

JULIANA DE LANNA PASSOS

Comparação da anatomia e química de *Lantana camara* e *L. radula* e
interação dessas espécies com *Corynespora cassiicola*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

Dedico esta conquista aos meus pais Nilce e Deco,
a meus familiares: Marco Aurélio e Laisa
Eduardo, Leonardo, Luciana,
Clara.

A Pedra

O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da vida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...

E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem!

Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitar para o seu próprio crescimento.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

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

Ao CAPES pela concessão da bolsa.

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

Aos meus conselheiros, os professores Robert Weingart Barreto, Renata M. S. Alves Meira pela orientação, sugestões, incentivos, ensinamentos e sobre tudo pela amizade.

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

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

Aos técnicos Antônio Carlos da Silva (aposentado), José Luiz e tantos outros pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos da minha eterna amizade e gratidão e, aos colegas do LASA pela ajuda e pelos bons momentos e ao Cleiton e Karla que participaram efetivamente de parte do desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Departamento de Botânica, pelo apoio, especialmente à professora Luzimar, pela disponibilidade e pelos ensinamentos e a Marília Ventrella, pela amizade e carinho. Ao professor Eldo A. Monteiro da Silva, pelo exemplo de perseverança, dedicação e pela amizade. Ao professor Wagner C. Otoni pela ajuda, disponibilidade e atenção.

A todos os amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal que muito contribuíram para meu aprendizado. A Kellen Lagares e a Lourdes pelas contribuições durante o andamento do trabalho. As colegas de laboratório Marcela, Josiane, Jaque Dias Cristina, Tuane (minha nova amiguinha), Dayana Alice, Naiara, Ana Cláudia, Bittencourt, Flávia Ferrari, Marina e também aos meninos: Bruno, Thiaguinho, Advânio, Victor, Dudu, Diego e Thiago (Tica).

Aos funcionários da Biologia Vegetal por se mostrarem sempre prontos a me auxiliar, principalmente a D. Edite.

A todos da Clínica de Doenças de Plantas que sempre me ajudaram: Bruno, Dartanhã, Davi, Henrique, Pones, Olinto, Ronaldo, Prof. Dhingra, Fabiano, Douglas e Célio. Ao Técnico da Clínica de Doença de Plantas, José Orlando por toda ajuda prestada.

As grandes amigas que aqui conheci Meiriele, Wania e Roberta por todo carinho, atenção e apoio.

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

Ao Rodrigo Carvalho, sempre presente em minha vida nos momentos mais difíceis. Obrigada pela atenção, pelo carinho, pela sua generosidade e pelas suas gracinhas também!

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

A meus familiares: meus pais Nilce e Deco (por me perdoarem a ausência), meus irmãos Marco Aurélio, Laisa, Eduardo, Leonardo e Luciana (pelo apoio e torcida) e, minha sobrinha Clara (por alegrar a todos nós).

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

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

Muito Obrigada.

BIOGRAFIA

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

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

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

Em agosto de 2008 concluiu os requisitos para a obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
ORGANIZAÇÃO DA TESE	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1: ANATOMIA FOLIAR DE DUAS ESPÉCIES DE <i>Lantana</i> (<i>VERBENACEAE</i>).....	6
RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS.....	11
DISCUSSÃO.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO E HISTOLOCAÇÃO DOS COMPOSTOS SECRETADOS POR <i>Lantana camara</i> L. E <i>L. radula</i> SW. E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	31
RESUMO	31
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
CAPÍTULO 3: HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO NO PATOSSISTEMA <i>Corynespora cassicola/Lantana</i> (<i>VERBENACEAE</i>).....	59
RESUMO	59
ABSTRACT	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	63
RESULTADOS.....	65
DISCUSSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
CONCLUSÕES GERAIS	84

RESUMO

PASSOS, Juliana de Lanna, Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2008. **Comparação da anatomia e química de *Lantana camara* e *L. radula* e interação dessas espécies com *Corynespora cassiicola*.** Orientador: Luiz Claudio de Almeida Barbosa. Co-Orientadores: Renata Maria Strozi Alves Meira, Robert Weingart Barreto.

Considerando a similaridade entre *L. camara* e *L. radula*, e a conseqüente dificuldade em distingui-las quando somente amostras estéreis são avaliadas, neste trabalho foi investigado uso de características anatômicas das folhas de ambas as espécies como ferramentas para suportar sua correta classificação. Foram observadas diferenças no pecíolo e na lâmina foliar que apresentam idioblastos secretores em *L. camara*. Na espécie *L. radula* eram encontrados idioblastos cristalíferos na lâmina foliar. Os tricomas capitatos bem como a superfície abaxial são diferentes em cada espécie. Os estudos histoquímicos evidenciaram diferenças nos secretados dos três tipos de tricomas capitatos das duas espécies e nos idioblastos de *L. camara*. Os óleos essenciais foram evidenciados em todos os tipos de tricomas capitatos e nos idioblastos. Os componentes majoritários identificados no óleo essencial de *L. camara* são germacreno-D e *E*-caryophylleno e de *L. radula* são *E*-caryophylleno e fitol. Os ensaios biológicos demonstraram que o óleo de *L. radula* é mais eficiente que o de *L. camara* para inibir o crescimento do fungo *Corynespora cassiicola*. O estudo comparativo da relação *C. cassiicola*/*Lantana* spp. mostrou estar diretamente relacionadas ao hospedeiro. Observou-se o aparecimento de lesões 24 horas após inoculação e estas eram maiores em *L. camara*. A topografia da superfície abaxial de *L. radula* parece dificultar o reconhecimento pelo patógeno. Observou-se nas duas espécies a formação de apressórios e ocasionalmente as hifas penetraram estômatos sem alterações morfológicas evidentes. A penetração em *L. camara* e *L. radula* ocorre principalmente na superfície abaxial e a colonização intercelularmente ou intracelularmente. Verificou-se o espessamento de parede de células epidérmicas demonstrando uma reação a presença do fungo. O tecido lacunoso foi o mais afetado e houve rompimento e desorganização de células bem como foi verificado nas nervuras. O fungo atua como um agente necotrófico.

ABSTRACT

PASSOS, Juliana de Lanna, Universidade Federal de Viçosa, August of 2008. **Comparison of the anatomy and chemistry of *Lantana camara* and *L. radula* and interaction of those species with *Corynespora cassiicola*.** Adviser: Luiz Claudio de Almeida Barbosa. Co-Advisers: Renata Maria Strozi Alves Meira, Robert Weingart Barreto.

Considering the similarity between *L. camara* and *L. radula*, and consequently the difficult in distinguishing them when only sterile samples are available, in this work was investigated the use of anatomical characteristics of the leaves of both species as a tool for supporting the correct classification. The differences were observed in the petiole and in the leaf blades that presented secretory idioblasts in *L. camara*. In the species *L. radula* were found crystalliferous idioblasts in the leaf blades. The capitate trichomes as well as the abaxial surface are different in each species. The histochemical study showed differences in the secretions composition of the three types of capitate trichomes for the two species and in idioblasts of *L. camara*. The essential oils were detected in all types of capitate trichomes and idioblasts. The main components identified in essential oil of *L. camara* are germacrene-D and *E*-caryophyllene and of *L. radula* are *E*-caryophyllene and phytol. The biological assays demonstrated that the oil of *L. radula* is more effective than the one from *L. camara* to inhibit the growth of the fungus *Corynespora cassiicola*. The comparative study of the relation between *C. cassiicola*/*Lantana* spp. seem to be directly connected to the host. Injuries were observed 24 hours after inoculation and these were larger in *L. camara*. The topography of the abaxial surface of *L. radula* seems to make recognition by the pathogen difficult. The formation of appressorium in the two species was observed and occasionally hyphae penetrated the stoma without obvious morphological alterations. The penetration in *L. camara* and *L. radula* takes place mainly on the abaxial surface and the intercellular or intracellular colonization. The thickness of the epidermic cell walls that demonstrates a reaction to the presence of the fungus was verified. The spongy tissue was the most affected and there was breakage and disorganization of the cells as verified in the veins. The fungus acts like a necrotrophic agent.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Lantana* é nativo da América tropical e subtropical, com algumas poucas espécies nativas da Ásia e da África tropical. *Lantana camara* L. foi introduzida como ornamental em vários países tornando-se uma das plantas daninhas mais nocivas do mundo, pois se adaptou muito bem às condições climáticas locais, invadindo áreas onde se observa intervenções antrópicas e ecossistemas intactos. Apesar das inúmeras tentativas visando o controle desta planta pouco se tem avançado neste sentido (Sharma *et al.*, 1988; Day *et al.*, 2003).

É grande a variabilidade morfológica de *L. camara* (Silva, 1999) e em outras espécies do gênero verificou-se a ocorrência de hibridização natural, o que dificulta a identificação de espécies no campo. Devido a problemas taxonômicos essas plantas são freqüentemente classificadas incorretamente (Silva, 1999; Salimena, 2002). A separação entre algumas espécies de *Lantana* é normalmente realizada a partir da análise de amostras férteis, o que é dificultado quando as plantas não apresentam flores e frutos.

Em Minas Gerais, *L. camara* ocorre juntamente com *L. radula* SW, espécies morfológicamente semelhantes. Porém, *L. radula* é uma espécie de ocorrência restrita a América Central e ao Brasil, com limite sul no estado de Minas Gerais (Silva, 1999).

Com a busca incessante do controle de *L. camara*, espécies como *L. radula*, podem ser afetadas por problemas de identificação taxonômica incorreta. A anatomia tem sido considerada uma importante fonte de caracteres para a taxonomia, principalmente na ausência de amostras reprodutivas (Solereeder, 1908; Metcalfe and Chalk, 1950). Assim, é importante se caracterizar anatomicamente as folhas de *L. camara* e *L. radula* de forma a contribuir com a identificação de amostras estéreis das duas espécies.

Algumas espécies de *Lantana* são produtoras de óleos essenciais com atividade sabidamente fungistática (Deena & Thoppil, 2000; Hernandez *et al.*, 2005). Apesar das semelhanças morfológicas entre *L. camara* e *L. radula*, em plantas cultivadas e mantidas em casa de vegetação foi possível notar odor distinto entre elas que pode estar relacionada à diferença na composição química dos óleos, sendo que para *L. camara* tal composição é conhecida (Deena &

Thoppil, 2000; Misra & Laatsch, 2000; Alitonou *et al.*, 2004; Randrianalijaona *et al.*, 2005). Quanto à composição química do óleo essencial de *L. radula*, não foram encontrados relatos na literatura. Devido às propriedades fungistáticas associadas aos óleos provenientes de espécies de *Lantana* (Deena & Thoppil, 2000; Hernandez *et al.*, 2005), é possível que *L. camara* e *L. radula* possam apresentar atividade biológica diferente. Esse fungo é um patógeno extremamente agressivo que foi identificado em *L. camara* (Barreto *et al.*, 1995) e que tem sido alvo de estudos de controle biológico (Holm *et al.*, 1977; Pereira, 2001).

Considerando que os metabólitos produzidos por espécies de plantas podem apresentar composição química diversa e complexa, e exercer funções distintas conforme os sítios onde são secretados (Fahn, 1979). A natureza química dos compostos produzidos pelas estruturas secretoras costuma ser heterogênea e complexa, já tendo sido identificadas substâncias como alcalóides, lactonas sesquiterpênicas e flavonóides, grupo de substâncias com reconhecida função de componentes de defesa química vegetal (Harbone, 1993; Ascensão *et al.*, 1999; Combrinck *et al.*, 2007). Em espécies de Verbenaceae são poucos os trabalhos sobre a histolocalização dos compostos secretados.

A interação planta/patógeno envolvendo *C. cassiicola* foi alvo de estudo em diversas culturas já que este fungo poder causar perdas econômicas substanciais em seringueira, tomate, feijão caupi, dentre outros (Ellis, 1971; Silva, *et al.*, 1998). Buscando melhor compreender essas espécies *L. camara* e *L. radula* foram eleitas para a realização de um estudo comparativo. *L. radula* Sw. apresenta, além da proximidade filogenética com *L. camara*, uma distribuição geográfica em parte superposta com ambiente de ocorrência natural. Apesar de *L. camara* e *L. radula* co-habitarem em alguns ambientes não há relatos de ataque de *C. cassiicola* a *L. radula*. Além disso, a escassez geral de informações sobre a espécie *L. radula* contribuiu para o interesse sobre essa espécie.

O estudo histopatológico envolvendo as duas espécies possibilitara o melhor entendimento dos mecanismos de infecção pelo fungo *C. cassiicola*. O estudo conjunto de uma interação compatível e uma não compatível podera contribuir para o melhor entendimento sobre o processo

infectivo de *C. cassiicola*. Neste trabalho foram avaliadas as alterações anatômicas, em folhas de *L. camara* e *L. radula* provocadas pelo ataque do fungo *C. cassiicola*, bem como examinados e descritos aspectos destas interações, os sítios de penetração, de infecção e os processos de colonização do fungo utilizando-se microscopia de luz e eletrônica de varredura.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos reconhecer caracteres anatômicos das folhas de *L. camara* e *L. radula* que possam ser utilizados como ferramentas para a separação correta dessas espécies além de realizar o estudo histoquímico de suas folhas. Buscou-se também caracterizar o óleo essencial produzido nas folhas de *L. camara* e *L. radula* e submetê-los a teste biológico sobre o desenvolvimento do fungo *C. cassiicola*. Foram realizados os estudos histopatológicos das interações *C. cassiicola* X *L. camara* e *L. radula*.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

O presente trabalho encontra-se organizado sob a forma de três artigos científicos, como disposto nas normas de redação de teses da Universidade Federal de Viçosa. Cada artigo segue a formatação da revista a qual será submetido. O primeiro artigo é referente à anatomia aplicada à taxonomia de duas espécies de *Lantana* (Verbenaceae), e se encontra organizado de acordo com as normas da revista *Journal of Plant Research*. O segundo artigo trata das estruturas secretoras presentes nas folhas de *L. camara* e *L. radula*, a composição do óleo essencial produzido por essas duas espécies e atividade biológica destes. Este artigo foi preparado atendendo as normas da *Biochemical Systematic and Ecology*. O terceiro artigo trata do estudo histopatológico das interações fungo/planta nos patossistemas *C. cassiicola* X *Lantana* spp e foi preparado de acordo com as normas da revista *Plant Pathology*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alitonou, G., Avlessi, F., Bokossa, I., Ahoussi, E., Dangou, J., Sohounhloué, D.C.K., 2004. Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* Linn. Comptes Rendus Chime 7, 1101-1105.
- Ascensão, L., Mota, L., Castro, M.M., 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. Annals of Botany 84, 437-447.
- Barreto, R.W., Evans, H.C., Ellison, C.A., 1995. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. Mycological Research 99 (7), 769-782.
- Combrinck, S., Du Plooy, G.W.D., McCrindle, R.I., Botha, B.M., 2007. Morphology and histochemistry glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). Annals of Botany, 1-9.
- Day, M.D., Willey, C.J., Playford, J., Zalucki, M.P., 2003. *Lantana* current management status and future prospects. Australian, Australian Centre for International Agricultural Research.
- Deena, M.J., Thoppil, J.E., 2000. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. Fitoterapia 71, 453-455.
- Ellis, M. B., 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1971. 608 p.
- Fahn, A., 1979. Secretory tissues in plants. London, Academic Press.
- Harbone, J.B., 1993. Ecological biochemistry. London: Academic. (4^a ed).
- Hernandez, T., Canales, M., Ávila, J.G., Garcia, A.M., 2005. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). Journal of Ethnopharmacology 96, 551-554.

- Holm, L.G.; Plucknett, D.L.; Pancho, J.V.; Herberger, J.P., 1977. The World's Worst Weeds. University of Hawaii Press, Honolulu, 609.
- Metcalf, C.R., Chalk, L., 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses vol I - Oxford: Oxford Clarendon Press.
- Misra, L., Laatsch, H., 2000. Triterpenoids, essential oil and photo-oxidative 28-13-lactonization of oleanolic acid from *Lantana camara*. *Phytochemistry* 54, 969-974.
- Pereira JM, 2001. *Prosopodium tuberculatum* e *Corynespora cassiicola* como agentes de biocontrole de *Lantana camara*. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação (Doutorado em Fitopatologia).
- Randrianalijaona, J., Ramanoelina, P.A.R., Rasoarahona, J.R.E., Gaydou, E.M., 2005. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta* 545, 46–52.
- Salimena, F.R.G., 2002. New synonyms and typifications in *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana* 40, 121-125.
- Sharma, O.P., Makkar, H.P.S., Dawra, R.K., 1988. A review of the noxious planta *Lantana camara*. *Toxicon* 26 (11), 975-987.
- Silva, T.R.S., 1999. Redelimitação e revisão taxonômica do gênero *Lantana* L. Verbenaceae no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.
- Silva, W.P.K., Deverall, B.J., Lyon, B.R., 1998. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology* 47, 267-277.
- Solereider, H., 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. Oxford, Clarendon Press.

CAPÍTULO 1

ANATOMIA FOLIAR DE DUAS ESPÉCIES DE *Lantana* (VERBENACEAE)

Resumo: A espécie *L. camara* L. tem sido usada há séculos como ornamental, e foi espalhada pelos colonizadores da América Tropical tornou-se uma das mais importantes plantas daninhas do mundo. Na busca de novos métodos de controle para esta planta, é essencial distinguir espécies do mesmo gênero, o que usualmente é feito com estudos taxonômicos de amostras férteis. Considerando a similaridade entre *L. camara* e *L. radula*, e a conseqüente dificuldade em distingui-las quando somente amostras estéreis estão disponíveis, entendeu-se como necessário investigar o uso de características anatômicas das folhas como fonte de informação adicional para a distinção dessas duas espécies. As folhas de *L. camara* e *L. radula* foram examinadas sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A diferença mais elevada observada foi à presença nos pecíolos de *L. camara* e *L. radula* de idioblastos. Na lâmina foliar de *L. camara* foram observados idioblastos secretores e em *L. radula* foram encontrados idioblastos cristalíferos. Os tricomas glandulares e não glandulares bem como a superfície abaxial apresentam diferenças morfológicas evidentes em cada espécie.

Palavras-chave: idioblastos, *L. camara*, *L. radula*, tricomas glandulares, planta daninhas.

Abstract: The species *Lantana camara* L. has been used as ornamental, and as a consequence it spread all over the world and became one of the world most important weeds. In order to development new methods of control for this plant, it is essential to distinguish it from other species of the same genus, and this is usually carried out by taxonomic studies of fertile samples. Considering the similarity between *L. camara* and *L. radula*, and the consequent difficult in distinguishing then when only sterile samples are available, in the present work we have investigated the use of anatomical characterists of the leaves of both species as a tool for suporting the correct classification. The leaves of *L. camara* and *L. radula* were anatomically examined by light microscopy and scanning electron microscopy. The major differences were observed in the petiole that presented secretor idioblasts in *L. camara*. In the leaf blades of *L. camara* were observed secretor idioblasts and in *L. radula* were found crystalliferou idioblasts. The glandular and nonglandular trichomes as well as the abaxial surface are different in each species. Such results can subsidize the strategies that aim the control of *L. camara* without interfering with *L. radula*.

Key words: idioblasts, *L. camara*, *L. radula*, glandular trichomes, weed plant.

INTRODUÇÃO

O gênero *Lantana* é nativo da América tropical e subtropical, com algumas poucas espécies nativas da Ásia e da África tropical. *Lantana camara* L. e apresenta propriedades medicinais (Weenen *et al.*, 1990; Herbert and Maffrand, 1991), não sendo relatado nenhum caso de toxicidade ao homem (Souza, 1988). No entanto, esta espécie encontra-se dispersa pelo mundo e tornou-se um problema em vários países onde foi introduzida como ornamental. Nesses países, apesar de exótica, ela se adaptou muito bem às condições climáticas locais e invadiu áreas de florestas e pastagens. No entanto, para muitos animais domésticos essa espécie apresenta toxidez aguda podendo levá-los a morte (Brito *et al.* 2004) *L. camara* exerce efeito alelopático em vegetação vizinha (Sharma *et al.*, 1988) interferindo em comunidades naturais, podendo levar a redução da diversidade local. Assim, numerosas tentativas têm sido realizadas visando o controle desta espécie, entretanto, com limitado sucesso (Sharma *et al.*, 1988; Day *et al.*, 2003).

A morfologia do gênero *Lantana* (Silva, 1999), dificultando a identificação de espécies no campo. Inúmeros problemas taxonômicos têm sido relatados e essas plantas são freqüentemente classificadas incorretamente (Silva, 1999; Salimena, 2002). A separação entre algumas espécies de *Lantana* é normalmente realizada a partir da análise de amostras férteis, o que é dificultado quando as plantas estão estéreis.

Em Minas Gerais, ocorre juntamente com *L. camara*, *L. radula* SW. Estas duas espécies são morfologicamente semelhantes, entretanto *L. radula* ocorre somente nas Américas, desde a América Central até o Brasil, com limite sul no estado de Minas Gerais (Silva, 1999).

Com a busca continuada de alternativas para o controle de *L. camara* espécies parecidas, como *L. radula*, podem ser fonte de confusão e trabalhos tais como a busca por agentes de biocontrole podem ser prejudicados por identificação taxonômica incorreta de hospedeiros principalmente quando as espécies estão estéreis. A anatomia há muito tempo, vem se mostrando como uma importante fonte de informação útil para a taxonomia, principalmente quando faltam amostras reprodutivas (Solereeder, 1908; Metcalfe and Chalk, 1950). Inclusive, em alguns casos, a anatomia foliar permite a identificação de níveis hierárquico inferiores (Alves *et al.*, 2002; Sartori

and Tozzi, 2002). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar anatomicamente as folhas de *L. camara* e *L. radula* visando indicar caracteres que possam contribuir com a identificação de amostras estéreis das duas espécies, fornecendo informações úteis para o manejo.

MATERIAL E MÉTODOS

O material botânico das espécies estudadas foi obtido de plantas cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação no Campus da Universidade Federal de Viçosa (20° 45' 24''S e 42° 52' 22''WO, 680 m de altitude). Ramos férteis foram herborizados e as exsiccatas incorporadas como testemunha no acervo do Herbário VIC (sob os números 30159 - *L. camara* e 30160 - *L. radula*) do Departamento de Biologia Vegetal, da UFV e a identidade das plantas foi confirmada por especialista.

Foram coletadas folhas maduras do 3° ao 5° nó a partir do ápice. Amostras frescas do pecíolo e da lâmina foliar foram seccionadas transversalmente utilizando-se um micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Belo Horizonte, Brasil), os cortes corados por 5 minutos com safrablau (safranina-azul de astra) (Bukatsh, 1972) e as lâminas montadas com água glicerizada.

Alguns fragmentos foliares foram fixados por 48 horas em FAA₇₀ (formaldeído, ácido acético, etanol 50%, 5:5:90, v/v) e conservados em etanol 70% (Kraus and Arduim, 1997). Amostras com aproximadamente cinco mm² da lâmina foliar e do pecíolo foram desidratadas em série etílica (70% a 95%) e incluídas em resina histológica (Historesin Leica). Para facilitar à penetração das soluções, as amostras foram mantidas em dessecador sob vácuo constante. As secções foram realizadas nos planos transversais e longitudinais, com o auxílio de um micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica), utilizando navalha de vidro. Cortes com 5 a 7 µm de espessura foram distendidos em lâminas de vidro, corados com Azul de Toluidina em pH 4,4 (O'brien and Maccully, 1981) durante 10 minutos e montados com resina sintética (Permound-Fisher).

Para a realização da diafanização foram selecionadas três amostras de três folhas do 3º ao 5º nó, a partir do ápice, por indivíduo de cada espécie sendo coletadas folhas de três indivíduos. As folhas foram subdivididas em regiões apical, mediana e basal e, para cada região, foram utilizadas duas amostras por folha para analisar a superfície abaxial e adaxial. Estas amostras foram clarificadas em hidróxido de sódio aquoso a 10%, lavados com água corrente, coradas com safranina aquosa a 1% (Johansen, 1940) e as lâminas montadas com gelatina glicerizada. O número de tricomas, secretores e não secretores, foi quantificado para as superfícies abaxial e adaxial em cada região sob microscópio de luz (aumento de 40 e área total de 29,7 mm²). As densidades de tricomas foram estimadas por espécie pela determinação do número de tricomas dentro do campo de visualização representando uma área de amostragem de aproximadamente 0,22 mm². Neste experimento foram amostradas em cada superfície 45 áreas por região (apical, mediana e basal) para cada espécie. As estimativas de densidades dos tricomas foram calculadas independentemente para as superfícies e porções avaliadas. Os resultados da avaliação dos tricomas foliares foram analisados pelo teste de média de Tukey.

A análise do laminário e a documentação fotográfica foram feitas utilizando-se um microscópio de luz (Olympus AX 70), conectado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo), do Laboratório de Anatomia Vegetal (DBV/UFV).

Para a descrição da micromorfologia dos tricomas secretores e não secretores, algumas amostras fixadas foram desidratadas em série etanólica, submetidas secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido utilizando-se equipamento CPD020 da Balzer e recobertas com ouro metálico a 10 nm de espessura (Balzers Modelo SCA010,). Tais amostras foram analisadas e fotografadas com um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss modelo LEO 1430VP).

RESULTADOS

Lantana camara (Fig. 1A e 1B) e *L. radula* (Fig. 1C e 1D) apresentavam alguns caracteres morfológicos foliares comuns, tais como: folhas simples, inteiras, pecioladas e pubescentes; filotaxia oposta-decussada, o ápice agudo a acuminado e margem serrada.

Os pecíolos das duas espécies (Fig. 2A-D) são planos na superfície adaxial e convexo na superfície abaxial. São revestidos por cutícula delgada e a epiderme é uniestratificada com células de tamanhos regulares, e com vários tipos de tricomas secretores e não secretores em toda a sua extensão. Na porção subepidérmica há cerca de três camadas de colênquima. O sistema vascular é do tipo colateral nas duas espécies avaliadas. Em *L. camara* ele é composto sistema vascular aberto, formando um arco achatado em forma de “V” com dois feixes acessórios dorsalmente localizados (Fig. 2A). Já em *L. radula* o sistema vascular é aberto com extremidades fletidas, em forma de ferradura, com dois feixes acessórios dispostos lateralmente (Fig. 2C). No pecíolo de *L. camara* observou-se grupos de idioblastos localizados lateralmente no parênquima cortical (Fig. 2B), os quais não foram visualizados em *L. radula* (Fig. 2D).

Em ambas as espécies, o padrão de venação é do tipo pinado com nervuras laterais craspedódromas simples onde todas as nervuras laterais e seus ramos terminam na margem (não documentado). As aréolas possuíam formato quadrangular com venação simples (Figs. 2E e 2F).

Nas superfícies da lâmina foliar de *L. camara* (Figs. 3A-D) e *L. radula* (Figs. 3E-I), as células epidérmicas apresentavam o contorno sinuoso com reentrâncias em forma de U. Em *L. radula* a superfície abaxial não é plana, apresentando regiões de depressões, onde é comum a ocorrência de tricomas secretores (Fig. 3H).

Os estômatos ocorriam em ambas as superfícies (anfiestomática), embora fossem raros na adaxial. Localizam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas, formando complexos diacíticos e anomocíticos (Figs. 3A, 3C, 3E e 3H).

Tricomas não secretores e secretores encontravam-se dispersos por todo o pecíolo e lâmina foliar, entretanto os tipos variaram conforme a espécie (Figs. 4, 5 e 6).



Figura 1 – Vista geral e detalhes de partes reprodutivas das duas espécies do gênero *Lantana*. A e B - *Lantana camara*. C e D - *Lantana radula*. A e C – Inflorescência. B e D - Detalhe: fruto.

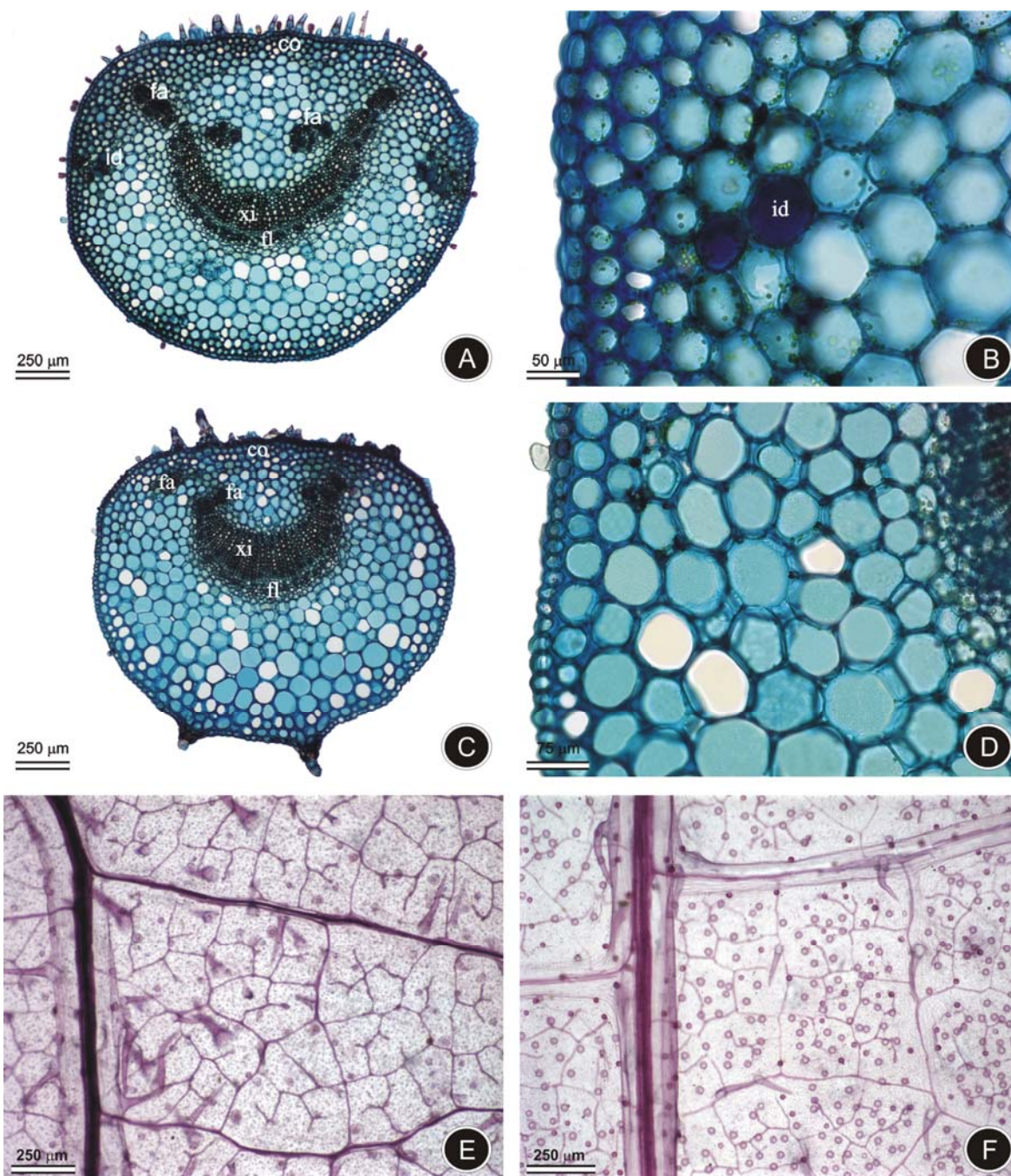


Figura 2 – Folha de *Lantana camara* (A, B e E) e *Lantana radula* (C, D e F). A a D - Secção transversal da região distal dos pecíolos. E e F - Diafanização das lâminas foliares evidenciando o padrão de venação. A e C - Vista geral. B – Detalhe do córtex evidenciando os idioblastos secretores. D – Córtex. E e F - Aréolas. Id = idioblastos, co = colênquima, xi = xilema, fl = floema, fa = feixes acessórios.

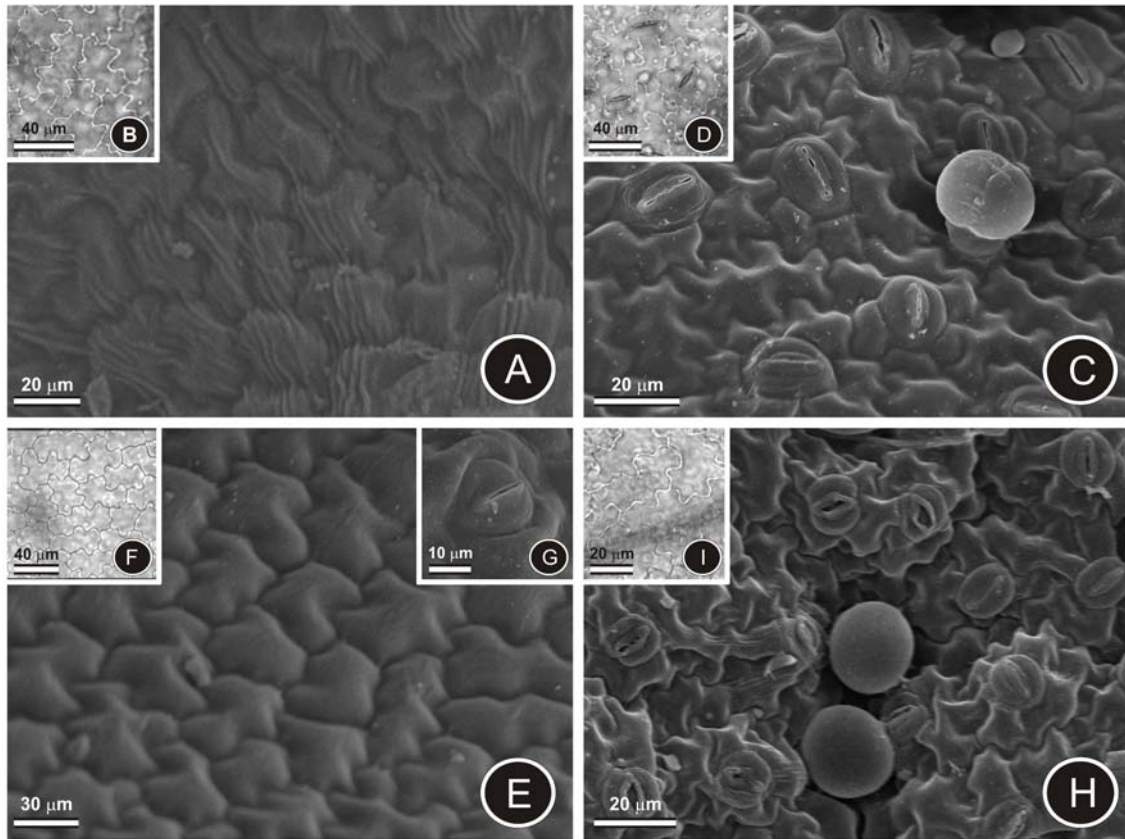


Figura 3 – Epiderme das superfícies adaxiais e abaxiais das folhas de *L. camara* e *L. radula* em vista frontal mostrando paredes anticlinais com contornos sinuosos. A a D – *L. camara*. E a I - *L. radula*. C - Estômatos no mesmo nível das células epidérmicas. H – Epiderme irregular devido à presença de depressões A, C, E, G e H - Micrografias de MEV. B, D, F e I = Diafanização. A, B, E, F e G – Superfícies adaxiais. C, D, H e I – Superfícies abaxiais.

Os tricomas não secretores das duas espécies (Figs. 4A-F) são do tipo cônico, sendo a base dilatada e a extremidade afilada, e com ornamentações verrucosas na parede. Esses tricomas são uni ou bicelulares e apresentavam na base um conjunto de células epidérmicas volumosas radialmente arranjadas (Fig. 4C-F). Em *L. camara* (Figs. 4A, 4C, 4E) os tricomas eram visualmente mais alongados que em *L. radula* (Figs. 4B, 4D, 4F) e mais numerosos (Fig. 7, Tabela 1). Como a frequência de tricomas não secretores em *L. radula*, foi muito baixa (inferior a 1, Tabela 1) não houve diferença estatística quando se comparou as duas superfícies foliares. Já em *L. camara* a diferença de frequência entre as duas superfícies foi estatisticamente significativa com a superfície adaxial tendo em média o dobro do valor da abaxial (Tabela 1). Em relação às regiões avaliadas, não se verificou diferenças significativas de densidade de tricomas em função da posição na folha para as duas espécies (Tabela 2).

Foram identificados três tipos de tricomas secretores capitados (Figs. 5 e 6). Tipo I: multicelular com uma célula na base, duas células alongadas de comprimento variável no pedúnculo, uma célula curta no pescoço e a cabeça multisseriada com duas a oito células. Tipo II: multicelular com uma célula basal, uma célula curta no pescoço e uma, duas ou quatro células apicais na cabeça secretora. Tipo III: bicelular, com uma célula basal curta e uma célula apical dilatada compondo a cabeça secretora, cuja cutícula apresentou-se distendida na fase secretora. Em *L. camara* foram visualizados os tricomas dos tipos I (Figs. 5A-H), II (Figs. 5I e 5J) e III (Figs. 5L e 5M). Em *L. radula* também foram observados tricomas dos tipos I (Figs. 6A e 6B), II (Figs. 6C, 6D, 6E e 6F) e III (Figs. 6G-I). No entanto, a diferença entre as duas espécies quanto ao número variável de células na cabeça dos tricomas capitados do tipo I e II observados em cada uma delas. Quanto a frequência, os valores foram aproximados nas duas espécies (Tabela 1) e em ambas os valores foram maiores para a superfície abaxial (Fig. 7, Tabela 1). Em relação às regiões avaliadas (base, região mediana e ápice) estatisticamente não se observou diferenças, em relação à frequência média dos tricomas, a exceção de *L. radula* na superfície abaxial (Tabela 2).

A lâmina foliar das duas espécies apresentou epiderme unisseriada com células de paredes periclinais externas delgadas e cutícula relativamente espessa. O mesofilo é dorsiventral, com duas camadas de parênquima paliçádico (Figs. 8A e 8B) e três a quatro camadas de parênquima lacunoso

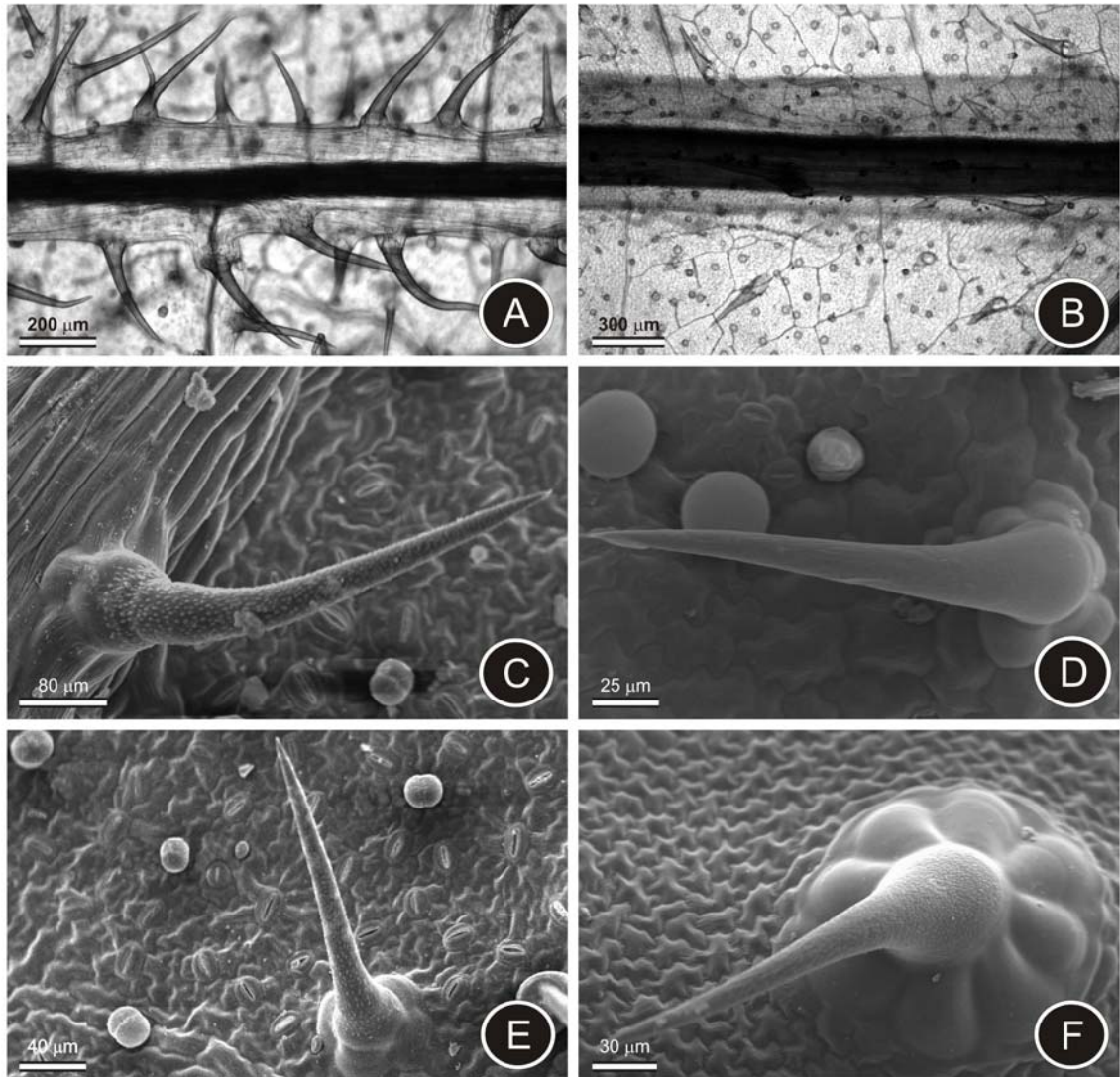


Figura 4 – Tricomas não secretores de *L. camara* e de *L. radula*. A e B – Aspecto geral das superfícies abaxiais. C, D, E e F – Detalhes dos tricomas não secretores. C, D e E – Superfícies abaxiais. F- Superfície adaxial. A, C e E – *L. camara*. B, D e F – *L. radula*. A e B – Diafanização. C, D, E, F – MEV.

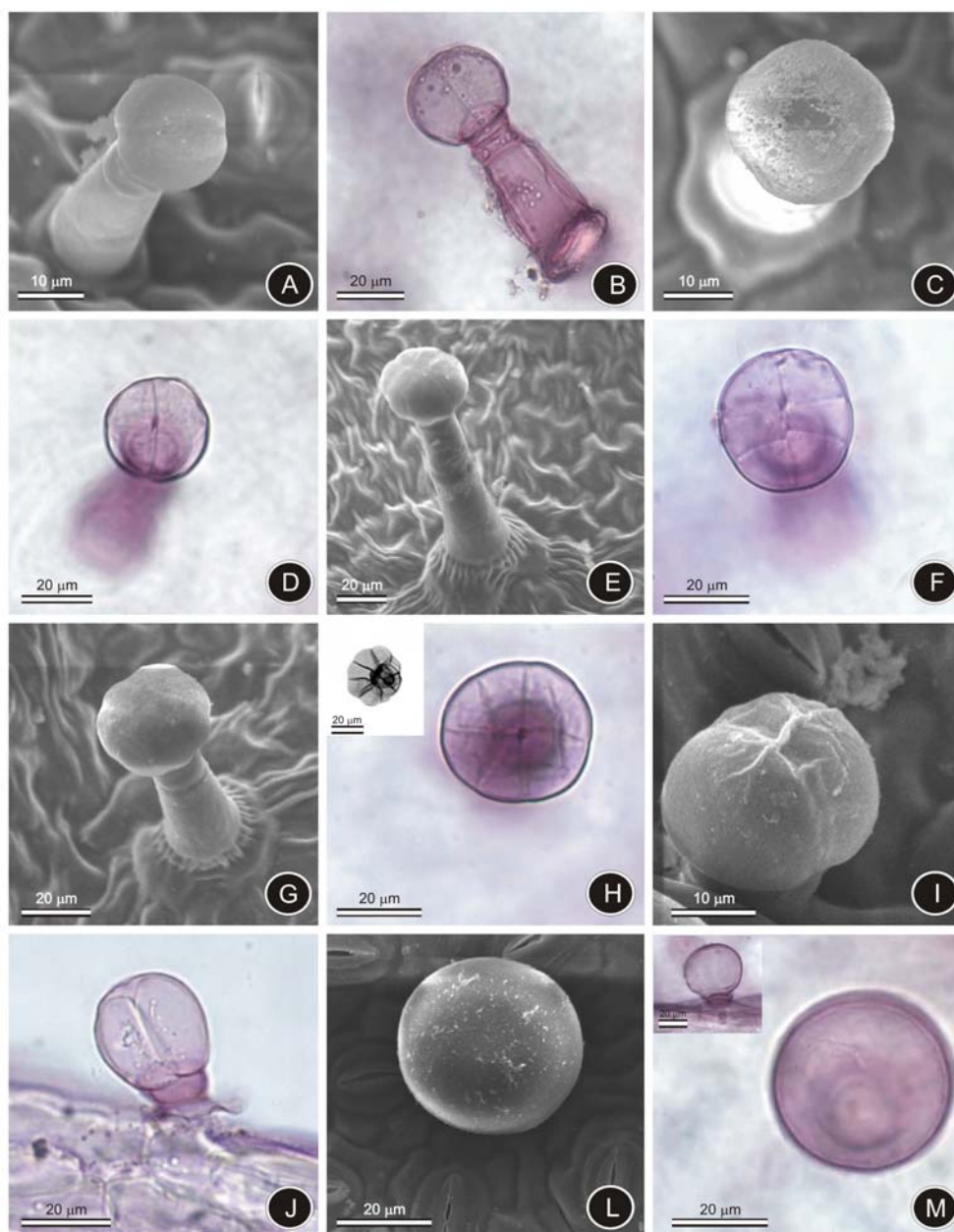


Figura 5 – Tipos de tricomas secretores em *L. camara*. A, C, E, G, I, L - MEV. B, D, F, H, J, M – Diafanização. A e B - Tricomas capitatos do tipo I com duas células na cabeça secretora. C e D - Tricomas capitatos do tipo I com quatro células na cabeça secretora. E e F - Tricomas capitatos do tipo I com seis células na cabeça secretora. G e H - Tricomas capitatos do tipo I com oito células na cabeça secretora. Detalhe: cabeça secretora. I e J - Tricomas capitatos do tipo II com duas células na cabeça secretora. Detalhe: cabeça secretora. L e M - Tricomas capitatos do tipo III unicelular. Detalhe: vista lateral.

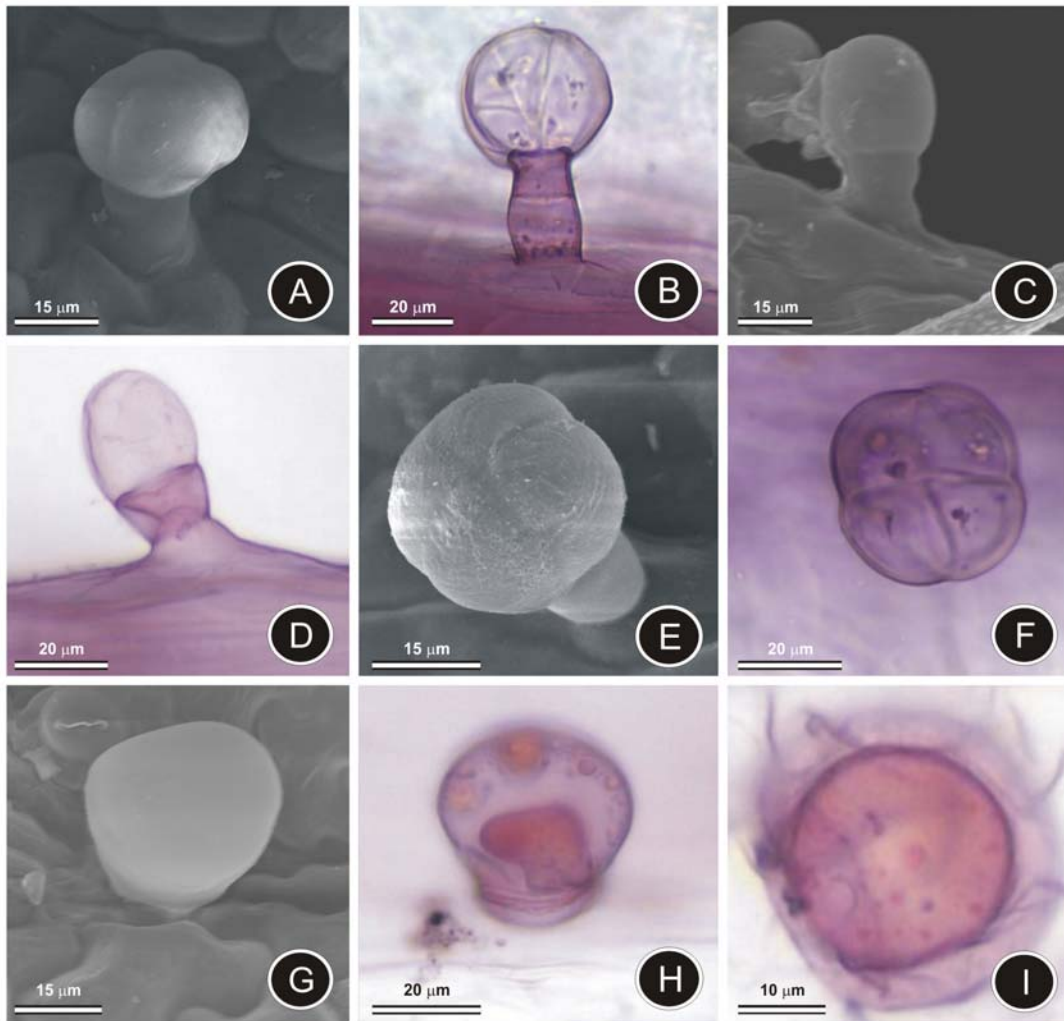


Figura 6 – Tipos de tricomas secretores em *L. radula*. A, C, E e G - MEV. B, D, F, H e I - Diafanização. A e B - Tricomas capitatos do tipo I com 4 células na cabeça secretora. C e D - Tricomas capitatos do tipo II com uma célula na cabeça secretora. E e F - Tricomas capitatos do tipo III com 4 células na cabeça secretora. G, H, I - Tricomas capitatos do tipo IV unicelular.

que é mais compacto em *L. camara* (Fig. 8A) que em *L. radula* (Fig. 8B). Em *L. camara*, a semelhança do verificado para o pecíolo, apresentou idioblastos secretores dispersos pelo mesofilo (Fig. 8C) cujo citoplasma se corou de roxo pelo Azul de Toluidina (Figs. 8A, 8C e 8E). Em *L. radula* foram visualizadas apenas idioblastos contendo estilóides no parênquima clorofiliano (Fig. 8D). O sistema vascular da nervura central (Figs. 8E, 8F, 8G e 8H) é do tipo colateral, em forma de arco aberto em *L. camara* e em *L. radula*. Porém, nesta última espécie é mais recurvado tendo as extremidades do arco mais afastadas.

DISCUSSÃO

Várias das características anatômicas de *L. camara* e *L. radula* avaliadas foram semelhantes. Por exemplo, a venação foliar craspedódroma simples de ambas. A utilização da venação foliar para fins taxonômicos (Reis *et al.*, 2004; Cardoso and Sajo, 2006), deve ser considerada com cuidado (Dilcher, 1974). Entretanto, foi possível identificar caracteres diagnósticos que permitiram distinguir as espécies.

No pecíolo das duas espécies de *Lantana*, o padrão de organização do sistema vascular e os idioblastos secretores (visualizados somente no córtex de *L. camara*) constituem-se em bons caracteres distintivos. A anatomia do pecíolo fornece, frequentemente, subsídios para a identificação de determinados taxa, sendo que a porção distal do pecíolo é a mais significativa em termos taxonômicos (Howard, 1979). O estudo do pecíolo tem se confirmado como um bom caráter taxonômico auxiliando na distinção, por exemplo, de gêneros da família Melastomataceae (Reis *et al.*, 2004) bem como na separação de espécies de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) (Bieras & Sajo, 2004).

A presença de cutícula espessa na superfície adaxial das duas espécies de *Lantana* estudadas pode ser interpretada como uma estratégia adaptativa (Dickison, 2000; Larcher, 2000). A cutícula recobre a epiderme da planta e serve de interface entre interior e exterior do organismo (Bukovac *et al.*, 1990) e deve ser considerada nas intervenções que visem o controle químico de plantas (Procópio *et al.*, 2003).

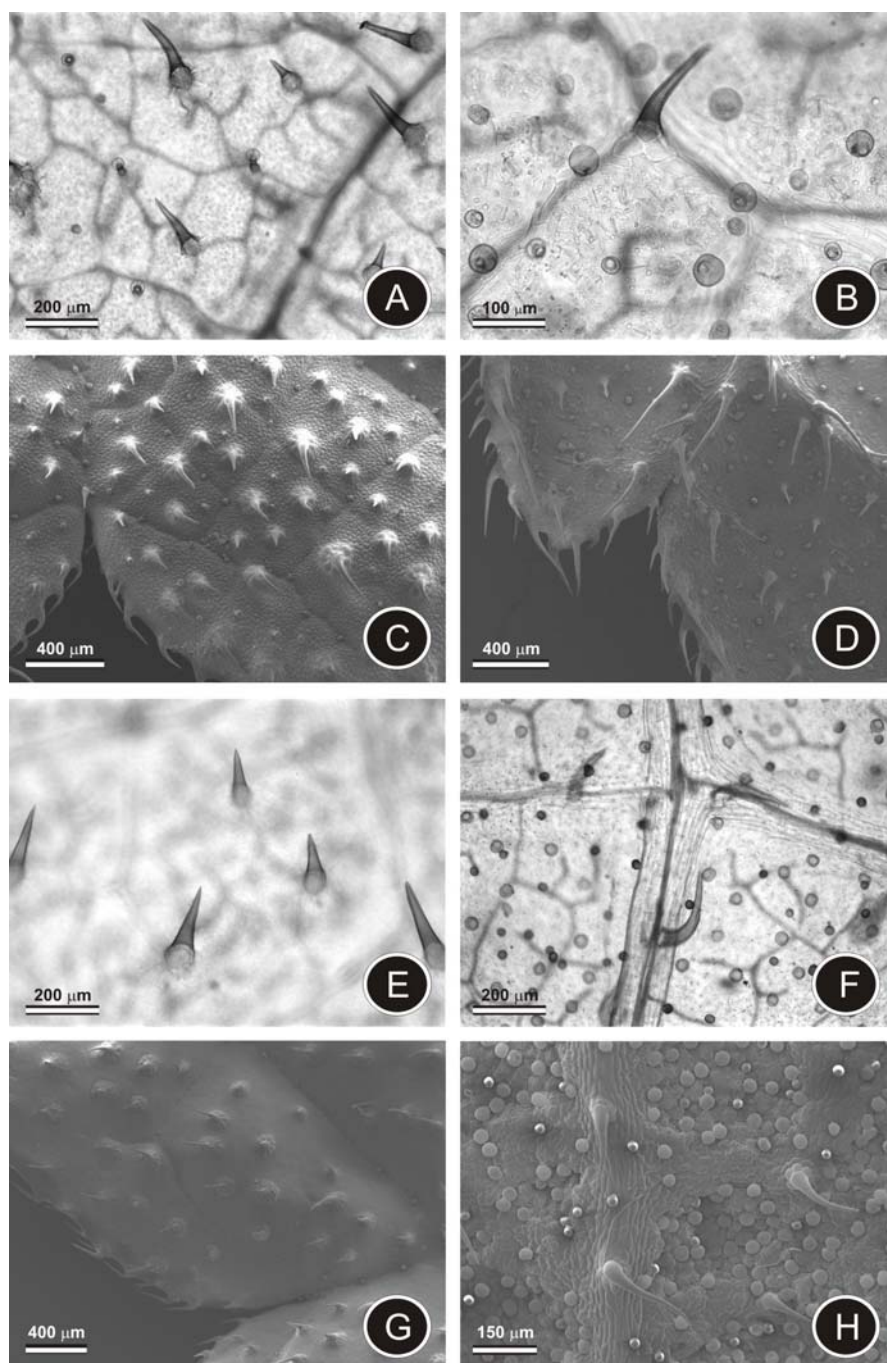


Figura 7 – Superfícies foliares de *L. camara* e *L. radula* vistos sob microscopia de luz e MEV. A - D = *L. camara*. E - H = *L. radula*. A, B, E e F – Diafanização. C, D, G e H - MEV. A, C, E e G – Superfícies adaxiais. B, D, F e H – Superfícies abaxiais.

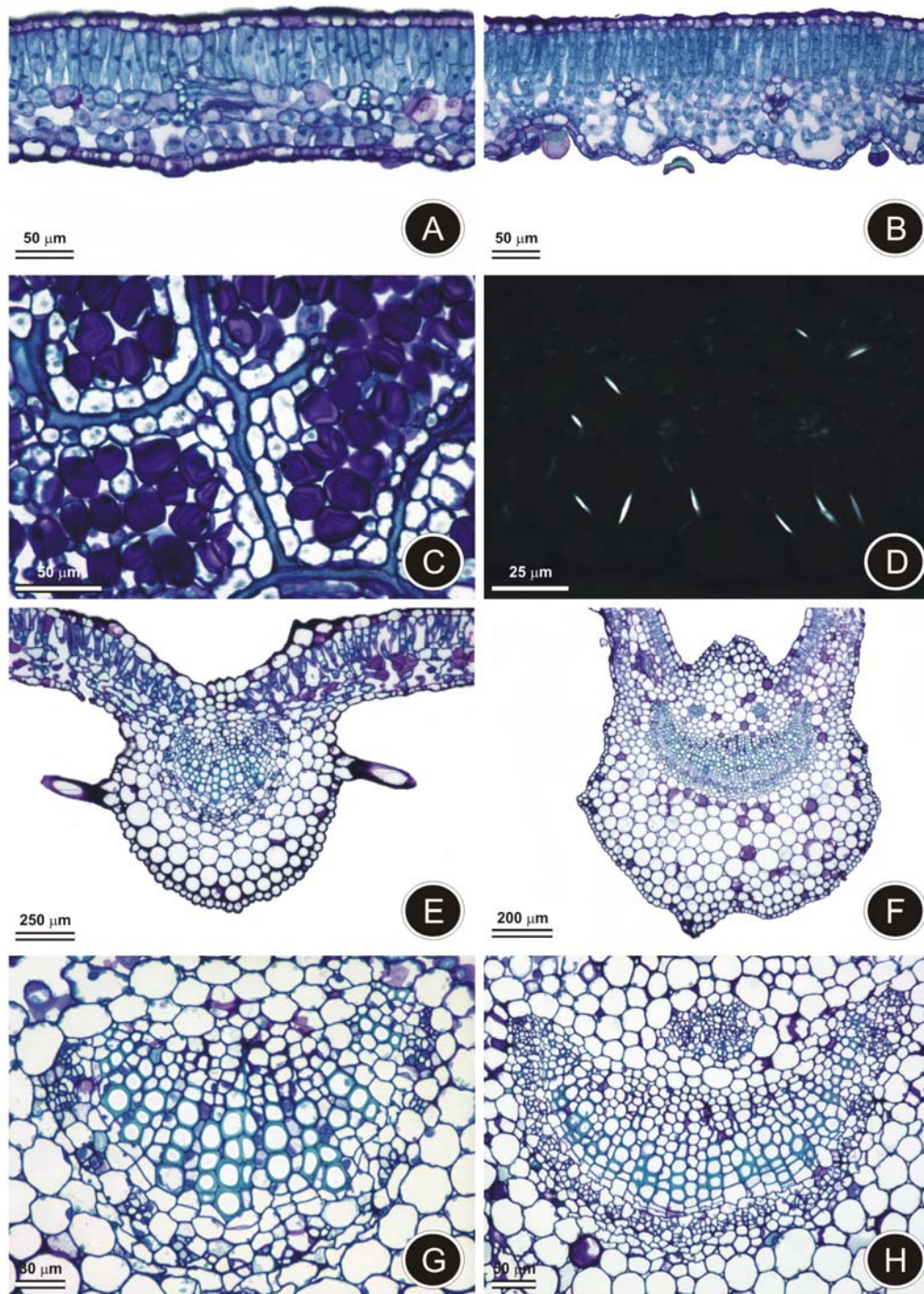


Figura 8 – Secções de lâminas foliares de *L. camara* e de *L. radula* corados com Azul de Toluidina. A, C, E e G – *L. camara*. B, D, F e H – *L. radula*. A e B - Cortes transversais lâminas foliares evidenciando mesofilo dorsiventral. C - Corte paradérmico da lâmina foliar evidenciando os idioblastos secretores. D - Corte transversal da lâmina foliar mostrando os estilóides. E a F – Aspecto geral da nervura mediana da folha. G e H - Detalhe do feixe vascular mostrando xilema e floema.

Tabela 1 - Valores médios da frequência dos tricomas não secretores e secretores por mm² nas superfícies abaxial e adaxial de folhas de *L. camara* e *L. radula*.

Superfícies	TRICOMAS NÃO SECRETORES		TRICOMAS SECRETORES	
	<i>L. camara</i>	<i>L. radula</i>	<i>L. camara</i>	<i>L. radula</i>
AB	2,8 B	0,3 A	21,2 A	23,0 A
AD	5,2 A	0,9 A	1,7 B	0,6 B

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. AD= adaxial / AB= abaxial.

Tabela 2 - Valores médios da frequência dos tricomas não secretores e secretores por mm² nas regiões basal, mediana e apical de folhas de *L. camara* e *L. radula*.

Regiões	TRICOMAS NÃO SECRETORES				TRICOMAS SECRETORES			
	<i>L. camara</i>		<i>L. radula</i>		<i>L. camara</i>		<i>L. radula</i>	
	AD	AB	AD	AB	AD	AB	AD	AB
BA	5,3 A	2,7 A	0,9 A	0,4 A	2,1 A	23,5 A	0,6 A	22,5 B
RM	4,2 A	3,27 A	0,8 A	0,3 A	1,7 A	19,3 A	0,5 A	26,2 A
AP	6,1 A	2,53 A	1,0 A	0,2 A	1,4 A	20,7 A	0,6 A	20,6 B

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. AD= adaxial / AB= abaxial / BA= base / RM= região mediana / AP= ápice.

A sinuosidade das células epidérmicas também pode ser uma resposta às condições ambientais (Alquini *et al.*, 2003), pois aumentariam a superfície de contato entre células adjacentes (Wylie, 1943) proporcionando maior rigidez (Haberlandt, 1928). No entanto, para Arruda (1994) este caráter parece estar bem fixado geneticamente. Quanto às espécies estudadas, como as condições de cultivo foram semelhantes, este não foi um bom caráter distintivo.

A distribuição dos estômatos não diferiu nas duas espécies estudadas, sendo elas anfiestomática, com um maior número de estômatos na superfície abaxial. Estômatos nas duas superfícies foliares caracterizam algumas espécies da família Verbenaceae (Metcalf e Chalk, 1950; Inamdar, 1969) e são caracteres ecologicamente menos variáveis (Dilcher, 1974). As folhas anfiestomáticas geralmente apresentam maior quantidade de estômato na epiderme da superfície abaxial (Greulach, 1973), o que parece ser um mecanismo preventivo a fotoinibição, pois a superfície adaxial fica mais exposta aos raios solares devido à orientação horizontal da maioria das folhas (Smith *et al.*, 1998).

Os tricomas não secretores e secretores, observados para as duas espécies de *Lantana* estudadas, são amplamente distribuídos na família Verbenaceae (Solereider, 1908; Metcalf e Chalk, 1950) incluindo algumas espécies do gênero *Lantana* (Solereider, 1908; Metcalf e Chalk, 1950; Inamdar, 1969; Moura *et al.*, 2005). Tricomas têm sido considerados importantes ferramentas para a taxonomia (Theobald *et al.*, 1979), em especial os secretores (Solereider, 1908; Metcalf & Chalk, 1950; Fahn, 1979).

Os tricomas não secretores unicelulares visualizados nas duas espécies estudadas já foram descritos para o gênero (Solereider, 1908; Metcalf e Chalk, 1950) inclusive para *L. camara* (Inamdar, 1969; Moura *et al.*, 2005). A maior densidade destes tricomas na superfície adaxial de *L. camara*, pode estar relacionada a diversos fatores como, por exemplo, proteção contra radiação excessiva e altas temperaturas, como registrado na literatura (Hallahan and Gray, 2000; Valkama *et al.*, 2003). No entanto, a verdadeira função ecológica dos tricomas, na maioria das vezes não é respaldada por investigações experimentais, e sim apenas sujeita a conjecturas (Werker, 2000). Estudos sobre a penetração dos herbicidas nos tecidos vegetais são fundamentais para o sucesso do controle químico de plantas daninhas (Procópio, 2003) os caracteres anatômicos, praticamente,

determinam à facilidade com que esses produtos serão absorvidos (Hess and Falk, 1990). Tricomas na superfície foliar podem interceptar gotas pulverizadas, impedindo que estas alcancem a epiderme propriamente dita. A eficiência da absorção de herbicidas pelos tricomas e a translocação destes para as células epidérmicas ainda são parcialmente desconhecidas (Hess and Falk, 1990). Entretanto, de acordo com Hull (1970), parte da absorção de determinadas substâncias pode ocorrer via tricomas. Todavia, poucos autores afirmam serem os tricomas, em especial os não secretores, um bom caminho para a entrada de herbicidas. Hess and Falk (1990), verificaram na literatura relação negativa entre a aderência dos herbicidas nos tricomas e a eficácia destes produtos. Portanto, a alta densidade de tricomas não secretores na superfície adaxial de *L. camara* seria vantajosa para a espécie quando submetida a estratégias de controle químico. Já *L. radula* estaria mais susceptível ao controle químico inadequado já que não se trata de uma planta daninha. A baixa densidade de tricomas não secretores na superfície adaxial (Tabela 1) deixa as células epidérmicas mais expostas à ação dos agroquímicos.

Os diferentes tipos de tricomas secretores capitados descritos para as duas espécies (Figs. 5 e 6), representam importantes parâmetros distintivos. Membros da família Verbenaceae pode apresentar diferentes tipos de tricomas secretores. Considerando o número elevado de espécies de *Lantana* e as dificuldades existentes em classificá-las, são ainda poucos os trabalhos que descrevem tais estruturas e aproveitam-nas como caracteres para classificação. Nota-se, a falta de uma padronização na classificação destes tricomas o que limita o uso de características destas estruturas para fins taxonômicos (Moura *et al.*, 2005; Inamdar, 1969). Em Lamiaceae, família filogeneticamente relacionada à Verbenaceae e que apresentam diferentes tipos de tricomas capitados, as diversas propostas de classificação dos tricomas gera confusões e dificulta a comparação entre os trabalhos registrados na literatura (Werker, 1993; Ascensão *et al.*, 1999; Corsi and Bottega, 1999).

Os tricomas secretores, nas duas espécies, são mais abundantes na superfície abaxial que na adaxial. São plantas aromáticas que ocorrem em ambientes ensolarados e os tricomas estando protegidos na superfície abaxial, permitiriam que as secreções permanecessem por um tempo mais prolongado na planta. *L. camara* é uma planta rica em óleos essenciais (Alitonou *et al.*, 2004;

Misra and Laatsch, 2000; Randrianalijaona *et al.*, 2005) e esses compostos normalmente se volatilizam e são liberados sob altas temperaturas e baixa umidade. Em *L. radula* os tricomas (principalmente do tipo III) ocorrem em depressões, o que reforça a hipótese da proteção. Os tricomas secretores apresentam grande importância ecológica proporcionando uma maior interação da planta com o ambiente, interferindo de forma eficaz contra herbívoros e patógenos (Werker, 1993). A variação quanto à ocorrência de tricomas secretores foram considerados como uma importante característica distintiva entre *L. camara* e *L. radula*.

L. radula apresenta a superfície abaxial irregular formando depressões ao contrário, de *L. camara* que tem um aspecto o que representa um caráter adicional na distinção das espécies. O arranjo dorsiventral observado nas duas espécies de *Lantana* estudadas é característico para a família Verbenaceae (Metcalf and Chalk, 1950).

Os idioblastos secretores observados apenas em *L. camara* bem como os idioblastos, cristalíferos contendo estilóides observados somente em *L. radula* são úteis para distinguir essas duas espécies. Segundo Moura *et al.* (2005) esses idioblastos podem ser locais de biossíntese ou armazenamento de triterpenos pentacíclicos não-voláteis frequentemente isolados dessa planta (Ghisalberti, 2000; Sharma *et al.*, 2000). A morfologia e a distribuição dos cristais é um caráter constante dentro das espécies (Franceschi, 2005) podendo ser usado com fins taxonômicos (Prychid 2003; Lersten and Horner, 2000) além de indicar um rigoroso controle genético na sua deposição (Franceschi, 2005).

Os resultados aqui obtidos permitiram identificar caracteres foliares úteis para a distinção de duas espécies morfologicamente semelhantes de *Lantana* e a descrição anatômica de folha de *L. radula* é apresentada aqui pela primeira vez, o que contribui para o conhecimento da família Verbenaceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alquini Y, Bona C, Boeger MRT, Costa CG, Barros CF (2003) Epiderme. In: Glória BA, Guerreiro SMC (eds.) Anatomia Vegetal. UFV: Viçosa, pp 87-107
- Alitonou G, Avlessi F, Bokossa I, Ahoussi E, Dangou J, Sohounhloúé DCK (2004) Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* Linn. Comptes Rendus Chime 7: 1101-1105
- Alves MV, Estelita MEM, Wanderley MGL, Thomas WW (2002) Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich (Cyperaceae). Revista Brasileira de Botânica 25: 1-9
- Ascensão L, Mota L, Castro MM (1999) Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. Ann. Bot. 84: 437-447
- Arruda RCO (1994) Anatomia foliar de *Trilepis lhotzkiana* Ness. e *Trilepis ciliatifolia* T. Koyama Cyperaceae. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
- Barreto RW, Evans HC, Ellison CA (1995) The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. Mycological Research 99: 769-782
- Bieras AC, Sajo MG (2004) Anatomia foliar de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Cerrado do estado de São Paulo, Brasil. Acta Botanica Brasilica 18: 601-612
- Brito MF, Tokarnia CH, Dobereiner J (2004) A toxidez de diversas lantanas para bovinos e ovinos no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira 24: 153-159.
- Bukatsh, F. (1972) Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. Mikrokosmos, 61: 255.

- Bukovac MJ, Petracek PD, Fader RG, Morse RD (1990) Sorption of organic compounds by plant cuticles. *Weed Sci.* 38: 289-298
- Cardoso CMV, Sajo MG (2006) Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. *Acta Botanica Brasílica* 20: 657–669
- Corsi G, Bottega S (1999) Glandular hairs of *Salvia officinalis*: new data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. *Ann. Bot.* 84: 657-664
- Day MD, Willey CJ, Playford J, Zalucki MP (2003) *Lantana* current management status and future prospects. Australian, Australian Centre for International Agricultural Research
- Dilcher DL (1974) Approaches to the identification of angiosperms leaf remains. *The Botanical Review* 40: 1-157
- Dickison, WC (2000) Integrative plant anatomy. Academic Press, New York
- Fahn A (1979) Secretory tissues in plants. Academic Press, London
- Franceschi VR, Nakata PA (2005) Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 41-71
- Ghisalberti EL (2000) *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia* 71: 467-486.
- Greulach VA (1973) Plant function and structure. Collier Macmillan
- Hallahn DL., Gray JC (2000) Plant trichomes. Academic Press, San Diego
- Haberlandt G (1928) Physiological plant anatomy. Macmillan & Co. Ltda, London
- Herbert JM, Maffrand JP (1991) Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. *J. Nat. Prod.* 54: 1595-1600
- Hess FD, Falk RH (1990) Herbicide deposition on leaf surfaces. *Weed Sci.* 38: 280-288

- Howard RA (1979) The petiole. – In: Metcalfe, C. R. and Chalk, L. Anatomy of the Dicotyledons vol. 1. Oxford Clarendon Press, Oxford, 88-96
- Hull HM (1970) Leaf structure as related to absorption of pesticides and other compounds. Res. Rev. 31: 1-155
- Inamdar JA (1969) Epidermal structure and ontogeny of stomata in some Verbenaceae. Ann. Bot. 33: 55–66
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. New York, Mc Graw-Hill Book Co. Inc
- Kraus JE, Arduim M (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR
- Larcher W (2000) Ecofisiologia vegetal. São Carlos, Rima Artes e Textos
- Lersten NR, Horner HT (2000) Calcium oxalate crystal types and trends in their distribution patterns in leaves of *Prunus* (Rosaceae : Prunoideae). Plant Syst. Evol. 224: 83–96
- Metcalfe CR, Chalk L (1950) Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses vol I - Oxford: Oxford Clarendon Press
- Misra L, Laatsch H (2000) Triterpenoids, essential oil and photo-oxidative 28-13-lactonization of oleanolic acid from *Lantana camara*. Phytochemistry 54: 969-974
- Moura MZD, Isaias RMS, Soares GLG (2005) Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 148: 427–431
- O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne, Termarcaphi Pty. Ltda
- Prychid CJ, Furness CA, Rudall PJ (2003) Systematic significance of cell inclusions in Haemodoraceae and allied families: silica bodies and tapetal raphides. Ann. Bot. 92: 571–580

- Procópio SO, Ferreira EA, Silva EAM, Silva AA, Rufino RJN, Santos JB (2003) Leaf Anatomical Studies in Weed Species Widely Common in Brazil. III - *Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* and *Ipomoea cairica*. *Planta Daninha* 21: 1-9
- Randrianalijaona J., Ramanoelina PAR, Rasoarahona JRE, Gaydou EM (2005) Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta* 545: 46–52
- Reis C, Proença SL, Sajo MG (2004) Vascularização foliar e anatomia do pecíolo de Melastomataceae do cerrado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 18: 987-999
- Salimena FRG (2002) New synonyms and typifications in *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana* 40:121-125
- Sartori ALB, Tozzi AMGA (2002) Comparative leaflet anatomy in *Microcarpus* Allemão, *Myroxylon* L. f. and *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae-Papilionidae-Sophoreae) species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 13: 29-41
- Sharma OP, Makkar HPS, Dawra RK (1988) A review of the noxious planta *Lantana camara*. *Toxicon* 26: 975-987
- Silva TRS (1999) Redelimitação e revisão taxonômica do gênero *Lantana* L. Verbenaceae no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo
- Smith WK, Bell DT, Shepherd KA (1998) Associations between leaf structure, orientation and sunlight exposure in five western Australian Communities. *American Journal of Botany* 85: 56-63
- Solereder H (1908) *Systematic anatomy of the dicotyledons*. Oxford, Clarendon Press
- Souza S (1988) *La Flora du Beénin*, tome 3. Benin, Ed. Presse de Notre Dame

- Theobald WL, Krahulik JL, Rollins R (1979) Trichome description and classification. In: Metcalfe C R. and Chalk L eds. 1979. In: *Anatomy of the dicotyledons*, vol. I. Systematic anatomy of the leaf and stem. Oxford, Oxford Clarendon Press, pp 40-53
- Valkama E, Salminen JP, Koricheva J, Pihlaja K (2003) Comparative analysis of leaves trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish Birch species. *Ann. Bot.*, 91: 643-655
- Weenen H, Nkunya HH, Bray DH, Mwasumbi LB, Kinabo LS., Kilimali VAEB (1990) Antimalarial activity of tanzanian medicibal plants. *Planta Med.* 56: 368-370
- Werker E (1993) Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 8:249-255
- Werker E (2000) Trichome diversity and development. In: Hallahan DL, Gray JC, Callow JA, eds. *Advances in botanical research, incorporating advances in plant pathology - Plant trichomes*. San Diego: Academic Press 31: 1-35
- Wylie RB (1943) The role of epidermis in the foliar organization and its relations to the minor venation. *Am. J. Bot.* 30: 273-280

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO E HISTOLOCALIZAÇÃO DOS COMPOSTOS SECRETADOS DE *Lantana camara* L. E *L. radula* SW. E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Resumo: As Verbenáceas secretam compostos de natureza diversa que podem atuar na proteção contra patógenos e herbívoros. A presença de tricomas secretores em espécies de *Lantana* despertou pra o estudo histoquímico bem como para a verificação de sua atividade biológica. Os testes histoquímicos evidenciaram diferenças nos secretados dos três tipos de tricomas capitatos de *Lantana camara* e *L. radula* e nos idioblastos de *L. camara*. As substâncias detectadas são de natureza mista (lipofílicos e hidrofílicos) e podem estar relacionadas a estratégias de defesa química nessas espécies. Dentre os terpenóides, óleos essenciais foram evidenciados em todos os tipos de tricomas capitatos e nos idioblastos. Os componentes majoritários identificados no óleo essencial de *L. camara* são germacreno-D (19,8%) e *E*-cariofileno (19,7%) e de *L. radula* são *E*-cariofileno (25,3%) e fitol (29,2%). A atividade fungistática observadas sobre *Corynespora cassiicola* pelo óleo das duas espécies foi muito maior para o óleo de *L. radula* do que para o de *L. camara*. Provavelmente, a presença dos compostos *E*-nerolidol (19,0%), identificado somente no óleo de *L. radula*, e o teor mais elevado do fitol (29,2%) possa justificar a diferença na atividade biológica.

Palavras-chave: tricomas secretores capitados, idioblastos secretores, histoquímica, Verbenaceae, óleo essencial, *Corynespora cassiicola*.

Abstract: Verbenáceas secrete composed of several nature that can act in the protection against patógenos and herbivores. The presence of capitate trichomes in species of Lantana woke up for the study histochemical as well as for the verification of your biological activity. The histochemical tests showed differences in secretion of the three types of capitate trichomes of *Lantana camara* and *L. radula* and in idioblasts of *L. camara*. The detected substances are of a mixed nature (lipophilicus and hydrophilicus) and they can be related to strategies of chemical defense in these species. Among the terpenoids, essential oils were appeared in all types of capitate trichomes and idioblasts. The main components identified in essential oil of *L. camara* are germacrene- D (19.8 %) and *E*- caryophyllene (19.7 %) and of *L. radula* are *E*- caryophyllene (25.3 %) and phytol (29.2 %). The fungistactic activity in *Corynespora cassicola* demonstrated that the oil of *L. radula* is more inhibitory to the growth of the colonies than *L. camara*. Probably the presence of compounds *E*-nerolidol (19.0 %) identified only in the oil of *L. radula*, and phytol (29.2 %) can justify the difference in biological activity.

Key-Words: capitate trichome secretors, idioblast secretores, histochemical, Verbenaceae, essential oil, *Corynespora cassicola*.

1. INTRODUÇÃO

Metabólitos produzidos pelas plantas podem apresentar composição química diversa e complexa, exercendo funções distintas conforme os sítios onde são secretados (Fahn 1979). A família Verbenaceae destaca-se pelo elevado número de espécies aromáticas que secretam óleos essenciais pelos tricomas secretores (Metcalf & Chalk, 1950; Inamdar, 1969; Combrinck, *et al.*, 2007). Apesar deste conhecimento geral são poucos os trabalhos sobre a histolocalização dos compostos secretados em espécies de Verbenaceae. Os óleos essenciais podem atuar na proteção contra o ataque de herbívoros e patógenos (Werker, 1993).

Lantana camara (Verbenaceae) é uma espécie invasora de difícil controle (Day *et al.*, 2003). Nesta foi verificada infestação pelo patógeno *Corynespora cassiicola*, tendo sido alvo de investigação para controle biológico (Pereira, 2001). Entretanto, o óleo essencial produzido por *L. camara* pode exercer atividade fungistática sobre *C. cassiicola*, interferindo no controle biológico, já que espécies de *Lantana* são produtoras de óleos essenciais com atividade fungistática (Deena & Thoppil, 2000; Hernandez *et al.*, 2005).

Portanto, conhecer a composição química do óleo e identificar os sítios de secreção na planta, permitirão estabelecer uma relação da produção com a capacidade de infecção do fungo, contribuindo para o esclarecimento do patossistema *C. cassiicola/L. camara*.

Lantana camara apresenta tricomas secretores e idioblastos dípersos pelo mesófilo, os quais secretam substâncias lipídicas (Moura *et al.*, 2005). Entretanto, a natureza química dos compostos secretados por *L. camara* costuma ser heterogênea e complexa, já tendo sido identificadas substâncias como alcalóides, as lactonas sesquiterpênicas e os flavonóides, componentes de defesa química vegetal (Harbone, 1993; Ascensão *et al.*, 1999; Combrinck *et al.*, 2007).

L. camara e *L. radula* são plantas morfologicamente semelhantes (Capítulo 1), entretanto, em plantas cultivadas e mantidas em casa de vegetação foi possível notar odor distinto entre elas. Tal observação sugere a produção de óleos de composição química diferente nas duas espécies, sendo que apenas para *L. camara* tal composição é conhecida (Deena & Thoppil, 2000; Misra &

Laatsch, 2000; Alitonou *et al.*, 2004; Randrianalijaona *et al.*, 2005), havendo variações na concentração de seus componentes conforme a origem.

Quanto à composição química do óleo essencial de *L. radula*, não foram encontradas referências, tampouco relatos de ocorrência do patógeno *C. cassiicola*. Este trabalho teve por objetivos proceder a histolocalização dos produtos secretados e identificar a composição química do óleo essencial de *L. camara* e *L. radula* e avaliar a atividade fungitóxica desses óleos sobre *C. cassiicola*, visando contribuir com informações úteis para o controle biológico de espécies invasoras.

2. MATERIAS E MÉTODOS:

2.1. Material vegetal:

Os experimentos foram conduzidos com plantas de *L. camara* e *L. radula*, mantidas em casa de vegetação no Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais – Brasil. A identidade das plantas foi confirmada por especialista e amostras herborizadas foram depositadas no Herbário VIC (sob número: 30159 - *L. camara* e 30160 - *L. radula*) do Departamento de Biologia Vegetal, da UFV.

2.2. Testes histoquímicos:

Os testes histoquímicos foram aplicados em cortes transversais da lâmina foliar de amostras frescas, acompanhados pelos respectivos controles. Parte dos cortes não foram submetida aos reagentes, visando identificar a coloração e/ou aspecto natural do composto secretado. Foram utilizados os reagentes: Sudan III (Pearse, 1980) e Sudan Vermelho B (Brundett *et al.*, 1991) para lipídios totais; Sulfato Azul do Nilo (Cain, 1947) para lipídios ácidos e neutros; reagente de Nadi (David & Carde, 1964) para terpenóides; tricloreto de antimônio para esteróides (Hardman & Sofowora, 1972; Mace *et al.*, 1974); ácido sulfúrico para lactonas sesquiterpênicas (Geissmen & Griffin, 1971); 2,4 dinitrofenilidrazina para terpenóides com grupo carbonila (Ganter & Jollés,

1969; 1970); dicromato de potássio para compostos fenólicos gerais (Gabe, 1968); vanilina clorídrica para taninos (Mace & Howell, 1974); floroglucinol para lignina (Johansen, 1940); reagente de Dittmar e Wagner para alcalóides (Furr & Mahlberg, 1981); lugol (Jensen, 1962); vermelho de Rutênio para pectinas (Johansen, 1940); ácido tânico/cloreto de ferro III para mucilagens (Pizzolato & Lillie, 1973); Xilidine Ponceau para proteínas (O'brien & Maccully, 1981).

A análise do laminário e a documentação fotográfica foram feitas utilizando-se um microscópio de luz (Olympus AX 70), conectado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo).

Os tricomas foram classificados em capitados do tipo I, II e III, de acordo com a literatura (Capítulo 1).

2.3. Extração do óleo essencial:

Folhas sadias totalmente expandidas entre o 3º e o 5º nó, do ápice para a base, de plantas adultas foram coletadas ao acaso em espécimens sob investigação. De cada amostra foram utilizadas 40 gramas de folha, sendo realizadas triplicata. O processo de extração utilizado em todas as repetições foi a hidrodestilação, utilizando-se aparelho do tipo Clevenger modificado, por um período de três horas. O óleo obtido foi extraído em funil de separação com pentano (3 x 10 mL) e seco com sulfato de magnésio anidro para posterior retirada do solvente em evaporador rotativo. Os óleos resultantes foram pesados em balança analítica com precisão e os rendimentos determinados. As amostras dos óleos obtidas foram transferidas para frascos de vidro e armazenadas sob atmosfera de nitrogênio em freezer a -20 °C, até o momento das análises.

As análises dos óleos essenciais das folhas de *L. camara* e *L. radula* foram realizadas por Cromatografia Gasosa (CG) em aparelho Shimadzu GC 17-A com detector de ionização de chama (FID) (análise quantitativa) e por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) em equipamento Shimadzu GGEM QP5050A (análise qualitativa).

O peso seco da folha foi obtido calculando-se paralelamente para cada amostra (2 g, seco a 103 ± 2 ° C por 24 horas) de acordo com método publicado (ASAE, 2000), sendo realizadas em triplicata.

2.4. Análises: cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa

2.4.1. Cromatografia gasosa (GC)

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas usando-se um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A conectado com um detector de ionização em chama (FID) e equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,32 mm, espessura do filme de 0,25 µm). A temperatura do injetor foi de 220 °C e do detector de 240 °C. O gás de arraste utilizado foi o N₂ e fluxo programado de 1,8 ml/ min. A temperatura programada inicialmente foi de 60 °C chegando a 240 °C na proporção de 3 °C/min, isotérmica de 240 °C por 15 minutos. O volume da injeção foi de 1,0 µL (1% de solução em CH₂Cl₂), no modo split, com razão de 1:10; pressão da coluna de 166 kPa. Triplicatas das amostras foram processadas usando-se o as mesmas condições cromatográficas. A composição percentual da amostra de óleo foi computada pelas áreas dos picos do CG por integração da totalidade dos cromatogramas; os dados foram calculados como valores médios de três injeções para cada amostra de óleo.

2.4.2. Cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa (CG/MS)

As análises do óleo foram realizadas em aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A equipado com detector de ionização operando com modo Impacto de Elétrons a 70 eV e equipado com coluna de sílica DB-5 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm). A temperatura do injetor/detector, programa térmico e o volume de injeção foram programados como acima (CG); o gás de arraste utilizado foi o hélio. A injeção dos padrões de hidrocarbonetos foi feita nas mesmas condições analíticas das amostras de óleo possibilitando o calculado do índice de Kovats (C10–C26) (SIGMA Chem. Comp.). As identificações dos componentes foram baseadas na comparação

do tempo de retenção com a literatura (Adams, 1995) e pela comparação dos espectros de massa com referências do banco de dados (Wiley 330,000).

2.5. *Teste de inibição do crescimento micelial*

O óleo obtido dissolvido em Tween 20 foi testado para a atividade antifúngica *in vitro* pela “Poison Food technique” (Dhingra & Sinclair, 1995). O meio utilizado para o teste com o fungo *C. cassiicola* foi o caldo de vegetais ágar (CVA/esterilizado) (SANTOS-SEIXAS et al., 2000). O óleo foi incorporado ao meio nas concentrações de 1000, 3000, 5000 e 10000 mg L⁻¹ (Tween 0,1%) o qual foi então agitado vigorosamente, e vertido em placas de Petri esterilizadas (60 mm de diâmetro) até a sua solidificação. As placas de Petri com meio misturado com óleo foram semeadas no centro com discos de ágar contendo colônias do fungo (5 mm de diâmetro) retiradas das margens das colônias de placas e incubadas a 25±2 °C. Os controles foram realizados paralelamente contendo meio misturado com Tween 20 (Tween na concentração de 0,1%). O período de incubação foi de 8 dias e o efeito do óleo no crescimento do micélio do fungo (mm) foi determinado pela medida do crescimento radial de *C. cassiicola* nos intervalos do 1º ao 8º dia após o semeio. O crescimento micelial do fungo exposto ou não ao óleo de *L. camara* e *L. radula* em ambos, tratamento e controle, em placas de Petri foram medidos em 4 diferentes direções. A inibição do crescimento foi expressa com percentual em relação ao crescimento radial médio da colônia na placa controle. Todos os bioensaios foram realizados em 4 replicatas cada repetição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Idioblastos e tricomas secretores*

Os tricomas secretores são amplamente distribuídos em espécies da ordem Lamiales (Solereeder, 1908), onde se insere a família Verbenaceae (Judd et al., 1999). A análise histoquímica possibilitou confirmar a presença de compostos de natureza química heterogênea, diversa e complexa no secretado dos três tipos de tricomas capitados de *L. camara* e *L. radula* e nos

idioblastos de *L. camara*. Os resultados dos testes histoquímicos aplicados encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Em *L. camara* os tricomas capitados do tipo I (Figs. 1A a 1F), reagiram positivamente aos testes para lipídios totais (Fig. 1B), lipídios ácidos (Fig. 1C) e terpenóides do tipo óleo essencial (não documentado). Além dos compostos lipídicos foram evidenciados: compostos fenólicos (Fig. 1D), alcalóides (Fig. 1E), pectinas (Fig. 1F) e mucilagem. Os capitados do tipo II (Figs. 1G a 1N), secretam ainda terpenóides com grupo carbonilo (Fig. 1J) e proteínas, compostos não observados nos tricomas do tipo I. As principais diferenças verificadas para os tricomas capitados do tipo III (Figs. 1O a 1U) foram à presença de lipídios neutros (Fig. 1Q), óleo-resina (Fig. 1R) e lactonas sesquiterpênicas (Fig. 1S). Em relação ao conteúdo dos idioblastos (Tabela 1), este respondeu positivamente à presença de substâncias lipídicas (Sudan III, Sudan Vermelho B, sulfato azul do Nilo) e polissacarídeos (Vermelho de Rutênio). Estes resultados estão de acordo com os estudos fitoquímicos das folhas de *L. camara* que determinaram à presença de triterpenóides, esteróides, carboidratos, lactonas, proteínas, flavonóides, resinas, taninos e óleos não voláteis (Verma & Verma, 2006).

Em *L. radula* os tricomas capitados do tipo I (Figs. 2A a 2D) reagiram positivamente aos testes para lipídios ácidos (Fig. 2B), terpenóides do tipo óleo essencial (não documentado) e proteínas (Fig. 2D). Quanto à presença de alcalóides os resultados não foram conclusivos, pois se verificou reação positiva somente ao reagente de Wagner (Fig. 2C). Os tricomas capitados do tipo II (Figs. 2E a 2J), diferiram do tipo I por conter terpenos com grupo carbonilo (Fig. 2H), compostos fenólicos (Fig. 2I) e pectinas (não documentado). Já os tricomas capitados do tipo III (Figs. 2L a 2U) diferiram dos demais por conter esteróides (Fig. 2P) e lactonas sesquiterpênicas (Fig. 2Q).

Os compostos comuns aos três tipos de tricomas das duas espécies avaliadas são óleos essenciais, compostos fenólicos, alcalóides, polissacarídeos e proteínas. Secreção de óleo-resina somente foi verificada nos tricomas do tipo III de *L. camara*. Este mesmo tipo de tricoma também secreta lactonas sesquiterpênicas e esteróides em ambas as espécies avaliadas, destacando-se como o tipo de tricoma cuja secreção foi mais heterogênea dentre as estruturas secretoras observadas. Os

Tabela 1. Grupos de metabólitos testados nos tricomas e nos idioblastos secretores.

GRUPO DE COMPOSTOS	REAGENTES	<i>Lantana camara</i>				<i>Lantana radula</i>		
		TI	TII	TIII	ID	TI	TII	TIII
LIPÍDIOS	Sudan III	+	+	+ Fig.1	+	+ Fig.2	nc	+ Fig.2
	Sudan Vermelho B	+ Fig.1	+ Fig.1	nc	+	+	+ Fig.2	+
	Sulfato Azul do Nilo	+ Fig.1	+	+ Fig.1	+	+	+	+ Fig.2
TERPENÓIDES	Reagente de Nadi	+	+ Fig.1	+ Fig.1	+	+	+ Fig.2	+ Fig.2
	Tricloreto de Antimônio	-	-	-	-	-	-	+ Fig.2
	Ácido Sulfúrico	-	-	+ Fig.1	-	-	-	+ Fig.2
	2,4dinitro-fenilhidrazina	-	+ Fig.1	+ Fig.1	-	-	+ Fig.2	-
COMPOSTOS FENÓLICOS	Dicromato de Potássio	+ Fig.1	+ Fig.1	+	-	-	+ Fig.2	+ Fig.2
	Vanilina Clorídrica	-	-	-	-	-	-	-
	Floroglucinol	-	-	-	-	-	-	-
ALCALÓIDES	Reagente de Dittmar	+ Fig.1	+ Fig.1	+ Fig.1	-	nc	+	+ Fig.2
	Reagente de Wagner	+	+	+	-	+ Fig.2	nc	+ Fig.2
POLISSACARÍDEOS	Vermelho de Rutênio	+ Fig.1	+ Fig.1	-	+	-	+	+ Fig.2
	Ácido tânico/ Cloreto de Ferro III	+	-	-	-	-	-	-
PROTEINAS	Xilidine Ponceau (XP)	+	+	+	-	+ Fig.2	+ Fig.2	+

+ = positivo; - = negativo; nc= não conclusivo.

resultados dos testes histoquímicos indicam os tricomas secretores como os principais sítios de secreção e ou acúmulo de compostos de interesse econômico.

Os compostos fenólicos gerais, detectados nos tricomas das duas espécies estudadas, já foram relatados para extratos foliares de *L. camara*, aos quais foi atribuída atividade alelopática (Singh *et.al.*, 1989). Tais compostos são geralmente associados às estratégias de defesa químicas das plantas (Seigler, 1995; Buchanan *et al.*, 2000) exibindo atividade biológica de interesse comercial. Porém, nas duas espécies as reações foram negativas para compostos fenólicos do tipo tanino, o que está de acordo com os resultados obtidos para *Plecthranthus ornatus* (Ascensão *et al.*, 1999) da família Lamiaceae, que é filogeneticamente próxima a Verbenaceae (Judd *et al.*, 1999).

Alcalóides foram observados nos três tipos de tricomas secretores das duas espécies, embora haja dúvidas quanto as reações para os tricomas do tipos I e II de *L. radula*. Esse grupo de compostos tem despertado interesse de pesquisadores devido a suas propriedades farmacológicas (Seigler, 1995; Buchanan *et al.*, 2000).

Quanto aos compostos hidrofílicos (polissacarídeos e proteínas), os resultados confirmam dados de literatura que apontam secreção de natureza mista para os tricomas capitados, semelhantes aos observados nas duas espécies de *Lantana* estudadas (Serrato–Valenti *et al.*, 1997; Ascensão *et al.*, 1999; Bottega & Corsi, 2000; Marin *et al.*, 2006). No entanto, nenhuma explicação satisfatória foi encontrada para justificar a presença dessa secreção viscosa nesses tricomas (Serrato–Valenti *et al.*, 1997).

Os terpenóides, também verificados nos tricomas das duas espécies, correspondem a uma classe de compostos também envolvidos na defesa química das plantas (Seigler, 1995; Buchanan *et al.*, 2000) e são os principais constituintes dos óleos de *L. camara* (Arora & Kohli, 1993). Os óleos essenciais e ácidos resiníferos apresentam reconhecidas propriedades como inibidores da germinação, agem na proteção contra predadores, entre outras (Harbone, 1993). Dentre os terpenóides, os monoterpenos e os sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais de plantas (Seigler, 1995; Buchanan *et al.*, 2000). Os esteróides, encontrados somente no tricoma do tipo III de *L. radula*, são triterpenos que conferem às plantas defesa contra predadores

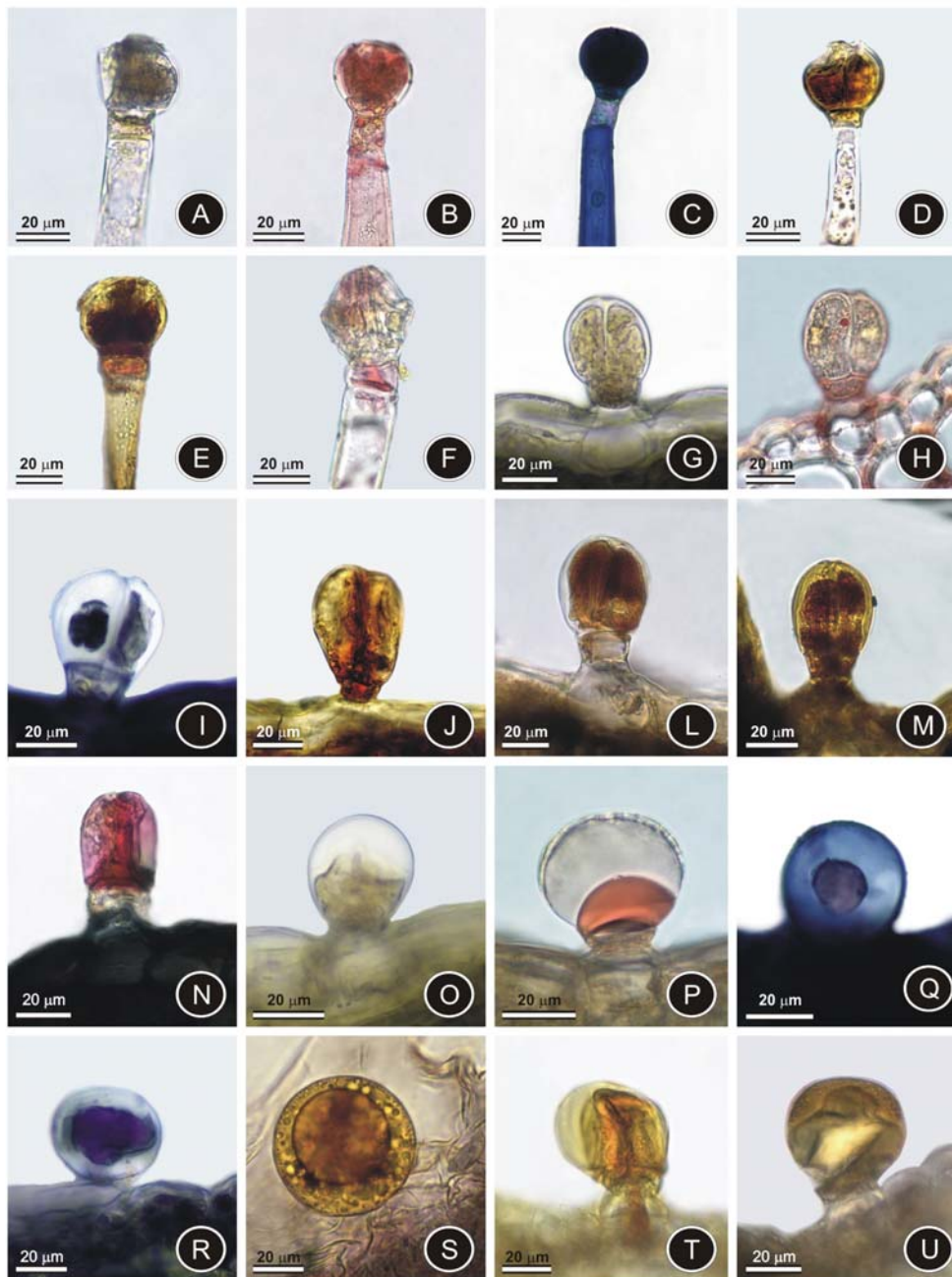


Fig. 1 - Tricomas capitatos em *L. camara* submetidos aos testes histoquímicos. A, G e O - Á fresco. B, H – Sudan Vermelho. P – Sudan III. C e Q – Sulfato Azul do Nilo. D e L - Dicromato de Potássio. E, M e U – Reagente de Dittmar. F e N – Vermelho de Rutênio. J e T - 2-4 Dinitrofenilhidrazina I e R – Reagente de Nadi. S - Ácido Sulfúrico. A a F – Tipo I. G a N – Tipo II. O a U – Tipo III.

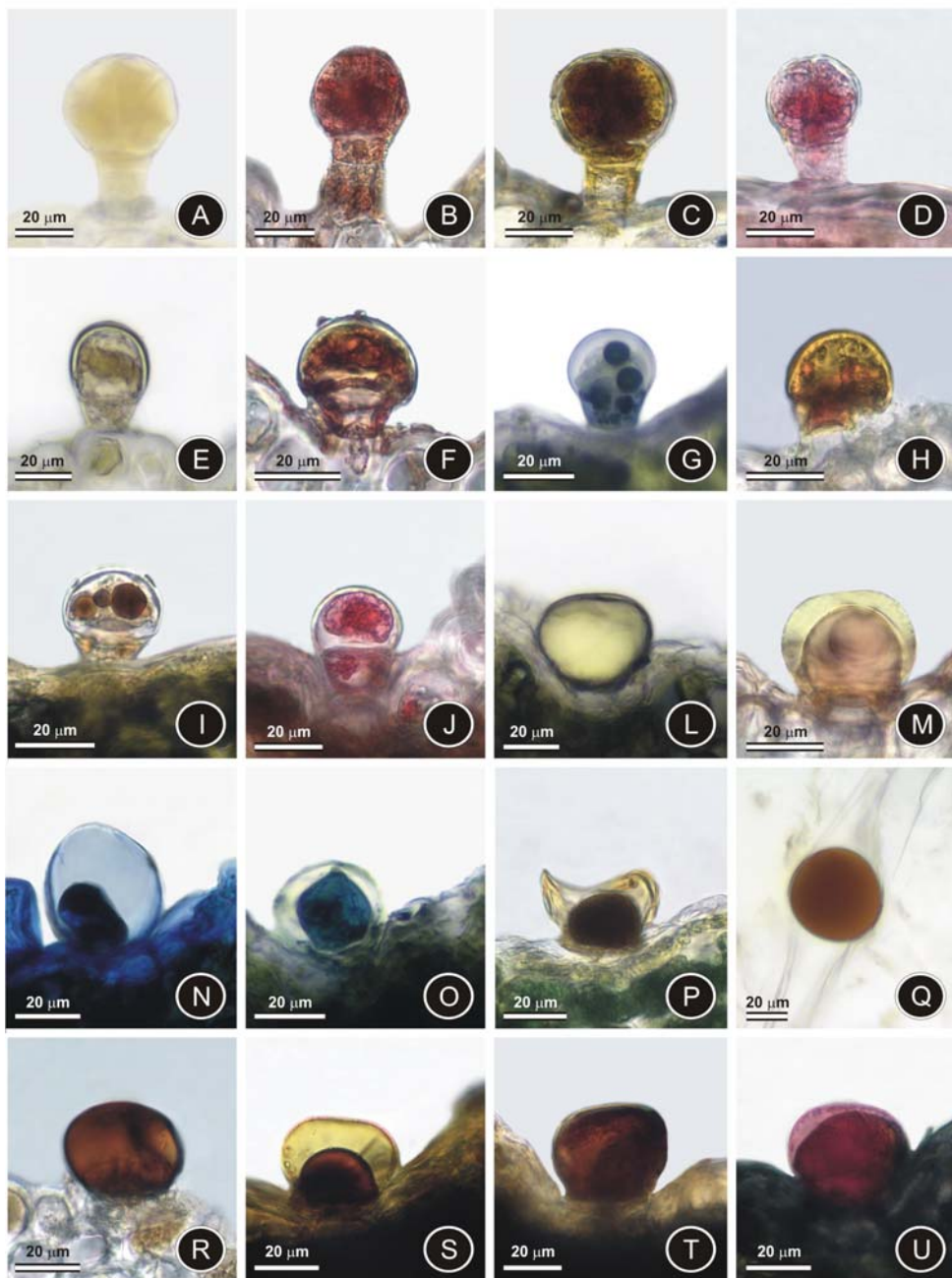


Fig. 2 - Tricomas capitatos em *L. radula* submetidos aos testes histoquímicos. A, E e L - À fresco. B e F – Sudan Vermelho B. C e T – Reagente de Wagner. D e J – Xilidine Ponceau. G e O - Reagente de Nadi. F e H- 2,4-Dinitrofenilidrazina. I e R – Dicromato de Potássio. M – Sudan III. N – Sulfato Azul do Nilo. P – Tricloreto de Antimônio. Q - Ácido Sulfúrico. S – Reagente de Dittmar. U – Vermelho de Rutênio. A a D – Tipo I. E a J – Tipo II. L a U – Tipo III.

(Seigler, 1995; Buchanan *et al.*, 2000). As lactonas sesquiterpênicas foram detectadas somente nos tricomas do tipo III nas duas espécies. Esse grupo de compostos tem sido estudado devido suas diversas atividades biológicas (Bharel *et al.*, 1996; Barbosa *et al.*, 2002).

3.2. Componentes do óleo essencial

A detecção de óleos essenciais pelos testes histoquímicos nos tricomas e idioblastos de *L. camara* e nos tricomas de *L. radula* contribuiu para as análises químicas, confirmando as diferenças entre elas. Quanto aos teores dos óleos essenciais, *L. camara* produz cerca de três vezes (0,09% \pm 0,005) mais óleo que *L. radula* 0,03% \pm 0,006. Em relação aos teores de água nas folhas, *L. camara* apresenta cerca de 79% \pm 0,51 e *L. radula* 67% \pm 0,01. O estudo químico revelou que as plantas de *L. camara* apresentaram um rendimento do óleo (0,09%) inferior aos obtidos em outros trabalhos onde os teores de óleo observados foram de 0,22% (Alitonou *et al.*, 2004) e 0,06% (Misra & Laatsch, 2000) o que podem ser ocasionado pelas condições ambientais. O óleo de *L. radula* apresentou o menor rendimento (0,03%) sendo que não há dados anteriores na literatura para essa espécie. As observações realizadas em casa de vegetação indicavam possíveis diferenças na composição do óleo das duas espécies que puderam ser confirmadas por meio de análises cromatográficas. Os componentes dos óleos essenciais de *L. camara* (19 compostos) e *L. radula* (9 compostos) foram identificados por CG-MS e CG respectivamente (Tabela 2; Figs. 3, 4 e 5). *L. camara* e *L. radula* apresentam como componentes comuns em seus óleos os seguintes compostos: tetradecano, *E*-cariofileno, α -humuleno, β -*E*-farneseno, germacreno-D, biciclogermacreno e fitol. Os dois componentes majoritários do óleo de *L. camara* são o germacreno D (19,8%) e o *E*-cariofileno (19,7%). A espécie *L. camara* apresenta ainda dois componentes representativos que são o biciclogermacreno (11,7%) e o α -humuleno (9,3%). Os quatro principais constituintes do óleo de *L. camara* juntos perfazem cerca de 60,5% de todo o óleo ficando os 17 componentes restantes distribuídos dentre os 39,5% do óleo dessa espécie (Fig. 6). Os quatro principais compostos constituintes do óleo de *L. radula* são o *E*-cariofileno (25,3%), o germacreno-D (17,6%), *E*-nerolidol (19,0%) e o fitol (29,2%). Em *L. radula* os quatro principais constituintes do

óleo somados representam 91,1% de todo o óleo sendo que os 8,9% restantes correspondem aos 5 outros componentes presentes no óleo desta espécie (Fig. 7).

Embora os óleos de *L. camara* e de *L. radula* tenham apresentado muitos constituintes químicos em comum e sejam secretados nos mesmos tipos de tricomas capitatos, a concentração dos mesmos variou entre as espécies. Dentre os quatro componentes majoritários de cada espécie somente o *E*-cariofileno e o germacreno-D são comuns a ambas, sendo que *L. camara* tem composição química mais diversificada que *L. radula*. Cabe ressaltar que morfológicamente *L. camara* difere de *L. radula* por apresentar idioblastos secretores de óleos essenciais, o que pode estar relacionado com a maior diversidade de componentes observados nesta espécie.

A composição química do óleo essencial da *L. camara* é variável, sendo relatado na literatura quimiotipos contendo os compostos germacreno-D (28,4%); γ -curcumeno + ar-curcumeno (27,6%) ou até mesmo o limoneno (16,5%) como constituintes majoritários (Silva et al., 1999). Já as plantas de *L. camara* cultivadas em Viçosa têm como componentes majoritários do seu óleo essencial o germacreno-D (19,8%) e o *E*-cariofileno (19,7%). Essa mesma planta apresentou diferenças na composição do seu óleo também em relação a plantas de outros locais como África (Alitonou et al., 2004) e Índia (Deena & Thoppil, 2000; Misra & Laatsch, 2000). O óleo de algumas dessas plantas apresentam componentes comuns à espécie estudada: β -gurjunene, germacreno-D e biciclogermacreno (Misra & Laatsch, 2000) e α -copaeno, β -elemeno, e α -humuleno (Alitonou et al., 2004), mas estes componentes variam na sua concentração em cada óleo. Embora essa variação química no óleo de *L. camara* (Silva et al., 1999; Misra & Laatsch, 2000; Alitonou et al., 2004) possa ser atribuída a caracteres ambientais, essas diferenças também refletem a diversidade genética encontrada nesse grupo (Spies, 1984; Brandão et al., 2007).

3.3. Bioensaio

Estudos têm demonstrado a importância dos componentes do metabolismo secundários na interação da planta com o ambiente biótico e abiótico (Harbone, 1993). O bioensaio conduzido com o óleo essencial extraído das folhas de *L. camara* (Fig. 8A) e *L. radula* (Fig. 8B) em placa de

Petri demonstrou que o óleo de *L. radula* ocasiona uma maior inibição no crescimento do fungo *C. cassiicola*. No bioensaio as colônias do fungo do tratamento controle atingiram cerca de 2,5 cm de raio no último dia de avaliação. Durante o período avaliado, pode-se observar que, na medida em que se aumentava a concentração dos óleos provenientes das duas espécies, havia um aumento na inibição do desenvolvimento das colônias do fungo (Fig. 8A e 8B). Nos dois primeiros dias de avaliação notou-se que o óleo de *L. camara* (Fig. 9) na concentração de 1.000 mg L⁻¹, causou uma redução no crescimento das colônias do fungo de aproximadamente 25,0 e 19,6%, respectivamente. O óleo de *L. camara* inibiu completamente o crescimento do fungo (100%) no primeiro dia de avaliação nas demais concentrações (3.000, 5.000 e 10.000 mg L⁻¹). Na concentração de 1.000 mg L⁻¹ esta taxa de inibição (100%) se manteve até o segundo dia. No oitavo dia de avaliação o óleo reduziu o desenvolvimento total médio das colônias nas concentrações de 1.000 (12%), 3000 (17%), 5.000 (27,2%) e 10.000 (49,25%) mg L⁻¹ em relação ao controle. O crescimento total médio da colônia do fungo no tratamento com o óleo de *L. camara* a 1.000 mg L⁻¹ foi cerca de 2,2 cm de raio no último dia avaliado. Nas concentrações de 3.000, 5.000 e 10.000 mg L⁻¹ as colônias atingiram em média 2,1; 1,8 e 1,3 cm de raio, respectivamente.

No primeiro dia de avaliação as concentrações de 1.000 e 3.000 (Fig. 8B) mg L⁻¹ do óleo de *L. radula* (Fig. 10) ocasionaram uma inibição de 17,2% e 40,6%, respectivamente. Já o óleo de *L. radula* nas concentrações de 5.000 e 10.000 mg L⁻¹ (Fig. 8B e 10) inibiram completamente o crescimento do fungo no primeiro dia de avaliação (100%). Ao final do experimento pode-se comprovar que o óleo de *L. radula* reduziu de forma acentuada o crescimento total das colônias de *C. cassiicola* em placa de Petri nas concentrações de 3.000 (23,2 %), 5.000 (42,25 %) e 10.000 (60,75 %) mg L⁻¹. Neste mesmo dia e nestas concentrações do óleo de *L. radula* o fungo apresentou crescimento total médio de 1,9; 1,4 e 1,0 cm de raio, respectivamente. Já na concentração de 1.000 mg L⁻¹ o fungo cresceu 2,4 cm de raio ocasionando uma redução de apenas 4,7 % no crescimento da colônia.

O bioensaio em placa de Petri demonstrou que a proporção de crescimento total das colônias está diretamente relacionada com a capacidade do fungo de vencer os primeiros dias de

Tabela 2 – Tempo de retenção e percentagem relativa dos componentes do óleo essencial de *L. camara* e *L. radula*.

Pico no.	Composto ^a	Índice de retenção de Adams ^b	Índice de retenção calculado	<i>L. camara</i> Área (%)	<i>L. radula</i> Área (%)
1	Alfa-Copaeno	1376	1374	1,1 ±0,12	-
2	Beta-Elemeneno	1391	1390	3,2 ±0,51	-
3	Tetradecano	1399	1399	1,0 ±0,55	1,8 ±0,26
4	<i>E</i> -Cariofileno	1418	1418	19,7 ±3,32	25,3 ±5,47
5	Beta-Gurjuneno	1434	1427	1,2 ±0,15	-
6	Alfa-Humuleno	1454	1451	9,3 ±0,30	1,2 ±0,06
7	Beta-Farneseno (E)	1458	1458	1,3 ±0,20	Tr
8	Germacreno-D	1480	1479	19,8 ±1,40	17,6 ±1,21
9	Biciclogermacreno	1494	1493	11,7 ±0,67	4,0 ±0,10
10	Alfa-Muuroleno	1499	1498	1,5 ±0,15	-
11	Germacreno-A	1503	1501	2,5 ±0,36	-
12	Cubeol	1514	1511	2,5 ±1,14	-
13	Delta-Cadineno	1524	1520	2,4 ±0,35	-
14	<i>E</i> -Nerolidol	1564	1562	-	19,0 ±3,56
15	Germacreno-D-4-ol	1574	1567	1,2 ±0,30	-
16	Oxido de Cariofileno	1581	1579	-	1,7 ±0,67
17	Davanona	1586	1572	1,2 ±0,58	-
18	Globulol	1587	1581	0,7 ±0,40	-
19	Humuladienona*	-	1594	1,2 ±0,36	-
20	Epi-Alpha-Muurolol	1641	1638	4,8 ±0,32	-
21	Fitol	2106	2092	4,0 ±1,45	29,2 ±5,23
Componentes identificados (%)				86,3	99,8

tr, componente traço < 0,1.* Identificação com GC-MS/Não representado.^a Compostos listados por ordem de eluição. ^b RI índice de retenção: medida relativa para n-alcenos na coluna DB-5.

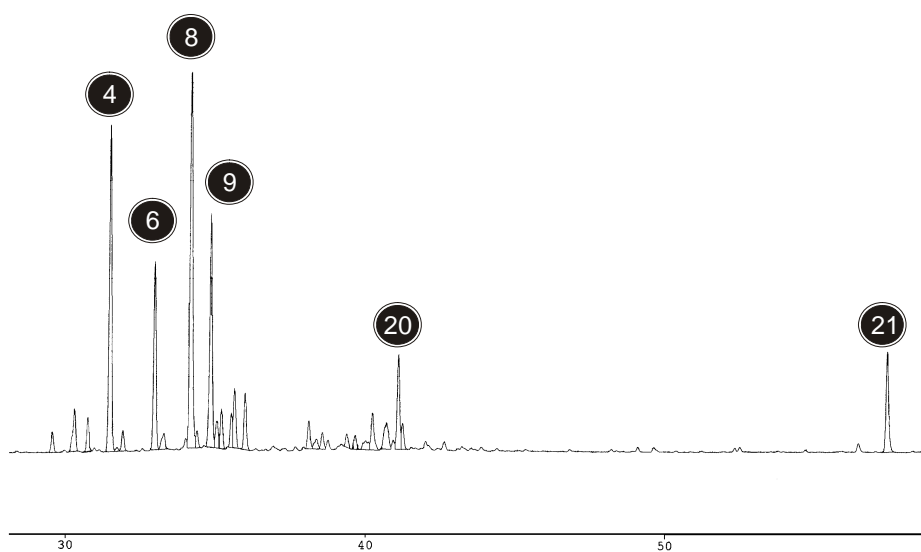


Fig. 3 - Cromatograma do óleo essencial de *L. camara* com os componentes majoritários numerados de acordo com a Tabela 1 (CG-FID).

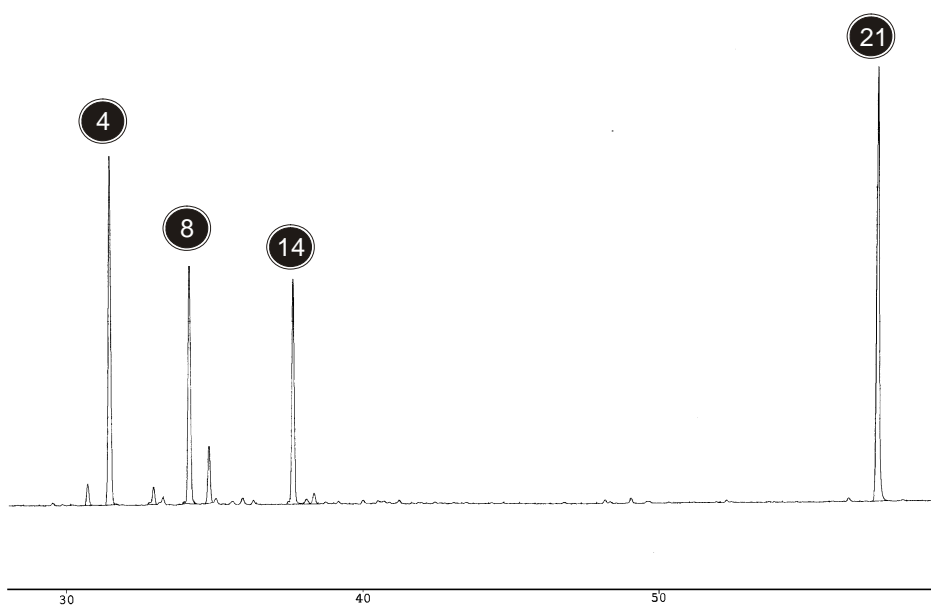


Fig. 4 - Cromatograma do óleo essencial de *L. radula* com os componentes majoritários numerados de acordo com a Tabela 1 (CG-FID).

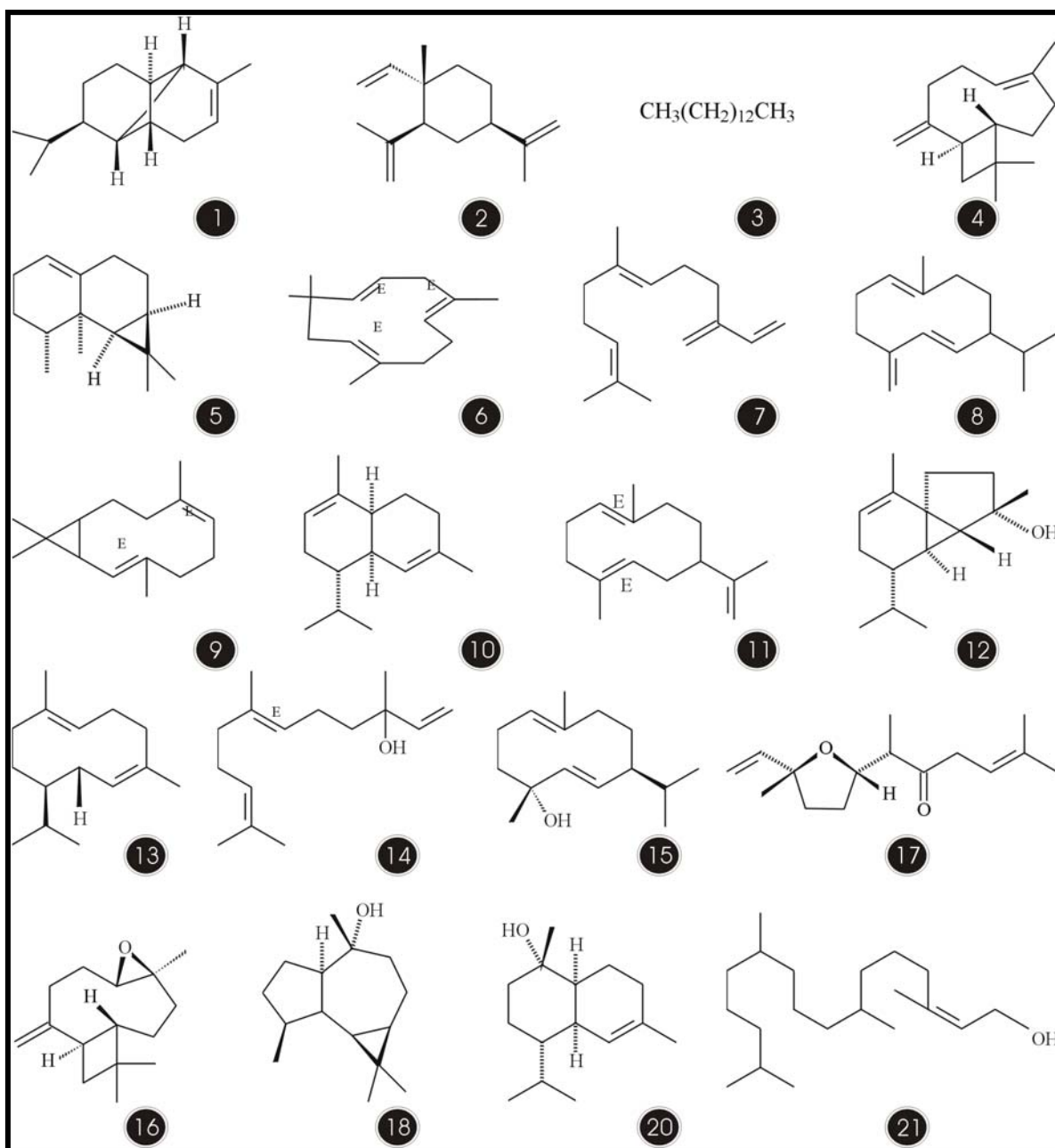


Fig. 5 – Estruturas dos componentes do óleo essencial de *L. camara* e *L. radula* numerados segundo o tempo de retenção apresentados na Tabela 3.

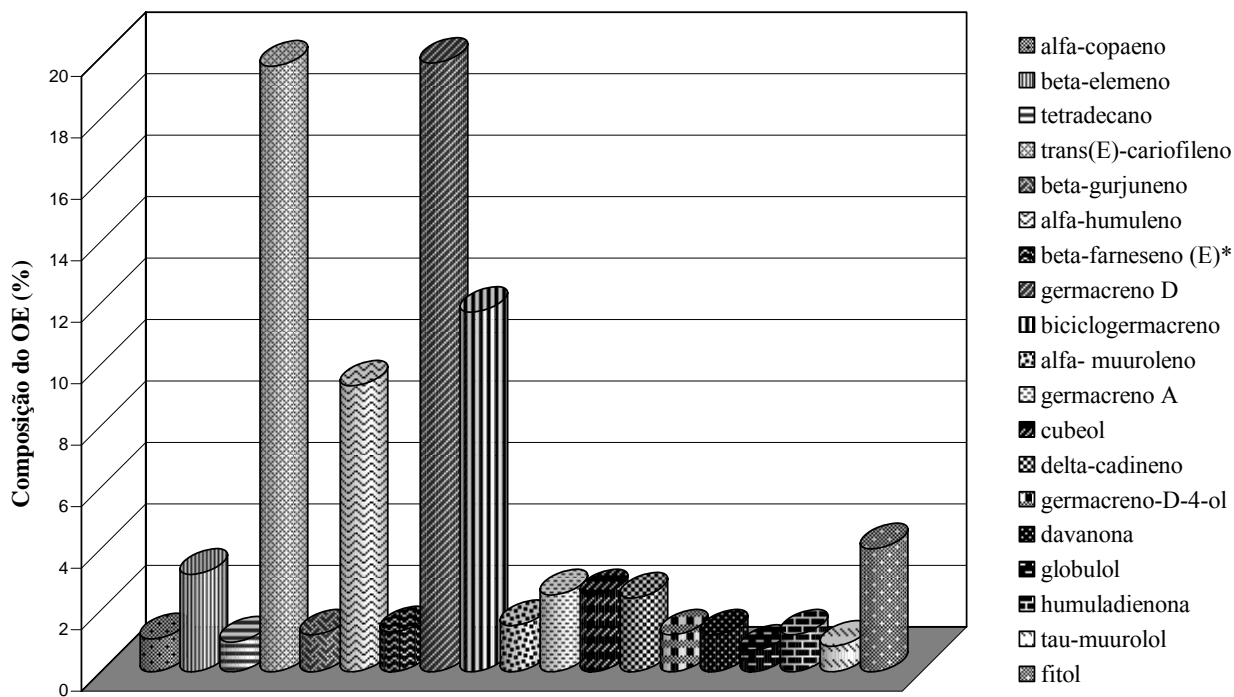


Fig. 6 – Composição do óleo essencial de *L. camara*.

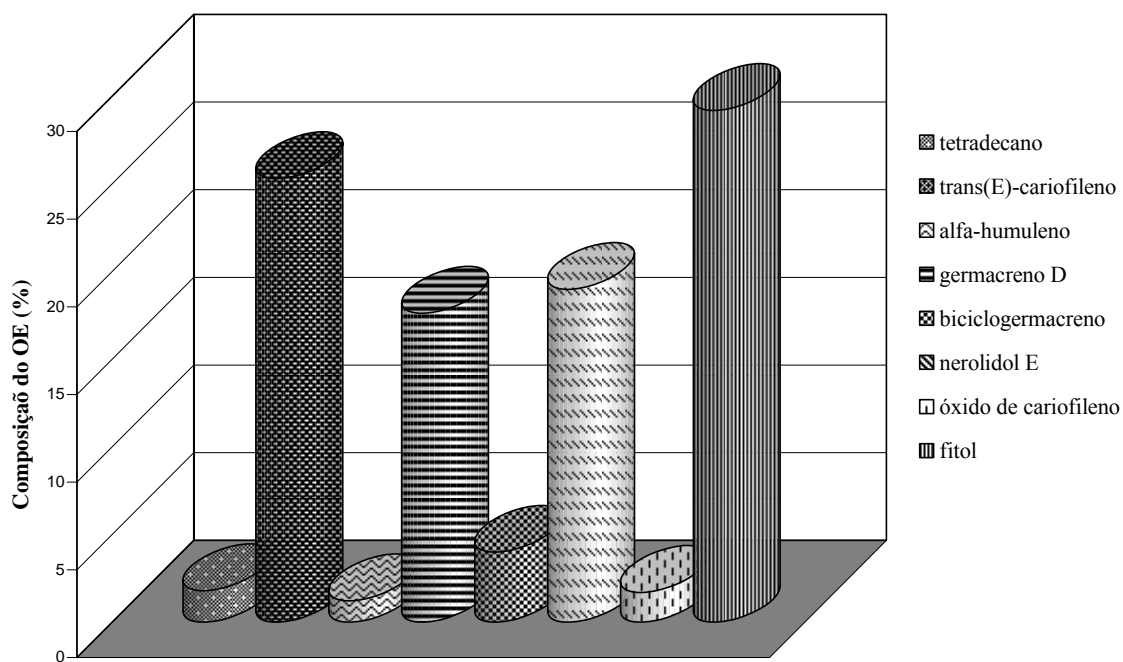


Fig. 7 – Composição do óleo essencial de *L. radula* (beta-farneseno (E): componente traço < 0,1).



Fig. 8 – Inibição do crescimento micelial de *C. cassicola* no oitavo dia de avaliação após a aplicação do óleo de *L. camara* (A) e *L. radula* (B): **1**) Controle; **2**) 3.000 mg L⁻¹; **3**) 5.000 mg L⁻¹; **4**) 10.000 mg L⁻¹.

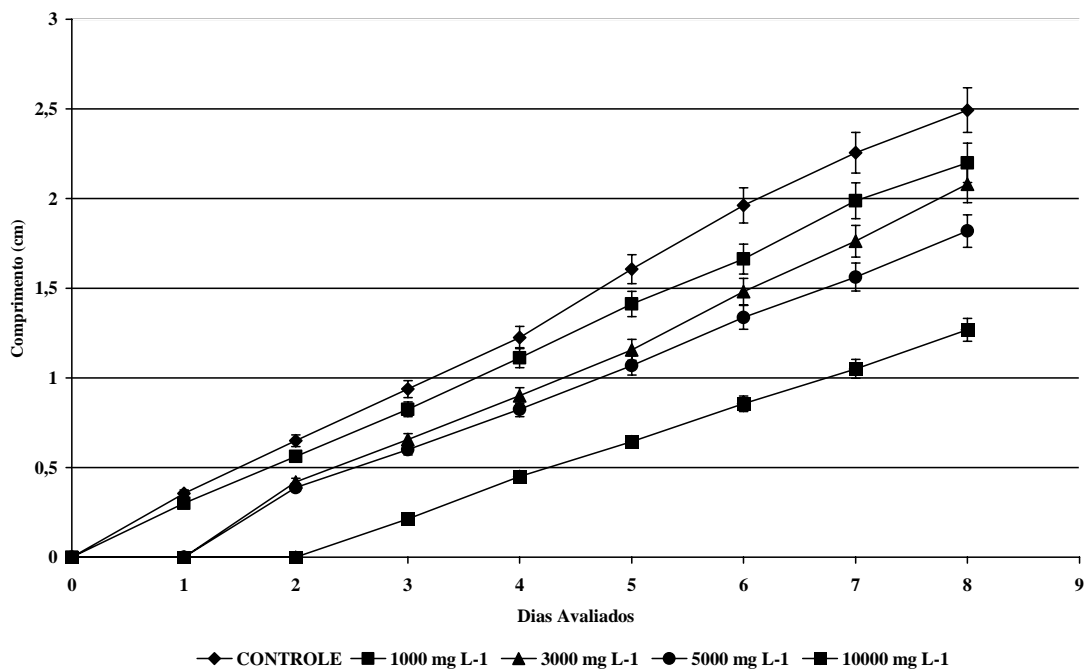


Fig. 9 - Inibição do crescimento de *C. cassiicola* à presença do óleo essencial de *L. camara* (LC) nas concentrações de 1.000, 3.000, 5.000, 10.000 mg L⁻¹ em meio de cultura (CT = controle).

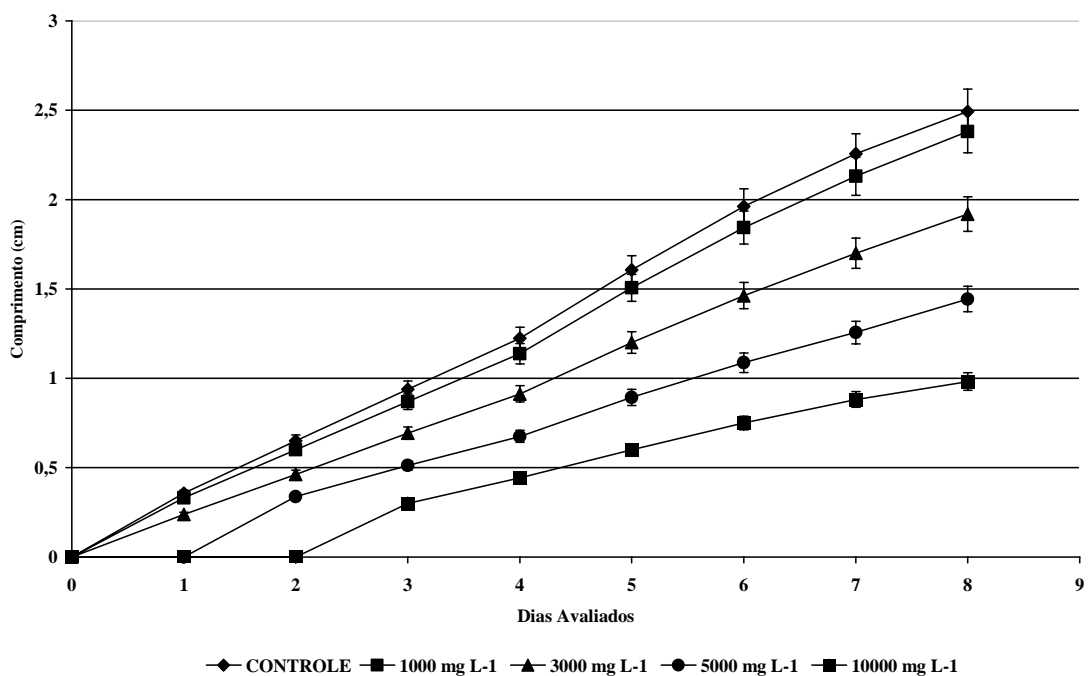


Fig. 10 - Inibição do crescimento de *C. cassiicola* à presença do óleo essencial de *L. radula* (LR) nas concentrações de 1.000, 3.000, 5.000, 10.000 mg L⁻¹ em meio de cultura (CT = controle).

exposição ao óleo. Nos primeiros dias em que não houve crescimento fica nítido que as colônias atingiram um crescimento total médio inferior aos demais dias avaliados. O desenvolvimento diário do fungo obedece a uma proporção que pôde ser observada no controle, não havendo em nenhum dos tratamentos depois de superado a fase inicial de inibição, uma aceleração de crescimento. A redução do crescimento é gradativa à medida que há um aumento da concentração do óleo de cada uma das espécies testadas.

A diferença marcante é que talvez possa expressar a maior atividade do óleo de *L. radula* poderia estar relacionada à presença exclusiva nessa espécie de altas concentrações de *E*-nerolidol. O composto *E*-nerolidol em *L. camara* foi identificado em baixas concentrações, em plantas originárias da África (Alitonou et al., 2004; Randrianalijaona et al., 2005). Outra diferença seria alta concentração de fitol em relação a *L. camara*. Outros trabalhos sobre a composição química do óleo de *L. camara* não mencionam a presença do fitol (Misra & Laatsch, 2000; Alitonou et al., 2004; Randrianalijaona et al., 2005).

O óleo essencial de *L. radula* é, sem dúvida, mais inibitório para o desenvolvimento de *C. cassiicola* do que o óleo extraído de *L. camara*. Segundo Deena & Thoppil (2000), o óleo de *L. camara* inibiu o crescimento de espécies de fungos e bactérias sendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* van Tiegh, *Fusarium solani* Mart. (Sacc.) e *Candida albicans* os mais sensíveis. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem com informações adicionais sobre as propriedades fungistáticas do óleo dessa espécie bem como para o entendimento da interação planta-patógeno.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que, *L. radula* apresenta em relação a *L. camara* um número mais reduzido de componentes no seu óleo. No entanto, seu óleo tem propriedades fungistáticas sobre *C. cassiicola* superiores ao óleo de *L. camara*. Somente a 1000 mg L⁻¹ o crescimento total médio da colônia de *C. cassiicola* exposto ao óleo de *L. radula* foi superior ao tratamento com o óleo de *L. camara*. Em todas as demais concentrações avaliadas o óleo de *L. radula* foi mais eficiente na inibição do fungo. Os indícios são de que as diferenças na composição do óleo das duas espécies estão diretamente relacionadas com as diferenças nas taxas de inibição do crescimento das colônias do fungo.

Os estudo comprovou que os óleos essenciais de ambas espécies de *Lantana* apresentam efeitos fungistáticos contra *C. cassiicola*. Não há registros de *C. cassiicola* em *L. radula* e, talvez isso possa também ser em parte explicado pela maior toxicidade apresentada pelo óleo de *L. radula* sobre esse fungo do que o óleo de *L. camara*. Apesar de em menor proporção, o óleo de *L. camara* é também eficiente em inibir o crescimento do fungo. Em sistemas naturais os óleos essenciais encontram-se concentrados e, apesar de voláteis, sua eficiência certamente é superior á aquela demonstrada nos bioensaios. Assim, esta estratégia para conter *C. cassiicola* ou outros fungos demonstra que as plantas apresentam mecanismos que antecedem a resposta hipersensível.

Conclusão:

Os resultados dos testes histoquímicos permitiram identificar substâncias lipídicas, compostos fenólicos, alcalóides, polissacarídeos e proteínas nos diferentes tipos de tricomas capitados. Os óleos essenciais secretados pelos tricomas capitatos apresentam alguns componentes químicos distintos entre as duas espécies, os quais foram correlacionados aos resultados dos testes biológicos realizados. Provavelmente, a presença dos compostos *E*-nerolidol e fitol no óleo de *L. radula* tenha resultado na maior atividade biológica do óleo ao fungo.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P, 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, IL, USA.
- Alitonou, G., Avlessi, F., Bokossa, I., Ahoussi, E., Dangou, J., Sohounhloué, D.C.K., 2004. Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* Linn. Compters Rendus Chime 7, 1101-1105.
- American Society of Agricultural Engineers, 2000. ASAE S358.2 DEC99, Standards Engineering Practices Data, Moisture Measurement – Forages.
- Arora, R.K., Kohli, R.K., 1993. Autotoxic impact of essential oil extracted from *Lantana camara* L. *Biologia Plantarum* 35, 293–297.
- Ascensão, L., Mota, L., Castro, M.M., 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* 84, 437-447.
- Barbosa, L.C.A, Maltha, C.R.A., Borges, E.E.L., 2002. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de lactonas derivadas do 2,4-dimetil-8- oxabicyclo[3.2.1]-oct-6-en-3-ona. *Quim. Nova*, 25: 203-208.
- Barreto, R.W., Evans, H.C., Ellison, C.A., 1995. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. *Mycological Research* 99, 769-782.
- Bharel, S., Gulati, A., Abdin, M.Z., Srivastava, P.S., Jain, S.K., 1996. Structure, biosynthesis and functions of artemisin. *Fitoterapia*, LXVII (5), 387-402.
- Bottega, S., Corsi, G., 2000. Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 132, 325-335.
- Brandão, A.D., Viccini, L.F., Salimena, F.R.G., Vanzela, A.L.L., Recco-Pimentel, S.M., 2007. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. *J Plant Res*, 120, 317–321

- Brundett, M.C., Kendrick, B., Peterson, C.A. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotech. e histochem.* 66, 111-116.
- Buchanan, B.B., Gruissen, W., Jones, R.L. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. In: Coroteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. *Natural Products (Secondary Metabolites)*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1367p.
- Cain, A.J., 1947. The use of Nile Blue in examination of lipids. *Quarter. J. Microsc. Sci.* 88, 383-392.
- David, R., Carde, J.P., 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Académie des Sciences Paris* 258,1338-1340.
- Day M.D., Willey C.J., Playford J, Zalucki M.P., 2003. *Lantana* current management status and future prospects. Australian: Australian Centre for International Agricultural Research. 128 p.
- Deena, M.J., Thoppil, J.E., 2000. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. *Fitoterapia* 71, 453-455.
- Dhingra, O.D, Sinclair, J.B., 1995. *Basic plant pathology methods*, 2th edn. London: Lewis Publishers.
- Fahn, A., 1979. *Secretory tissues in plants*. - Academic Press, London.
- Furr, M., Mahlberg, P.G., 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.* 44, 153-159.
- Gabe, M., 1968. *Techniques histologiques*. Masson & Cie, Paris.
- Ganter, P., Jollés, G., 1969/1970. *Histologie normale et pathologique*. Gauthier-Villars. Paris. I e II.
- Geissman, T.A., Griffin, T.S., 1971. Sesquiterpene lactones: acid catalyzed color reaction as an aid in structure determination. *Phytochemistry* 10, 2475-2485.
- Harbone, J.B., 1993. *Ecological biochemistry*. London: Academic. (4^a ed).

- Hardman, R., Sofowora, E.A., 1972. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain Technol.* 47, 205-208.
- Hernandez, T., Canales, M., Ávila, J.G., Garcia, A.M., 2005. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 96, 551–554
- Inamdar, J.A., 1969. Epidermal structure and ontogeny of stomata in some Verbenaceae. *Annals of Botany* 33, 55–66.
- Jensen, W.A., 1962. *Botanical histochemistry, principles and practice*. San Francisco: W.H. Freeman, 408 p.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. New York, Mc Graw-Hill Book Co. Inc.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. Stevens, P.F., 1999. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Massachusetts: Sinauer Associates, 464p.
- Mace, M.E., Bell, A.A., Stipanovic, R.D., 1974. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathology*. 64, 1297-1302.
- Mace, M.E., Howell, C.R., 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Can. J. Bot.* 52, 2423-2426.
- Marin, M., Koko, V., Dulei -Lausevi , S., Marin, P.D., Ranei , D., Dajic-Stevanovic, Z., 2006. Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany* 72, 378-382.
- Metcalf, C.R., Chalk, L., 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press.
- Misra, L., Laatsch, H., 2000. Triterpenoids, essential oil and photo-oxidative 28-13-lactonization of oleanolic acid from *Lantana camara*. *Phytochemistry* 54, 969-974.
- Moura, M.Z.D., Isaias, R.M.S., Soares, G.L.G., 2005. Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 148, 427–431.

- O'Brien, T.P., McCully, M.E. 1981. The study of plant structure: principles and methods. South Melbourne. Australia: Bradford House.
- Pearse, A.G.E., 1980. Histochemistry theoretical and applied. Lonman Group Limited (4° ed.), II.
- Pereira JM, 2001. *Prospodium tuberculatum* e *Corynespora cassiicola* como agentes de biocontrole de *Lantana camara*. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação (Doutorado em Fitopatologia).
- Pizzolato, P., Lillie, R.D., 1973. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. The Journal of Histochemistry and Chitchemical 21(1), 56-64.
- Randrianalijaona, J., Ramanoelina, P.A.R., Rasoarahona, J.R.E., Gaydou, E.M., 2005. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. Analytica Chimica Acta 545, 46–52.
- Santos-Seixas, C.D.; Pereira, J.M.; Barreto, R.W. 2000. Caldo de vegetais-ágar: um substituto adequado para o meio V8® - ágar. Fitopatologia Brasileira 25, 419.
- Seigler, D.S., 1995. Plant secondary metabolism. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., Ciarallo, G., 1997. Strutral and histochemical of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. Annals of Botany 79, 329-336.
- Silva, M.H.L, Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B., Luz, A.I.R., Silva, J.D., Maia, J.G.S, 1999. The essential oils of *Lantana camara* L. occurring at North Brazil. Flavour Fragr. J., 14, 208-210.
- Spies, J.J., 1984. A cytotaxonomic study of *Lantana camara* (Verbenaceae) from South Africa. S Afr J Bot 3, 231–250.
- Solereeder, H., 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. Oxford: Clarendon Press.
- Theis, N., Lerdau, M., 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. International Journal of Plant Science 164, S93-S102.
- Verma, R.K., Verma, S.K., 2006. Phytochemical and termiticidal study of *Lantana camara* var. aculeate leaves. Fitoterapia 77, 466-468.

Werker, E., 1993. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 8, 249-255.

CAPÍTULO 3

HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO NO PATOSSISTEMA *Corynespora cassiicola*/ *Lantana* SPP (VERBENACEAE)

Resumo: Buscando melhor compreender a interação patógeno/hospedeiro realizou-se um estudo comparativo da relação *C. cassiicola*/*Lantana* spp. *L. camara* e *L. radula* apresentam similaridades morfológicas e apesar de co-habitarem em alguns ambientes há relatos de *C. cassiicola* somente em *L. camara*. Além disso, a escassez de informações sobre *L. radula* contribuiu para o interesse sobre essa espécie. As folhas foram inoculadas com suspensão de conídios de dois isolados (Ccl e Cc-t) em ambas as superfícies. As observações das amostras foram realizadas por microscopia de luz e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As principais diferenças observadas parecem estar diretamente relacionadas ao hospedeiro. Houve o aparecimento de lesões 24 horas após inoculação e estas eram maiores em *L. camara*. A topografia da superfície abaxial de *L. radula* parece dificultar o reconhecimento pelo patógeno. Observou-se nas duas espécies a formação de apressórios nas junções de células epidérmicas, células basais dos tricomas e sobre os estômatos. Ocasionalmente as hifas penetraram estômatos abertos sem alterações morfológicas evidentes. No entanto, não foram verificados aspectos quantitativos nesse estudo. A penetração nas duas espécies ocorre principalmente na superfície abaxial e a colonização intercelularmente ou intracelularmente. Verificou-se o espessamento de parede de células epidérmicas demonstrando reação de resistência a presença do fungo. O parênquima lacunoso foi o mais afetado e houve rompimento e desorganização de células bem como foi verificado nas nervuras. O fungo atua como um agente necotrófico.

Palavras-chave: *C. cassiicola*, *L. camara*, *L. radula*, apressório, alterações morfológicas.

Abstract: Trying to better understand the pathogen/host interaction a comparative study of the relation between *C. cassicola/Lantana* spp. *L. camara* and *L. radula* was done presenting morphological similarities and in spite of cohabitating in some environments there are reports of *C. cassicola* only in *L. camara*. Furthermore, the information shortage about *L. radula* contributed to the interest on this species. The leaves were inoculated with a suspension of conidium of two isolates (JMP 216c and JMP 217) on both surfaces. The observations of the samples were performed with a light microscope and MEV. The main differences observed seem to be directly connected to the host. There apparent injuries 24 hours after inoculation and these were larger in *L. camara*. The topography of the abaxial surface of *L. radula* seems to make recognition by the pathogen difficult. The appressorium formation in the two species was observed in the epidermic cell joinings, basic cells of the trichomes and on the estomatal complex. Occasionally they hyphas penetrated the stoma opened without obvious morphological alterations. However, quantitative aspects were not checked in this study. The penetration in the two species takes place mainly on the abaxial surface and the intercellular or intracellular colonization. The thickness of the epidermic cell walls that demonstrates a reaction to the presence of the fungus was verified. The spongy tissue was the most affected and there was breakage and disorganization of the cells as verified in the veins. The fungus acts like a necrotrophic agent.

Key words: *C. cassicola*, *L. camara*, *L. radula*, apressorium, morphological alterations.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do processo co-evolutivo nas interações planta/patógeno existe um contínuo desenvolvimento de mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos nas populações de plantas (Clay and Kover, 1996) e de adaptações nos patógenos que permita superar estas defesas. As plantas são necessariamente resistentes à maior parte da grande diversidade de fitopatógenos existentes, por possuírem um amplo número de estratégias que são responsáveis pela defesa e/ou do bloqueio físico da entrada de microorganismos (Barbieri and Carvalho, 2001). Em patossistemas, os mecanismos de defesa vegetal constituem-se em barreiras físicas como a cutícula e os tricomas, e mecanismos pós-formados que são induzidos pelo ataque do patógeno como a explosão oxidativa que conduz à resposta hipersensível (RH). A capacidade de vencer essas barreiras é que faz de um microorganismo um patógeno de determinada espécie vegetal. No entanto, não só as barreiras estruturais são formas de resistência da planta frente ao ataque de um patógeno, mas também, o acúmulo e a liberação de compostos químicos que ocorrem nestas interações (Passos, 2004).

Dentre as interações planta/patógeno aquelas envolvendo fungos fitopatogênicos agressivos de plantas daninhas tem sido objeto de interesse em estudo de controle biológico (Day *et al.* 2003). *Lantana camara* L. é uma planta daninha de importância mundial e de difícil controle (Day *et al.*, 2003). Ao longo de anos de estudos buscando identificar possíveis inimigos naturais dessa espécie através do estudo da sua microbiota associada a este em seu centro de origem no Brasil (Barreto *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2000), foi identificada uma forma do fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. especializada no ataque de *L. camara* (Pereira *et al.*, 2003). Dentre as doenças que ocorrem nessa espécie, a mancha alvo apresenta-se particularmente severa sendo capaz de produzir desfolhas acentuadas e até mesmo levar à morte de plantas jovens (Pereira and Barreto, 2000). O fungo envolvido na doença pertence a espécie que tem centena de hospedeiros conhecidos, apesar de onter populações especializadas e restritas quanto ao seu leque de hospedeiros. *Corynespora cassiicola* quando atacando plantas cultivadas pode causar perdas econômicas substanciais. Culturas como as da seringueira, tomate, feijão caupi, dentre outros podem sofrer grandes prejuízos

por ataque deste fungo (Ellis, 1971; Silva *et al.*, 1998). Estudos têm demonstrado que o fungo produz uma toxina (Breton *et al.*, 2000; Pereira, 2001; Pereira *et al.*, 2003; Passos, 2004) e que esta pode estar associada ao grau de severidade da doença (Onesirosan *et al.*, 1975).

Apesar disso, há pouca informação publicada sobre os detalhes da interação de *C. cassiicola* com seus hospedeiros. Aproveitando-se a realização de estudos sobre *C. cassiicola* f. sp. *lantanae* para agente de biocontrole para *L. camara* resolveu-se objetivar um estudo comparativo da interação patógeno/hospedeiro desta espécie de fungo com *L. camara* e com outra espécie do mesmo gênero. *Lantana radula* Sw. apresenta, além da proximidade filogenética com *L. camara*, uma distribuição geográfica em parte superposta com a de *L. camara* em seu ambiente de ocorrência natural. Essas duas espécies apresentam ainda similaridades morfológicas e a separação entre elas normalmente depende da disponibilidade de amostras férteis, sendo dificultada quando as plantas estão estéreis. Apesar de *L. camara* e *L. radula* co-habitarem em apenas regiões não há relatos de *C. cassiicola* como patógeno de *L. radula*. O fungo parece agir de forma seletiva ocasionando doença somente em *L. camara* ou, pelo menos a forma *specialis lantanae*, conforme realizado no trabalho de Pereira *et al.* (2003).

Nos patossistemas, dentre as estratégias de defesa das plantas contra patógenos, está a defesa química que pode incluir a produção e liberação de óleos voláteis. *Lantana camara* é uma planta aromática que produz óleo essencial com atividade biológica capaz de reduzir o desenvolvimento de fungos (Capítulo 2; Deena and Thoppil, 2000; Hernandez *et al.*, 2005). Em nossos estudos comprovou-se que *L. camara* e *L. radula* produzem óleos essenciais que diferem na composição química e atividade biológica sobre *C. cassiicola*, pois, o óleo de *L. radula* mostrou-se mais eficiente em inibir o crescimento do fungo em placa de Petri (Capítulo 2). Entretanto, a capacidade do óleo essencial de *L. radula* de impedir o desenvolvimento do fungo pode estar associada à aparente ausência de ataques de *C. cassiicola* a *L. radula* em sistemas naturais. Um estudo histopatológico envolvendo essas combinações fungo x planta permitirá o melhor entendimento dos mecanismos de infecção ou restrição à infecção por *C. cassiicola*. As observações histopatológicas são úteis para analisar as alterações decorrentes da infecção e compreender os possíveis mecanismos de infecção e defesa. A utilização da microscopia eletrônica

de varredura (MEV) tem sido uma ferramenta útil para esclarecer as fases de pré-infecção e penetração do fungo, permitindo a visualização da germinação, o direcionamento do tubo germinativo, a formação ou não de apressório e alterações na superfície do hospedeiro (McKeen and Svircev, 1981). Assim, a possibilidade de haver mecanismos de resistência envolvidos na relação *L. radula*/*C. cassiicola* poderá vir a esclarecer a não ocorrência natural da doença nessa espécie. O estudo conjunto de uma interação natural e outra não relatada naturalmente poderá contribuir para o melhor entendimento sobre o processo infectivo de *C. cassiicola*.

Neste trabalho serão avaliadas as alterações anatômicas, em folhas de *L. camara* e *L. radula* provocadas pelo ataque do fungo *C. cassiicola*, bem como examinados e descritos aspectos destas interações, os processos de colonização, os sítios de penetração e de infecção do fungo utilizando-se microscopia de luz e eletrônica de varredura. Para complementar esse estudo resolveu-se incluir também o exame de planta exposta à substância tóxica a *Lantana camara* produzidas por *C. cassiicola* quando de germinação a um isolado de *C. cassiicola* obtido de outra planta hospedeira (tomateiro).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *C. cassiicola* utilizados foram os seguintes: *C. cassiicola* f. sp. *lantanae* (Ccl – isolado JMP 217) e *C. cassiicola* isolado obtido de tomateiro (Cc-t - JMP 216c). Ambos estão depositados na Coleção de Culturas fúngicas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Estes isolados estavam preservados em sílica-gel (Dhingra and Sinclair, 1995). As plantas de *L. camara* (biótipo Ab, flores brancas – provenientes de Queensland, Austrália) e de *L. radula*, utilizados nos testes foram obtidas a partir da coleção de plantas mantidas na Clínica de Doenças de Plantas. As plantas de *L. radula* foram obtidas no viveiro de mudas da UFV.

Para a obtenção da suspensão de conídios Ccl e Cc-t, foram utilizados os procedimentos descritos por Pereira (2001). O fungo foi cultivado em placa de Petri contendo meio CVA (caldo de vegetais-ágar) (Santos-Seixas *et al.*, 2000) sob temperatura de aproximadamente 25 °C, em

incubadora, por 15 dias. Para a obtenção da suspensão de conídios, a superfície do meio colonizado pelo fungo foi raspada com espátula de borracha após adição de cerca de 3 mL de solução de Tween 80 a 0,05% (polioxietileno sorbitan mono-oleato, Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, realizou-se a filtração do produto obtido em gaze e, após ser transferida para um erlenmeyer, a suspensão de estruturas fúngicas foi mantida durante 4 horas, sob agitação constante, a temperatura ambiente favorecer a germinação dos conídios. Metade desta suspensão foi reservada para aplicação sobre as plantas-teste e a outra metade foi filtrada em conjunto de filtro Milipore® (0,45µm e 25mm de diâmetro), obtendo-se assim, um filtrado sem conídios. A estimativa da concentração dos conídios na suspensão não filtrada foi feita em alíquota da suspensão de inóculo examinada em um hemacitômetro. A suspensão utilizada nos testes tinha uma concentração de 1×10^6 conídios/mL.

Indivíduos de *L. camara* e *L. radula* foram inoculados com Ccl, inoculados com o isolado Cc-t. Para cada espécie de *Lantana* foram utilizadas três plantas sendo que foram inoculadas 4 folhas adultas localizadas entre o 3° e o 5° nó do ápice para a base por planta. Cada folha escolhida foi pincelada em ambas as faces com a suspensão de conídios. Após tratadas estas plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro, a 25 °C, durante 48 horas e, após este período foram transferidas para a casa de vegetação a 25 °C, por cerca de 4 dias.

Foram realizadas coletas periódicas, em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas h.a.i., com a retirada de 1 folha de cada planta tratada, a cada 24 horas a partir da inoculação. Uma amostra de cada porção (basal, mediana e apical) da lâmina foliar com cerca de 0,5 cm² foram fixadas em FAA₅₀ ou tampão glutaraldeído, processadas para observação em microscopia de luz e eletrônica de varredura, respectivamente. As amostras fixadas para observação em microscopia de luz foram incluídas em metacrilato (Historesin – Leica) ou em parafina para a obtenção de cortes transversais de 5 a 7 µm de espessura em micrótomo rotativo (Spencer, 820). Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (pH=4,0) (O'Brien & McCully, 1981) e as lâminas montadas com resina sintética (Permout). Para se observar a presença do fungo no tecido doente, foi utilizado o método de clareamento e coloração de Keane *et al.* (1988) que é uma modificação do método Bruzesse

and Hansan (1983). As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo), com câmera digital acoplada (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic instruments inc. New York, USA), do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

O material destinado a observação sob microscopia eletrônica de varredura foi fixado em tampão glutaraldeído a 25%, a temperatura de 4 °C, durante 24 horas, e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 3%, a mesma temperatura, durante 3 horas. A seguir, as amostras foram lavadas em solução tampão de cacodilato de sódio (0,4 M, pH=6,8) e desidratadas em série alcoólica progressiva até álcool etílico absoluto. As amostras foram secas ao ponto crítico (CPD 020 Balzers, Union) e utilizando-se CO₂ líquido. Posteriormente, o material vegetal foi recoberto com ouro metálico (espessura de 10 nm), em pulverizador de ouro (Balzers Modelo SCAO10), segundo Bozzola e Russell (1992). A observação e documentação fotográfica do material foliar obtidas em um microscópio de varredura (Zeiss Modelo LEO 1430VP), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM).

3. RESULTADOS

Sítios de penetração de C. cassicola em L. camara e L. radula observados por MEV:

As análises dos materiais às 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (h.a.i.) mostraram que a extensão de lesões variou consideravelmente em relação à espécie de planta inoculada. A 24 h.a.i. (Fig. 1) já eram evidentes a presença de lesões nas folhas inoculadas de *L. camara* (Figs. 1a e 1b) e *L. radula* (Fig. 1c e 1d). A extensão das lesões observadas em *L. camara* foram mais extensas que as lesões formadas em *L. radula* (Fig. 1). No entanto, não houve diferenças significativas em relação ao isolado inoculado (Ccl e Cc-t) em *L. camara* e *L. radula*. As inoculações demonstraram que as diferenças existentes estão mais relacionadas com a reação de cada hospedeiro do que ao isolado de *C. cassicola* envolvido à interação com esta espécie de fungo. A concentração utilizada para os dois isolados foi capaz de produzir doença nas duas espécies, porém em menor proporção

em *L. radula*. Aspectos relativos à quantificação de doença (incidência e severidade, por exemplo) não foram averiguados neste estudo.

A 24 h.a.i. foi observado o desenvolvimento inicial do patógeno nas superfícies foliares dos dois hospedeiros. Nos dois isolados de *C. cassiicola* testados verificou-se uma mesma tendência, independentemente da espécie de *Lantana* estudada, de apresentar um desenvolvimento sobre a superfície adaxial (Fig. 2) menos abundante sobre a superfície abaxial das folhas (Figs. 3 e 4). Aos 24 e 48 h.a.i., os conídios dos dois isolados de *C. cassiicola* haviam germinado igualmente sobre ambas as superfícies foliares. Houve emissão de tubos germinativos em células situadas na base ou no ápice dos conídios germinados e a formação de um a dois tubos germinativos em cada conídio, sendo a formação de dois tubos germinativos mais comum, independente da interação isolado/hospedeiro. Porém, a germinação dos conídios e a ocorrência de penetração foi menos abundante na superfície adaxial. Quando havia germinação de conídios havia a formação de micélio denso e poucos sinais de colonização pelo patógeno. A 48 (Fig. 2a), 72 (Fig. 2c) e 96 h.a.i. as hifas não haviam avançado muito a partir do ponto de deposição do inóculo. Algumas hifas dirigiram-se para a base de tricomas glandulares indicando que esse pode ser um ponto susceptível a penetração (Fig. 2e). Observou-se a formação de apressórios (Figs. 2a, 2b, 2d e 2f) em menor intensidade na superfície adaxial, indicando uma menor adaptação de *C. cassiicola* para iniciar a infecção na superfície adaxial.

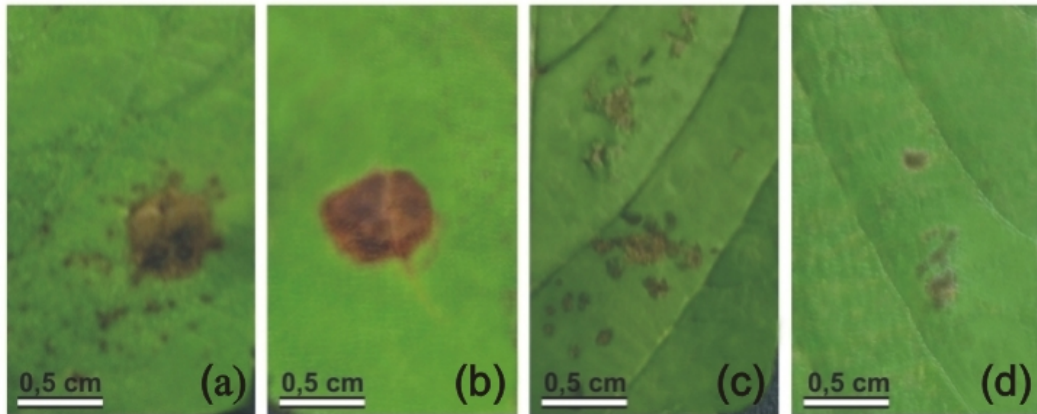


Figura 1 – Fragmentos foliares de *L. camara* e *L. radula* inoculadas com *C. cassiicola* a 24 h.a.i. (a) e (b) - *Lantana camara*; (c) e (d) - *Lantana radula*. (a) e (b) – Isolado Ccl; (c) e (d) – Isolado Cc-t.

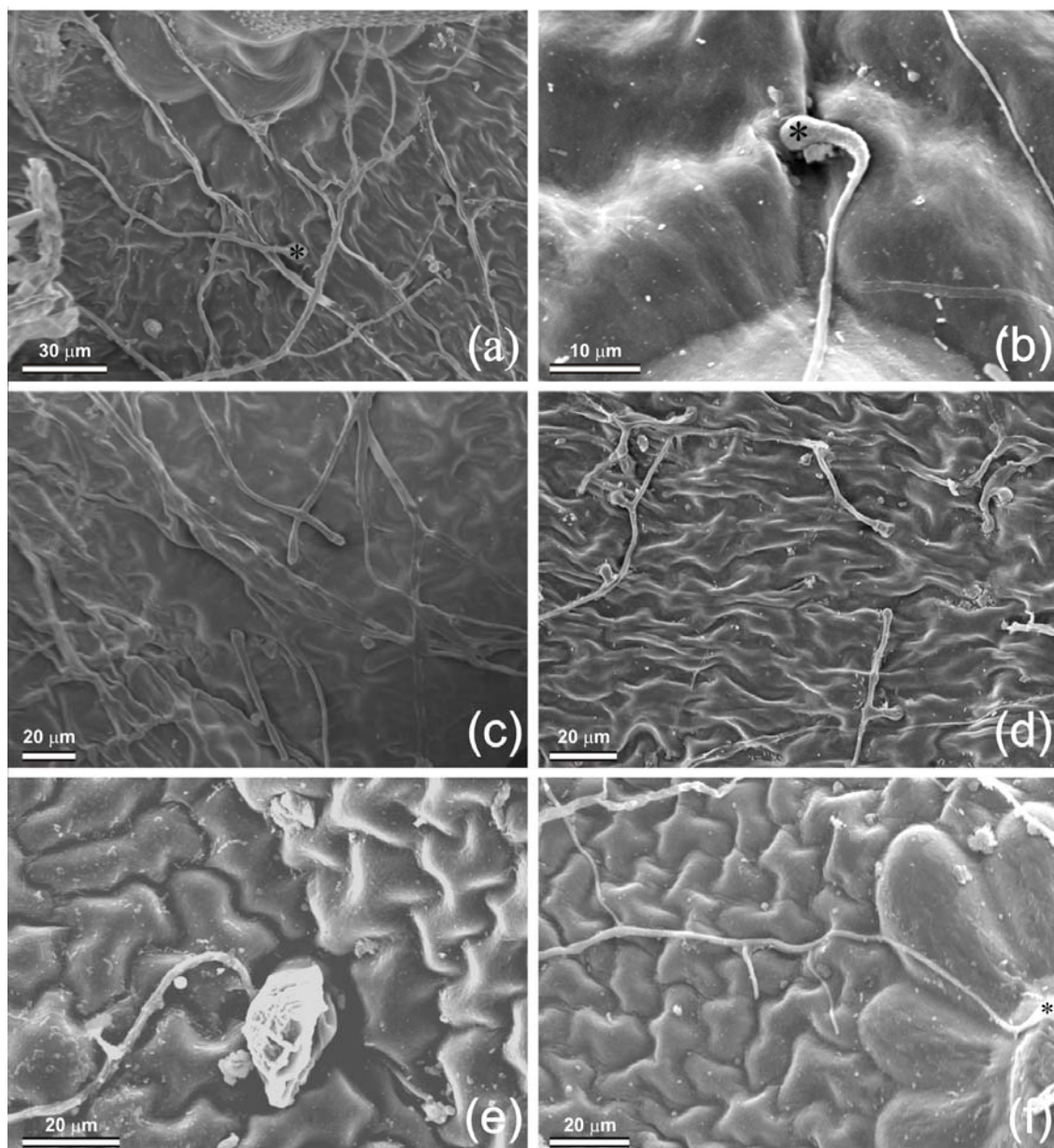


Figura 2 - Superfície adaxial de folhas de *L. camara* e *L. radula* inoculadas com dois isolados de *C. cassiicola* (micrografias eletrônicas de varredura). (a) Hifas e apressório próximos a tricoma. (b) Apressório terminal nas junções das células epidérmicas. (c) Hifas desenvolvendo na superfície epidérmica. (d) Hifa e apressórios terminais e laterais. (e) Hifa terminado nas células basais de tricoma glandular. (f) Hifa se ramificando e apressório terminal sobre tricomas. (a), (b), (c) e (d) – *L. camara*. (e) e (f) – *L. radula*. (a), (c) e (e) - Isolado Ccl. (b), (d) e (f) - Isolado Cc-t. (a), (d) e (e) - 48 h.a.i., (b) - 24 h.a.i., (c) e (f) - 72 h.a.i.* = apressório.

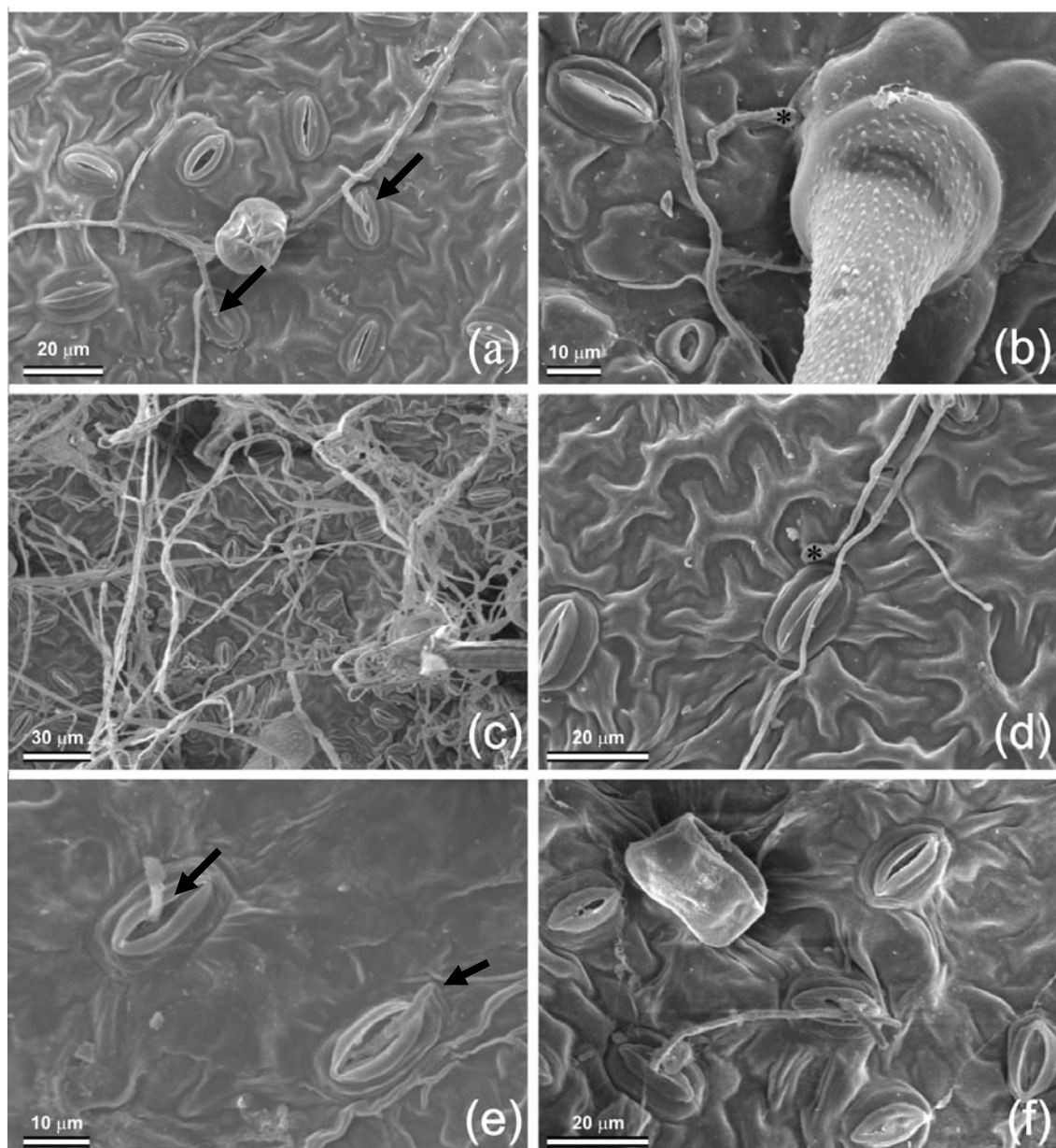


Figura 3 - Superfície abaxial de folhas de *L. camara* inoculadas com dois isolados de *C. cassiicola* (micrografias eletrônicas de varredura). (a) Penetração direta pelos estômatos (setas). (b) Apressório lateral nas junções das células basais do tricoma. (c) Micélio denso. (d) Hifa passando sobre estômato e apressório terminal entre célula guarda e célula epidérmica. (e) e (f) Hifas saindo pelos ostíolos dos estômatos (setas). (e) (a), (c) e (e) - Isolado Ccl. (b), (d) e (f) - Isolado Cc-t. (a) e (b) - 24 h.a.i., (c) e (d) - 48 h.a.i., (e) - 96 h.a.i., (f) - 72 h.a.i. * = apressório.

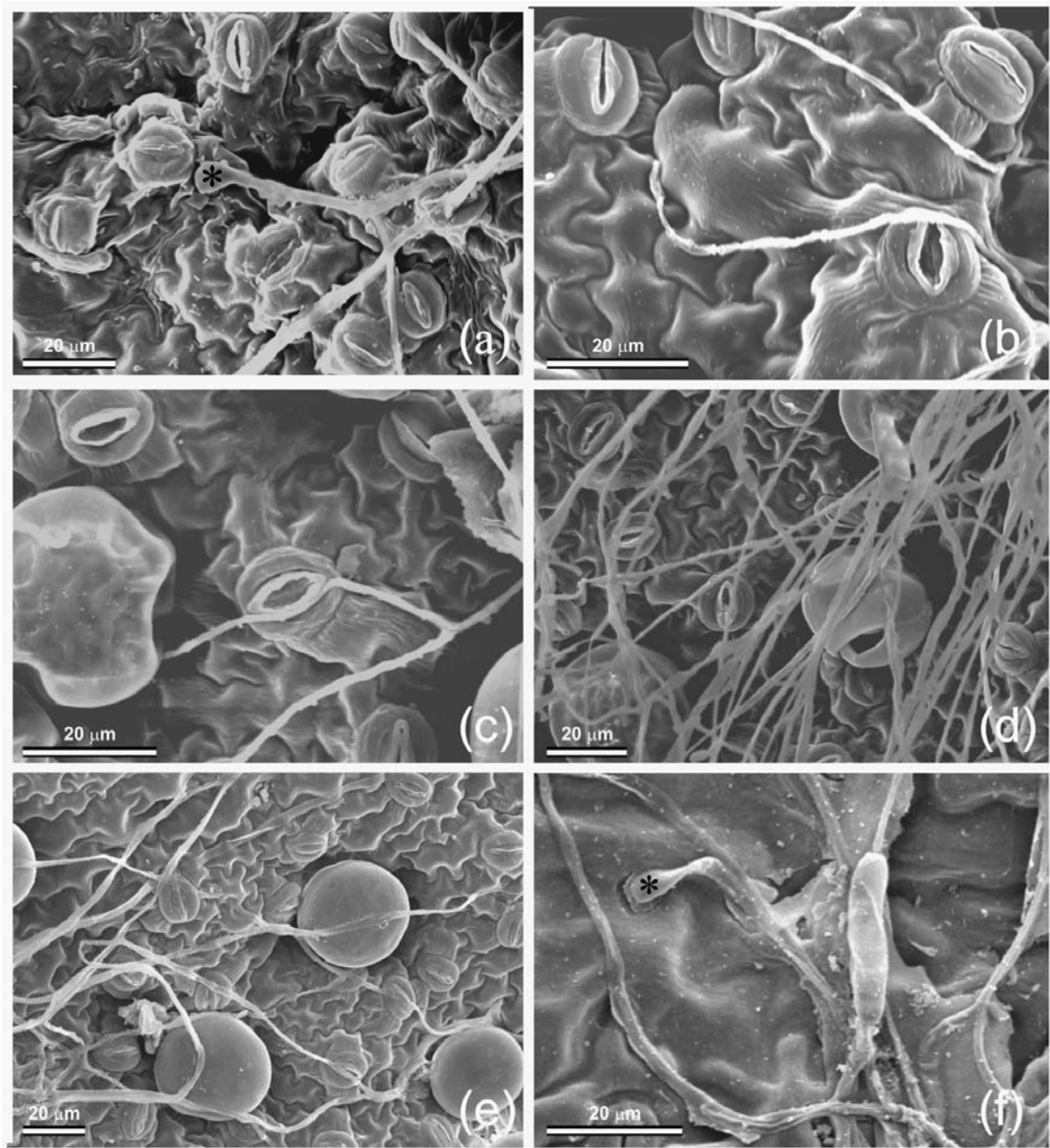


Figura 4 - Superfície abaxial de folhas de *L. radula* inoculadas com dois isolados de *C. cassicola* (micrografias eletrônicas de varredura). (a) Apressório sobre células epidérmicas e hifa contornando estômato. (b) Hifas passando sobre estômatos. (c) Hifa contornando estômato aberto. (d) Micélio denso e tricoma glandular colonizado. (e) Hifas passando sobre tricomas sem entrar em contato direto com as células epidérmicas. (f) Conídio germinado (seta), hifas e apressório sobre células epidérmicas. (a), (c) e (e) - Isolado Ccl. (b), (d) e (f) - Isolado Cc-t (a) e (b) - 24 h.a.i., (c) e (d) - 48 h.a.i., (e) e (f) - 72 h.a.i. * = apressório.

Na superfície abaxial de folhas de ambas as espécies de *Lantana*, a 24 h.a.i., observou-se um grande número de conídios germinados e a presença de apressórios (Figs. 3b e 4a). Detectaram-se vários sítios de penetração do fungo e a maioria dos conídios, independentemente do isolado já haviam germinado. O mesmo foi observado 48 h.a.i já então acompanhado de formação de micélio (Figs. 3c e 4d). Nesta fase tubos germinativos já haviam se expandido, ramificado e formado hifas na superfície epidérmica de ambos os hospedeiros ou terminado em dilatações apressoriais (Fig. 3d). Não se observou orientação no crescimento dos tubos germinativos para locais específicos das superfícies foliares nas duas espécies de planta apesar de havere diferenças morfológicas na microtopografia das duas espécies. *Lantana camara* apresenta a superfície abaxial plana enquanto que em *L. radula* essa superfície apresenta nítidas depressões (Capítulo 1). As hifas penetravam apenas ocasionalmente pelos ostíolos dos estômatos (Fig. 3a), indicando que esta não é a via de penetração preferencial no tecido do hospedeiro para *C. cassiicola*, ao menos na sua interação com *Lantana*. Nesses casos ocorreu penetração direta sem alterações morfológicas evidentes. Muitas vezes observou-se que as hifas passavam sobre os estômatos abertos, sem contudo ocorrer penetração (Figuras 4b e 4c). Vários apressórios foram observados, principalmente nas superfícies abaxiais (Figs. 3b, 3d, 4a e 4f) e quando ainda não completamente formados era visível um leve entumescimento na ponta das hifas, denotando sua posterior formação. As diferenças entre as superfícies abaxiais de *L. camara* (Fig. 3) e *L. radula* (Fig. 4) parecem estar relacionadas com o menor número de lesões observadas em *L. radula* uma vez que nas superfícies adaxiais o comportamento do fungo foi igual para as duas espécies. Devido às depressões encontradas nesta superfície as hifas muitas vezes cresciam sobre tricomas encontrados nestas cavidades não estabelecendo contato com as células epidérmicas (Fig. 4e). No entanto, observou-se a formação de apressórios (Figs. 4a e 4f) bem como houve a penetração via estômatos na superfície abaxial de *L. radula*.

Em ambos os hospedeiros, os apressórios (Figs. 2a, 2b, 2d, 2f, 3b, 3d, 4a e 4f) formados pelos dois isolados caracterizaram-se como dilatações predominantemente formadas na laterais das hifas, ou nas extremidades de tubos germinativos. Os apressórios eram claviformes, com septo nem sempre evidente. Apesar da aparente ausência de orientação do crescimento dos tubos

germinativos, a maioria dos apressórios formou-se nas junções de células epidérmicas (Fig. 2b) ou sobre o complexo estomático (Fig. 3d). Ocasionalmente eles se formaram também nas junções das células basais dos tricomas (Fig. 3b) indicando ser esse um possível ponto adicional para a penetração. Devido ao grande número de apressórios formados principalmente na superfície abaxial, é possível que essa estrutura desempenhe um papel importante para a patogênese. Nos períodos de 72 e 96 (Figs. 3f e 3e) h.a.i. foram observadas hifas saindo pela abertura dos ostíolos demonstrando que a colonização dos tecidos já estava num estado mais adiantado. Neste intervalo, também foram izualizados estômatos anormais com células-guarda plasmolizadas e crista estomática deformada. Com a progressão da colonização ocorreu a necrose do tecido foliar acentuada desidratação.

Eventos de colonização em microscopia de luz:

A cutícula da face adaxial nas duas espécies é mais espessa do que na face abaxial e pode atuar como uma barreira, dificultando a penetração de fungos como *C. cassicola* o que pode ter conexão com as observações de uma penetração mais abundante de *C. cassicola* pela face abaxial. Nesta face é onde as injúrias decorrentes do ataque do fungo surgem mais rapidamente. No entanto, verificou-se penetração também pela superfície adaxial (Figs. 5A e 5B) com rompimento de células do parênquima paliçádico devido o avanço de hifas. Entre 24 e 48 h.a.i. vários conídios já haviam germinado, a penetração no tecido já havia ocorrido e as hifas estavam presentes tanto no interior como no exterior das células (Fig. 5c) quanto intercelularmente (Fig. 5d). Apesar de ambas as faces terem sido inoculadas com a mesma suspensão de conídios e, portanto com uma mesma quantidade de estruturas infectivas, notou-se um número bem mais expressivo de conídios germinados e hifas na a face abaxial. Quando esses eventos estavam bem estabelecidos, as hifas haviam colonizado a epiderme e atingido o parênquima.

Em montagens onde foi feita a clarificação das amostras verificou-se a ocorrência de espessamento de paredes celulares em áreas de necrose tanto em *L. camara* quanto em *L. radula*. Essa reação não foi suficiente para conferir resistência nas plantas ao ataque do fungo, pois esse

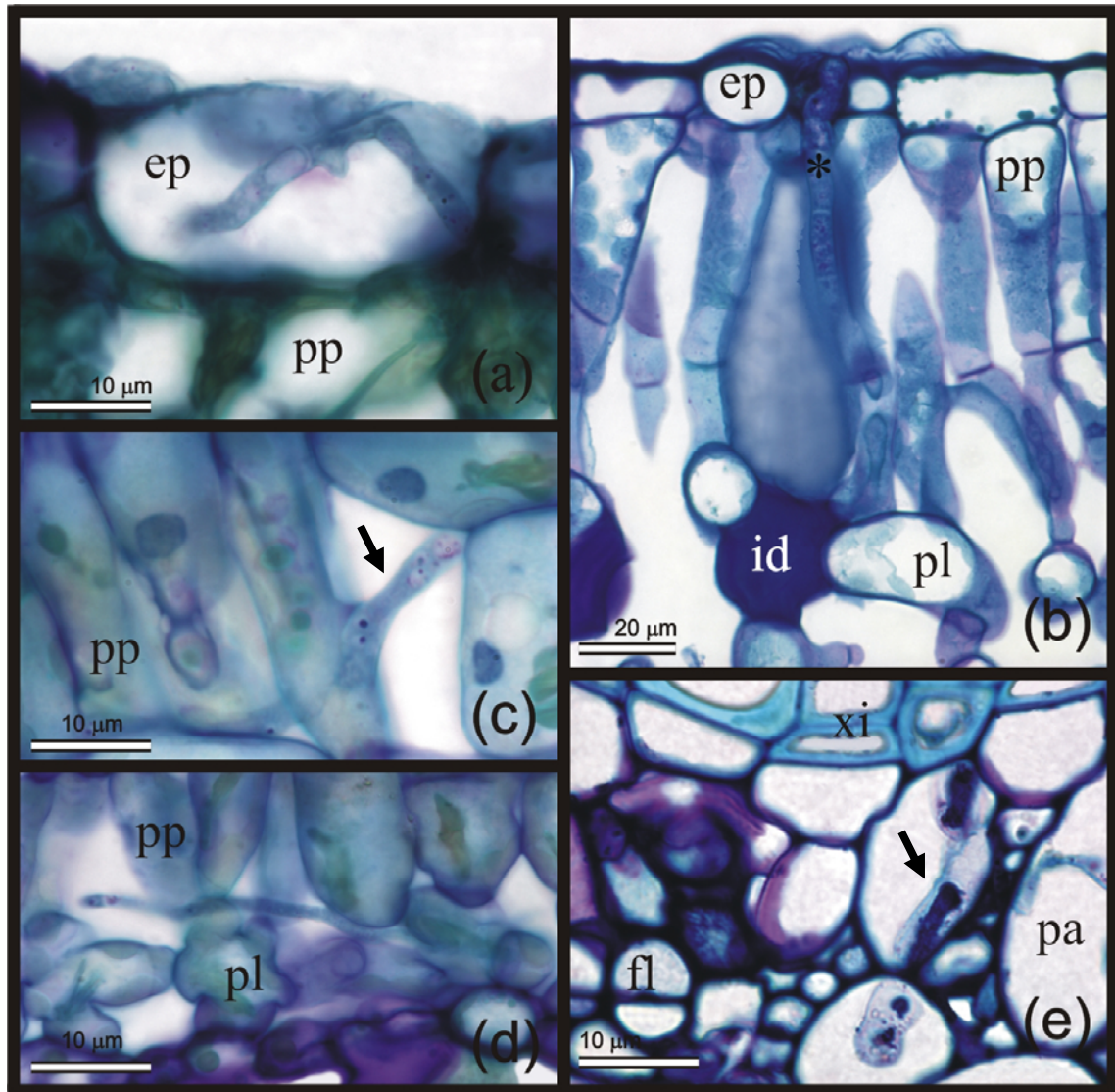


Figura 5 - Cortes transversais de lâminas foliares de *L. camara* e *L. radula* inoculadas com *C. cassiicola* (microscopia de luz). (a) Hifa localizada dentro célula epidérmica da superfície adaxial. (b) Hifa penetrando pela superfície adaxial. (c) Hifa transpondo célula do parênquima paliçadico (seta). (d) Hifa entre células do parênquima paliçadico e lacunoso. (e) Hifa na nervura central próxima ao xilema (seta). (a) e (b) - Isolado Cc-t. (c), (d) e (e) - Isolado Ccl. (a), (c) e (d) - *L. radula*, (b) e (e) - *L. camara*. ep = epiderme, pp = parênquima paliçadico, pl = parênquima lacunoso, id = idioblasto secretor, xi = xilema, fl = floema, * = hifa. (a) - 72 h.a.i., (b) e (d) - 24 h.a.i., (c) e (d) - 48 h.a.i.

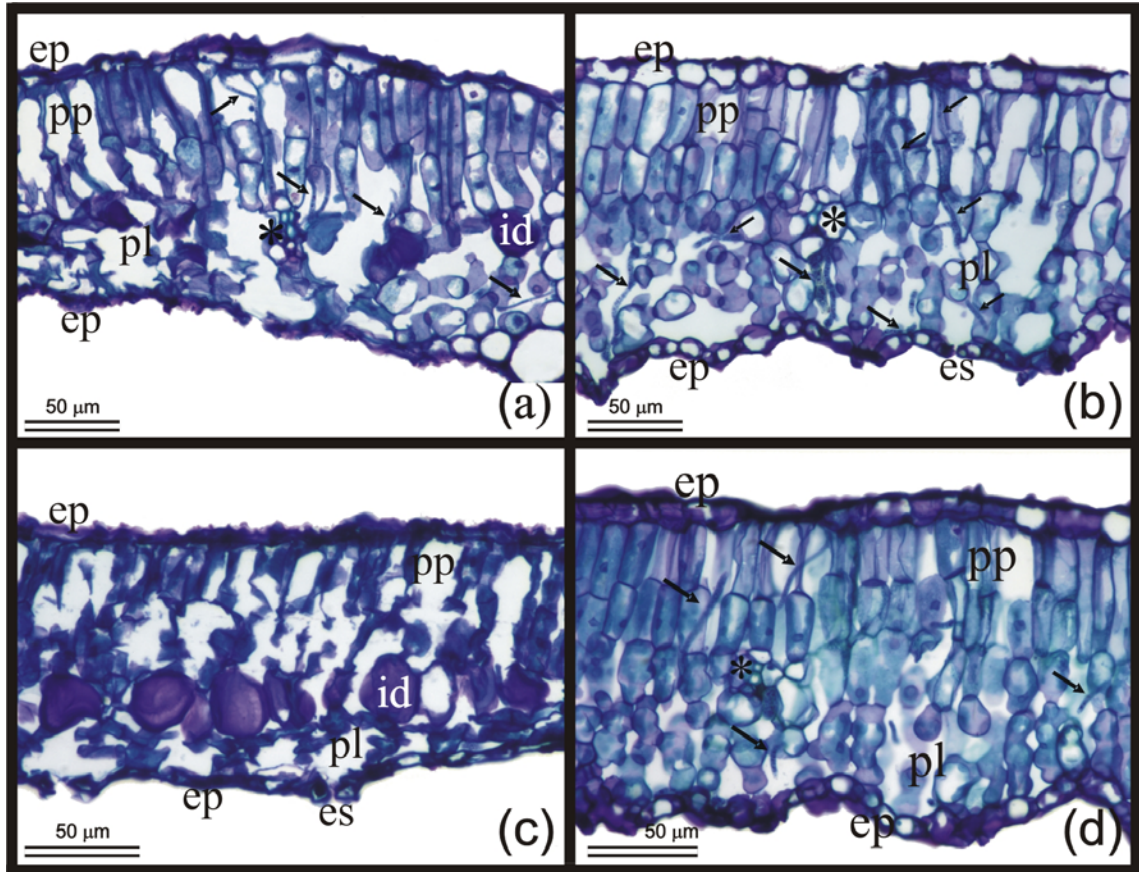


Figura 6 - Cortes transversais de lâminas foliares de *L. camara* e *L. radula* inoculadas com *C. cassicola* (microscopia de luz). (a) e (b) Hifas e células colapsadas no parênquima paliçadico e lacunosos. (c) Idioblastos intactos e mesófilo com células do parênquima paliçadico e lacunosos destruídas. (d) Hifas no mesofilo e células colapsadas no parênquima paliçadico. (a) e (b) - Isolado Ccl. (c) e (d) - Isolado Cc-t. (a) e (c) - *L. camara*, (b) e (d) - *L. radula*. ep = epiderme, pp = parênquima paliçadico, pl = parênquima lacunoso, id = idioblasto secretor, es = estômato, setas = hifas. (a) e (c) = 72 h.a.i., (b) e (d) = 48 h.a.i.

foi capaz de provocar sintomas nas folhas inoculadas. O espessamento confere uma coloração marrom-dourada brilhante às células epidérmicas. Esta reação pode ser observada a 24 h.a.i. e aconteceu quando ocorria o ataque do fungo.

A 72 h.a.i., verificou-se uma diminuição do número de conídios e a proliferação de hifas sobre a epiderme. As hifas penetraram a epiderme, percorreram o parênquima lacunoso e se ramificavam várias vezes atingindo locais distantes do ponto de penetração (Figuras 6a, 6b e 6d). No sentido vertical, a colonização ocorreu, predominantemente, da face abaxial para a face adaxial. Houve destruição completa do parênquima lacunoso. Em determinados locais necrosados do material infectado, onde se verificou a formação de tecido de cicatrização. A 24 e 48 h.a.i., a destruição do parênquima paliçádico devido à penetração do fungo foi menos freqüente, mas foi detectada em algumas regiões (Fig. 6b). Isso se deve ao fato de que o fungo coloniza de forma mais agressiva a face abaxial. Porém, o tecido paliçádico encontrava-se bastante degradado a 72 e 96 (Figs. 6a e 6c) h.a.i. quando a colonização por hifas oriundas da superfície abaxial já o atingia. Na região da nervura foi possível constatar uma desorganização do feixe vascular, associada à presença de hifas (Fig. 5e). Houve rompimento de células principalmente do floema e do parênquima. Muitos tricomas foram completamente destruídos e foram observadas, muitas vezes, áreas de tecido necrosado nas proximidades.

Os eventos relacionados à colonização são equivalentes para os dois isolados fúngicos testados e também não diferem em relação para as duas espécies de *Lantana*. Nota-se que a diferença predominante nas interações examinadas (isolados x planta hospedeira x superfície foliar) quanto aos eventos de penetração pareceu estar relacionada com a natureza distinta das superfícies abaxiais de *L. radula* e *L. camara*.

4. DISCUSSÃO

O surgimento de necroses em *L. camara* e *L. radula* após apenas 24 h.a.i. resultante da inoculação com os isolados de Ccl e Cc-t demonstra a alta agressividade desta espécie de fungo para *Lantana*. Em *Hevea brasiliensis* foi demonstrado que, com o desenvolvimento do fungo no tecido do hospedeiro, havia o aparecimento de lesões necróticas a 24 h.a.i. (Breton *et al.*, 1997). Nas interações fungo fitopatogênico-planta, o escurecimento protoplasmático de células adjacentes às hifas até a formação de necroses nas células epidérmicas sob as hifas são eventos observados após a infecção (Dankyn & Milholland, 1984). A desidratação dos tecidos promove a formação das lesões macroscópicas (Griffey & Leach, 1965).

Apesar de estudo anterior ter demonstrado uma especificidade elevada para Ccl (Pereira *et al.*, 2003) e existirem outros exemplos de especialização fisiológica dentro da espécie *C. cassiicola*, para o caso em estudo observou-se um comportamento similar entre Ccl (específico) e Cc-t (inespecífico) na interação com as duas espécies de *Lantana*. As diferenças estavam restritas ao tamanho das lesões necróticas produzidas em cada hospedeiro. Elas foram menores em *L. radula* e conjecturou-se que isso pode estar associado às diferenças físicas (microtopografia) entre a superfície abaxial de folhas de *L. camara* e *L. radula*. Outra possibilidade seria a atuação de substâncias químicas como os óleos essenciais na defesa de *L. radula* contra o ataque do fungo. Sabe-se que óleos essenciais de plantas podem atuar na proteção contra o ataque de herbívoros e patógenos (Werker, 1993). Nossos estudos comprovaram a alta toxicidade do óleo essencial de *L. radula* sobre *C. cassiicola*. Embora o óleo de *L. camara* também iniba o crescimento do fungo, a sua atividade é menos intensa (Capítulo 2). Essas diferenças de toxicidade podem estar diretamente relacionadas com a menor severidade da doença provocada por *C. cassiicola* em *L. radula*. Além disso, há uma maior concentração dos tricomas glandulares nas superfícies abaxiais de *L. radula* em relação a *L. camara* (Capítulo 1). Desta forma, é possível supor que além da topografia imprópria para um contato maior entre o fungo e o hospedeiro pode ser que a maior densidade dos tricomas glandulares torne a superfície abaxial de *L. radula* menos propícia para o desenvolvimento do fungo do que a de *L. camara*.

A penetração do fungo pelos espaços intercelulares foi verificada para os dois isolados nas duas espécies inoculadas. A penetração intercelular por *C. cassiicola* também foi verificada em *H. brasiliensis* (Purwantara, 1987). No entanto, na etapa de colonização o fungo se desenvolve tanto de forma intracelular como intercelular em *L. camara* e *L. radula*. Em *H. brasiliensis* observou-se que a colonização dos tecidos da folha acontece somente de forma intracelular (Breton *et al.*, 2000).

Apressórios foram formados nas quatro interações isolado x hospedeiro estudadas. A análise do processo de infecção sugeriu que a formação de apressórios é um fator que está associado com a patogênese. Essa tendência do patógeno de formar apressórios nas junções de células, independentemente da espécie vegetal, pode resultar de uma resposta a estímulos para a formação de apressórios em função da microtopografia foliar e da disponibilidade de nutrientes no microambiente das junções celulares (Araújo and Matsuoka, 2004). No entanto, às diferenças na microtopografia exibidas nas duas espécies de *Lantana*, sugere que possa haver fatores adicionais determinando a indução da formação dos apressórios, como envolvimento de estímulos químicos (Clay *et al.*, 1994; Rubiales and Niks, 1996). No presente trabalho não foram feitas análises quantitativas do número de apressórios formados para cada interação isolado/hospedeiro em busca de evidenciar sobre possíveis diferenças nesse aspecto das interações. Diferentemente do observado em *L. camara* e em *L. radula*, a forma preferencial de penetração em *H. brasiliensis* foi direta (Breton *et al.*, 1997, 2000). A penetração de *C. cassiicola* via estômatos em *H. brasiliensis*, assim como em *Lantana*, não foi comum (Breton *et al.*, 1997, 2000).

Os espessamentos de paredes das células, como reação à presença do fungo, não resultou na morte do patógeno, servindo como barreira ineficaz contra a sua penetração. Esse tipo de reação é confinado à parede celular e à lamela média e não envolve o citoplasma (Hachler & Hohl, 1984). Trata-se de deposição de lignina (Carpin *et al.*, 2001), que dificultaria a ação de enzimas do fungo para degradar os componentes das paredes. A coloração adquirida (marrom) é comum quando ocorre morte celular devido ao acúmulo de compostos fenólicos em células mortas (Heath, 1998). As necroses (morte programada de células) é um dos mais importantes mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de patógenos uma vez que estabelece uma barreira ao fluxo de água e

nutrientes para o patógeno (Griffey and Leach, 1965). Esta forma de retardar o patógeno seria uma estratégia de defesa da planta até que esta pudesse ativar o seu mecanismo de defesa química (Brown *et al.*, 1998; Breton *et al.*, 1997).

Corynespora cassiicola é um fungo necotrófico (Breton *et al.*, 2000) que atua destruindo mais efetivamente o mesofilo do que a epiderme, conforme observado por Purwantara (1987) no patossistema *C. cassiicola/Hevea*, e também verificado no presente estudo. A penetração do fungo levou ao colapso do tecido na face abaxial das folhas e à desorganização de células frente à progressão das hifas (Breton *et al.*, 2000). O ingresso do fungo está sempre associado com desorganizações das células do hospedeiro e alterações na parede celular (Benhamou & Lafontaine, 1995). A preferência de colonização do fungo, pela face abaxial, pode ser típica da interação de cada isolado com seu hospedeiro. Duarte *et al.* (1983) trabalhando com dois isolados diferentes de *C. cassiicola*, obtidos do mamoeiro e cacaueteiro, notou diferenças na morfologia, fisiologia e patogenicidade destes. Estes autores observaram que as estruturas reprodutivas eram formadas mais na face adaxial das folhas de mamoeiro e, em ambas as faces nas folhas de cacaueteiro, quando inoculados com isolado mamoeiro e cacaueteiro, respectivamente. Além disso, há evidências da produção de uma toxina por *C. cassiicola*, conforme investigado por Passos (2004) que seria importante para a ocorrência da doença e, portanto, um determinante primário da patogênese. Esta toxina reproduziria sintomas similares à doença induzida pelo fungo, bem como a necrose. A morte de células distantes das hifas indica a presença e difusão desta toxina que parece ter um papel importante no estabelecimento do fungo (Breton *et al.*, 2000).

Os eventos cruciais para o desenvolvimento da mancha necrótica de *C. cassiicola* em *L. camara* e em *L. radula* ocorrem na fase pré-penetração, onde os conídios do fungo após sua deposição germinam, ocorre a liberação de toxinas, a extensão das hifas e formação de apressórios em microregiões apropriadas para a penetração do tecido do hospedeiro, sobretudo na superfície abaxial. Porém, as diferenças verificadas na topografia foliar da superfície abaxial das duas espécies de *Lantana* e a natureza química dos óleos essenciais de cada espécie parece ter interferido diretamente no estabelecimento e desenvolvimento de *C. cassiicola*. Na interação Ccl/hospedeiro verificou-se que o isolado apresenta maior especificidade com *L. camara*. O tamanho das lesões

formadas nesta espécie foi superior ao observado em *L. radula*. Na interação Cc-t/hospedeiro novamente verificou-se que o isolado apresenta maior interação com *L. camara* o que também pode ser atribuído às diferenças nas extensões das lesões em cada espécie. Portanto, o grau de severidade da doença produzido por cada isolado atua está diretamente relacionado ao hospedeiro inoculado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Araújo JCA, Matsuoka K, 2004. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomates resistentes e suscetível. *Fitopatologia brasileira* **29**, 268-275.
- Barbieri RL, Carvalho FIF, 2001. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. *Revista Brasileira de Agrociência* **7**, 79-83.
- Barreto RW, Evans HC, Ellison CA, 1995. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. *Mycological Research* **99**, 769-782.
- Benhamou N, Lafontaine PJ, 1995. Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced structural responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Planta* **197**, 89-102.
- Bozzola JJ, Russell LD. Electron microscopy. Boston: Jones and Barplett Publishers, 1992.
- Breton F, Sanier C, D'Auzac J, 1997. Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. *Journal of Plant Physiology* **151**, 595-602.
- Breton F, Sanier C, D'Auzac J, 2000. Role of cassicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*. *Journal Rubber Research* **3**, 115-128.
- Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield J, Bolwell GP, 1998. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *The Plant Journal* **15**, 333-343.
- Bruzzese E, Hansan S, 1983. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. *Plant Pathology* **32**, 335-338.
- Carpin S, Crevecoeur M, Meyer M, Simon P, Greppin H, Penel C, 2001. Identification of a CA²⁺ -pectate binding on an apoplastic peroxidase. *The Plant Cell* **13**, 511-520.

- Clay K, Kover PX, 1996. The Red Queen Hypothesis and plant/pathogen interactions. *Annual Reviews Phytopathology* **34**, 29-50.
- Clay RP, Enkerly J, Fuller MS, 1994. Induction and formation of *Cochliobolus sativus* appressoria. *Protoplasma* **178**, 34-47.
- Dankyn ME, Milholland RD, 1984. Histopathology of ripe rot caused by *Colletotrichum gloeosporieoides* on muscadina grap. *Phytopathology* **74**, 1339-1341.
- Day MD, Willey CJ, Playford J, Zalucki MP, 2003. *Lantana* current management status and future prospects. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Deena MJ, Thoppil JE, 2000. Antimicrobial activity of the essencial oil of *Lantana camara*. *Fitoterapia* **71**, 453-455.
- Dhingra OD, Sinclair JB, 1995. Basic plant pathology methods. 2º ed. London: CRC Lewis Publishers.
- Duarte MLR, Asano S, Albuquerque FC, 1983. Estudo comparativo das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassicola*. *Fitopatologia Brasileira* **8**, 205-215.
- Ellis MB, 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Griffey RT, Leach LG, 1965. The influence of age tissue on development of bean anthracnose lesion. *Phytopathology* **55**, 915-918.
- Hachler H, Hohl HR, 1984. Temporal and spatial distribution patterns of collar and papillae wall appositions in resistant and susceptible tuber tissue of *Solanum tuberosum* infectible by *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology* **24**, 107-118.
- Heath MC, 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 117-124.
- Hernandez T, Canales M, Ávila JG, Garcia AM, 2005. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **96**, 551-554.

- Keane PJ, Limongiello N, Warren MA. 1988. A modified method for clearing and staining leaf-infecting fungi in whole leaves. *Australian Plant Pathology* **17**, 37-38.
- Kraus JE, Arduim M, 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR: Editora Universidade Rural.
- Mckeen WE, Svircev AM, 1981. Early development of *Peronospora tabacina* in the *Nicotiana tabacum* leaf. *Canadian Journal of Plant Pathology* **3**, 145-158.
- O'Brien PP, McCully ME, 1981. The study of plants structure principles and selected methods. Melbourne-Australia: Termarcarphi Pty. Ltda, 45p.
- Onesirosan P, Mabuni CT, Morin RB, Rich DH, Army DC, 1975. Toxin production by *Corynespora cassiicola*. *Physiological Plant Pathology* **5**, 289-295.
- Passos JL, 2004. Avaliação da fitotoxicidade de compostos isolados do fungo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei. e alterações anatômicas causadas por esse em *Lantana camara* L. (Verbenaceae). Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação (Mestrado em Botânica).
- Pereira JM, 2001. *Prospodium tuberculatum* e *Corynespora cassiicola* como agentes de biocontrole de *Lantana camara*. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, Dissertação (Doutorado em Fitopatologia).
- Pereira JM, Barreto RW, 2000. Additions to the mycobiota of the weed *Lantana camara* (Verbenaceae) in southeastern Brazil. *Mycopathology* **151**, 71-80.
- Pereira JM, Barreto RW, Ellison CA, Maffia LA, 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* **26**, 21-31.
- Purwantara A, 1987. Studi Histologi Daun Karet Yang Terserang *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Menara Perkebunan* **55**, 47-49.
- Rubiales D, Niks RE, 1996. Avoidance of rust infection by some genotypes of *Hordeum chilense* due to their relative inability to induce the formation of appressoria. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**, 89-101.
- Santos-Seixas CD, Pereira JM, Barreto RW, 2000. Caldo de vegetais-ágar: um substituto adequado para o meio V8® - ágar. *Fitopatologia Brasileira* **25**, 419-419.

Silva WPK, Deverall BJ, Lyon BR, 1998. Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathology* **47**, 267-277.

Werker E., 1993. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **8**, 249-255.

CONCLUSÕES GERAIS

As folhas de *L. camara* e *L. radula* apresentam diferenças que podem ser usadas como subsídio à taxonomia. As principais características distintivas verificadas foram os idioblastos secretores e cristalíferos, os tricomas glandulares e não glandulares e, por último, a diferença na superfície abaxial das duas espécies.

Já os estudos histoquímicos evidenciaram diferenças nos secretados dos três tipos de tricomas capitatos de *Lantana camara* e *L. radula* e nos idioblastos de *L. camara*. As substâncias detectadas são de natureza mista (lipofílicos e hidrofílicos). As análises dos óleos essenciais de *Lantana camara* e *L. radula* revelaram diferenças na sua composição e o bioensaio realizado revelou diferença na atividade biológica destes em *C. cassicola*.

O estudo histopatológico demonstrou que as principais diferenças observadas no patossistema *C. cassicola/Lantana* spp. parecem estar diretamente relacionadas ao hospedeiro. Houve o aparecimento de lesões 24 horas após inoculação, evidenciou-se a formação de apressórios e a penetração direta. Verificou-se reação de hipersensibilidade devido à presença do fungo e o parênquima lacunoso e paliçádico sofreram injúrias severas. O fungo atua como um agente necotrófico.