**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS
DA INTERAÇÃO**
Cuscuta racemosa Mart. x *Malvaviscus arboreus* Cav.

Gislei Cristina Gonçalves

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

**PIRACICABA/SP
Estado de São Paulo / Brasil
Novembro/1999**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Gonçalves, Gislei Cristina

Alterações fisiológicas e bioquímicas da interação *Cuscuta racemosa* Mart. X *Malvaviscus arboreus* Cav. / Gislei Cristina Gonçalves. - - Piracicaba, 1999.

206 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.

Bibliografia

1. Malvavisco 2. Planta hospedeira 3. Planta ornamental 4. Planta parasita 5. Relação
hospedeiro-parasito I. Título

CDD 635.9

À DEUS

*“ Não temas, porque Eu sou contigo, não
te assombres, porque Eu sou o teu
DEUS, Eu te fortaleço, e te ajudo, e te
sustento com a minha destra fiel.”*

(Isaías 41.10)

**“ QUEM CONHECE OS OUTROS É INTELIGENTE.
QUEM CONHECE A SI MESMO É SABIO.
QUEM VENCE OS OUTROS É FORTE.
QUEM VENCE A SI MESMO É PODEROSO.
QUEM SE FAZ VALER TEM FORÇA DE VONTADE
QUEM É AUTO-SUFICIENTE É RICO.
QUEM NÃO PERDE O SEU LUGAR É ESTAVEL.
QUEM MESMO NA MORTE NÃO PERECE**

ESSE VIVE. ”

(LAO TZU)

À minha família

**Em especial a minha mãe, que se foi cedo
demais...**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, agradeço pela força, coragem, benignidade e justiça, sem a qual nada eu seria, cujo amor imensurável me levantou todas as vezes que fraquejei e pensei cair.

Aos meus familiares que por muitas vezes não me auxiliaram diretamente, tentaram compreender minha ausência, a minha mãe cuja sabedoria me guiou e compreendeu, fez-me ver o mundo de diferentes formas, me ensinou a nunca desistir, mesmo quando teve a certeza de que iria partir.

A UNIMEP, representada pelas pessoas do Prof. Dr. Gustavo Alvim e a Prof^a. Dr^a. Gislaine Cervený, Darci Aparecida Latorre Monfrinato, pelo incentivo na elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos (as), Adriana Hayashi, Adriana Scarpari, Adriano Malosso, Ana Elci Silva Lima, Antônio Adão Santin, Aparecida Regina Prado, Aparecido Antônio Polon, Aparecido Celso Felipe de Almeida, Débora Marcia Grossi, Fabiana Gimenez, Fernando Martino Gusmão, Henrique César Pedrolli Percolari, Herminio Zanardo, Prof^a MS Ivete Ap. Tietz Granato, Iza Maria Bernardino, Josemari Cristina Parizzi, Pós-graduando Lasaro Vanderlei da Silva, Prof. Dr. Luiz Antônio Rochelle, Luis, Marco Antonio Gallo, Maria Aparecida Packer, Maria Cristina de Almeida Prado Ribeiro, Maria Lucia Camargo, Patricia Carla Paulino, Raquel Belmudes Lordello, MS. Raquel Foroni, Regiane Melega, Regina Célia M. Soave, Ricardo Narvaes Bellucco, Reimar Padovani, Rosana Custódio Barbosa, Sandra Cristina Soave, Sandra Helena de Souza Rodrigues, Prf^a MS. Silvia Helena Holita Figueiredo, Soraya Patrícia Frota Clemente Bellucco, Valéria Maria Gomes, Vicente de Paula Arcolino, Wagner Fernandes Ferreira, Roselene Canato Felipe Oliveira, pelos auxílios diretos e indiretos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo, pela orientação e “paciência”, na elaboração do presente trabalho e no decorrer deste curso.

Ao meu amigo Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pelo auxílio na ausência do meu orientador, cuja sabedoria e paciência fizeram despertar em mim a sede do saber, pois só desperta a paixão de aprender, quem tem paixão de ensinar, pela co-orientação, sem a qual não teria sido possível obter pleno êxito no presente trabalho.

Ao Centro de Biotecnologia de Plantas (CEBTEC), onde foi realizado o presente trabalho, a equipe extremamente competente, Prof^a Dr^a. Helaine Carrer, Prof. Dr. Murilo de Mello, MS Enio Tiago de Oliveira, MS Valentina de Fátima de M. Orelli, Técnico Antônio F. de Campos Amaral, Técnico Romeu Aparecido Rocha, Secretária Maria Solizete Granziol Silva, aos Pós-graduandos Daniela Defávani, Fábio Borgatto, Irving Joseph Berger, Maria Clara Pestanha, Telma K. Hayashi e Tercílio Calsa Junior.

Ao Departamento de Ciências Florestais (IPF), ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, a Técnica Elza Martins Ferraz, ao Técnico Gelson Dias Fernandes e a Doutoranda Maria Beatriz Perecin, pela amizade, incentivo e auxílio laboratorial fundamental.

Ao Departamento de Nutrição Mineral, ao Prof. Dr. Quirino Augusto C. Carmello, as Técnicas Nivanda Maria de Moura, Lurdes Ap. Dario de Gonzalez, Mirtes Ventura Sesso, e a secretaria Sueli Maria Amaral Campos Bovi, e Técnico Luis Lucatti, pela amizade, incentivo e auxílio laboratorial fundamental.

Ao Departamento de Fitopatologia, ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati, Prof.^a Dra. Maria Heloisa Duarte Moraes, ao Prof Dr. José Renato Stangarlin, aos Técnicos José Rodolfo Groppo e Fernanda Yeda Groppo, a estagiária Renata Rodrigues de Almeida pela amizade, incentivo e auxílio laboratorial fundamental.

Ao Marcelo Corrêa Alves e Eclison Dutra Nepumuceno do Ciagri/Esalq/USP, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas e seu corpo docente e técnico, onde pude ampliar meus conhecimentos, a secretária Maria Cristina Clemente Furlan na qual encontrei uma sincera amizade e que sempre me incentivou a continuar.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo -FAPESP
pelo Auxílio Financeiro para a realização deste trabalho - Processo FAPESP Nº
98/6409-6

A todos que me incentivaram ou criticaram, mas que com esta atitude
somente me impeliram a caminhar para frente, me estimulando a nunca desistir.

A todos que oraram por mim.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIACÕES	xxviii
RESUMO	xxix
SUMMARY	xxxix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Cuscuta racemosa</i> Mart.	3
2.1.1 Bioquímica do parasitismo na interação <i>Cuscuta</i> x <i>Malvaviscus</i>	9
2.2 Mecanismo de resistência	13
2.2.1 Composição da parede celular do hospedeiro	18
2.2.2 Fisiologia do parasitismo em angiospermas	23
2.2.2.1 Bioquímica da resposta de defesa	25
2.3 Atividades enzimáticas	28
2.3.1 Peroxidase (EC 1.11.1.7)	28
2.3.2 Exo (EC 3.2.1.91) e Endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)	31
2.3.3 Xilanase (EC 3.2.1.8)	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Delineamento Experimental	36
3.1.1 Experimento I	36
3.1.1.1 Efeito da <i>Cuscuta</i> sobre as folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	36
3.1.1.2 Efeito do parasitismo na atividade de enzimas nos pecíolos liofilizados das folhas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	37
3.1.1.3 Fluxograma do Experimento I	39
3.1.2 Experimento II	40

3.1.2.1 Efeito da <i>Cuscuta</i> sobre os pecíolos das folhas e nas folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	40
3.1.2.2 Fluxograma do Experimento II	42
3.2 Delineamento Estatístico	43
3.3 Análises químicas em folhas frescas e liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	43
3.3.1 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS) em folhas liofilizadas e frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	43
3.3.2. Açúcares redutores em folhas liofilizadas e frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	45
3.3.3 Macro e Micronutrientes em folhas liofilizadas	46
3.3.4 Determinação da atividade específica de peroxidase (EC. 1.11.1.7) em folhas liofilizadas e frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	47
3.3.5. Caracterização Eletroforética - Sistema Eletroforético em Gel de Amido em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	48
3.3.5.1 Preparo das Amostras	48
3.3.5.2 Desenvolvimento Eletroforético	48
3.4 Análises químicas em pecíolos das folhas liofilizadas e frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	50
3.4.1 Determinação da massa de matéria seca (MMS) e preparação dos extratos de pecíolos liofilizados e frescos das folhas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	50
3.4.2 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos liofilizados e frescos de <i>Malvaviscus arboreus</i>	51
3.4.3 Açúcares redutores em pecíolos liofilizados e frescos de <i>Malvaviscus arboreus</i>	51
3.4.4 Determinação da atividade celulolítica em pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i>	51

3.4.4.1 Atividade da exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)	51
3.4.4.2 Atividade da endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)	52
3.4.5 Determinação da Atividade da Xilanase (EC 3.2.1.8) em pecíolos lioofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i>	53
3.4.6 Determinação da atividade específica da peroxidase (EC. 1.11.1.7) em pecíolos liofilizados e frescos de <i>Malvaviscus arboreus</i>	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Observações visuais das folhas e pecíolos de <i>Malvaviscus arboreus</i> e dos filamentos de <i>Cuscuta racemosa</i>	54
4.2 Experimento I - Folhas e pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i>	61
4.2.1 Massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i> <i>arboreus</i>	61
4.2.1.1 Massa de matéria seca (MMS) nos pecíolos liofilizadas de <i>Malvaviscus</i> <i>arboreus</i>	62
4.2.2 Proteína total solúvel (PTS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i> <i>arboreus</i>	64
4.2.2.1 Proteína total solúvel (PTS) nos pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus</i> <i>arboreus</i>	66
4.2.3 Açúcares redutores em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	67
4.2.3.1 Açúcares redutores em pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i>	70
4.2.4 Macro e micronutrientes em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	72
4.2.5 Atividade específica de peroxidase da peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	95
4.2.6 Caracterização eletroforética das isoenzimas de peroxidases em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	96
4.2.7 Atividade Celulolítica: exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91), endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4), e atividade da xilanase (EC 3.2.1.8) nos pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i>	101
4.3 Experimento II - Folhas e pecíolos frescos de <i>Malvaviscus arboreus</i>	107

4.3.1 Massa de matéria seca nas folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	107
4.3.1.1 Massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	108
4.3.2 Teor de proteína total solúvel (PTS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	110
4.3.2.1 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	112
4.3.3 Açúcares redutores (AR) em folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	114
4.3.3.1 Açúcares redutores nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	115
4.3.4 Atividade específica de peroxidase nos pecíolos nas folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	117
5 CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
APÊNDICE	150

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Representação esquemática da estrutura da cutícula em tecido foliar (adaptado de Juniper & Jeffree, 1983, fonte: Pascholati, 1995).	19
Figura 2 Representação esquemática da estrutura e composição das paredes de células vegetais (adaptado de Agrios, 1988; Heitefuss & Williams, 1976, fonte: Pascholati, 1995).	20
Figura 3 Estrutura básica da celulose e das microfibrilas (adaptado de Agrios, 1988; Goodmann et al., 1986, fonte: Pascholati, 1995).	21
Figura 4 Observação visual do estabelecimento do parasitismo após 55 dias do início do parasitismo.	56
Figura 5 Observação visual do parasitismo 55 dias após a inoculação da <i>Cuscuta</i> . Pode-se observar pela figura que em algumas plantas, o parasitismo se tornou deficiente.	56
Figura 6 Observação visual do declínio do parasitismo após 95 e 108 D.A.I. de seu início.	57
Figura 7 Após a morte dos filamentos de <i>Cuscuta racemosa</i> surge uma cicatriz decorrente do parasitismo na planta hospedeira.	57
Figura 8 Fotografia da formação de um haustório da <i>Cuscuta racemosa</i> sob uma folha de <i>Malvaviscus arboreus</i> , foto realizada sob estereomicroscópio Zeizz ampliada 600x.	58

Figura 9	Detalhe do haustório do filamento de <i>Cuscuta racemosa</i> , idem a anterior.	58
Figura 10	Observação de folhas de <i>Malvaviscus arboreus</i> parasitada com sucesso e de folhas cujo parasitismo não se estabeleceu.	59
Figura 11	Observação de dois pecíolos onde a <i>Cuscuta</i> não conseguiu se estabelecer junto a um pecíolo onde o parasitismo foi eficaz.	59
Figura 12	Observação de um pecíolo de <i>Malvaviscus arboreus</i> parasitado anteriormente por haustórios de <i>Cuscuta racemosa</i>	60
Figura 13	Observação detalhando o anel de haustórios que envolviam o pecíolo de <i>Malvaviscus arboreus</i>	60
Figura 14	Porcentagem da massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 2 a 6, no Apêndice.	62
Figura 15	Porcentagem da massa de matéria seca (MMS) em pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 7 a 11, no Apêndice.	63
Figura 16	Porcentagem do teor de proteína total solúvel (PTS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 12 a 15, no Apêndice.	65

Figura 17	Porcentagem do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos das folhas liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 16 a 21, no Apêndice.	67
Figura 18	Porcentagem de açúcar redutor (AR) nas folhas liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 22 a 25, no Apêndice.	69
Figura 19	Porcentagem de açúcares redutores (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média A análise estatística encontra-se nas Tabelas 26 a 30, no Apêndice.	71
Figura 20	Conteúdo de Nitrogênio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 33 a 36, no Apêndice.	76
Figura 21	Conteúdo de Fósforo em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 37 a 39, no Apêndice	78
Figura 22	Conteúdo de Potássio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 40 a 43, no Apêndice.	80
Figura 23	Conteúdo de Cálcio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 44 a 45, no Apêndice.	82

Figura 24	Conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 46 a 49, no Apêndice.	84
Figura 25	Conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 50 a 53, no Apêndice.	86
Figura 26	Conteúdo dos Macronutrientes nas plantas “in natura”, controle e parasitadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> dados em g/kg PS.	87
Figura 27	Conteúdo de Manganês em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 54 a 55, no Apêndice.	89
Figura 28	Conteúdo de Cobre em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 56 a 57, no Apêndice.	90
Figura 29	Conteúdo de Zinco em folhas liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 58 a 61, no Apêndice.	91
Figura 30	Conteúdo de Ferro em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 62 a 65, no Apêndice.	92
Figura 31	Conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 66 a 69, no Apêndice.	93

Figura 32	Conteúdo dos Micronutrientes nas plantas “in natura”, controle e parasitadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> dados em mg/kg PS.	94
Figura 33	Atividade específica da peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 70 a 75 , no Apêndice	96
Figura 34	Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 1 (55 dias) das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> (no lado esquerdo cedro e plantas controle, no lado direito plantas parasitadas e cedro).	99
Figura 35	Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 2 (95 dias) das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> (no lado direito cedro e plantas controle, no lado esquerdo plantas parasitadas e cedro).	99
Figura 36	Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 3 (108 dias) das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> (no lado esquerdo plantas controle, no lado direito plantas parasitadas).	100
Figura 37	Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 4 (180 dias) das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> (no lado esquerdo cedro e plantas controle, no lado direito plantas parasitadas e cedro).	100
Figura 38	Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 0 folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> Cav. "in natura". (cedro, plantas "in natura", cedro).	101

Figura 39	Atividade da exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91) em pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 77 a 82, no Apêndice.	104
Figura 40	Atividade da endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4) em pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 83 a 88, no Apêndice.	105
Figura 41	Atividade da xilanase (EC 3.2.1.8) em pecíolos liofilizados de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão A análise estatística encontra-se nas Tabelas 89 a 92, no Apêndice.	106
Figura 42	Porcentagem de massa de matéria seca nas folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas, testemunha e filamentos de <i>Cuscuta</i> . Barras representam o erro padrão A análise estatística encontra-se nas Tabelas 93 a 103, no Apêndice.	108
Figura 43	Porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos frescos de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas, testemunha e filamentos de <i>Cuscuta</i> . Barras representam o erro padrão. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 104 a 114, no Apêndice.	110
Figura 44	Porcentagem de proteína total solúvel (PTS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i> testemunha, controle, parasitadas e <i>Cuscuta racemosa</i> . Barras representam o erro padrão da média, os valores foram multiplicados por 10 para melhor visualização dos dados. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 116 a 123, no Apêndice.	111

Figura 45	Porcentagem do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos de <i>Malvaviscus arboreus</i> testemunha, controle, parasitadas e <i>Cuscuta racemosa</i> . Barras representam o erro padrão da média, os valores foram multiplicados por 10 para melhor visualização dos dados. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 124 a 132, no Apêndice.	113
Figura 46	Porcentagem de açúcar redutor (AR) nas folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i> testemunha, controle, parasitadas e <i>Cuscuta racemosa</i> . Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 133 a 140, no Apêndice.	115
Figura 47	Porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i> testemunha, controle, parasitadas e <i>Cuscuta racemosa</i> . Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 141 a 147, no Apêndice.	116
Figura 48	Atividade específica de peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas, testemunha e filamentos de <i>Cuscuta</i> . Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 148 a 156, no Apêndice.	118
Figura 49	Atividade específica de peroxidase em pecíolos frescos de <i>Malvaviscus arboreus</i> controle, parasitadas, testemunha e filamentos de <i>Cuscuta</i> . Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 157 a 165, no Apêndice.	119

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Solução de extração número 1 de Alfenas et al. (1991).	48
Tabela 2 Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	151
Tabela 3 Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	151
Tabela 4 Análise de regressão, teste de curvilinearidade para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	151
Tabela 5 Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	152
Tabela 6 Parâmetros estimados para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	152
Tabela 7 Quadro de análise de variância para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	152
Tabela 8 Teste de Tukey para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	153
Tabela 9 Teste de curvilinearidade para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	153

Tabela 10	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	153
Tabela 11	Parâmetros estimados para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	154
Tabela 12	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	154
Tabela 13	Teste de Tukey para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	154
Tabela 14	Quadro do modelo de regressão para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	155
Tabela 15	Quadro dos parâmetros estimados para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	155
Tabela 16	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	155
Tabela 17	Teste de Tukey para a a variável tempo na porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	156
Tabela 18	Teste de Tukey para a hipótese de nulidade para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	157
Tabela 19	Teste de curviliniariedade para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	157

Tabela 20	Quadro da análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	158
Tabela 21	Parâmetros estimados para o modelo de regressão na porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	158
Tabela 22	Quadro de análise de variância para açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	158
Tabela 23	Teste de Tukey para açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	159
Tabela 24	Quadro de análise de variância para o estudo de regressão para a porcentagem de açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	159
Tabela 25	Quadro dos parâmetros estimados para análise de regressão dos açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	159
Tabela 26	Quadro de análise de variância para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	160
Tabela 27	Teste de Tukey para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	160
Tabela 28	Teste de curvilineridade para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	160

Tabela 29	Quadro de análise de variância para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	161
Tabela 30	Parâmetros estimados para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	161
Tabela 31	Conteúdo dos Macronutrientes nas plantas “in natura”, controle e parasitadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> dados em g/kg PS.	73
Tabela 32	Conteúdo dos Micronutrientes nas plantas “in natura”, controle e parasitadas de <i>Malvaviscus arboreus</i> dados em mg/kg PS.	73
Tabela 33	Quadro de análise de variância para a variável dependente conteúdo de Nitrogênio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	161
Tabela 34	Teste de TuKey. Médias transformadas para comparação do conteúdo de Nitrogênio observados em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	162
Tabela 35	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Nitrogênio observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	162
Tabela 36	Quadro de análise dos Parâmetros Estimados conteúdo de Nitrogênio observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	162
Tabela 37	Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Fósforo observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	163

Tabela 38	Teste de Tukey. Médias transformadas para comparação do conteúdo de Fósforo observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i> em quatro diferentes níveis de tempo.	163
Tabela 39	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Fósforo observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	163
Tabela 40	Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	164
Tabela 41	Teste de Tukey. Médias transformadas para o conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i> , em quatro diferentes níveis de tempo.	164
Tabela 42	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão para o conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	164
Tabela 43	Quadro de análise dos Parâmetros Estimados para o conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	165
Tabela 44	Quadro de análise de variância para a variável dependente Cálcio - Medida do conteúdo de Cálcio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	165
Tabela 45	Quadro de análise de variância para o estudo de regressão do conteúdo de Cálcio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	165

Tabela 46	Quadro de análise de variância para a variável dependente Enxofre - Medida do conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	166
Tabela 47	Teste de Tukey com médias transformadas para comparação de níveis de tempo conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	166
Tabela 48	Quadro de análise de variância para o estudo de regressão do conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	166
Tabela 49	Quadro de análise de parâmetros estimados para o conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	167
Tabela 50	Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	167
Tabela 51	Teste de Tukey. Médias transformadas para comparação do conteúdo de Magnésio observados em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	167
Tabela 52	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	168
Tabela 53	Análise dos parâmetros estimados para o conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	168
Tabela 54	Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Manganês - Inverso da raiz de teor de manganês em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	168

Tabela 55	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão do conteúdo de Manganês em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	169
Tabela 56	Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Cobre - Medidas do conteúdo de Cobre observados em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	169
Tabela 57	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Cobre em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	169
Tabela 58	Quadro de análise de variância para o conteúdo de Zinco em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	170
Tabela 59	Teste de Tukey. Medias transformadas para comparação do conteúdo de Zinco observados em quatro diferentes níveis de tempo.	170
Tabela 60	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão para o conteúdo de Zinco em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	170
Tabela 61	Análise dos parâmetros estimados para o conteúdo de Zinco em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	171
Tabela 62	Quadro de análise de variância para a variável dependente conteúdo de Ferro - Log 10 (conteúdo de ferro) em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	171
Tabela 63	Teste de Tukey. Medias transformadas para comparação do conteúdo de Ferro observados em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	171

Tabela 64	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão conteúdo de Ferro em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	172
Tabela 65	Quadro de análise dos parâmetros estimados para o conteúdo de Ferro em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	172
Tabela 66	Quadro de análise de variância para a variável dependente conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	172
Tabela 67	Teste de Tukey para o conteúdo de Boro observado em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	173
Tabela 68	Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	173
Tabela 69	Quadro dos parâmetros estimados conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	173
Tabela 70	Quadro da análise de variância para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	174
Tabela 71	Teste de Tukey para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	174
Tabela 72	Teste de Tukey para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i> para a interação “tempo*trat”. Destaca-se em negrito que ocorre significância.	175

Tabela 73	Teste de Curvilinearidade para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i> para a interação “tempo*trat”. Destaca-se em negrito que ocorre significância.	176
Tabela 74	Quadro de variância para o modelo de regressão da atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	176
Tabela 75	Parâmetros estimados para o modelo de regressão da atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	176
Tabela 76	Média dos valores referentes aos Rfs das bandas de peroxidase referentes ao gel de amido das Fases 0, 1, 2, 3 e 4 das plantas “in natura”, controle e parasitadas de <i>Malvaviscus arboreus</i>	98
Tabela 77	Quadro de análise de variância para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	177
Tabela 78	Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tratamento” para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	177
Tabela 79	Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tempo” para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	177
Tabela 80	Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tempo” versus “tratamento” para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	178

Tabela 81	Análise de variância para o estudo de regressão para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	178
Tabela 82	Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	179
Tabela 83	Quadro de análise de variância para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	179
Tabela 84	Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tempo” para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	179
Tabela 85	Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tratamento” para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	180
Tabela 86	Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tratamento” versus “tratamento” para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	180
Tabela 87	Quadro de análise de variância para o estudo de regressão para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	181

Tabela 88	Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	181
Tabela 89	Quadro de Análise de Variância para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	181
Tabela 90	Teste de Tukey – Relacionamento entre as variáveis “tempo” para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	182
Tabela 91	Análise de variância para o estudo de regressão para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	182
Tabela 92	Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de <i>Malvaviscus</i>	182
Tabela 93	Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	183
Tabela 94	Parâmetros estimados para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	183
Tabela 95	Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	183

Tabela 96	Parâmetros estimados para a análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	183
Tabela 97	Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento. .	184
Tabela 98	Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	184
Tabela 99	Teste de Tukey/LSMEAN para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	185
Tabela 100	Análise de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	185
Tabela 101	Parâmetros estimados para a análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	186
Tabela 102	Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento x Testemunha.	186
Tabela 103	Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento x Testemunha.	186

Tabela 104	Quadro de Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	187
Tabela 105	Análise de variância para o estudo de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	187
Tabela 106	Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	187
Tabela 107	Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	188
Tabela 108	Quadro de análise de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	188
Tabela 109	Parâmetros estimados para a análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	188
Tabela 110	Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	189
Tabela 111	Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	189

Tabela 112	Teste de Tukey/LSMEAN para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	190
Tabela 113	Quadro da análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento x Testemunha.	190
Tabela 114	Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento x Testemunha.	191
Tabela 115	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha x tempo.	191
Tabela 116	Parâmetros estimados para a porcentagem de PTS em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha x tempo.	191
Tabela 117	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	192
Tabela 118	Quadro de análise de variância nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i> ao longo do tempo na porcentagem de PTS.	192
Tabela 119	Parâmetros estimados nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i> ao longo do tempo na porcentagem de PTS.	192
Tabela 120	Quadro de análise de variância para porcentagem de PTS em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	193

Tabela 121	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão para porcentagem de PTS em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	193
Tabela 122	Parâmetros estimados para o modelo de regressão para porcentagem de PTS em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	193
Tabela 123	Parâmetros estimados para o modelo de regressão para porcentagem de PTS em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento x Testemunha.	194
Tabela 124	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	194
Tabela 125	Teste de Tukey para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	194
Tabela 126	Quadro da análise de variância para o modelo de regressão para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	195
Tabela 127	Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha	195
Tabela 128	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	195

Tabela 129	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	196
Tabela 130	Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	196
Tabela 131	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha x Controle.	196
Tabela 132	Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento.	197
Tabela 133	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nas folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	197
Tabela 134	Quadro da análise de variância para o modelo de regressão para a porcentagem de AR nas folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	197
Tabela 135	Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nas folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	198
Tabela 136	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	198
Tabela 137	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	

Tabela 138	Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	198
Tabela 139	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nas folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha x Controle.	199
Tabela 140	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nas folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento x Testemunha.	199
Tabela 141	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha.	199
Tabela 142	Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha	200
Tabela 143	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	200
Tabela 144	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	200
Tabela 145	Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	201
Tabela 146	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Testemunha x Controle.	201
Tabela 147	Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nas folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> . Controle x Tratamento x Testemunha.	201

Tabela 148	Quadro da análise de variância para a atividade específica de peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha.	202
Tabela 149	Quadro da análise de variância do modelo de regressão para a atividade específica de peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha.	202
Tabela 150	Parâmetros estimados do modelo de regressão para a atividade específica de peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha	202
Tabela 151	Quadro de análise de variância para a atividade específica nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	203
Tabela 152	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão para a atividade específica de peroxidase nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	203
Tabela 153	Parâmetros estimados para o modelo de regressão para a atividade específica de peroxidase nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	203
Tabela 154	Quadro da análise de variância para a atividade específica de peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Controle x Tratamento.	204
Tabela 155	Quadro da análise de variância para a atividade específica de peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Tratamento x Controle x Testemunha.	204

Tabela 156	Teste de Tukey para a atividade específica de peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Tratamento x Controle x Testemunha.	204
Tabela 157	Quadro da análise de variância para a atividade específica de peroxidase os pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha.	205
Tabela 158	Quadro da análise de variância do modelo de regressão para a atividade específica de peroxidase os pecíolos das folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha.	205
Tabela 159	Parâmetros estimados do modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Testemunha.	205
Tabela 160	Quadro de análise de variância para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	206
Tabela 161	Quadro de análise de variância para o modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	206
Tabela 162	Parâmetros Estimados para o modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita <i>Cuscuta</i>	206
Tabela 163	Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Controle x Tratamento.	207

Tabela 164	Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Tratamento x Controle x Testemunha.	207
Tabela 165	Teste de Tukey para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de <i>Malvaviscus</i> Tratamento x Controle x Testemunha.	207

LISTA DE ABREVIACÕES

ABREVIACO	SIGNIFICADO
AR	Açúcar redutor
BSA	Albumina Soro Bovina
CM	Citrato Morfolina
CMC	Carboximetil celulose
CM-xylan-RBB	Xilana carboximetilada marcada com remazol brilhante azul
D.A.I.	Dias após a coleta
DIECA	Dietilcarbamato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilenodiamino tetra acetato
HAPHB	Hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico
KDa	Quilodalton
MMS	Massa de Matéria Seca
RIPs	Proteínas inativantes de ribossomos
RP	Proteína de resistência
PRP	Proteína de relacionadas à patogênese
PTS	Teor de Proteína Total Solúvel
PVP-40	Polivinilpirrolidone
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TRIS	Hidroximetil amino metano

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA INTERAÇÃO

Cuscuta racemosa Mart. x *Malvaviscus arboreus* Cav.

Autora: GISLEI CRISTINA GONÇALVES

Orientador: Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO GALLO

RESUMO

O parasitismo envolvendo plantas superiores se estabelece através de mecanismos fisiológicos e bioquímicos que trazem vantagens para a planta parasita em detrimento do hospedeiro, o qual, muitas vezes, dependendo das condições ambientais, pode recuperar-se retomando suas atividades metabólicas. Para contribuir à compreensão da interação entre planta parasita e seu hospedeiro é que o presente trabalho foi conduzido utilizando-se como hospedeiro *Malvaviscus arboreus* Cav. e como parasita *Cuscuta racemosa* Mart. Essa parasita é uma planta herbácea, trepadeira perene com caule filiforme e delicado, afilica ou com poucas folhas reduzidas. Os seus filamentos envolvem a planta de *Malvaviscus* e desta se nutrem através de seus haustórios; ocorrendo uma drenagem de nutrientes orgânicos e inorgânicos dos sítios de infecção no hospedeiro, para os filamentos da *Cuscuta*.

Plantas de *Malvaviscus* foram cultivadas em vasos contendo uma mistura de solo, terra vegetal e turfa, mantidas em casa-de-vegetação e infectadas com filamentos de *Cuscuta* obtidos no campo. Plantas de *Malvaviscus* sem os filamentos da parasita foram utilizadas como controle. Foram conduzidos dois tipos de experimentos: **Experimento I**, coleta de folhas e pecíolos do hospedeiro nas Fases T₀ (0 dias, testemunha, imediatamente antes da cobertura do hospedeiro com a manta de filamentos da parasita); Fase T₁ 55 dias; Fase T₂ 95 dias; Fase T₃ 108 dias; Fase T₄ 180 dias após o início do experimento. Neste experimento o material foi liofilizado para análise de massa de matéria seca, macro e micronutrientes, proteína total solúvel, açúcares redutores, atividade específica de peroxidase e análise eletroforética de isoenzimas de peroxidase. **Experimento II**, coleta de folhas e pecíolos de *Malvaviscus* para analisar os

sítios de infecção, os locais distantes desses sítios e os filamentos de *Cuscuta*; foi utilizado material fresco para análise de massa de matéria seca, proteína total solúvel, açúcares redutores e atividade específica de peroxidase. O material foi coletado nas seguintes fases: Fase T₀ (0 dias, inicial); Fase T₁ 5 dias; Fase T₂ 32 dias e Fase T₃ 44 dias após o início do experimento. Todos os parâmetros foram analisados seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado.

Os filamentos de *Cuscuta* desenvolveram-se sobre as plantas de *Malvaviscus* estabelecendo a interação parasítica com um pico máximo entre 55 e 95 dias após o início do experimento; em ambos experimentos identificou-se o pecíolo das folhas do hospedeiro como sendo o sítio da infecção. As plantas de *Malvaviscus* reagiram à invasão da parasita, recuperando-se da infecção a partir de 95 dias quando então os filamentos de *Cuscuta* começaram a definhar. A ação deletéria da parasita fizeram-se sentir no decréscimo dos valores de massa de matéria seca e no conteúdo de nutrientes nas folhas e pecíolos do hospedeiro, como consequência da drenagem dos mesmos para os filamentos de *Cuscuta*. Essa drenagem também pode ser observada no caso dos açúcares redutores cujo teor sofreu fortes alterações no hospedeiro e foi cerca de 6 vezes maior nos filamentos de *Cuscuta* do que em folhas e pecíolos de *Malvaviscus*. Nestes últimos foi detectado aumento nos valores de proteínas totais solúveis e da atividade específica de peroxidase e de exo- β -1,4- glucanase envolvidas nos mecanismos de formação de parede celular e no metabolismo de carboidratos complexos, apesar de os valores de xilanase e de endo- β -1,4-glucanase terem diminuído, aparentemente como resposta à invasão da parasita, uma vez que o hospedeiro recuperou-se, o que foi constatado ao 180 dias após o início do experimento, quando então as plantas de *Malvaviscus* que haviam sido parasitadas por *Cuscuta* retomaram o seu desenvolvimento, com a maioria parâmetros aqui analisados retornando aos seus valores iniciais.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES OF THE INTERACTION

Cuscuta racemosa x *Malvaviscus arboreus* Cav.

Author: GISLEI CRISTINA GONÇALVES

Adviser: Prof. Dr. LUIZ ANTONIO GALLO

SUMMARY

The parasitism involving superior plants settles down through physiologic and biochemical mechanisms that bring advantages for the plant parasite in detriment of the host, which, several times, depending on the environmental conditions, can recover its metabolic activities. To contribute to the understanding of the interaction between parasitic plants and their hosts the present work was performed using *Malvaviscus arboreus* Cav. as host and *Cuscuta racemosa* Mart. as parasite. This parasite is a herbaceous plant, perennial creeper with phylliform and soft stem, aphyllous or with little reduced leaves. Its branches involve the plant of *Malvaviscus* and are nurtured through its haustoria; a drainage of organic and inorganic nutrients from the infection sites in the host to the *Cuscuta* branches sets up.

Plants of *Malvaviscus* were cultivated in vases containing a mixture of soil and peat, which were maintained in greenhouse and infected with *Cuscuta* branches obtained in the field. Plants of *Malvaviscus* that had not been infected with the parasite were used as control. Two types of time course experiments were conducted: **Experiment I.** leaves and petioles of the host were collected at Phase T₀ (0 days, immediately before the covering of the host with the mantle of the parasite branches); Phase T₁ 55 days; Phase T₂ 95 days; Phase T₃ 108 days; Phase T₄ 180 days after the beginning of the experiment. In this experiment the material was lyophilized to analyse mass of dry matter, macro and micronutrients, soluble total protein, reduced sugar, specific activity of peroxidase and electrophoretic analysis of peroxidase isoenzymes. **Experiment II.** Leaves and petioles of *Malvaviscus* were collected in order to analyze the infection sites, not

infected regions of the leaves or petioles and the *Cuscuta* branches; fresh material was used for analysis of mass of dry matter, soluble total protein, reduced sugars and specific activity of peroxidase. The material was collected in the following phases: Phase T₀ (0 days, initial); Phase T₁ 5 days; Phase T₂ , 32 days and Phase T₃ 44 days after the beginning of experiment. All the data has been analysed statistically.

The *Cuscuta* branches were developed on the plants of *Malvaviscus* establishing the parasitic interaction with a maximum peak between 55 and 95 days after the beginning of the experiment; in both experiments the petioles of the leaves of the host were identified as being the infection site. The plants of *Malvaviscus* reacted to the invasion of the parasite, recovering of the infection starting from 95 days when then the branches of *Cuscuta* began to decay. The major effects of the parasite were to decrease the values of dry matter and in the content of nutrients in the host leaves and petioles, as a consequence of their drainage to the *Cuscuta* branches. That drainage could also be observed in the contents of reduced sugars which showed dramatic alteration in the host cell and it was almost 6 times higher in the *Cuscuta* branches than in the leaves and petioles of *Malvaviscus*. In the later increases in the values of soluble total proteins, specific activity of peroxidase and in the activity of exo- β -1,4 - glucanase, the enzymes involved in the mechanisms of formation of cell wall and in the metabolism of complex carbohydrates was detected; in spite of the decrease in the xylanase and endo- β -1,4-glucanase activities. Apparently these facts point out to a response to the invasion of the parasite, since the host recovered, what observed 180 days after the beginning of the experiment, when the plants of *Malvaviscus* that had been infected by *Cuscuta* recovered its development.

1 INTRODUÇÃO

Cuscuta racemosa Mart. é uma planta perene, holoparasita, do gênero *Cuscuta*, família Cuscutaceae, formadas por plantas trepadeiras herbáceas que possuem caules filiformes e delicados, afilicas ou possuem poucas folhas reduzidas. Aclorofiladas, são incapazes de executar fotossíntese, sendo assim necessitam viver às custas da planta hospedeira e, para isto, desenvolvem órgãos especiais denominados haustórios, através do quais conseguem sobreviver, retirando nutrientes orgânicos e inorgânicos do hospedeiro.

Esta espécie é denominada vulgarmente de cipó-chumbo (Bacchio et al., 1972), tinge ovos, cipó-dourado, aletria-de-pau, fios de ovos. É frequentemente encontrada sobre diversas culturas, chegando a infestar, em larga escala, plantas consideradas ornamentais. Devido a sua interação com a planta hospedeira este parasita a reveste com um amplo manto de filamentos de coloração dourada, permanecendo assim, retirando nutrientes da planta hospedeira suficientes à sua sobrevivência (Lorenzi, 1949), podendo vir a matar ou não seu hospedeiro.

A *Cuscuta* possui propriedades medicinais, atuando principalmente na medicina caseira, sendo utilizada como agente antiúlcera, cicatrizante e antiinflamatório (Bacchi, et al., 1995); sendo também utilizada como adstringente, emoliente, antiflogística, estomáquica, purgativa, diurética e antiblenorrágica.

Jeschke et al.(1994) e Jeschke et al. (1995) estudando a partição de nutrientes na associação *Cuscuta reflexa* x *Lupinus albus*, observaram uma drenagem severa de nutrientes da planta hospedeira para o parasita, indicando que o parasita afetava fortemente a concentração de íons nas células do hospedeiro.

Fric (1976) observou uma alteração metabólica correlacionada com mudanças na atividade de enzimas chaves para o metabolismo, tanto primário como secundário, associando-as aos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o patógeno. Em virtude desse fato, a peroxidase (EC 1.11.1.7) está presente nos tecidos das plantas (Hoagland, 1990), participando também de diversos processos fisiológicos de grande interesse e, freqüentemente, tem sido correlacionada por diversos autores nas respostas de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas.

Diversos mecanismos de resistência da planta a patógenos tem sido relatados. Dentre eles, está a produção de proteínas relacionadas a resistência a patógenos, que são ativadas ou possuem sua síntese induzida pela presença de patógenos. Também a produção de fitoalexinas e de outros mecanismos fisiológicos e bioquímicos estão relacionados aos mecanismos de defesa da planta. Tais mecanismos, atuando conjuntamente, procuram definir os sistemas de defesa da planta contra a invasão dos patógenos. Em relação à interação parasita-hospedeiro, quando a parasitada é outra planta superior, como o gênero *Cuscuta*, muito pouco se conhece sobre a bioquímica e fisiologia destas relações parasíticas. Assim, o trabalho ora desenvolvido procurou estudar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos de defesa da planta *Malvaviscus arboreus* Cav. e da planta parasita *Cuscuta racemosa* Mart.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cuscuta racemosa* Mart.

Encontradas na Europa e na Ásia, as espécies parasitas do gênero *Cuscuta*, *Cuscuta chinensis* e *Cuscuta reflexa*, estão largamente espalhadas pelo Brasil. *Cuscuta racemosa* Mart., tem indícios de ser uma das espécies mais disseminadas neste país.

Habitam as matas, campos, pomares, parques, jardins e as árvores das ruas, parasitando várias espécies de hospedeiros entre eles, as plantas ornamentais, tais como o *Hibiscus rosa-sinensis*, o qual quando parasitado por *Cuscuta odorata* forma um exemplo de hospedeiro incompatível nesta interação (Schlenzka, 1992).

No Brasil é comum dar-se o nome de Cipó Chumbo a todas as espécies do gênero parasitário *Cuscuta*, da família das Cuscutaceae, sendo consideradas invariavelmente nocivas. As plantas de *Cuscuta* são trepadeiras herbáceas, de porte variável, não possuem folhas ou, quando presentes, são rudimentares ou com formato de escamas simples. Suas flores são pequenas, sésseis, raramente pedunculadas, amarelas, brancas ou róseas (Bacchio et al., 1972). São aclorofiladas, sendo que algumas apresentam pequena quantidade de clorofila em virtude de sua interação com os hospedeiros (Wolswinkel & Halevy, 1989). O caule é constituído de longos filamentos capilares onde se encontram os haustórios. Estes são apêndices através dos quais a *Cuscuta* suga grande quantidade de nutrientes de seu hospedeiro, proliferando-se rapidamente, porém, às vezes, podendo exterminá-lo. Huang & Li (1994) verificaram a ação do Cálcio e da calmodulina na iniciação do haustório e concluíram que estes atuavam como mensageiros secundários neste processo. Também constataram que as células primárias do haustório eram ricas em calmodulina, e estas apresentaram-se como

uma região de baixo conteúdo de aminoácidos livres, quando comparadas com as demais regiões da *Cuscuta* (Paliyath & Mahadevan, 1988). Segundo Stewart & Press (1990), a ação de concentração de carboidratos no parasita é cerca de cinco vezes maior no hospedeiro, sendo o manitol o principal componente

Jorgensen (1991) ao estudar o desenvolvimento do haustório em *Sambuais nigra*, notou que, antes da penetração do órgão pelo parasita, este formava grande quantidade de carboidratos, armazenados no plasmalema e na parede celular e, em menor grau, no vacúolo.

Devido a suas estranhas formas consideradas até então bizarras, esta espécie tem despertado interesse entre os indígenas e aborígenes. Foi provavelmente devido a esse interesse e curiosidade destes povos que foram descobertas as suas propriedades fitoterápicas.

Esse gênero parasitário é utilizado na medicina natural em diversos países, como adstringente, emoliente, purgativo, depurativo, desobstruente do fígado, icterícia, diurético, antiblenorrágico, no tratamento de várias afecções da garganta, em cólicas hepáticas, em hemorragias, em feridas recentes, etc (Lorenzi, 1949). Estudos feitos na Índia (Nair & Thirupurasundari, 1992) sobre *Cuscuta reflexa* mostraram que a mesma possui propriedades relaxantes e espasmolíticas. Esses autores isolaram duas cumarinas, a escoparona (6,7-dimetiloxicumarina) e a melanetina (6-hidroxi-7-metoxi-4-(4-hidrofênil)-cumarina), juntamente com quercetina.

Saxena et al. (1988) observaram que o extrato de *Cuscuta* teria uso como agente de antifertilidade. Já Mahmood (1997), também observou que os constituintes da *Cuscuta reflexa* podem ser utilizados como agentes anti-HIV.

Oommachan et al. (1990) verificaram o uso de *Cuscuta reflexa* no tratamento da icterícia. Nisa et al. (1985) administraram extratos quentes aquosos de *Cuscuta chinensis* como anti-inflamatórios. Szykula et al. (1994), trabalhando com os constituintes da fração hexano de *Cuscuta chinensis* em meio a suas múltiplas ações fitoterápicas, também observaram seu uso no combate aos tumores.

Cuscuta racemosa Mart., parasitando *Hibiscus rosa-sinensis* L., teve seu extrato analisado no que se refere a sua ação antiúlcera. Na droga foi verificada a

presença de flavonóides, taninos, mucilagem e gomas, supondo-se que os flavonóides seriam responsáveis por sua ação, muito embora os taninos também estejam envolvidos (Bacchi, 1993).

Todo tipo de interação entre planta hospedeira e parasita desencadeia uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas, as quais repercutem intimamente na sobrevivência de ambas ou de apenas uma das espécies envolvidas, a mais forte ou melhor adaptada (Pascholati & Leite, 1995). Isto se deve principalmente a uma reação da planta hospedeira na tentativa de se manifestar contrária ao ataque que está sofrendo por parte da planta parasita, reação essa que se revela em alterações bioquímicas, como teor de proteínas e atividades enzimáticas.

As plantas parasitas tendem a penetrar o xilema ou, em alguns casos, também o floema de seus respectivos hospedeiros, tendo assim acesso aos reguladores de crescimento transportados no interior do mesmo. No caso da *Cuscuta*, como a mesma não possui sistema radicular, ela se torna totalmente dependente de seus hospedeiros para sua sobrevivência, desde a síntese de certos reguladores de crescimento até a obtenção de água (Stewart & Press, 1990).

Observou-se também que as plantas parasitas possuem uma taxa de transpiração freqüentemente superior a de seu hospedeiro, sendo considerado este fato uma característica fisiológica e, o resultado deste fenômeno, é a produção de um gradiente hídrico em direção à folha, facilitando o fluxo de novas fontes para o parasita. Este mecanismo é comum tanto nos caules quanto nas raízes de plantas parasitas pertencentes às diferentes regiões climáticas (Fischer, 1983; Press et al., 1988; Ullmann et al., 1985).

Smith (1990), ao estudar as faixas epidérmicas preparadas de folhas de *Striga hermonthica*, concluiu que sua alta concentração de potássio modificava sua resposta em relação à radiação, ao CO₂ e à concentração do ácido abscísico. Observou também que as altas taxas de transpiração, tanto durante o dia como à noite, pelos estômatos, oriundas de situações tais como a ação da irradiância ou mesmo o déficit de água, presumivelmente indicam ser características de parasitas foliares. Entretanto, folhas de mistletoes (erva-de-passarinho), geralmente possuem alta concentração de potássio, sendo este provavelmente o responsável pelas respostas lentas de seus estômatos.

Assim sendo, a junção haustorial demonstraria ser um componente de resistência para a direção da transpiração e do fluxo de água dentro do parasita. Segundo Glatzel (1987), em *Loranthus europaeus* parasitando *Quercus robur*, a resistência do haustório demonstrou ser de 2,6 a 4,2 vezes maior quando comparadas aos caules e hastes das plantas.

Em estudos feitos com plantas parasitas, como *Cuscuta* e hemiparasitas, como *Orobanch*e e *Thesium*, Fer et al. (1992) observaram alterações na nutrição mineral nas interações hospedeiro-parasita. Os hemiparasitas obtinham os nutrientes através do xilema do hospedeiro, enquanto que *Cuscuta* spp. os obtinha através do floema. Corroborou-se desse modo que ocorre uma influência do parasitismo sob a composição mineral e o crescimento do hospedeiro.

Anteriormente, Fer et al. (1990) ao estudarem a interação *Cuscuta lupuliformis* e *Vicia sativa*, em condições de casa-de-vegetação, verificaram que ocorria um impacto sobre a biomassa e o conteúdo de vários elementos minerais. Neste caso, as alterações não indicaram a existência de um mecanismo regulatório entre a planta hospedeira e o parasita, mas sim um forte crescimento, induzindo a inibição da *C. lupuliformis* em plantas de *V. sativa* parasitadas, possuindo um efeito essencial na retirada das substâncias orgânicas provenientes do hospedeiro.

Em várias plantas infectadas por angiospermas parasitas, inclusive do gênero *Cuscuta*, Fer (1979) observou uma migração de aminoácidos e amidas do hospedeiro para o parasita, indicando que a principal forma de nitrogênio que se acumulou nas células do parasita foi a orgânica. Stewart & Press (1990) enfatizaram que estudos enzimológicos e de crescimento em plantas parasitas sugerem que as mesmas teriam preferência por formas reduzidas de nitrogênio, apresentando limitada capacidade para assimilar o nitrogênio inorgânico, como o nitrato, o que aliás também já fora observado por Hall et al. (1987). Mecanismos de resistência das diferentes plantas ao ataque de vários parasitas, até então continuam revelando surpreendentes respostas, uma vez que ambos, hospedeiro e parasita, lutam para obter sua perpetuação no reino, seja animal ou vegetal.

Ao estudar petúnia híbrida infectada simultaneamente por *Orobancha cernua* e por *Cuscuta* spp. (*C. campestris*, *C. indecora* e *C. reflexa*), Setty (1971) observou alterações nos conteúdos de proteínas e fósforo. A infecção primária diminuiu estas substâncias no hospedeiro, porém, a infecção secundária provocada por *Cuscuta* spp. manteve o efeito da infecção primária, constatando-se assim a ação dos diferentes parasitas sobre o mesmo hospedeiro, comprovando respostas à infecção.

Malicki & Berbeciowa (1986) observaram que, em *Cuscuta trifolii* e *Cuscuta epithymum*, os conteúdos de Ca^{++} e Mg^{++} foram menores nos parasitas do que nos hospedeiros. Entretanto, os teores de P e K^+ tiveram uma inter-relação positiva entre hospedeiro e parasita.

Em outro experimento sobre o parasitismo simultâneo com *Orobancha* spp. e *Cuscuta* spp. em petúnia híbrida, os níveis de proteína e fósforo sofreram redução na planta hospedeira pela primeira infecção por *Orobancha* spp., mantendo-se assim durante a segunda infecção por *Cuscuta* spp. (Setty, 1971).

Bhattacharya (1977), ao observar as inter-relações na composição mineral entre hospedeiro e parasita durante uma infecção provocada por *Cuscuta reflexa* sobre 12 espécies de plantas hospedeiras, constatou a existência de correlações positivas entre parasita e hospedeiro, sendo que o parasita preferencialmente acumulou mais P, K^+ e S do que os outros nutrientes.

A nutrição das plantas parasitas tem sido pesquisada através de variados experimentos, entre eles os testes “in vitro” são os mais comuns. Através destes experimentos procura-se estabelecer quais são os fatores nutricionais derivados do hospedeiro. Okonkwo (1987), citado por Stewart & Press (1990), cultivando parasitas em culturas axênicas, verificou que o crescimento só era possível quando os mesmos continham açúcares e elementos minerais essenciais. Observou-se que o N atuava como um fator limitante no parasitismo e em outras associações simbióticas envolvendo plantas e, que possivelmente esta ação seria uma estratégia para aumentar a aquisição de N (Lamont, 1983).

Fer (1979) observou a translocação de aminoácidos e amido das plantas hospedeiras para o parasita, como relatado para *Cuscuta*, *Lathraca*, *Striga*, *Orobanca* e *Cytinus*. Os

estudos enzimológicos e de crescimento sugeriram que as plantas parasitas exibem uma preferência pelas fontes reduzidas de nitrogênio, tendo uma capacidade limitada para a assimilação de fontes de nitrogênio inorgânicas tais como o nitrato. Foi sugerido que a aquisição de N seria um fator chave nos processos de regulação do transporte entre parasita e hospedeiro.

Verificou-se que nas plantas holoparasitas que teriam acesso a um suprimento de compostos de N orgânico do floema dos hospedeiros, bem como o N do xilema, os mesmos não possuiriam a enzima serina-treonina dihidratase (Nandakumar et al., 1976), tornando-os heterotróficos para o aminoácido isoleucina. Apesar deste fato, observaram-se poucas evidências que os hemiparasitas, *S. hermonthica* e *S. asiatica*, exibiam uma redução da capacidade de biossíntese do aminoácido (Press et al., 1986).

Diferenças nas taxas de elementos entre o hospedeiro e o parasita, sugeriram que o haustório provocaria um aumento seletivo de íons nos tecidos parasitas (Atsatt, 1983; Lamont, 1983). Alguns autores têm criticado esta hipótese (Glatzel, 1987; Kramer & Kozlowski, 1979) em erva-de-passarinho e em parasitas que podem penetrar o xilema, observaram-se altas concentrações de K^+ em suas folhas, refletindo assim uma falta de mobilidade deste íon nessas espécies, como consequência da ausência de conexões entre o floema do hospedeiro e o do parasita.

Glatzel, (1983) estudou *D. falcota* detalhadamente ao parasitar 48 espécies diferentes de hospedeiros e observou uma correlação positiva entre as concentrações de N, K^+ , Mg^{++} e Cl^- , no hospedeiro e no parasita. Observou ainda que as concentrações de K^+ nas folhas do parasita também se apresentavam em quase todos os hospedeiros enriquecidos. Isto refletiria um fluxo passivo do hospedeiro para o parasita.

Apesar disso, experimentos com *Misteloe maritima* sobre *Conocarpus erectus*, demonstraram possuir altas concentrações de cloreto de sódio em seu xilema, três vezes maior que a existente no parasita, sugerindo uma possível seletividade na transferência dos íons. Sendo assim, Goldstein et al. (1989), sugeriram que o haustório agiria como uma coluna de troca de íons, de onde os cátions poderiam ser seqüestrados.

No caso da holoparasita *Cuscuta*, cuja nutrição é predominantemente no floema, o aumento das taxas de descarga do hospedeiro são essenciais para a transferência dos carboidratos, ocorrendo este processo diretamente dentro do apoplasto do parasita e estaria sob controle metabólico (Wolswinkel, 1978; Wolswinkel et al., 1984).

Também segundo Wolswinkel et al. (1984), este transporte dos assimilados do floema do hospedeiro para as células haustoriais da *Cuscuta* é considerado similar ao transporte que ocorre nos tecidos maternos para o embrião nas sementes de leguminosas. Wolswinkel (1974) observou que quando ocorre o desenvolvimento de frutos e *Cuscuta*, e ambos estão competindo pelos assimilados, os benefícios primários ficam às custas do hospedeiro.

O mecanismo controlador de descarga dentro do apoplasto é desconhecido, sendo uma alternativa a ocorrência de um fluxo via transmembranas, mediados por carreadores. Alternativamente ocorreria um tipo de fluxo ou corrente de massa através dos poros ou um mecanismo semelhante para a secreção de granulocrina observadas em células secretoras dos nectários (Wolswinkel, 1985).

2.1.1 Bioquímica do parasitismo na interação *Cuscuta* x *Malvaviscus*

Cuscuta é uma angiosperma holoparasita que ataca inúmeras espécies de hospedeiros, drenando nutrientes do xilema e floema.

Embora não haja comunicação direta com o hospedeiro, o haustório é capaz de retirar nutrientes do floema, e água e sais minerais do xilema, principalmente Ca^{++} (Fer et al., 1992).

O parcionamento de C e N e outros elementos minerais, foi estudado por Jeschke et al. (1995). Entretanto, nos trabalhos de Fer et al. (1990), os autores relatam que não houve alteração nutricional em plantas de *V. sativa*, indicando existir um mecanismo no hospedeiro que mantém os níveis de K^+ , Ca^{++} , Mg e Na^+ inalterados e

que a severa inibição do crescimento do hospedeiro foi devido principalmente à retirada de nutrientes orgânicos.

Assim, no parasitismo de plantas de bálsamo (*Impatiens balsamica*) por *Cuscuta campestris* e *C. reflexa*, Misra & Saxena (1971) observaram que a concentração total de nitrogênio total foi igual no parasita, independente do tipo de parasita e que *Cuscuta campestris* absorveu $\frac{1}{4}$ do total do N das plantas de bálsamo. Ocorreu também menos N na forma de aminoácidos livres que N na forma de aminoácidos combinados. Plantas parasitadas por *C. campestris* tiveram maior concentração de N quando comparadas com plantas controle.

Jeschke et al. (1994), demonstraram que em *Cuscuta reflexa* cultivadas sobre *Lupinus*, houve um acúmulo de C e N no parasita, provocando um aumento na pressão osmótica no xilema do parasita. Também ocorreu um aumento na assimilação do Ca^{++} via xilema. Comparando-se os valores de C e N no parasita e no hospedeiro, verificou-se que houve uma preferência maior pela assimilação de N em relação ao C, atuando a *Cuscuta* como um dreno de nutrientes do hospedeiro. Observaram também que ocorreu inibição da respiração, da fotossíntese, do crescimento da raiz e na produção de sementes quando *Lupinus* estava sob parasitismo da *Cuscuta*.

Jeschke et al. (1995) observou que *Cuscuta reflexa* obtém cerca de 99,5% de suas necessidades em carbono e 93,6 % em nitrogênio a partir do hospedeiro. Comparando a interação entre plantas de *Lupinus* sp. parasitado por *C. reflexa* e não parasitado, os autores encontraram uma severa inibição do crescimento da planta parasitada. Os teores de N e de K^+ foram, respectivamente, 40 e 17% menores na planta parasitada. Em relação ao Ca^{++} , *C. reflexa* foi menos exigente, possuindo baixos teores desses íons.

Nandakumar et al. (1976) observaram que plantas de *Cuscuta reflexa* não possuem a enzima L-treonina desidratase e L-serina desidratase e que, provavelmente, a ausência de tais enzimas estariam ligadas ao fato das plantas de *Cuscuta* serem parasitas obrigatórios.

Nandakumar (1989) relatou que plantas de *Cuscuta campestris* e *C. reflexa* apresentavam invertase, sacarose sintase e sacarose fosfato sintase ativas e que a

inabilidade de síntese de sacarose se deve a algum fator independente das enzimas envolvidas.

Em cinco cultivares de *Pelargonium* parasitado por *C. reflexa*, Saric et al. (1991) observaram que os teores de N nas folhas mostravam-se maiores no hospedeiro que no parasita, sendo que no caule os teores de N foram menores que no parasita. As concentrações de P e K apresentaram-se maiores no parasita que na planta hospedeira e os teores de Ca^{++} e Mg^{++} foram menores no parasita. No cultivar Matador, o parasita apresentou teores menores de N, P, K^+ e Mg^{++} , sendo que o Ca^{++} apresentou teor elevado. As maiores concentrações de N, P, K^+ e Mg^{++} no parasita foram encontradas no cultivar Bundeskanzler, embora este cultivar sozinho não apresentou os maiores teores dos elementos.

Fer et al. (1992), encontraram que na interação planta parasitada - hospedeiro (*Vicia faba*) não houve alteração na composição mineral quando sob a influência do parasita, apesar da transferência de K^+ para o parasita.

Jeschke & Hilpert (1997) observaram que a matéria seca e o crescimento de *Cuscuta* foi severamente afetado quando a concentração de N diminuiu no hospedeiro. Em *Lupinus* e *Ricinus*, o conteúdo de N aumentou quando parasitados por *Cuscuta*, ocorrendo uma demanda de N pelo parasita, proveniente das folhas, com a inibição da assimilação do N pelas raízes.

Rajput et al. (1991) demonstrou que a amilase apresentava redução na atividade em diferentes espécies de *Cuscuta*. O autor sugeriu que a supressão na atividade da amilase seria devida a síntese de citocininas no ponto de contato com o hospedeiro e que o parasitismo induziria à síntese de amilase no hospedeiro, a qual poderia causar grande mobilização de açúcar do hospedeiro, necessários para o crescimento do parasita.

Outras enzimas encontradas e estudadas em *Cuscuta* foram a ácido ascórbico oxidase, descritas por Tommasi et al. (1990), ausente em plantas de *C. reflexa*, embora estas apresentem a ácido ascórbico peroxidase, cuja atividade é semelhante a das plantas clorofiladas. Relataram também a presença das enzimas ascorbato redutase de radical livre e a DHA redutase (deidroascorbato redutase), sendo que esta última possui alta atividade. A oxidase de radicais livres tem atividade extremamente baixa, sugerindo-se

que a enzima ascorbato redutase de radical livre seria a enzima chave no processo que regularia a relação baixa de AA/DHA no parasita.

Buscando entender a regulação gênica nas plantas parasitas, Haberhausen et al. (1992), sequenciando os genes fotossintéticos de plastídeos de *C. reflexa*, observaram que o gene *rbcL* que codifica a sub unidade maior da Rubisco carboxilase / oxigenase possui uma proteína com 18 a 23 aminoácidos, maiores que em outras plantas superiores. O nível de transcrição do gene foi sensivelmente menor quando comparado com o tabaco. A atividade da Rubisco nos extratos não foi detectada, sendo provavelmente este um dos fatores que levaram a *Cuscuta* a se tornar uma planta holoparasita.

Também sequenciando os genes fotossintéticos em plantas parasitas, Wolfe & Depamphilis (1997), relataram que plantas parasitas como *Cuscuta* e *Orobanche* apresentam o gene *rbcL* na forma de pseudo gene, e que o mesmo possui regiões capazes de formar “stem looping”, tendo regiões deletadas com 56 a 69 nucleotídeos, indicando que os ancestrais destas plantas deveriam possuir regiões normais não deletadas.

Bommer et al. (1993) também determinaram a sequência de nucleotídeos do plastídeo de *C. reflexa*, clonando uma região de 5,3 kb, encontrando uma colinearidade desta região com uma região de 12,4 kb de tabaco. Em *C. reflexa* esta região representa cerca de 7,1 kb em deleções, envolvendo genes para proteínas ribossomais *rp12* e *rp123*, além do tRNA para isoleucina.

Entretanto, Haberhausen & Zetesche (1994), analisando o genoma plastidial de *C. reflexa*, encontraram que o gene *ndhB* (NAD desidrogenase estava na forma de um pseudo gene, com muitas mutações e que não havia hibridização deste com os genes das plantas superiores, indicando ser o mesmo ausente ou muito alterado.

Freyer et al (1995), também sequenciando o genoma de *Cuscuta europaea*, observaram que a mesma apresentava a perda de um intron completo quando comparada com o pseudo gene *ndhB* de *Cuscuta reflexa*.

2.2 Mecanismo de resistência

No mundo animal e em certo grau no vegetal, a competição pelo alimento, água, luz, etc, acontece em todos os níveis da cadeia alimentar. Segundo Bettiol (1991) e Roveratti (1989), até mesmo as leveduras são organismos capazes de competir por nutrientes. Essa competição para todos os organismos seria, de uma forma geral, o esforço dispensado por dois ou mais seres, com a intenção de adquirir reservas nutricionais necessárias a partir de um substrato onde o teor nutricional não é suficiente para ambos. Esta competição é assim ampliada ao nível nutricional, desde a obtenção de carboidratos, nitrogênio e fatores de crescimento, bem como em questão de espaço físico, ou seja, a formação de sítios de infecção até a luta pelo fornecimento de oxigênio.

Já no parasitismo esta relação nutricional entre dois seres vivos permite que o organismo denominado parasita possa obter, parcialmente ou todo, seu alimento de outro ser, denominado hospedeiro.

Segundo Droby et al. (1991), atualmente o uso de mecanismos de caráter antagonista contra patógenos que ocasionam doenças pós-colheita, como uma competição pelos nutrientes essenciais (carboidratos, aminoácidos, oxigênio, etc) ou mesmo para adquirir puramente um espaço físico, revelam-se como um mecanismo de caráter importante, pois estão sendo utilizados como agentes de biocontrole nas doenças oriundas após a pós-colheita, na ausência de antibióticos satisfatórios.

De uma forma geral, as espécies vegetais por si só possuem mecanismos de auto-defesa efficientíssimos, que tem por função impedir desde o estabelecimento até o desenvolvimento da maioria dos organismos considerados patogênicos. Apesar disso, observa-se que alguns são capazes de vencer estas defesas naturais e como resultado instalar a doença. Sendo assim, concluiu-se que a resistência seria a regra e a suscetibilidade foi considerada uma exceção (Pascholati & Leite, 1994; Moraes, 1991; Lopes, 1993).

Alguns autores observaram que este mecanismo, também conhecido como indução de proteção ou até mesmo como imunidade adquirida, estaria intimamente relacionado com a ativação de mecanismos até então tidos como latentes, pertencentes à espécie. Esta ativação consistia em dois aspectos, um com tratamento prévio, por exemplo, através de microrganismos ativos ou inativados, que foram denominados por Madamanchi & Kuc (1991) como agentes bióticos e o segundo aspecto seria, por exemplo, a ação de metais pesados, chamados de agentes abióticos (Kessmann, 1994).

Apesar de terem sido citados apenas processos cujas respostas demonstram somente uma ação bioquímica, observou-se que os mesmos também eram capazes de se expressar através das alterações ao nível estrutural e físico, atuando como barreiras mecânicas, tentando conter, bloquear ou mesmo anular a atividade do organismo intruso (Moraes, 1991).

Segundo Martins (1991), todas as plantas contém informações genéticas para exibir resistência à qualquer tipo de patógeno e o mecanismo pelo qual o patógeno consegue induzir a expressão dessas informações de caráter genético é que resulta no estado de resistência em uma interação, agora denominada incompatível.

Observando-se estes dados, concluiu-se que dentro destes mecanismos de defesa teríamos a ação das “Proteínas Relacionadas à Patogênese” (PRP), das enzimas hidrolíticas quitinases e β -1, 3-glucanase.

Apesar da ação destes compostos, tornou-se essencial que a planta fosse capaz de reconhecer o “intruso” (patógeno), para que a mesma pudesse vir a desencadear as respostas celulares que possibilitariam abortar o processo de infecção e/ou colonização e que, sem isto, o patógeno poderia ser eficaz em sua invasão vindo a manifestar a doença na planta (Leite et al., 1997). Sendo assim, para qualquer tipo de interação entre dois seres vivos, se faz necessário um processo de reconhecimento e transdução dos sinais emitidos pelos organismos envolvidos. No caso de planta-fungo tem-se um sinal externo denominado elicitor que atua em um possível receptor, o qual encontra-se na superfície da célula vegetal, sendo que através dele é transmitido um sinal primário para o interior da célula, o qual ativa os mensageiros secundários.

Estes últimos amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, por consequência, manifesta-se a interação, considerada compatível (suscetível) ou incompatível (resistente).

Braga et al. (1993) observou que os elicitores derivados dos fungos e das plantas superiores demonstravam possuir estruturas moleculares diferentes, concluindo que deveria ocorrer diferentes meios de interação para exercer sua atividade elicitora.

No caso dos elicitores fúngicos, observou-se duas situações, na primeira ocorria o reconhecimento direto das plantas – elicitores exógenos, ou seja as moléculas originadas dos fungos como, por exemplo, os fragmentos de polissacarídeos da parede celular, como as β -glucanas, quitinas e quitosanas; na segunda a ação do elicitor requer primeiro a degradação da parede celular da planta, através da ação das enzimas hidrolíticas dos microrganismos, sendo que o produto final dessa degradação interagiria com os receptores das plantas então denominados de elicitores endógenos.

Alguns autores (Darvill & Albersheim, 1984; Hahn et al., 1981), observaram que outros polissacarídeos eram encontrados ativando respostas de defesa das plantas. Dentre eles temos os fragmentos de oligogalacturonídeos pertencentes às paredes celulares das plantas, originários da ação das poligalacturonases e pectina liases, as quais são capazes de ativar a síntese das fitoalexinas nas culturas de soja e que, ao mesmo tempo, mostravam-se inibidoras da síntese de proteinase em folhas de tomate.

Segundo Darvill & Albersheim (1984) e Ryan (1987), já no início da patogênese, as enzimas pécticas secretadas pelo patógeno conseguem despolimerizar a parede celular, solubilizando assim os oligouronídeos, os quais podem vir a atuar como sinais primários das respostas localizadas de defesa.

Baseando-se nos sistemas de reconhecimento e transdução de sinais nas células animais, observou-se que, após a interação do ligante com o receptor, ocorria (Gennis, 1989):

- a) a abertura de um canal iônico;

- b) a ativação de uma proteína quinase citoplasma, levando-se em conta que o receptor devido ao seu domínio intracelular pode fosforilar proteínas;
- c) a produção de mensageiros secundários nas células vegetais, identificou-se AMPc, Ca^{++} , proteínas quinases, proteínas G, Ca-calmodulina, inositol trifosfato (IF3) e as espécies ativas de oxigênio (EAO).

Sugeriu-se também (Leite et al., 1997) que hormônios vegetais, tais como o etileno e o ácido jasmônico, atuam como possíveis mensageiros secundários na transdução dos sinais moleculares nas interações planta-microrganismos.

Vance et al. (1976) observaram que a formação de lignina nas paredes celulares de colmos de alpebreiro e trigo seria uma resposta de resistência (Ride, 1975; Sherwood & Vance, 1976; Vance & Sherwood, 1976a, Vance & Sherwood, 1976 b). Em outro experimento, Vance & Sherwood (1976 b) puderam constatar que a ciclohexamida inibia esta resposta de resistência em colmo de alpebreiro, juntamente com a inibição da biossíntese de lignina e da atividade de enzimas solúveis, incluindo-se a peroxidase. Observou-se que até a parede celular proporciona uma superfície comum inicial entre o patógeno e o hospedeiro, sendo que os componentes celulares das paredes semelhantes às ligninas e peroxidases estariam envolvidos na resposta da planta ao patógeno.

O aumento da atividade da peroxidase e a alteração dos padrões das isoenzimas em colmos de alpebreiro podem ser uma resposta da planta contra a tentativa de penetração do fungo. Estas alterações estariam envolvidas na formação de estruturas das células das paredes lignificadas no sítio de penetração, tentando evitar a mesma.

Bricek et al. (1975 a, b) sugeriram que o aumento da atividade da peroxidase em milho e tabaco seria uma resposta não específica para a injúria. Já Ohguchi & Asada (1975) sugeriram que o aumento da atividade da peroxidase em rabanete japonês estaria envolvido na formação de lignina que, por sua vez, estaria envolvida com o mecanismo de resistência.

O trabalho apresentado por Vance et al. (1976) foi um dos primeiros a demonstrar que a inibição das peroxidases da parede celular ao redor dos sítios de

penetração resultavam na suscetibilidade não específica para o fungo. Sendo assim, estes estudos se transformaram numa indicação para determinar se a inibição da lignina e da peroxidase ocorria em uma associação compatível hospedeiro-patógeno em alpisteiro. Muitos modelos foram publicados para explicar os mecanismos de ação ao nível celular quando uma planta é atacada por um patógeno. Segundo Lyon (1998), as interações moleculares podem ser divididas em dois grupos: as moléculas derivadas de patógenos e as moléculas derivadas da planta hospedeira.

Archana et al. (1997) estudaram a inter-relação entre as conexões dos haustórios e a resistência do hospedeiro entre *Cuscuta reflexa* e *Ipomoea batatas* L. e *Lycopersicon esculentum* Mill, analisando enzimaticamente os hospedeiros e o parasita, constatando-se a atividade de celulasas (EC 3.2.1.4), poligalacturonases (EC 3.2.1.15) e xilanases (EC 3.2.1.8), que atuavam como fortes inibidores das células da parede celular.

O patógeno possui genes para virulência relacionados na determinação da especificidade do hospedeiro e nas respostas de hipersensibilidade em plantas. Patógenos necrotróficos produzem uma grande variedade de moléculas extracelulares (exoenzimas) que o habilitam a penetrar nas células dos hospedeiros. Já os patógenos biotróficos produzem pouca ou nenhuma exoenzima. Fungos liberam quitinases que hidrolizam a parede celular da planta hospedeira. Fungos patogênicos podem também produzir substâncias que degradam fitoalexinas produzidas pelas plantas hospedeiras.

A planta hospedeira possui genes que são específicos para determinados tipos de patógenos, sugerindo algum tipo de sinalização molecular existente entre o patógeno e o hospedeiro. Muitas plantas possuem peptídeos antimicrobianos que defendem a planta do ataque de patógenos. Entre tais peptídeos estão os do tipo com 4 resíduos de cisteína, heveína e knotina - proteínas transferidoras de lipídeos, e as defensivas - tioninas e RIPs (proteínas inativantes de ribossomos). Algumas plantas também produzem as RP (proteínas de resistência) como quitinases, glucanases e peroxidases, sendo que esta última atua na síntese de lignina para dificultar a penetração do patógeno. A síntese local de fitoalexinas também ocorre em resposta ao patógeno, em geral, associada à necrose e morte celular induzida pelo mesmo. A síntese de radicais

livres causando ligações cruzadas entre proteínas em plantas também é uma resposta inicial à infecção. A síntese de ácido salicílico como uma resposta sistêmica da planta também ocorre em plantas em resposta ao patógeno.

Proteínas seletivas do hospedeiro (Brosch et al., 1996) são os primeiros compostos a conferir às plantas especificidade pelo patógeno. A habilidade de fungos causarem doenças está estritamente correlacionada à síntese destas toxinas. A toxina HC causa desacetilação de histonas, levando ao acúmulo de histonas desacetiladas, afetando o núcleo da célula vegetal e modificando a transcrição de genes. O primeiro gene clonado de plantas que confere resistência à Toxina HC foi o Hm1 em milho.

Os eventos bioquímicos que ocorrem durante os mecanismos de resistência em plantas são disparados nas reações de hipersensibilidade quando da interação gene-gene. Embora os mecanismos bioquímicos de hipersensibilidade em plantas sejam desconhecidos vários deles são alterados, como o fluxo de íons, alteração na concentrações de espécies reativas ao oxigênio que se acumulam e, também, acontece a síntese de ácido salicílico. Tais sinais, entretanto, parecem ser mecanismos de regulação em cascata que coordenam vários outros processos. A produção de compostos ao redor do sítio de infecção parece procurar inibir o crescimento e desenvolvimento do patógeno. A acumulação das RP e de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina podem levar a um alargamento e endurecimento da parede celular. A biossíntese de calose, suberina e lignina tenta “selar” o sítio de infecção isolando, assim, o fungo do restante da planta (Brosch et al., 1996).

2.2.1 Composição da parede celular do hospedeiro

Uma vez que a maioria dos patógenos retiram seus nutrientes de seus respectivos hospedeiros, necessitando destes para desenvolver seu metabolismo, estes enfrentam todos os tipos de barreiras para a obtenção dos mesmos.

Observa-se que as alterações na disposição dos componentes estruturais das paredes dos hospedeiros, ao longo da penetração e desenvolvimento da infecção pelo patógeno, demonstram a ação de enzimas produzidas pelos fitopatógenos que podem degradar as substâncias pertencentes às células ou afetar diretamente o protoplasma.

Figura 1 Representação esquemática da estrutura da cutícula em tecido foliar (adaptado de Juniper & Jeffree, 1983, fonte: Pascholati, 1995).

Figura 2 Representação esquemática da estrutura e composição das paredes de células vegetais (adaptado de Agrios, 1988; Heitefuss & Williams, 1976, fonte: Pascholati, 1995).

Segundo Pascholati (1995), na **Figura 1 e 2** estão esquematicamente demonstradas a composição da parede celular dos hospedeiros, delimitando-se os três tipos de componentes estruturais, sendo:

- a) Lamela média: atua como uma espécie de adesivo intercelular, possui em sua maior parte substâncias pécicas, localizando-se entre as paredes das células adjacentes;
- b) Parede primária: possui principalmente polissacarídeos, tais como celulose, hemicelulose e substâncias pécicas;
- c) Parede secundária: basicamente idêntica à primária, porém possui quantidades menores de hemicelulose e substâncias pécicas, apresentando lignina e suberina em suas células mais velhas.

Constatou-se que a parede celular da maioria das plantas terrestres tem como principal constituinte a celulose, como demonstra a **Figura 3**, possuindo áreas altamente ordenadas, regiões denominadas cristalinas e áreas constituídas por um emaranhado de fibras pouco ordenadas, sendo chamadas de regiões amorfas.

Figura 3 Estrutura básica da celulose e das microfibrilas (adaptado de Agrios, 1988; Goodmann et al., 1986, fonte: Pascholati, 1995).

Verificou-se que para cada reação metabólica, a ação de determinada enzima estava intimamente envolvida com o substrato fornecido, ocorrendo assim a degradação da cutícula pelas cutinases a qual está aderida à parede celular, na tentativa de impedir a penetração do patógeno.

Têm-se também observado a suberização. A suberina normalmente recobre a superfície dos órgãos subterrâneos, ocorrendo principalmente entre a parede celular e a membrana plasmática. Mostrando uma estrutura lamelar, esta tem por função também evitar a penetração dos patógenos, podendo aparecer nas paredes celulares, apesar de sua composição e estrutura não serem bem compreendidas, uma vez que sua degradação através da ação dos fitopatógenos são pouco discutidas.

Na degradação da parede celular dos hospedeiros, observou-se que as substâncias cristalinas e insolúveis, quando presentes na forma nativa, necessitavam da ação de diferentes celulases, oriundas de microorganismos, os quais possuem a capacidade de converter a celulose em sua fonte de carbono e energia.

Tanto nas paredes primárias como secundárias, as hemiceluloses são constituídas em sua maioria por xiloses, arabinoses, glicoses, manoses e galactoses, apesar das xiloglucanas e xilanas serem seus constituintes predominantes, sua degradação requer a ação das hemicelulases. As xiloglucanas são compostas de moléculas de glicose possuindo ligações glicosídicas β -1,4 e ramificações de xilose possuindo ligações α -1,6. Já as xilanas são cadeias de xilose em ligações β -1,4. Apesar disso, conforme o substrato utilizado a enzima recebe um nome específico, sendo assim tem-se que a β -1,4 xiloglucana sofre hidrólise de uma endoglucanase, uma endoxilanase é capaz de hidrolizar a β -1,4 xilana (Pascholati, 1995).

Na degradação da parede celular tem-se, ainda, a ação de pectinases ou enzimas pectinolíticas que agem em substâncias pécticas como as metilpoligalacturonases, poligalacturonases, pectinas liases, trans-eliminases do ácido poligalacturônico e meltilesterases da pectina.

Nagar & Sanwal (1984) estudaram plantas suscetíveis e não suscetíveis à *C. reflexa*, através das enzimas de degradação da parede celular. Observaram que os íons Ca^{++} , agiam como o inibidor mais potente da *Cuscuta* celulase-Cx seguido por Mg^{++} , Mn^{++} e Fe^{++} . O conteúdo de Ca^{++} nas plantas não suscetíveis quando comparadas com as suscetíveis foi cerca de cinco a dez vezes maior. O inibidor da atividade de celulase-Cx no parasita nas plantas não suscetíveis, parece ser o Ca^{++} , agindo sozinho ou em combinações com Mg^{++} , Mn^{++} e Fe^{++} . Em estudos preliminares de casa-de-vegetação quando plantas infectadas foram pulverizadas com o Ca^{++} , o parasita foi seletivamente controlado.

As lesões intracelulares surgem devido a ferimentos ou ao ataque de patógenos que induzem reações localizadas, como a morte celular programada, causada pela ativação de enzimas que levam à degradação celular. Tais necrobioses induzidas (formação de lesões marrom) têm um efeito sob a peroxidase, similar ao da infecção virótica. Deve ser dito que o aumento da biossíntese de compostos aromáticos, característica de tecidos doentes, podem ser induzidos por produtos químicos tóxicos. Devido ao aumento na atividade da peroxidase

nas células necrosadas ocorre um aumento na produção de compostos aromáticos hidroxilados.

Farkas & Stahmann (1966) sugeriram que ocorreria a ativação das potencialidades sintéticas latentes do hospedeiro e estas eram originadas (ou provocadas) pela infecção por vírus. Os testes histoquímicos demonstraram que uma ou mais peroxidases estariam ativas nas plantas em seu sítio de penetração e na parede celular vizinha evidenciando, assim, que as peroxidases seriam ativas no sítio de penetração (Maehly & Chance, 1954).

Segundo Vance et al. (1976), em colmos de alpeiteiro ocorreu a formação de uma papila lignificada localizada nas células epidérmicas da parede celular na tentativa de penetração do sítio (Sherwood & Vance, 1976), uma vez que os fungos não são capazes de penetrar as epidermes (Vance & Sherwood, 1976a). Nas plantas lenhosas a lignina é o constituinte da parede celular, a qual é derivada do ácido cinâmico, conferindo rigidez à parede.

Nagar et al. (1984), estudou as enzimas que degradam a pectina, a hemicelulose e a celulose em *C. reflexa* e seus respectivos hospedeiros suscetíveis e não suscetíveis. Observaram a existência de uma exo-1,4- β -D-glucosidase ativa na planta parasita, porém não existente em seus hospedeiros. A atividade da xilanase e da celulase das plantas hospedeiras aumentou enquanto que a atividade da celobiase diminuiu em resposta a infecção.

2.2.2. Fisiologia do parasitismo em angiospermas

No parasitismo estabelece-se uma relação de caráter nutricional entre dois seres vivos, sendo que um é considerado o hospedeiro e o outro o parasita. Este último pode obter do primeiro os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, sendo este tipo de obtenção de caráter parcial ou total (Stewart & Press, 1990).

No caso das plantas angiospermas existem dois tipos de parasitismo, as holoparasitas, consideradas parasitas de caráter obrigatório, isentas de clorofila, possuindo pouca capacidade independente para assimilar os carbonos e os nitrogênios inorgânicos. A *Cuscuta* é um exemplo deste parasita. Tem-se também as plantas hemiparasitas que podem ter o caráter tanto obrigatório quanto facultativo, são aclorofiladas e habitualmente se entrelaçam aos seus hospedeiros para obter água e sais minerais. Ambas são diferenciadas através da presença de um órgão denominado haustório, o qual atua na fixação, penetração e transferência dos solutos. Devido a este fator, atualmente tornou-se necessário compreender a sua fisiologia e atuação, pois as mesmas estão colocando em risco diversas culturas.

Lynn et al. (1981) concluíram que a formação do haustório seria um tipo de resposta às alterações químicas induzidas pela ação do parasitismo. Sendo assim, os primeiros haustórios que puderam ser induzidos e isolados foram os fenilpropanóides denominados xenognosin A e B (7,2'-hidroxi-4'-metoxi-isoflavone), extraídos de *Astragalus gummifer*, considerada uma planta de caráter não hospedeiro.

Através de experimentos, Steffens et al. (1982), obtiveram alguns análogos sintéticos que eram funcionalmente semelhantes ao m-methoxifenol, o qual descobriu-se ser necessário à atividade indutora do haustório de *Agaliris purpurea* e algumas outras raízes parasitas.

Segundo Atsatt (1977), nas raízes as substâncias que induzem a formação do haustório e que são também estimulantes para a germinação, originavam meios para a seleção e localização dos parasitas. Propôs ainda que estas plantas parasitas faziam uso dos compostos de defesa do hospedeiro para atuarem como sinais de reconhecimento. Apesar destes órgãos serem funcionalmente semelhantes em diferentes espécies, sua anatomia e morfologia são muito diferentes entre as espécies.

Após a adesão e penetração no hospedeiro, primeiramente transferem os nutrientes e a água do hospedeiro para o parasita (Visser & Dorr, 1987). A possível existência de uma continuidade apoplástica entre parasita e hospedeiro, não sendo necessariamente de xilema para xilema, sugeriria que os haustórios das hemiparasitas seriam funcionalmente passivos na transferência destes solutos (Raven, 1983).

Alguns trabalhos analisando o haustório de diversas espécies ao nível ultraestrutural, demonstraram a presença de células do parênquima possuindo alta densidade de organelas celulares (Kuo et al., 1989; Mallaburn & Stewart, 1987; Visser & Dorr, 1987; Visser et al., 1984). Em *Striga* (Mallaburn & Stewart, 1987; Smith & Stewart, 1987; Visser et al., 1984), estas células estariam em contato direto com o xilema ou dentro do haustório, apesar que em *Olax* foram encontradas na face interna do haustório (Kuo et al., 1989).

Estas observações indicam que as células haustoriais possuem funções bioquímicas especializadas para a regulação da transferência dos solutos, comprovando assim que o haustório possui uma função metabólica ativa durante a nutrição das plantas parasitas.

Alguns autores têm observado que, alterações em relação ao hospedeiro sobre as proteínas, principalmente as enzimas, têm sido de grande importância uma vez que correlacionam as mudanças com as alterações decorrentes do metabolismo das doenças da planta (Farkas & Solymosy, 1965) e nas reações de defesa do hospedeiro (Stahmann, 1965; Uritani, 1965).

Sugeriu-se que em alguns tecidos doentes o aumento da atividade da enzima seria duplo, pelo menos em parte, para a síntese de proteínas induzidas pelo ataque do parasita (Shaw, 1963; Stahmann, 1965) ou para a ativação das enzimas inativas (Farkas et al., 1964; Farkas & Lovrekovich, 1965; Staples & Stahmann, 1964). Apesar destes estudos, concluiu-se que a síntese de enzima estimulada no hospedeiro ainda é de caráter circunstancial.

No trabalho de Farkas & Stahmann (1966), seus dados sugeriram que as novas peroxidases se estabeleceram nos tecidos infectados pelos vírus e representavam as proteínas com diferentes propriedades enzimológicas e físico-químicas.

2.2.2.1 Bioquímica da resposta de defesa

Em virtude das constantes alterações ambientais tornou-se necessário, com o passar dos anos, obter uma compreensão mais profunda sobre as eventuais modificações

metabólicas pelas quais as culturas economicamente viáveis ficaram expostas. Modificações estas em resposta a um desequilíbrio ambiental, proveniente desde a ação de substâncias tóxicas até a ação de diferentes patógenos (vírus, bactérias e plantas consideradas parasitas).

Segundo Stewart & Press (1990), a intensidade destas respostas nem sempre são evidentes conforme o metabolismo individual, bem como as características particulares do patógenos, agindo em conjunto e paralelamente às condições ambientais, demonstraram ocorrer desde anormalidades consideradas espetaculares, ou seja, cuja ação alteraria drasticamente a fisiologia, anatomia e crescimento de seus hospedeiros, bem como a possível “ausência” de respostas.

Doggett (1982), trabalhando com culturas de grãos de sorgo, milho e milheto, pode observar respostas consideradas drásticas, desde alterações no crescimento do hospedeiro bem como a completa eliminação da cultura, quando submetidas à infecção por *Striga*. Entretanto, Schulze & Ehleringer (1984), observaram que algumas ervas de passarinho podem sobreviver por décadas junto a seus hospedeiros gerando apenas danos superficiais.

Os patógenos em sua maioria retiram seus nutrientes dos respectivos hospedeiros, utilizando-os no seu próprio metabolismo. Para que isto ocorra, torna-se necessário que o mesmo consiga “driblar” as barreiras externas do hospedeiro, desde alterações metabólicas e fisiológicas, mesmo que estas sejam de caráter externo (ex.: parede celular), bem como as internas, ou seja, respostas bioquímicas.

Todos os tipos de resposta eventualmente repercutem no hospedeiro, quer seja pela perda de água e sais minerais ou mesmo íons inorgânicos. A capacidade autotrófica dos diferentes parasitas possivelmente age como um regulador nesta demanda de recursos. Paralelo a esta ação ainda deve-se ter em mente que as diferenças anatômicas e funcionais do haustório também interferem no controle da direção, intensidade de fluxo e quantidade na demanda dos nutrientes.

Stewart & Press (1990), observaram que alguns danos secundários surgiram devido ao efeito direto da perda de compostos de carbono que afetavam o crescimento. Presumiu-se que no decorrer do parasitismo, ou seja, no início da “competição”, os teores de solutos inorgânicos pouco interferiam na produtividade do hospedeiro, porém os solutos orgânicos demonstraram poder determinar o comportamento do hospedeiro.

Drennan & El Hiweris (1979) e Press et al. (1987), observaram que logo em seguida ao início do parasitismo, ocorriam alterações morfológicas no hospedeiro e, eventualmente, refletiam em uma modificação no conteúdo dos reguladores de crescimento. Sendo assim, tecidos de sorgo foram infectados com *Striga*, onde se comprovou a ocorrência de alterações nos teores das substâncias inibidoras e promotoras do crescimento. Entretanto, esta mesma cultura quando submetida a um novo experimento denominado “divisão”, ou seja, seu sistema radicular dividido ao meio, porém não retirado da planta, sendo que o mesmo foi mantido em dois vasos, onde um vaso confinou uma parte do sistema radicular contendo 30 % da infecção. Constatou-se dessa maneira uma redução de crescimento similar na planta hospedeira, sugerindo-se que o sistema radicular sadio era incapaz de compensar e limitar a infecção.

Diversos autores tentam comprovar que as plantas parasitas podem produzir substâncias tóxicas, as quais interfeririam diretamente nas respostas metabólicas do hospedeiro. Musselman (1980) e Parker (1984) sugeriram que esta suposta toxina seria responsável pelos efeitos do crescimento de *Striga* sobre cereais, embora análises diretas demonstrem sua falta.

Alguns experimentos relatam a ocorrência de alterações nas características fotossintéticas de hospedeiros de ação similar as dos parasitas fúngicos, sendo por muitas vezes atribuídas à ação das toxinas. Observou-se que o Tentoxin, que é um tetrapeptídeo produzido por *Alternaria*, era capaz de induzir sintomas similares aos observados nos cereais infectados por *Striga* (Koltz, 1988). Embora tenha sido observado, desde alterações ao nível da arquitetura do hospedeiro até a redução na sua produção, uma vez que estas respostas surgem em virtude da perturbação fisiológica e

metabólica induzida pela presença do parasita, os mecanismos pelos quais elas ocorrem permanecem desconhecidos.

Devido ao aumento da incidência destas associações, principalmente em culturas de caráter econômico, e suas respectivas ações e respostas complexas, tornou-se necessário obter a compreensão dos principais passos deste estabelecimento, desde a germinação da semente até o reconhecimento do hospedeiro, bem como o possível estabelecimento do parasitismo. Até hoje, pouco se conhece sobre como agem e quais são os sinais e receptores que atuam neste tipo de interação.

2.3 Atividades enzimáticas

2.3.1 Peroxidase (EC 1.11.1.7)

As peroxidases (oxidases EC 1.11.1.7) se apresentam na forma de isoenzimas nas plantas, catalisando reações ligadas ao processo do metabolismo secundário e envolvidas com mecanismos de defesa das mesmas contra fitopatógenos, levando à alterações metabólicas (Fric, 1976). Assim, o estudo das peroxidases, que são classificadas como glicoproteínas, tem sido de grande importância para avaliar as interações hospedeiro-patógeno. Elas catalisam a oxidação por peróxidos de várias substâncias orgânicas.

Sanchez-Ferrer et al. (1989) e Reimmann et al. (1992) observaram que a peroxidase é uma proteína da membrana, a qual é ativada quando a membrana é danificada, seja por agentes mecânicos ou pela ação de enzimas proteolíticas.

A peroxidase é capaz de atuar em diferentes processos fisiológicos indicando a existência de diferentes isoenzimas, as quais podem ser separadas em formas ácidas e básicas por eletroforese, cromatografia de troca iônica ou focalização isoeletrica (Gaspar et al., 1982).

Constatou-se também que esta enzima está presente nos tecidos das plantas e que também participa de vários processos fisiológicos de grande importância, tais como a oxidação de compostos fenólicos, a biossíntese do hormônio vegetal etileno (Misaghi, 1982) e de lignina (Abeles & Biles, 1991). Hammerschmidt et al. (1982), trabalhando com plantas de pepino doentes e Ye et al. (1990) com plantas de fumo infectadas com fungo e vírus, observaram aumento na atividade dessa enzima à medida que a infecção progredia, levando-os a concluir que a peroxidase estaria envolvida com mecanismos de expressão da resistência em diferentes sistemas hospedeiro-patógeno.

Hammerschmidt & Kuc (1982) observaram que, em resposta ao ataque de patógenos, ocorre uma intensificação da lignificação e do espessamento da parede celular de plantas de pepino, como consequência da ação da peroxidase sobre a união oxidativa de monômeros fenólicos que levam à formação de polímeros da parede.

Neste contexto, as plantas de um modo geral passam a formar estruturas papilares como resposta à invasão de fungos sejam ele patogênicos ou não. Essas papilas são formadas principalmente por lignina, proteína, suberina, fenóis, quitina e gomas, detectando-se também a presença de peroxidase. Em plantas de milho infectadas com os fungos *Helminthosporium maydis* e *Colletotrichum graminicola*, Cadena-Gomez & Nicholson (1987) observaram variações nas isoenzimas de peroxidase durante a formação de papilas. Esse mesmo tipo de observação foi feita por Oliveira et al. (1997) em hipocótilos de *Mimosa scabrella* infectada com *C. graminicola*, onde as papilas formadas no sítio de infecção apresentavam alta atividade de peroxidase.

Quando cultivares de arroz, contendo o gene Xa-10 para resistência à raça de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, são infectados por essa bactéria ocorre um aumento na atividade da peroxidase com acúmulo de lignina no sítio de infecção, como resposta do hospedeiro ao ataque do agente infeccioso (Reimers & Leach, 1991).

Vários trabalhos têm demonstrado que há uma correlação entre variação na atividade da peroxidase e resistência ou susceptibilidade em diferentes patossistemas como: algodão - *Rhizoctonia solani* (Veech, 1976); melão - *Sphaerotheca fuliginea* (Reuveni & Bothma, 1985); tomate - *Verticillium dahliae* (Reuveni & Ferreira, 1985);

trigo - *Erysiphe graminis* (Patykowski et al., 1988); fumo - *Peronospora tabacina*/TMV (Ye et al., 1990); alface - *Bremia lactucae* (Reuveni et al., 1991); batata - *Erwinia carotovora* (Lojkowska & Holubowska, 1992); feijão - PMV (Wagih, 1993) e rosa - *Botrytis cinerea* (Shaul & Elad, 1995).

Os autores demonstraram o surgimento de duas novas isoenzimas no sítio de infecção de folhas de feijoeiro infectadas pelo vírus do mosaico. Vance & Sherwood (1976 b) mostraram que a resposta à resistência em grama canário foi inibida por ciclohexamida e que a síntese de ligninas e enzimas solúveis relacionadas à sua síntese (incluindo peroxidase) foram também inibidas. Uma vez que a parede celular foi o agente que separou a planta do parasita, componentes desta parede celular tais como a lignina e peroxidases parecem estar envolvidas na relação planta patógeno.

Segundo Farkas and Stahmann (1966) Uritani & Stahmann (1961) Rudolph & Stahmann (1964) a atividade das isoenzimas de peroxidase sofrem influência das doenças (infecções).

Smithes (1955) foi o primeiro a detalhar os métodos eletroforéticos através de análises das diferenças qualitativas bem como quantitativas das variantes eletroforéticas de enzimas específicas, comparativamente, em pequenas quantidades de tecidos. Shannon (1968), denominou que estas variantes seriam as isozimas ou isoenzimas que significam diferentes formas eletroforéticas de uma enzima as quais estão catalisando uma reação particular sob o gel. Nos diversos estudos, a maioria das bandas foram identificadas como isoenzimas de peroxidase devido a sua habilidade em oxidar a O-dianisidina ou benidina na presença de peróxido de hidrogênio.

Hamil & Brewbaker (1969), reportaram uma variação da isoenzima entre espécies de milho. A multiplicidade das isoenzimas tem sido relatada também entre diversas espécies de plantas.

Kerby & Somerville (1992), em experimento com cevada demonstrou também o surgimento de duas novas isoenzimas, quando as plantas eram submetidas ao ataque de fungos (*Erysiphe graminis* PC.).

Depósitos de lignina se formam como uma barreira à penetração e à degradação da parede celular pelo ataque dos fungos, contribuindo assim com o complexo sistema de defesa das plantas. As peroxidases também poderiam estar relacionadas ao processo de ligação de compostos fenólicos aos polímeros da parede celular formando a calose próximas às papilas que se formam nos sítios de infecção, dificultando assim o ataque do patógeno.

Fehrmann & Dimond (1967) demonstraram haver forte correlação entre a atividade da peroxidase em diferentes órgãos de tomateiro em relação à resistência a *Phytophthora infestans*.

Em milho, Shimoni et al (1991), encontraram em plantas não inoculadas pelo fungo *E. turcicum* alta atividade de peroxidase. Em plantas resistentes quando comparadas às plantas susceptíveis, no entanto, quando ambas as plantas susceptíveis e resistentes foram inoculadas pelo fungo houve aumento simultâneo das mesmas.

Segundo o trabalho de Farkas & Stahmann (1966), ocorre uma associação entre o desenvolvimento da lesão e o aumento do conteúdo de peroxidase nos tecidos vizinhos, tanto no desenvolvimento da lesão como nos danos mecânicos (ex: cutina do tecido armazenado). A síntese de proteína foi "acionada" nos tecidos circunvizinhos ao ferimento surgindo como uma resposta a indução da peroxidase nas folhas de feijoeiro infectadas devido ao ferimento, levando a um desenvolvimento da lesão.

Vance et al. (1976) verificaram que em grama canário a atividade da peroxidase aumenta em resposta a tentativa de penetração do fungo (Vance & Sherwood, 1976 b).

2.3.2 Exo (EC 3.2.1.91) e Endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)

Reese et al. (1950), citado por Estrada (1997), realizaram um dos primeiros estudos sobre como atuaria o mecanismo de ação das celulasas. Propuseram um conceito denominado C₁-C_x, que representava a hidrólise da celulase, onde o primeiro componente

simbolizaria a degradação da forma cristalina, tendo como resultado a formação de cadeias lineares mais curtas, e a segunda a enzima que degradaria as formas amorfas.

Atualmente este conceito foi substituído por um complexo constituído de três enzima:

- a) **Endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4):** ou β -1,4 glucan-glucosidase, denominadas carboximetilcelulases (CMCase), Cx ou endocelulases – atuam internamente sobre o polímero celulose, hidrolisando-o ao acaso e formando oligossacarídeos. Sendo assim, a celulose se torna mais predisposta à ação das exoglucanases, pois ocorre a formação de novos sítios reativos;
- b) **Exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91):** ou β -1,4 glucan-celobiosidase, denominadas avicelases, celulases C₁ ou exocelulases – solubilizam a celulose cristalina (celulose suscetível), removendo as unidades de celobiose das cadeias (exo-eliminação);
- c) **β -glicosidase (EC 3.2.1.21):** ou também chamada de celobiosidase, atuando na hidrólise da mesma, oriunda da ação das endo e exoglucanases sobre a celulose, transformando-se em monômeros de glicose; considerada comum nas plantas, fungos, bactérias e tecidos animais, atuando no final do processo de degradação da celulose.

Observou-se com o tempo que muitos microrganismos eram capazes de degradar a celulose. Entretanto, Mandels (1975) observou que “in vitro” apesar destes organismos crescerem em meio contendo celulose, ou ainda serem capazes de degradar a celulose amorfa, seus sistemas celulolíticos pouquíssimas vezes eram completados. Sendo assim, propôs que em alguns microrganismos a produção de celulase extracelular seria uma resposta à presença de determinadas substâncias denominadas indutoras, dentre elas tem-se a própria celulose, derivados de celulose, celobiose, sofórose e lactose (Mandels & Reese, 1960; Mandels et al., 1962).

Anos mais tarde, Herr (1979), Jabbar & Afzal (1981) e Woodward & Arnold (1981), estudando outros tipos de fungos descobriram que também poderia ocorrer uma repressão da síntese de celulasas pela simples presença ou aplicação de glicose ou outros açúcares exógenos.

Em outros tipos de associações, as micorrízicas, os carboidratos derivados do hospedeiro comprovadamente reprimiram a produção de celulasas na interface fungo-raiz (Giltrap & Lewis, 1982).

Além disso, altas concentrações de nitrogênio extracelular quando analisados em *Pisolithus tinctorius* “in vitro”, foram suficientes para a redução da atividade celulolítica (Cao & Crawford, 1993a).

Alguns autores observaram a ocorrência de um mecanismo sinérgico entre as endo e exoglucanases. Neste caso, a atividade de um componente enzimático seria favorecida pela ação hidrolítica do outro (Ryu & Mandels, 1980; Enari, 1983; Isaac, 1992).

Eriksson & Pettersson (1975 a, b) estudaram o fungo *Phanerochaete chrysosporium* causador da podridão branca em algodoeiro. Neste, as endoglucanases foram induzidas através do uso de diferentes substratos. Entretanto, as exoglucanases somente na presença do substrato celobiodextrina podem liberar celobiose e glicose, demonstrando um forte sinergismo com as endoglucanases, só que na presença de avicel ou fibras de algodão.

Encontrou-se também sistemas celulolíticos incompletos, por exemplo, em outros tipos de fungos que causam a podridão na madeira, sendo que os mesmos só podem degradar a celulose através da endo β -1,4 glucanase não tendo ação alguma da exo (Keilich et al., 1969; Wolter et al., 1980 e Ulhoa et al., 1986).

Apesar destes dados, quando analisam-se a atuação destas enzimas em resposta aos fungos denominados patogênicos, não se obteve evidências concretas sobre a participação das mesmas na patogênese. Dori et al. (1995) forneceram carboximetilcelulose e avicel aos meios contendo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, obtendo a síntese enzimática no patógeno.

Já em *Venturia inaequalis*, quando cultivada em vários substratos celulolíticos tais como, xilana, pó de celulose, papel filtro, celobiose e carboximetilcelulose, obteve-se um aumento na atividade das enzimas quando foi adicionado aos substratos celulolíticos, extratos obtidos de maçã. A atividade enzimática mostrou-se intimamente relacionada com o desenvolvimento do micélio, sendo que as fontes de carbono não provocaram alterações. Já nas análises das macieiras naturalmente infectadas, encontrou-se atividade celulolítica em suas lesões foliares (Kollar, 1994).

Nos patógenos *Hendersonula toruloidea*, *Cytosporina sp.* e *Cytospora sp.*, os quais causam a produção e secreção de uma goma ou um líquido com aspecto gomoso, denominada gomose em damasco, ao serem cultivados na presença de carboximetilcelulose, e nos caules inoculados, os quais demonstravam ter a doença, relatou-se a produção da endoglucanase. Já *Cytospora sp.*, quando cultivado “in vitro” produziu menor quantidade de celulase quando comparada aos outros dois, considerados patógenos mais agressivos. Com estas observações Rotem et al. (1995), presumiram que a enzima seria um dos fatores que afetavam a agressividade desses patógenos.

Testes “in vitro” com *Fusarium tricinctum* (Wick & Schroeder, 1982), *Botrytis cinerea* (Verhoeff et al., 1983) e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Di Piero & Pascholati, 1995), os dois primeiros demonstraram possuir atividade de endoglucanases e exoglucanases, porém o último somente apresentou atividade de endoglucanases.

2.3.3 Xilanase (EC 3.2.1.8)

Segundo Lanchke (1988), Pascholati (1995), citados em Estrada (1997), nas plantas superiores o principal polissacarídeo encontrado na parede celular, ou melhor, na fração hemicelulolítica é a D-xilana. A hidrólise ao acaso das ligações β -D-xilopiranosil de xilana formam xilooligossacarídeos através da enzima Endo β -1,4 xilanase ou β -D-1,4 xilana xilanohidrolase (EC 3.2.1.8).

Stewart et al. (1983), analisaram *Aspergillus fumigatus* cultivado em diferentes gramíneas forrageiras e palha de cevada, obtendo a produção de xilanase. Os autores observaram que ocorria a indução com o substrato, apesar do efeito da temperatura de incubação e variação do pH também alterarem a produção da enzima. Merchant et al. (1988), também observaram em *Thielavia terrestris*, um tipo de fungo termófilo, cultivado em “solka foc” a 48 °C com um pH inicial de 4,0, sendo que o mesmo demonstrou atingir seu ponto de ação máximo neste período.

Monti & Jorge (1986) ao estudarem *Humicola sp.*, em diferentes meios de cultura, relataram sua maior produção quando a xilana era utilizada como fonte de carbono. Ao contrário, quando foi utilizada glicose (0,01%), a produção foi reprimida, sendo mais afetada a síntese da xilanase do que a xilosidase.

A utilização da parede celular de cereais também demonstrou ativar a ação da enzima nos fungos fitopatogênicos “in vitro”. Holden & Walton (1992) cultivando *Cochliobolus carbonum* comprovaram este fato utilizando meios contendo xilana ou parede celular de milho como fontes de carbono.

Em *Helminthosporium turcicum*, a adição de glicose mostrou suprimir a ação desta enzima. A mesma tornava-se ativa em meios contendo xilana, palha de trigo ou parede celular de milho, sendo que com esta última o aumento era bem maior (Degefu et al., 1995).

Cairney & Burke (1994), observando fungos ectomicorrízicos (*Paxillus involutus*, *Suillus variegatus*, *Tylospora fibrilosa* e o simbionte *Hymenoscyphus ericae*) cultivados “in vitro”, observaram a produção de xilanases, mas também identificaram a presença de peroxidase e Mn-peroxidase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC/FEALQ), Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ)- Universidade de São Paulo (USP) - Campus Piracicaba. As plantas foram classificadas pelo Prof. Dr. Vinícius Castro Souza do Departamento de Ciências Biológicas.

3.1 Delineamento Experimental

3.1.1 Experimento I

3.1.1.1 Efeito da *Cuscuta* sobre as folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

Foram utilizadas 32 plantas de *Malvaviscus arboreus*, cedidas por viveiristas e mantidas em casa-de-vegetação em vasos contendo substrato formado por uma mistura de solo, terra vegetal e turfa. Os filamentos de *Cuscuta racemosa* foram obtidos no campo.

O experimento constou das seguintes fases:

T₀ - FASE INICIAL (0 DIAS - TESTEMUNHA): foram coletadas folhas de *Malvaviscus arboreus* de plantas de 4 vasos. O material vegetal foi pesado para se obter os valores de massa de matéria fresca (MMF). Em seguida, liofilizado em Liofilizador Labconco, por 48 horas a 0.⁰C, mantido em dessecador sob sílica gel e armazenado em geladeira à 4 °C para determinação da massa de matéria seca (MMS) e as análises.

Foram realizadas análises da porcentagem de massa de matéria seca (MMS), do teor de proteína total solúvel (PTS), da dosagem dos açúcares redutores (AR), gel de amido e atividade específica da isoenzima peroxidase (E.C 1.11.1.7). Os resultados obtidos nesta fase foram utilizados como controle inicial.

Nesta mesma fase, outras 16 plantas de *Malvaviscus* envasadas foram parasitadas com os filamentos de *Cuscuta* para posterior uso nas demais fases.

T₁ - 55 DIAS : nesta fase foram analisadas as folhas de 4 plantas de *Malvaviscus* não parasitadas e 4 plantas de *Malvaviscus* parasitadas por *Cuscuta*. Nesse material foram feitas análises da porcentagem de massa de matéria seca (MMS), do teor de proteína total solúvel (PTS), da dosagem dos açúcares redutores (AR), gel de amido e atividade específica da isoenzima peroxidase.

T₂- 95 DIAS : foram repetidos os mesmos procedimentos da FASE T₁.

T₃– 108 DIAS: foram repetidos os mesmos procedimentos da FASE T₁.

T₄- 180 DIAS: foram repetidos os mesmos procedimentos da FASE T₁. Esta fase correspondeu à FASE FINAL, onde já não eram mais notados indícios visuais do parasitismo.

Os vasos sofreram rodízios quanto à sua localização na casa-de-vegetação de 10 em 10 dias.

3.1.1.2 Efeito do parasitismo na atividade de enzimas nos pecíolos liofilizados das folhas de *Malvaviscus arboreus*

Foram utilizadas as mesmas 32 plantas de *Malvaviscus arboreus* já referidas no item 3.1.1.1. Este ensaio foi simultâneo com o anterior, sendo coletados apenas os pecíolos das folhas de *Malvaviscus* .

O experimento também constou das seguintes fases:

T₀ - FASE INICIAL (0 DIAS - TESTEMUNHA): Foram coletados os pecíolos das folhas de 4 plantas de *Malvaviscus arboreus*. Nesse material foram feitas análises da porcentagem de massa de matéria seca (MMS), do teor de proteína total solúvel (PTS), da dosagem dos açúcares redutores, atividade de endo e exo β -1,4 glucanase (E.C 3.2.1.4; E.C 3.2.1.91) e atividade de xilanase (E.C 3.2.1.8).

Nesta mesma fase, outras 16 plantas de *Malvaviscus* envasadas foram parasitadas com os filamentos de *Cuscuta* para posterior uso nas demais fases.

T₁ - 55 DIAS : Nesta fase foram analisados os pecíolos das folhas de 4 plantas de *Malvaviscus* não parasitadas (Controle - C) e de 4 plantas de *Malvaviscus* parasitadas (Parasitadas - P) por *Cuscuta*. Nesse material foram feitas análises da porcentagem de massa de matéria seca (MMS), do teor de proteína total solúvel (PTS), da dosagem dos açúcares redutores (AR), atividade de endo e exo β -1,4 glucanase (E.C 3.2.1.4; E.C 3.2.1.91) e atividade de xilanase (E.C 3.2.1.8).

T₂- 95 DIAS : foram repetidos os mesmos procedimentos da FASE T₁.

T₃– 108 DIAS: foram repetidos os mesmos procedimentos da FASE T₁.

T₄- 180 DIAS: foram repetidos os mesmos procedimentos da FASE T₁. Esta fase correspondeu à **FASE FINAL**, onde já não eram mais notados indícios visuais do parasitismo.

3.1.1.3 Fluxograma do Experimento I

3.1.2 Experimento II

3.1.2.1 Efeito da *Cuscuta* sobre os pecíolos das folhas e nas folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

Seis plantas de *Malvaviscus arboreus* foram mantidas em casa de vegetação parasitadas com filamentos de *Cuscuta*. Todas as análises foram realizadas em material vegetal fresco.

O experimento constou das seguintes fases:

T₀ - FASE INICIAL (0 DIAS): foram coletados os pecíolos das folhas e as folhas de 3 plantas de *Malvaviscus arboreus* (Testemunha - T). Nesse material foram feitas análises da porcentagem de massa de matéria seca (MMS), do teor de proteína total solúvel (PTS), da dosagem dos açúcares redutores e atividade específica da isoenzima peroxidase (E.C 1.11.1.7). Os resultados obtidos nesta fase foram empregados como controle inicial (Testemunha - T).

Nesta mesma fase outras, 3 plantas de *Malvaviscus* envasadas foram parasitadas, com os filamentos de *Cuscuta*, sendo que foram analisados os locais onde não ocorriam sítios de infecção (Controle - C), locais onde ocorriam os sítios de infecção (Parasitada - P) e os filamentos da *Cuscuta* (Cusc.) para posterior uso nas demais fases.

T₁ - 05 DIAS : a partir do acompanhamento visual do desenvolvimento das plantas de *Malvaviscus* parasitadas, nesta FASE foram analisados os pecíolos das folhas e as folhas das plantas dos 3 vasos parasitados. Foram realizadas as seguintes análises nos pecíolos das folhas e nas folhas das plantas próximas aos sítios do parasitismo e distantes dos sítios do parasitismo: porcentagem de massa de matéria seca (MMS), teor de proteína total solúvel (PTS), dosagem dos açúcares redutores e atividade específica da isoenzima peroxidase (E.C 1.11.1.7).

T₂- 32 DIAS : ao longo do desenvolvimento do parasitismo foram repetidos os procedimentos da FASE T₁, nos mesmos vasos, tendo como prioridade analisar as mudanças decorrentes do estabelecimento do parasita no hospedeiro.

T₃ – 44 DIAS : foram repetidos os mesmos procedimentos da FASE T₁; esta fase correspondeu à **FASE FINAL**.

3.1.2.2 Fluxograma do Experimento II

3.2 Delineamento Estatístico

Todos os parâmetros do experimento I foram avaliados segundo um delineamento inteiramente casualizado para um único tratamento com diferentes tempos de observação (T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , T_4), sendo que cada fase constou de 4 repetições. Foram realizadas análise de variância e regressão entre as plantas parasitadas (P), não parasitadas (C), e plantas "in natura" (NP). As médias entre os cultivares foram comparadas através do teste de Tukey. No experimento II as plantas foram avaliadas também segundo um delineamento inteiramente casualizado para um único tratamento com diferentes tempos de observação (T_0 , T_1 , T_2 , T_3), sendo que cada fase constou de 3 repetições, realizando-se a análise de variância e regressão entre as plantas testemunha (T) aos 0 e 44 D.A.I., nas plantas parasitadas (sítio de infecção - P), plantas controle (sítio não infectado - C) e nos filamentos de *Cuscuta* (Cusc.), as médias entre os cultivares foi comparada através do teste de Tukey. Os dados relativos aos resultados das análises estatística estão mencionados no **Apêndice**, as análises estatísticas foram realizadas através do uso do programa SAS sob a supervisão do Centro de Informática na Agricultura (CIAGRI) - Campus da USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP.

3.3 Análises químicas em folhas frescas e liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

3.3.1 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS) em folhas liofilizadas e frescas de *Malvaviscus arboreus*

A análise das folhas liofilizadas foi baseada na massa de matéria seca (MMS)) do material vegetal que foi coletado no período da manhã, limpo, pesado e seco em liofilizador por 48 horas.

De cada tratamento foram analisados 25 mg de tecido foliar liofilizado pertencentes à parte superior de cada planta controle e parasitada. O material foi submetido a uma digestão em 5 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, o qual permaneceu em

repouso por 12 horas sendo, em seguida centrifugado a 2000 g por 30 min à 20 °C. O primeiro sobrenadante residual permaneceu armazenado em geladeira.

O sedimento foi ressuspensão em 5 mL de acetona 80 %, permanecendo em repouso por 1 hora e, em seguida, centrifugado a 2000 g por 30 min à 20 °C. Este segundo sobrenadante residual também foi armazenado em geladeira juntamente com o anterior.

O novo sedimento foi novamente ressuspensão em 5 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, permanecendo em repouso por 3 horas sendo em seguida, centrifugado a 2000 g por 30 min à 20 °C.

O terceiro sobrenadante residual foi coletado e adicionado aos sobrenadantes 1 e 2. Para a precipitação das proteínas foram acrescentados 15 mL de ácido tricloroacético 10 % à 2 °C, ao novo sobrenadante. A mistura permaneceu em repouso por 12 horas, sendo em seguida, centrifugada a 1000 g por 30 min à 20 °C.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão em 2 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, permanecendo a mistura sob agitação constante em banho maria à 25 °C por 4 horas para posterior análise.

Nas folhas frescas, a análise também foi baseada na massa de matéria seca do material vegetal, coletadas igualmente no período da manhã, sendo em seguida, lavadas em água destilada, pesadas e secas em estufa à 60 °C por 48 horas, para se obter o valor da massa de matéria seca (MMS).

De cada tratamento foram analisados 1g de tecido foliar fresco pertencentes à parte superior de cada planta testemunha (T). De cada planta parasitada, sítio controle (C) e sítio parasitado (P) e dos filamentos de *Cuscuta* (Cusc.), o material foi macerado em um almofariz com 1 mL de solução de extração (tampão Tris+EDTA+ β -mercaptoetanol, pH7,5) e 10 mg de areia lavada. Todo o material de análise foi mantido sob refrigeração constante em banho de gelo.

O material foi transferido para um tubo de Eppendorf seguindo-se à centrifugação (13.000 g, à 4 °C, durante 30 minutos). O sobrenadante oriundo deste processo foi transferido para um novo tubo de Eppendorf, sendo utilizado na determinação do teor de proteína total solúvel (PTS).

Para a determinação da PTS de ambos os extratos, tanto das folhas liofilizadas quanto folhas frescas, foi utilizado o método de Bradford (1976). Foram analisados 100 µl dos extratos juntamente com 5 ml do reagente de Bradford que deram origem a uma mistura cuja intensidade de coloração foi lida no espectrofotômetro Hitachi modelo U-3210 a 595 nm.

O reagente de Bradford foi constituído por 100 mg de Coomassie brilliant blue G-250 diluído em 50 ml de etanol 95%, acrescentado de 100 ml de H₃PO₄ 85%, sendo o volume da mistura aferido para 1 litro e filtrado duas vezes em papel de filtro qualitativo.

O teor de proteína das amostras foi calculado tomando-se por base os dados de uma curva padrão obtida com albumina de soro bovino (BSA).

3.3.2 Açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas e frescas de *Malvaviscus arboreus*

De cada tratamento das folhas liofilizadas, 1 g do tecido foliar pertencente à parte superior de cada planta controle e parasitada foram analisadas. A esse material foi adicionado água destilada até completar 25 g sendo, em seguida, aquecido em banho maria à 60 °C por 30 min.

O material foi filtrado em papel filtro Whatman nº 3. Amostras foram diluídas na proporção de 1 ml de amostra / 50 ml de água destilada.

A análise das folhas frescas foi baseada no extrato vegetal obtido conforme item 3.3.1. De cada tratamento foram analisados 20 µl das amostras foliares diluídas em 980 µl de água destilada e 5 µl do extrato dos filamentos da planta parasita diluídos em 995 µl de água destilada

O padrão de açúcares redutores a 1% utilizado para comparação foi diluído na proporção de 2 ml de amostra / 200 ml de água destilada.

Tanto nas amostras como no padrão em ambos os extratos foliares foram adicionados 1 mL de água destilada + 1mL da solução de Somogyi, aquecendo-se em água fervente por 10 min e resfriadas. Acrescentou-se 1 mL da solução de Nelson + 7

mL de água destilada. A intensidade de coloração foi lida em espectrofotômetro Hitachi modelo U-3210, 540 nm, contra branco contendo 1mL de água destilada + 1 mL da solução de Somogyi, submetidos à fervura por 10 min resfriadas e acrescentado mais 1 mL da solução de Nelson + 7 mL de água destilada (Nelson, 1944).

Após as leituras através do cálculo do fator, obteve-se a porcentagem de açúcares redutores.

$$\text{FATOR} = \frac{\text{Diluição da amostra}}{\text{Diluição do padrão}} \times \frac{\text{Abs da amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs do padrão} - \text{Abs branco}}$$

3.3.3 Macro e Micronutrientes em folhas liofilizadas

Para a determinação da massa de matéria seca (MMS), o material vegetal foi coletado no período da manhã, foi limpo, pesado e seco em estufa à 50 °C, sob ar forçado.

Na massa de matéria seca das folhas das plantas cultivadas em casa-de-vegetação, foram determinados os teores de nutrientes usando-se os seguintes métodos (Sarruge & Haag, 1974):

a) Nitrogênio total, através do método semi-micro Kjeldahl, em extrato de digestão sulfúrica, em 100 mg de massa de matéria seca;

b) em extrato nitro-perclórico, 500 mg de massa de matéria seca foi determinado o fósforo através do método colorimétrico do metavanadato; o potássio através da fotometria de chama de emissão; o enxofre por turbidimetria; cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (Malavolta et al., 1989).

Os conteúdos de macro e micronutrientes foram obtidos pela média ponderada relacionada à produção de massa de matéria seca das folhas de *Malvaviscus*.

3.3.4 Determinação da atividade específica de peroxidase (EC. 1.11.1.7) em folhas liofilizadas e frescas de *Malvaviscus arboreus*

A análise da folhas liofilizadas foi baseada na massa de matéria seca conforme descrito no **item 3.3.1**.

De cada tratamento foram coletadas folhas pertencentes à parte superior de cada planta controle e parasitada, que foram submetidas à liofilização. Utilizou-se 30 mg do material liofilizado que foram macerados em um almofariz com 1 mL de solução de extração (tampão fosfato 0,01 M pH6,0) e 10 mg de areia lavada. Todo o material de análise foi mantido sob refrigeração constante em banho de gelo.

O material foi transferido para um tubo de Eppendorf seguindo-se à centrifugação (13.000 g, à 4 °C, durante 30 minutos). O sobrenadante oriundo deste processo foi transferido para um novo tubo de Eppendorf sendo utilizado na determinação da atividade específica da peroxidase.

Nas folhas frescas as análises foram baseadas na massa de matéria seca (MMS) e extrato descritos no **item 3.3.1**.

Para a determinação da atividade específica da peroxidase (EC. 1.11.1.7), tanto em folhas liofilizadas como em folhas frescas, foi seguido o método espectrofotométrico direto (Hammerschmidt et al., 1982). Neste processo, 0,1 mL dos extratos foram adicionados a 2,9 mL de uma solução de guaiacol, sendo lidos no espectrofotômetro Hitachi modelo U-3210 a 470 nm. Os resultados foram expressos em Δ unidades de absorbância/ min/ mg de proteína, utilizando-se como substrato uma solução de guaiacol (250 μ L), peróxido de hidrogênio (306 μ L) e tampão fosfato 0,01 M pH 6 (100 mL).

3.3.5 Caracterização Eletroforética - Sistema Eletroforético em Gel de Amido em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

3.3.5.1 Preparo das Amostras

A extração da enzima foi realizada sob refrigeração empregando-se 20 mg do material vegetal liofilizado conforme item 3.3.2. Foram utilizadas placas de porcelana resfriadas juntamente com cerca de 10 mg de areia lavada e 200 µL de solução de extração número 1 de Alfenas et al. (1991), conforme Tabela 1.

Tabela 1 Solução de extração número 1 de Alfenas et al. (1991).

Composto	Quantidade
Fosfato de sódio bibásico (0,034 M)	0,6 g
Sacarose (0,2 M)	7,0 g
PVP-40 (2,56 %)	2,56 g
DTT (3 mM)	50 mg
L-Ácido ascórbico (5,7 mM)	100 mg
DIECA (5,8 mM)	100 mg
Bisulfito de sódio (2,6 mM)	50 mg
Borato de sódio (Borax) (2,5 mM)	50 mg
2-Mercaptoetanol (0,2 %)	0,2 mL
Polietilenoglicol-6000 (1 %)	1 g
Água deionizada (q.s.p.)	100 mL

3.3.5.2 Desenvolvimento Eletroforético

Foram confeccionados géis com 46 g de penetrose de milho (amido de milho) que equivale a um gel com 13% de concentração, o qual foi diluído na solução tampão citrato morfolina composto por 8,4 g/L de ácido cítrico 0,04 M pH 6,1 e titulado com N-(3-aminopropil) morfolina, o qual foi utilizado como tampão do eletrodo (Clayton & Tretiak, 1972).

Os extratos obtidos foram absorvidos em pedaços de papel filtro Whatman nº 3 medindo 6 x 10 mm, colocados no gel juntamente com extrato de cedro obtido conforme item 3.3.5.1, utilizado como padrão. Por apresentar um perfil eletroforético conhecido, possibilitando melhor visualização do desenvolvimento eletroforético, também foram utilizados dois pedaços de papel filtro contendo solução marcadora de azul de bromofenol a 0,1 % colocados nas extremidades dos géis.

O desenvolvimento eletroforético foi realizado a uma amperagem inicial de 25 A e voltagem inicial de 250 V e após trinta minutos foi modificada para uma amperagem de 35 A e voltagem de 300 V.

Após a migração, os géis foram fatiados em 2,0 mm de espessura cada um sendo submetidos a uma solução corante constituída por 30 mg de 2,2 – dianisidina (bi-HCl), 50 ml de acetato de sódio pH 4,5 (0,1 M) e 1 mL de H₂ O₂ (3 %).

O gel foi incubado de 30 a 35 °C no escuro durante 30 a 60 minutos. Depois do aparecimento das bandas, o gel foi fixado em glicerol 10%, modificado a partir de Soltis et al. (1983). A seguir, o gel foi submetido à análise de bandas empregando-se o software Image Master da Pharmacia.

3.4 Análises químicas em pecíolos das folhas liofilizadas e frescas de *Malvaviscus arboreus*

3.4.1 Determinação da massa de matéria seca (MMS) e preparação dos extratos de pecíolos liofilizados e frescos das folhas de *Malvaviscus arboreus*

A análise dos pecíolos liofilizados foi baseada na massa de matéria seca (MMS) do material vegetal conforme descrito no item 3.3.1.

De cada tratamento foram coletados os pecíolos pertencentes à parte superior de cada planta controle e parasitada. Foram macerados 200 mg do material, liofilizado em um almofariz contendo 2 mL de solução de extração (tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0) e 10 mg de areia lavada. Durante toda a extração o material foi mantido sobre refrigeração constante empregando-se banho de gelo.

O material foi transferido para um tubo de Eppendorf seguindo-se à centrifugação a 13.000 g à 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante oriundo desse processo foi transferido para um novo tubo de Eppendorf, sendo utilizado na determinação do teor de proteína total solúvel (PTS), porcentagem de açúcar redutor e também para a determinação da atividade das enzimas celulasas endo e exo β -1,4 glucanase e xilanase.

Nos pecíolos frescos a análise foi baseada na massa de matéria seca (MMS) do material vegetal conforme descrito no item 3.3.1.

De cada tratamento foram analisados 0,2 g de tecido fresco pertencentes à parte superior de cada planta testemunha (T), de cada planta parasitada em sítios controle (C), os quais não apresentavam a presença do parasita, e em sítios parasitados (P) pelos filamentos de *Cuscuta* e nos filamentos de *Cuscuta* (Cusc.). A preparação dos extratos seguiu a metodologia do item 3.3.1, sendo utilizado na determinação do teor de proteína total solúvel (PTS), porcentagem de açúcar redutor e também para a determinação da atividade específica da peroxidase.

3.4.2 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos liofilizados e frescos de *Malvaviscus arboreus*

Os extratos do material liofilizado e fresco utilizados foram obtidos conforme descrito no item 3.4.1, em ambos 100 µL dos extratos foram analisados juntamente com 5 ml do reagente de Bradford. Para a determinação de PTS, foi utilizado o método de Bradford (1976) conforme item 3.3.1.

3.4.3 Açúcares redutores (AR) em pecíolos liofilizados e frescos de *Malvaviscus arboreus*

No pecíolo das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*, de cada tratamento foram analisadas 0,5 g de tecido liofilizado pertencente à parte superior de cada planta controle e parasitada preparadas conforme metodologia descrita no item 3.3.2.

Nos pecíolos das folhas frescas foram utilizados os extratos obtidos conforme item 3.3.1. De cada tratamento foi analisado 10 µl da amostra do pecíolo das folhas diluídas em 990 µl de água destilada e 5 µl do extrato dos filamentos da planta parasita diluídos em 995 µl de água destilada. A metodologia utilizada para a determinação foi a mesma do item 3.3.2.

3.4.4 Determinação da atividade celulolítica em pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus*

3.4.4.1 Atividade da exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)

A atividade da exo β -1,4 glucanase foi determinada através do método espectrofotométrico indireto tendo como base a liberação de moléculas de glicose sob celulose microcristalina (Avicel) utilizada como substrato (Lever, 1972).

Na reação 50 μL da fonte enzimática, foram acrescentadas a 450 μL de celulose microcristalina 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 e incubados à 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico 1% (HAPHB) em álcali, sendo novamente incubada à 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e em seguida, resfriada sob banho de gelo (Lever, 1972).

As amostras foram lidas a 410 nm contra branco composto por 1,5 mL de HAPHB + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M.

Para cada amostra analisada foi subtraído o valor de seu respectivo controle, ou seja uma mistura idêntica a da amostra, porém sem prévia incubação.

O experimento constou de 3 repetições por amostra, sendo utilizada uma curva padrão de glicose para a plotagem das leituras de absorbância feitas a 410 nm. A atividade específica da enzima foi expressa em μg de glicose/ $\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína $^{-1}$.

3.4.4.2 Atividade da endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)

A atividade da endo β -1,4 glucanase foi determinada através do método espectrofotométrico indireto, dosando-se a quantidade de glicose liberada através da ação enzimática empregando-se CMC (carboximetil celulose) como substrato.

Na reação 50 μL da fonte enzimática foram acrescentadas a 450 μL de CMC 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 e incubados à 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico 1% (HAPHB) em álcali, sendo novamente incubada à 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e em seguida resfriada sob banho de gelo (Lever, 1972).

As amostras foram lidas a 410 nm contra o branco composto por 1,5 mL de HAPHB + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M.

Para cada amostra analisada foi subtraído o valor de seu respectivo controle, ou seja uma mistura idêntica a da amostra, porém sem prévia incubação.

O experimento constou de 3 repetições por amostra. A atividade específica da enzima foi expressa em μg de glicose/ $\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína $^{-1}$.

3.4.5 Determinação da Atividade da Xilanase (EC 3.2.1.8) em pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus*

A atividade da xilanase foi determinada através do uso da xilana carboximetilada marcada com remazol brilhante azul (“CM-xylan-RBB”), dosando-se espectrofotometricamente a 595 nm os fragmentos solúveis de “CM-xylan-RBB” que foram liberados na reação (Biely et al., 1988)

Na reação, 50 µL da fonte enzimática foram acrescentadas a 200 µL de CM-xylan-RBB (4,0 mg/mL), 200 µL tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 e incubados a 30 °C por 1 hora. A reação foi paralisada pela adição de 500 µL de HCl 2N seguida de centrifugação a 13000 g por 5 minutos à 4 °C.

O sobrenadante foi lido a 595 nm contra um branco composto por 300 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M , 200 µL de CM-xylan-RBB e 500 µL de HCl 2N.

3.4.6 Determinação da atividade específica da peroxidase (EC. 1.11.1.7) em pecíolos liofilizados e frescos de *Malvaviscus arboreus*

Para a determinação da atividade da peroxidase (EC. 1.11.1.7), o extrato utilizado foi o mesmo do item 3.3.1 e a metodologia empregada foi a mesma descrita no item 3.3.4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Observações visuais das folhas e pecíolos de *Malvaviscus arboreus* e dos filamentos de *Cuscuta racemosa*

A **Figura 4** mostra plantas de *Malvaviscus arboreus* 55 dias do início da infecção (D.A.I.) do parasitismo pelos filamentos de *Cuscuta racemosa*. Nessas plantas os filamentos envolveram-se com rapidez e eficiência nos pecíolos e caules das plantas hospedeiras. Entretanto, algumas plantas nesta mesma fase aparentaram resistência ao parasitismo (**Figura 5**).

Na **Figura 6** pode-se observar o declínio da atividade parasítica aos 95 D.A.I., ampliando-se até o término do experimento, o que provavelmente foi devido a um aumento da rigidez dos tecidos, causado por um aumento na síntese de lignina. Essa condição estaria impedindo a proliferação dos filamentos de *Cuscuta*, a exemplo do que ocorre quando alguns fungos patogênicos infectam hospedeiros. Desse modo se estabeleceria uma barreira mecânica bloqueando não somente o avanço, mas também o crescimento desses filamentos (Ride, 1978). Observa-se na **Figura 7** a formação de cicatrizes no tecido caulinar e nos pecíolos das plantas infectadas após a morte dos filamentos, indicando que a invasão de filamentos de *Cuscuta* pode prejudicar incisivamente o hospedeiro. Uma das formas do hospedeiro reagir ao ataque seria a intensificação do processo de lignificação (Ride, 1978) e do espessamento da parede celular. Ambas as atividades metabólicas são oriundas da ação de peroxidases catalizando a união de grupos fenólicos que participam na formação da parede celular (Hammerschmidt & Kuc, 1982).

Os filamentos de *Cuscuta*, conforme observado nas Figuras 8 e 9, instalam-se nas plantas hospedeiras através dos haustórios.

Segundo Kuc (1982), o sítio de infecção pode estar ligado à difusão das substâncias dentro dos tecidos, tanto ao nível temporal como espacial. Sendo assim, quando se compara uma folha parasitada com sucesso à uma folha parasitada sem sucesso (conforme Figura 10) pode-se verificar que a cicatriz forma-se no local onde o haustório dos filamentos de *Cuscuta* estavam inseridos. Já pela Figura 11 observa-se em detalhe o haustório envolvendo um pecíolo com sucesso e outros dois pecíolos onde a *Cuscuta* não conseguiu se estabelecer por um tempo mais prolongado.

Na Figura 12 pode-se observar em detalhe o mesmo pecíolo mostrado na Figura 11, que continha o anel de haustórios de *Cuscuta*, indicando também os locais dos sítios de infecção (cicatrices) após a retirada desse anel. A Figura 13 mostra o filamento de *Cuscuta* retirado do pecíolo identificado na Figura 12, detalhando o anel de haustórios que envolvia o pecíolo de *Malvaviscus*. Desse modo, ficou demonstrado que o parasitismo estabeleceu-se através destes órgãos, e que a formação dos mesmos estaria ligada diretamente ao sucesso ou insucesso do parasitismo. No presente caso, apesar da constatação de que *Cuscuta* conseguiu infectar com sucesso muitas plantas de *Malvaviscus*, pode-se inferir das observações visuais e também experimentais, que essas plantas demonstraram tendência a resistir ao parasitismo.

Figura 04 Observação visual do estabelecimento do parasitismo após 55 dias do início do parasitismo.

Figura 05 Observação visual do parasitismo 55 dias após a inoculação da *Cuscuta*. Pode-se observar pela figura que em algumas plantas, o parasitismo se tornou deficiente.

Figura 06 Observação visual do declínio do parasitismo após 95 e 108 D.A.I. de seu início.

Figura 07 Após a morte dos filamentos de *Cuscuta racemosa* surge uma cicatriz decorrente do parasitismo na planta hospedeira.

Figura 08 Fotografia da formação de um haustório da *Cuscuta racemosa* sob uma folha de *Malvaviscus arboreus*, foto realizada sob estereomicroscópio Zeizz ampliada 600x.

Figura 09 Detalhe do haustório do filamento de *Cuscuta racemosa*, idem a anterior.

Figura 10 Observação de folhas de *Malvaviscus arboreus* parasitada com sucesso e de folhas cujo parasitismo não se estabeleceu.

Figura 11 Observação de dois pecíolos onde a *Cuscuta* não conseguiu se estabelecer junto a um pecíolo onde o parasitismo foi eficaz.

Figura 12 Observação de um pecíolo de *Malvaviscus arboreus* parasitado anteriormente por haustórios de *Cuscuta racemosa*.

Figura 13. Observação detalhando o anel de haustórios que envolviam o pecíolo de *Malvaviscus arboreus*.

4.2 Experimento I - Folhas e pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus*

4.2.1 Massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

Com base nos dados da **Figura 14**, pode-se observar que houve um relativo incremento de massa de matéria seca nas plantas controle e parasitadas ao longo do período do experimento, ou seja entre 55, 95 e 108 D.A.I., não existindo entretanto diferença estatística significativa entre ambos os tratamentos ao nível de 5%. Esse incremento em MMS se fez sentir na folhas das plantas controle passando de 17,02% aos 55 D.A.I. para 21,48 %aos 95 D.A.I. e 21,87% aos 108 D.A.I. Por sua vez, o incremento de MMS nas folhas das plantas parasitadas passou de 18,56% aos 55 D.A.I. para 22,31 % aos 95 e 21,35 % aos 108 D.A.I., neste último, quando os filamentos de *Cuscuta* já haviam definhado. Observou-se que, mesmo parasitadas, as plantas de *Malvaviscus* não paralizaram o seu crescimento, mas, ao que tudo indica, resistiram à invasão de *Cuscuta*. Stewart & Press (1990) chamam a atenção para o fato de que a resposta do hospedeiro ao ataque do parasita pode variar desde um crescimento completamente anormal até a completa ausência de sintomas visíveis. Algumas plantas parasitas podem viver durante décadas com o seu hospedeiro com quase nenhum dano ao mesmo (Schulze & Ehleringer, 1984). No presente caso, levando-se em conta os valores de massa de matéria seca, pode-se inferir que o hospedeiro conseguiu superar a invasão da parasita. Aos 180 D.A.I., portanto aproximadamente 2 meses após a poda, as plantas retomaram o seu crescimento detectando-se nas plantas controle MMS da ordem de 16,89 % e nas parasitadas 16,06% de MMS. Como se verá adiante (item 4.1 - **Figura 7**) os filamentos de *Cuscuta* causaram cicatrizes nos pecíolos das folhas que foram os locais da infecção. Portanto *Malvaviscus* apresentou resposta de defesa ao patógeno, comportando-se assim como uma planta resistente à invasão do mesmo, tal como acontece com muitas plantas resistente a fungos e outros parasitas.

Figura 14. Porcentagem da massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 2 a 6, no Apêndice.

4.2.1.1 Massa de matéria seca (MMS) nos pecíolos liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

Os dados referentes à massa de matéria seca dos pecíolos de *Malvaviscus*, analisados após a liofilização dos mesmos, apresentados na **Figura 15** indicam que ocorreu a mesma tendência observada na MMS das folhas liofilizadas desse hospedeiro. Os mesmos mostram que entre as fases 55 D.A.I. (controle: 16,53%; parasitadas: 18,69%), 95 D.A.I. (controle: 18,49%; parasitadas: 19,83%) e 108 D.A.I. (controle: 18,41%; parasitadas: 19,52%) não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% entre os mesmos.

Entretando, esses valores de MMS dos pecíolos das plantas parasitadas, onde se situam os sítios de infecção, sempre foram superiores aos das plantas controle; assim sendo, pode-se inferir que as plantas estavam reagindo à invasão pelos filamentos de *Cuscuta*.

Aos 108 D.A.I. foi realizada a poda que proporcionou a retomada do desenvolvimento das plantas parasitadas cujos pecíolos aos 180 D.A.I. apresentaram valores de MMS não significativamente diferentes ao nível de 5% daqueles das plantas controle, nestas últimas sendo de 15,94% e nas parasitadas 15,79%. Esses valores foram estatisticamente diferentes dos encontrados nas outras fases, e menores do que nos pecíolos das plantas “in natura” (25,16%).

Figura15 Porcentagem da massa de matéria seca (MMS) em pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 7 a 11, no Apêndice.

4.2.2 Proteína total solúvel (PTS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

Conforme mostra a **Figura 16** aos 55 e 95 D.A.I., os valores de PTS nas folhas liofilizadas das plantas parasitadas aos 55 D.A.I. (3,92%) e aos 95 D.A.I. (3,32%) foram maiores do que nas plantas controle (55 D.A.I.: 3,31%; 95 D.A.I.: 2,94%). Entretanto, o valor de PTS das parasitadas aos 108 D.A.I. (2,76%) foi menor que o valor das controle (3,15%). Observe-se que a planta “in natura” apresentou teor de PTS mais elevado (4,15%) do que as plantas parasitadas em qualquer uma das fases, inclusive aos 180 D.A.I. (controle: 2,57%; parasitada: 2,16%).

As proteínas relacionadas à patogênese (RP) teriam uma função de resposta de defesa do hospedeiro (Pascholati & Leite, 1995) e estariam envolvidas nas reações de hipersensibilidade, induzindo a produção de várias proteínas de defesa codificadas pelos genes das plantas (Carr e Klessing, 1990, Grahnan e Grahnan, 1991, Stintizi et al., 1993).

Segundo Stintizi et al. (1993) as proteínas RP são as responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de PTS durante as respostas de defesa. No presente trabalho observa-se (**Figura 16**) que a Fase 55 D.A.I. foi aquela na qual os filamentos de *Cuscuta* melhor se instalaram sobre o hospedeiro, com o consequente aumento na produção de PTS nas plantas parasitadas. Aos 95 D.A.I. o parasitismo iniciou um declínio, vindo a ser quase que extinto visualmente aos 108 D.A.I.; em virtude deste declínio os valores de PTS reduziram-se. Para se atestar o efeito residual deste parasitismo, todas as plantas foram podadas, sendo que as folhas das plantas controle e anteriormente parasitadas foram novamente analisadas aos 180 D.A.I., não se detectando diferença estatisticamente significativa entre os níveis de PTS nas plantas controle e anteriormente parasitadas.

Figura 16. Porcentagem do teor de proteína total solúvel (PTS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 12 a 15, no Apêndice.

4.2.2.1 Proteína total solúvel (PTS) nos pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus*

Os dados da **Figura 17** mostram a porcentagem de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos liofilizados de plantas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”, teores esses significativamente diferentes entre si ao nível de 5 %. O teor de PTS nos pecíolos foi consideravelmente menor do que o encontrado nas folhas liofilizadas (**Figura 16**) sendo que nas plantas controle variou de 0,21% aos 55 D.A.I a 0,34% aos 95 D.A.I, este último valor sendo praticamente igual ao detectado aos 108 D.A.I.(0,33%); por sua vez, na presença dos filamentos de *Cuscuta* PTS variou de 0,28% aos 55 D.A.I. a 0,62% aos 108 D.A.I. Desse modo, esses dados, os quais correspondem aos sítios da infecção, corroboram aqueles do PTS para as folhas liofilizadas das plantas parasitadas inferindo-se que as proteínas PR estão desempenhando seu papel na defesa do hospedeiro frente à invasão da parasita.

Após a poda, aos 180 D.A.I., quando então as plantas do hospedeiro retornaram o seu desenvolvimento, recuperando-se visualmente do ataque dos filamentos de *Cuscuta*, o valor de PTS das plantas parasitadas (0,52%) praticamente retornou aos valores da planta “in natura” (0,55%). Observe-se que aos 108 D.A.I. o valor de PTS nos pecíolos das folhas das plantas de *Malvaviscus* parasitadas (0,62%) é praticamente o dobro daquele das plantas controle (0,33%). Essa fase é aquela em que os filamentos de *Cuscuta* haviam se desprendidos e nos pecíolos se encontravam apenas as cicatrizes deixadas pela invasão da parasita.

Figura 17 Porcentagem do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 16 a 21, no Apêndice.

4.2.3 Açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

A **Figura 18**, mostra a porcentagem de açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* “in natura”, controle e parasitadas. Observe-se que as folhas de todas as plantas do experimento tiveram os seus níveis de AR aumentados

ao longo do tempo. Nas plantas controle cresceram de 0,61% aos 55 D.A.I. a 1,5% aos 108 D.A.I. este último valor não diferindo estatisticamente daquele observado aos 180 D.A.I. (controle: 1,43%; parasitadas: 1,69%), ou seja, após a poda realizada aos 108 D.A.I., as plantas retomaram o seu desenvolvimento normalmente, e as que haviam sido parasitadas não apresentaram efeito residual da *Cuscuta*. Nas plantas de *Malvaviscus* “in natura”, vindas do campo onde foram coletadas, o valor de AR foi de 1,91%.

Não ocorreram diferenças estatísticas significativas ao nível de 5% entre plantas controle e parasitadas nos valores de AR aos 55 D.A.I. (controle: 0,61%; parasitadas: 0,63%), aos 95 D.A.I. (controle: 0,66%; parasitadas: 0,97%) e aos 108 D.A.I. (controle: 1,5%; parasitadas: 0,89%). O mesmo pode ser observado em relação os valores de AR comparativos entre as plantas aos 55 D.A.I. e 95 D.A.I. e entre plantas aos 95 D.A.I. e 108 D.A.I.. Observe-se, contudo, que com base nos valores das médias dos dados obtidos pode-se inferir que ocorreu um decréscimo em AR nas plantas parasitadas de 0,97% aos 95 D.A.I., quando os filamentos de *Cuscuta* começaram a definhar, a 0,89% aos 108 D.A.I., quando então o parasitismo havia se desinstalado, deixando as cicatrizes nos sítios da invasão (item 4.1 Figura 7)

Os açúcares solúveis, como os glicose e frutose, fazem parte da corrente de nutrientes orgânicos que participam do metabolismo da célula vegetal (Knutson, 1979). No processo da interação entre planta hospedeiro-planta parasita, como é o caso do presente trabalho, no ponto de infecção estabelece-se o mecanismo de fonte-dreno entre as células do hospedeiro (fonte), que exporta nutrientes, e o órgão (dreno) do parasita que os recebe. Os dados da **Figura 18** estão indicando que no período entre 55 D.A.I. e 95 D.A.I., durante o qual o parasitismo se instalou, ocorreu uma drenagem de açúcares redutores das células de *Malvaviscus* (0,63%) para os haustórios da *Cuscuta* (0,97%). Porém, a partir dos 95 D.A.I. nas plantas tanto controle quanto nas parasitadas teve início o aparecimento das gemas florais que passaram a exigir energia advinda do catabolismo de açúcares (glicólise, ciclo de Krebs, cadeia respiratória). O valor 0,89%

de AR nas folhas das plantas parasitadas aos 108 D.A.I., quando então a floração atingiu a sua plenitude, está apontando para o fato de que as mesmas utilizaram parte dos açúcares para a continuidade do seu ciclo biológico em detrimento dos filamentos de *Cuscuta* que nesse período (entre 95 e 108 D.A.I.) definharam, uma das causas prováveis sendo a diminuição no processo de drenagem de nutrientes efetuada pelos haustórios da invasora.

Figura 18 Porcentagem de açúcar redutor (AR) nas folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 22 a 25, no Apêndice.

4.2.3.1 Açúcares redutores em pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus*

Os dados de AR obtidos pela análise dos pecíolos liofilizados das folhas, que foram o sítio da infecção de *Malvaviscus* pelos filamentos de *Cuscuta* (**Figura19**), corroboram as assertivas acima discutidas. Não ocorreram diferenças significativas nos valores de AR entre 55 D.A.I. (controle: 0,69%; parasitadas: 0,81%) e 95 D.A.I. (controle: 0,59%; parasitadas: 0,98%). Por outro lado, diferenças significativas foram observadas entre os pecíolos aos 55 D.A.I. e aos 108 D.A.I. (controle: 1,53%; parasitadas: 1,83%). Pode-se observar que ocorreu um aumento em AR no sítio de infecção ao longo do período experimental, sendo que aos 180 D.A.I. os valores de AR nos pecíolos das folhas de ambos os tipos de plantas (controle: 2,51%; parasitadas: 3,04%) foram estatisticamente diferentes dos valores obtidos nas fases anteriores, os quais foram superiores ao valor encontrado nos pecíolos das folhas das plantas “in natura” (1,6%), atestando uma vez mais a retomada do desenvolvimento (crescimento com atividade metabólica mais intensa) das plantas inicialmente parasitadas as quais recuperaram-se da invasão por *Cuscuta*.

Figura 19 Porcentagem de açúcares redutores (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média A análise estatística encontra-se nas Tabelas 26 a 30, no Apêndice.

4.2.4 Macro e micronutrientes em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

Partição de nutrientes em plantas de *Malvaviscus arboreus* parasitadas por *Cuscuta racemosa*

Em plantas sensíveis, o parasitismo pela *Cuscuta* causa severos danos e prejuízos agrícolas. Jerschke et al. (1994), demonstraram a dependência de plantas de *Cuscuta* pelos nutrientes de xilema ou floema do hospedeiro. Cerca de 99,5 % do C e 93,6 % do N que o parasita necessita são retirados do floema e o restante do xilema. Em *Lupinus*, o N e o K^+ foliar foram 40 e 17%, respectivamente menores nas plantas parasitadas por *Cuscuta* do que nas não parasitadas. Com relação ao Ca^{++} houve um aumento do mesmo nas raízes e folhas de *Lupinus* infectadas por *Cuscuta*. Por outro lado, em plantas parasitadas, K^+ , Mg^{++} e N foliar tiveram redução significativa nos seus conteúdos. Bhattacharya (1977), observou aumento nos conteúdos de Mg^{++} , Ca^+ , Fe^{++} , Mn^{++} e Mo nos tecidos das plantas parasitadas por *Cuscuta*.

As Tabelas 31 e 32 apresentam respectivamente o conteúdo de macro e micronutrientes encontrados em folhas de *Malvaviscus arboreus* na ausência e na presença de *Cuscuta racemosa* analisados aos 55, 95, 108 e 180 dias.

Tabela 31 Conteúdo dos Macronutrientes nas plantas “in natura”, controle e parasitadas de *Malvaviscus arboreus* dados em g/kg PS.

FASES DIAS	N	P	K	Ca	Mg	S
0	17.8±0.45	2.53 ± 0.19	13.26 ± 0.89	26.32 ± 0.67	3.14 ± 0.16	5.75 ± 0.25
55 C	17.6 ± 2.0 B A	4.2 ± 0.17 A	18.74 ± 2.12 A	21.77 ± 3.03	6.16 ± 0.49 B A	6.85 ± 1.07 A
55 P	18.44 ± 1.82 B A	4.67 ± 0.17 A	21.8 ± 1.8 A	20.72 ± 2.26	6.11 ± 0.2 B A	6.65 ± 0.55 A
95 C	14.8± 1.33 B	4.24 ± 0.29 A	15.3 ± 1.59 A	24.58 ± 2.28	6.67 ± 0.36 B A	14.38 ± 1.56 B
95 P	14.42 ± 1.12 B	3.83 ± 0.29 A	17.59 ± 1.46 A	17.98 ± 2.27	6.11 ± 0.46 B A	10.35 ± 2.31 B
108 C	14.91±0.58 B	5.36 ± 0.38 A	16.83 ± 1.49 A	20.93 ± 0.41	7.18 ± 0.2 A	11.65 ± 1.57 B
108 P	15.89 ± 0.78 B	5.26 ± 0.38 A	16.06 ± 0.31 A	20.08 ± 1.19	6.91 ± 0.36 A	8.83 ± 1.05 B
180 C	17.95 ± 1.08 A	4.69 ± 0.23 A	19.13 ± 0.62 A	22.72 ± 0.39	5.51 ± 0.52 B	5.23 ± 0.13 A
180 T	20.93 ± 1.09 A	3.55 ± 0.23 A	18.74 ± 0.73 A	25.67 ± 1.73	6.05 ± 0.27 B	7.25 ± 1.6 A

• C= Controle; P= Parasitada; 0 = “in natura”

Tabela 32 Conteúdo dos Micronutrientes nas plantas “in natura”, controle e parasitadas de *Malvaviscus arboreus* dados em mg/kg PS.

FASES DIAS	Mn	Co	Zn	Fe	Bo
0	54.17 ± 1.57	9.84 ± 0.46	12.67 ± 0.3	97.73 ± 2.76	56.15 ± 1.23
55 C	131.71 ± 64.99	11.35 ± 1.65	19.87 ± 2.15 B A	98.87 ± 9.24 B C	48.55 ± 2.24
55 P	57.97 ± 4.64	9.6 ± 1.49	18.65 ± 2.65 B A	105.45 ± 6.6 B C	48.02 ± 2.24
95 C	63.7 ± 9.91	12.6 ± 0.97	26.5 ± 1.89 A	194.27 ± 23.51 A	79.92 ± 6.95
95 P	60.32 ± 4.79	11.07 ± 1.83	20.82 ± 1.84 A	152.37 ± 21.28 A	70.05 ± 6.95
108 C	81.4 ± 7.05	12.57 ± 0.79	22.05 ± 0.33 A	126.95 ± 4.18 B A	77.95 ± 5.81
108 P	92.97 ± 7.41	13.1 ± 1.53	23.54 ± 1.63 A	150.8 ± 13.11 B A	77.32 ± 5.81
180 C	55.5 ± 8.64	12.17 ± 0.77	17.1 ± 1.65 B	90.87 ± 16.03 C	66.42 ± 3.42
180 P	61.2 ± 12.69	10.82 ± 0.31	15.37 ± 0.48 B	83.55 ± 7.93 C	70.62 ± 3.42

* C= Controle; P= Parasitada; 0 = “in natura”

A - MACRONUTRIENTES

Pode-se verificar pela Tabela 31, referente aos macronutrientes, que não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre os teores de P, K e Ca relativos à plantas controle e parasitadas ao longo do período experimental. Ao que parece, portanto, a invasão de *Cuscuta* não determinou variações drásticas nesses elementos, entretanto esse fato não significaria que os três nutrientes não estejam envolvidos em processos metabólicos importantes nesta interação.

Conteúdo de nitrogênio - Com base nas médias dos valores, houve um decréscimo de cerca de 15% aos 95 e 108 D.A.I. para o conteúdo de N, o que foi motivado provavelmente pelo deslocamento desse nutriente para órgãos mais jovens da planta e também porque se iniciava o processo de florescimento nas mesmas. Knutson (1979), enfatiza que durante o processo de floração, o hospedeiro compete com sucesso por metabólitos com a planta parasita. Essa seria uma das causas, no presente experimento, do definhamento dos filamentos de *Cuscuta*, o qual se concretizou a partir dos 108 D.A.I.

Durante o fenômeno do parasitismo, os teores de N (Tabela 31) nas folhas das plantas controle decresceram de 17,6 g.Kg⁻¹ a 14,8 g.Kg⁻¹ e nas plantas parasitadas de 18,44 g.Kg⁻¹ a 14,42 g.Kg⁻¹. Esse decréscimo pode ter sido ocasionado, no caso das folhas das plantas parasitadas, pela migração do nutriente das células do hospedeiro para o haustório da *Cuscuta*. No caso das plantas controle, as folhas foram coletadas por ocasião do início do florescimento, o qual ocorreu entre 95 e 108 D.A.I., quando então o nitrogênio teria sido utilizado para a formação das flores. O mesmo poderá ter ocorrido com as folhas das plantas parasitadas.

Por outro lado, após a poda de todas as plantas, realizada aos 108 D.A.I., houve uma retomada do crescimento das mesmas e aos 180 D.A.I. detectou-se aumento no teor de N, o

qual, nas plantas que haviam sido parasitadas, atingiu valor ($20,93 \text{ g.Kg}^{-1}$) superior aos observados nas plantas “in natura” ($17,8 \text{ g.Kg}^{-1}$) e plantas controle ($17,95 \text{ g. Kg}^{-1}$).

Conforme indicado na **Figura 20**, apesar dos dados estatísticos não demonstrarem alterações significativas no decorrer do experimento ao nível de 5 %. Observou-se que, pela média dos valores, o conteúdo de N das plantas “in natura” ($17,8 \text{ g.Kg}^{-1}$) e controle ($17,6 \text{ g.Kg}^{-1}$) aos 55 D.A.I. é basicamente o mesmo, quando comparados às plantas parasitadas aos 55 D.A.I. ($18,44 \text{ g.Kg}^{-1}$). Foi constatado também que esse período correspondeu ao pico de maior intensidade da ação da *Cuscuta* sobre o hospedeiro. Aos 95 D.A.I. observou-se que os filamentos de *Cuscuta* começaram a definhar (**vide item 4.1 e Figura 6**). Paralelamente, ambas a plantas controle e parasitadas deram início ao período de floração. Como consequência, possivelmente as substâncias nitrogenadas passaram a ser direcionadas para essa nova fase fisiológica das plantas. Por outro lado, na fase da coleta aos 108 D.A.I., quando a parasita estava praticamente ausente, detectou-se nas plantas controle um nível de N ($14,91 \text{ g. Kg}^{-1}$) semelhante ao da fase anterior ($14,8 \text{ g. Kg}^{-1}$). Em contrapartida, as plantas parasitadas apresentaram um nível ligeiramente superior ($15,89 \text{ g. Kg}^{-1}$) em relação à fase anterior ($14,42 \text{ g. Kg}^{-1}$).

Aos 108 D.A.I., tendo como objetivo a análise da existência de supostos resíduos internos da ação do parasita (**Figura 12**), as plantas controle apresentaram teores similares ($17,95 \text{ g. Kg}^{-1}$) às do controle nas fases e 55 D.A.I.. As plantas parasitadas desta fase demonstraram possuir um teor superior ($20,93 \text{ g. Kg}^{-1}$), possivelmente sendo um reflexo da ação conjunta do novo estímulo ao crescimento e da provável resistência ao parasitismo.

O nitrogênio é um elemento essencial para a produção de material celular, uma vez que é parte integrante de proteínas estruturais e enzimáticas, além de entrar na estrutura de moléculas informacionais e de outras com diferentes funções metabólicas. Nitrogênio apresenta-se como um fator limitante nas inter-relações dos componentes dos ecossistemas. Stewart & Press (1990) chamam a atenção para o fato de que o parasitismo seria uma forma de aumentar a possibilidade de aquisição desse nutriente pelas plantas envolvidas nessa associação. Esses mesmos autores citam trabalhos sobre a migração de aminoácidos e amidas

em plantas invasoras como *Cuscuta*, *Lathraea*, *Striga*, *Orobancha* e *Cytinus*, os quais demonstram que as plantas parasitas mostram uma preferência para as formas reduzidas de nitrogênio, apresentando capacidade limitada para assimilar fontes nitrogenadas inorgânicas, como o nitrato. Concluem então, que a aquisição de N é um fator chave na regulação dos mecanismos de transporte de nutrientes entre o hospedeiro e a planta parasita.

Figura 20. Conteúdo de Nitrogênio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 33 a 36, no Apêndice.

Conteúdo de fósforo - A **Figura 21** representa o conteúdo de fósforo nas plantas de *Malvaviscus arboreus* controles e parasitadas. Nas folhas das plantas de *Malvaviscus* controle o conteúdo desse nutriente variou de 4,2 g. Kg⁻¹ aos 55 D.A.I. a 5,36 g. Kg⁻¹ aos 108 D.A.I., enquanto que as folhas das plantas parasitadas por *Cuscuta*, o teor variou de 4,67 g.Kg⁻¹ aos 55 D.A.I. a 5,26 g.Kg⁻¹ aos 108 D.A.I.. Observe-se que nas folhas das plantas “in natura” o conteúdo de fósforo foi de 2,53 g.Kg⁻¹, inferior ao apresentado pelas folhas das plantas controle e parasitadas aos 180 D.A.I., 5,469 g.Kg⁻¹ e 3,55 g.Kg⁻¹, respectivamente. Esses dados uma vez mais corroboram o fato de que as plantas de *Malvaviscus* parasitadas, após a poda realizada aos 108 D.A.I., recuperaram-se da invasão por *Cuscuta*, o que é evidenciado pela retomada de suas atividades metabólicas, envolvendo a ação de nutrientes, como se discutiu acima para o caso do nitrogênio, e agora com o fósforo. Este último é parte integrante de substâncias que armazenam e distribuem energia química para o desempenho celular, como AMP, ADP e ATP e faz parte dos mononucleotídeos da cadeia de RNA e de DNA, moléculas informacionais comprometidas com a herança genética. Pode-se notar pelos dados da **Figura 21** que não houve diferença estatística significativa entre o conteúdo de fósforo a longo do experimento (coletas de 55 D.A.I. a 108 D.A.I.), mas, pela médias dos valores, pode-se inferir que, apesar de ainda parasitadas, as folhas continuavam a realizar processos metabólicos como a fotossíntese que leva à síntese de ATP.

O fato do conteúdo de fósforo nas plantas podadas serem superiores aos das plantas “in natura” pode estar ligado a que estas últimas vieram do campo em condições precárias, se bem que saudáveis, e as primeiras estavam mantidas em condições semi-controladas de casa de vegetação.

Figura 21 Conteúdo de Fósforo em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 37 a 39, no Apêndice.

Conteúdo de potássio - A **Figura 22** apresenta os conteúdos de potássio nas folhas das plantas de *Malvaviscus arboreus* controle e parasitadas os quais não diferem significativamente ao longo das coletas do experimento. Esse conteúdo variou de 15,3 g. Kg⁻¹ aos 95 D.A.I. a 18,74 g.Kg⁻¹ aos 55 D.A.I. nas plantas controle e de 16,06 g.Kg⁻¹ aos 108 D.A.I. a 21,8 g.Kg⁻¹ aos 55 D.A.I. nas plantas parasitadas por *Cuscuta*. Esses dados estão mostrando que o conteúdo de potássio, elemento móvel dentro da planta, manteve-se praticamente estável. Apesar de não fazer parte da estrutura dos compostos químicos celulares, cerca de 70% de seu conteúdo total encontra-se em forma iônica, solúvel em água e 30% livremente adsorvidos a proteínas (Malavolta, 1976). É ativador de enzimas que envolvem a transferência de fósforo, como as quinases e outras enzimas, e também é essencial ao processo de abertura e fechamento dos estômatos. Este último fenômeno está diretamente envolvido com a ligação do haustório sobre a folha do hospedeiro e relacionado com o conteúdo de potássio neste último, em particular à relação K/Ca (Govier et al., 1967), uma vez que os estômatos estão comprometidos com esse mecanismo. O potássio também está envolvido nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de carboidratos e metabolismo do nitrogênio. O seu maior conteúdo nas folhas das plantas aos 180 D.A.I. (19,13 g. Kg⁻¹ nas controle e 18,74 g.Kg⁻¹ nas parasitadas) do que nas plantas “in natura” (13.16g. Kg⁻¹), está indicando também neste caso a retomada de processos metabólicos essenciais após a poda das plantas parasitadas, evidenciando a não existência de efeitos residuais da ação da *Cuscuta*.

Figura 22. Conteúdo de Potássio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e "in natura". Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 40 a 43, no Apêndice.

Conteúdo de cálcio - O cálcio está diretamente ligado à formação dos complexos moleculares que constituem as paredes celulares dos vegetais, as quais, como se sabe são as primeiras barreiras a serem danificadas quando do início da invasão pelos haustórios de *Cuscuta*. Segundo Huang et al. (1994), o Ca^{++} e calmodulina, agindo como mensageiros secundários, estariam envolvidos no processo de indução do haustório; as células dos primórdios do haustório são ricas em calmodulina. Esses autores sugerem que o cálcio e a calmodulina também estariam envolvidos no processo de tropismo dos filamentos da *Cuscuta*.

Pode-se observar pela Tabela 31 que, aos 95 D.A.I., embora não seja significativo ao nível de 5% de probabilidade, houve uma redução de cerca de 26,8% nos teores de cálcio nas plantas parasitadas, estando os dados de acordo com a literatura, indicando que provavelmente esse nutriente estaria sendo drenado para o parasita para a formação de haustórios da *Cuscuta*. As plantas de *Cuscuta*, segundo Jerschke et al. (1995) não retiram os nutrientes minerais diretamente do floema ou do xilema mas, possivelmente através de mecanismos de sucção dos haustórios, exploram o floema e o xilema do hospedeiro, de onde retiram água e sais minerais, principalmente o Ca^{++} .

Baseando-se nas médias dos valores obtidos, pode-se observar na Figura 23 que o conteúdo de cálcio variou de 20,93 g.Kg⁻¹ aos 55 D.A.I. a 24,58 g. Kg⁻¹ aos 95 D.A.I. nas plantas de *Malvaviscus* controle e de 17,98 g.Kg⁻¹ aos 95 D.A.I. a 25,67 g.Kg⁻¹ aos 180 D.A.I. nas plantas de *Malvaviscus* parasitadas. Aos 95 D.A.I. as plantas invadidas, bem como as controle, continuaram a se desenvolver; ao mesmo tempo as primeiras estavam utilizando suas energias no combate à invasão, muito provavelmente. Após a coleta de material aos 108 D.A.I., foi feita uma poda em todas as plantas as quais voltaram a crescer, sendo o material vegetal coletado aos 180 D.A.I. para análise. A dosagem de cálcio nessa época de coleta aumentou, sendo de 25,67 g.Kg⁻¹ em folhas de plantas parasitadas e 22,72 g.Kg⁻¹ nas folhas de plantas controle, contribuindo para a recuperação das plantas parasitadas.

Figura 23. Conteúdo de Cálcio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e "in natura". Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 44 a 45, no Apêndice.

Conteúdo de enxofre - O conteúdo de enxofre nas folhas das plantas controle e parasitadas de *Malvaviscus* estão mostrados na **Figura 24**. Pode-se observar que ocorreu um pico aos 95 D.A.I. (14.38 g.Kg⁻¹ nas plantas controle e 10.35 g.Kg⁻¹ nas parasitadas), decrescendo.

Em seguida, detectando-se, aos 108 D.A.I., 11,65 g.Kg⁻¹ nas plantas controle e 8,83 g.Kg⁻¹ nas parasitadas. As diferenças entre os valores do conteúdo de S em ambos tipos de plantas não foram estatisticamente significativas aos 95 e 108 D.A.I., mas o foram em relação às folhas das plantas aos 55 D.A.I. (6,85 g.Kg⁻¹ nas plantas controle e 6,65 g.Kg⁻¹ nas parasitadas), e também com relação aos valores obtidos aos 180 D.A.I.. Esse elemento é pouco móvel dentro das plantas e faz parte da estrutura de aminoácidos como cisteína, cistina e metionina, proteínas, algumas vitaminas como timina, e de ésteres dos polissacarídeos componentes das membranas celulares. Está envolvido nos processos de fotossíntese, respiração e metabolismo de gorduras e do nitrogênio. Portanto, sua presença é altamente importante para o metabolismo celular vegetal. O seu conteúdo nas folhas das plantas controle, aos 180 D.A.I., manteve-se no mesmo patamar das plantas “in natura”, 5,23 g.Kg⁻¹ nestas últimas e 5,75 g.Kg⁻¹ nas primeiras. O mesmo ocorreu em relação às plantas 55 D.A.I.. Por outro lado, observa-se que aos 180 D.A.I., as plantas parasitadas, as quais retomaram seu desenvolvimento normal após a poda aos 108 D.A.I., tiveram o seu conteúdo em S da ordem de 7,12 g.Kg⁻¹.

Figura 24 Conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 46 a 49, no Apêndice.

Conteúdo de magnésio - A **Figura 25** apresenta os dados referentes ao conteúdo de magnésio nas plantas de *Malvaviscus arboreus* controle e parasitadas. Pode-se observar que esses valores nos tempos 55 D.A.I. (6,16 g.Kg⁻¹ para controle e 6,11 g.Kg⁻¹ para parasitadas) 95 D.A.I. (6,67 g.Kg⁻¹ para controle e 6,11 g.Kg⁻¹ para parasitadas) não apresentaram diferenças estatísticas significantes ao nível de 5% entre si, permanecendo constantes. Note-se também que no tempo 108 D.A.I. os valores para plantas controle (7,18 g. Kg⁻¹) e parasitadas (6,91 g.Kg⁻¹) não diferem significativamente dos anteriores, podendo-se inferir que, a partir das plantas “in natura” (3,14 g.Kg⁻¹), obtidas no campo, quando foi iniciada a invasão por *Cuscuta* (tempo 0), as plantas se desenvolveram normalmente, independentemente da ação deletéria da parasita. Isso é facilmente visualizado pelo fato de que o magnésio é cofator de enzimas que catalisam as reações bioquímicas de transferência de fósforo, como as quinases e outras que atuam no fenômeno da fotossíntese e da respiração celular, esta última envolvendo os passos glicolíticos e o Ciclo de Krebs, e das reações de assimilação do nitrogênio. Portanto, durante todo o experimento as plantas parasitadas estavam respondendo à invasão da *Cuscuta*, o que ficou evidenciado pelo definhamento dos filamentos da invasora a partir de 95 D.A.I.

Após a poda das plantas controle e parasitadas, houve a retomada do crescimento das mesmas, quando então o conteúdo de magnésio atingiu patamares superiores (5,51 g.Kg⁻¹ para as controle e 6,05 g.Kg⁻¹ para as parasitadas) aos das plantas “in natura”, esses valores sendo estatisticamente diferentes dos valores obtidos aos 108 D.A.I.

Figura 25 Conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 50 a 53, no Apêndice.

Figura 26 Conteúdo dos Macronutrientes nas plantas “in natura”, controle e parasitadas de *Malvaviscus arboreus* dados em g/kg PS.

B- MICRONUTRIENTES

Os micronutrientes analisados foram manganês, zinco, cobre, ferro, boro. Todos são essenciais para o pleno desenvolvimento das plantas, atuando em processos enzimáticos. Alguns são parte da estrutura de enzimas, como o zinco, sendo que a maioria deles é cofator da ação de inúmeras outras enzimas (Malavolta et al., 1989)

Conteúdo de manganês - Com exceção das plantas controle que no tempo 55 D.A.I. apresentaram um resultado elevado para o conteúdo de manganês ($131,71 \text{ g.Kg}^{-1}$) (Figura 27), os demais valores apresentaram-se idênticos aos da planta de *Malvaviscus* “in natura” ($54,17 \text{ g.Kg}^{-1}$) e não diferiram significativamente entre si. As plantas controle apresentaram valores de $63,7 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 95 D.A.I. e $81,4 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 108 D.A.I.; as parasitadas apresentaram valores de $57,97 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 55 D.A.I., $60,32 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 95 D.A.I. e $92,97 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 108 D.A.I.. Após a poda, aos 180 D.A.I., as plantas controle e parasitadas apresentaram níveis de manganês ($55,5 \text{ g.Kg}^{-1}$ para o controle a $61,2 \text{ g.Kg}^{-1}$ para as parasitadas) idênticos ao observado nas plantas “in natura”.

Figura 27 Conteúdo de Manganês em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 54 a 55, no Apêndice.

Conteúdo de cobre - A Figura 28 mostra o conteúdo de cobre nas plantas de *Malvaviscus arboreus* controle e parasitadas. Se bem que não significativamente diferentes ao nível de 5%, pode-se considerar com base na média dos valores encontrados para esse micronutriente, que, no período em que o parasitismo estava em seu ponto mais alto, entre 55 e 95 D.A.I., as folhas das plantas parasitadas apresentaram conteúdos de cobre inferiores ($9,6 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 55 D.A.I. e $11,07 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 95 D.A.I.) aos das plantas controle ($11,35 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 55 D.A.I. e $12,6 \text{ g.Kg}^{-1}$ aos 95 D.A.I.). Entretanto, como foi mencionado anteriormente (item 4.1 Figura 7) entre 95 e 108 D.A.I. as plantas parasitadas começaram a reagir e os filamentos de *Cuscuta* definharam. Aos 108 D.A.I.

O conteúdo de cobre das folhas das plantas parasitadas foi maior ($13,1 \text{ g.Kg}^{-1}$) do que nas controle ($12,57 \text{ g.Kg}^{-1}$), e superiores aos da planta ‘in natura’ ($9,84 \text{ g.Kg}^{-1}$).

Figura 28 Conteúdo de Cobre em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 56 a 57, no Apêndice.

Conteúdo de zinco - Na Figura 29 estão apresentados os valores do conteúdo em zinco nas plantas de *Malvaviscus arboreus* controle e parasitadas.

Observa-se que houve um pico nesses valores aos 95 D.A.I. (26,5 g.Kg⁻¹ para o controle e 20,82 g.Kg⁻¹ para as parasitadas); valores menores foram detectados aos 55 D.A.I., 19,87 g.Kg⁻¹ para o controle e 18,65 g.Kg⁻¹ para as parasitadas. Aparentemente, como ocorreu com o cobre, aos 108 D.A.I. os valores de zinco nas folhas das plantas parasitadas (23,54 g.Kg⁻¹) foi um pouco superior aos das folhas das plantas controle (22,05 g.Kg⁻¹). No caso deste micronutriente, 6 meses após a poda, ou seja, aos 180 D.A.I., os seus valores decresceram nas plantas que retomaram o desenvolvimento (17,1 g.Kg⁻¹ para o controle e 15,37 g.Kg⁻¹ para as parasitadas), valores esses significativamente diferentes dos demais valores obtidos nas coletas anteriores, sendo mesmo superiores aos das plantas “in natura” (12,67 g.Kg⁻¹).

Figura 29 Conteúdo de Zinco em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 58 a 61, no Apêndice.

Conteúdo de ferro - A Figura 30 apresenta os valores do conteúdo de ferro nas plantas de *Malvaviscus arboreus* controle e parasitadas, os quais diferiram significativamente entre si ao nível de 5% crescendo de 98,87 g.Kg⁻¹ para o controle e 105,45 g.Kg⁻¹ para as parasitadas aos 55 D.A.I. para 194,27 g.Kg⁻¹ para o controle e 152,37 g.Kg⁻¹ para as parasitadas aos 95 D.A.I.. A partir dessa data, quando então o parasitismo começou a declinar, as plantas parasitadas aos 108 D.A.I. permaneceram praticamente no mesmo patamar (150,8 g.Kg⁻¹) enquanto que as plantas controle apresentaram conteúdo de ferro mais baixo (126,95 g.Kg⁻¹). Aos 180 dias, quando as plantas visualmente apresentaram-se recuperadas da invasão por *Cuscuta*, os conteúdos de ferro decresceram (90,87 g.Kg⁻¹ para o controle e 83,55 g.Kg⁻¹ para as parasitadas) a valores menores do que as plantas “in natura” (97,73 g.Kg⁻¹).

Figura 30 Conteúdo de Ferro em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 62 a 65, no Apêndice.

Conteúdo de boro - A Figura 31 apresenta os valores do conteúdo de boro nas plantas de *Malvaviscus arboreus* controle e parasitadas. Apesar de não apresentarem diferenças significativas ao nível de 5%, pode-se inferir que, com base na média dos valores, ocorreu um incremento no conteúdo de boro em ambos os tipos de plantas da coleta aos 55 D.A.I. (48,55 g.Kg⁻¹ para o controle e 48,02 g.Kg⁻¹ para as parasitadas) para a coleta aos 95 D.A.I. (79,92 g.Kg⁻¹ (64%) para as plantas controle e para as parasitadas (45%) 70,05 g.Kg⁻¹), incremento esse que permaneceu no mesmo patamar aos 108 D.A.I. (foi 77,95 g.Kg⁻¹ para as plantas controle e 77,32 g.Kg⁻¹ para as parasitadas), quando então as plantas, após a coleta de suas folhas, foram podadas.

Na retomada do crescimento, aos 180 D.A.I., o conteúdo de boro para as plantas controle foi de 66,42 g.Kg⁻¹ e 70,62 g.Kg⁻¹ para as parasitadas, acima dos valores para as plantas “in natura” (56,15 g.Kg⁻¹), indicando uma vez mais, a recuperação das plantas à invasão de *Cuscuta*.

Figura 31 Conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e “in natura”. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 66 a 69, no Apêndice.

Figura 32 Conteúdo dos Micronutrientes nas plantas "in natura", controle e parasitadas de *Malvaviscus arboreus* dados em mg/kg PS.

4.2.5 Atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

Conforme mostra a **Figura 33** nas folhas das plantas controle houve um aumento da atividade específica de peroxidase em relação.

A peroxidase está relacionada à síntese de lignina, e portanto este aumento seria esperado, já que neste período as plantas se desenvolveram (**Figura 14**) podendo-se inferir que ocorreu aumento na síntese de lignina para a formação de novos tecidos. O decréscimo na atividade a partir de 95 dias nas folhas das plantas parasitadas foi quase o dobro da encontrada nas folhas das plantas controle foi cerca de 84 %, o qual poderia ser explicado pelo fato da planta ter atingido o estado adulto, e ter iniciado o processo de floração. A síntese de lignina a partir desse momento teria diminuído. Após, a poda aos 108 dias, as plantas passaram a produzir novamente lignina, o que explicaria o aumento na atividade da peroxidase.

Nas plantas submetidas ao parasitismo pela *Cuscuta racemosa*, o pico de atividade da peroxidase teria coincidido com o pico de 55 D.A.I. após a infecção. O aumento da atividade da peroxidase, estaria também relacionado à síntese de lignina, síntese esta que teria sido estimulada pela formação do haustório. A planta estaria “tentando se defender” do parasitismo, produzindo mais lignina para endurecer os tecidos que estavam sendo invadidos, apesar disso, a parasita instalou-se sobre o hospedeiro. Aos 95 D.A.I. as plantas apresentaram-se infectadas e bastante estressadas pelo ataque da parasita, o que explicaria uma diminuição na atividade específica de peroxidase observada aos 108 D.A.I.. Aos 72 dias após a poda, entretanto, houve a retomada do crescimento, detectando-se um aumento na atividade da peroxidase. Contudo, como as plantas não foram reinfectadas, não se observou um pico de atividade antecipado como ocorreu nos casos anteriores.

Na planta “in natura” observou-se uma atividade específica de peroxidase muito baixa. Deve-se ressaltar que estas plantas não foram submetidas às condições semi-controladas de casa-de-vegetação.

Figura 33 Atividade específica da peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* Cav. controle, parasitadas e "in natura". Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 70 a 75, no Apêndice.

4.2.6 Caracterização eletroforética das isoenzimas de peroxidases em folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus*

Os dados representados nas Figura 34 a 38 referem-se à caracterização de peroxidases utilizando-se o sistema de gel de amido para análise das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* a partir da Fase O (plantas "in natura") até a Fase Final (180 dias).

Em todas as fases as bandas anódicas puderam ser mais claramente definidas que as bandas catódicas.

Aos 55 D.A.I., conforme mostra a **Tabela 76**, as plantas controle diferem das parasitadas com relação às bandas catódicas em níveis de expressão e valores de RF, enquanto que as bandas anódicas, apesar de apresentarem alguns RFs distintos, parecem não diferir entre si em termos da natureza das bandas e seu número (**Figura 34**).

Observa-se na **Figura 35** que aos 95 D.A.I. ambas as plantas, controle e parasitadas, apesar de possuírem RFs diferentes, aparentaram as mesmas bandas catódicas e anódicas, não se detectando diferenças na natureza e número das mesmas (**Tabela 76**).

Aos 108 D.A.I. (**Figura 36**) as plantas controle diferem das parasitadas, podendo-se nestas últimas detectar-se a presença de uma terceira banda catódica, inexistente nas fases anteriores. Nessa plantas foi mantido o mesmo número de bandas anódicas, e todas com RFs diferentes conforme mostra a **Tabela 76**.

No término do experimento aos 180 dias (**Figura 37**), após a extinção visível da invasão do parasita, e a poda das plantas realizada aos 108 D.A.I., as mostras escolhidas ao acaso foram analisadas. Novamente detectou-se uma terceira banda catódica nas plantas parasitadas, o que não aconteceu nas plantas controle. Nessa Fase também foi mantido o mesmo número de bandas anódicas tanto nas plantas controle quanto nas parasitadas, todas com valores de RFs diferentes (**Tabela 76**).

Os dados da **Figura 38** em relação às plantas “in natura” mostram que nelas a peroxidase está presente, se bem que em baixo nível de atividade como indicado na **Figura 33**, uma vez que, apesar do número de bandas ser o mesmo daquele encontrado nas folhas das plantas controle, a intensidade de coloração das mesmas foi visualmente diferente.

Tabela 76 Média dos valores referentes aos Rfs das bandas de peroxidase referentes ao gel de amido das Fases 0, 1, 2, 3 e 4 das plantas “in natura”; controle e parasitadas de *Malvaviscus arboreus*

Figura 34 Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 1 (55 dias) das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* (no lado esquerdo cedro e plantas controle, no lado direito plantas parasitadas e cedro).

Figura 35 Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 2 (95 dias) das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* (no lado direito cedro e plantas controle, no lado esquerdo plantas parasitadas e cedro).

Figura 36 Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 3 (108 dias) das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* (no lado esquerdo plantas controle, no lado direito plantas parasitadas).

Figura 37 Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 4 (180 dias) das folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* (no lado esquerdo cedro e plantas controle, no lado direito plantas parasitadas e cedro).

Figura 38 Observação visual do desenvolvimento eletroforético em gel de amido da isoenzima peroxidase referente a Fase 0 folhas liofilizadas de *Malvaviscus arboreus* "in natura". (cedro, plantas "in natura" , cedro)

4.2.7 Atividade Celulolítica: exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91), endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4), e atividade da xilanase (EC 3.2.1.8) nos pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus*

A atividade da exo β -1,4 glucanase em pecíolos de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitado e "in natura", esta representada na **Figura 39**. Como se pode observar houve um aumento significativo nas plantas parasitadas em relação às plantas controle que apresentaram atividade cerca de 50 % inferior no início do parasitismo aos 55 D.A.I. Tal aumento de atividade poderia ser explicado pela produção de substâncias indutoras excretadas pelo parasita. Tal suposição se baseia no fato de que a planta parasitada consegue posteriormente eliminar completamente o parasita de sua superfície, indicando assim ser uma das formas empregadas pelo hospedeiro para resistir ao ataque do patógeno.

Coincidindo com a regressão do parasitismo aos 95 e 108 dias que houve uma eliminação quase que completa do parasita, verificou-se também aos 180 D.A.I. uma diminuição na atividade da enzima exo β -1,4 glucanase devido provavelmente à diminuição na produção do agente indutor pelo parasita.

Pela **Figura 40**, pode-se observar a atividade da endo β -1,4 glucanase em pecíolos liofilizados. Ao contrário do que ocorreu com a exo, houve uma inibição na atividade da enzima na planta parasitada em todas as fases do experimento. Tanto endo como exo glucanases, bem como as xilanases fazem parte das proteínas relacionadas à patogenicidade (**PR**). São enzimas hidrolíticas que tem por função a degradação das paredes celulares dos patógenos, inibindo assim a ação dos parasitas. No caso, ao que tudo indica, a *Cuscuta* foi percebida pela planta, como um invasor e passou a estimular seu sistema de defesa. Também o parasita procura de algum modo inibir os mecanismos de defesa do hospedeiro. Uma das enzimas que a *Cuscuta*, provavelmente conseguiu inibir foi a endo β -1,4 glucanase, como se observa pela **Figura 40**. A atividade da mesma diminui dos 55 até os 108 D.A.I., sendo sempre menor na planta parasitada.

Também pode-se observar pela **Figura 41** que a xilanase se apresentou de maneira semelhante a endo β -1,4 glucanase. Como discutido anteriormente, ao sofrer a invasão do patógeno a planta responde com a produção de RP, fitoalexinas, aumento da atividade de enzimas degradativas, alterações na atividade de peroxidase, devido a estarem intimamente relacionadas com a síntese de lignina. O patógeno também produz inibidores que procuram bloquear e/ou diminuir a atividade destas enzimas. Estes atuam através de mecanismos de regulação em cascata de forma a inibir também, a ação destes, contudo estes mecanismos ainda são muito pouco conhecidos neste tipo de interação (Forrest & Lyon, 1997).

No presente trabalho a atividade da xilanase provavelmente foi inibida pelo patógeno, através da liberação de algum indutor químico, da mesma forma como ocorreu com a endo β -1,4 glucanase.

A atividade da xilanase nas plantas parasitadas indicaria uma provável produção de substâncias inibidoras pelo parasita, buscando desta forma bloquear a atividade de enzimas de resistência, para ter maior facilidade de acesso aos nutrientes da parasita. Ao atingir o estágio de florescimento houve um decréscimo para cerca de 70 % da atividade original nas plantas controle e nas plantas parasitadas, devido provavelmente ao redirecionamento do metabolismo para a produção de flores. Aos 108 dias foi realizada a poda das plantas e as mesmas foram reavaliadas aos 180 dias verificando-se que não houve diferença significativa na atividade dessa enzima em ambas as plantas.

Chatterjee & Sanwal (1999), purificaram uma proteína de alto peso molecular de *Lantana camara* designada como estimulador de celulase (Cs) em vista de sua habilidade para estimular / ativar a catalase da celulase em *Cuscuta reflexa*.

Os tipos de elicitores, receptores, sinais, genes ativo / inativos, e mensageiros secundários existentes em ambas as plantas, bem como a qualidade e quantidade de suas respostas, necessitam ser estudados e discutidos em maior escala na elaboração de testes e trabalhos que possam sanar com certeza estas duvidas. Braga et al. (1993) relataram que fragmentos da parede celular, tais como β glucana, quitinas, etc, poderiam estar atuando como elicitores. Darwill & Albersheim (1984), Hahn et al. (1981), observaram que outros polissacarídeos, como por exemplo os oligogalacturonídeos estariam envolvidos. A ação das enzimas pécticas secretadas pelo patógeno, solubilizariam os oligouronídeos, os quais atuariam como sinais primários, nas respostas de defesa localizadas. Entretanto no parasitismo de plantas superiores, como é o caso da *Cuscuta*, nada foi revelado, uma vez que constatou-se que esta interação demonstrou resultados amplos e complexos, ficando assim um assunto para ser melhor investigado posteriormente.

Segundo Herr (1979), Jabbar & Afzal (1981), Woodward & Arnold (1981), em fungos a síntese de celulasas pode ser reprimida pela presença de glicose e outros açúcares exógenos. Já Giltrap & Lewis (1982) observaram que carboidratos derivados do hospedeiro, em associações micorrízicas reprimiam a produção das mesmas na interface fungo-raiz, sendo também que a possível redução ou eliminação da disponibilidade dos mesmos poderia favorecer a atividade das celulasas.

Figura 39 Atividade da exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91) em pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e "in natura". Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 77 a 82, no Apêndice.

Figura 40 Atividade da endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4) em pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e "in natura". Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 83 a 88, no Apêndice.

Figura 41 Atividade da xilanase (EC 3.2.1.8) em pecíolos liofilizados de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e "in natura". Barras representam o erro padrão A análise estatística encontra-se nas Tabelas 89 a 92, no Apêndice.

4.3 Experimento II - Folhas e pecíolos frescos de *Malvaviscus arboreus*

4.3.1 Massa de matéria seca nas folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

Nesse experimento as plantas de *Malvaviscus arboreus* foram divididas em dois lotes, um de plantas controle e um de plantas infectadas com filamentos de *Cuscuta racemosa* e o material, folhas e pecíolos do hospedeiro e os filamentos da parasita, foram coletados separadamente aos 0, 5, 32 e 44 D.A.I.

Aos 44 D.A.I. foram também coletadas plantas de *Malvaviscus* testemunhas, com a mesma idade fisiológica das plantas sujeitas aos tratamentos (controles e parasitadas). Como se pode observar na **Figura 42** o teor de massa de matéria seca das folhas frescas das plantas controle permaneceu constante ao longo do experimento, de 24% aos 5 D.A.I., 24,33% aos 32 e 44 D.A.I., não apresentando diferença estatística significativa ao nível de 5%. Esses valores também não foram diferentes estatisticamente do valor de MMS da testemunha aos 44 D.A.I. (23,67%). A testemunha tempo 0, utilizada como referência para o início do experimento, apresentou 28,83% para MMS.

Nas folhas frescas das plantas parasitadas, os valores de MMS também permaneceram constantes: aos 5 D.A.I. (22,96%) e aos 32 D.A.I. (20,33%), decrescendo aos 44 D.A.I. (18,83%); esses valores não diferiram significativamente ao nível de 5%. Pode-se dizer, contudo, que longo do tempo as plantas infectadas sofreram um decréscimo no valor de seu MMS, mesmo que discreto, indicando o estabelecimento da infecção por *Cuscuta*. Os filamentos da parasita, uma vez estabelecidos sobre o hospedeiro (20,31% de MMS aos 5 D.A.I.), foram definhando drasticamente em resposta à reação de *Malvaviscus*: 15,02% aos 32 D.A.I. e 11,9% aos 44 D.A.I..

Figura 42 Porcentagem de massa de matéria seca nas folhas frescas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas, testemunha e filamentos de *Cuscuta*. Barras representam o erro padrão. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 93 a 103, no Apêndice.

4.3.1.1 Massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

A MMS dos pecíolos frescos de *Malvaviscus* seguem padrão idêntico de comportamento fisiológico frente à invasão pelos filamentos de *Cuscuta* (Figura 43). Nas plantas controle, a MMS dos pecíolos permaneceu constante de 5 D.A.I. (15,45%) a 32 D.A.I. (14,68%), aumentando contudo aos 44 D.A.I. (19,55) apesar desses valores não diferirem estatisticamente entre si ao nível de 5%, como também não o foram em

relação à testemunha tempo 44 D.A.I. (MMS igual a 16,08%). Observe-se que a testemunha tempo 0 (referência) apresentou MMS igual a 16,66%.

Tomando como base os valores das médias, a **Figura 43** está indicando que houve um decréscimo nos valores de MMS para os pecíolos frescos das plantas parasitadas de 15,28% aos 5 D.A.I. para 5,7% aos 32 D.A.I. Como essas plantas retomaram o seu desenvolvimento aos 44 D.A.I., o valor de MMS para os pecíolos frescos nessa fase aumentou para 15,24%. Esses dados podem ser corroborados levando-se em conta que aos 5 D.A.I. os filamentos de *Cuscuta* já estavam estabelecidos sobre o hospedeiro (MMS 20,31%) e, apesar de ter decrescido aos 32 D.A.I. (MMS 15,02%), ainda estavam se desenvolvendo, para então diminuir para MMS 11,9% aos 44 D.A.I..

Os dados referentes à massa de matéria seca dos pecíolos das folhas de *Malvaviscus*, apresentados na **Figura 42** indicam que ocorreu a mesma tendência observada para a MMS das folhas liofilizadas desse hospedeiro. Os mesmos mostram que entre as fases 55 D.A.I. (controle: 16,53%; parasitadas: 18,69%), 95 D.A.I. (controle: 18,49%; parasitadas: 19,83%) e 108 D.A.I. (controle: 18,41%; parasitadas: 19,52%) não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% entre os mesmos. Entretanto, esses valores de MMS dos pecíolos das plantas parasitadas, onde se situam os sítios de infecção, sempre foram superiores aos das plantas controle; assim sendo, pode-se inferir que as plantas estavam reagindo à invasão pelos filamentos de *Cuscuta*.

Aos 108 D.A.I. foi realizada a poda que proporcionou a retomada do desenvolvimento das plantas parasitadas cujos pecíolos aos 180 D.A.I. apresentaram valores de MMS não significativamente diferentes ao nível de 5% daqueles das plantas controle, nestas últimas sendo de 15,94% e nas parasitadas 15,79%. Esses valores foram estatisticamente diferentes dos encontrados nas outras fases, e menores do que nos pecíolos das plantas “in natura” (25,16%).

Figura 43 Porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos frescos de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas e testemunha e filamentos de *Cuscuta*. Barras representam o erro padrão. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 104 a 114, no Apêndice.

4.3.2 Teor de proteína total solúvel (PTS) em folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

Conforme pode-se observar pela **Figura 44**, as folhas frescas de *Malvaviscus* parasitadas por *Cuscuta racemosa*, apresentaram aos 5 D.A.I., um aumento significativo de cerca de 50% e aos 32 D.A.I., um aumento de cerca de 2 vezes no conteúdo de

proteína total solúvel em relação á folha não parasitada. Como as análises representam a media de 6 folhas, pode-se verificar que a planta esta produzindo proteínas de resistência para se defender. Também por parte da *Cuscuta*, houve produção de proteínas, provavelmente hidrolíticas, no inicio do parasitismo (5 D.A.I.). Posteriormente, aos 32 e 44 D.A.I., houve o retorno aos níveis normais de proteína (cerca de 0,7% em média).

Conforme já mencionado anteriormente para folhas liofilizadas, o aumento nos teores de proteína total solúvel estão relacionados com as resposta de defesa da planta a patógenos, como discutido no item 4.2.2.

Figura 44. Porcentagem de proteína total solúvel (PTS) em folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*: testemunha, controle, parasitadas e *Cuscuta racemosa*. Barras representam o erro padrão da média, os valores foram múltiplicados por 10 para melhor vizualização dos dados. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 115 a 123, no Apêndice.

4.3.2.1 Determinação do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

Conforme pode-se observar pela **Figura 45**, os pecíolos frescos de *Malvaviscus* parasitados por *Cuscuta racemosa*, apresentaram aos 5 D.A.I., um aumento não significativo de cerca de 20% e aos 32 D.A.I., uma redução de cerca de 20% no conteúdo de proteína total solúvel em relação aos pecíolos não parasitados. Como as análises também representam a média de 6 pecíolos, pode-se verificar que a planta está produzindo proteínas de resistência para se defender. Também por parte da *Cuscuta*, houve produção de proteínas, provavelmente hidrolíticas, no início do parasitismo (5 D.A.I.). Posteriormente, aos 32 e 44 D.A.I., houve o retorno aos níveis normais de proteína (cerca de 0,7% em média).

Figura 45 Porcentagem do teor de proteína total solúvel (PTS) em pecíolos de *Malvaviscus arboreus* testemunha, controle, parasitadas e *Cuscuta racemosa*. Barras representam o erro padrão da média, os valores foram múltiplicados por 10 para melhor visualização dos dados. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 124 a 132, no Apêndice.

4.3.3 Açúcares redutores (AR) em folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

O teor de açúcares redutores (AR) em folhas frescas de *Malvaviscus* ao longo do período do experimento estão mostrados na **Figura 46**. Observa-se que os valores de AR nas folhas das plantas controle permaneceu praticamente inalterado de 5 D.A.I. (0,84%), 32 D.A.I. (0,71%) a 44 D.A.I. (0,79%), não apresentando diferenças significativas ao nível de 5%. Comportamento idêntico pode ser observado para os valores de AR nas folhas das plantas parasitadas: 5 D.A.I., 0,58%; 32 D.A.I., 0,46%; 44 D.A.I., 0,64%, também não apresentando diferenças significativas ao nível de 5%. Esses valores são menores do que os das plantas controle, indicando que ocorreu uma drenagem de AR da fonte (células do hospedeiro) para o dreno (haustório da *Cuscuta*) , o que pode ser constatado pelos altos valores de AR nos filamentos de *Cuscuta* aos 5 D.A.I. (3,04%) e 44 D.A.I. (2,92%). Pode-se portanto, inferir que a partir do estabelecimento da infecção a drenagem de açúcares redutores foi se tornando cada mais intensa. Entretanto, a partir de 32 D.A.I., os filamentos visualmente começaram a definhar e aos 44 D.A.I. poucos restavam infectando o hospedeiro neles detectando-se 1,23% de AR, bem menor do que nas fases anteriores. Neste experimento, o processo de invasão de *Malvaviscus* por *Cuscuta* foi bastante intenso como se pode constatar quando se comparam os valores de AR aos 5 e 32 D.A.I. nas folhas das plantas parasitadas com os valores encontrados no tempo 0 (referência) (0,94%) e com a testemunha aos 44 D.A.I. (1,00%).

Figura 46 Porcentagem de açúcar redutor (AR) nas folhas frescas de *Malvaviscus arboreus* testemunha, controle, parasitadas e *Cuscuta racemosa*. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 133 a 140, no Apêndice.

4.3.3.1 Açúcares redutores nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

Virtualmente o mesmo cenário dos valores de AR em folhas frescas de *Malvaviscus* foi observado na análise dos pecíolos frescos desse hospedeiro invadido pelos filamentos de *Cuscuta*, como está mostrado na **Figura 47**. No sítio de infecção das plantas parasitadas os valores de AR decresceram de 0,7% aos 5 D.A.I. para 0,47% aos

32 D.A.I., com pequena recuperação aos 44 D.A.I.(0,6%), valores não são diferentes estatisticamente ao nível de 5%. Esses valores corroboram a existência de drenagem desses combustíveis orgânicos da fonte (células dos pecíolos) para o dreno (haustórios da invasora), contribuindo para o desenvolvimento dos filamentos de *Cuscuta*, como já mostrado no item anterior. Por outro lado, os valores de AR nos pecíolos das plantas controle, como no caso das folhas, permaneceram praticamente constantes: 0,45% aos 5 D.A.I., 0,53% aos 32 D.A.I. com pequeno aumento aos 44 D.A.I, valores esses comparáveis ao valor obtido no tempo 0 (referência), porém bem maior do que o encontrado nos pecíolos das plantas testemunha (0,20%).

Figura 47 Porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas frescas de *Malva viscus arboreus* testemunha, controle, parasitadas e *Cuscuta racemosa*. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 141 a 147, no Apêndice .

4.3.4 Atividade específica de peroxidase nos pecíolos e nas folhas frescas de *Malvaviscus arboreus*

Como podemos observar pela **Figura 48**, o parasitismo aos 5 D.A.I., por *Cuscuta racemosa* causou um incremento de cerca de 5 vezes na atividade específica da enzima peroxidase em relação ao controle. Apesar do erro padrão da média ser bastante alto, pode-se observar que o mesmo comportamento se repetiu aos 32 D.A.I. Neste período, apesar de ter ocorrido uma redução nas médias, em cerca de 30%, a atividade nas plantas controle também aumentou, como consequência natural do crescimento da planta. Tal comportamento seria o esperado, uma vez que a peroxidase esta envolvida nos fenômenos de resistência a patógenos. Assim pode-se afirmar que a planta hospedeira ao reagir ao ataque da *Cuscuta*, esta disparou no hospedeiro os mecanismos de defesa, do mesmo modo que os mecanismo de invasão por outros patógenos, como fungos e bactérias. Aos 44 D.A.I., apesar do declínio da infecção, não houve um declínio na atividade da enzima, supondo-se que o estímulo indutor ainda estivesse presente, e que o mesmo não teria se difundido para outros órgãos, a exemplo do que ocorre com a síntese de ácido salicílico nas respostas das plantas a patógenos nos modelo de resposta sistêmica adquirida (Delaney, 1997).

Em pecíolos a atividade da enzima peroxidase, teve um comportamento semelhante, exceto que aos 32 D.A.I., ainda tivemos um incremento de cerca de 30% uma vez que o sítio de infecção se localizava no pecíolo e não na folha. (**Figura 49**).

Como relatado anteriormente (**item 4.2.5**) ficou demonstrado por este experimento a relação entre a atividade da peroxidase e o parasitismo pela *Cuscuta*, estando os dados de acordo com a literatura.

Figura 48 Atividade específica de peroxidase em folhas frescas de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas, testemunha e filamentos de *Cuscuta*. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 148 a 156, no Apêndice .

Figura 49 Atividade específica de peroxidase em pecíolos frescos de *Malvaviscus arboreus* controle, parasitadas, testemunha e filamentos de *Cuscuta*. Barras representam o erro padrão da média. A análise estatística encontra-se nas Tabelas 157 a 165, no Apêndice.

5 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos nos experimentos realizados para se contribuir à compreensão da interação a parasita *Cuscuta racemosa* com o hospedeiro *Malvaviscus arboreus* Cav., pode-se concluir que:

1. Nas condições experimentais, a *Cuscuta* conseguiu estabelecer-se sobre o hospedeiro, com um pico máximo entre os 55 e 95 dias após o início dos experimentos, identificando-se o pecíolo das folhas como sendo o sítio da infecção;

2. As plantas de *Malvaviscus* parasitadas foram capazes, ao longo do período experimental, de reagir ao ataque da parasita, o que ocorreu entre 95 e 108 dias após o início do experimento quando então os filamentos de *Cuscuta* definharam como consequência da reação do hospedeiro ao seu ataque;

3. Alterações fisiológicas nas folhas e pecíolos do hospedeiro parasitado fizeram-se sentir:

a) nas variações detectadas nos seus valores de massa de matéria seca que decresceram ao longo do período experimental, recuperando-se aos 180 D.A.I., após a poda efetuada aos 108 D.A.I.;

b) o conteúdo de nutrientes em geral diminuiu, em consequência da sua drenagem para a formação dos haustórios da *Cuscuta*.

4. Como resposta ao ataque da planta invasora, o teor de proteínas totais solúveis nas folhas e pecíolos das plantas parasitadas cresceu ao longo do período experimental;

5. A atividade de peroxidase aumentou significativamente ao longo do período experimental nas folhas e pecíolos, o mesmo acontecendo com a exo-B-1,4-glucanase, enquanto que a endo-B-1,4-glucanase e xilanase decresceram durante o processo de infecção;

6. Os teores de açúcares redutores mostraram-se alterados nas folhas e pecíolos de *Malvaviscus*, indicando existir um estreito relacionamento entre o fenômeno do parasitismo e o mecanismo de drenagem das células no sítio de infecção do hospedeiro para o haustório da *Cuscuta*, sendo que o parasita apresentou um elevado teor de açúcares redutores, cerca de 6 vezes maior do que o encontrado no hospedeiro. Isto causaria um aumento na pressão osmótica das células da planta parasita, sendo um dos mecanismos da drenagem de água e nutrientes inorgânicos e orgânicos do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B.; BILES, C. L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v. 45, p.395-400, 1991

AGRIOS, G. N. Plant Pathology, 1988. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia** Vol I, Fonte: PASCHOLATI, S.F., cap.19, p.342- 364, 1995.

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.;PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa - MG, UFV, p.242, 1991.

ARCHANA-SINGH; MADHAV-SINGH; SINGH- A; SINGH-M. Incompatibility of *Cuscuta* haustória with the resistant hosts - *Ipomoea batatas* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. **Journal of Plant Physiology**, v.150, n. 5, p. 592-596, 1997.

ATSATT, P. R. Host-parasite inateractions in higher plants. In Physiological Plant Ecology III: Responses to the Chemical and Biological Environment. Encyclopedia of Plant Physiology, N.S., ed. O L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, H. Ziegler, 12C: 519-35.Berlin: Springer-Verlag, 1983.

ATSATT, P. R. The insect herbivore as a predictive model in parasitic seed plant biology. **The Americam Nature**, v. 111, p. 579-586, 1977.

- BACCHI, E. M. Flavonoids from *Cuscuta racemosa*. **Planta-Medica**, v. 59, p. 7, 1993.
- BACCHI, E. M.; ALVES, N. B.; SEKI, F. R. Ação antiúlcera de *Cuscuta racemosa* MARITUS, X **Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 1995.
- BACCHI, O.; ARANHA, C., FILHO, H. F .L. **Plantas invasoras de culturas**, Campinas: Ed. Inst. Campineiro de Ensino Agrícola, 1972, v. 1, p. 42-43.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In. BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991. cap. 1, p.1-5.
- BHATTACHARYA, M. K. Interlinks in mineral composition between host and parasite during *Cuscuta* infection. **Acta Agronomica Academiae Scientiarum - Hungaricae**, v. 26, n. 3-4, p. 324-328, 1977.
- BIELY, P.'MISLOVICOVÁ, D.; TOMAN, R. Remazol Brilhante Blue - Xylan: A soluble Chromogenic Substrate for Xylanases. In: WOOD, W.A. & KELLOGG, S. T. (Eds). **Methods in Enzymology Cellulose and Hemicellulose**. San Diego: Academic Press, 1988. vol.160, p. 536-541.
- BOMMER. D.; HABERHAUSEN, G.; ZETSCHKE, K. A large deletion in the plastid DNA of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa* concerning two ribosomal proteins (rpl2, rpl23), one transfer RNA (trnI) and an ORF 2280 homologue. **Current-Genetics**, v. 24, n. 1-2, p. 171-176, 1993.

- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.
- BRAGA, M. R.; COSTA, A P. C.; DIETRICH, S. M. C. Cell wall carbohydrates as trigger of defensive responses in plants. **Carbohydrate Research in Brazil**, v. 45, n. 1, p. 76-80, 1993.
- BRIRECKA, H.; CATALFAMO, J. L.; GARRAWAY, M. O. Cell wall and protoplast isoperoxidases of corn leaves in relation to cut injury and infection with *Helminthosporium maydis*. **Plant Physiology**, v. 55, p. 607-610, 1975a.
- BRIRECKA, H.; CATALFAMO, J. L.; URBAN, P. Cell wall and protoplast isoperoxidases in tobacco plants in relation to mechanical injury and infection with tobacco mosaic virus. **Plant Physiology**, v. 55, p. 611-619, 1975b.
- BROSCH, G.; RANSOM, R.; LECHNER, T.; WALTON, J. D.; LOIDL, P. Inhibition of maize histone deacetylases by Hc toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. **The-Plant-cell**, v.7, n.11, p. 1941-1950, 1995.
- CADENA-GOMEZ, G.; NICHOLSON, R. L. Papilla formation and associated peroxidase activity: A non-specific response to attempted fungal penetration of maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.31, p.51-67, 1987.
- CAIRNEY, J. W. G.; BURKE, R. M. Fungal enzymes degrading plant cell walls:their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. **Mycological Research**, v. 98, p. 1345-1356, 1994.

- CAO, W.G.; CRAWFORD, D. L. Purification and some properties of β -glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 125-129, 1993a.
- CARR, J. P.; KLESSIG, D. F. The pathogenesis-related proteins of plants. **Genetic Engineering - Principles and Methods**. E. Jane K. Seltow. Plenum Press. vol II. p. 65-109, 1990.
- CHATTERJEE, U.; SANWAL, G. G. Purification and properties of a protein from *Lantana camara* activating *Cuscuta reflexa* cellulase. **Phytochemistry**, v. 52, p. 361-366, 1999.
- CLAYTON, J.; TRETIAK, D. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Board of Canada**, v. 29, p. 1169-1172, 1972.
- DARVILL, A G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 243-275, 1984.
- DEGEFU, Y.; FAGERSTROM, R.; KALKKINEN, N. Purification and partial characterization of xylanase from the fungal maize pathogen *Helminthosporium turcicum* (Pass.). **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 291-99, 1995.
- DELANEY, T. P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, v. 113, p. 5-12, 1997.

- DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Atividade celulolítica "in vitro" de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* diferindo em virulência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28, Ilhéus, 1995. Resumos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.296, 1995.
- DOGGETT, H. Factors reducing *sorghum* yields, *Striga* and birds. In *Sorghum* in the Eighties, ed. ICRISAT, Patancheru : ICRISAT, p. 313-320, 1982.
- DORI, S.; SOLEI, Z.; BARASH, I. Cell wall-degrading enzymes produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.189-198, 1995.
- DRENNAN, D. S. H.; EL HIWERIS, S. O Changes in growth regulating substances in *Sorghum vulgare* infected with *Striga hermonthica*. **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PARASITIC WEEDS 2.**, p.144-155, Raleigh, 1979.
- DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C. L. Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. **Postharvest News Information**, v. 2, p. 169-173, 1991.
- ENARI, T. M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.) **Microbial enzyme and biotechnology applied sciences**. London: Applied Society, 1983, p. 183-223.
- ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilised by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. I. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4- β -glucanases. **European Journal of Biochemistry**, v.51, p. 193-206, 1975a.

ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilised by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. III. Purification and physico-chemical characterization of an exo-1,4- β -glucanase. **European Journal of Biochemistry**, v. 51, p. 213-218, 1975 b.

ESTRADA, K. R. F.S. Caracterização enzimática de Fungos ectomicorrízicos e o envolvimento de Enzimas celulolíticas na Simbiose *Eucalyptus urophylla* – *Pisolithus tinctorius*. Tese (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1997.

FARKAS, G. L.; DEZSI, L.; HORVATH, M.; KISBAN, K.; UDVARDY, J. Common pattern of enzymatic changes in detached leaves and tissues attacked by parasites. **Phytopathol. Z.** v. 49, n. 343-354, 1964.

FARKAS, G. L.; LOVREKOVICH, L. Enzyme levels in tobacco leaf tissue affected by wildfire toxin. **Phytopathology**, v.55, p.519-524, 1965.

FARKAS, G. L.; SOLYMONY, F. Host metabolism and symptom production in virus-infected plants. **Phytopathol. Z.** v. 53, p. 85-93, 1965.

FARKAS, G. L.; STAHMANN, M. A. On the nature of changes in Peroxidase Isoenzymes in Bean Leaves Infected by Southern Bean Mosaic Virus. **Phytopathology**, v.56, p.667-669, 1966.

FEHRMANN, H.; DIMOND, A.E. P. Peroxidase activity and *Phytophthora* resistance in different organs of the potato plant. **Phytopathology**, n. 57, p. 69-72, 1967.

- FER, A Contribution a la physiologie de la nutrition des phanérogames parasites, etude du genre *Cuscuta* L. (Convolvulacea). PhD thesis Univ. Grenoble, 1979, citado por Stewart, G.R. & Press, M.C. The Physiology and Biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 127-151, 1990.
- FER, A.; BENHANAT, H.; REY, L.; RENAUDIN, S. A study of some effects of *Cuscuta lupuliformis* parasitism Krock on *Vicia sativa* L.: impact on biomass and the content of several important mineral elements. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 310, n. 4, p. 113-120, 1990.
- FER, A.; PAINSET, J. C.; REY, L. Characteristics of mineral nutrition in some types of parasitic plants (*Cuscuta*, *Orobanche*, *Thesium*) and their development on crops. **Bulletin-de-la-Societe-Botanique-de-France, Actualites-Botaniques**, v.139, n. 1, p. 111-121, 1992.
- FISHER, J. T. Water relations of mistletoes and their hosts. In: Calder, D., Bernhardt, M. P. **The biology of mistletoes**. New York: Academic, 1983, p. 161-183.
- FORREST, R. S.; LYON, G. D. Substrate degradation patterns of polygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* and *Bacillus polymyxa* and release of phytoalexin-eliciting oligosaccharides from potato cell wall. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, p. 481-488, 1990.
- FREYER, R; NECKERMANN, K.; MAIER, R. M; KOSSEL, H. Structural and functional analysis of plastid genomes from parasitic plants: loss of an intron within the genus *Cuscuta*. **AU Current-Genetics**, v. 27, n. 6, p. 580-586, 1995.
- FRIC, F. Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS, R. & WILLIAMS, P. H. (ed.) **Physiological plant pathology**, Berlin, Springer, p.617-631, 1976.

GASPAR, T. H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPIN, H. **Peroxidases 1970-1980**. Geneva, Universidade de Geneva: Centro de Botanique, 1982, p.324.

GENNIS, R. B. **Biomembranes: molecular structure and function**. New York: Springer-Verlag, 1989. 533 p.

GILTRAP, N. J.; LEWIS, D. H. Catabolite repression of the synthesis of pectin-degrading enzymes by *Suillus luteus* (L. ex Fr.) S. F.Gray and *Hebeloma oculatum* Bruchet. **New Phytologist**, v.90, p.485-93,1982.

GLATZEL, G. Haustorial resistance, foliar development and mineral nutrition in the hemiparasitic mistletoe *Loranthus europaeus* Jacq. (Loranthaceae), p. 253-262, 1987.

GLATZEL, G. Mineral nutrition and water relations of hemiparasitic mistletoes: a question of partitioning. Experiments with *Loranthus europaeus* on *Quercus petraea* and *Quercus robur*. **Oecologia**, v.56, p. 193-201, 1983.

GOLDSTEIN, G.; RADA, F.; STERNBERG, L.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Gas exchange and water balance of a mistletoe species and its mangrove hosts. **Oecologia**, 1989.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The Biochemistry and Physiology of Plant Disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986, 433 p. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia** vol I, Fonte: PASCHOLATI, S.F., cap.19, p.342- 364, 1995.

GOVIER, R. N.; NELSON, M. D.; PATE, J. S. Hemiparasitic nutrition in angiosperms. I. The transfer of organic compounds from host to *Odontites verna* (Bell.) Dum. (Scrophulariaceae). **New Phytology**, v. 66, p. 285-297, 1967.

GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Cellular coordination of molecular responses in plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, n. 5, p. 415-422, 1991.

HABERHAUSEN, G.; VALENTIN, K.; ZETSCHKE, K.; Organization and sequence of photosynthetic genes from the plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. **Molecular-and-General-Genetics**, v. 232, n. 1, p.154- 157, 1992.

HABERHAUSEN, G.; ZETSCHKE, K. Functional loss of all *ndh* genes in an otherwise relatively unaltered plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. **Plant-Molecular-Biology**, v. 24, n. 1, p. 217-222, 1994.

HAHN, M. G.; DARVILL, A G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology**, v. 68, p. 1161-1169, 1981.

HALL, P. J.; BADEBOCH-JONES, J.; PARKER, C. W.; LETHAM, D. S.; BARLOW, B. A. Identification and quantification of cytojinins in the xylem sap of mistletoes and their hosts in relation to leaf mimicry. **Australian Journal Plant Physiology**, v.14, p. 429-438,1987.

HAMILL, D. E.; BREWBAKER, J. L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. IV. The peroxidase isoenzymes of maize (*Zea mays*). **Physiological Plantarum**, Praga, v. 22, p. 945-958, 1969.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 62-71, 1982.

- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.
- HEITEFUS, R.; JEFFREE, C. E. **Plant Surfaces**. London, Edward Arnold, 1983, 93 p.
In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia** vol I, Fonte: PASCHOLATI, S.F., cap.19, p.342- 364, 1995.
- HERR, D. Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in submerged culture on different substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p. 1361-1371, 1979.
- HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R. E. (ed.) **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990, p. 87-113.
- HOLDEN, F. R.; WALTON, J. D. Xylanases from the fungal maize pathogen *Cochiobolus carbonum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 40, p.39-47, 1992.
- HUANG, J. Z.; LI, Y. H. Calcium and calmodulin functions in dodder haustorial initiation. **Chinese Journal of Botany**, v. 6, n.1, p.69-73, 1994.
- ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman & Hall., 1992. 418 p.
- JABBAR, A; AFZAL, J. Evaluation of solid substrates for the biosynthesis of cellulase by *Trichoderma viride*. **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 45, p. 1719-1720, 1981.

- JESCHKE, W. D.; BAUMEL, P.; RATH, N. Partitioning of nutrientes in the *Cuscuta reflexa* – *Lupinus albus* association. **Aspects of Applied Biology**, n. 42, p.71-79, 1995.
- JESCHKE, W. D.; BAUMEL, P.; RATH, N.; CZYGAN, F. C.; PROKSCH, P. Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. And its host *Lupinus albus* L. II Flows between host and parasite and within the parasitized host. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 801-812, 1994.
- JESCHKE, W.D.; HILPERT, A. Sink-stimulated photosynthesis and sink-dependent increase in nitrate uptake: nitrogen and carbon relations of the parasitic association *Cuscuta reflexa*-*Ricinus communis*. **Plant-Cell-and-Environment**, v. 20, n. 1, p. 47-56, 1997.
- JORGENSEN, H. S. Cuticle development and ultrastructure. **Planta**, v. 183, p. 511-519, 1991.
- JUNIPER & JEFFREE, 1983. Citados In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia** vol I, Fonte: PASCHOLATI, S. F., cap.19, p.342- 364, 1995.
- KEILICH, G.; BAILEY, P.J.; AFTING, E. G.; LIESE, W. Cellulase (β -1,4 glucan-4-glucan-4-glucan-hydrolase) from the wood-rooting fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. II. Characterization. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 185, p. 392-401, 1969.
- KERBY, K.; SOMERVILLE, S. C. Purification of na infection-related, extracellular peroxidase from barley. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 397-402, 1992.

- KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMAN, C.; WARD, E.; UKNESS, S.; RYALS, J.
Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 439-459, 1994.
- KLOTZ, M. G. The action of tentoxin on membrane processes in plants. **Physiology Plant**, v. 74, p. 575-582, 1988.
- KNUTSON, D. M. How parasitic seed plants induce disease in other plants. In.
HORSFALL, J., COWLING, G. B. (Eds). **Plant disease: an advanced treatise**,
New York: Academic, 1979. p.293-312.
- KOLLAR, A Characterization of specific induction, activity, and isozyme polymorfism
of extracellular cellulases from *Venturiaa inaequalis* detected in vitro and on the
host plant. **Molecular and Plant-Microbe Interactions**, v. 7, n.5, p. 603-611,
1994.
- KRAMER, P.; KOZLOWSKI, T. T. **Physiology of woody plants**. New York:
Academic, 1979.
- KUC, J. Individual immunity to plant disease. **Bio Science**, v. 32, p. 854-860, 1982
- KUIJT, J. **The Biology of parasitic flowering plants**. Berkeley: Univ. Calif. Press,
1969.
- KUO, J.; PATE, J. S.; DAVIDSON, N. J. Ultrastructure of haustorial interface and
apoplastic continuum between host and the root hemiparasite *Ola x phyllanthi*
(Labill.) R. Br. (Olacaceae). **Protoplasma**, v.150, p.27-39, 1989.

- LACHKE, A H. 1,4- β -D-Xylan Xylohydrolase of *Sclerotium rolfsii*. In : WOOD, W. A & KELLOGG, S. T. (Eds). **Methods in Enzymology. Cellulose and Hemicellulose**. San Diego: Academic Press, 1988. v. 160, p. 679-684.
- LAMONT, B. Mineral nutrition of mistletoes. In: CALDER, D. M., BERNHARDT, P.(Eds) **Biology of mistletoes**. New York: Academic, 1983, p. 185-204.
- LEITE, B.; RONCATO, L. D.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungo patogênicos. In : LUZ, C. W., FERNANDES, J. M. C., PRESTES, A M., PICININI, E. C. (Ed) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: **Revisão anual de patologia de plantas**, 1997. v. 5, p. 235-280.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p. 273-279, 1972.
- LOJKOWSKA, E.; HOLUBOWSKA, M. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. **Journal of Phytopathology**, v. 136, p. 319-328, 1992.
- LOPEZ, A M. Q. Fitoalexinas em sorgo - papel na interacao com fungos patogenicos. **Summa Phytopathologica**, v. 19, n. 1, p. 59-62, 1993.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e medicinais**, s. n. t. , p 115, 1949.
- LYNN, D. G.; STEFFENS, J. C.; KAMUT, V. S.; GRADEN, D. W.; SHABANOWITZ, J.; RIOPEL, J. L. Isolation and characterization of the first host recognition substances for parasitic angiosperms. **Journal American Chemical Socyete**, v.103, p.1868-1870,1981.

LYON. Dados obtidos da internet <http://www.scri.sari.ac.uk/bpp/celltext.htm>, 1998.

MADAMANCHI, N. R.; KUC, J. Induced systemic resistance in plants In: COLE, GT., HOCH, HC. (Ed) **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p. 347-362.

MAEHLI, A. C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. In: D. Glick, ed., **Methods of biochemical analysis**. New York: Wiley-Interscience, 1954. v. 1p. 357-424.

MAHMOOD, N.; PIACENTE, S.; BURKE, A.; KHAN, A.; PIZZA-C Constituents of *Cuscuta reflexa* are anti-HIV agents **.Antiviral-Chemistry-and-Chemotherapy**, v.8, n. 1, p. 70-74, 1997.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 528 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. DE. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: NAGY, 1989. 201p.

MALICKI, J.; BERBECIOWA, C. Content of basic macroelements in common parasitical weeds. **Acta - Agrobotanica**, v. 39, n.1, p. 123-128, 1986.

- MALLABURN, P. S.; STEWART, G. R. Haustorial function in *Striga*: comparative anatomy of *S. asiatica* (L.) Kuntz and *S. hermonthica* (Del.) Benth. (Scrophulariaceae). p. 523-536, 1987. In: STEWART, G. R. & PRESS, M. C. The Physiology and Biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 127-151, 1990.
- MANDELS, M. Microbial sources of cellulase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, p. 81-105, 1975.
- MANDELS, M.; PARRISH, F. W.; REESE, E. T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, p. 400-408, 1962.
- MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, v. 79, p. 816-826, 1960.
- MARTINS, E. M. F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1991. cap. 24, p. 345-363.
- MERCHANT, R.; MERCHANT, F.; MARGARITIS, A. Production of xylanase by the thermophilic fungus *Thielavia terrestris*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 7, p. 513-516, 1988.
- MISAGHI, I. J. Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions. Plenum Press, 1982. 286 p.
- MISHRA, S.; SANWAL, G. G. Changes in lipid composition of Brassica siliquae upon infection by *Cuscuta racemosa*. **Journal of Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 303-306, 1995.

- MISHRA, S.; SANWAL, G. G. Alterations in lipid composition of seed oil from *Brassica juncea* upon infection with *Cuscuta reflexa*. **Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 52-55, 1992.
- MISRA, P. C.; SAXENA, Y. R. Nitrogen metabolism in angiosperm parasites: total N and its forms. **Indian Journal of Experiments Botanical**, v. 9, n. 1, p. 72-74, 1971.
- MONTI, R.; JORGE, J. A. Xylanolytic enzymes production in *Humicola* sp. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 29, p. 42, 1986.
- MORAES, W. B. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1991. cap. 10, p. 157-179.
- MUSSELMAN, L. J. The biology of *Striga*, *Orobanch*e, and other root-parasitic weeds. **Annual Review Phytopathology**, v. 18, p. 463-489, 1980.
- NAGAR, R.; SANWAL, G. C. Biochemical aspects of parasitism in *C. reflexa*: Inhibition of cell wall degrading enzymes of *Cuscuta* by nonsusceptible plants. **Proceedings of the Third International Symposium on Parasitic Weeds**, p. 175-183, 1984.
- NAGAR, R.; SINGH, M.; SANWAL, G. G. Cell wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its hosts. **Journal-of-Experimental-Botany**, v.35, n.157, p. 1104-1112, 1984.
- NAGAR, R.; MADHAV, S., SANWALL, G. G.; SINGH, M. Presence of coniferyl lignin in *Cuscuta*. **Journal of the Indian Botanical Society**, v.62, n.3, p.301-304, 1983.

- NAIR, A. G. R.; THIRUPURASUNDARI, G. Coumarins and flavonoids from *Cuscuta reflexa* parasitic on *Bougainvillea spectabilis*. *Fitoterapia*, v. 63, n. 4, p.381-382, 1992.
- NANDAKUMAR, S.; KACHRU, D. N.; KRISHNAN, P. S. Threonin-serine dehydratase activity in angiospermous parasites. *New Phytology*, v. 18, p. 613-618, 1976.
- NANDAKUMAR, S. Sucrose metabolism in *Orobanche* and *Cuscuta racemosa*. *Indian-Journal-of-Plant-Physiology*, v. 32, n. 4, p.389-392, 1989.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal Biological Chemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NISA, M.; AKAVAR, S.; TARIQ, M. Anti-inflammatory activity of *Cuscuta chinensis*. *Fitoterapia*, v. 56, n. 5, p. 315-317, 1985.
- OHGUCHI, T.; ASADA, Y. Dehydrogenation polymerization products of p-hydroxycinnamyl alcohols by isoperoxidases obtained from downy mildew-infected roots of Japanese radish (*Raphanus sativus*). *Physiology Plant Pathology*, v. 5, p. 183-192, 1975.
- OKONKWO, S. N. C. **Developmental studies on witchweeds.** p. 63-74, 1987. In: STEWART, G. R. & PRESS, M. C. The Physiology and Biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, v. 41, p. 127-151, 1990.

- OLIVEIRA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.2, p. 195-197, 1997.
- OOMMACHAN, M.; SHRIVASTAVA, J. L.; MASHI, S. K. Observations on certain plants used in the treatment of jaundice. **Indian journal of applied and pure biology**, v. 5, n. 2, p. 99-102, 1990.
- PALIYATH, G. ; MAHADEVAN, S. Changes in the level of free amino acids in various regions of *Cuscuta* during growth. **Plant-and-Cell-Physiology**, v.29, n. 6, p. 945-950, 1988.
- PARKER, C. The physiology of *Striga* sp. : present state of Knowledge and priorities for future. p. 179-193,1984. In: STEWART,G.R. & PRESS, M.C. The Physiology and Biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 127-151, 1990.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1995. v. 1 .p. 415-453.
- PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A, KIMATI, H., AMORIN, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 343-364.
- PASCHOLATI, S. F.: LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência as doenças. In: LUZ, C. W., FERNANDES, J.M.C., PRESTES, A M., PICINI, E. C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo. 1994. v. 2, p. 1-51.

- PATE, C.; MUSSELMAN, L. J.; POLHILL, R. M.; WILSON, A. K. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PARASITIC, 3.** , Weeds, 1984. Proceedings. Alepo: ICARDA/IPSPRG, 1984.
- PATYKOWSKI, J.; URBANEK, H.; KACZOROWASKA, T. Peroxidase activity in leaves of wheat cultivars differing in resistance to *Erysiphe graminis* DC. **Journal of Phytopathology**, v.122, p.126-134,1988.
- POP, M., Osmotica in *Amyema miquelii* (Lehm. Ex Mig.) Tieghem and *Amyema pendulum* (Sieber ex Sprengel) Tieghem (Loranthaceae) on different hosts. v. 107, p. 621-30, 1987. In: STEWART, G. R. & PRESS, M.C. The Physiology and Biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 127-151, 1990.
- PRESS, M. C.; GRAVES, J. D.; STEWART, G. R. Transpiration and carbon acquisition in root hemiparasites. **Journal of Experimental Botany**, v. 39, p.1009-1014, 1988.
- PRESS, M. C.; SHAH, N.; STEWART, G. R. **The parasitic habit: trends in metabolic reductionism.** p. 96-107, 1986.
- PRESS, M. C.; TUOHLY, J. M.; STEWART, G. R. Gas exchange characteristics of the sorghum-Striga host-parasite association. **Plant Physiology**, v. 84, p. 814-819, 1987.
- RAJPUT, B. S.; BHARTI, S.; LALORAYA, M. M. Changes in alpha-amylase activity during haustorial development in *Cuscuta* ,**Indian-Journal-of-Experimental-Biology**, v. 29, n. 2, p.173-175, 1991.

- RAVEN, J. A. Phytophages of xylem and phloem : a comparison of animal and plant sap-feeders. **Advanced Ecology Research**, v.13, p.135-234, 1983.
- REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, p. 485-97, 1950.
- REIMERS, P. J.; LEACH, J. E. Race specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* conferred by blight resistance gene Xa-10 in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 38, p.39-55, 1991.
- REIMMANN, C. R.; RINGLI, C.; DUDLER, R. Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 1611-1612, 1992.
- REUVENI, R. ., SHIMONI, M., CRUTE, R. I. Na association between high peroxidase activity in lettuce (*Lactuca sativa*) and field resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*). **Journal of Phytopathology**, v. 132, p.312-318, 1991.
- REUVENI, R.; BOTHMA, G. C. The relationship between peroxidase activity and the resistance to *Sphaerotheca fuliginea* in melons. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 114, p.260-267, 1985.
- REUVENI, R.; FERREIRA, J. F. The relationship between peroxidase activity and the resistance of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) to *Verticillium dahliae*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 112, p. 193-197, 1985.

- RIDE, J. P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. **Physiology Plant Pathology**, v. 5, p. 125-134, 1978.
- ROTEM, Y.; SHOSEYOV, O.; SZTEJNBERG, A. The role of cellulase (endo 1,4- β -glucanase) in gummosis diseases in apricot. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 7-10, 1995.
- ROVERATTI, D. S. Proteção de plantas de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk, et Br. Por *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. Piracicaba, 1989. 94p. Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- RUBEN-GARCIA, M.; SILVIA-ERAZO, G.; PENA, R. C. Flavonoids and alkaloids from *Cuscuta* (Cuscutaceae). **Biochemical-Systematics-and-Ecology**, v. 23, n. 5, p. 571-572, 1995.
- RUDOLPH, K.; STAHMANN, M. A. Some investigations on the proteins of bean leaves infected by *Pseudomonas phaseolicola*. **Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz** v. 71, p. 107-112, 1964.
- RYAN, C. A Oligossaccharide signaling in plants. **Annual Review of Cell Biology**, v.3, p. 295-317, 1987.
- RYU, D. D. Y., MANDELS, M. Cellulases : Biosynthesis and applications. **Enzyme Microbial Technology**, v. 2, p. 91-102, 1980.
- SADHANA-SRIVASTAVA; ANAND-NIGHOJKAR; ANIL-KUMAR; SRIVASTAV, S.; NIGHOJKAR, A.; KUMAR, A. Purification and characterization of starch phosphorylase from *Cuscuta reflexa* filaments. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p.1001-1005, 1995.

- SAHM, A.; CZYGAN, F. C.; PROKSCH, P.; GEIBEL, M. (ED.); TREUTTER, D. (ED.), FEUCHT, W. Resistance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) to dodder (*Cuscuta reflexa*). International symposium on natural phenols in plant resistance, volume II, Weißenstephan, Germany, 13-17 September 1993. *Acta-Horticulturae*, n. 381(II), p. 650-653, 1994.
- SAHM, A.; PFANZ, H.; GRUNSFELDER, M.; CZYGAN, F. C.; PROKSCH, P. Anatomy and phenylpropanoid metabolism in the incompatible interaction of *Lycopersicon esculentum* and *Cuscuta reflexa*. *Botanica-Acta*, v. 108, n. 4, p. 358-364, 1995.
- SANCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiology, Lancaster*, 91: 1481-1487, 1989.
- SARIC, M.; KRSTIC, B.; MOMCILOVIC, V. The relationship of the concentration of mineral elements between host plant (*Pelargonium zonale*) and parasite (*Cuscuta reflexa* ROXB.). *Biochemie-und-Physiologie-der-Pflanzen*, v.187, n. 2, p.105-112, 1991.
- SARRUGE, J. R., HAAG, H. P. *Análises químicas em plantas*. Piracicaba: ESALQ/Depto Química, 1974.
- SAXENA, N.; BIDWARI, A.; SAXENA, N. K; RAM-PRASAD; BODKE, R. R. Antifertility effect of selected forest plants. *Journal-of-Tropical-Forestry*, v.4, n. 3, p. 281-284, 1988.
- SCHLENZKA, B. *Hibiscus rosa-sinensis/Cuscuta odorata*: An example for an incompatible host plant-parasite relation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. (Thesis-or-Dissertation), 1992, p. 78.

- SCHULZE, E. D.; EHLERINGER, J. R. The effect of nitrogen sup.ly on growth and water-use efficiency of xylem-tap.ing mistletoes. **Planta**, v. 162, p. 268-275, 1984.
- SETTY, P. N. Studies on parasitism simultaneously by *Orobanche* and *Cuscuta*: tissue protein na phosphorus, **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 9, n. 2, p. 244-247, 1971.
- SHANNON, L. M. Plant isoenzymes. **Annual Review Plant Physiology**, v. 19, p. 187-210, 1968.
- SHAUL, O.; ELAD, Y. Peroxidase and pathogenicity: related proteins in plant tissues infected by *Botrytis cinera*. In: **ASSOCIATION OF AP.LIED BIOLOGISTS. Aspects of ap.lied biology 42: physiological responses of plants to pathogens.** Dundee: Association of Ap.lied Biologists, 1995, p. 285-291.
- SHAW, M., The physiology of host-parasite relations of the rusts. **Annual Review Phytopathology**, v.1, p. 259-294, 1963.
- SHERWOOD, R. T.; VANCE, C. P. Histochemistry of papillae formed in reed canarygrass leaves in response to noninfecting pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 66, p. 503-510, 1976.
- SHIMONI, M.; BAR-ZUR, A.; REUVENI, R. The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 131, p. 315-321, 1991.
- SMITH, P. L.; STEWART, G. R. *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke: haustorial ontogeny and a role for ergastic substances in the maintainance of physiological integrity. p. 763-74, 1987.

- SMITH, S. Stomatal behaviour of *Striga hermonthica*. In: STEWART, G.R. & PRESS, M.C. The Physiology and Biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 127-151, 1990.
- SMITHES, O. **Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular Biology**, vol. I, edited by work, London, p. 143, 1955.
- SOLTIS, D. E.; HAUFLER, C. H.; DARROW, D. C.; GASTONY, G. L. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v.73, n. 1, p. 9-26, 1983.
- STAHMANN, M. A. The biochemistry of proteins of the host and parasite in some plant diseases. **Tagungsber. DAL Berlin** (in press), 1965, citado por: FARKAS, G. L., STAHMANN, M. A. On the nature of changes in Peroxidase Isoenzymes in Bean Leaves Infected by Southern Bean Mosaic Virus. **Phytopathology**, v.56, p667-669, 1966.
- STAPLES, R. C.; STAHMANN, M. A. Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. **Phytopathology**, v.54, p760-764, 1964.
- STEFFENS, J. C.; LYNN, D. G.; KAMAT, V.; RIOPEL, J. L. Molecular specificity of haustorial induction in *Agalinis purpurea* (L.) Raf. (Scrophulariaceae). **Annual of Botany**, v. 50, p. 1-7, 1982.
- STEWART, J. C.; LESTER, A.; MILBURN, B.; PARRY, J. B. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Biotechnology Letters**, v. 5, n.8, p.543-548, 1983.

- STEWART, G. R.; PRESS, M.C. The Physiology and Biochemistry of parasitic angiosperms. **Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 127-151, 1990.
- STINTIZI, A.; HEITZ, T. PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their rôle in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, p. 687-706, 1993.
- SZYKULA, J.; HEBDA, C.; KHAZRAJI, A.; ALSHAROOK, Z.; FISCHER, P. Constituents of the hexane fraction from *Cuscuta chinensis*. **Fitoterapia**, v. 65, v. 1, p. 86, 1994.
- TOMMASI, F.; GARA, L. DE; LISO, R.; ARRIGONI, O.; DE-GARA, L. The ascorbic acid system in *Cuscuta reflexa* Roxb **Journal-of-Plant-Physiology**, v.135, n. 6, p. 766-768, 1990
- TOULBART, P.; DESIDERIO, A.; SALVI, G.; CERVONE, F.; DARODA, L.; DE LORENZO, G.; BERGMANN, C.; DARVILL, A G.; ALBERSHEIN, P. **Plant Journal**, v. 2, p. 367-373, 1992.
- ULHOA, C. J.; FELIX, C. R.; CALDAS, R. A. β -glucosidase enzymes of the cellulolytic fungi *Picnoporus sanguineus*. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 29, p. 45, 1986.
- ULLMANN, I.; LANGE, O. L.; ZIEGLER, H.; EHRLINGER, J. R.; SCHULZE, E. D.; COWAN, I. R. Diurnal courses of leaf conductance and transpiration of mistletoes and their hosts in central Australia. **Oecologia**, v. 67, p. 577-587, 1985.

URITANI, I. Molecular pathology in the plant field with special regard to defense action of the host. **Tagungsber. DAL Berlin** (in press), 1965, citado por: FARKAS, G. L., STAHMANN, M. A. On the nature of changes in Peroxidase Isoenzymes in Bean Leaves Infected by Southern Bean Mosaic Virus. **Phytopathology**, v.56, p.667-669, 1966.

URITANI, I.; STAHMANN, M. A. Changes in nitrogen metabolism in sweet potato with black rot. **Plant Physiology**, v. 36, p. 770-782, 1961.

VANCE, C. P.; ANDERSON, J. D.; SHERWOOD, R. R. T. Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. **Plant Physiology**, v. 57, n. 6, p. 920-922, 1976a.

VANCE, C. P.; SHERWOOD, R. T. Cyclohexamide treatments implicate papilla formation in resistance of reed canarygrass to fungi. **Phytopathology**, v. 66, p. 498-502, 1976b.

VANCE, C. P.; SHERWOOD, R. T. Regulation of lignin formation in reed canarygrass in relation to disease resistance. **Plant Physiology**, v. 58, p. 915-919, 1976c.

VEECH, J. A. Localization of peroxidase in *Rhizoctonia solani*-infected cotton seedlings. **Phytopathology**, v.66, p. 1072-1076, 1976.

VELUTHAMBI, K.; MAHADEVAN, S.; MAHESHWARI, R. Trehalose toxicity in *Cuscuta reflexa*. Sucrose content decreases in shoot tips upon trehalose feeding. **Plant Physiology**, v. 69, n.6, p. 1247-1251, 1982.

- VERHOEFF, K.; LIEM, J. I.; SCHEFFER, R. J.; SURYA, I. Cellulolytic activity of *Botrytis cinerea* in vitro and in vivo. **Journal of Phytopathology**, v. 106, p. 97-103, 1983.
- VISSER, J. H.; DORR, I. The haustorium. p. 91-106, 1987.
- VISSER, J. H.; DORR, I.; KOLLMANN, R. The hyaline body of the root parasite *Alectra orobanchoides* Benth (Scrophulariaceae) - its anatomy, ultrastructure and Histochemistry. **Protoplasma**, v. 121, p. 146-156, 1984.
- WAGIH, E. E. Stress protein and isozymology of acid phosphatase, esterase, and peroxidase in *Phaseolus vulgaris* following peanut mottle virus infection. **Journal of Phytopathology**, v. 139, p.157-164, 1993.
- WALTON, J. D. Deconstructing The Cell Wall. **Plant Physiology**, v. 104, 1113-1118, 1994.
- WHITNEY, P. J. The carbohydrate and water balance of beans (*Vicia faba*) attacked by broomrape (*Orobanche crenata*). **Annual Applied Biology**, v. 70, p. 59-66, 1972.
- WICK, R. L.; SCHROEDER, D. B. *In vitro* production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium tricinctum*. **Mycologia**, v. 74, p. 460-466, 1982.
- WOLFE, A. D.; DEPAMPHILIS, C. W. Alternate paths of evolution for the photosynthetic gene *rbcL* in four nonphotosynthetic species of *Orobanche*. **Plant-Molecular-Biology**, v. 33, n. 6, p. 965-977, 1997.

- WOLSWINKEL, P. Complete inhibition of setting and growth of fruits of *Vicia Faba* L., resulting from the draining of the phloem by *Cuscuta* species. **Acta Bot. Nerrl.** v. 23, p. 48-60, 1974.
- WOLSWINKEL, P. Phloem unloading and turgor-sensitive transport: factors involved in sink control of assimilate partitioning. **Physiology Plant**, v. 65, p. 331-339, 1985.
- WOLSWINKEL, P. Phloem unloading in stem parts by *Cuscuta*: the release of ^{14}C and K to the free space at 0 $^{\circ}\text{C}$ and 25 $^{\circ}\text{C}$. **Physiology Plant**, v. 42, p.167-172, 1978.
- WOLSWINKEL, P.; AMMERLAAN, A.; PETERS, H. F. C. Phloem unloading of amino acids at the site of *Cuscuta europeae*. **Plant Physiol.**, 75:13-20 **Plant**, 1984.
- WOLSWINKEL, P., HALEVY, A. H. *Cuscuta*. **Handbook-of-flowering**, Halevy, A. H. (ed.) v. 6, p. 270-274, 1989.
- WOLTER, K. E.; HIGHLEY, T. L.; EVANS, F. J. A unique polysaccharide and glycoside-degrading enzyme from the wood decay fungus *Poria placenta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 97, p. 1499-1540, 1980.
- WOODWARD, J.; ARNOLD, S. L. The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C30 cellulase by derivative and isomers of glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p. 1553-1562, 1981.
- YE, X. S.; PAN, S. Q.; KUC, J. Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus. **Phytopathology**, v. 80, p. 1295-1299, 1990.

APÊNDICE

Tabela 2 Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Response: MALVA**2.3

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	7	2.12E6	302289	8.528	0.0000
TEMPO	3	2.04E6	680981	19.21	0.0000
TRAT*TEMPO	3	68960	22987	0.649	0.5916
TRAT	1	4121	4121	0.116	0.7361
Error	24	850679	35445		
Total	31	2.97E6			

R-square	0.7133	Root MSE	188.27	Adj R-square	0.6296	C.V.	19.799
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 3 Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: MA NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ. Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 35444.96 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 259.68 Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	1213.51	8	95
A	1182.46	8	108
B	777.00	8	55
B	630.67	8	180

Tabela 4 Análise de regressão, teste de curvilinearidade para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V.	F	Pr > F
TEMPO (Linear)	7.694	0.0098
TEMPO (Quadratic)	47.80	0.0000
TEMPO (Cubic)	0.538	0.4694

Tabela 5 Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	1.02E6	511928	31.03	0.0000
TEMPO	1	147648	147648	8.950	0.0056
TEMPO*TEMPO	1	876207	876207	53.12	0.0000
Error	29	478387	16496		
Total	31	1.5E6			

R-square	0.6816	Root MSE	128.44	Adj R-square	0.6596	C.V.	18.24
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 6 Parâmetros estimados para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimat	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	-285.1	169.2	-1.685	0.1027
TEMPO	1	20.92	3.117	6.710	0.0000
TEMPO**2	1	-0.093	0.0127	-7.288	0.0000

MALVA**2.2 = -285.1 20.92*TEMPO -0.093*TEMPO**2 .					
---	--	--	--	--	--

Tabela 7 Quadro de análise de variância para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	7	976E-8	139E-8	4.935	0.0014
TEMPO	3	804E-8	268E-8	9.486	0.0003
TRAT	1	101E-8	101E-8	3.577	0.0707
TRAT*TEMPO	3	709E-9	236E-9	0.837	0.4871
Error	24	678E-8	282E-9		
Total	31	165E-7			

R-square	0.5901	Root MSE	0.0005	Adj R-square	0.4705	C.V.	16.395
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 8 Teste de Tukey para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

General Linear Models Procedure		
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: PA		
NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.		
Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 2.825E-7		
Critical Value of Studentized Range= 3.901		
Minimum Significant Difference= 0.0007		
Means with the same letter are not significantly different.		
Tukey Grouping	Mean	N TEMPO
A	0.0039931	8 180
B A	0.0034005	8 55
B	0.0028094	8 108
B	0.0027641	8 95

Tabela 9 Teste de curvilinearidade para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Source	F	Pr > F
TEMPO (Linear)	7.769	0.0094
TEMPO (Quadratic)	12.34	0.0015
TEMPO (Cubic)	0.0952	0.7599

Tabela 10 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	801E-8	401E-8	13.63	0.0001
Error	29	852E-8	294E-9		
Total	31	165E-7			

R-square	0.4846	Root MSE	0.0005	Adj R-square	0.4490	C.V.	16.724
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 11 Parâmetros estimados para a porcentagem de MMS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.0054	0.0007	7.565	0.0000
TEMPO	1	-49E-6	132E-7	-3.735	0.0008
TEMPO**2	1	23E-8	54E-9	4.275	0.0002

The predicted model is $PE^{**2} = 0.0054 - 49E-6 * TEMPO + 23E-8 * TEMPO^{**2}$

Tabela 12 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	7	277.2	39.59	4.710	0.0019
TEMPO	3	218.8	72.94	8.678	0.0004
TRAT*TEMPO	3	52.31	17.44	2.075	0.1302
TRAT	1	6.009	6.009	0.715	0.4062
Error	24	201.7	8.405		
Total	31	478.9			

R-square 0.5787 Root MSE 2.8992 Adj R-square 0.4559 C.V. 30.198

Tabela 13 Teste de Tukey para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*

<p>Porcentagem de proteína em folhas liofilizadas-EX1 Analysis of Variance Procedure Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: POR NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ. Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 8.40543 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 3.9989 Means with the same letter are not significantly different.</p>			
Tukey Grouping		Mean	N TEMPO
A		13.219	8 55
B A		10.147	8 95
B C		9.145	8 108
C		5.892	8 180

Tabela 14 Quadro do modelo de regressão para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	213.0	213.0	24.03	0.0000
TEMPO	1	213.0	213.0	24.03	0.0000
Error	30	265.9	8.863		
Total	31	478.9			

R-square	0.4448	Root MSE	2.977	Adj R-square	0.4263	C.V.	31.008
----------	--------	----------	-------	--------------	--------	------	--------

Tabela 15 Quadro dos parâmetros estimados para a porcentagem de PTS em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	15.86	1.381	11.49	0.0000
TEMPO	1	-0.057	0.0117	-4.902	0.0000

Tabela 16 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	7	0.534	0.0763	58.15	0.0000
TRAT	1	0.224	0.224	171.0	0.0000
TEMPO	3	0.257	0.0857	65.27	0.0000
TRAT*TEMPO	3	0.0528	0.0176	13.42	0.0000
Error	24	0.0315	0.0013		
Total	31	0.566			

R-square	0.9443	Root MSE	0.0362	Adj R-square	0.9281	C.V.	9.043
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 17 Teste de Tukey para a a variável tempo na porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

General Linear Models Procedure						
Least Squares Means						
Adjustment for multiple comparisons: Tukey						
TRAT	POR	T / Pr > T H0:				
	LSMEAN	LSMEAN1=LSMEAN2				
c	0.31687500	-13.0771				
		0.0001				
t	0.48437500					

TEMPO	POR	T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T				
	LSMEAN	i/j	1	2	3	4
55	0.25000000	1	.	-9.38489	-12.7662	-11.1101
				0.0001	0.0001	0.0001
95	0.42000000	2	9.384892	.	-3.38132	-1.72516
			0.0001		0.0123	0.3332
108	0.48125000	3	12.76621	3.381321	.	1.656157
			0.0001	0.0123		0.3679
180	0.45125000	4	11.11006	1.725164	-1.65616	.
			0.0001	0.3332	0.3679	

Tabela 18 Teste de Tukey para a hipótese de nulidade para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

TEMPO TRAT		POR LSMEAN	
		LSMEAN Number	
55	c	0.21750000	1
55	t	0.28250000	2
95	c	0.34000000	3
95	t	0.50000000	4
108	c	0.33500000	5
108	t	0.62750000	6
180	c	0.37500000	7
180	t	0.52750000	8

T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T								
i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		-2.53734	-4.78191	-11.0277	-4.58673	-16.0048	-6.14817	-12.1012
		0.2276	0.0016	0.0001	0.0026	0.0001	0.0001	0.0001
2	2.53734		-2.24457	-8.49033	-2.04939	-13.4674	-3.61083	-9.56382
	0.2276		0.3621	0.0001	0.4724	0.0001	0.0258	0.0001
3	4.78191	2.24457		-6.24576	0.19518	-11.2229	-1.36626	-7.31925
	0.0016	0.3621		0.0001	1.0000	0.0001	0.8633	0.0001
4	11.02767	8.490331	6.24576		6.44094	-4.97709	4.8795	-1.07349
	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001	0.0010	0.0013	0.9564
5	4.58673	2.04939	-0.19518	-6.44094		-11.418	-1.56144	-7.51443
	0.0026	0.4724	1.0000	0.0001		0.0001	0.7673	0.0001
6	16.00476	13.46742	11.22285	4.97709	11.41803		9.856591	3.9036
	0.0001	0.0001	0.0001	0.0010	0.0001		0.0001	0.0131
7	6.14817	3.61083	1.36626	-4.8795	1.56144	-9.85659		-5.95299
	0.0001	0.0258	0.8633	0.0013	0.7673	0.0001		0.0001
8	12.10116	9.563821	7.319251	1.07349	7.514431	-3.9036	5.95299	
	0.0001	0.0001	0.0001	0.9564	0.0001	0.0131	0.0001	

Tabela 19 Teste de curviliniariedade para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	F	Pr > F
TEMPO (Linear)	17.67	0.0002
TEMPO (Quadratic)	15.40	0.0005
TEMPO (Cubic)	0.0019	0.9659

Tabela 20 Quadro da análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	0.384	0.192	17.12	0.0000
TEMPO	1	0.205	0.205	18.30	0.0002
TEMPO*TEMPO	1	0.179	0.179	15.95	0.0004
Error	29	0.325	0.0112		
Total	31	0.708			

R-square	0.5415	Root MSE	0.1058	Adj R-square	0.5099	C.V.	-25.07
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 21 Parâmetros estimados para o modelo de regressão na porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	-1.137	0.139	-8.158	0.0000
TEMPO	1	0.0119	0.0026	4.632	0.0001
TEMPO**2	1	-42E-6	105E-7	-3.994	0.0004

The predicted model is LOG10(POR) = -1.137 0.0119*TEMPO -42E-6*TEMPO**2 .					
---	--	--	--	--	--

Tabela 22 Quadro de análise de variância para açúcares redutores em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	7	3.289	0.470	4.769	0.0018
TEMPO	3	2.648	0.883	8.958	0.0004
TRAT*TEMPO	3	0.641	0.214	2.169	0.1180
TRAT	1	0.0002	0.0002	0.0016	0.9680
Error	24	2.365	0.0985		
Total	31	5.654			

R-square	0.5817	Root MSE	0.3139	Adj R-square	0.4598	C.V.	30.847
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 23 Teste de Tukey para açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: ACU NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ. Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.152459 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 0.5386 Means with the same letter are not significantly different.				
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO	
A	1.5600	8	180	
B A	1.2013	8	108	
B C	0.8200	8	95	
C	0.6225	8	55	

Tabela 24 Quadro de análise de variância para o estudo de regressão para a porcentagem de açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	3.816	3.816	22.66	0.0000
TEMPO	1	3.816	3.816	22.66	0.0000
Error	30	5.052	0.168		
Total	31	8.868			

R-square	0.4303	Root MSE	0.4104	Adj R-square	0.4113	C.V.	39.047
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 25 Quadro dos parâmetros estimados para análise de regressão dos açúcares redutores (AR) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.213	0.190	1.121	0.2711
TEMPO	1	0.0076	0.0016	4.760	0.0000

The predicted model is ACU = 0.213 0.0076*TEMPO .					
---	--	--	--	--	--

Tabela 26 Quadro de análise de variância para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	7	2.018	0.288	11.74	0.0000
TEMPO	3	1.853	0.618	25.15	0.0000
TRAT	1	0.103	0.103	4.194	0.0517
TRAT*TEMPO	3	0.062	0.0207	0.842	0.4843
Error	24	0.589	0.0246		
Total	31	2.608			

Tabela 27 Teste de Tukey para a porcentagem de açúcar redutor nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: PEC NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ. Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.024562 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 0.2162 Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	0.42620	8	180
B	0.19786	8	108
C	-0.13901	8	55
C	-0.14372	8	95

Tabela 28 Teste de curvilineridade para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Source	F	Pr > F
TEMPO (Linear)	67.47	0.0000
TEMPO (Quadratic)	0.569	0.4568
TEMPO (Cubic)	9.864	0.0040

Tabela 29 Quadro de análise de variância para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	2.963	2.963	52.66	0.0000
TEMPO	1	2.963	2.963	52.66	0.0000
Error	30	1.688	0.0563		
Total	31	4.650			

R-square	0.6371	Root MSE	0.2372	Adj R-square	0.6250	C.V.	20.383
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 30 Parâmetros estimados para a porcentagem de açúcar redutor (AR) nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.426	0.110	3.870	0.0005
TEMPO	1	0.0067	0.0009	7.257	0.0000

The predicted model is $\text{SQRT}(\text{RED}) = 0.426 + 0.0067 \cdot \text{TEMPO}$.					
--	--	--	--	--	--

Tabela 33 Quadro de análise de variância para a variável dependente conteúdo de Nitrogênio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	ValorF	Pr > F
Model	7	143.0	20.43	2.977	0.0214
TEMPO	3	121.7	40.56	5.909	0.0036
TRAT	1	9.724	9.724	1.417	0.2456
TRAT*TEMPO	3	11.61	3.869	0.564	0.6442
Error	24	164.7	6.863		
Total	31	307.7			

R-square	0.4647	Root MSE	2.6198	Adj R-square	0.3086	C.V.	15.529
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 34 Teste de TuKey. Médias transformadas para comparação do conteúdo de Nitrogênio observados em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: NITAlpha= 0.05 df= 24 MSE= 6.863267Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 3.6135				
Tukey Grouping		Mean	N TEMPO	
B	A	19.443	8	180
	A	18.025	8	55
	B	15.400	8	108
	B	14.613	8	95

Tabela 35 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Nitrogênio observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Pr > F
Model	2	117.4	58.68	8.940	0.0009
TEMPO	1	23.08	23.08	3.515	0.0709
TEMPO*TEMPO	1	94.28	94.28	14.36	0.0007
Error	29	190.4	6.564		
Total	31	307.7			

Tabela 36 Quadro de análise dos parâmetros estimados conteúdo de Nitrogênio observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	26.78	3.375	7.936	0.0000
TEMPO	1	-0.214	0.0622	-3.438	0.0018
TEMPO**2	1	0.001	0.0003	3.790	0.0007

Tabela 37 Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Fósforo observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	ValorF	Pr > F
Model	7	11.57	1.653	1.881	0.1176
TEMPO	3	8.170	2.723	3.097	0.0458
TRAT	1	0.708	0.708	0.805	0.3784
TRAT*TEMPO	3	2.696	0.899	1.022	0.4003
Error	24	21.10	0.879		
Total	31	32.68			

R-square	0.3542	Root MSE	0.9377	Adj R-square	0.1659	C.V.	20.942
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 38 Teste de Tukey. Médias transformadas para comparação do conteúdo de Fósforo observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus* em quatro diferentes níveis de tempo.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: FOS			
Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.009449			
Critical Value of Studentized Range= 3.901			
Minimum Significant Difference= 0.1341			
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	1.64076	8	108
A	1.56067	8	55
A	1.52007	8	180
A	1.51707	8	95

Tabela 39 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Fósforo observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
Model	2	1.880	0.940	0.885	0.4234
TEMPO	1	0.315	0.315	0.297	0.5902
TEMPO*TEMPO	1	1.565	1.565	1.474	0.2345
Error	29	30.80	1.062		
Total	31	32.68			

R-square	0.0575	Root MSE	1.0305	Adj R-square	-.0074	C.V.	23.015
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 40 Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	7	117.5	16.78	2.132	0.0790
TEMPO	3	86.82	28.94	3.676	0.0261
TRAT	1	8.820	8.820	1.120	0.3004
TRAT*TEMPO	3	21.83	7.276	0.924	0.4441
Error	24	188.9	7.873		
Total	31	306.4			

R-square	0.3834	Root MSE	2.8058	Adj R-square	0.2035	C.V.	15.564
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 41 Teste de Tukey. Médias transformadas para o conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*, em quatro diferentes níveis de tempo

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: POT Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 7.87265 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 3.8701 Means with the same letter are not significantly different.				
	Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
	A	20.274	8	55
	A	18.939	8	180
	A	16.450	8	108
	A	16.450	8	95

Tabela 42 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão para o conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	S Q	QM	Valor F	Pr > F
Model	2	85.75	42.88	5.635	0.0086
TEMPO	1	1.065	1.065	0.140	0.7111
TEMPO*TEMPO	1	84.69	84.69	11.13	0.0023
Error	29	220.7	7.609		
Total	31	306.4			

R-square	0.2799	Root MSE	2.7584	Adj R-square	0.2302	C.V.	15.301
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 43 Quadro de análise dos parâmetros estimados para o conteúdo de Potássio observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err	T	Pr > T
INTERCEPT	1	29.82	3.633	8.206	0.0000
TEMPO	1	-0.224	0.0669	-3.353	0.0022
TEMPO**2	1	0.0009	0.0003	3.336	0.0023

Tabela 44 Quadro de análise de variância para a variável dependente Cálcio - Medida do conteúdo de Cálcio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
Model	7	172.0	24.58	1.665	.1656
TEMPO*TRAT	3	92.77	30.92	2.095	0.1275
TEMPO	3	63.86	21.29	1.442	0.2553
TRAT	1	15.40	15.40	1.043	0.3173
Error	24	354.3	14.76		
Total	31	526.3			

R-square 0.3268 Root MSE 3.8422 Adj R-square 0.1305 C.V. 17.615

Tabela 45 Quadro de análise de variância para o estudo de regressão do conteúdo de Cálcio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	1	42.67	42.67	2.647	0.1142
TEMPO	1	42.67	42.67	2.647	0.1142
Error	30	483.7	16.12		
Total	31	526.3			

R-square 0.0811 Root MSE 4.0152 Adj R-square 0.0504 C.V. 18.408

Tabela 46 Quadro de análise de variância para a variável dependente Enxofre - Medida do conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
Model	7	0.0893	0.0128	5.480	0.0007
TEMPO	3	0.0731	0.0244	10.47	0.0001
TRAT*TEMPO	3	0.0148	0.0049	2.122	0.1239
TRAT	1	0.0014	0.0014	0.587	0.4512
Error	24	0.0559	0.0023		
Total	31	0.145			

R-square	0.6151	Root MSE	0.0482	Adj R-square	0.5029	C.V.	13.568
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 47 Teste de Tukey com medias transformadas para comparação de níveis de tempo conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: ENXOFRE Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.002328 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 0.0666			
Tukey Grouping	Mean	N TEMPO	
A	0.41252	8	180
A	0.39187	8	55
B	0.32012	8	108
B	0.29795	8	95

Tabela 48 Quadro de análise de variância para o estudo de regressão do conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
Model	2	0.0695	0.0347	13.31	0.0001
TEMPO	1	0.0084	0.0084	3.218	0.0833
TEMPO*TEMPO	1	0.0611	0.0611	23.40	0.0000
Error	29	0.0757	0.0026		
Total	31	0.145			

R-square	0.4786	Root MSE	0.0511	Adj R-square	0.4426	C.V.	14.366
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 49 Quadro de análise de parâmetros estimados para o conteúdo de Enxofre em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.621	0.0673	9.228	0.0000
TEMPO	1	-0.006	0.0012	-4.485	0.0001
TEMPO**2	1	245E-7	506E-8	4.837	0.0000

Tabela 50 Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	7	8.214	1.173	2.030	0.0928
TEMPO	3	6.884	2.295	3.969	0.0198
TRAT*TEMPO	3	1.270	0.423	0.732	0.5430
TRAT	1	0.0604	0.0604	0.104	0.7494
Error	24	13.87	0.57		
Total	31	22.09			

R-square	0.3719	Root MSE	0.7603	Adj R-square	0.1887	C.V.	11.988
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 51 Teste de Tukey. Médias transformadas para comparação do conteúdo de Magnésio observados em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: MG				
Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.578049				
Critical Value of Studentized Range= 3.901				
Minimum Significant Difference= 1.0487				
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO	
A	7.0525	8	108	
B A	6.3938	8	95	
B A	6.1388	8	55	
B	5.7838	8	180	

Tabela 52 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	2	5.411	2.705	4.705	0.0170
TEMPO	1	0.889	0.889	1.546	0.2238
TEMPO*TEMPO	1	4.522	4.522	7.864	0.0089
Error	29	16.68	0.575		
Total	31	22.09			

R-square	0.2450	Root MSE	0.7583	Adj R-square	0.1929	C.V.	11.957
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 53 Análise dos parâmetros estimados para o conteúdo de Magnésio em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	4.125	0.999	4.129	0.0003
TEMPO	1	0.0472	0.0184	2.567	0.0157
TEMPO**2	1	-21E-5	0.0001	-2.804	0.0089

Tabela 54 Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Manganês - Inverso da raiz de teor de manganês em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	7	0.0049	0.0007	1.589	0.1866
TEMPO	3	0.0035	0.0012	2.666	0.0706
TRAT*TEMPO	3	0.0013	0.0004	0.990	0.4142
TRAT	1	0.0001	0.0001	0.157	0.6952
Error	24	0.0106	0.0004		
Total	31	0.0156			

R-square	0.3167	Root MSE	0.0211	Adj R-square	0.1174	C.V.	17.066
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 55 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão do conteúdo de Manganês em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	2	0.0006	0.0003	1.892	0.1689
TEMPO	1	0.0004	0.0004	2.202	0.1487
TEMPO*TEMPO	1	0.0003	0.0003	1.583	0.2183
Error	29	0.0049	0.0002		
Total	31	0.0055			

R-square	0.1154	Root MSE	0.013	Adj R-square	0.0544	C.V.	24.111
----------	--------	----------	-------	--------------	--------	------	--------

Tabela 56 Quadro de análise de variância para a variável dependente do conteúdo de Cobre - Medidas do conteúdo de Cobre observados em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
Model	7	37.76	5.394	0.834	0.5702
TRAT	1	8.405	8.405	1.299	0.2656
TEMPO	3	22.78	7.594	1.174	0.3404
TRAT*TEMPO	3	6.568	2.189	0.338	0.7977
Error	24	155.3	6.470		
Total	31	193.0			

R-square	0.1956	Root MSE	2.5436	Adj R-square	-.0390	C.V.	21.81
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 57 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão do conteúdo de Cobre em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	1	2.352	2.352	0.370	0.5475
TEMPO	1	2.352	2.352	0.370	0.5475
Error	30	190.7	6.356		
Total	31	193.0			

R-square	0.0122	Root MSE	2.5211	Adj R-square	-.0207	C.V.	21.617
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 58 Quadro de análise de variância para o conteúdo de Zinco em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	ValorF	Pr > F
Model	7	357.2	51.03	4.168	0.0039
TEMPO	3	279.5	93.16	7.609	0.0010
TRAT	1	25.56	25.56	2.088	0.1614
TRAT*TEMPO	3	52.15	17.38	1.420	0.2614
Error	24	293.8	12.24		
Total	31	651.0			

R-square	0.5487	Root MSE	3.499	Adj R-square	0.4170	C.V.	17.079
----------	--------	----------	-------	--------------	--------	------	--------

Tabela 59 Teste de Tukey. Medias transformadas para comparação do conteúdo de Zinco observados em quatro diferentes níveis de tempo.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: ZI Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 12.24292 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 4.8262			
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	23.663	8	95
A	22.788	8	108
B A	19.263	8	55
B	16.238	8	180

Tabela 60 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão para o conteúdo de Zinco em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	S Q	QM	Valor F	Pr > F
Model	2	274.3	137.2	10.56	0.0004
TEMPO	1	78.23	78.23	6.022	0.0204
TEMPO*TEMPO	1	196.1	196.1	15.10	0.0005
Error	29	376.7	12.99		
Total	31	651.0			

Tabela 61 Análise dos parâmetros estimados para o conteúdo de Zinco em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	7.016	4.747	1.478	0.1503
TEMPO	1	0.301	0.0875	3.439	0.0018
TEMPO**2	1	-0.001	0.0004	-3.885	0.0005

Tabela 62 Quadro de análise de variância para a variável dependente conteúdo de Ferro - Log 10 (conteúdo de ferro) em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	ValorF	Pr > F
Model	7	0.458	0.0654	7.436	0.0001
TEMPO	3	0.421	0.140	15.95	0.0000
TRAT*TEMPO	3	0.0363	0.0121	1.378	0.2735
TRAT	1	0.0005	0.0005	0.0584	0.8110
Error	24	0.211	0.0088		
Total	31	0.669			

R-square	0.6844	Root MSE	0.0938	Adj R-square	0.5924	C.V.	4.521
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 63 Teste de Tukey. Medias transformadas para comparação do conteúdo de Ferro observados em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: FE Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 822.355 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 39.554 Means with the same letter are not significantly different.				
	Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
	A	173.33	8	95
	B A	138.88	8	108
	B C	102.16	8	55
	C	87.21	8	180

Tabela 64 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão conteúdo de Ferro em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
Model	2	0.0044	0.0022	20.98	0.0000
TEMPO	1	0.001	0.001	9.418	0.0046
TEMPO*TEMPO	1	0.0034	0.0034	32.53	0.0000
Error	29	0.0031	0.0001		
Total	31	0.0075			

R-square	0.5913	Root MSE	0.0103	Adj R-square	0.5631	C.V.	11.015
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 65 Quadro de análise dos parâmetros estimados para o conteúdo de Ferro em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.152	0.0135	11.23	0.0000
TEMPO	1	-0.001	0.0002	-5.134	0.0000
TEMPO**2	1	58E-7	102E-8	5.704	0.0000

Tabela 66 Quadro de análise de variância para a variável dependente conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	ValorF	Pr > F
Model	7	0.0003	42E-6	4.089	0.0044
TEMPO	3	0.0003	0.0001	8.717	0.0004
TRAT	1	844E-8	844E-8	0.823	0.3735
TRAT*TEMPO	3	169E-7	564E-8	0.550	0.6533
Error	24	0.0002	103E-7		
Total	31	0.0005			

R-square	0.5439	Root MSE	0.0032	Adj R-square	0.4109	C.V.	20.1
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	------

Tabela 67 Teste de Tukey para o conteúdo de Boro observado em quatro diferentes níveis de tempo em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: BOCA=1/boro NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ. Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.00001 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 0.0044 Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	0.020920	8	55
B	0.014753	8	180
B	0.014334	8	95
B	0.013757	8	108

Tabela 68 Quadro de análise de variância para testar o modelo de regressão conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor F	Pr > F
Model	2	0.189	0.0946	11.35	0.0002
TEMPO	1	0.0603	0.0603	7.237	0.0117
TEMPO*TEMPO	1	0.129	0.129	15.46	0.0005
Error	29	0.242	0.0083		
Total	31	0.431			

R-square	0.4390	Root MSE	0.0913	Adj R-square	0.4003	C.V.	5.0368
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 69 Quadro dos parâmetros estimados conteúdo de Boro em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	1.265	0.120	10.52	0.0000
TEMPO	1	0.0096	0.0022	4.314	0.0002
TEMPO**2	1	-36E-6	905E-8	-3.931	0.0005

Tabela 70 Quadro da análise de variância para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	7	2.464	0.352	6.960	0.0001
TEMPO	3	1.876	0.625	12.37	0.0000
TRAT*TEMPO	3	0.586	0.195	3.861	0.0219
TRAT	1	0.0015	0.0015	0.03	0.8639
Error	24	1.214	0.0506		
Total	31	3.678			

R-square	0.6700	Root MSE	0.2249	Adj R-square	0.5737	C.V.	35.978
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 71 Teste de Tukey para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: ES NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ. Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 0.050573 Critical Value of Studentized Range= 3.901 Minimum Significant Difference= 0.3102 Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	1.0192	8	180
B	0.5817	8	55
B	0.5385	8	95
B	0.3608	8	108

Tabela 72 Teste de Tukey para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus* para a interação “tempo*trat”. Destaca-se em **negrito** que ocorre significância.

TEMPO	TRAT	ES	LSMEAN	LSMEAN Number
55	c		0.50899175	1
55	t		0.65446188	2
95	c		0.77963701	3
95	t		0.29738379	4
108	c		0.29625764	5
108	t		0.42535086	6
180	c		0.94291205	7
180	t		1.09550195	8

T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T									
	i/j	1	2	3	4	5	6	7	
8									
3.68835	1	.	-0.91481	-1.70199	1.330726	1.337808	0.525987	-2.72877	-
0.0216			0.9816	0.6860	0.8793	0.8752	0.9994	0.1619	
2.77354	2	0.914809	.	-0.78718	2.245536	2.252618	1.440797	-1.81396	-
0.1490		0.9816		0.9923	0.3616	0.3579	0.8295	0.6173	
1.98636	3	1.701991	0.787181	.	3.032717	3.039799	2.227978	-1.02678	-
0.5104		0.6860	0.9923		0.0898	0.0885	0.3709	0.9654	
5.01908	4	-1.33073	-2.24554	-3.03272	.	0.007082	-0.80474	-4.0595	-
0.0009		0.8793	0.3616	0.0898		1.0000	0.9912	0.0091	
5.02616	5	-1.33781	-2.25262	-3.0398	-0.00708	.	-0.81182	-4.06658	-
0.0009		0.8752	0.3579	0.0885	1.0000		0.9907	0.0090	
4.21434	6	-0.52599	-1.4408	-2.22798	0.804739	0.811821	.	-3.25476	-
0.0063		0.9994	0.8295	0.3709	0.9912	0.9907		0.0565	
0.95958	7	2.728769	1.813959	1.026778	4.059495	4.066577	3.254756	.	-
0.9760		0.1619	0.6173	0.9654	0.0091	0.0090	0.0565		
	8	3.688352	2.773542	1.986361	5.019078	5.02616	4.214339	0.959583	.
		0.0216	0.1490	0.5104	0.0009	0.0009	0.0063	0.9760	

Tabela 73 Teste de Curvilinearidade para a atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus* para a interação “tempo*trat”. Destaca-se em **negrito** que ocorre significância.

Source	F	Pr > F
TEMPO (Linear)	17.27	0.0003
TEMPO (Quadratic)	10.13	0.0036
TEMPO (Cubic)	2.291	0.1414

Tabela 74 Quadro de variância para o modelo de regressão da atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

C.V	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	1.736	0.868	12.97	0.0001
TEMPO	1	0.992	0.992	14.82	0.0006
TEMPO*TEMPO	1	0.744	0.744	11.11	0.0024
Error	29	1.941	0.0669		
Total	31	3.678			

R-square	0.4721	Root MSE	0.2587	Adj R-square	0.4357	C.V.	41.394
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 75 Parâmetros estimados para o modelo de regressão da atividade específica de peroxidase em folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	1.261	0.341	3.701	0.0009
TEMPO	1	-0.017	0.0063	-2.669	0.0123
TEMPO**2	1	0.0001	256E-7	3.333	0.0024

The predicted model is $\text{SQRT}(\text{ESP}) = 1.261 - 0.017 \cdot \text{TEMPO} + 0.0001 \cdot \text{TEMPO}^2$.

Tabela 77 Quadro de análise de variância para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	7	0.873	0.125	16.88	0.0000
TEMPO	3	0.330	0.110	14.92	0.0000
TRAT	1	0.0504	0.0504	6.822	0.0153
TRAT*TEMPO	3	0.492	0.164	22.20	0.0000
Resíduo	24	0.177	0.0074		
Total	31	1.050			

R-square	0.8312	Root MSE	0.0859	Adj R-square	0.7819	C.V.	6.0321
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 78 Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tratamento” para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

TRAT	EXO3	T / Pr > T H0:
		LSMEAN LSMEAN1=LSMEAN2
c	29.5668750	0.796386
		0.4336
t	27.8687500	

Tabela 79 Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tempo” para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

TEMPO	EXO3	T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T
	LSMEAN	i/j 1 2 3 4
55	36.8375000	1 . 1.815612 4.809715 4.145234
		. 0.2908 0.0004 0.0019
95	31.3625000	2 -1.81561 . 2.994102 2.329621
		. 0.2908 0.0299 0.1193
108	22.3337500	3 -4.80971 -2.9941 . -0.66448
		. 0.0004 0.0299 0.9094
180	24.3375000	4 -4.14523 -2.32962 0.664481 .
		. 0.0019 0.1193 0.9094

Tabela 80 Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tempo” versus “tratamento” para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

TRAT	TEMPO	EXO3	LSMEAN					
			LSMEAN	Number				
c	55		27.9750000	1				
c	95		29.9000000	2				
c	108		33.1425000	3				
c	180		27.2500000	4				
t	55		45.7000000	5				
t	95		32.8250000	6				
t	108		11.5250000	7				
t	180		21.4250000	8				

T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T								
i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1 .	-0.45139	-1.21173	0.170005	-4.15633	-1.13728	3.857358	1.535908	
	0.9998	0.9205	1.0000	0.0072	0.9416	0.0146	0.7812	
2 0.451393	.	-0.76033	0.621398	-3.70494	-0.68588	4.308751	1.987301	
	0.9998	0.9937	0.9982	0.0208	0.9966	0.0050	0.5099	
3 1.211726	0.760333	.	1.381731	-2.94461	0.074451	5.069084	2.747635	
	0.9205	0.9937	0.8566	0.1071	1.0000	0.0008	0.1563	
4 -0.17001	-0.6214	-1.38173	.	-4.32634	-1.30728	3.687353	1.365903	
	1.0000	0.9982	0.8566	0.0048	0.8873	0.0217	0.8635	
5 4.156332	3.704939	2.944606	4.326337	.	3.019057	8.01369	5.692241	
	0.0072	0.0208	0.1071	0.0048	0.0923	0.0001	0.0002	
6 1.137276	0.685883	-0.07445	1.307281	-3.01906	.	4.994634	2.673184	
	0.9416	0.9966	1.0000	0.8873	0.0923	0.0009	0.1792	
7 -3.85736	-4.30875	-5.06908	-3.68735	-8.01369	4.99463	.	-2.32145	
	0.0146	0.0050	0.0008	0.0217	0.0001	0.0009	0.3228	
8 -1.53591	-1.9873	-2.74763	-1.3659	-5.69224	-2.67318	2.321449		
	0.7812	0.5099	0.1563	0.8635	0.0002	0.1792	0.3228	

Tabela 81 Análise de variância para o estudo de regressão para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Modelo	1	597.1	597.1	5.998	0.0204
TEMPO	1	597.1	597.1	5.998	0.0204
Resíduo	30	2987	99.56		
Total	31	3584			

Tabela 82 Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a atividade da exo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	GL	Estimate	Desvio Padrão	T	Pr > T
INTERCEPT	1	39.20	4.627	8.470	0.0000
TEMPO	1	-0.096	0.0391	-2.449	0.0204

Tabela 83 Quadro de análise de variância para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	7	14630	2090	170.2	0.0000
TEMPO	3	10945	3648	297.1	0.0000
TRAT	1	3088	3088	251.5	0.0000
TRAT*TEMPO	3	596.9	199.0	16.20	0.0000
Error	24	294.7	12.28		
Total	31	14925			

R-square	0.9803	Root MSE	3.5041	Adj R-square	0.9745	C.V.	10.561
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 84 Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tempo” para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

TEMPO	ENDO3	T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T					
		LSMEAN	i/j	1	2	3	4
	55	57.4950000	1	.	8.11631	20.02394	27.37328
					0.0001	0.0001	0.0001
	95	43.2750000	2	-8.11631	.	11.90763	19.25697
				0.0001		0.0001	0.0001
	108	22.4125000	3	-20.0239	-11.9076	.	7.349342
				0.0001	0.0001		0.0001
	180	9.5362500	4	-27.3733	-19.257	-7.34934	.
				0.0001	0.0001	0.0001	

Tabela 85 Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tratamento” para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

TRAT	ENDO3	T / Pr > T H0:
	LSMEAN	LSMEAN1=LSMEAN2
c	43.0037500	15.85971 0.0001
t	23.3556250	

Tabela 86 Teste de Tukey/LSMEANS – Relacionamento entre as variáveis “tratamento” versus “tratamento” para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

TRAT	TE9MPO	ENDO3	LSMEAN	LSMEAN	Number
		c	55	72.6900000	1
		c	95	55.4000000	2
		c	108	30.7500000	3
		c	180	13.1750000	4
		t	55	42.3000000	5
		t	95	31.1500000	6
		t	108	14.0750000	7
		t	180	5.8975000	8

T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T								
i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1	.	6.97813	16.92671	24.01986	12.2652	16.76527	23.65663	26.95701
		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
2	-6.97813	.	9.948577	17.04173	5.287074	9.78714	16.6785	19.97888
	0.0001		0.0001	0.0001	0.0005	0.0001	0.0001	0.0001
3	-16.9267	-9.94858	.	7.093154	-4.6615	-0.16144	6.72992	10.0303
	0.0001	0.0001		0.0001	0.0021	1.0000	0.0001	0.0001
4	-24.0199	-17.0417	-7.09315	.	11.7547	-7.25459	-0.36323	2.937151
	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001	0.9999	0.1087
5	-12.2652	-5.28707	4.661504	11.75466	.	4.500066	11.39142	14.69181
	0.0001	0.0005	0.0021	0.0001		0.0032	0.0001	0.0001
6	-16.7653	-9.78714	0.161437	7.254591	-4.50007	.	6.891357	10.19174
	0.0001	0.0001	1.0000	0.0001	0.0032		0.0001	0.0001
7	-23.6566	-16.6785	-6.72992	0.363234	-11.3914	-6.89136	.	3.300385
	0.0001	0.0001	0.0001	0.9999	0.0001	0.0001		0.0513
8	-26.957	-19.9789	-10.0303	-2.93715	-14.6918	-10.1917	-3.30039	.
	0.0001	0.0001	0.0001	0.1087	0.0001	0.0001	0.0513	

Tabela 87 Quadro de análise de variância para o estudo de regressão para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	87.97	87.97	72.50	0.0000
TEMPO	1	87.97	87.97	72.50	0.0000
Error	30	36.40	1.213		
Total	31	124.4			

R-square	0.7073	Root MSE	1.1016	Adj R-square	0.6976	C.V.	20.353
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 88 Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a atividade da endo β -1,4 glucanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	9.434	0.511	18.47	0.0000
TEMPO	1	-0.037	0.0043	-8.515	0.0000

Tabela 89 Quadro de análise de variância para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	7	0.557	0.0796	23.04	0.0000
TRAT	1	0.286	0.286	82.92	0.0000
TEMPO	3	0.250	0.0835	24.17	0.0000
TRAT*TEMPO	3	0.0202	0.0067	1.945	0.1493
Error	24	0.0829	0.0035		
Total	31	0.640			

R-square	0.8705	Root MSE	0.0588	Adj R-square	0.8327	C.V.	5.4068
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 90 Teste de Tukey – Relacionamento entre as variáveis “tempo” para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: XILANASE				
Alpha= 0.05 df= 24 MSE= 3.638295				
Critical Value of Studentized Range= 3.901				
Minimum Significant Difference= 2.6309				
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO	
A	17.7638	8	55	
B	12.0963	8	95	
B	11.0400	8	108	
B	10.6588	8	180	

Tabela 91 Análise de variância para o estudo de regressão para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	262.2	131.1	11.39	0.0002
TEMPO	1	163.9	163.9	14.24	0.0007
TEMPO*TEMPO	1	98.39	98.39	8.550	0.0066
Error	29	333.7	11.51		
Total	31	596.0			

R-square	0.4400	Root MSE	3.3923	Adj R-square	0.4014	C.V.	26.318
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 92 Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a atividade da xilanase nos pecíolos das folhas liofilizadas de *Malvaviscus*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	30.61	4.468	6.850	0.0000
TEMPO	1	-0.288	0.0823	-3.494	0.0015
TEMPO**2	1	0.001	0.0003	2.924	0.0066

Tabela 93 Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	35.04	35.04	26.28	0.0069
Error	4	5.333	1.333		
Total	5	40.38			
TEMPO	1	35.04	35.04	26.28	0.0069

R-square	0.8679	Root MSE	1.1547	Adj R-square	0.8349	C.V.	5.4339
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 94 Parâmetros estimados para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	18.83	0.667	28.25	0.0000
TEMPO	1	0.110	0.0214	5.127	0.0069

MM = 18.83 0.110*TEMPO .					
--------------------------	--	--	--	--	--

Tabela 95 Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Response: MM

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	108.6	54.30	2.263	0.1852
Error	6	144.0	24.00		
Total	8	252.6			

R-square	0.4300	Root MSE	4.8986	Adj R-square	0.2400	C.V.	31.113
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 96 Parâmetros estimados para a análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	21.48	2.929	7.333	0.0002
TEMPO	1	-0.212	0.0929	-2.288	0.0560

MM = 21.48 -0.212*TEMPO .					
---------------------------	--	--	--	--	--

Tabela 97 Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	5	81.96	16.39	14.70	0.0001
Error	12	13.38	1.115		
Total	17	95.33			
TRAT	1	55.51	55.51	49.80	0.0000
TRAT*TEMPO	2	15.48	7.738	6.942	0.0099
TEMPO	2	10.97	5.485	4.920	0.0275

R-square	0.8597	Root MSE	1.0558	Adj R-square	0.8012	C.V.	.6996
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 98 Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

General Linear Models Procedure					
Least Squares Means Adjustment for multiple comparisons: Tukey					

TRAT	MM	T / Pr > T	H0:		
		LSMEAN	LSMEAN1=LSMEAN2		
c	24.222222	7.05663	0.0001		
t	20.710000				

TEMPO	MM	T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T			
	LSMEAN	i/j	5	32	44
5	23.4816667	1	.	1.883813	3.114169
				0.1856	0.0226
32	22.3333333	2	-1.88381	.	1.230357
			0.1856	0.4588	
44	21.5833333	3	-3.11417	-1.23036	.
				0.0226	0.4588

Tabela 99 Teste de Tukey/LSMEAN para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

TRAT TEMPO		MM LSMEAN	
		LSMEAN	Number
c	5	24.0000000	1
c	32	24.3333333	2
c	44	24.3333333	3
t	5	22.9633333	4
t	32	20.3333333	5
t	44	18.8333333	6

T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T						
i/j	1	2	3	4	5	6
1	.	-0.38666	-0.38666	1.202524	4.253301	5.993288
		0.9986	0.9986	0.8277	0.0111	0.0007
2	0.386664	.	0	1.589188	4.639965	6.379952
	0.9986		1.0000	0.6197	0.0058	0.0004
3	0.386664	0	.	1.589188	4.639965	6.379952
	0.9986	1.0000		0.6197	0.0058	0.0004
4	-1.20252	-1.58919	-1.58919	.	3.050777	4.790764
	0.8277	0.6197	0.6197		0.0833	0.0045
5	-4.2533	-4.63997	-4.63997	-3.05078	.	1.739987
	0.0111	0.0058	0.0058	0.0833		0.5335
6	-5.99329	-6.37995	-6.37995	-4.79076	-1.73999	.
	0.0007	0.0004	0.0004	0.0045	0.5335	

Tabela 100 Análise de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

Response: MM**1.9

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	8996	8996	1.771	0.2019
Error	16	81266	5079		
Total	17	90262			
TEMPO	1	8996	8996	1.771	0.2019

R-square	0.0997	Root MSE	71.268	Adj R-square	0.0434	C.V.	19.103
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 101 Parâmetros estimados para a análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	410.1	32.49	12.62	0.0000
TEMPO	1	-1.371	1.030	-1.331	0.2019

$$MM^{**1.9} = 410.1 - 1.371 * TEMPO .$$

Tabela 102 Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento x Testemunha.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	54.06	27.03	11.58	0.0087
Error	6	14.00	2.333		
Total	8	68.06			
TRAT	2	54.06	27.03	11.58	0.0087

R-square	0.7943	Root MSE	1.5275	Adj R-square	0.7257	C.V.	6.8567
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 103 Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento x Testemunha.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: MM Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 2.333333 Critical Value of Studentized Range= 4.339 Minimum Significant Difference= 3.8267 Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	24.333	3	c
A	23.667	3	k
B	18.833	3	t

Tabela104 Quadro de Análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.505	0.505	0.266	0.6332
Error	4	7.586	1.897		
Total	5	8.091			
TEMPO	1	0.505	0.505	0.266	0.6332

R-square	0.0624	Root MSE	1.3771	Adj R-square	-.1720	C.V.	8.4109
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 105 Análise de variância para o estudo de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.505	0.505	0.266	0.6332
Error	4	7.586	1.897		
Total	5	8.091			
TEMPO	1	0.505	0.505	0.266	0.6332

R-square	0.0624	Root MSE	1.3771	Adj R-square	-.1720	C.V.	8.4109
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 106 Análise dos parâmetros estimados para o modelo de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	16.66	0.795	20.96	0.0000
TEMPO	1	-0.013	0.0256	-0.516	0.6332

MM = 16.66 -0.013*TEMPO .					
---------------------------	--	--	--	--	--

Tabela 107 Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	108.6	54.30	2.263	0.1852
Error	6	144.0	24.00		
Total	8	252.6			
TEMPO	2	108.6	54.30	2.263	0.1852

R-square	0.4300	Root MSE	4.8986	Adj R-square	0.2400	C.V.	31.113
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 108 Quadro de análise de regressão para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	108.1	108.1	5.233	0.0560
Error	7	144.5	20.65		
Total	8	252.6			
TEMPO	1	108.1	108.1	5.233	0.0560

R-square	0.4278	Root MSE	4.5439	Adj R-square	0.3460	C.V.	28.86
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 109 Parâmetros estimados para a análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	21.48	2.929	7.333	0.0002
TEMPO	1	-0.212	0.0929	-2.288	0.0560

MM = 21.48 -0.212*TEMPO .					
---------------------------	--	--	--	--	--

Tabela 110 Quadro de análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	5	313.8	62.77	32.47	0.0000
Error	12	23.20	1.933		
Total	17	337.0			
TEMPO	2	165.2	82.62	42.73	0.0000
TRAT	1	90.50	90.50	46.81	0.0000
TRAT*TEMPO	2	58.10	29.05	15.03	0.0005

R-square	0.9312	Root MSE	1.3905	Adj R-square	0.9025	C.V.	9.7099
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 111 Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

General Linear Models Procedure Least Squares Means Adjustment for multiple comparisons: Tukey						
TRAT	MM	T / Pr > T H0:				
		LSMEAN	LSMEAN1=LSMEAN2			
c	16.5622222	6.841602				
			0.0001			
t	12.0777778					
TEMPO						
	MM	T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T				
		LSMEAN	i/j			
	5	15.3666667	1	5	32	44
					6.438045	-2.52664
					0.0001	0.0640
	32	10.1983333	2	-6.43805		-8.96468
				0.0001		0.0001
	44	17.3950000	3	2.526637	8.964682	
				0.0640	0.0001	

Tabela 112 Teste de Tukey/LSMEAN para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

TRAT		TEMPO	MM	LSMEAN		
				LSMEAN	Number	
c		5		15.4533333	1	
c		32		14.6833333	2	
c		44		19.5500000	3	
t		5		15.2800000	4	
t		32		5.7133333	5	
t		44		15.2400000	6	

T for H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j) / Pr > T						
i/j	1	2	3	4	5	6
1	.	0.678234	-3.60844	0.152676	8.579213	0.187909
		0.9811	0.0327	1.0000	0.0001	1.0000
2	-0.67823	.	-4.28667	-0.52556	7.90098	-0.49032
	0.9811		0.0105	0.9940	0.0001	0.9956
3	3.608437	4.286671	.	3.761113	12.18765	3.796346
	0.0327	0.0105		0.0254	0.0001	0.0239
4	-0.15268	0.525558	-3.76111	.	8.426538	0.035233
	1.0000	0.9940	0.0254		0.0001	1.0000
5	-8.57921	-7.90098	-12.1877	-8.42654	.	-8.3913
	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001
6	-0.18791	0.490325	-3.79635	-0.03523	8.391305	.
	1.0000	0.9956	0.0239	1.0000	0.0001	

Tabela 113 Quadro da análise de variância para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento x Testemunha.

C.V.	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	31.31	15.65	9.197	0.0149
Error	6	10.21	1.702		
Total	8	41.52			
TRAT	2	31.31	15.65	9.197	0.0149

R-square	0.7540	Root MSE	1.3046	Adj R-square	0.6721	C.V.	7.693
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 114 Teste de Tukey para a porcentagem de massa de matéria seca (MMS) em pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento x Testemunha.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: MM Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 1.701878 Critical Value of Studentized Range= 4.339 Minimum Significant Difference= 3.2681 Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	19.550	3	c
B	16.083	3	k
B	15.240	3	t

Tabela 115 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS em folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha x tempo.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	0.0012	0.0012	0.553	0.4985
TEMPO	1	0.0012	0.0012	0.553	0.4985
Error	4	0.0085	0.0021		
Total	5	0.0097			

R-square 0.1214 oot MSE 0.0461 Adj R-square -.0982 C.V. 87.575

Tabela 116 Parâmetros estimados para a porcentagem de PTS em folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha x tempo.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.0667	0.0266	2.504	0.0665
TEMPO	1	-64E-5	0.0009	-0.744	0.4985

OBE = 0.0667 -64E-5*TEMPO .

Tabela 117 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	1.383	1.383	7.350	0.0302
Error	7	1.318	0.188		
Total	8	2.701			
TEMPO	1	1.383	1.383	7.350	0.0302

R-square	0.5122	Root MSE	0.4338	Adj R-square	0.4425	C.V.	44.984
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 118 Quadro de análise de variância nos filamentos da planta parasita *Cuscuta* ao longo do tempo na porcentagem de PTS.

C.v.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	1.628	0.814	4.552	0.0627
TEMPO	2	1.628	0.814	4.552	0.0627
Error	6	1.073	0.179		
Total	8	2.701			

R-square	0.6027	Root MSE	0.4229	Adj R-square	0.4703	C.V.	43.848
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 119 Parâmetros estimados nos filamentos da planta parasita *Cuscuta* ao longo do tempo na porcentagem de PTS.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	1.614	0.280	5.769	0.0007
TEMPO	1	-0.024	0.0089	-2.711	0.0302

OBE = 1.614 -0.024*TEMPO .

Tabela 120 Quadro de análise de variância para porcentagem de PTS em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	5	0.709	0.142	1.350	0.3090
TEMPO2	0.429	0.214	2.041	0.1726	
TRAT*TEMPO	2	0.238	0.119	1.132	0.3547
TRAT	1	0.0425	0.0425	0.405	0.5364
Error	12	1.260	0.105		
Total	17	1.969			

R-square 0.3600 Root MSE 0.324 Adj R-square 0.0934 C.V. -21.4

Tabela 121 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão para porcentagem de PTS em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	0.0143	0.0143	3.671	0.0734
TEMPO	1	0.0143	0.0143	3.671	0.0734
Error	16	0.0623	0.0039		
Total	17	0.0766			

R-square 0.1866 Root MSE 0.0624 Adj R-square 0.1358 C.V. 33.318

Tabela 122 Parâmetros estimados para o modelo de regressão para porcentagem de PTS em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.234	0.0284	8.224	0.0000
TEMPO	1	-0.002	0.0009	-1.916	0.0734

SQRT(OBE) = 0.234 -0.002*TEMPO .

Tabela 123 Parâmetros estimados para o modelo de regressão para porcentagem de PTS em folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento x Testemunha.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	5.973	2.987	0.197	0.8261
TRAT	2	5.973	2.987	0.197	0.8261
Error	6	90.84	15.14		
Total	8	96.81			

R-square	0.0617	Root MSE	3.891	Adj R-square	-.2511	C.V.	48.923
----------	--------	----------	-------	--------------	--------	------	--------

Tabela 124 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	0.0038	0.0038	11.25	0.0285
TEMPO	1	0.0038	0.0038	11.25	0.0285
Error	4	0.0013	0.0003		
Total	5	0.0051			

R-square	0.7377	Root MSE	0.0183	Adj R-square	0.6721	C.V.	17.958
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 125 Teste de Tukey para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: OBE NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ. Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.000333 Critical Value of Studentized Range= 3.927 Minimum Significant Difference= 0.0414 Means with the same letter are not significantly different.			
Tukey Grouping	Mean	N	TEMPO
A	0.12667	3	0
B	0.07667	3	44

Tabela 126 Quadro da análise de variância para o modelo de regressão para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	0.0037	0.0037	11.25	0.0285
TEMPO	1	0.0037	0.0037	11.25	0.0285
Error	4	0.0013	0.0003		
Total	5	0.0051			

R-square	0.7377	Root MSE	0.0183	Adj R-square	0.6721	C.V.	17.958
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 127 Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.127	0.0105	12.02	0.0003
TEMPO	1	-0.001	0.0003	-3.354	0.0285

OBE = 0.127 -0.001*TEMPO.

Tabela 128 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	1.628	0.814	4.552	0.0627
Error	6	1.073	0.179		
Total	8	2.701			
Tempo	2	1.628	0.814	4.552	0.0627

R-square	0.6027	Root MSE	0.4229	Adj R-square	0.4703	C.V.	43.848
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 129 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	1	1.383	1.383	7.350	0.0302
Error	7	1.318	0.188		
Total	8	2.701			
A	1	1.383	1.383	7.350	0.0302

R-square	0.5122	Root MSE	0.4338	Adj R-square	0.4425	C.V.	44.984
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 130 Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de PTS nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	1.614	0.280	5.769	0.0007
tempo	1	-0.024	0.0089	-2.711	0.0302

$C = 1.614 - 0.024 \cdot A$

Tabela131 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha x Controle.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	2	0.0009	0.0004	1.114	0.3877
Error	6	0.0023	0.0004		
Total	8	0.0032			
TRAT	2	0.0009	0.0004	1.114	0.3877

R-square	0.2708	Root MSE	0.0197	Adj R-square	0.0278	C.V.	31.137
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 132 Quadro de análise de variância para a porcentagem de PTS nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento.

C.V.	DF	SS	MS	F	Pr > F
Model	5	0.0126	0.0025	1.303	0.3258
TEMPO	2	0.0081	0.0041	2.112	0.1637
TRAT*TEMPO	2	0.0041	0.0021	1.075	0.3720
TRAT	1	0.0003	0.0003	0.141	0.7136
Error	12	0.0231	0.0019		
Total	17	0.0357			

R-square	0.3519	Root MSE	0.0439	Adj R-square	0.0819	C.V.	54.505
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 133 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nas folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.015	0.015	7.377	0.0532
Error	4	0.0081	0.002		
Total	5	0.0231			
TEMPO	1	0.015	0.015	7.377	0.0532

R-square	0.6484	Root MSE	0.0451	Adj R-square	0.5605	C.V.	4.5243
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 134 Quadro da análise de variância para o modelo de regressão para a porcentagem de AR nas folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.015	0.015	7.377	0.0532
Error	4	0.0081	0.002		
Total	5	0.0231			
TEMPO	1	0.015	0.015	7.377	0.0532

R-square	0.6484	Root MSE	0.0451	Adj R-square	0.5605	C.V.	4.5243
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 135 Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nas folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.947	0.026	36.36	0.0000
TEMPO	1	0.0023	0.0008	2.716	0.0532

$$MM = 0.947 + 0.0023 \cdot TEMPO.$$

Tabela 136 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	0.0962	0.0481	0.214	0.8135
Error	6	1.350	0.225		
Total	8	1.446			
TEMPO	2	0.0962	0.0481	0.214	0.8135

R-square	0.0665	Root MSE	0.4744	Adj R-square	-0.2447	C.V.	280.94
----------	--------	----------	--------	--------------	---------	------	--------

Tabela 137 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.0952	0.0952	0.493	0.5053
Error	7	1.351	0.193		
Total	8	1.446			
TEMPO	1	0.0952	0.0952	0.493	0.5053

R-square	0.0658	Root MSE	0.4393	Adj R-square	-0.0677	C.V.	260.2
----------	--------	----------	--------	--------------	---------	------	-------

Tabela 138 Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.339	0.283	1.197	0.2702
TEMPO	1	-0.006	0.009	-0.702	0.5053

$$\text{LOG}_{10}(\text{MM}) = 0.339 - 0.006 \cdot \text{TEMPO}.$$

Tabela139 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nas folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha x Controle.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	5	0.117	0.0234	1.146	0.3889
Error	12	0.245	0.0204		
Total	17	0.362			
TRAT	1	0.0753	0.0753	3.687	0.0789
TRAT*TEMPO	2	0.0213	0.0107	0.522	0.6061
TEMPO	2	0.0204	0.0102	0.500	0.6187

R-square	0.3232	Root MSE	0.1429	Adj R-square	0.0412	C.V.	-73.2
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	-------

Tabela 140 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nas folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento x Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	0.246	0.123	1.661	0.2667
Error	6	0.445	0.0742		
Total	8	0.692			
TRAT	2	0.246	0.123	1.661	0.2667

R-square	0.3563	Root MSE	0.2724	Adj R-square	0.1418	C.V.	32.905
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 141 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.0748	0.0748	2.242	0.2086
Error	4	0.133	0.0334		
Total	5	0.208			
TEMPO	1	0.0748	2.242	0.2086	

R-square	0.3592	Root MSE	0.1827	Adj R-square	0.1990	C.V.	57.382
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 142 Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.430	0.105	4.077	0.0151
TEMPO	1	-0.005	0.0034	-1.497	0.2086

$$MM = 0.430 - 0.005 \cdot \text{TEMPO} .$$

Tabela 143 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Response: LOG10(MM)

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	0.0962	0.0481	0.214	0.8135
Error	6	1.350	0.225		
Total	8	1.446			
TEMPO	2	0.0962	0.0481	0.214	0.8135

R-square 0.0665 Root MSE 0.4744 Adj R-square -.2447 C.V. 280.94

Tabela 144 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Response: LOG10(MM)

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.0952	0.0952	0.493	0.5053
Error	7	1.351	0.193		
Total	8	1.446			
TEMPO	1	0.0952	0.0952	0.493	0.5053

R-square 0.0658 Root MSE 0.4393 Adj R-square -.0677 C.V. 260.2

Tabela 145 Parâmetros estimados para o modelo de regressão da porcentagem de AR nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.339	0.283	1.197	0.2702
TEMPO	1	-0.006	0.009	-0.702	0.5053

The predicted model is $\text{LOG10}(\text{MM}) = 0.339 - 0.006 * \text{TEMPO}$.

Tabela146 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Testemunha x Controle.

Response: MM

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	5	0.271	0.0543	0.586	0.7109
Error	12	1.111	0.0926		
Total	17	1.382			
TRAT*TEMPO	2	0.153	0.0765	0.827	0.4610
TEMPO	2	0.118	0.0591	0.638	0.5451
TRAT	1	5E-5	5E-5	0.0005	0.9818

R-square 0.1963 Root MSE 0.3043 Adj R-square -.1386 C.V. 51.233

Tabela 147 Quadro de análise de variância para a porcentagem de AR nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus*. Controle x Tratamento x Testemunha.

Response: LOG10(MM)

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	0.626	0.313	4.983	0.0531
Error	6	0.377	0.0628		
Total	8	1.003			
TRAT	2	0.626	0.313	4.983	0.0531

R-square 0.6242 Root MSE 0.2506 Adj R-square 0.4989 C.V. -65.95

Tabela 148 Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	1.193	1.193	5.125	0.0863
Error	4	0.931	0.233		
Total	5	2.125			
TEMPO	1	1.193	1.193	5.125	0.0863

R-square	0.5616	Root MSE	0.4826	Adj R-square	0.4521	C.V.	65.862
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 149 Quadro da análise de variância do modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	1.193	1.193	5.125	0.0863
Error	4	0.931	0.233		
Total	5	2.125			
TEMPO	1	1.193	1.193	5.125	0.0863

R-square	0.5616	Root MSE	0.4826	Adj R-square	0.4521	C.V.	65.862
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 150 Parâmetros estimados do modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	1.179	0.279	4.231	0.0134
TEMPO	1	-0.02	0.009	-2.264	0.0863

LOG10(TE) = 1.179 - 0.02*TEMPO .

Tabela 151 Quadro de análise de variância para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	0.0049	0.0025	1.900	0.2294
Error	6	0.0077	0.0013		
Total	8	0.0127			
TEMPO	2	0.0049	0.0025	1.900	0.2294

R-square	0.3878	Root MSE	0.0359	Adj R-square	0.1838	C.V.	69.172
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 152 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	0.003	0.003	2.220	0.1798
Error	7	0.0096	0.0014		
Total	8	0.0127			
TEMPO	1	0.003	0.003	2.220	0.1798

R-square	0.2408	Root MSE	0.037	Adj R-square	0.1323	C.V.	71.317
----------	--------	----------	-------	--------------	--------	------	--------

Tabela 153 Parâmetros Estimados para o modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	0.0824	0.0239	3.450	0.0107
TEMPO	1	-0.001	0.0008	-1.490	0.1798

$1/LEIT = 0.0824 - 0.001 * TEMPO .$

Tabela 154 Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de *Malvaviscus* Controle x Tratamento.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	5	1.633	0.327	1.038	0.4391
Error	12	3.774	0.315		
Total	17	5.407			
TRAT*TEMPO	2	0.998	0.499	1.587	0.2446
TEMPO	2	0.560	0.280	0.890	0.4360
TRAT	1	0.0743	0.0743	0.236	0.6356

R-square	0.3020	Root MSE	0.5608	Adj R-square	0.0111	C.V.	29.617
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 155 Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de *Malvaviscus* Tratamento x Controle x Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	104.3	52.14	136.4	0.0000
Error	6	2.293	0.382		
Total	8	106.6			
TRAT	2	104.3	52.14	136.4	0.0000

R-square	0.9785	Root MSE	0.6182	Adj R-square	0.9713	C.V.	14.198
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 156 Teste de Tukey para a atividade específica da peroxidase em folhas frescas de *Malvaviscus* Tratamento x Controle x Testemunha.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: AT Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 57.43639 Critical Value of Studentized Range= 4.339 Minimum Significant Difference= 18.986 Means with the same letter are not significantly different.				
Tukey Grouping	Mean	N	TRAT	
A	83.917	3	t	
B	5.744	3	c	
B	2.743	3	K	

Tabela 157 Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	16.13	16.13	0.140	0.7270
Error	4	459.9	115.0		
Total	5	476.0			
TEMPO	1	16.13	16.13	0.140	0.7270

R-square	0.0339	Root MSE	10.723	Adj R-square	-.2076	C.V.	68.111
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 158 Quadro da análise de variância do modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	16.13	16.13	0.140	0.7270
Error	4	459.9	115.0		
Total	5	476.0			
TEMPO	1	16.13	16.13	0.140	0.7270

R-square	0.0339	Root MSE	10.723	Adj R-square	-.2076	C.V.	68.111
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 159 Parâmetros estimados do modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus* Testemunha

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	17.38	6.191	2.808	0.0484
TEMPO	1	-0.075	0.199	-0.375	0.7270

ATE = 17.38 -0.075*TEMPO .					
----------------------------	--	--	--	--	--

Tabela 160 Quadro de análise de variância para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Response: LOG10(ATE)

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	0.336	0.168	1.977	0.2190
Error	6	0.511	0.0851		
Total	8	0.847			
TEMPO	2	0.336	0.168	1.977	0.2190

R-square	0.3972	Root MSE	0.2917	Adj R-square	0.1963	C.V.	21.211
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 161 Quadro de análise de variância para o modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	1	1049	1049	2.851	0.1352
Error	7	2576	368.0		
Total	8	3625			
TEMPO	1	1049	1049	2.851	0.1352

R-square	0.2894	Root MSE	19.182	Adj R-square	0.1879	C.V.	63.742
----------	--------	----------	--------	--------------	--------	------	--------

Tabela 162 Parâmetros Estimados para o modelo de regressão para a atividade específica da peroxidase nos filamentos da planta parasita *Cuscuta*.

Term	DF	Estimate	Std. Err.	T	Pr > T
INTERCEPT	1	12.22	12.37	0.988	0.3560
TEMPO	1	0.662	0.392	1.688	0.1352

$$\text{ATE} = 12.22 + 0.662 \cdot \text{TEMPO} .$$

Tabela 163 Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus* Controle x Tratamento.

Response: LOG10(ATE)

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	5	1.376	0.275	1.460	0.2729
Error	12	2.261	0.188		
Total	17	3.637			
TRAT	1	0.852	0.852	4.524	0.0548
TEMPO	2	0.398	0.199	1.057	0.3777
TRAT*TEMPO	2	0.125	0.0625	0.332	0.7241

R-square 0.3783 Root MSE 0.4341 Adj R-square 0.1193 C.V. 26.083

Tabela 164 Quadro da análise de variância para a atividade específica da peroxidase nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus* Tratamento x Controle x Testemunha.

C.V.	G.L.	SQ	QM	F	Pr > F
Model	2	7723	3861	39.55	0.0004
Error	6	585.8	97.63		
Total	8	8308			
TRAT	2	7723	3861	39.55	0.0004

R-square 0.9295 Root MSE 9.8806 Adj R-square 0.9060 C.V. 22.34

Tabela 165 Teste de Tukey para a atividade específica da peroxidase nos pecíolos das folhas frescas de *Malvaviscus* Tratamento x Controle x Testemunha.

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: ATE
 Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 97.62538
 Critical Value of Studentized Range= 4.339
 Minimum Significant Difference= 24.752
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	83.918	3	t
B	34.665	3	c
B	14.104	3	k