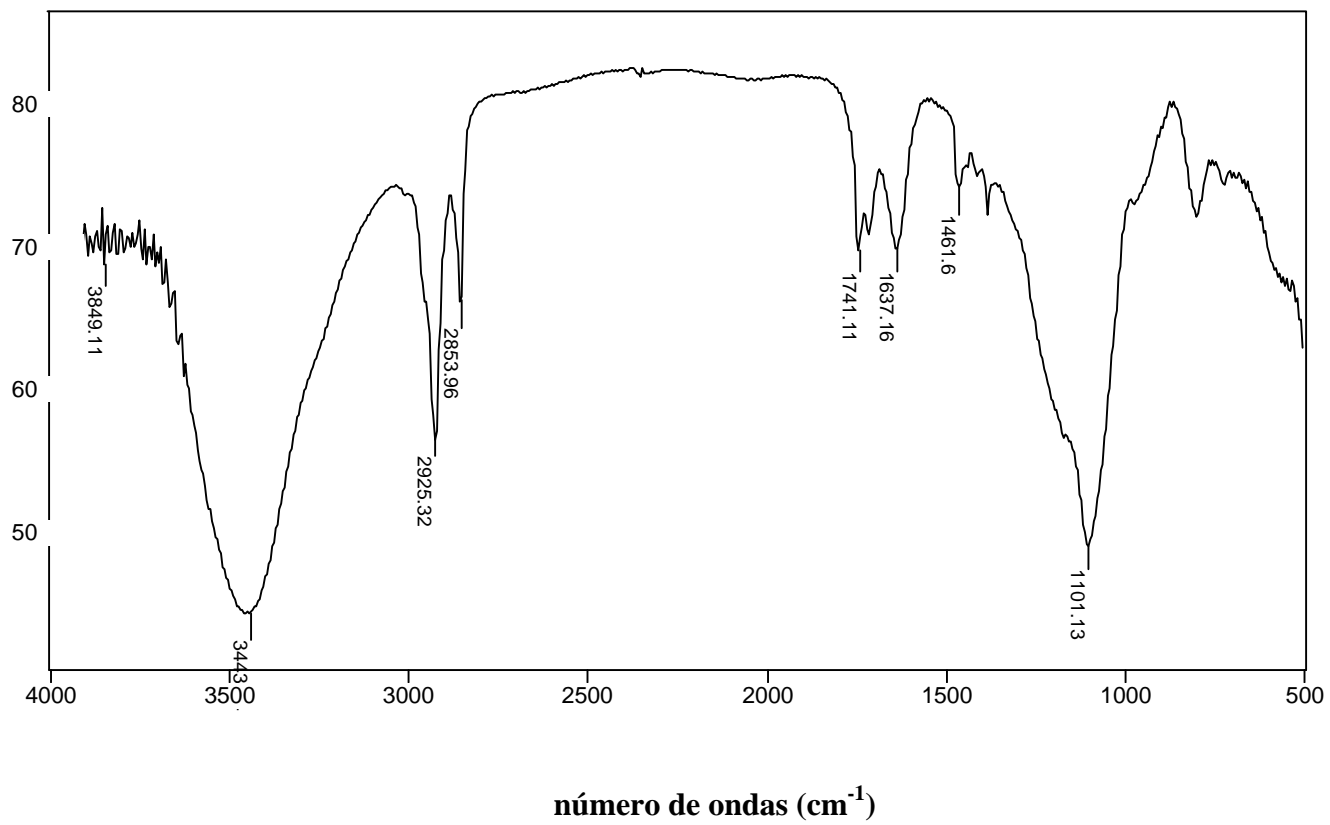


Figura 10. Espectro mo IV (NaCl) da fração CAE(3):2.

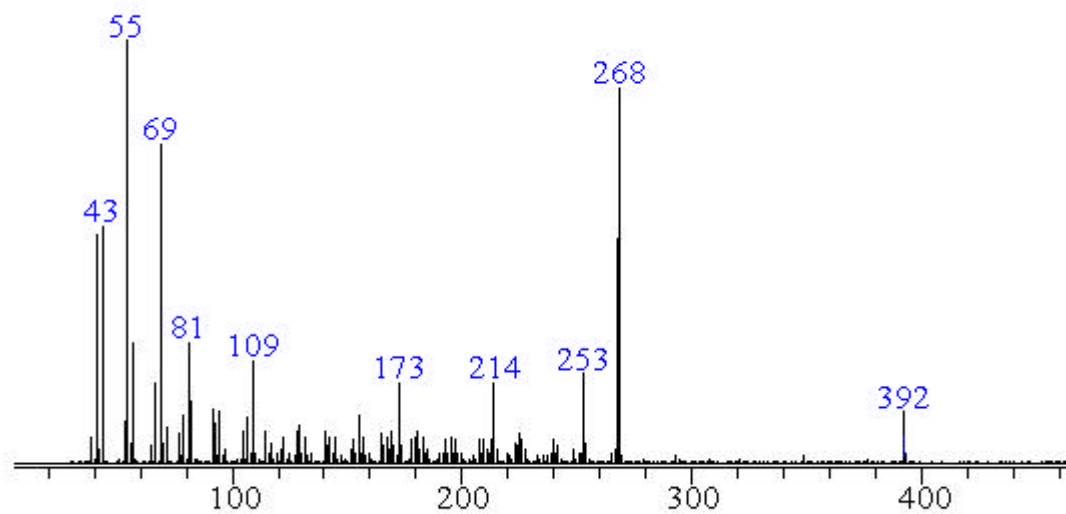


Figura 11. Espectro de massa do composto CAE(5):1(ergostetra- 4,6-8(14),22-en-3-ona).

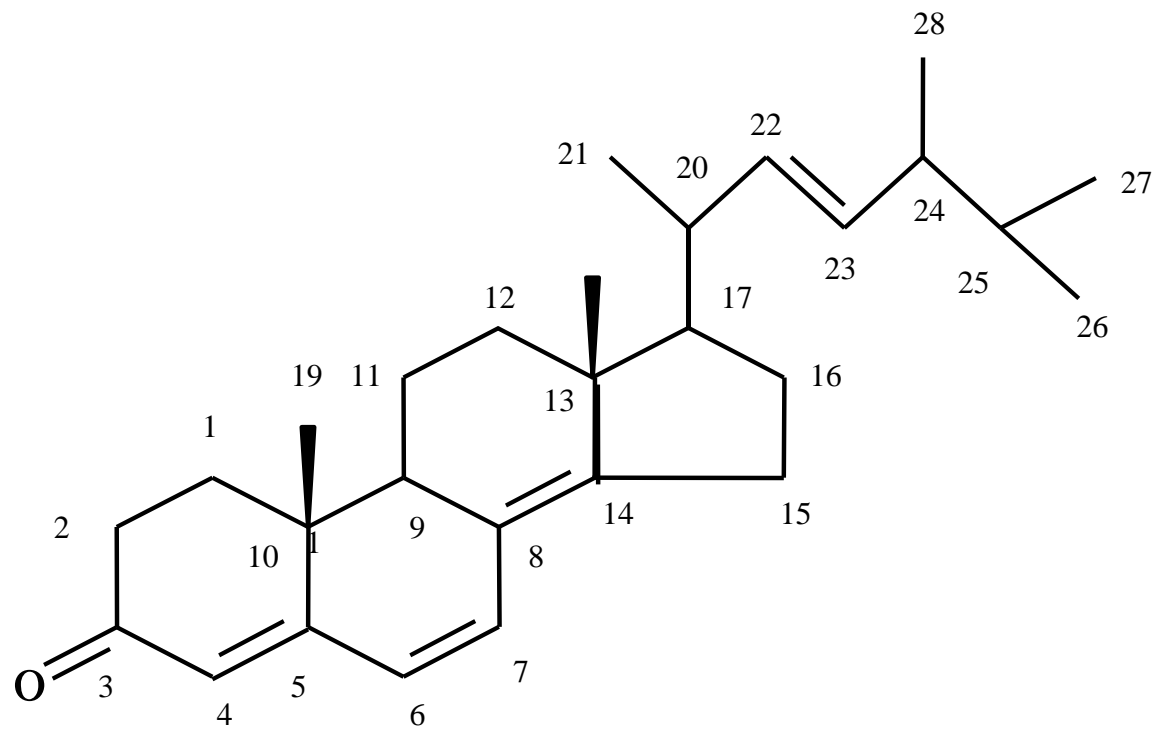


Figura 12. Fórmula estrutural do composto CAE(5):1, ergostatetra- 4,6-8(14),22-en-3-ona.

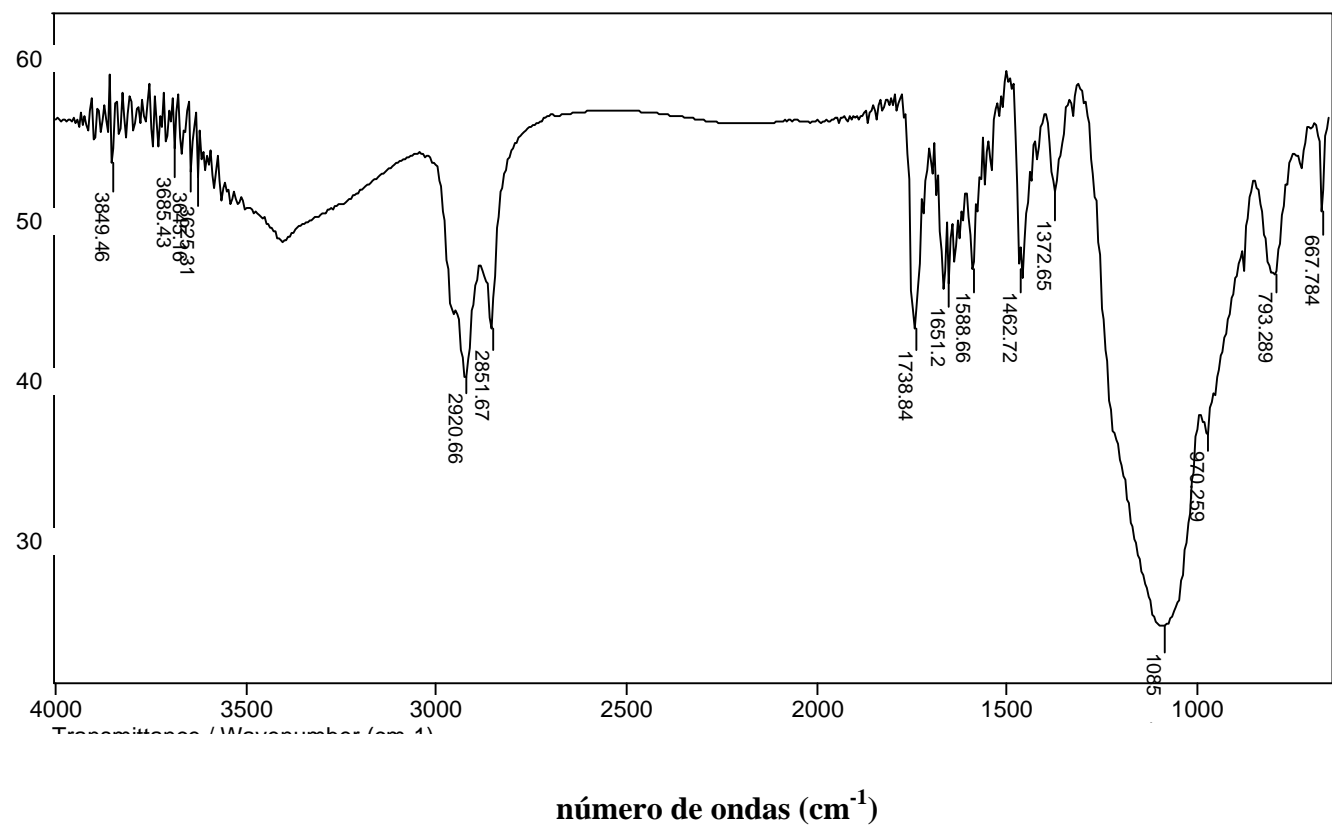


Figura 13. Espectro mo IV (NaCl) da fração CAE(5):1, ergostatetra- 4,6-8(14),22-en-3-ona.

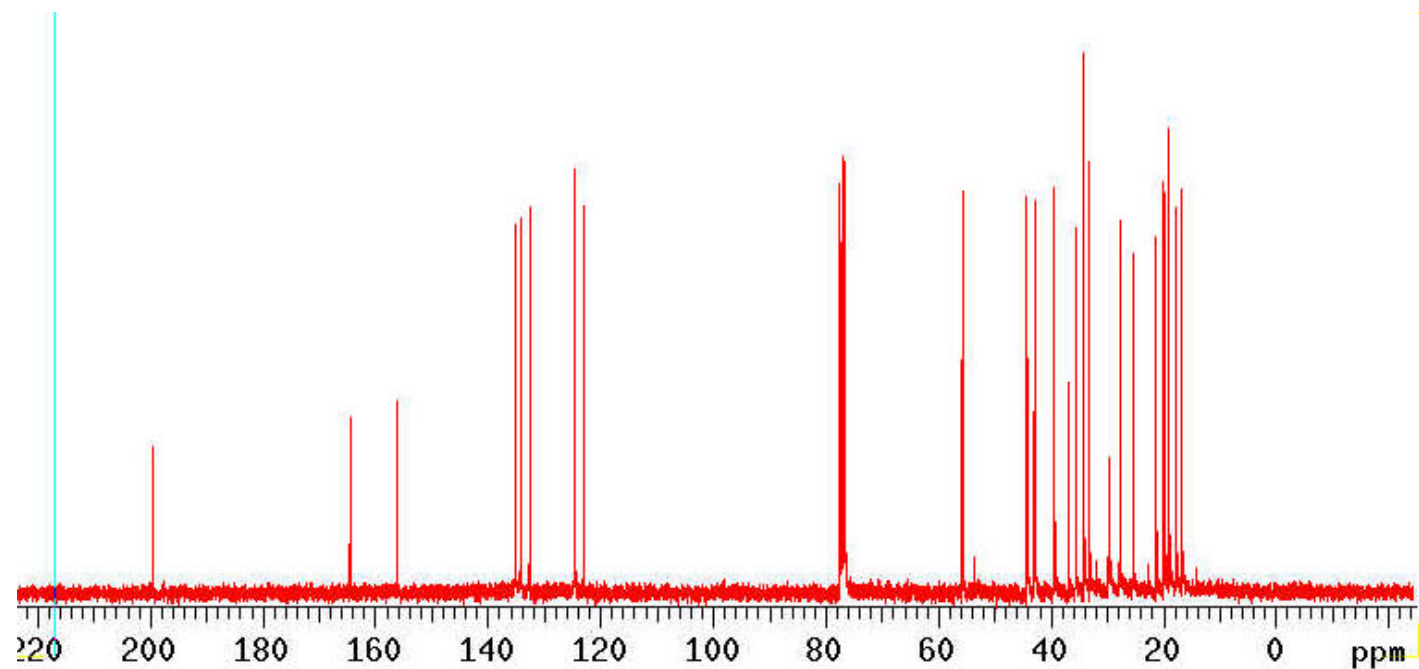


Figura 14 Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CAE(5):1 (ergostatetra- 4,6-8(14),22-en-3-ona).



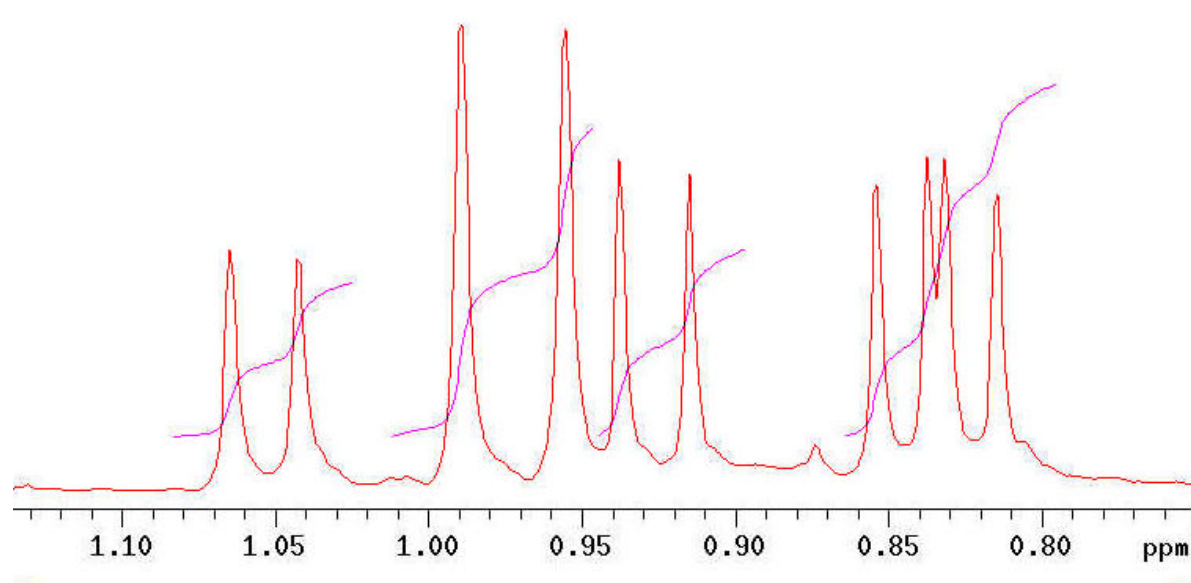


Figura 16. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da região compreendida entre 0,75-1,10 do composto CAE(5):1 (ergostatetra- 4,6-8(14),22-en-3-ona).

*Pleurotus ostreatus* (CHOBOT *et al.*, 1997), *Tuber indicum* (JINMING *et al.*, 2001) dentre outros. Assim, fica evidente que ergostatetra- 4,6-8(14),22-en-3-ona ocorre amplamente em fungos. Os esteróides podem atuar como constituintes de biomembranas e, possivelmente, também como precursores de hormônios esteroidais ou fitoalexinas (JINMING *et al.*, 2001). No entanto, maiores investigações para se determinar sua verdadeira função se fazem necessárias. Este composto foi, também, identificado em farinha de trigo mofada, armazenada em condições variáveis de temperatura e umidade. Desta forma, a detecção do composto ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona pode servir para indicar estágios iniciais de danos produzidos pelo mofo em cereais armazenados sob condições adversas (COOKS *et al.*, 1970). Outra ocorrência deste composto pode ser verificada em *Acremonium coenophialum* um fungo endofítico de gramínea e que está relacionado com a “síndrome de verão” exibida em gado (DAVIS *et al.*, 1986).

### **3.3.2. Estudo da fração CAE(1):3:**

As frações CAE(8): 1-19, CAE(8): 20-21 E CAE(8): 22-31, originadas da fração CAE(1):3, foram analisadas pr CG o sendo possível identificar hidrocarbonetos (undecano, pentadecano, hexadecano), esterés metílicos (oleato de metila, estearato de metila, linoleato de metila) e determinar a natureza esteroideal de alguns compostos. Devido a grande quantidade de impurezas apresentada e da complexidade das frações tornou-se inviável a identificação de novas estruturas.

A fração CAE(8):22-31 demonstrou por CCD menor complexidade para separação de seus constituintes. Desta forma, foi eluída em coluna e a partir da fração obtida CAE(9): 21-50 foi possível isolar um composto, denominado CAE(10):1. Através de análises espectroscópicas, foi constatado que se tratava do mesmo composto isolado da fração CAE(1):2. Novamente, o composto ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona (Figura 12) foi identificado como componente de outra fração.

Tabela 3- Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CAE(5):1 com dados obtidos da literatura para o ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona.

Carbonos	* RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz)	** RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz)	DEPT
1	34,9	34,0	$\text{CH}_2$
2	18,9	18,9	$\text{CH}_2$
3	199,2	199,5	C
4	122,9	122,9	CH
5	164,3	164,4	C
6	124,4	124,4	CH
7	133,9	134,0	CH
8	124,4	124,3	C
9	44,2	44,2	CH
10	36,7	36,7	C
11	25,3	25,3	$\text{CH}_2$
12	21,21	21,19	$\text{CH}_2$
13	34,0	29,6	C
14	156,0	156,1	C
15	35,5	35,5	$\text{CH}_2$
16	27,6	27,7	$\text{CH}_2$
17	55,6	55,6	CH
18	18,95	18,9	$\text{CH}_3$
19	16,6	16,6	$\text{CH}_3$
20	39,2	39,2	CH
21	21,1	21,1	$\text{CH}_3$
22	134,9	134,9	CH
23	132,5	132,4	CH
24	42,8	42,8	CH
25	33,0	33,0	CH
26	19,6	19,9	$\text{CH}_3$
27	19,9	19,6	$\text{CH}_3$
28	17,6	17,6	$\text{CH}_3$

\* Dados obtidos de JINMING *et al.*, 2001.

\*\* Dados obtidos do composto CAE(5):1.

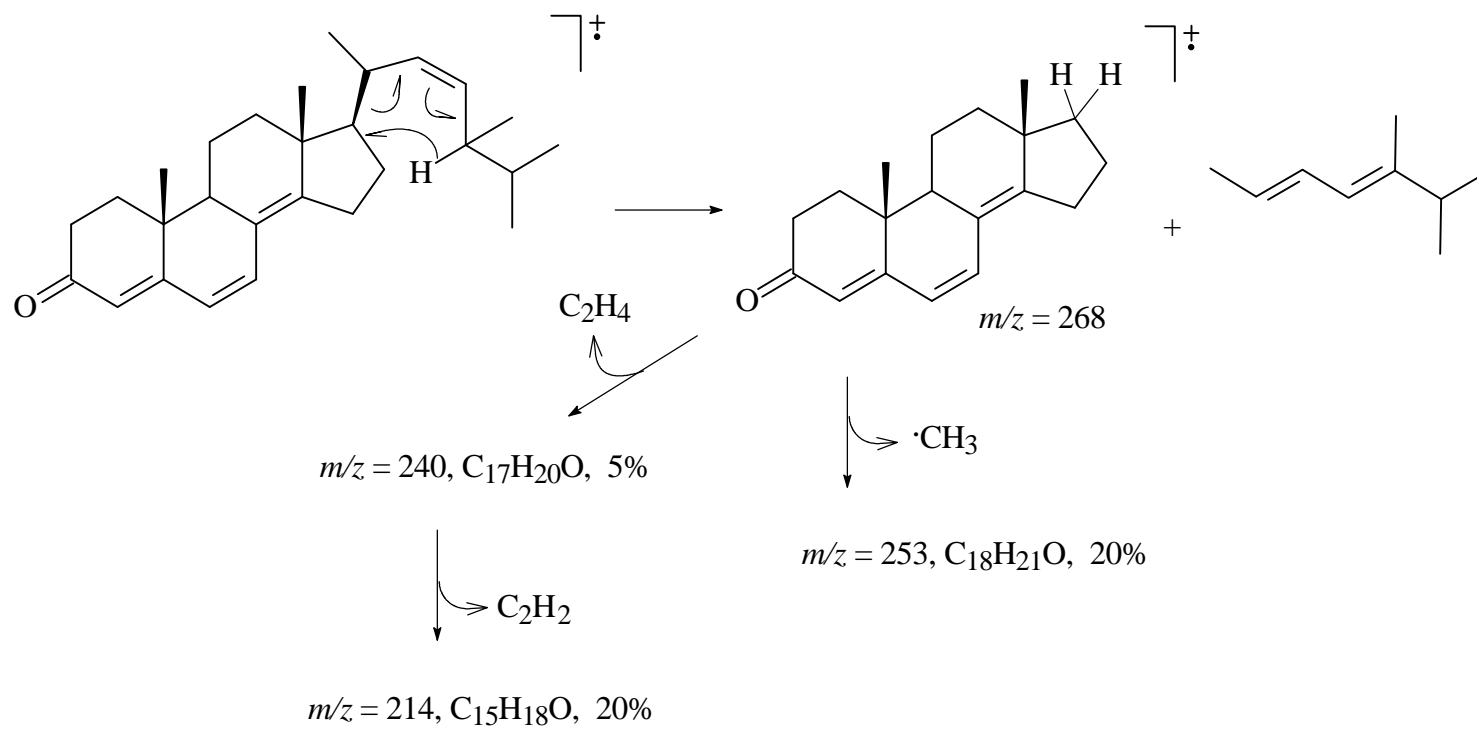


FIGURA 17. Fragmentação parcial do composto CAE(5):1, ergosta- 4,6-8(14),22-tetraen-3-ona.

### 3.4. Bioensaios

#### 3.4.1. Teste de inibição do desenvolvimento radicular de alface

O procedimento utilizado para avaliar o desenvolvimento radicular de alface foi escolhido uma vez que é bastante utilizado nos trabalhos de determinação de fitotoxicidade (MACÍAS *et al.*, 2000a; D`ABROSCA *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2002) e, por ser a alface uma espécie muito sensível que apresenta germinação rápida (YU e MATSUI, 1994) e respostas visíveis. Segundo COBB (1992), o “screening” aleatório é, sabidamente, uma prática de excelência que pode orientar a busca de novos compostos com atividade herbicida.

Desta forma, realizou-se o bioensaio para avaliar a inibição do desenvolvimento radicular de alface provocada pelos extratos CAE e CE, primeiramente a 100 ppm. Através dos dados obtidos não se constataram diferenças significativas entre o controle e os extratos CAE e CE nesta concentração (Tabela 4). Pelo teste de Tukey, observou-se que os valores de crescimento radicular não diferiram estatisticamente. Portanto, a 100 ppm, os extratos não são capazes de influenciar a germinação ou o crescimento das sementes de alface de forma significativa.

Em testes realizados com os extratos CAE e CE, na concentração de 1000 ppm, não foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos controle/CE e CE/CAE (Tabela 4). As interações dos valores de crescimento radicular para estes tratamentos não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. O tratamento com o extrato CE foi o que apresentou maior similaridade com os outros dois tratamentos (controle e CAE), o que torna seu nível de inibição pouco considerável. No entanto, o tratamento com CAE, apresentou em relação ao controle um grau de inibição considerável. MACÍAS *et al.* (1993), atestaram como significativa a inibição de 39% do crescimento radicular de alface provocado por imperatorin isolado de folhas de *Pilocarpus goudotianus*. Portanto, a 1000 ppm o extrato CAE foi capaz de influenciar na germinação das sementes de alface, retardando em aproximadamente 37% sua taxa de crescimento. Desta forma, ficou evidente que o extrato menos

polar, CAE, por ser o mais ativo na inibição do desenvolvimento radicular de alface foi aquele escolhido para se iniciar o fracionamento.

Tabela 4. Inibição do crescimento radicular de sementes de alface submetidas a bioensaio de difusão em meio sólido, utilizando-se os extratos CAE e CE, a 100 e 1000 ppm

tratamento	100 ppm		1000 ppm	
	comprimento das raízes (cm)*	% inibição	comprimento das raízes (cm)*	% inibição
controle	2,1 A	---	2,1 A	---
CE	1,9 A	12,8	1,8 AB	16,0
CAE	1,6 A	25,2	1,3 B	37,6

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P=0,05).

### 3.4.2. Avaliação da inibição da síntese de ATP pelos extratos CAE e CE

Os extratos CE e CAE foram submetidos a testes para avaliação da atividade sobre a síntese de ATP, em cloroplastos frescos isolados de folhas de espinafre. A síntese de ATP, no cloroplasto, é catalizada pela H<sup>+</sup>-ATPase associada com as membranas do tilacóide (ACHINE *et al.*, 1999a). Os cloroplastos podem sintetizar ATP, através do transporte de elétrons acíclico, com concomitante síntese de O<sub>2</sub> e NADPH, ou pelo transporte de elétrons cíclico, o qual não utiliza nenhum substrato, e nenhum outro produto, além de ATP é formado (BUCHANAM *et al.*, 2000). Com o intuito de confirmar a atividade fitotóxica da fração CAE realizou-se, também, o bioensaio para avaliar uma possível inibição da síntese de ATP.

Os extratos CE e CAE do fungo *C. cassicola* apresentaram efeito fisiológico, na síntese de ATP, em cloroplastos de espinafre. No entanto, como pode ser observado na Figura 18, o extrato CAE foi mais ativo na inibição da síntese de ATP do que o extrato CE. Os extratos CAE e CE causaram uma redução em 50% da atividade de síntese de ATP a 21,5 ppm e a 67 ppm, respectivamente. Observou-se, ainda, uma inibição de 100% na síntese de ATP, a 76 ppm, provocada pelo extrato

CAE. Já o extrato CE, apresenta valores próximos a zero, ou seja, uma inibição total da síntese de ATP numa concentração acima de 200 ppm. Desta forma, pode-se notar que uma atividade tão importante para a célula vegetal, como a síntese de ATP, pode ser comprometida de forma efetiva pela aplicação, principalmente, do extrato CAE. Este extrato demonstrou conter substância(s) fitotóxica(s) potencialmente interessante(s) do ponto de vista agrônomo. Este resultado confere com aquele obtido para a inibição do desenvolvimento radicular de alface onde o extrato CAE foi o mais eficiente. No entanto, somente no teste de inibição do desenvolvimento radicular de alface, na concentração de 1000 ppm, foi obtido resultado significativo. A inibição numa concentração alta poderia estar relacionada com a solubilidade do extrato, o qual foi solubilizado em metanol e, posteriormente, em água. O extrato mostrou-se solúvel em metanol, porém, não apresentou a mesma solubilidade em água. Sendo assim, essa concentração a 1000 ppm pode não representar a concentração real do extrato. Provavelmente, esperar-se-ia uma maior taxa de inibição caso o extrato fosse totalmente solúvel em água. A necessidade de menor concentração de extrato, no teste de síntese de ATP, pode também ser atribuída ao fato de que a aplicação do extrato ocorre diretamente no meio reacional. No teste de desenvolvimento radicular de alface o extrato precisa atravessar membranas, paredes celulares, até penetrar na célula. Desta forma, a eficiência da síntese de ATP fica aumentada, em relação ao teste de desenvolvimento radicular de alface. O extrato CE, também se mostrou de grande valor, apesar da sua menor eficiência no bloqueio da síntese de ATP.

### **3.4.3. Potencial herbicida dos extratos CAE e CE**

Apesar dos testes realizados com alface e na síntese de ATP terem revelado que os extratos CAE e CE apresentavam atividade inibitória, suas atividades sobre as espécies de plantas daninhas *Lolium multiflorum* e *Trifolium alexandrinum* e sobre as espécies de plantas cultivadas *Amaranthus hypochondriacus* e *Physalis ixocarpa* foram avaliadas. Desta forma, foram realizados bioensaios onde se determinou a porcentagem de inibição sobre a germinação, o desenvolvimento da parte aérea e da raiz.

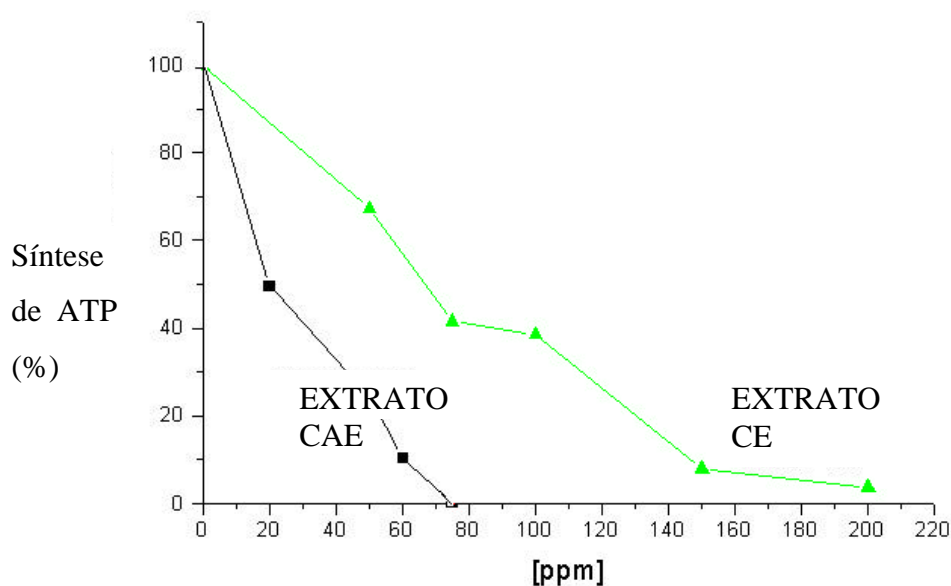


Figura 18. Avaliação da síntese de ATP dos extratos CAE e CE obtidos de arroz colonizado com *Corynespora cassiicola*.

Como mostrado na Tabela 5, a 50 ppm o extrato CAE de *C. cassiicola* inibiu o crescimento da raiz de *Physalis ixocarpa* em 42% e a germinação em 37%. No entanto, a 100 ppm, o extrato estimulou em 139% o crescimento da raiz e a 37% a germinação. A parte aérea, nas concentrações de 50 e 100 ppm, apresentou pouco efeito ao extrato CAE. Em *Trifolium alexandrinum* (Tabela 6), o extrato CAE, a 50 ppm, provocou uma redução de 34% do crescimento da raiz, e de 21 e 20% sobre a parte aérea e a germinação, respectivamente. Na concentração de 100 ppm o extrato CAE inibiu somente a raiz de forma significativa (29%). Nessa mesma concentração a inibição da parte aérea e da germinação pelo extrato não foi significativa. Em *Lolium multiflorum* (Tabela 7), o extrato CAE a, 50 ppm, promoveu inibição de 44% do crescimento da raiz, 27% da parte aérea e, não houve efeito significativo na germinação. A 100 ppm observou-se um estímulo na germinação pelo extrato, porém não houve um incremento significativo. A raiz e a parte aérea após aplicação do extrato a 100 ppm apresentaram valores de inibição próximos aos encontrados a 50 ppm (44% e 29%, respectivamente). Em *Amaranthus hypochondriacus* (Tabela 8), uma dicotiledônea, observou-se um efeito inibitório, não significativo, no crescimento da raiz (11%) e na germinação (17%) após aplicação do extrato na concentração de 50 ppm. Na mesma concentração de CAE somente a parte aérea

mostrou um estímulo no seu desenvolvimento, mas também não foi muito expressivo. Na concentração de 100 ppm do extrato, a inibição do crescimento da raiz, da parte aérea e da germinação das sementes de *A. hypochondriacus* não foram significativos. Os valores encontrados para a inibição a 100 ppm foram inferiores a 15%.

Assim, o extrato CAE mostrou-se eficiente ao promover estímulo somente da raiz da dicotiledônea *P. ixocarpa*, na concentração de 100 ppm. Os valores de inibição e estímulo em *A. hypochondriacus* não foram significativos. No entanto, a atividade inibitória do extrato foi mais significativa sobre as plantas daninhas *Physalis ixocarpa*, *T. alexandrinum* e *L. multiflorum*. A 50 ppm, essas espécies afetadas sofreram maior inibição o no desenvolvimento da raiz. A 100 ppm, em *T. alexandrinum* e *L. multiflorum*, novamente a raiz foi a porção mais inibida pelo extrato CAE. Em seguida, verificou-se para essas espécies o comprometimento da parte aérea pelo extrato. Como foi verificado o extrato CAE inibiu principalmente a raiz, o que sugere que sua aplicação em pré-emergência poderia ser uma forma eficiente de controle de espécies indesejáveis.

Da mesma forma, foi realizado o teste para se avaliar o potencial herbicida do extrato CE utilizando-se espécies daninhas e cultivadas de monocotiledôneas e de dicotiledôneas.

O extrato CE do fungo *C. cassiicola* estimulou de forma eficiente o crescimento da raiz de *P. ixocarpa* (Tabela 5), uma dicotiledônea, sem afetar eficientemente a parte aérea e a germinação, a 50 ppm. A 100 ppm, novamente o extrato promove estímulo significativo do crescimento da raiz (125%), porém houve uma inibição da germinação em cerca de 33%. O extrato, porém não afetou de forma expressiva a parte aérea nessa concentração. Esse extrato, no entanto, tem efeito inibitório em outra dicotiledônea: *T. alexandrinum* (Tabela 6). Observou-se a inibição sobre a germinação em aproximadamente 86%, e da parte aérea em cerca de 42%, ambos a 100 ppm. Não se observou inibição significativa da raiz a 100 ppm. A 50 ppm, o extrato praticamente não interferiu de forma relevante nesta espécie. Na espécie *L. multiflorum* (Tabela 7), o extrato promoveu inibição da raiz, da parte aérea e da germinação, a 50 e 100 ppm. No entanto, somente sobre a germinação, na concentração de 50 ppm, observou-se inibição considerável, com valor próximo a 58%. A 100 ppm, a raiz (48%), a parte aérea (57%) e a germinação (54%) sofreu

uma forte inibição pelo extrato CE. Finalmente, a 50 ppm, o extrato etanólico, em *A. hypochondriacus* (Tabela 8), uma dicotiledônea, estimulou o crescimento da raiz em 25% e os valores obtidos para o estímulo no crescimento da parte aérea e inibição da germinação não foram significativos. A 100 ppm, houve uma maior ativação do crescimento da raiz do que a 50 ppm, sendo que este aumentou cerca de 31%, em relação ao controle. A parte aérea não sofreu qualquer alteração, em relação ao controle, a 100 ppm. Já a inibição da germinação a 100 ppm, assim como ocorreu a 50 ppm, não foi expressiva.

Novamente, a atividade inibitória do extrato CE foi mais significativa sobre as plantas daninhas, a dicotiledônea *T. alexandrinum* e a monocotiledônea *L. multiflorum*. Porém, esse efeito foi mais expressivo sobre a germinação para ambas as espécies. Portanto, novamente as mesmas espécies de plantas daninhas se mostraram sensíveis à aplicação de extrato. Comparando-se os efeitos das atividades dos extratos CAE e CE, verificou-se que o extrato CE apresentou um melhor desempenho, visto que os percentuais de inibição obtidos da sua aplicação foram mais expressivos. No entanto, o extrato CAE também se mostrou interessante sobre o ponto de vista fitotóxico. Segundo MACÍAS *et al.* (2000c), uma taxa mínima de inibição de 40% poderia ser considerado de grande importância sobre o ponto de vista fitotóxico.

Tabela 5. Efeito do extrato em acetato de etila (CAE) e o extrato etanólico (CE), a 50 e 100 ppm, sobre o comprimento das raízes, da parte aérea e sobre a germinação de sementes de *Physalis ixocarpa*\*

Extrato	Raiz (%)		Parte aérea (%)		Germinação (%)	
	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm
CAE	-42	+ 139	-13	-7	-37	+ 7
CE	+ 122	+ 125	+ 4	-4	-11	-33

\* +: estímulo; -: inibição; 0: controle.

Tabela 6. Efeito do extrato em acetato de etila (CAE) e o extrato etanólico (CE), a 50 e 100 ppm, sobre o comprimento das raízes, da parte aérea e sobre a germinação de sementes de *Trifolium alexandrinum*\*

Extrato	Raiz (%)		Parte aérea (%)		Germinação (%)	
	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm
CAE	-34	- 29	- 21	- 13	-20	- 6
CE	+ 7	- 12	+ 6	- 43	-14	- 86

\* +: estímulo; -: inibição; 0: controle.

Tabela 7. Efeito do extrato em acetato de etila (CAE) e o extrato etanólico (CE), a 50 e 100 ppm, sobre o comprimento das raízes, da parte aérea e sobre a germinação de sementes de *Lolium multiflorum*\*

Extrato	Raiz (%)		Parte aérea (%)		Germinação (%)	
	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm
CAE	- 44	- 44	-27	- 29	- 7	+ 4
CE	- 21	- 48	- 6	- 57	- 58	- 54

\* +: estímulo; -: inibição; 0: controle.

Tabela 8. Efeito do extrato em acetato de etila (CAE) e o extrato etanólico (CE), a 50 e 100 ppm, sobre o comprimento das raízes, da parte aérea e sobre a germinação de sementes de *Amaranthis hypochondriacus*\*

Extrato	Raiz (%)		Parte aérea (%)		Germinação (%)	
	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm	50 ppm	100 ppm
CAE	- 11	- 15	+ 7	-8	-17	-12
CE	+ 25	+ 31	+ 6	0	- 2	- 15

\* +: estímulo; -: inibição; 0: controle.

#### 3.4.4. Inibição do desenvolvimento radicular de alface das frações obtidas do extrato CAE

Uma vez que o extrato CAE apresentou em todos os testes, maior atividade que o extrato CE, o mesmo foi submetido a fracionamento em coluna filtrante de sílica gel, resultando na obtenção de seis frações: CAE(1):1; CAE(1):2; CAE(1):3; CAE(1):4; CAE(1):5; CAE(1):6. Considerando que o teste de inibição do desenvolvimento radicular de alface, como mencionado anteriormente, tem como objetivo direcionar o estudo das frações, à medida que o extrato inicial foi sendo fracionado, procurou-se realizar testes que poderiam aumentar a eficiência na busca de fitotoxinas. Sendo assim, novamente foi utilizado o teste de desenvolvimento radicular de alface a fim de avaliar a fitotoxicidade das frações CAE(1):1; CAE(1):2; CAE(1):3; CAE(1):4; CAE(1):5 e CAE(1):6.

As diferenças obtidas neste bioensaio não foram significativas para muitas das frações obtidas a partir do extrato CAE, a 1000 ppm (Tabela 9). A fração CAE(1):3 foi a que apresentou maior distanciamento em relação ao controle. Este tratamento chegou a inibir em aproximadamente 42 % o crescimento radicular. As frações CAE(1):1 e CAE(1):2, apesar de apresentarem-se estatisticamente similares à demais, proporcionaram um alto grau de inibição do crescimento das raízes de alface. As frações CAE(1):1 e CAE(1):2 afetaram em aproximadamente 35 e 37 %,

respectivamente, o nível de crescimento da alface. A similaridade dos outros tratamentos torna seu nível de inibição pouco significativo. Portanto, a 1000 ppm a fração CAE(1):3, obtida do extrato CAE inibiu consideravelmente a alface, acompanhado pelas frações CAE(1):1 e CAE(1):2.

Tabela 9. Inibição do crescimento radicular de sementes de alface submetidas a bioensaio de difusão em meio sólido, das frações obtidas de CAE, a 1000 ppm

tratamento	comprimento das raízes (cm)*	% inibição
controle	1,8 A	---
CAE(1):5	1,7 AB	3,8
CAE(1):4	1,6 AB	6,6
CAE(1):6	1,6 AB	8,3
CAE(1):1	1,1 AB	35,5
CAE(1):2	1,1 AB	37,2
CAE(1):3	1,0 B	42,2

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P=0,05)

### 3.4.5. Avaliação da inibição da síntese de ATP pelas frações do extrato CAE

As frações obtidas do fracionamento em coluna filtrante foram submetidas também ao teste de síntese de ATP para determinar sua possível fitotoxicidade.

Na Figura 19, observa-se que as frações do extrato CAE do fungo *C. cassiicola* apresentaram efeito fisiológico na síntese de ATP em cloroplastos de espinafre. As frações do extrato CAE(1):1, CAE(1):2 e CAE(1):3 foram as mais ativas na inibição da síntese de ATP, respectivamente. As frações CAE(1):4, CAE(1):5 e CAE(1):6 não apresentaram valores significativos de inibição. As frações CAE(1):1 e CAE(1):2, ocasionaram redução em 50% da atividade de síntese de ATP a 15,5 ppm e a 21,9 ppm, respectivamente. Estas frações causaram uma inibição total da síntese de ATP numa concentração acima de 100 ppm. Desta forma, pode-se confirmar que a síntese de ATP pode ser comprometida de forma eficiente pela aplicação do extrato CAE, de onde derivam estas frações. As frações CAE(1):1

e CAE(1):2, portanto, são as mais importantes do ponto de vista fitotóxico, já que demonstraram conter substância(s) fitotóxica(s).

A síntese de ATP pode ser inibida em qualquer etapa da cadeia transportadora de elétrons. Deste modo, para elucidar o mecanismo de ação sobre a fotossíntese, dever-se-ia investigar seus efeitos sobre o transporte de elétrons (basal, fosforilação e desacoplado) (ACHINE et al., 1999a; CHAVEZ et al., 2001). No entanto, a concentração necessária para as frações CAE(1):1, CAE(1):2 e CAE(1):3 afetarem a síntese de ATP já é um bom indicativo de considerável atividade biológica.

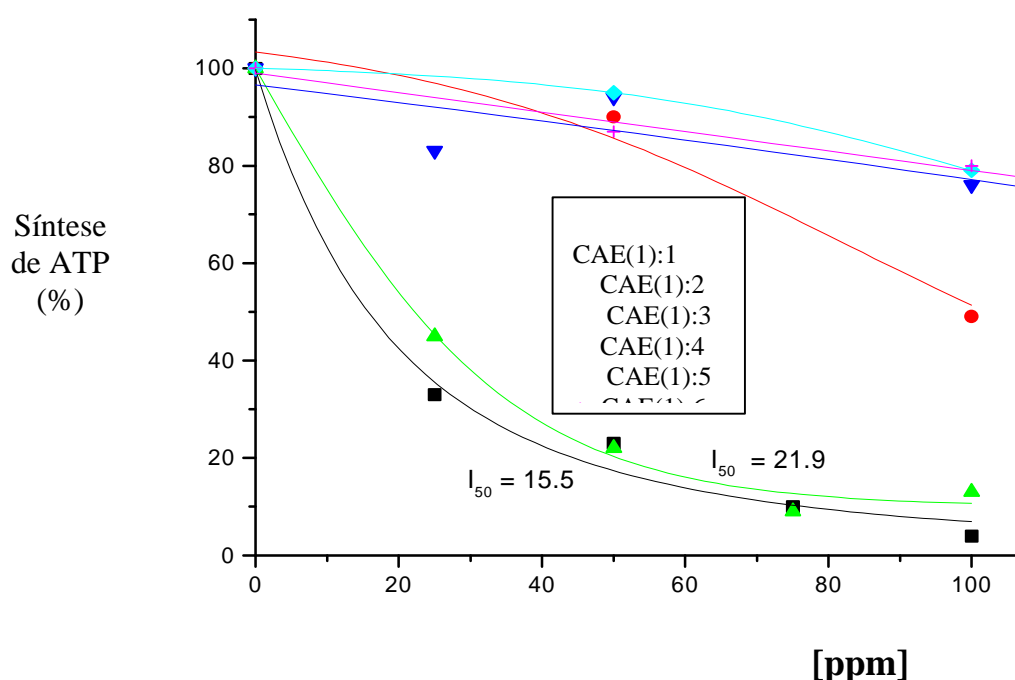


Figura 19. Avaliação da síntese de ATP das frações do extrato CAE obtido de arroz colonizado com *C. cassiicola*.

### 3.4.6. Avaliação da inibição da síntese de ATP pelo composto ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona

Através de avaliação da síntese de ATP (Figura 20) observou-se inibição de 70% desta atividade, causada pelo composto ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona, a 200 ppm. A fotofosforilação pode ser afetada pela inibição da cadeia redox, o complexo H<sup>+</sup>-ATPase ou por desacoplamento (ACHINE et al., 1999b). Para elucidar

o seu modo de ação, novos testes devem ser realizados tais como: fluxo de elétrons, liberação de prótons, etc. No entanto, este valor está dentro de um espectro de ação de compostos considerados fitotóxicos. Uma vez que o composto ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona é proveniente da fração CAE(1):2 de comprovada ação fitotóxica, devido a presença de ésteres de ácidos graxos, fica comprovada também a participação deste composto na toxicidade desta fração

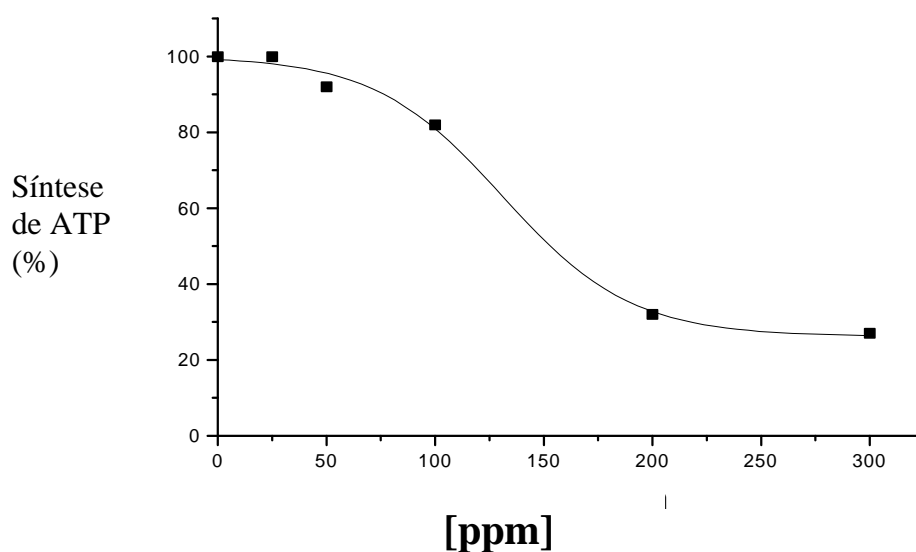


Figura 20. Avaliação da síntese de ATP do composto CAE(5):1, ergosta-4,6-8(14),22-tetraen-3-ona.

#### 3.4.7. Avaliação da inibição da síntese de ATP pelas frações CAE(8): 1-19, CAE(8): 20-21 E CAE(8): 22-31

As frações CAE(8): 1-19, CAE(8): 20-21 e CAE(8): 22-31 (Figura 21), originadas da fração CAE(1):3, demonstraram uma atividade significativa na inibição da síntese de ATP. Estas frações inibiram, a 50 ppm, cerca de 70, 80 e 65 %, respectivamente. Estes resultados sugerem uma alta atividade fitotóxica destas frações. Nessas frações foram identificados hidrocarbonetos, esterés metílicos e também, foi determinada a natureza esteroideal de alguns compostos. Novamente, a

presença de ácidos graxos e de esteróides nestas frações podem estar contribuindo para sua fitotoxicidade.

O composto ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona (Figura 12) foi novamente identificado, porém desta vez, da fração CAE(8):22-31, demonstrando que ele provavelmente pode ser um dos principais componentes do extrato CAE. Sua taxa de inibição da síntese de ATP, a 100 ppm, demonstra que ele também participa de forma eficaz na atividade fitotóxica da fração na qual ele se encontra.

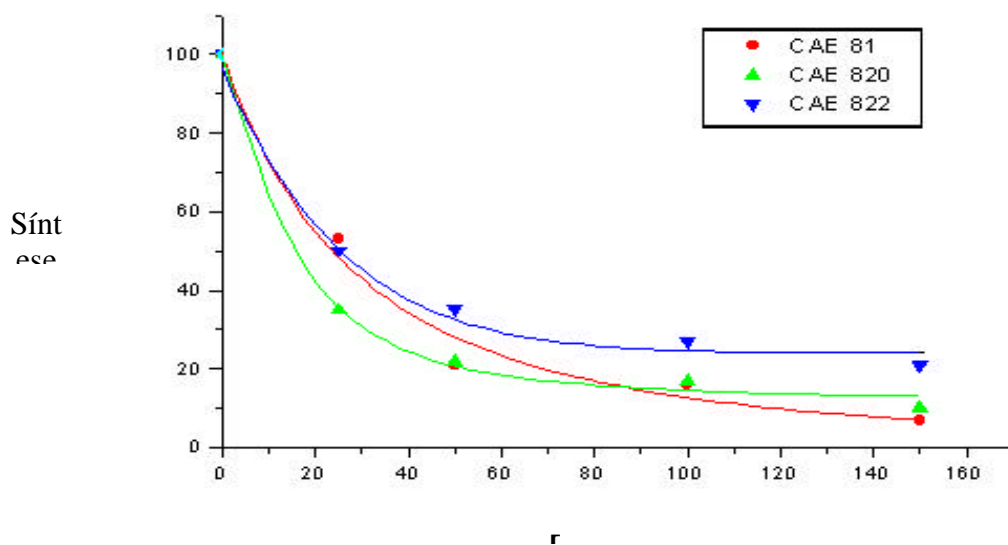


Figura 21. Avaliação da síntese de ATP dos extratos CAE(8): 1-19,

#### 4. CONCLUSÕES

Por meio de testes biológicos dos extratos do fungo *Corynespora cassiicola* pode ser revelada sua fitotoxicidade e atribuir esta atividade aos ácidos graxos e ao esteróide isolado nas frações analisadas. As frações e os compostos isolado submetidos à ensaios biológicos, apresentaram atividades fitotóxicas em teste preliminares de germinação, crescimento de parte aérea, crescimento da raiz e sobre a síntese de ATP, sendo que outros testes deverão ser realizados, posteriormente.

Uma vez identificados, os ácidos graxos das frações CAE(1):1 e CAE(1)2, sua contribuição na fitotoxicidade destas frações pode ser comprovada através de bioensaios monitorados. O composto isolado ergostatetra-4,6-8(14),22-en-3-ona é de ocorrência comum em fungos e também apresentou atividade fitotóxica. Sua presença nas frações CAE(1):2 e CAE(1):3 pode indicar que ele contribui, de forma significativa, na toxidez dessas frações.

A fração CE também mostrou conter substâncias tóxicas que deverão ser, posteriormente, isoladas e avaliadas sob ponto de vista fitotóxico.

Novos fracionamentos deverão ser realizados, a fim de identificar compostos que possam atuar como substâncias inibitórias do crescimento e desenvolvimento de plantas. Os extratos do fungo *C. cassiicola* isolado de tomateiro apresentam uma gama de metabólitos, os quais não puderam ser totalmente explorados e, portanto, novos estudos deverão ser realizados no futuro.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHINE, L.; MATA, R.; LOTINA-HENNSEN, B. Interference of the natural product 7-oxo-7-deacetoxygedunin with CF<sub>0</sub> of H<sup>+</sup>-ATPase of spinach chloroplasts. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 63, p. 139-149, 1999a.
- ACHINE, L.; MIRANDA, R. P.; PRIETO, R. I.; SÁNCHEZ, R. M.; HENNSEN, B. L. Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 246-252, 1999b.
- ALSAADAWI, I. S.; RICE, E. L.; KARNS, T. K. B. Allelopathic effects of *Polygonum aviculare* L. – Isolation, characterization, and biological activities of phytotoxins other than phenols. **Journal of Chemical Ecology**, v.9, n°6, p. 761-774, 1983.
- ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. Insecticide of plant origin. **ASC Symposium Series**, 387, 1989.
- BRETON, F.; SANIER, C.; D`AUZAC, J. Role of cassicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal of a leaf fall disease of *Hevea*. **J. Rubb. Res.**, v.3, n°2, p. 115-128, 2000.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. United States: Courier Companies, 1367 p., 2000.
- CALVO, A. M.; HINZE, L. L.; GARDNER, H. W.; KELLER, N. P. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p. 3668-3673, 1999.
- CHAVEZ, R. M.; PRIETO, R. I.; HENNSEN, B. L. Annonaceous acetogenins: naturally occurring inhibitors of ATP synthesis and photosystem II in spinach chloroplasts. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 262-268, 2001.
- CHOBOT, V.; OPLETAL, L.; JAHODAR, L.; PATEL, A. V.; DACKE, C. G.; BLUNDEN, G. **Phytochemistry**, v. 45, n° 48, p. 1669-1671, 1997.

- COBB, A. Ergosta-6,8,22-tetraen-3-one from the edible fungus, *Pleurotus ostreatus* (oyster fungus) **Herbicides and Plant Physiology**. London: Chapman & Hall Limited, p.176, 1992.
- COOKS, R. G.; DAFTARY, R. D.; POMERANZ, Y. Changes in mold-damaged wheat flours stored at various temperatures: 4, 6,8 (14), 22- ergostatetraen-3-one and its C<sub>24</sub>- ethyl analog. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 18, n° 4, p.620-623, 1970.
- D'ABROSCA, B. ; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, PIETRO; PREVITERA, L.; SIMONET, . M.; ZARELLI, A. Potencial allelochemicals from *Sambucus nigra*. **Phytochemistry**, v 58, p. 1073-1081, 2001.
- DAKSHINI, K. M. M. & EINHELLIG, F. A. **Allelopathy: Organisms, processes and applications**. American Chemical Society, Washington, 382 p., 1995.
- DAVIS, N. D.; COLE, R. J.; DORNER, J. W.; WEETE, J. D.; BACKMAN, P. .A.; CLARK, E. M.; KING, C. C.; SCHIMIDT, S. P.; DIENER, U. L. Steroid Metabolites of *Acremonium coenophialum*, a endophyte of tall fescue. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 34, p. 105-108, 1986.
- DUARTE, M. L. R.; ASANO, S.; ALBUQUERQUE, F. C. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolados de *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 205- 214, 1983.
- DUKE, O. S.; ABBAS, H. K.; AMAGASA, T.; TANAKA, T. Phytotoxins Of Microbial Origin With Potential For Use As Herbicides. In: COPPING, L. G. (Ed.). **Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p.82-113, 1996.
- DUKE, S. O.; VAUGHNM K. C.; CROOM, E. M.; ELSOHLY, H. N. Artemisinin, a constituent of annula wormwood (*Artemisia annua*) is a selective phytotoxin. **Weed Science**, v.35, p.499-505, 1987.
- EINHELLIG, F. A.; SCHON, M. K.; RASMUSSEN, J. A. Synergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. **Journal Plant Growth Regulators**, 1(4), P. 251-258, 1983.
- GREAVES, M. P. Microbial herbicides: factors in development. In: COPPING, L. G. (Ed.). **Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p.444-467, 1996.
- JINMING, G.; LIN, H.; JIKAI, L. A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. **Steroids**, v. 66, p. 771-775, 2001.
- KAWAHARA, N; SEKITA, S.; SATAKE, M. Steroids from *Calvatia cyathiformis*. **Phytochemistry**, v. 37, n°1, p. 213-215, 1994.

- KIMURA, Y.; MISUNO, T.; SHIMADA, A. Penedione and penihydrone, new plantgrowth regulators produced by the fungus *Penicillium sp.* **Tetrahedron**, v.38, n° 3, p.469-472, 1997.
- MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 48, p. 2512-2521, 2000a.
- MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; CASTELLANO, D.; VELASCO, R. F. Sesquiterpene lactonas with potential use as natural herbicide models. 2. Guaianolides. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 48, p. 5288-5296, 2000b.
- MACÍAS, F. A.; SIMONET, A. M.; PACHECO, P. C.; BARRETO; A. F.; CABRERA, E.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, DAVID. Natural and synthetic podolactones with potential use as natural herbicide models. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 48, p. 3003-3007, 2000c
- MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; CASTELLANO, D.; G.M., MASSANET; F. RODRIGUEZ-LUIZ; ZUBÍA, E. Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n° 7, p. 1371-1379, 1993.
- MACÍAS, F. A.; SIMONET, A. M.; PACHECO, P. C.; BARRETO; A. F.; CABRERA, E.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, DAVID. Natural and synthetic podolactones with potential use as natural herbicide models. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 48, p. 3003-3007, 2000c.
- ONERISORAN, P. T.; MABUNI, C. T.; DURBIN, R. D.; MORIN, R. B.; RICH, D. H.; ARNY, D. C. Toxin production by *Corynespora cassiicola*. **Physiology Plant Pathology**, v.5, p. 289-295, 1975.
- PEREIRA, J.M. *Prosopodium tuberculatum e Corynespora cassiicola como agentes de biocontrole de Lantana camara*. 2001. 64 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PEREIRA, J.M. & BARRETO, R.W. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. **Mycopathology**, v. 151, p. 71-80, 2000.
- PEREIRA, J.M.; BARRETO, R.W.; ELLISON, C. A.; MAFFIA, L. A. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. **Biological Control**, v. 26, p. 21-31, 2003.
- PILLMOOR, J. B. Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. **Pesticide Science**. v.52, p.75-80, 1998.

- PILLMOOR, J. B.; WRIGHT, K.; TERRY, A. D. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. **Pesticide Science**, v. 39, p.131, 1993.
- ROEDER, P. E.; SARGENT, M. L.; BRODY, S.; Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: oscillations in fatty acids. **Biochemistry**, v. 21, p. 4909-4916, 1982.
- ROMAGNI, J. G.; MEAZZA, G.; NANAYAKKARA, D. DAYAN, F. E. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **FEBS Letters**, v. 480, p. 301-305, 2000.
- SEITZ, L. M. & PAUKSTELIS, J. V. Metabolites of *Alternaria alternata*: Ergosterol and ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 25, n°4, p. 838-841, 1977.
- SILVA, W.P.K.; DEVERALL, B.J.; LYON, B.R. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantation in Sri Lanka. **Plant Pathology**, v.47, p.267-277, 1998.
- SPENCER, J. A. & WALTER, H. J. Variations in certain isolates de *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v.59, p.58-60, 1969.
- STONARD, R. J. & MILLER-WIDEMAN, M. A. Herbicides and plant growth regulators. In: Godfrey, C. R. A. (Ed.). **Agrochemicals from Natural Products**. New York, p.285-310, 1995.
- TSO, T.C. Plant-growth inhibition by some fatty acids and their analogues. **Nature**, v.2, p.511-512, 1964.
- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. Biochemical basis for wheat seedling allelopathy on the suppression of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 50, p. 4567-4571, 2002.
- YU, J. Q.; MATSUI, Y. Phytotoxic substances in root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v.20, p. 21-31, 1994.

## CAPÍTULO 2

### ALTERAÇÕES ANATÔMICAS EM *Lantana camara* L. (VERBENACEAE) CAUSADAS POR *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. f. sp *lantanae*

#### 1. INTRODUÇÃO

A Família Verbenaceae é composta de cerca de 100 gêneros e 2600 espécies de distribuição pantropical e, somente um limitado número de espécies ocorre em regiões temperadas (CRONQUIST, 1981). METCALFE & CHALK (1957) e SOLEREDER (1908) descreveram a anatomia da família Verbenaceae com destaque para alguns gêneros dentre os quais incluí-se o gênero *Lantana*. JUDD *et al.* (1999) contabilizou cerca de 150 espécies para o gênero *Lantana*. *Lantana* L. (do latim *lento*), provavelmente, derivou de um ancestral de nome latim do gênero *Viburnum*, o qual assemelha-se na folhagem e inflorescência (GHISALBERTI, 2000).

O gênero *Lantana* é nativo da América tropical e subtropical e, algumas poucas espécies são nativas da Ásia e da África tropical. *Lantana camara* L. (Figura 1), foi levada do Brasil para a Holanda, e daí para outros países da Europa, e para a América do Norte (GHISALBERTI, 2000). Segundo SANDERS (1946), algumas espécies de *Lantana* são utilizadas como plantas ornamentais, o que facilitou sua dispersão pelo mundo.

*Lantana camara* L., é uma planta daninha conhecida como lantana que infesta milhões de hectares de pastagens e terras produtivas em aproximadamente 47 países (HOLM *et al.*, 1977). *L. camara* L. é, inevitavelmente, um problema e nenhum

avanço significativo tem sido feito para o seu controle, por isso a planta está se espalhando mais a cada ano (SHARMA et. al., 1988). No Brasil, *L. camara* L. está incluída em todas as listas de daninhas brasileiras, mas isso é devido quase totalmente à toxicidade de suas folhas e sementes para muitos animais domésticos (BARRETO, 1995). *L. camara* L. é uma das dez mais nocivas daninhas do mundo, sendo considerada tóxica para animais e exercendo efeito alelopático em vegetação vizinha (SHARMA et. al., 1988). A planta não é comida facilmente pelo gado, porém, o envenenamento ocorre comumente em tempo de seca, quando o gado faminto é levado a pastar em áreas onde a planta ocorre. A intoxicação provoca distúrbio no fígado ocasionando fotossensibilização e icterícia, sendo responsável por perda do gado, devido à mortalidade, por abortos e torna inviável a utilização do leite (SEAWRIGHT, 1963).

Tentativas de controle de *L. camara* L. têm sido feitas usando meios mecânicos, químicos e biológicos, os quais apresentaram limitado sucesso (SHARMA et. al., 1988). Na África, tem se realizado vários estudos na tentativa de detectar insetos que seriam seus inimigos naturais (BAARS, 2003), enquanto que na Austrália a liberação de inimigos naturais tem sido utilizada para o controle biológico de *L. camara* L. (PALMER, 2000). Embora as tentativas de controle biológico desta planta tenha envolvido exclusivamente insetos fitófagos, existem muitas doenças nessa planta daninha causadas por fungos que poderiam ser aproveitados (BARRETO et al., 1995). Certamente, os fungos podem ser usados para o controle de plantas daninhas, e em alguns casos, são mais eficazes que os herbicidas químicos (TEMPLETON & TEBEEST, 1979). Uma estratégia empregada para o controle de daninhas é a utilização de bioherbicidas, produtos biotecnológicos que oferecem uma alternativa não química para o controle de plantas daninhas, com a vantagem de reduzir os resíduos químicos no ambiente. Desta forma, com a redução do uso de herbicidas químicos, seriam também reduzidos os perigos para os humanos e para o meio ambiente (SAXENA & PANDEY, 2002).

Recentemente, PEREIRA & BARRETO (2000), relataram a ocorrência do fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. atacando a planta daninha *L. camara* L., sendo o fungo em lantana, posteriormente, reconhecido como específico para o gênero *Lantana* e identificado como *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae* /Ccl (PERREIRA et al., 2003) . As plantas foram encontradas em Estância Betânia e Guaraguaçu, no estado do Paraná. Com base na observação da agressividade do

fungo nesta planta, suspeitou-se que este produziria uma toxina hidrossolúvel de natureza incerta (PEREIRA, 2001; PEREIRA *et al.*, 2003). A primeira evidência de uma substância fitotóxica produzida por *C. cassiicola* foi relatada por ONESIROSAN *et al.* (1975). Segundo este autor, a alta virulência de determinados isolados do fungo pode estar associada à capacidade genética de causar infecção e produzir níveis relativamente altos de toxinas.

De acordo com PEREIRA (2001), foram observadas lesões foliares em indivíduos da espécie *L. camara* L., levando à desfolha da planta infectada. Esse foi o primeiro relato da presença de *C. cassiicola*, um fungo mitospórico, agente causal da mancha alvo (Target Spot), nessa planta no Brasil. *C. cassiicola* é uma espécie cosmopolita, especialmente abundante nos trópicos, onde atinge um grande número de plantas hospedeiras sendo reconhecido como patógeno em caupi, pepino, melão, gergelim, soja, etc. (ELLIS, 1971). No entanto, alguns estudos têm indicado que *C. cassiicola* é uma espécie complexa, incluindo populações específicas em relação a seus hospedeiros (ONESIROSAN *et al.*, 1975; SILVA, *et al.*, 1998; SPENCER & WALTERS, 1969). Outras plantas de importância econômica, na qual *C. cassiicola* é freqüentemente encontrado como patógeno são: mandioca, mamão, seringueira e tomate (ELLIS, 1971). No Sri Lanka, o fungo se espalhou em toda área de produção de borracha tornando-se a mais destrutiva doença foliar nesta cultura no país. (SILVA *et al.*, 1998).

Considerando-se que a natureza da interação patógeno-hospedeiro no patossistema *C. cassiicola* f. sp. *lantanae* x *L. camara* não foi ainda documentada adequadamente, e considerando a potencial aplicação deste fitopatógeno no controle biológico desta espécie daninha, elegeram-se como objetivos deste trabalho avaliar se as alterações anatômicas, em folhas da espécie daninha *L. camara* L. provocadas pelo ataque deste fungo, bem como avaliar a colonização, os sítios de penetração e de infecção desse fungo utilizando-se técnica de clareamento e microscopia de luz e eletrônica de varredura. As observações histopatológicas são úteis para analisar as alterações decorrentes da infecção e compreender os possíveis mecanismos de infecção. A utilização da microscopia eletrônica de varredura tem sido uma ferramenta útil para esclarecer as fases de pré-infecção e penetração do fungo, permitindo a visualização da germinação, o direcionamento do tubo germinativo, a formação ou não de apressório e alterações na superfície do hospedeiro (MCKEEN & SVIRCEV, 1981).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção da suspensão com conídios, suspensão sem conídios e emulsão

Os isolados de *C. cassicola* f. sp. *lantanae* (RWB 01), foram obtidos da Coleção de Culturas Fúngicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa onde se encontram depositados. Este isolado bem como os demais desta coleção permanecem acondicionados em vidros, contendo sílica gel, e em geladeira (DHINGRA & SINCLAIR, 1995).

As plantas adultas utilizadas de *L. camara* L. biótipo Ab (flores brancas), de Queensland (Austrália), também foram obtidas na coleção de plantas testes da Clínica de Doenças de Plantas.

Para a obtenção da suspensão de conídios e do filtrado (suspensão sem conídios), foram utilizados os procedimentos descritos por PEREIRA (2001). O fungo foi cultivado em meio CVA (caldo de vegetais ágar), em temperatura de aproximadamente 25° C, em incubadora, por 15 dias. Para a obtenção da suspensão de conídios, estes foram raspados em placa de Petri contendo o fungo, após adicionar-se cerca de 3 mL de solução de Tween 80 a 0,05% (polioxietileno sorbitan mono-oleato, Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, realizou-se a filtragem do produto obtido em gaze e, após ser transferido para um erlenmeyer, a suspensão foi mantida durante 4 horas, sob agitação constante, a temperatura ambiente para se aguardar a germinação dos conídios. Metade desta suspensão foi reservada e a outra metade foi filtrada em conjunto de filtro Milipore® (0,45µm e 25mm de diâmetro), obtendo-se assim, um filtrado sem conídios. A estimativa da concentração dos

conídios na suspensão não filtrada foi feita retirando-se 1mL da suspensão de inóculo e contados em um hemacitômetro.

Para a obtenção da emulsão foi utilizado o extrato CAE, obtido do arroz colonizado com o fungo Ccl. Os fungos foram cultivados em meio de cultura de vegetais-ágar (CVA) à temperatura de aproximadamente 25 °C (PEREIRA, 2001). Após seu desenvolvimento, discos da cultura do fungo foram retirados das placas e semeados em sacos plásticos, contendo grãos de arroz comum tipo B, esterilizados. Os grãos de arroz foram preparados da seguinte forma: 350 gramas de arroz foram colocados em cada saco de polipropileno, sendo os mesmos, em seguida, umedecidos com aproximadamente 150 mL de água destilada e autoclavados a 120° C por 20 minutos. Após esfriar, os sacos foram mantidos, por 10 minutos, em câmara de fluxo laminar sob luz UV germicida para garantir a esterilização externa destes. Em seguida, cada saco foi semeado com cinco discos da cultura do fungo de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. O semeio também foi realizado na câmara de fluxo laminar, onde os sacos foram deixados para evitar-se uma possível contaminação. Os sacos foram fechados com argolas de PVC, que foram introduzidas em sua extremidade como um anel, para que se pudessem virar as bordas dos sacos e possibilitar a introdução do chumaço de algodão. Em seguida, forrou-se com jornal o chumaço de algodão, prendendo-o com gomas de borracha. Assim, os sacos foram levados para câmara com temperatura controlada a  $25 \pm 3$  ° C, onde foram mantidos por, aproximadamente, 15 dias, até que a colonização do arroz fosse efetuada. O conteúdo dos sacos foi periodicamente revolvido pela pressão dos dedos. O extrato foi preparado, por extração, com solvente acetato de etila em aparelho tipo Soxhlet. e, concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo. Foram utilizados 20 mg do extrato CAE que foram solubilizadas em 2 mL de etanol. Posteriormente, adicionaram-se 20 mL de água destilada, a fim de se obter uma emulsão a 1000 ppm.

## **2.2. Alterações foliares**

Para avaliar os mecanismos celulares envolvidos na interação fungo-hospedeiro foram realizados cortes histológicos de folhas de *L. camara* L.

inoculados com Ccl, expostas ao filtrado de conídios ou a emulsão preparada a partir do extrato CAE. O experimento constou de 3 repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta na qual foram tratadas 7 folhas por planta. Como tratamentos, foram administradas: 1) a suspensão de esporos; 2) o filtrado derivado da suspensão de conídios (PEREIRA, 2001) e; 3) emulsão do extrato CAE. De cada planta foram pinceladas nas faces abaxial e adaxial das folhas. Estas plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro (Figura 2A), a 25 °C, durante 48 horas e, após este período, em casa de vegetação a 25 °C, por cerca de 7 dias.

Foram realizadas coletas periódicas, onde se retirou 1 folha, preferencialmente do terceiro ao quinto nó, de cada planta tratada, em intervalos de 24 horas. Amostras da porção basal, mediana e apical da lâmina foliar foram fixadas em FAA<sub>50</sub> ou glutaraldeído, processadas para observação em microscopia de luz e eletrônica de varredura, respectivamente. Para a caracterização anatômica da folha, foram obtidos cortes transversais de amostras frescas e as lâminas foram montadas em glicerina. As amostras fixadas foram incluídas em metacrilato (Historesin – Leica) ou em parafina para obtenção de cortes transversais de 10 µm de espessura em micrótomo rotativo (Spencer, 820). Os cortes foram corados com Azul de Toluidina ou com Safranina e Azul de Astra (KRAUS, 1997) e as lâminas montadas em resina sintética (Permount).

Para se determinar à presença do fungo Ccl no tecido doente, foi utilizado o método de clareamento e coloração de KEANE *et al.* (1988) que é uma modificação do método BRUZZESSE E HANSAN (1983).

Realizaram-se testes histoquímicos nas folhas a fim de determinar possíveis diferenças na detecção de algumas substâncias entre o controle e tratamento. Portanto, utilizou-se Sudan IV e Sudan Black para verificar a presença de lipídios (PEARSE, 1980), Azul Brilhante de Comassie para evidenciar proteínas (FISHER, 1968), Cloreto de ferro III para detecção de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940) e Lugol para evidenciar a presença de amido (JOHANSEN, 1940). Os fragmentos de folhas fixados em FAA<sub>50</sub> foram cortados em criomicrotomo (Modelo CM1850-Leica), com cerca de 30 µm de espessura. Para os testes, foram utilizados fragmentos de folhas, não inoculados, e fragmentos de folhas inoculados com o fungo *C. cassicola* f. sp. *lantanae*.

A análise do laminário e a documentação fotográfica foi feita utilizando-se um microscópio de luz (Olympus AX 70), conectado a um sistema de fotomicrografia

(Olympus U-Photo), do Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

O material destinado à microscopia eletrônica de varredura foi fixado em glutaraldeído a 25%, a temperatura de 4 ° C, durante 24 horas, e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 3%, a mesma temperatura, durante 3 horas. A seguir, estes foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio (0,4 M, pH=6,8) e desidratados em série alcoólica progressiva até álcool etílico absoluto. As amostras foram desidratadas utilizando-se o ponto crítico de desidratação (CPD 020 Balzers, Union) e CO<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, o material vegetal foi recoberto com ouro metálico (espessura de 10 nm), em pulverizador de ouro (Balzers Modelo SCAO10), segundo BOZZOLA & RUSSELL (1992). A observação e documentação fotográfica do material foliar foram obtidas através de um microscópio de varredura (Zeiss Modelo LEO 1430VP), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Considerações gerais**

As plantas inoculadas com o filtrado sem conídios e a emulsão preparada do extrato CAE não apresentaram nenhum sintoma, quando observados em microscopia de luz. Na observação dos tecidos foliares não foi identificada qualquer alteração estrutural, confirmando a inexistência de sintomas. No entanto, a concentração ideal de inóculo para se realizar o experimento não havia sido obtida.

Verificou-se que a formação de lesões foliares ocorreu após 24 horas de inoculação (Figura 2B), e a desfolha se iniciou 48 horas após a inoculação (Figura 2C) da suspensão de conídios nas plantas. As lesões progrediram com o passar do tempo, conforme pode ser observado na Figura 2D, após 72 horas e na Figura 2E e 2F, após 96 horas. A lesão causava maceração do tecido foliar e seguida de necrose.

#### **3.2. Anatomia da folha de *L. camara***

A folha de *L. camara* L. (Figura 3A a 3D), observada em corte transversal, apresenta a face abaxial e a face adaxial compostas por uma camada de células irregulares. Estas se apresentam sinuosas em ambas as faces, porém, em grau mais acentuado na face abaxial. Os estômatos (Figuras 3A e 3B) estão presentes somente na face abaxial (hipoestomática), no mesmo nível da face, e formam complexos

diacíticos e anomocíticos. A folha é pilosa (Figura 3B, 3C, 3D, 3E e 3F com tricomas tectores que variam com o número de células basais e da cabeça e tricomas secretores também com células da cabeça e basais em número variáveis. A cutícula encontra-se mais espessada na face adaxial do que na face abaxial.

A folha é dorsiventral (Figuras 3A e 3D) e o mesofilo apresenta o parênquima paliçádico composto por duas camadas de células parenquimáticas alongadas no plano transversal da folha, em contato com a face adaxial. O parênquima lacunoso (Figuras 3A, 3B e 3C) em contato com a face abaxial é uma região de células de forma irregular com grandes espaços intercelulares. Na nervura principal encontra-se o sistema vascular colateral (Figura 3C). Observa-se a presença de células organizadas de modo a formar uma bainha em volta do feixe que se estende da epiderme da adaxial a abaxial. O xilema é constituído por elementos de vaso, com deposição em parede secundária anelada e espiralada. Nas camadas periféricas do floema observa-se a presença de fibras. Os tricomas tectores e secretores (Figura 3B, 3C, 3D, 3E e 3F) distribuem-se em ambas as faces da nervura. As nervuras laterais são igualmente rodeadas por uma bainha de células que não se estendem até as faces abaxial e adaxial.

### **3.3. Observação ultra-estrutural (MEV) da interação fungo-planta**

Foi observado que o fungo utiliza como via preferencial de penetração os espaços intercelulares. Esporadicamente, ocorre a penetração através dos estômatos e é comum observar hifas contornando-os (Figura 4A e 4B). Desta forma, não houve tropismo aparente em direção aos estômatos, como ocorre para muitos fungos, uma vez que a hifa passa próxima ao estômato e vai concentrar-se no tricoma. A penetração também acontece pela epiderme e em ferimentos. Esses ferimentos foram, em grande número, ocasionados pela queda de tricomas (Figura 4C). A camada de cera epicuticular apesar de espessa não parece impedir a penetração do fungo que é capaz de rompê-la. (Figura 4D). Como não foram realizados experimentos, a fim de determinar qual o mecanismo de penetração, não se pode afirmar se este envolve a liberação de enzimas, como cutinase, ou força mecânica, ou mesmo ambas. Após a germinação do conídio (Figura 4E), sobre a epiderme,

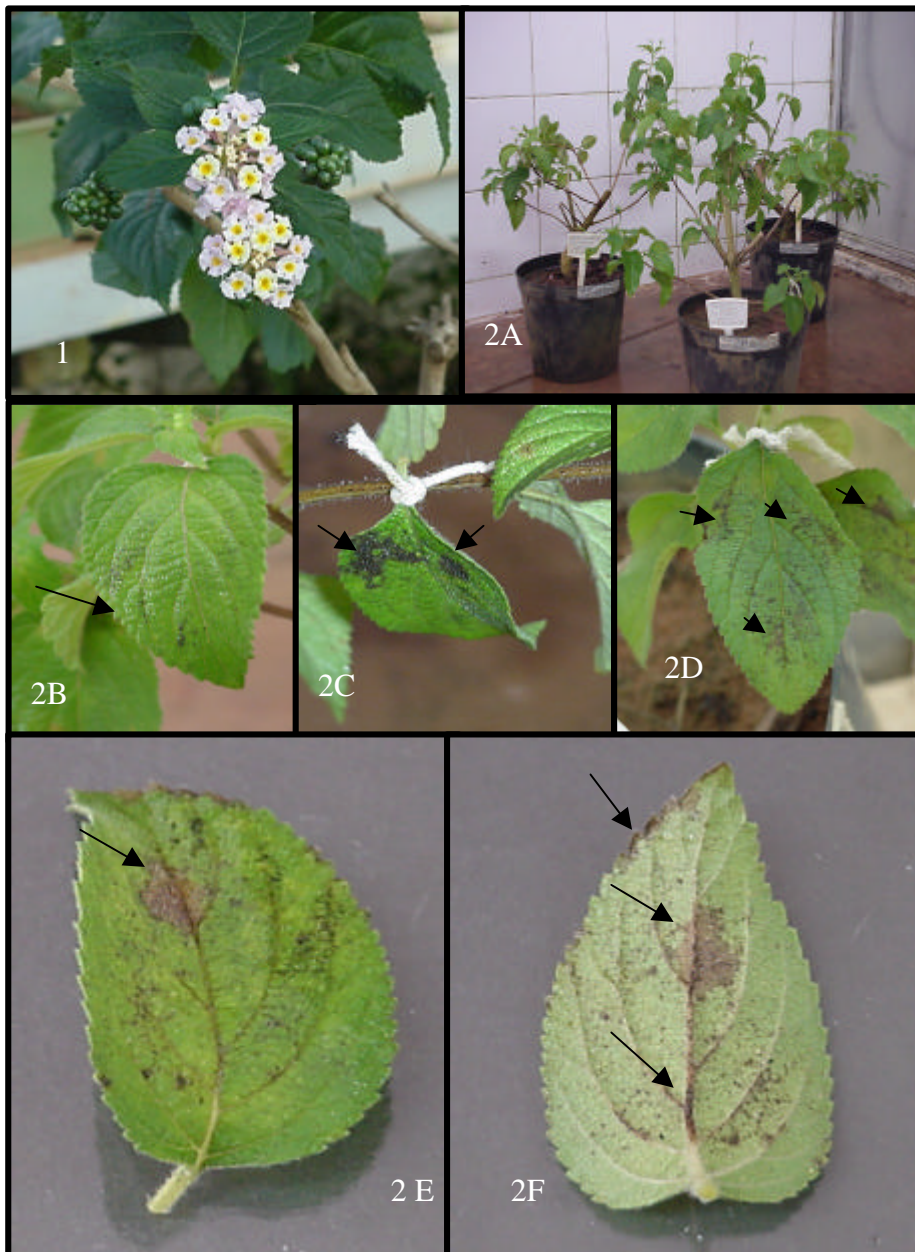
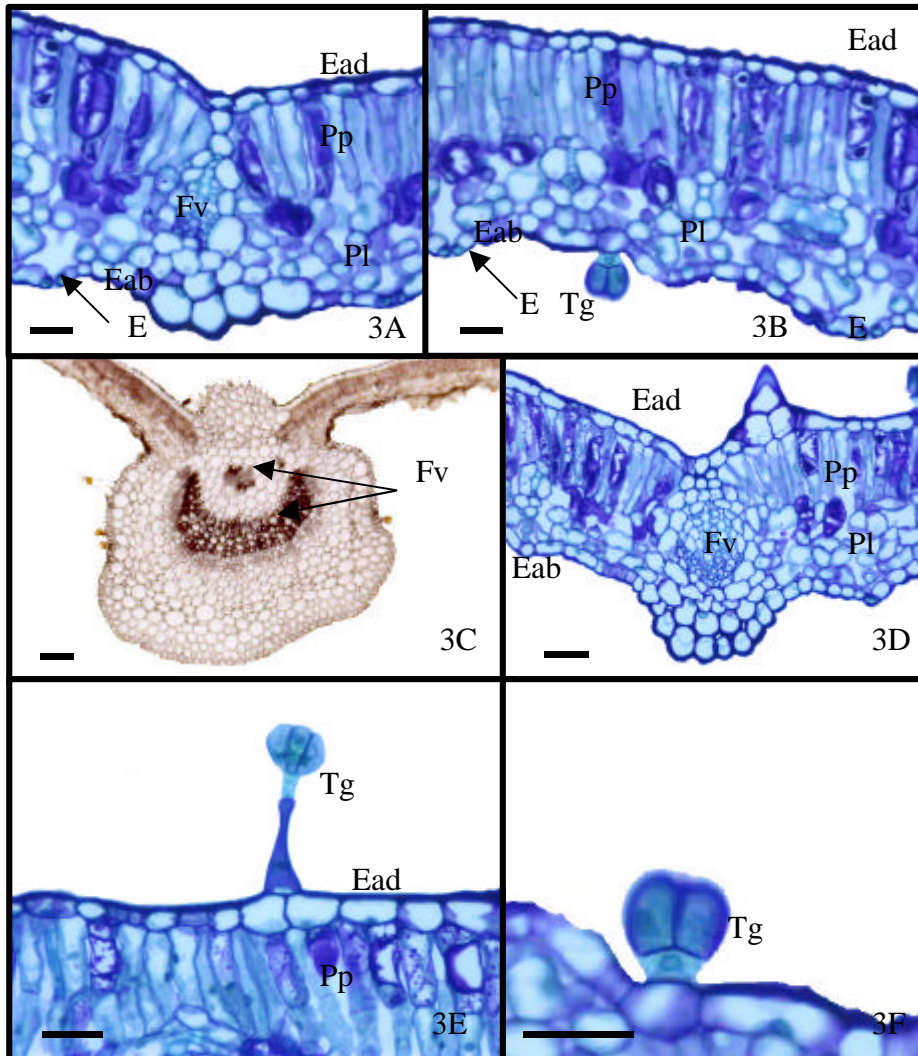


Figura 1 - *Lantana camara* L. Figuras 2A a 2F -Plantas e folhas de *L. camara* inoculadas. Figura 2A- Vasos dispostos, aleatoriamente, em câmara de nevoeiro. Figura 2B - Folhas inoculadas com suspensão de conídios de Ccl após 24 horas. Figura 2C – Folhas inoculadas com suspensão de conídios de Ccl após 48 horas. Figura 2D – Folhas inoculadas com suspensão de conídios de Ccl após 72 horas. Figura 2E – Folhas inoculadas com suspensão de conídios de Ccl, após 96 horas (face adaxial). Figura 2F – Folhas inoculadas com suspensão de conídios de Ccl, após 96 horas (face abaxial).



Figuras 3A a 3D - Aspecto geral da folha de *L. camara* em corte transversal. Figura 3A e B – Detalhe do limbo foliar. Figura 3C e 3D – Detalhe da nervura. Figura 3E e 3F- Detalhe de tricomas glandulares. Figuras 3A, 3B, 3D, 3E, 3F – Cortes transversais incluídos em historesina. Figura 3C – Corte transversal de amostra a fresco (nervura principal). Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; Pp= parênquima paliçadico; Pl= parênquima lacunoso; Tg = tricoma glandular; Tt = tricoma tector; E = estômato; Fv = feixe vascular. Figuras 3A e 3F – Barra = 30  $\mu$ m.

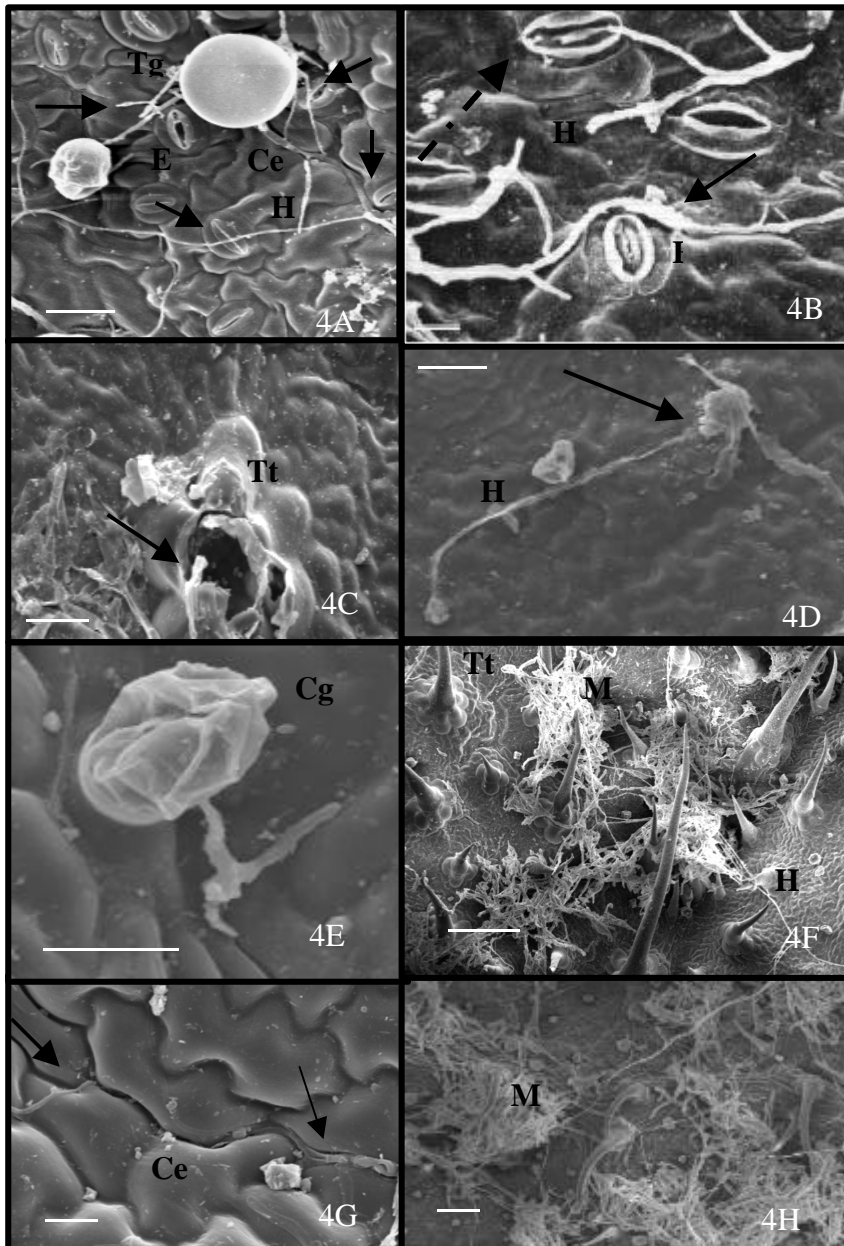


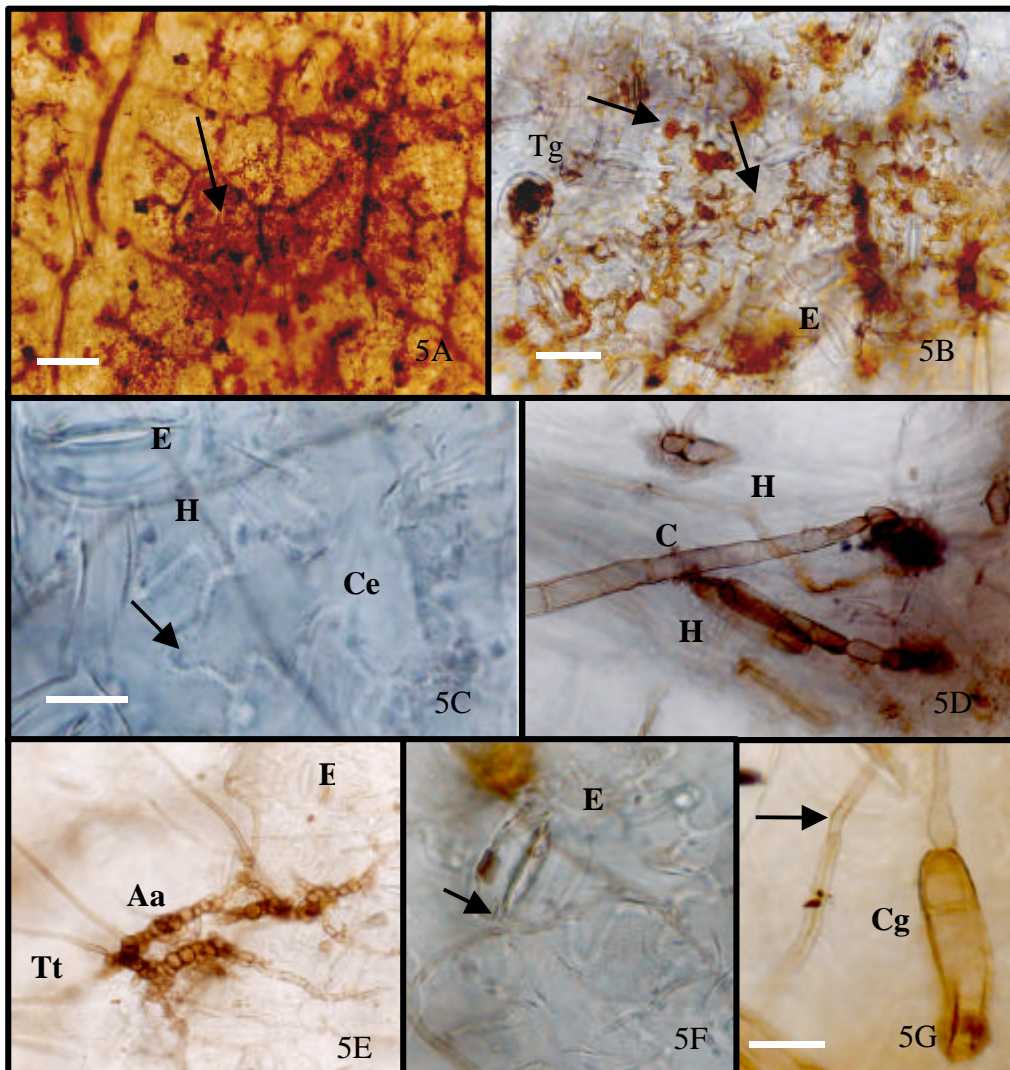
Figura 4A a 4H- Eletromicrografias. Figura 4a- Hifa próxima a estômatos (setas). Figura 4B - Hifa contornando o estômato (seta) e passando sobre o ostíolo (seta tracejada). Figura 4C - Base do tricoma destruído (seta=hifa). Figura 4D - Hifa penetrando a epiderme adaxial (seta). Figura 4E - Conídio germinado deformado pela desidratação. Figura 4F - Micélio envolvendo os tricomas. Figura 4G - Hifa nas junções das células epidérmicas (seta). Figura 4H - Micélio. H= hifa; Ce= célula epidérmica; Tg = tricoma glandular; Tt = tricoma tector; Cg = conídio germinado M= micélio. Figura 4A - Barra = 20µm. Figuras 4B; 4E; e 4G - Barras = 10µm. Figura 4C; 4D; 4F e 4H - Barras = 50µm.

observou-se freqüentemente que a hifa originada se alongava e se ramificava, extensivamente, para além do local onde ocorreu a germinação do conídio. Muitas hifas foram observadas envolvendo os tricomas o que sugere que essas hifas, além de concentrar-se próximas aos tricomas estariam atuando no processo de destruição dessas estruturas epidérmicas (Figura 4F). Desta forma, seriam abertos pontos de entrada para o acesso das hifas, promovendo a infecção. Várias hifas mostravam-se bastante longas sobre a epiderme, provavelmente, por não haver reconhecimento de um sítio de penetração satisfatório. Até 48 horas, foi possível observar que muitas hifas desenvolviam-se ao longo das junções de células epidérmicas (Figura 4G), onde pode ocorrer acúmulo de exsudados e outras substâncias que aí se depositaram. Outra interpretação para esse comportamento seria que as junções permitem às hifas uma maior aderência. Após 48 horas, tornou-se difícil acompanhá-las, devido ao grande número de hifas, que formavam um emaranhado sobre a epiderme (Figura 4H).

#### **3.4. Estudo dos sítios de penetração e infecção dos tecidos (por meio de técnica de clarificação)**

Através da clarificação foi possível observar áreas de necrose onde foi evidenciado espessamento de paredes celulares, os quais reagiram à presença do fungo (Figuras 5A e 5B). Aparentemente, toda a parede tornou-se espessada, conferindo uma coloração marrom-dourada brilhante, em toda a célula. Este tipo de reação da célula vegetal parece restringir-se às células epidérmicas. Esta reação podia ser observada, após 24 horas de inoculação, e acontecia quando ocorria o ataque do fungo. Verificou-se também que algumas células apresentavam o conteúdo celular alterado, demonstrando um aspecto granuloso (Figura 5C), refletindo uma reação de hipersensibilidade.

Um grande número de esporos aderidos na lâmina foliar pode ser observado, até 48 horas (Figura 5D). Verificou-se que, entre 24 e 48 horas após a inoculação, os esporos já haviam germinado e a penetração no tecido já havia ocorrido. Quando esses eventos estavam bem estabelecidos, as hifas haviam colonizado a epiderme e, em alguns locais, atingido o parênquima. Após 48 horas, verificou-se uma diminuição do número de conídios e a proliferação de hifas sobre a epiderme. Apesar de ambas as faces terem sido igualmente inoculadas, é possível notar um



Figuras 5A a 5G – Técnica de clarificação da lâmina foliar de *L. camara* inoculada com Ccl, após 24 e 48 horas. Figura 5A e 5B – após 24 horas de inoculação Figura 5A- Aparência das primeiras necroses em vista geral (epiderme abaxial). Figura 5B – Área de necrose: observa-se reação nas parede das células epidérmicas (seta). Figuras 5C a 5G – após 48 horas de inoculação. Figura 5C - Granulação (seta) devido à reação das células epidérmicas à penetração do fungo. Figura 5D – Conídios sobre a superfície abaxial, hifas sub-epidérmicas. Figura 5E – Almofadas apressoriais germinando sobre epiderme abaxial. Figura 5F e 5G – Hifa penetrando entre célula subsidiária e célula-guarda. Aa= almofadas apressoriais; Tt= tricoma tector; E= estômato; Cg= conídio germinado. Figura 5A - Barra= 120  $\mu$ m. Figura 5B - Barra= 30  $\mu$ m. Figuras 5C e 5D - Barra= 15  $\mu$ m. Figuras 5E - Barra= 25  $\mu$ m. Figuras 5F e 5G - Barra= 15  $\mu$ m.

número bem mais expressivo de conídios germinados e hifas percorrendo a faces abaxial. Observou-se a presença de almofadas apressoriais (Figura 5E) que são estruturas de infecção do fungo. Estas estruturas já podiam ser observadas após 24 horas de inoculação e, aumentavam a cada intervalo de coleta. A partir de muitas dessas almofadas apressoriais (Figura 5E) já havia hifas infectantes, após 48 horas de inoculação. Após este período tais estruturas, na sua maioria, permaneceram sem originar novas hifas.

Realmente, a penetração intercelular parece ser predominante ocorrendo, muitas vezes, próximas aos estômatos, entre suas células subsidiárias e as células-guardas (Figura 5F e 5G). No entanto, a penetração via estômato também ocorreu. As hifas, após penetrarem a epiderme, percorrem uma vasta área de tecido paliçádico e podem ser observadas inúmeras ramificações de uma mesma hifa. A colonização ocorre, principalmente, no sentido paralelo à superfície foliar. A hifa, antes de seguir no sentido vertical, se ramifica várias vezes e atinge locais distantes do ponto de penetração. No sentido vertical, a colonização ocorreu, em sua maioria, da face abaxial para a face adaxial.

### **3.5. Penetração e colonização do fungo sob microscopia fotônica**

A cutícula, na face adaxial, mostrou-se mais espessada do que na face abaxial. Desta forma, a cutícula exerceu uma barreira mais acentuada à penetração do fungo na face adaxial. Esta também pode ser uma das razões pela qual o fungo penetrou, principalmente, pela face abaxial, sendo esta face claramente a primeira área a apresentar injúrias decorrentes a presença do fungo (Figura 6A). Observou-se a destruição completa do parênquima lacunoso que teve suas células e da epiderme abaxial colapsadas e aderidas umas as outras. Foi observada que a penetração das hifas ocorria, preferencialmente, através da parede anticlinal das células epidérmicas e estendia-se através do parênquima lacunoso para o paliçádico. Muitas vezes, não foi possível localizar o ponto exato de penetração das hifas, mas em alguns casos a presença de conídios germinados sobre a epiderme anunciava, possivelmente, a presença de hifas em tecidos próximos. Em determinados locais detectaram-se necroses, em material infectado, onde foi possível observar a formação de tecido de

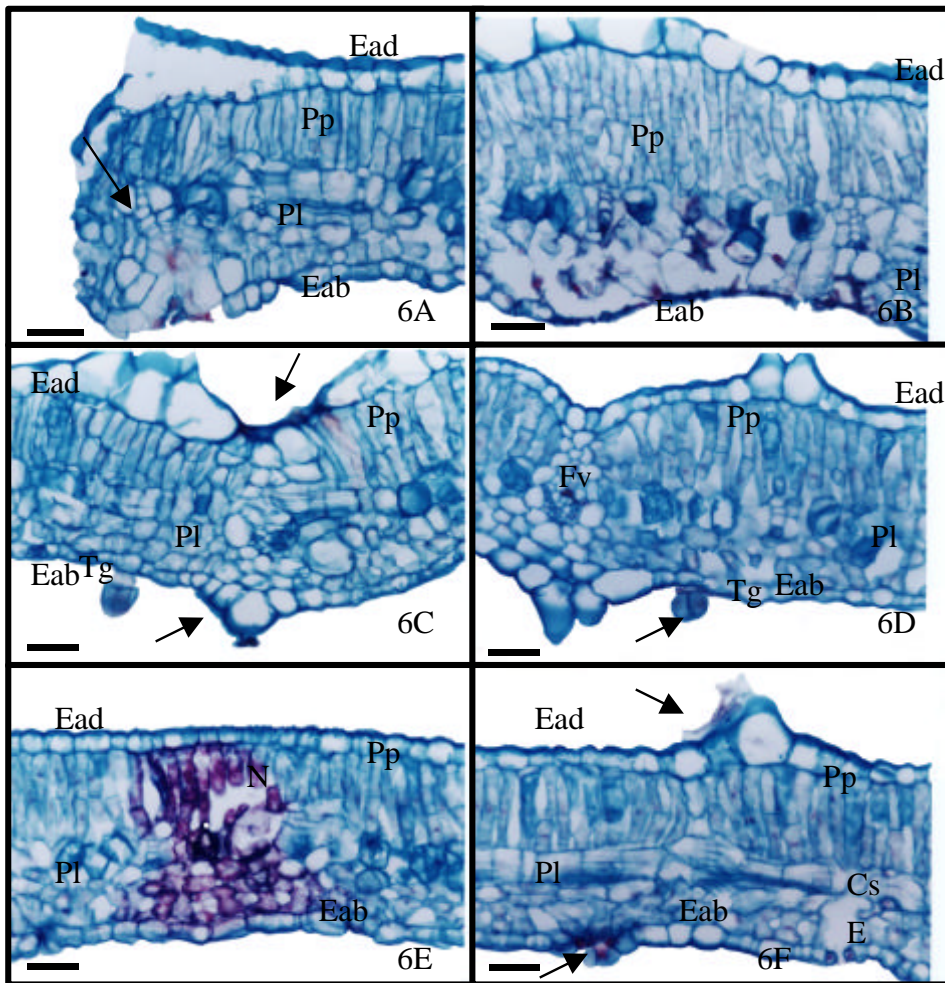


Figura 6A A 6F - Corte transversal de lâmina foliar de *L. camara* inoculada com Ccl. Figura 6A– 48 horas. Necrose na epiderme abaxial e formação de tecido de cicatrização (seta). Figura 6B – 96 horas. Área de necrose. Figura 6C – 48 horas. Necrose na epiderme adaxial (seta), formação de tecido de cicatrização (Tc) e conídio germinado na epiderme abaxial (seta). Figura 6D – 96 horas - Conídio germinado (seta). Dois segmentos de hifa: um penetrou o tricoma glandular e o outro penetrou a epiderme de forma intracelular. Figura 6E - 48 horas – Área de necrose. Figura 6F– 96 horas. Conídios germinados na epiderme adaxial (seta) e necrose na epiderme abaxial (seta). Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; E= estômato; Cs = câmara sub-estomática Pp= parênquima paliçádico; Pl= parênquima lacunoso; Tg = tricoma glandular; Fv= feixe vascular. Barras= 10  $\mu$ m.

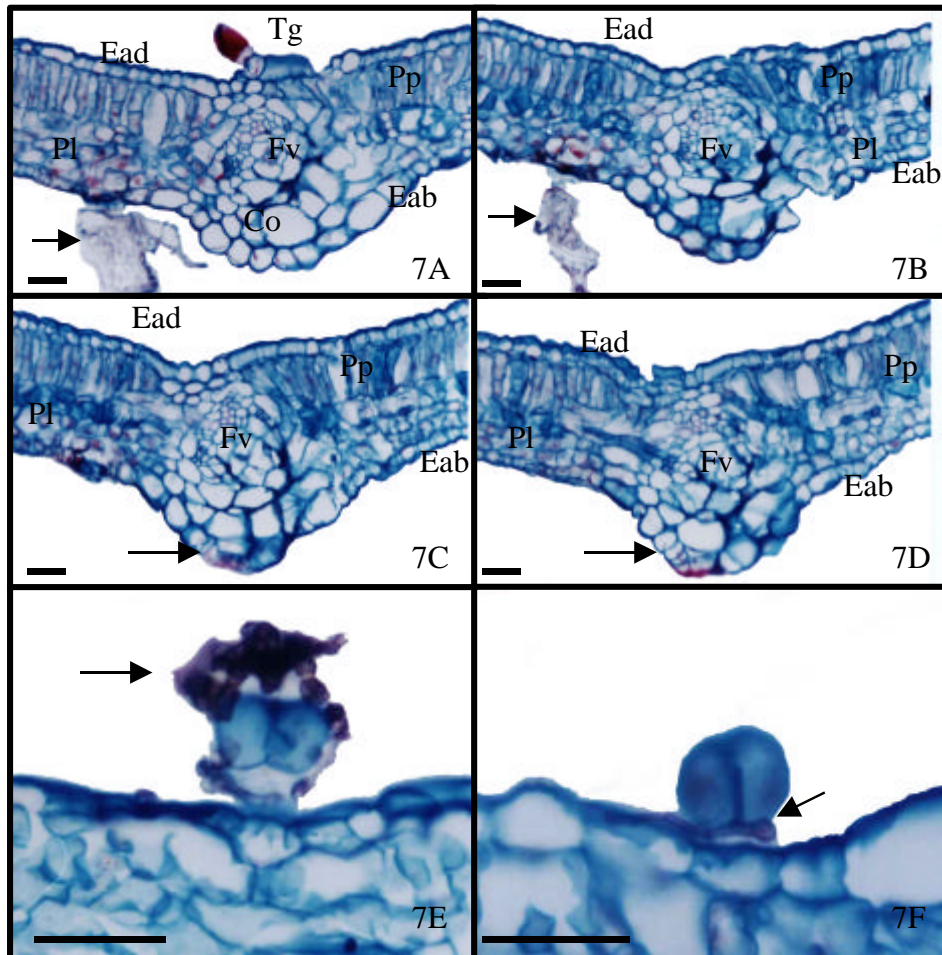
cicatrização (Figura 6B), e as células desta região comumente se coravam com safranina. Na maioria das vezes o parênquima lacunoso estava bem destruído, e suas células haviam colapsado aderindo-se umas as outras (Figura 6C). Em alguns casos, as células da epiderme tornaram-se amorfas, não individualizadas, e plasmolizadas. A destruição do tecido paliçádico foi menos freqüente. Isso se deve ao fato de que o fungo coloniza de forma mais agressiva a face abaxial (Figuras 6C e 6D). Verificou-se que o citoplasma das células parenquimáticas apresentava-se granulado em material contaminado. As células coram-se com safranina evidenciando a presença de lignina em áreas de necrose (Figuras 6E e 6F). Na região da nervura (Figuras 7A, 7B, 7C e 7D) foi possível constatar uma desorganização do feixe vascular, quando detectada a presença de hifas. As células do parênquima e do colênquima muitas vezes encontravam-se amorfas e plasmolizadas. Foi possível observar lise celular, porém algumas células apresentavam hiperplasia. As células próximas à nervura coraram-se com safranina demonstrando ter ocorrido uma reação que se estendia, muitas vezes, da epiderme ao parênquima paliçádico. Na nervura também se observou esta mesma reação e a produção de tecido de cicatrização.

Os tricomas foram encontrados rodeados de hifas (Figura 7E), denotando-se uma concentração e freqüência nesta área (Figura 7F). Muitos tricomas foram completamente destruídos e foram observadas, muitas vezes, necroses próximas a eles.

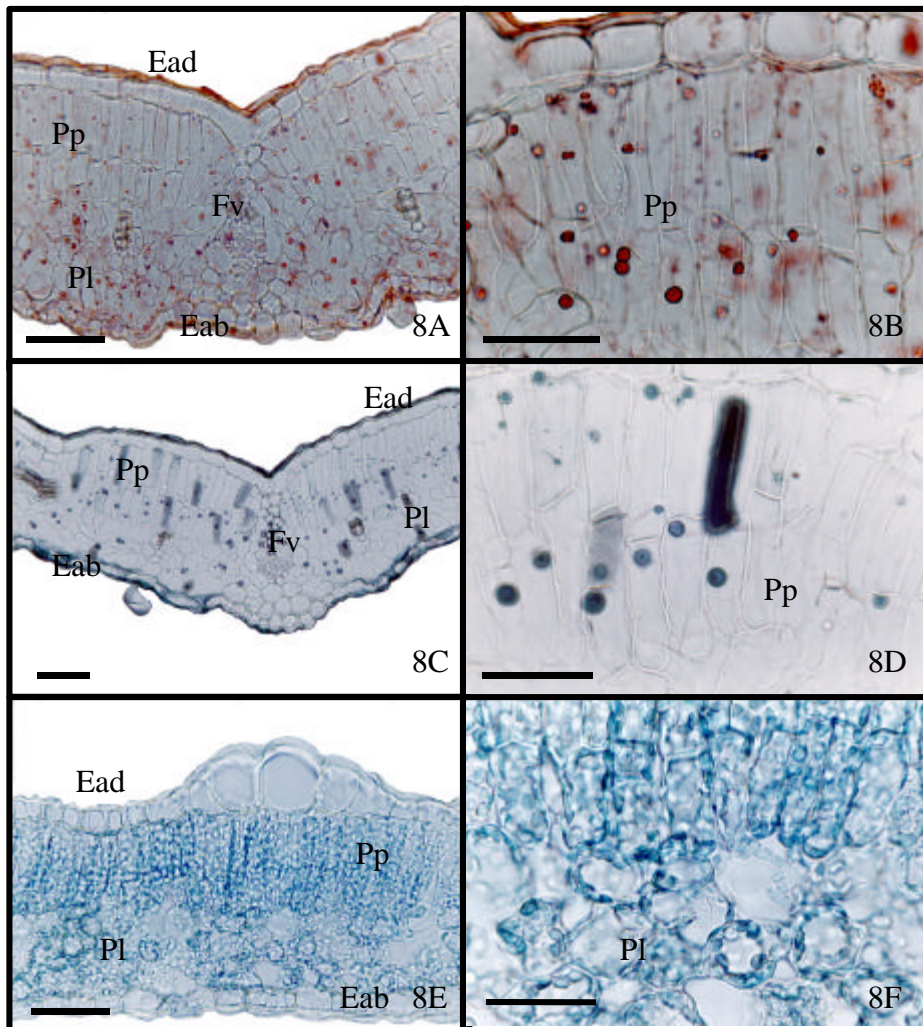
### **3.6. Testes histoquímicos**

Os testes histoquímicos não revelaram diferenças entre os fragmentos foliares não inoculados e fragmentos foliares inoculados com o fungo *C. cassiicola*.

Os testes com Sudan IV e Sudan Black para ambos os fragmentos foliares foram positivos. A epiderme em ambas as faces teve a cutícula corada de vermelho, após a reação com Sudan IV (Figuras 8A e 8B), o qual identifica a presença de cutina, suberina e outros lipídeos. Gotículas de lipídeos foram observadas nas células do mesofilo. A reação com Sudan Black (Figuras 8C e 8D) revelaram uma coloração escura, presente na cutícula e em gotículas dispersas no mesofilo,



Figuras 7A A 7D - Cortes transversais de lâmina foliar de *L. camara* inoculada com Ccl, após 96 horas. Figuras 7A e 7B - Formação de áreas de necrose, desorganização do feixe vascular, células túrgidas do colênquima, hifas (seta). Figuras 7C e 7D - Evolução da necrose, desorganização do feixe vascular, células túrgidas do colênquima, formação de tecido de cicatrização (seta). Figuras 7E e 7F- Observa-se a presença de hifa(s) aderidas ao tricoma glandulares (setas). Ead= epiderme adaxial; Eab= epiderme abaxial; Pp= parênquima paliçádico; Pl= parênquima lacunoso; Fv= feixe vascular; Co= colênquima; Tg= tricoma glandular; H= hifa. Figuras 7A a 7F - Barras= 10 m.



Figuras 8A a 8E - Testes histoquímicos. Figuras 8A, 8C e 8E - Controle. Figuras 8B, 8D e 8E - Tratamento. Figuras 8A e 8B – Resultados obtidos com Sudan IV. Figuras 8C e 8D – Resultados obtidos com Sudan Black. Figuras 8E e 8F – Resultados obtidos com Azul Brillhante de Comassie Ead= epiderme adaxial; Eab= epiderme abaxial Pp= parênquima paliçadico; Pl= parênquima lacunoso; Fv= feixe vascular; Co= colênquima; Ct= cutícula; G= gotas de lipídeo; seta= cloroplasto. Figura 8A- Barra= 20 m. Figura 8B- Barra= 10 m. Figuras 8C, 8D e 8E - Barra= 15 m. Figura 8F - Barra= 60 m.

evidenciando desta forma, a presença de lipídeos tanto na epiderme como no mesofilo.

Os teste com Azul Brilhante de Comassie foi positivo para os fragmentos foliares não inoculados e inoculados. Os cloroplastos localizados nas células do mesofilo reagiram intensamente quando submetidas ao Azul Brilhante de Comassie (Figuras 8E e 8F), revelando a presença de grande quantidade de proteínas nestas estruturas. O teste para detecção de compostos fenólicos e amido não demonstraram a presença de tais substâncias.

#### 4. DISCUSSÕES

Não foi observado sintoma proveniente da aplicação da suspensão sem conídios. Segundo PEREIRA et al. (2003), seria necessário uma concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL na pré-filtragem para a produção de fitotoxidez utilizando-se a suspensão sem conídios. Utilizando-se esta concentração, seria possível observar sintomas semelhantes aos causados pela suspensão de conídios. Porém, a concentração obtida nesta pesquisa foi de  $0,1 \times 10^6$  conídios/mL, concentração esta abaixo do sugerido. O surgimento de necroses em *L. camara* L., biótipo Ab, inoculada com Ccl (RWB 01), ocorreu após 72 horas de inoculação. No entanto, neste trabalho, observou-se o aparecimento de necroses após 24 horas de inoculação que demonstra a alta patogenicidade do fungo. Segundo DANKYN (1984), as respostas das plantas às hifas de infecção, variam de um leve escurecimento protoplasmático em células adjacentes às hifas até necroses de células epidérmicas sob as hifas. De acordo com GRIFFEY & LEACH (1965), a desidratação dos tecidos ocorre na formação das lesões macroscópicas.

A penetração das hifas, preferencialmente, pelos espaços intercelulares já havia sido observada anteriormente por PURWANTARA (1987) no tecido foliar de clone PPN 2444 de *Hevea*. No entanto, BRETON et al. (2000) relataram que a colonização dos tecidos da folha aconteceria de forma intracelular. BRETON et al. (1997, 2000), mostraram que doze horas após a inoculação, o tubo germinativo invadiu a primeira camada da face abaxial de clones de *Hevea brasiliensis*, pela penetração direta, sendo que a penetração via estômatos foi rara. Esta diferença poderia estar associada ao isolado ou a planta hospedeira. Apesar de PURWANTARA (1985) e BRETON et al. (1997, 2000) trabalharem com isolados de clones de *Hevea brasiliensis* foram utilizados clones diferentes. PURWANTARA (1985), trabalhou com o clone PPN2444 e BRETON et al. (1997) com PB260 e GT1. Assim, diferenças no mecanismo de infecção dos isolados poderiam estar associadas

a sua origem. SILVA *et al.* (1998), constatou em seu trabalho com 32 isolados de *C. cassicola*, oriundos do Sri Lanka e Austrália que, além da especialização geográfica houve uma reação específica patógeno-hospedeiro. Desta forma, os isolados foram divididos em 7 grupos, nos quais, pode-se correlacionar o crescimento dos isolados e a patogenicidade, em diferentes plantas hospedeiras.

Os espessamentos de paredes das células que reagiram à presença do fungo, conferiam uma coloração marrom-dourada e brilhante à célula. Essa reação não causa a morte do patógeno, mas serve de barreira à sua penetração. Segundo HACHLER e HOHL (1984), a reação de amarronzamento está confinada a parede celular e a lamela média, não envolvendo o citoplasma. Os espessamentos de parede são provocados pela deposição de lignina (CARPIN *et al.*, 2001), o que dificultaria a ação de enzimas produzidas pelo fungo para degradar os componentes das paredes. Este amarronzamento característico é um evento comum quando ocorre morte celular, geralmente, sendo resultante do acúmulo de materiais fenólicos nas células mortas (HEATH, 1998). Os compostos fenólicos são inibidores do processo de extensão da parede celular fúngica, causando o intumescimento e subsequente rompimento das hifas infectantes (MAUSETH, 1995). Segundo BRETON *et al.* (1997), a progressão do fungo no tecido hospedeiro foi acompanhada pelo aparecimento de lesões necróticas, após 24 horas de infecção (BRETON *et al.*, 1997). Para GRIFFEY & LEACH (1965), as necroses são consideradas mecanismos de defesa uma vez que estabelecem uma barreira ao fluxo de água e nutrientes para o patógeno. Outra reação do hospedeiro, observada, foi à granulação do citoplasma. Segundo PURWANTARA (1985), o protoplasto da célula sofre granulações devido à desintegração de cloroplastos. A multiplicação do patógeno causa vários danos às células, incluindo desorganização do citoplasma e desintegração de organelas (BENHAMOU & LAFONTAINE, 1995). A granulação parece ser um evento provavelmente resultante da ação de enzimas líticas (VANETTI, 2001). Segundo BROWN *et al.* (1997), estas formas de retardar o patógeno seriam uma estratégia de defesa da planta até que esta pudesse ativar o seu mecanismo de produção de fitotoxinas e proteínas líticas que possuem ação fungicida. Essas barreiras servem para imobilizar o microorganismo e expô-lo a uma bateria concentrada de componentes antimicrobianos, como as fitoalexinas e as enzimas envolvidas na produção de espécies de oxigênio ativo (BROWN *et al.*, 1998; BRETON *et al.*, 1997). Entretanto, foi demonstrado que *C. cassicola* é capaz de degradar

escopoletin, uma fitoalexina isolada de *Hevea brasiliensis*, demonstrando ser relativamente resistente ao seu efeito tóxico (BRETON *et al.*, 1997). Outra explicação para a ineficiência desta fitoalexina deve-se ao atraso de sua acumulação comparada com a rapidez com que o fungo invade o tecido hospedeiro (BRETON *et al.*, 1997). No entanto, neste trabalho não foi possível determinar se houve, realmente, atuação desses componentes em reações de resistência do hospedeiro, embora não seja totalmente descartada a possibilidade do envolvimento desses mecanismos e a capacidade do fungo de vencê-las. Como se pode observar, não só as barreiras estruturais são formas de resistência da planta frente ao ataque de um patógeno, mas também, o acúmulo e a liberação de compostos químicos que ocorrem nestas interações. O espessamento da parede das células epidérmicas e o aparecimento de granulações no citoplasma celular têm sido, comumente, observadas em outras interações. VANETTI (2001), constatou estas reações morfológicas no tecido do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), em resposta a presença do fungo *Alternaria solani* (Ell. & Martin) Jones & Grout. ARAÚJO (2000), relatou que tais reações celulares observadas em pimentão (*Capsicum annum* L.), inoculado com *A. solani* sob microscopia de fluorescência, tornaram-se fluorescentes, indicando acúmulo de compostos fenólicos, um dos componentes do processo de morte celular na reação de hipersensibilidade.

Para PURWANTARA (1985), *C. cassiicola* destrói mais efetivamente o mesofilo do que a epiderme. Segundo este autor, os vasos e tecidos associados tais como esclerênquima, parênquima e epiderme colapsaram e foram corados de vermelho a púrpura, quando submetidos à coloração com safranina e azul de anilina. Este fenômeno pode ser devido ao efeito a toxina conhecida como cassicolin que é produzida pelo patógeno. Resultados de pesquisas têm mostrado que essa toxina, produzida por *C. cassiicola*, é essencial para a sua patogenicidade e, pode ser considerada como um determinante primário da patogênese (BRETON *et al.*, 2000). Esta toxina, de acordo com o autor, reproduz sintomas similares da doença induzidas pelo fungo, bem como a necrose. LEWIS & GOODMAN (1962), estudando os efeitos morfológicos de colletotín, em folhas de tomateiro *Digitalis*, constataram a perda da integridade foliar primeiramente no parênquima esponjoso, após exposição à toxina. Segundo os autores, o efeito observado pode ser devido a uma alteração na permeabilidade da célula, ou talvez, no sistema de enzimas que degradam a pectina. Esta toxina poderia estar envolvida na ativação do sistema que degrada pectina.

A penetração do fungo levou ao colapso a face abaxial e a desorganização de células em frente à progressão da hifa (BRETON *et al.*, 2000). O ingresso do fungo está sempre associado com desorganizações das células do hospedeiro e alterações na parede celular (BENHAMOU & LAFONTAINE, 1995). Esta observação demonstra que *C. cassiicola* comporta-se como um fungo necotrófico (BRETON *et al.*, 2000). A preferência de colonização do fungo, através da face abaxial, pode estar também associada à interação do isolado ao seu hospedeiro. DUARTE *et al.* (1983), trabalhando com isolados de mamoeiro e cacauero notou diferenças morfológicas, fisiológicas e patogênicas nestes isolados. As estruturas reprodutivas eram formadas mais na face ventral das folhas de mamoeiro e, em ambas as faces nas folhas de cacauero, quando inoculados com isolado mamoeiro e cacauero, respectivamente. SPENCER & WALTERS (1969), trabalhando com 14 isolados diferentes de *C. cassiicola* constataram a existência de duas raças, na qual, estes isolados poderiam ser subdivididos. Uma outra possibilidade seria que, uma vez mantidas na câmara de nevoeiro por 48 horas, a face adaxial das folhas das plantas inoculadas poderia ser lavada, devido ao excesso de umidade na câmara. O fungo poderia também ser favorecido na face abaxial devido ao microclima encontrado nesta face, apesar da colocação das plantas, após a inoculação, em um ambiente controlado, com temperatura, umidade e luminosidade ideais ao seu estabelecimento.

Os testes histoquímicos para lipídios revelaram a presença de uma cutícula composta de cutina e suberina, as quais servem como barreiras contra a perda de água, infecção por patógeno e insetos. Para penetrar a cutícula, o patógeno provavelmente precisará secretar cutinase, uma enzima que hidrolisa as ligações éster (BUCHANAN *et al.*, 2000). Os lipídios servem como moléculas armazenadoras de energia e, para fins estruturais, como é o caso das ceras. No entanto, a presença do fungo não provocou alteração na produção de lipídeos na folha.

Vários cloroplastos presentes nas células do mesófilo foram corados intensamente de azul, após reagirem com Azul Brillante de Comassie, revelando a presença de grande quantidade de proteínas nessas estruturas. As proteínas estão presentes nos cloroplastos, e no seu sistema de membranas que são estruturas lipoprotéicas (BUCHANAN *et al.*, 2000). Segundo PURWANTARA (1985), a granulação do citoplasma do hospedeiro devido à presença do fungo seria decorrente a desintegração de cloroplastos. No entanto, não foi possível estabelecer tal conexão uma vez que o controle e tratamento apresentaram-se igualmente corados.

Não foram detectadas substâncias fenólicas em tecido infectado que poderia ser um indício de processo de morte celular na reação de hipersensibilidade. Apesar de não terem sido detectados nos fragmentos inoculados, a sua presença pode se evidenciada através da reação de espessamento de paredes de células em reação a presença do fungo. Esta reação estaria associada ao acúmulo de materiais fenólicos nas células (HEATH, 1998).

## 5. CONCLUSÕES

Este estudo é uma investigação para o entendimento da interação *C. cassicola*/L. *camara* L. Embora uma grande contribuição já tenha sido dada com estes resultados, tanto com relação à interação patógeno-hospedeiro quanto em relação a fitoquímica do fungo, é importante que seja dada continuidade a este estudo, não só para que sejam estudadas as demais frações, mas também para que sejam realizados novos testes biológicos com as novas substâncias isoladas. Os resultados obtidos também foram muito importantes para compreender os mecanismos pelo qual o fungo *C. cassicola* coloniza e destrói os tecidos foliares da planta daninha *L. camara* L.

Não foram observadas quaisquer alterações estruturais nos tecidos das folhas, devido à aplicação do filtrado sem conídios e da emulsão preparada a partir do extrato CAE.

Observou-se o aparecimento de necrose, 24 horas após inoculação, com a suspensão de conídios, sendo a penetração preferencialmente intercelular. As vias de penetração do fungo, observadas neste experimento, foram as seguintes: pelo complexo estomático, que envolvem a penetração pelo ostíolo; entre a lateral da célula-guarda e a célula epidérmica subsidiária; através do complexo epidérmico, que compreende a penetração diretamente da face exposta da epiderme (periclinal), ou entre as paredes de contato (anticlinal), entre células da epiderme. A penetração através do tricoma (glandular ou tector), também foi incluída no complexo epidérmico.

O hospedeiro demonstrou reação de hipersensibilidade ao patógeno, respondendo com espessamento das paredes da epiderme e granulação do citoplasma. Evidenciou-se também a formação de um tecido de cicatrização.

A face abaxial e o parênquima lacunoso foram os tecidos mais afetados. As células dos tecidos onde se observou a presença de hifas sofreram desorganização,

algumas apresentaram hiperplasia, outras se tornaram amorfas e plasmolizadas. O fungo se distribuiu nos tecidos penetrados, primeiramente, no sentido paralelo à face foliar. A penetração vertical ocorreu, principalmente, a partir da face abaxial.

Observou-se formação e germinação de almofadas apressoriais e a penetração dos tecidos, a partir de hifas infectantes originadas nestas estruturas.

Os resultados dos testes histoquímicos para lipídeos, proteínas e compostos fenólicos não revelaram diferenças entre fragmentos foliares referentes ao controle e ao tratamento. Tanto no controle quanto no tratamento evidenciou-se a presença de lipídeos na camada de cera epicuticular, e gotículas dispersas no mesofilo. O teste com Azul Brilhante de Comassie corou cloroplastos presentes no mesofilo revelando a presença de proteínas em suas membranas. O teste para compostos fenólicos foi negativo não revelando, portanto, a produção desses metabólitos secundários em tecidos de folhas infectados, apesar da evidente reação de espessamento de parede das células da epiderme, conferindo a essas uma coloração marrom-dourada e brilhante que estaria associada ao acúmulo de materiais fenólicos nas células mortas.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Através de testes biológicos observou-se que os ácidos graxos e o composto ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona apresentam atividade fitotóxica. No entanto, a fração CE encontra-se ainda inexplorada e sua fitotoxicidade já se encontra determinada.

As observações anatômicas mostraram que o fungo provoca o surgimento de lesões, após 24 horas de sua inoculação, com a suspensão de conídios. A penetração, apesar de ser preferencialmente intercelular, ocorre também pelo complexo estomático, entre a lateral da célula-guarda e a célula epidérmica subsidiária e pelo complexo epidérmico, onde se incluem as penetrações via estômatos.

Observações anatômicas da folha de *L. camara* L. demonstraram reação de hipersensibilidade a presença do patógeno por meio de espessamento das paredes da epiderme com deposição de lignina, granulação do citoplasma e formação de um tecido de cicatrização.

A face abaxial e o parênquima lacunoso foram os tecidos mais afetados devido à preferência do fungo pela face abaxial. As células dos tecidos colonizados sofreram desorganização, algumas apresentaram hiperplasia, outras se tornaram amorfas e plasmolizadas. O fungo se distribuiu, primeiramente, no sentido paralelo à face foliar. Observou-se a presença de almofadas apressoriais.

Os testes histoquímicos não confirmaram a presença de substâncias fenólicas, mas foram positivos para lipídeos e proteínas. No entanto, não foram observadas diferenças entre o controle e o tratamento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. C. A. **Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiro resistente e susceptível.** 2000. 52 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BAARS, J. Geographic range, impact, and parasitism of lepidopteran species associated with the invasive weed *Lantana camara* in South Africa. **Biological Control**, v. 28, p. 293-301, 2003.
- BARRETO, R. W., EVANS, H.C., ELLISON, C. A. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. **Mycological Research**, v. 99, n. 7, p. 769-782, 1995.
- BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J. Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced structural responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Planta**, v. 197, p. 89-102, 1995.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, I. d. Electron microscopy. Boston: Jones and Barlett Publishers, 1992. 542 p.
- BRETON, F.; SANIER, C.; D'AUZAC, J. Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. **Journal of Plant Physiology**, v. 151, p. 595-602, 1997.
- BRETON, F.; SANIER, C.; D'AUZAC, J. Role of cassicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. **Journal Rubber Research**, v. 3, n° 2, p. 115-128, 2000.
- BROWN, I.; TRETOWAN, J.; KERRY, M.; MANSFIELD, J.; BOLWELL, G. P. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. **The Plant Journal**, v. 15, n°3, p. 333-343, 1998.
- BRUZZESE, E.; HANSAN, S. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. **Plant Pathology**, v. 32, p. 335-338, 1983.

- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. United States: Courier Companies, 2000, 1367 p.
- CARPIN, S.; CREVECOEUR, M.; MEYER, M.; SIMON, P.; GREPPIN, H.; PENEL, C. Identification of a  $CA^{2+}$  -pectate binding on an apoplasmic peroxidase. **The plant Cell**, v. 13, p. 511-520, 2001.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 1622 p.
- DANKYN, M.E.; MILHOLLAND, R.D. Histopathology of ripe rot caused by *colletotrichum gloeosporieoides* on muscadina grap. **Phytopathology**, v.74, n° 11, p. 1339-1341, 1984.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2° ed. London: Lewis Publishers, 1995. 434 p.
- DUARTE, M. L. R.; ASANO, S.; ALBUQUERQUE, F. C. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassiicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 205-215, 1983.
- ELLIS, M. B. 1971. **Dematiaceous hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1971. 608 p.
- FISHER D. B. Protein staining of ribboned Epon sections for microscopy. **Histochemic**, v. 16, p. 92-96, 1968.
- GHISALBERTI, E. L. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). **Fitoterapia**, v. 71, p. 467-486, 2000.
- GRIFFEY, R. T.; LEACH, L. G. The influence of age tissue on development of bean anthracnose lesion. **Phytopathology**, v.55, n° 9, p. 915-918, 1965.
- HACHLER, H.; HOHL, H. R. Temporal and spatial distribution patterns of collar and papillae wall appositions in resistant and susceptible tuber tissue of *Solanum tuberosum* infectible by *Phytophthora infestans*. **Physiological Plant Pathology**, v. 24, p. 107-118, 1984.
- HEATH, M. C. apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 117-124, 1998.
- HOLM, L. G.; PLUCKNETT, D. L.; PANCHO, J. V.; HERBERGER, J. P. **The World's Worst Weeds**. University of Hawaii Press, Honolulu, 1977. 609 p.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw Hill: New York, 1940. 523 p.

- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F. **Plant Systematics – A phylogenetic approach.** Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts U.S.A., 1999. 464 p.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** EDUR: Editora Universidade Rural, 1997. 198 p.
- KEANE, P. J.; LIMONGIELLO, N.; WARREN, M. A. A modified method for clearing and staining leaf-infecting fungi in whole leaves. **Australian Plant Pathology**, v. 17, n° 2, p. 37-38, 1988.
- LEWIS, S.; GOODMAN, R. N. Morphological effects of colletotol on tomato And Digitalis foliage. **Phytopathology**, v. 52, p. 1273-1276, 1962.
- MAUSETH, J. D. Fungi. In: Mauseth, J. D. **Botany: an introduction to plant biology.** 2° ed. San Marino: Saunders College Publishing, 1940. 542-574 p.
- MCKEEN, W. E.; SVIRCEV, A.M. Early development of *Peronospora tabacina* in the *Nicotiana tabacum* leaf. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 3, p. 145-158, 1981.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons.** Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1957, 1030-1041 p.
- ONESIROSAN, P.; MABUNI, C.T.; MORIN, R. B.; RICH, D.H.; ARNY, D.C. Toxin production by *Corynespora cassiicola*. **Physiological Plant Pathology**, v. 5, p. 289-295, 1975.
- PALMER, W. A.; WILSON, B. W.; PULLEN, K.R. Introduction, rearing, and host range of *Aerenicopsis championi* Bates (Coleoptera: Cerambycidae) for the biological control of *Lantana camara* L. in Australia. **Biological Control**, v. 17, p. 227-233, 2000.
- PEARSE A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied.** 4 ° ed. Longman Group Limited, 1980. ☞
- PEREIRA, J. M. *Prospodium tuberculatum* e *Corynespora cassiicola* como **agentes de biocontrole de Lantana camara.** 2001. 64 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PEREIRA, J. M.; BARRETO, R. W. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. **Mycopathology**, 151, 71-80. 2000.
- PEREIRA, J.M.; BARRETO, R.W.; ELLISON, C. A.; MAFFIA, L. A. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. **Biological Control**, v. 26, p. 21-31, 2003.

- PURWANTARA, A. Studi Histologi Daun Karet Yang Terserang *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. **Menara Perkebunan**, v. 55, n° 3, p. 47-49, 1987.
- SANDERS, D. A. *Lantana* poisoning in cattle. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 109, p. 139, 1946.
- SAXENA, S.; PANDEY, A. K. Evaluation of an indigenous isolate of *Alternaria alternata* (LC#508) for use as a mycoherbicide for *Lantana camara* L. **Crop Protection**, v. 21, p. 71-73, 2002.
- SEAWRIGHT, A. A. Studies on experimental intoxication of sheep with *Lantana camara*. **Australian Veterinary Journal**, v. 39, p. 340- 344, 1963.
- SHARMA, O. P.; MAKKAR, H. P. S.; DAWRA, R. K. A review of the noxious planta *Lantana camara*. **Toxicon**, v. 26, n° 11, p. 975-987, 1988.
- SILVA, W. P. K.; DEVERALL, B. J.; LYON, B. R. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi rubber plantations in Sri Lanka. **Plant Pathology**, v. 47, p. 267-277, 1998.
- SOLEREDER, S. **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Oxford Press, v.2, 1908. 1182 p.
- SPENCER, J. A.; WALTER, H. J. Variations in certain isolates de *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, v.59, p.58-60, 1969.
- TEMPLETON, G. E.; TEBEEST, D. O. Biological weed control with mycoherbicides. **Annual Review Phytopathology**, v. 17, p. 301-310, 1979.
- VANETTI, C. A. **Resistência do tomateiro a *Alternaria solani* induzida por quitina, ácido salicílico, benzotiadiazol e ácido acetil salicílico tamponado**. 2001. 65 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.