

Edison Cardona Medina

***Escobedia grandiflora* (L.f.) Kuntze (Orobanchaceae):
ESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA SEMINAL E PÓS-
SEMINAL NO PARASITISMO COM *Pennisetum purpureum***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências; área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Coorientadora: Prof. Dra. Marisa Santos

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Medina, Edison

Escobedia grandiflora (L.f.) Kuntze
(Orobanchaceae): ESTRUTURA E ULTRAESTRUTURA SEMINAL
E PÓS-SEMINAL NO PARASITISMO COM *Pennisetum*
purpureum / Edison Medina ; orientador, Rubens
Nodari, coorientadora, Marisa Santos, 2017.
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Haustório. 3.
Parasita. 4. Hospedeiro. I. Nodari, Rubens . II.
Santos, Marisa . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. IV. Título.

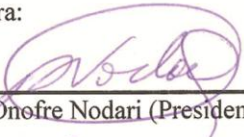
***Escobedia grandiflora* (L.F.) Kuntze
(Orobanchaceae): estrutura e ultraestrutura
seminal e pós-seminal no parasitismo com
*Pennisetum purpurem***

por

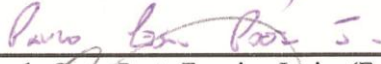
Edison Cardona Medina

Dissertação julgada e aprovada em 22/02/2017, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

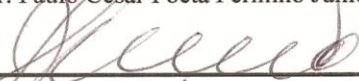
Banca Examinadora:



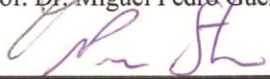
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Presidente-CCA/UFSC)




Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior (Externo-CBS/UFSC)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Interno-CCA/UFSC)



Prof.ª Dr.ª Neusa Steiner (Interno-CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Este trabalho está dedicado à minha
mãe e minha irmã, e à memória da
Diana Morales, saudades infinitas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos.

À minha mãe Adriana e à minha irmã Dayana pelo apoio incondicional. Aos meus queridos familiares na Colômbia pela força e o carinho.

Ao professor Rubens Onofre Nodari pela orientação e pelos ensinamentos e confiança, por acreditar em mim, no meu trabalho, e disponibilizar as ajudas para a realização do mesmo.

Agradeço à professora Marisa Santos pela coorientação, pelo interesse em nosso trabalho por acreditar em mim, por todos os ensinamentos, dicas e sugestões e por disponibilizar todas as ajudas para realização do trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudo de mestrado concedida e à Universidade Federal de Santa Catarina em particular ao programa de Pós-Graduação em Recursos genéticos Vegetais e ao departamento de Botânica pelo espaço para a formação e elaboração do trabalho.

À Sandra Muriel pelos conselhos, por me incentivar na pesquisa e por tantos anos de amizade.

Ao Lido Borsuk, Giulia, Diego, Sebastian e David pela amizade e pela ajuda nas coletas de campo das populações de açafão.

Ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), pela disponibilidade de materiais e equipamentos e aos meus amigos Yohan, Thiago Ornellas, Daniel Houlderbaum, Gleison, Liliana, Marcia, Thiago Tomazetti, Patrick, Hugo, Leila, Clarissa, Catarina, Luiza, grato por tantos momentos legais de parceria dentro e fora do lab.

Aos meus amigos Diana, Tatiana, Lara, Marlon, Jaime, Jose, Julio, Lorena, Natalia, Gabriel, Betzaida, Nickolas, e Karin pelos conselhos, pela amizade e pelas ajudas no meu trabalho. Todos vocês são minha família aqui no Brasil.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, LAVEG, e aos colegas Maiby,

Ana Lando, Grazi, Pedro, Annielly, obrigado pelas ajudas.

Ao Laboratório de Microscopia Central, LCME, pelas análises do MEV, MET e CONFOCAL, também a Katina e a Eliana pelas ajudas e sugestões nas diferentes microscopias.

Para todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram no meu trabalho, gratidão.

“The evolution is opportunistic, and no better examples of this in the plant world can be found than among parasitic plant”

(Job Kuijt. 2008)

RESUMO

O parasitismo em plantas é um fenômeno de interação entre duas plantas, em que a planta parasita precisa penetrar no tecido vivo de outra planta captando delas os recursos necessários para sobreviver. Esse é o caso de *Escobedia grandiflora*, conhecida como açafrao do campo. Esta planta hemiparasita possui raízes alaranjadas, as quais têm sido utilizadas como corante alimentício, com expressivo potencial para a indústria. Pouco se sabe sobre biologia dessa planta, portanto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura e a ultraestrutura da semente e da planta durante o parasitismo com *Pennisetum purpureum*. Foram localizadas populações naturais de *E. grandiflora*, no estado de Santa Catarina (SC), e coletadas sementes em três dessas populações. Rizomas do hospedeiro *P. purpureum* foram obtidos de plantas localizadas no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSC. Dois ensaios foram feitos. No primeiro, foram semeadas sementes em papel absorvente umedecido durante 18 dias e foram feitas três coletas, duas durante a germinação e uma na pós-germinação. O segundo ensaio consistiu de dois tratamentos: no primeiro, sementes de *E. grandiflora* embebidas por cinco dias, foram semeadas com plantas do hospedeiro (CH), em bandejas com substrato. No segundo, as sementes embebidas foram semeadas em bandejas sem hospedeiro (SH). Para cada tratamento foram estabelecidas 40 repetições, totalizando 80 unidades amostrais. Na caracterização estrutural e de ultraestrutura, as amostras foram processadas e analisadas em microscopias ópticas, confocal e eletrônicas de varredura e transmissão. Entre os resultados, populações de *E. grandiflora* foram encontradas em quatro municípios de SC, dois registros novos de ocorrência de populações naturais em Campos Novos e Florianópolis, sendo um primeiro registro de *E. grandiflora* em todo o litoral Brasileiro. Estruturalmente, as sementes de *E. grandiflora* estavam compostas pela exotesta e endotélio, seguidas pelo perisperma e embrião. As sementes apresentaram reservas nutricionais armazenadas principalmente nos cotilédones. A protrusão da raiz foi caracterizada por um anel de pelos radiculares na junção hipocótilo-raiz, com alongamento das células corticais, cuja função é estabilizar a plântula no substrato e absorver rapidamente água e nutrientes. As plântulas de *E. grandiflora* formaram haustórios e penetraram com sucesso a raiz do hospedeiro, após 22 dias da emergência da raiz. Desde os 22 até os 64 dias, foi observada uma acumulação de grãos de amido nas células corticais da raiz. Esses grãos de amido mostraram-se menores no caule comparados com os da raiz. *Escobedia grandiflora* exibiu lento

crescimento das plântulas, concentrou todas as reservas nutricionais para desenvolver o sistema radicular, aproximou-se das raízes do hospedeiro e formou haustórios para parasitar a raiz do hospedeiro. Também foi constatada a pigmentação laranja amarelada no interior dos grãos de amido, a qual indicou relação com material eletrodense observado nos amiloplastos. Os resultados sugerem que esses carotenóides poderiam ser formados dentro dos amiloplastos. As plantas desenvolveram somente haustórios laterais, os quais formaram-se ao longo da raiz. Passados 43 dias da germinação, *E. grandiflora* desenvolveu as primeiras folhas definitivas, passando ao estágio de planta. Nas folhas foram registrados dois tipos de tricomas, captados e não captados. O haustório estava composto, externamente, por uma epiderme, com pelos radiculares, e, internamente, apresentou uma região basal com tecido provascular, elementos traqueais, corpo hialino e endófito. A formação dos haustórios iniciou-se com o aumento no tamanho das células corticais a subsequente aproximação do haustório na raiz de *P. purpureum*, até abranger o tecido do hospedeiro. No haustório foram observados compostos pécticos principalmente nos elementos traqueais e na interface parasita-hospedeiro. Esses compostos têm a função de unir as epidermes do haustório e do hospedeiro, facilitando a entrada do endófito do haustório no cilindro central do hospedeiro. Os haustórios desenvolvidos aos 22 dias estavam desprovidos de corpo hialino, mas aos 64 dias já se apresentavam maduros, com corpo hialino. Em plantas CH e SH, diferenças estruturais entre as duas foram observadas, tais como o aumento do número de grãos de amido nas células corticais, o aumento no tamanho do cilindro central, a maior pigmentação das raízes e a maior quantidade de haustórios, durante o parasitismo até 64º dia. Plantas de *E. grandiflora* SH formaram um cilindro central, nas raízes, de menor tamanho em todas as etapas do desenvolvimento, comparados com plantas CH. Por outro lado, *E. grandiflora* não necessitou de um hospedeiro para formar haustórios, não obstante, a presença do hospedeiro promoveu a rápida formação dos haustórios.

Palavras chave: emergência de raiz, pelos radiculares, haustório, hospedeiro.

ABSTRACT

Plant parasitism is a fascinating interaction phenomenon between two plants, where one parasitic plant needs to penetrate the living tissues of another plant from which it obtains some materials needed for survival. This is the case of *Escobedia grandiflora*, also known as 'açafraão do campo', which is a wild hemiparasitic plant with orange-yellow roots commonly used for food dye. Little is known about its biology, and therefore, the objective of this study was to perform structural and ultrastructural analysis of *E. grandiflora* seed and plant during the parasitism with *Pennisetum purpureum*. There has been found natural populations of *E. grandiflora* in Santa Catarina (SC) state; and seeds were collected from three natural populations, and the *P. purpureum* host rhizome was collected from plants at Center for Agricultural Sciences of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. Two assays were carried out: in the first one, seeds were set on moistened absorbent paper for 18 days, and were made three harvests, two during germination and one in the post-germination stage. The second assay was contained two treatments; in the first one, 5 days imbibed seeds were sowed with host plants (CH), previously planted 30 days before, in trays with substrate. In the second treatment, the imbibed seeds were sowed in trays without host (SH). For each treatment it was established forty repetitions, totalizing 80 sample units. For the structure and ultrastructure characterization, sample roots were processed and analyzed in light microscopy, confocal microscopy and electronic scanning and transmission microscopy. Among the results, natural populations of *E. grandiflora* were found in four municipalities of SC, two new records for natural populations occurrence in Campos Novos and Florianópolis, the last being the first record in Brazilian coast. Structurally, *E. grandiflora* seeds were composed by two seed coat (testa and endothelium) covering the perisperm and the embryo. The seeds presented storage reserves mainly into the cotyledons. The emergence of the radicle were characterized by a collar of hair roots which encircles the axis at the root-hypocotyl junction, with the elongation of the internal cortical cells, and they had the function of anchor the seedling in its substrate and quickly absorb water and nutrients, at a critical stage for the seedling that had slow growth and still did not connect with the host root. The seedling of *E. grandiflora* formed haustoria and reached the host root with success after 22 days of root emergence. Since the day 22 until the 64 days, it was observed a starch grains accumulation on the root cortical cells, the starch grains

were smaller in the stem and larger on the root. *E. grandiflora* presented slow growth seedling, concentrated all storage reserves to develop the root system, approached to the host root and formed haustoria to parasite the host root. As well, it was verified an orange-yellow pigmentation in the inside of the starch grain that indicated a relation with electron-dense material observed in the amyloplasts. Those carotenoids could be produced into the amyloplasts. The plants developed only lateral haustoria, which formed along the root. After 43 days of the emergence, *E. grandiflora* developed definitive first leaves, beginning the plant phase, and were observed two trichome types, glandular and non glandular trichome. The haustoria was externally composed by an epiderm with root hairs, and internally presented the base of haustoria with the procambium, the tracheary elements, the hyaline tissue and parasite endophyte. Haustorio initiation began with the increase of the cortical cells size, and following haustoria approaches into *P. purpureum* root until anchoring the host root surface. It was observed into haustoria, pectins substances, mainly into tracheary elements and the interface parasite-host. These substances are implicated in sticking and allow internal anchoring of the parasite to the host tissue, facilitating the parasite endophyte to reach the central cylinder of the host. The haustoria developed after 22 days lacked hyaline body; however, it was different after 64 days, when they presented developed haustoria with hyaline body. In both CH and SH plants, structural differences between them, like the increase number of the starch grains into cortical cells, the central cylinder size increase, the root pigmentation increase and the haustoria quantity increase, were observed during the parasitism after 64 days of root emergence. The SH plants presented a smaller central cylinder in all stages of development as compared to CH plants. In contrast, *E. grandiflora* did not need the host to develop haustoria; however, the host presence promotes a quick haustorial formation.

Key words: root emergence, hairs root, haustoria, host.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>Escobedia grandiflora</i> . (a) Planta em estágio vegetativo; (b) raízes de cor laranja; (c) planta em floração; (d) planta em frutificação; (e) secção longitudinal do fruto maduro; (f) semente madura. Barra:.....	67
Figura 2. Origem da semente e estabelecimento dos ensaios de <i>Escobedia grandiflora</i> para (i) caracterização de sementes e (ii) comparação entre dois tratamentos com e sem a presença da planta parasita..	68
Figura 3. Localização das quatro populações naturais de <i>E. grandiflora</i>	69
Figura 4. Vista geral das populações naturais de <i>E. grandiflora</i>	70
Figura 5. Morfoanatomia da semente de <i>E. grandiflora</i> e do início da germinação.	71
Figura 6. Morfoanatomia da plântula de <i>E. grandiflora</i> na germinação e início do desenvolvimento.	72
Figura 7. Morfoanatomia das plântulas de <i>E. grandiflora</i> , aos 15 dias, na presença de <i>P. purpureum</i> .	73
Figura 8. Morfoanatomia das plântulas de <i>E. grandiflora</i> , aos 22 dias, associadas ao <i>P. purpureum</i> .	74
Figura 9. Morfoanatomia da parte aérea de <i>E. grandiflora</i> , aos 43 dias, com destaque dos indumentos: tricomas capitados e não capitados.....	75
Figura 10. Morfoanatomia das plantas de <i>E. grandiflora</i> , aos 64 dias, associadas ao <i>P. purpureum</i> .	76
Figura 11. Grãos de amido no parênquima cortical da raiz de <i>E. grandiflora</i> .	77
Figura 12. Aspectos morfoanatômicos do haustório de <i>E. grandiflora</i> ligado nas raízes de <i>P. purpureum</i> .	78
Figura 13. Haustório de <i>E. grandiflora</i> .	79
Figura 14. Formação do haustório de <i>E. grandiflora</i> e parasitismo nas raízes do <i>P. purpureum</i> .	80
Figura 15. Morfoanatomia das plantas de <i>E. grandiflora</i> sem hospedeiro...	81

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Estruturas internas e externas da planta parasita <i>E. grandiflora</i> , analisadas nas microscopias óptica (MO), eletrônica de varredura (MEV), óptica confocal (MC) e eletrônica de transmissão (MET).....	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CH – *Escobedia grandiflora* como hospedeiro *Pennisetum purpureum*

LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

MC – Microscópio Óptico Confocal

MO – Microscópio Óptico

MET – Microscópio Eletrônico de transmissão

MEV – Microscópio Eletrônico de varredura

SH – *Escobedia grandiflora* sem o hospedeiro *Pennisetum purpureum*

UFSC – Universidad Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. PARASITISMO EM PLANTAS	25
2.1.2. Família Orobanchaceae	26
2.2. CARACTERÍSTICAS DAS PLANTAS PARASITAS DE OROBANCHACEAE	27
2.2.1. Semente	27
2.2.2. Germinação das sementes e plântula	28
2.2.3. O haustório	29
2.3. AÇAFRÃO DO CAMPO (<i>Escobedia grandiflora</i>)	31
2.3.1. Características gerais da planta	31
2.3.2. Importância de <i>E. grandiflora</i>	32
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. COLETA DE FRUTOS E SEMENTES DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Escobedia grandiflora</i>	37
4.2. ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL DO HOSPEDEIRO <i>Pennisetum purpureum</i>	37
4.3. PREPARO DOS ENSAIOS	38
4.3.1. Semente e plântula de <i>E. grandiflora</i>	38
4.3.2. Etapa inicial do parasitismo	38
4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E DE ULTRAESTRUTURA	40
4.4.1. Análise em Microscopia Óptica (MO)	41
4.4.2. Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
4.4.3. Análise em Microscopia Óptica Confocal (MC)	42
4.4.4. Análise em Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)	42
6. RESULTADOS	43
6.1. IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>E. grandiflora</i>	43
6.2. SEMENTE, GERMINAÇÃO E PLÂNTULA DE <i>E. grandiflora</i>	43
6.3. PLÂNTULA E INICIO DO PARASITISMO DE <i>E. grandiflora</i>	45
6.4. PLÂNTULAS E PLANTAS COM E SEM HOSPEDEIRO	49
7. DISCUSSÃO	51

7.1.	IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>E. grandiflora</i>	51
7.2.	SEMENTE, GERMINAÇÃO E PLÂNTULA DE <i>E. grandiflora</i>	51
7.3.	PLÂNTULA E INICIO DO PARASITISMO DE <i>E. grandiflora</i>	54
7.4.	PLÂNTULAS E PLANTAS COM E SEM HOSPEDEIRO	60
8.	CONCLUSÕES	63
9.	PERSPECTIVAS DO FUTURO	65
10.	ILUSTRAÇÕES	67
	REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

As plantas parasitas constituem grupo intrigante que se caracteriza por requerer de outras plantas suprimento para suas necessidades nutricionais. Elas atingem seu objetivo por meio de uma estrutura conhecida como haustório, comum em todas as raízes das plantas parasitas, sendo a única estruturada planta, capaz de entrar no tecido de outra planta e absorver água e nutrientes (BAIRD; RIOPEL, 1983).

As plantas parasitas distribuem-se em 28 famílias de plantas com aproximadamente 4500 espécies (MALÉCOT; NICKRENT, 2008). Uma das famílias mais importante dentro deste vasto grupo é a família Orobanchaceae, que inclui o maior número de plantas parasitas de raiz entre as angiospermas (BENNETT; MATHEWS, 2006).

A importância da família está no fato de que abrange plantas não parasitas e todos os tipos de parasitismo de raiz possíveis, desde hemiparasitismo (Obrigatório e facultativo) até holoparasitismo (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Também são importantes as pesquisas sobre a origem e a evolução das plantas parasitas a partir de plantas não parasitas (WESTWOOD, *et al.*, 2010). Neste grupo se encontram espécies que fazem parte das comunidades naturais e algumas escassas espécies têm uso medicinal e alimentício. Outras espécies afetam cultivos de importância econômica, tornando-se uma das principais razões para o início das pesquisas sobre plantas parasitas (MURIEL *et al.*, 2015; REN, *et al.*, 2010).

Dentro da família existe uma das poucas espécies de plantas parasitas que foi valorizada e de amplo uso durante vários séculos por distintos povos. Esta espécie nativa de América é conhecida como açafraão do campo (*Escobedia grandiflora* (L.f.) Kuntze), cujas raízes são alaranjadas e provavelmente a civilização *chibcha* foi à primeira comunidade em aproveitá-la (PENNELL, 1931). As raízes de *E. grandiflora* foram usadas como corante alimentício e muitas comunidades têm usado as raízes para o tratamento de problemas associados ao fígado (MURIEL *et al.*, 2015; PENNELL, 1931). Este uso foi tão valorizado que a planta era bastante comercializada nos mercados das cidades principais na Colômbia, como em Medellín. Com a entrada nos anos 60's de outros corantes naturais e químicos, o uso do açafraão do campo começou diminuir, até ser esquecido e limitado só ao uso pelas comunidades próximas às populações naturais (MURIEL *et al.*, 2015).

Assim, destaca-se o enorme potencial que possuem as raízes desta planta parasita na medicina e para a produção de pigmentos. Para aproveitar este potencial, são necessários estudos focalizados principalmente na biologia da planta, como desenvolvimento inicial das plântulas, compatibilidade e preferência por um ou mais hospedeiros, anatomia do haustório e do início do parasitismo, fatores de indução dos haustórios, formação dos carotenóides nas raízes da planta e protocolo de extração dos carotenóides. Estas informações que são escassas, mas fundamentais visando o aproveitamento do potencial da planta. Sobre os aspectos mencionados anteriormente, encontra-se somente os trabalhos de CARDONA e MURIEL (2015) e MURIEL *et al.* (2015), sendo que os demais trabalhos estão relacionadas à descrição morfológicas da família Orobanchaceae.

Em geral, o estágio de plântula depende dos recursos armazenados na semente para sobreviver (BEWLEY *et al.*, 2013) e esse estágio, nas plântulas parasitas, é crítico, pois a plântula precisa desenvolver rapidamente as suas raízes para aproximar-se das raízes de um potencial hospedeiro. Diante do exposto, torna-se fundamental compreender como se comporta estruturalmente a plântula desde a protusão da raiz até parasitar a raiz de um hospedeiro, para entender porque o crescimento é lento. Desta maneira, obter conhecimento de quais etapas são mais críticas durante o desenvolvimento da plântula e como esses aspectos afetam o parasitismo inicial com as plantas hospedeiras, é de grande importância. Entenda-se como parasitismo inicial, a primeira formação de haustórios e subsequente parasitismo. Por consequência, é necessário conhecer bem a estrutura do haustório e entender como é a formação inicial e posterior ligação na raiz do hospedeiro, devido ao fato de que é a estrutura mais importante da plântula.

Dentro desse panorama, essa pesquisa pretendeu caracterizar a estrutura da semente e do subsequente crescimento de plântulas e plantas de *E. grandiflora* no parasitismo com as raízes do hospedeiro *Pennisetum purpureum* Schumach. Foram analisadas as estruturas básicas da semente, da plântula desde a germinação, da raiz, da estrutura no início do desenvolvimento do haustório de *E. grandiflora* até entrar no tecido do hospedeiro. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura e ultraestrutura da semente e da plântula de *E. grandiflora* durante o parasitismo com *P. purpureum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PARASITISMO EM PLANTAS

“Plantas parasitas configuram um fenômeno de estreita interação planta à planta, com características comuns a muitas plantas não parasitas, mas com um modo de expressão e características únicas” (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). As plantas parasitas precisam entrar no tecido vivo de outra planta, conhecida como hospedeiro, captando delas os recursos necessários para sobreviver (HEIDE-JØRGENSEN, 2008). Elas têm uma estreita ligação com o tecido do hospedeiro por meio de uma estrutura especializada da raiz conhecida como haustório. Segundo a estrutura que a planta parasitar, podem ser classificadas em parasitas de caule ou de raiz. Espécies parasíticas ocorrem nas angiospermas em 28 famílias, com aproximadamente 250-275 gêneros e 4500 espécies, sendo 60% parasitas de raiz e 40% de caule (MALÉCOT; NICKRENT, 2008; PRESS, 1995). As famílias de plantas parasitas mais representativas são Balanophoraceae, Convolvulaceae, Loranthaceae, Orobanchaceae, Rafflesiaceae, Santalaceae, Visaceae. Plantas parasitas são comumente generalistas, aceitando uma ampla gama de espécies hospedeiras. Em plantas parasitas de raiz, esta característica parece ser uma vantagem, porque podem absorver das raízes dos hospedeiros diferentes tipos de nutrientes, em quantidades distintas.

Dentro dos hospedeiros das plantas parasitas são mais comuns as espécies hospedeiras dicotiledôneas que monocotiledôneas, no entanto, as gramíneas são hospedeiros frequentes, porque têm um abundante sistema radicular com raízes finas, as quais são fáceis de parasitar (HEIDE-JØRGENSEN, 2008; PHOENIX; PRESS, 2005). Embora generalistas, as plantas parasitas podem ter preferência por alguns hospedeiros; as raízes de possíveis hospedeiros respondem de maneiras diferentes à ligação pelos haustórios de plantas parasitas de raiz (PHOENIX; PRESS, 2005; RÜMER *et al.*, 2007).

As plantas parasitas podem ser classificadas em dois tipos: plantas holoparasitas, aquelas que não têm suficiente clorofila para fazer fotossíntese e, assim, absorvem principalmente solutos orgânicos do floema do hospedeiro; e plantas hemiparasitas, as quais fazem

fotossíntese e, com isto, absorvem água e solutos inorgânicos do xilema do hospedeiro. As plantas holoparasitas são obrigatórias devido à sua dependência pelo hospedeiro. As plantas hemiparasitas constituem 90% de todas as plantas parasitas existentes (HEIDE-JØRGENSEN, 2008; JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013; PRESS, 1995). Conforme HEIDE-JØRGENSEN (2008), as plantas hemiparasitas podem ser plantas facultativas ou obrigatórias. As facultativas podem permanecer vivas por longos períodos de tempo sem o hospedeiro, embora a produtividade da planta aumente quando os nutrientes são fornecidos por uma ou mais plantas. As obrigatórias necessitam de um hospedeiro para sobreviver e produzir estruturas reprodutivas.

2.1.2. Família Orobanchaceae

A família Orobanchaceae, anteriormente com os representantes incluídos na família Scrophulariaceae, é morfologicamente diversa e inclui o maior número de espécies parasitas de raízes do reino Plantae (BENNETT; MATHEWS, 2006; PHOENIX; PRESS, 2005; WOLFE *et al.*, 2005). Esta família apresenta apenas um gênero não parasita (*Lindenbergia*), e os demais incluem espécies de plantas hemiparasitas (facultativas-obrigatórias) e holoparasitas (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Orobanchaceae é uma família cosmopolita, com 89 gêneros e aproximadamente 1613 espécies (“Orobanchaceae — The Plant List”, 2013). Dentre estes, entre 300-330 espécies e 21 gêneros são nativas do Neotrópico, especialmente dos Andes e em regiões de altitude no Brasil (SOUZA, 2012). Alguns gêneros da família, como *Alectra*, *Orobanche* e *Striga*, afetam a produtividade de plantas de lavoura como ervilha, feijão, milho, arroz e sorgo, sendo umas das razões iniciais para o estudo das plantas parasitas. Plantas do gênero *Striga*, por exemplo, provocam grandes perdas na produção dos cereais na África subsaariana (FERNÁNDEZ-APARICIO; FLORES; RUBIALES, 2016; RICHES; HAMILTON; PARKER, 1992; SCHOLE; PRESS, 2008). Muitas espécies da família são componentes das comunidades de vegetação natural em diferentes lugares do mundo e importantes pelo uso medicinal e alimentar, tais como *Pedicularis cephalantha* Franch., *Escobedia grandiflora*, e *Euphrasia officinalis* (L.) Hook. (BUSSMANN; GLENN; SHARON, 2010; MURIEL *et al.*, 2015; REN, *et al.*, 2010; TROVATO *et al.*, 2000).

2.2. CARACTERÍSTICAS DAS PLANTAS PARASITAS DE OROBANCHACEAE

2.2.1. Semente

Esta família exhibe sementes pequenas compreendidas entre 0,2-5 mm de comprimento, com uma ampla diversidade de formas e características superficiais, composta por uma primeira camada de células externas conhecida como testa (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Estas características morfológicas, em particular a translucidez das sementes e a ornamentação da exotesta ou testa exterior, são características taxonômicas dentro da família e podem definir o tipo de dispersão (ICHASO, 1980; JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Por exemplo, algumas sementes da família, que se caracteriza por ter sementes lineares, cilíndricas ou alongadas, se dispersam por anemocoria (dispersão pelo vento), como nos gêneros *Alectra*, *Angelonia*, *Escobedia*, *Gerardia*, *Melasma*, *Physocalyx* (ICHASO, 1980).

De modo geral, assementes da família Orobanchaceae estão compostas por quatro estruturas características: os tegumentos, endosperma, perisperma e embrião (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Nos tegumentos, a testa é composta de duas camadas de células, uma camada externa de epiderme e o endotélio. As células da epiderme externa são alongadas, com frequência com paredes internas e laterais espessadas e com parede exterior fina, que pode colapsar com facilidade. O endotélio tem células pequenas e lisas, desprovidas de núcleo e conteúdo citoplasmático e contém mucilagem (JOEL *et al.*, 2012; JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013).

Internamente ao endotélio, encontra-se o perisperma que circunda o endosperma e o embrião, com células de parede fina, adjacentes ao embrião, e espessadas; próximas ao endotélio, coberta por uma cutícula composta por ceras em forma de cristais perpendicular à superfície da célula. O interior das células do perisperma possui conteúdo citoplasmático denso com corpos de óleo (JOEL *et al.*, 2012). O endosperma pode ser abundante em hemiparasitas facultativas, composto por uma fina parede de células finas, contendo abundantes corpos de óleo (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013).

O embrião, em espécies como *Striga* e *Alectra*, é composto por uma pequena radícula, um hipocótilo (com procâmbio alongado no centro) e dois cotilédones (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013).

2.2.2. Germinação das sementes e plântula

Em geral, a germinação *stricto sensu* começa com a captação de água pelas sementes (embebição) e termina com a emergência do eixo embrionário, sendo visível, normalmente a raiz (BEWLEY *et al.*, 2013). A germinação ocorre em duas etapas: na etapa I, a semente torna-se hidratada e, na etapa II, o conteúdo de água é constante e as atividades metabólicas aumentam com transcrição de novos genes, e ocorre a emergência da raiz através das estruturas circundantes no final desta etapa, marcando a conclusão da germinação (BEWLEY *et al.*, 2013).

A emergência da raiz em plântulas de *Rhamphicarpa fistulosa* (Orobanchaceae) começa aos quatro dias, formando uma raiz fina e transparente, com pelos radiculares na junção hipocótilo-radícula; três dias depois, os cotilédones rompem a testa e, nos dias seguintes, as plântulas começam formar as folhas (OUÉDRAOGO *et al.*, 1999). A presença de pelos radiculares na junção hipocótilo-radícula também foi reportada por NEUMANN; SALLÉ; WEBER (1998), como um colar de pelos unicelulares que rodeiam o eixo da junção hipocótilo-radícula. Durante a germinação das sementes, a região plumular da planta parasita *Cistanche* (Orobanchaceae), apresenta um elevado número de grãos de amido, que diminuem com a emergência e alongamento da raiz. A radícula está desprovida de grãos de amido, mas estes surgem e aumentam com a emergência e alongamento da raiz (QING-LIANG *et al.*, 2011).

A estrutura interna da raiz principal de plântulas de *Striga* e *Alectra* exibe uma coifa pouco desenvolvida, nãoobstante, depois do alongamento da raiz principal, ela apresenta uma coifa desenvolvida (OKONKWO; RAGHAVAN, 1982). Plântulas de *E. grandiflora* sem hospedeiro (SH) tiveram uma sobrevivência de 7,5%, diferente de plântulas com hospedeiro (CH) que tiveram sobrevivência de 95 %; nenhuma das plântulas apresentaram formação evidente de haustórios; e, em geral, o crescimento das plântulas mostrou-se lento, crescendo 1 mm e desenvolvendo duas folhas a cada quatro semanas (CARDONA; MURIEL, 2015).

2.2.3. O haustório

O haustório é a estrutura mais importante das plantas parasitas, sendo o único órgão da planta homólogo à raiz, que conecta o parasita ao hospedeiro, permitindo a conexão vascular entre eles para estabelecer, assim, a transferência de água e nutrientes do hospedeiro ao parasita (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013; KUIJT, 1977). Na estrutura interna, o haustório está constituído por duas partes: a primeira com uma série de estruturas que se encontram fora do hospedeiro compostas por células de parênquima e tecido condutivo; a segunda com um órgão invasivo, conhecido como endófito, que tem a função de penetrar o tecido do hospedeiro (HEIDE-JØRGENSEN, 2008; RÜMER *et al.*, 2007). Existem dois tipos de haustórios: o primário (apical) e o secundário (lateral).

O haustório primário desenvolve-se no ápice da raiz principal, sendo comum em plantas holoparasitas e em algumas plantas hemiparasitas, tais como *Striga* e *Alectra*; o haustório secundário desenvolve-se a partir das raízes laterais (HEIDE-JØRGENSEN, 2008; OKONKWO; RAGHAVAN, 1982; WESTWOOD *et al.*, 2010).

Uma característica comum dos haustórios em muitas plantas parasitas é o desenvolvimento de pelos radiculares na periferia do local da ligação, os quais funcionam como dispositivo à conexão parasita-hospedeiro (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Eles são desenvolvidos com frequência em plantas da família Orobanchaceae. Os pelos radiculares ajudam manter a conexão do haustório com a raiz do hospedeiro, abrangendo densamente a superfície da raiz, e aumentando a pressão sobre a raiz do hospedeiro (CUI *et al.*, 2016). Conforme BAIRD; RIOPEL, (1983), a primeira estrutura do haustório em entrar em contato com o hospedeiro são os pelos radiculares e sua estrutura indica que podem ter uma função diferenciada dos outros pelos radiculares que se encontram ao longo da raiz. Alguns pelos radiculares apresentam na superfície papilas com secreção de substâncias aderentes, que ajudam melhorar a estabilidade da conexão. Essas substâncias estão relacionadas à hemicelulose (BAIRD; RIOPEL, 1983). Em *Triphysaria*, os pelos radiculares secretam compostos pécticos semelhantes à mucilagem (HEIDE-JØRGENSEN; KUIJT, 1995).

Em algumas plantas parasitas a formação inicial dos haustórios depende da liberação de sinais químicos das raízes de plantas hospedeiras (ALBRECHT; YODER; PHILLIPS, 1999); distinguindo, assim, as próprias raízes das raízes de um potencial hospedeiro. As

moléculas associadas com a formação dos haustórios estão bastante distribuídas entre as plantas, portanto, poderia ser esperado que muitas plantas deveriam induzir a formação de haustórios nas plantas parasitas (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). O primeiro composto indutor de haustórios foi encontrado nas raízes de *Astragalus* (Fabaceae) induzindo a formação dos haustórios na planta parasita *Agalinis* (Orobanchaceae). Esse composto é um flavonóide conhecido como xenognosina (LYNN *et al.*, 1981). Outros compostos responsáveis que induzem a formação de haustórios são ácidos fenólicos e a quinona 2,6-dimethoxy-p-benzoquinone (ALBRECHT; YODER; PHILLIPS, 1999).

A raiz do parasita comunica-se com a base do haustório, interligando os elementos traqueais que vem da raiz do parasita com os elementos traqueais que vão em direção ao endófito do haustório. A base do haustório está implicada na regulação da continuidade fisiológica com a raiz do hospedeiro (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013).

Elementos traqueais são observados tanto na raiz quanto no haustório do parasita; eles apresentam diferenças na origem ontogenética. Enquanto os elementos traqueais da raiz são originados no procâmbio do ápice da raiz, os elementos traqueais do haustório são originados nas células do periciclo, que desenvolve um tecido provascular (NEUMANN; SALLÉ; WEBER, 1998). Uma vez estabelecido o contato do haustório com a raiz de hospedeiro, células do tecido provascular do haustório, formam e circundam os elementos traqueais do xilema, que desenvolve-se em direção ao tecido do hospedeiro, conectando-se com o endófito. Esses elementos traqueais podem variar em número, dependendo do tipo de haustório, da etapa do desenvolvimento do haustório e da espécie (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Haustórios mais velhos podem apresentar diversos elementos traqueais (VISSER; DÖRR; KOLLMANN, 1984).

Intercalado com o tecido provascular e os elementos traqueais do haustório, encontra-se o corpo hialino, o qual está associado com os elementos condutores, caracterizado por ter células pequenas, com estrutura densa e com depósito extracelular, o qual pode estar relacionado com polissacarídeos (VISSER; DÖRR; KOLLMANN, 1984). Provavelmente o corpo hialino está envolvido no metabolismo dos nutrientes do hospedeiro, no armazenamento transitório e na regulação do abastecimento para o desenvolvimento do parasita (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Em algumas plantas parasitas como *Rhamphicarpa fistulosa* (Hochst.) Benth. (Orobanchaceae), os

haustórios são desprovidos do corpo hialino (NEUMANN; SALLÉ; WEBER, 1998).

2.3. AÇAFRÃO DO CAMPO (*Escobedia grandiflora*)

2.3.1. Características gerais da planta

Escobedia grandiflora (Figura 1) é uma planta nativa do neotrópico, conhecida como açafão do campo, açafão do mato, açafão do cerrado, azafrán, azafrán de raiz (PENNELL, 1931; SILVA *et al.*, 2010; SOUZA; GIULIETTI, 2009). Distribui-se amplamente desde América central (México, Costa Rica, Panamá) até América do Sul (Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Brasil, Paraguai e Argentina) (SOUZA; GIULIETTI, 2009; “Tropicós - Home”, 2017).

No Brasil, as populações naturais da planta parasita podem ser encontradas nos estados da Bahia, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No estado de Santa Catarina elas ocorrem nos municípios de Bom Jardim da Serra, Caçador, Joaçaba, Chapecó, Curitibanos, Itaiópolis, Lages, Água Doce e Campo Erê (SOUZA; GIULIETTI, 2009; “speciesLink Network”, 2017). O açafão do campo desenvolve-se em diferentes tipos de relevo (inclinação) e em solos rochosos, sendo também encontrada em beiras de estradas, em áreas abertas, em banhados e em locais com alto teor de umidade no solo (BURGUER; BARRINGER, 2000).

Esta espécie é uma erva ereta ou semi-ereta (Figura 1); com uma altura variável, ramos eretos, glabros e cilíndricos. Suas folhas são simples, opostas, ásperas em ambas as faces, com tricomas concentrados nas nervuras. As raízes são de cor laranja ou amarela brilhante (Figura 1b), responsáveis pelo uso como corante alimentício. A inflorescência é uma flor solitária (Figura 1c), pedicelo semi-ereto, com bractéolas opostas, inseridas abaixo do cálice. A corola é de cor branca, com tricomas capitados; o fruto (Figura 1d-e) é uma cápsula elipsóide. As sementes (Figura 1e, f) têm embrião visível; células epidérmicas estreitas, não claviformes, lineares (CARDONA; MURIEL, 2015; ICHASO, 1980; SOUZA; GIULIETTI, 2009).

No estudo de CARDONA; MURIEL (2015), foi determinado que *E. grandiflora* é uma planta hemiparasita obrigatória. Da planta foram analisados alguns aspectos do processo germinativo das sementes

e o desenvolvimento de plantas desde rizoma durante 28 semanas, com tratamentos CH e SH. As sementes de *E. grandiflora* mostraram uma germinação que oscilou entre 66 % e 85,3%, em condições de temperatura de 25°C, sendo que a luz não influenciou o processo germinativo. Independente do tratamento, as plantas CH e SH exibiram um crescimento inicial lento, mas o rizoma apresentou reservas importantes de nutrientes acumulados, que permitiram a sobrevivência da planta até estabelecer-se com o hospedeiro, e obter um parasitismo bem sucedido. Depois de 28 semanas do desenvolvimento, as diferenças de crescimento entre tratamentos CH foram maiores comparadas com plantas SH. As plantas com hospedeiro apresentaram grande número de haustórios ligados aos hospedeiros e uma maior acumulação de matéria seca total. Em plantas SH, a acumulação de matéria seca foi menor e apresentou poucos haustórios.

Em relação aos hospedeiros, pouco se conhece sobre as preferências que tem *E. grandiflora*, que permitam uma ligação bem sucedida do haustório com as raízes do hospedeiro. Algumas plantas da família Poaceae, como *Pennisetum purpureum* Schumach., *Calamagrostis viridiflavecens* (Pior.) Steud., *Sporobolus jacquemontii* Kunth. E *Andropogon bicornis* L. são bons hospedeiros para *E. grandiflora*, mostrando diversos haustórios ligando-se nas raízes dos hospedeiros (CARDONA; MURIEL, 2015).

2.3.2. Importância de *E. grandiflora*

As raízes desta planta de pigmentação alaranjada foram amplamente utilizadas durante vários séculos atrás, em algumas regiões dos Andes Colombianos, provavelmente, a coloração dos alimentos com as raízes desta planta foi derivada da civilização *chibcha* na Colômbia (PENNELL, 1931). Esta é uma das poucas plantas da família Orobanchaceae que tem sido usada e valorizada pelas comunidades.

As raízes de *E. grandiflora* eram comercializadas nos mercado e consideradas de grande importância, especialmente na Colômbia, Bolívia e Peru, devido ao uso das raízes na culinária, como corante natural dos alimentos, na preparação de arroz e sopas (MURIEL *et al.*, 2015; PENNELL, 1931; ULLOA, 2006). Na medicina popular, elas foram amplamente utilizadas para o tratamento da hepatite (MURIEL *et al.*, 2015). Além do uso medicinal das raízes, as flores possuem substâncias antibacterianas (BUSSMANN; GLENN; SHARON, 2010). Essas raízes ainda são comercializadas em mercados locais

Colombianos, usadas principalmente pelas comunidades rurais (MURIEL *et al.*, 2015). No Brasil, somente há informações do uso das raízes no estado de Minas Gerais, por ter efeito anorexígeno (inibidor de apetite) (SILVA *et al.* 2010). A pigmentação laranja das raízes de *E. grandiflora* é devido ao um pigmento carotenóide conhecido como azafranina (KUHN, 1935)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a estrutura e a ultraestrutura da semente, da plântula e da planta jovem de *Escobedia grandiflora* durante o parasitismo com *Pennisetum purpureum*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever a estrutura e a ultraestrutura da semente e da plântula de *E. grandiflora*;
- b) Caracterizar estrutural e ultraestruturalmente as plântulas de *E. grandiflora* desde o desenvolvimento pós-seminal até o processo inicial do parasitismo com *P. purpureum*;
- c) Analisar as diferenças anatômicas entre as plantas de *E. grandiflora* com e sem o hospedeiro *P. purpureum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA DE FRUTOS E SEMENTES DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Escobedia grandiflora*

A coleta do material vegetal (frutos com sementes) foi realizada em três populações naturais de *E. grandiflora* do estado de Santa Catarina, cujas expedições foram baseadas nas informações encontradas na Flora Catarinense (ICHASO; BARROSO, 1970), no levantamento das espécies de Scrophulariaceae *sensu lato* nativas do Brasil (SOUZA; GIULIETTI, 2009), nas exsicatas dos herbários LUSC (Herbário de Lages da Universidade do Estado de Santa Catarina) e do SPF (Herbário da Universidade Federal de São Paulo), no site Redespèces link e nas informações dos escritórios municipais da EPAGRI.

Das populações encontradas, foram coletadas plantas com estruturas reprodutivas no final de 2015, as quais que foram depositadas no herbário FLOR (UFSC, Florianópolis, SC) sob os números 60996, 61001 e 60997.

Frutos desenvolvidos de *E. grandiflora* foram coletados no início de 2016 (Figura 2), de modo aleatório e armazenados individualmente por planta em sacolas de polietileno. Após coleta, os frutos foram secados à temperatura ambiente, depositados em sacolas hermeticamente fechadas e armazenadas em geladeira a 5°C, na coleção de sementes de *E. grandiflora* do laboratório LFDGV. Quantidades de 500 mg de sementes foram extraídas de cada um dos dez frutos selecionados aleatoriamente, para cada uma das populações acessadas. Logo após, as amostras de sementes de cada fruto foram misturadas para representar a população amostrada e armazenadas para serem usadas nos ensaios posteriores.

4.2. ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL DO HOSPEDEIRO *Pennisetum purpureum*

O hospedeiro selecionado para o ensaio foi o capim elefante (*Pennisetum purpureum*) (Figura 2c), devido se constituir em planta abundante, de fácil acesso, facilidade para ser propagada e apresenta características morfológicas estáveis, o que permite ser facilmente

identificada. Ademais, segundo CARDONA; MURIEL, (2015), a planta é uma boa hospedeira de *E. grandiflora*, porque suas raízes são parasitadas com sucesso por um grande número de haustórios do parasita. Estruturas asexuais da espécie hospedeira foram obtidas das plantas localizadas no Centro de Ciências Agrárias (CCA) (Lat: -27.3456, Long: -48.3018).

4.3. PREPARO DOS ENSAIOS

4.3.1. Semente e plântula de *E. grandiflora*

No primeiro ensaio, sementes de *E. grandiflora* foram semeadas em Gerbox com papel absorvente umedecido (Figura 2b), em condições de temperatura e fotoperíodo segundo de 25°C e de 12 horas luz, durante 18 dias até a emergência das plântulas, recomendações de CARDONA; MURIEL, (2015). Foram realizadas três coletas durante a germinação *sensu stricto*, com base nas descrições feitas por BEWLEY *et al.*, (2013): aos 6 dias da embebição; aos 10 dias; aos 11 dias, durante a emergência da raiz; e aos 18 dias, durante a pós-germinação. Para fins de comparação foram fixadas sementes maduras. O material coletado foi fotografado com microscópio estereoscópico (ME) Olympus SZH10 (Tóquio, Japão), equipado com câmera Olympus DP71. Para a análise das estruturas em microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), o material foi fixado em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e, posteriormente, desidratadas em série crescentede etanol (20, 40, 60, 70° GL), sendo então armazenadas em álcool ao 70°GL (RUZIN, 1999). Para a análise em microscopia confocal, as plântulas germinadas de *E. grandiflora* foram fixadas em solução de paraformaldeído de 2,5% em tampão 0,1 M, pH 7,2, lavadas na mesma solução tampão, e mantidas na geladeira (4°C) até o uso subsequente.

4.3.2. Etapa inicial do parasitismo

Para caracterizar o desenvolvimento pós-seminal de plantas de *E. grandiflora*, em presença do hospedeiro (CH), e comparar anatomicamente com aquelas sem a presença do hospedeiro (SH), foi implantado um segundo ensaio, em casa de vegetação com irrigação constante cada três horas, constituída por dois tratamentos.

No primeiro tratamento, sementes de *E. grandiflora* foram embebidas por cinco dias em Gerbox, em condições de temperatura de

25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz, segundo recomendações de CARDONA; MURIEL (2015). Elas foram semeadas com plantas do hospedeiro (CH) *P. purpureum*, plantados 30 dias antes do estabelecimento do parasita (Figura 2c), em bandejas de polipropileno com alvéolos de 338 cm³ (8×6,5×6,5 cm), contendo substrato composto por vermiculita e substrato comercial para hortaliças (Tropsustrato há-Hortaliças) (1:1).

No segundo tratamento, as sementes de *E. grandiflora* embebidas por cinco dias foram semeadas em bandejas sem hospedeiro (SH), nas mesmas condições do primeiro tratamento (Figura 2d). Para cada tratamento foram estabelecidas 40 repetições, totalizando 80 unidades amostrais.

Nos dois tratamentos, as plântulas (Figura 2d-f) foram coletadas com cinco repetições, a cada 7 dias durante 64 dias (15, 22, 29, 36, 43, 50, 58 e 64 dias), totalizando 8 coletas. O tempo estimado para a formação inicial dos haustórios é de 24 dias (NEUMANN; SALLÉ; WEBER, 1998). O material coletado foi disposto em frascos de 250 ml, com água, e submetido ao banho de ultrassom (UltraCleaner 1650, UNIQUE, Indaiatuba/SP, Brasil) durante 1 hora, para separar as partículas da rizosfera ligadas à rizoderme, sem danificar a estrutura radicular parasita-hospedeiro. Para a análise morfológica, as plantas foram fotografadas através de um microscópio estereoscópico Olympus SZH10 (Tóquio, Japão) equipado com câmera Olympus DP71. Posteriormente, para a análise das estruturas durante o parasitismo em MO e MEV, amostras do caule, de diferentes regiões da raiz do parasita, dos haustórios e da região parasita-hospedeiro foram separadas em frações e fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, em pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e, posteriormente, desidratadas em série crescente de etanol (20, 40, 60, 70° GL), sendo armazenadas em álcool ao 70 ° GL (RUZIN, 1999). Para a análise em microscopia confocal (MC), haustórios ligados nas raízes do hospedeiro foram fixados em solução de paraformaldeído de 2,5%, em tampão 0,1 M, pH 7,2, lavados na mesma solução tampão, e mantidos na geladeira (4 °C) até o uso subsequente.

4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E DE ULTRAESTRUTURA

Na caracterização das estruturas mais importantes da planta (Tabela 1), as amostras foram processadas para realizar as análises com diferentes tipos de microscopia.

Tabela 1. Estruturas internas e externas da planta parasita *E. grandiflora*, analisadas nas microscopias óptica (MO), eletrônica (MEV), óptica confocal (MC) e eletrônica de transmissão (MET).

Estrutura	Microscopia			
	MO	MEV	MC	MET
Estrutura interna e externa da semente, de sementes embebidas e da emergência da radícula	Φ	Φ		
Estrutura interna da radícula e do hipocótilo	Φ		Φ	
Estrutura interna dos ápices e da raiz primária e lateral	Φ			
Estrutura interna da região proximal da raiz	Φ			
Estrutura interna do haustório e da ligação com o hospedeiro (<i>P. purpureum</i>)	Φ		Φ	
Grãos de amido	Φ	Φ		Φ
Organelas celulares do córtex da raiz principal, como vacúolos e plastídios				Φ
Estrutura externa da radícula e do hipocótilo		Φ	Φ	
Estrutura externa dos ápices e da raiz primária e lateral		Φ		
Estrutura externa região proximal da raiz		Φ		
Estrutura externa do haustório e da ligação com o hospedeiro (<i>P. purpureum</i>).		Φ	Φ	

Estrutura externa dos cotilédones, os eófilos e as folhas		Φ		
Estrutura externa dos tricomas da folha		Φ		

4.4.1. Análise em Microscopia Óptica (MO)

O material preservado em álcool 70°Gl foi desidratado em séries crescentes de etanol 80, 90 e 96°Gl e infiltradas em hidroxietilmetacrilato (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha), conforme GERRITS; SMID, (1983). Secções longitudinais e transversais de 5µm foram efetuadas em micrótomato rotativo RM 2125 (Leica, Nussloch, Alemanha) e distendidas sobre lâminas de vidro, contendo água, em chapa aquecedora (52°C). Visando observar cada uma das estruturas, as lâminas foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964).

Para visualizar a presença de substâncias pécticas, no haustório, e grãos de amido, no caule e na raiz, foram usados os reagentes vermelho de rutênio e lugol, respectivamente, segundo os métodos descritos por (JOHANSEN, 1940). As imagens foram capturadas em microscópio (Olympus® BX-40) equipado com uma câmera (Olympus DP71) do Laboratório de Fisiologia de Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDG– - UFSC).

4.4.2. Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O material preservado em álcool 70°Gl foi desidratado em séries crescentes etanol 80, 90 e duas vezes 100°Gl. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no ponto crítico EM CPD030 (Leica, Heilderberg Alemanha), conforme a metodologia de (HORRIDGE; TAMM, 1969). Posteriormente, as amostras foram aderidas em suportes de alumínio, com ajuda da fita de dupla face e recobertas com 30nm de ouro paládio em metalizador SCD500 (Leica, Viena, Áustria). Imagens foram capturadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol XL30 (Tokio) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCM– -UFSC)

3.5.3. Análise em Microscopia Óptica Confocal (MC)

O material preservado na solução tampão fosfato foi disposto na mesma solução em lâminas com lamínulas e selados com esmalte transparente. De algumas amostras foram feitas secções transversais à mão livre com navalha. As lâminas foram observadas em microscópio confocal de varredura a Laser DMI600B (Leica TCS SP-5, Alemanha) no LCME- UFSC. A autofluorescência das plântulas e dos haustórios foi observada em dois comprimentos de onda de excitação: o primeiro com laser de 488nm (fluorescência em verde) e o segundo com laser UV (405) (fluorescência em azul), com dois espectros de emissão 412-501nm e 510-550 nm. Para o processamento das imagens no MC foi usado o programa LAS-AF Lite (Leica).

3.5.4 Análise em Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)

A raiz principal e os haustórios de *E. grandiflora*, foram cortados em pequenos fragmentos e fixados segundo PUESCHEL(1979), *overnight* a 4°C em solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e sacarose 0,2 M. O procedimento seguiu com 5 lavagens da solução tampão cacodilato de sódio 0,3 M, pH 7,2, sacarose 0,6 M e H₂O, reduzindo a concentração de sacarose em 25% por cada lavagem. Após, o material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio (2%), com cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2 (1:1), durante 4 horas em temperatura ambiente. As amostras, foram lavadas em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e desidratadas em serie crescente de acetona (30, 50, 70, 90, 100°Gl). Posteriormente, as amostras foram pré-infiltradas em série de acetona e resina Spurr (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3) e infiltradas em resina (SPURR, 1969). As amostras foram polimerizadas em moldes horizontais com a resina pura, em estufa a 70°C por 24 h. Secções semifinas, de 700nm de espessura, foram feitas com navalha de vidro, para selecionar as regiões para serem analisadas. Secções ultrafinas, de 60 nm de espessura, foram feitas com navalha de diamante no ultramicrotômo Power Tome XL e contrastadas com acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 1%, conforme (REYNOLDS, 1963). As observações e registro de imagens foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM1011(Tokio, Japão) no LCME-UFSC.

6. RESULTADOS

6.1. IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *E. grandiflora*

Nas expedições feitas foram identificadas quatro populações naturais de *E. grandiflora* (Figuras 3-4), localizadas nos campos dos municípios de Água Doce (SC) (lat:-26.615733, long:-51.49745; Altitude: 1234 m), Palmas (PR) (lat:-26.35065, long: -51.51832; Altitude: 1200 m), Campos Novos (SC) (lat:-27.3069, long:-51.195467; Altitude: 883) e duas populações em Florianópolis (SC), localizadas no parque municipal da Lagoinha do Leste (Lat:-27.46079, long: -48.20643; Altitude: 27 m), (-27.46890, -48.29265; Altitude: 190 m). Das quatro populações três foram encontradas no interior dos estados de SC e PR, em áreas abertas de banhados. As plantas localizadas em Florianópolis estavam em campos abertos e pedregosos. Das quatro populações só não foi feita coleta de sementes e frutos em Palmas, PR, por não apresentar estes no momento da coleta.

Até a execução do presente trabalho, havia nos registros consultados a ocorrência de *E. grandiflora* em localidades de 8 municípios do estado de SC (Água Doce, Bom Jardim da Serra, Caçador, Chapecó, Campo Erê, Curitiba, Itaiópolis, Joaçaba, Lages). Assim, com a realização do presente estudo, novos registros de ocorrência no estado de Santa Catarina de *E. grandiflora* foram adicionados (Figura 4c-d): um no município de Campos Novos (FLOR60996) e dois registros no município de Florianópolis (FLO61001, FLOR60997).

6.2. SEMENTE, GERMINAÇÃO E PLÂNTULA DE *E. grandiflora*

A partir das observações realizadas neste trabalho, foi possível descrever as principais características das sementes e do processo germinativo da espécie. *Escobedia grandiflora* apresentou sementes cilíndricas, alongadas, não claviformes, com um comprimento de 5mm, apresentando um estreitamento na base da semente no lugar em que estava localizado o hilo, que era do tipo circular. Nesta região ocorreu o rompimento da semente com o funículo (Figura 5a). As sementes estavam compostas pelos tegumentos, perisperma, endosperma e embrião.

O tegumento externo, exotesta (Figura 5b) que recobria a semente, apresentou-se translúcido e possibilitou a visibilidade do embrião (Figura 5c-d). A exotesta estava formada por células alongadas longitudinalmente, com espessamento nas paredes anticlinais. A parede celular periclinal externa da exotesta era fina e podia fragmentar-se ou colapsar facilmente, deixando exposta a ornamentação da semente do tipo reticulada (Figura 5b).

Internamente à exotesta encontrava-se o segundo tegumento, o endotélio que circundava outras estruturas da semente (perisperma, endosperma e embrião) (Figura 5e-f). Sob os tegumentos foi encontrado o perisperma (Figura 5e), com células maiores e conteúdo citoplasmático denso.

Entre o perisperma e o embrião, foram observados vestígios do endosperma (Figura 5e-f); em algumas regiões essa camada era imperceptível. O embrião que ocupava a parte central da semente (Figura 5c-d, g) estava composto por um eixo hipocótilo-radícula e dois cotilédones (Figura 5g), sendo o ápice da radícula ainda não bem desenvolvido. Na base do embrião foi observado o suspensor bem desenvolvido (Figura 5c). No centro do eixo hipocótilo-radícula já era distinto o procâmbio, circundado por meristema fundamental (Figura 5g), quando ainda denotavam-se vestígios do suspensor (Figura 5h).

Com a entrada de água na semente iniciou-se o processo de germinação. Após seis dias da embebição da semente, o embrião mostrou-se intumescido (Figura 5d) com procâmbio indicando atividade por estar bem desenvolvido (Figura 5g).

Aos 10 dias da fase de embebição, o eixo hipocótilo-radícula tornou-se mais longo; a radícula rompeu o endotélio, aproximando-se da exotesta, e os cotilédones encontravam-se mais desenvolvidos, com o procâmbio distribuindo-se ao longo do eixo hipocótilo-radícula. Entre os cotilédones, foram observadas células do ápice caulinar, possibilitando distinguir a protoderme delimitando o promeristema (Figura 5j).

A protrusão da raiz nas sementes de *E. grandiflora* começa aos 11 dias do início da embebição (Figura 6a-c), finalizando assim a germinação e dando início ao crescimento da plântula (pós-germinação).

Durante a protrusão, a raiz rompeu a exotesta, apresentando uma dilatação periférica na região proximal da raiz adjacente ao colo, com pelos radiculares em crescimento, que começaram também a atravessar a exotesta (Figura 6a-c). Em algumas sementes, a primeira estrutura a sair da exotesta foi o hipocótilo e a última foi a radícula (Figura 6d). Após 4 dias da germinação, os cotilédones bem

desenvolvidos começaram sair do tegumento (Figura 6e) e a região proximal da raiz da plântula continuou aumentando de diâmetro, sendo caracterizada principalmente por ter pelos radiculares em crescimento, contornando o eixo da junção radícula-hipocótilo (Figura 6d-f).

Na raiz principal observou-se um ápice com coifa pouco desenvolvida e com elementos vasculares maduros, próximos da região do promeristema, que também apresentou pelos radiculares ao longo da raiz (Figura 6e-detalle). A ultraestrutura revelou a presença de tricomas glandulares capitados na face adaxial dos cotilédones (Figura 6g). No interior das células dos cotilédones e do ápice da raiz, foram visualizadas células com conteúdo citoplasmático denso (Figura 6d).

6.3. PLÂNTULA E INICIO DO PARASITISMO DE *E. grandiflora*

Plântulas de *E. grandiflora*, aos 15 dias da emergência da raiz (Figuras 2e; 7a), apresentaram cotilédones bem desenvolvidos, sem formar ainda eofilos. Rapidamente, as plântulas deram início a formação de raízes laterais (Figura 7a). Também foi constatada a pigmentação de cor laranja, na região distal do hipocótilo e nas estruturas da raiz, inclusive nos ápices (Figura 7a).

Na estrutura da planta permaneceu a dilatação periférica na região proximal da raiz, que apresentou pelos radiculares alongados (Figura 7a, b). Na estrutura interna, as plântulas apresentaram o hipocótilo com cilindro central, córtex e epiderme (Figura 7c). O cilindro central do hipocótilo estava composto por periciclo, formado por um anel de células, de menor tamanho que as células da endoderme, e elementos vasculares dispostos de forma similar à raiz, ou seja, com xilema exarco (diarco) e alterno com o floema.

Não foi registrada a presença de medula. O córtex estava composto por várias camadas de células de parênquima e um anel de células da endoderme. A epiderme estava formada por uma camada de células. Na região proximal da raiz foi observado alongamento das células do córtex, principalmente de parênquima e algumas da endoderme; este alongamento foi visualizado unicamente para um dos lados da estrutura, quando vista em secção transversal (Figura 7d). O cilindro vascular da região proximal mostrou estrutura do tipo diarca, igual ao descrito para o hipocótilo (Figura 7d). Na raiz principal foi observado um primórdio de raiz lateral, constituído por células com núcleo visível e conteúdo citoplasmático denso, correspondendo às

células do promeristema e iniciais da coifa (Figura 7e). O ápice da raiz principal apresentou uma coifa bem desenvolvida, com elementos traqueais maduros próximos do promeristema (Figura 7a-detalle), com poucas células procambiais entre estes.

Após 22 dias da emergência da raiz, não foi observado crescimento da parte aérea da plântula comparativamente à avaliação anterior, continuando com os cotilédones (Figura 8a), sem formar ainda os eofilos. No sistema radicular foi notório o aumento do crescimento e a ramificação das raízes. Outro aspecto de destaque foi a pigmentação laranja nas raízes de *E. grandiflora* (Figura 8a). Na estrutura interna, o hipocótilo (Figura 8b) e a raiz (Figura 8c) apresentaram grãos de amido em algumas células de parênquima do córtex. O cilindro vascular do hipocótilo (Figura 8b) continuou com estrutura similar à raiz (Figura 8c), apresentando um eixo de metaxilema interno e protoxilema externo do tipo diarco, alternos ao floema. O colar de pelos radiculares favoreceu distinguir a transição entre hipocótilo e raiz primária (Figura 8d). Na raiz principal (Figura 8c), o córtex apresentou células de parênquima de diâmetro crescente com poucas camadas de células. Foi observada também, a presença de grãos de amido dentro das células do córtex, de maior tamanho e em maior quantidade em relação ao hipocótilo. Neste estágio, foi observada a formação de haustórios nas raízes primárias e laterais de *E. grandiflora*, pois na estrutura externa da raiz foi constatada uma dilatação na superfície (Figura 8e). A face superior do haustório que fazia conexão com a raiz do hospedeiro, apresentou uma abertura pela qual as células intrusivas entravam no tecido do hospedeiro *P. purpurem* (Figura 8e-detalle).

Aos 22 dias, alguns dos haustórios formados fixaram-se na raiz de *P. purpureum* e o endófito penetrou no cilindro central da raiz do hospedeiro, provocando uma fragmentação do tecido, e invadindo o xilema com sucesso (Figura 8f, g). Assim, considerou-se, este momento do desenvolvimento, o início do parasitismo.

Após 43 dias, as plântulas de *E. grandiflora* desenvolveram as folhas definitivas (metafilos), passando ao estágio de planta (Figura 9a). Os cotilédones, os eofilos e os primórdios das folhas definitivas apresentaram tricomas no indumento (Figura 9a, b) em ambas as faces, adaxial e abaxial. Foram registra dos dois tipos de tricomas, captados e não captados (Figura 9c, d). O tricoma captado caracterizou-se por ter um ápice sustentado por um pedúnculo (Figura 9c-detalle), e aderido à epiderme por células basais, os quais já eram visíveis nos cotilédones no

final da germinação das sementes; em algumas regiões foi observado somente as células basais, indicando a perda do tricoma.

O tricoma não captado mostrou um ápice pontiagudo (Figura 9c, d), que não foi visível nos cotilédones, ao final da germinação, mas começaram a aparecer aos 15 dias da protusão da radícula.

Após 64 dias do desenvolvimento, as plantas de *E. grandiflora* ainda mantinham os cotilédones (Figura.10a), mas já apresentavam até seis folhas (Figura 2f). Foi observado amplo crescimento do sistema radicular, cujas raízes eram totalmente pigmentadas de cor laranja, sendo a coloração mais acentuada nas raízes mais velhas. *Escobedia grandiflora* exibiu grande número de haustórios laterais de diferentes tamanhos ligados às raízes do hospedeiro *P. Purpureum*, alguns localizados perto da região do colo (Figura 10a, b). Na estrutura interna, o caule estava constituído por epiderme, córtex e cilindro central (Figura 10 c). O tecido de revestimento do caule (Figura 10c) e da raiz principal e lateral (Figura 11d, e) mantiveram-se representados pela epiderme, sem registro de periderme até os 64 dias. No cilindro central, destacou-se a presença do câmbio vascular, tanto no caule (Figura 10 c), quanto na raiz (Figura 10 d). Foram observados indícios do desenvolvimento das células do câmbio vascular que dariam origem aos elementos de vaso do xilema secundário. A análise histológica revelou que os elementos do xilema e do floema secundários ainda não estavam desenvolvidos.

No caule e na raiz principal e lateral de *E. grandiflora*, foi constatada a presença de muitos grãos de amido no parênquima cortical, os quais eram menores no caule (Figura 10f) do que na raiz principal (Figuras. 10g; 11a). Também foi constatada a pigmentação laranja amarelada no interior dos grãos de amido (Figura 10g), o que poderia estar relacionado com áreas eletrodensas observadas nos amiloplastos, em microscopia eletrônica de transmissão (Figura 11b-c). Alguns desses corpos apresentaram-se superpostos tornando-se mais escuros.

O haustório, estrutura que possibilita o parasitismo, foi observado pela primeira vez aos 22 dias após a germinação das sementes. As plantas desenvolveram somente haustórios laterais, que formavam-se em qualquer região ao longo da raiz. O haustório maduro de *E. grandiflora*, visto externamente, mostrou estar composto por epiderme com pelos radiculares tubiformes saindo da epiderme, que se encontravam disseminados principalmente na dilatação do haustório,

aderindo-se na raiz de *P. purpureum* e ajudando na ligação inicial entre o parasita e o hospedeiro (Figura 12a).

Secções transversais do haustório (Figura 12b-c, f) revelaram que, internamente, ele é composto por complexa estrutura histológica, apresentando uma região na base com tecido provascular, elementos traqueais, corpo hialino e endófito. A base do haustório é a região que conecta o haustório com a raiz do parasita, formado principalmente pelo cilindro central e algumas camadas de células do córtex e da epiderme (Figura 12c).

As células de parênquima do córtex apresentaram grãos de amido (Figura 12 c), que exibiram coloração alaranjada em seu interior, semelhantes aos encontrados na raiz.

O cilindro central estava composto pelo xilema alterno ao floema, com formação inicial de câmbio vascular, e pelo periciclo, que mostrou evidências de originar tecido provascular em direção ao hospedeiro (Figura 12b, c). O tecido provascular (Figura 12c), perpendicular ao cilindro central, apresentou células vacuolizadas com núcleo visível, e abrangendo os elementos traqueais direcionados ao endófito do parasita. Os elementos traqueais (Figura 12b-c, e) conectavam-se desde a base do haustório até o endófito do parasita e mostraram autofluorescência de cor verde, indicando presença de lignina (Figura 12e). O corpo hialino (Figuras 12b-d, f;13a), localizado na região do córtex, estava formado por células de parênquima, com conteúdo denso.

A análise das imagens em microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de vacúolos, grãos de amido e núcleo visível (Figura 13c-d). Estas células parenquimáticas mostraram-se isodiamétricas e intercaladas por células do tecido provascular que contornava os elementos traqueais (Figura 13a). Nas regiões intercelulares do corpo hialino e do córtex foi observada a presença de compostos pécticos de cor rosa (Figuras 12d; 13a). Também foi observada acumulação de compostos pécticos de cor rosa escuro nos elementos traqueais e no ápice do haustório, região essa que faz conexão com a raiz de *P. purpureum*. Esses compostos pécticos foram pouco visíveis na raiz do hospedeiro (Figura 13a). As células invasivas, que entram no tecido do hospedeiro se conhecem como endófito do parasita (Figura 12f).

A formação dos haustórios e o subsequente parasitismo de *E. grandiflora*, iniciou-se como crescimento e aumento no tamanho das células corticais, que apresentaram conteúdo denso, resultando numa

dilatação da raiz (Figura.14a). Em seguida, ocorreu o início da formação de pelos radiculares na periferia do haustório, crescendo em sentido acrópeto (Figura 14b-c). O processo de invasão no tecido do hospedeiro começou com a aproximação do haustório na raiz de *P. purpureum*, em que os pelos radiculares começaram se aderir à raiz do hospedeiro (Figura 14d), até abranger o tecido e fazer contato entre o ápice do haustório e a raiz do hospedeiro (Figura 14e).

Simultaneamente houve o início da formação dos elementos traqueais do haustório, que estavam crescendo em direção à raiz do hospedeiro (Figura 14d-e). Depois que as epidermes das duas espécies entraram em contato (Figura 14f), a raiz de *P. purpureum* começou se aprofundar no tecido do haustório (Figura 14g). Isto facilitou a entrada do endófito do parasita, que apresentou alongamento das células até atingir o xilema do hospedeiro, dando início à absorção de nutrientes e ao parasitismo propriamente dito (Figura 14h-i).

Durante o processo de parasitismo, em haustórios ligados à raiz do hospedeiro, foram observadas diferenças anatômicas dos haustórios formados aos 22 dias e 64 dias após a germinação. O haustório formado aos 22 dias (Figura 14h) apresentou as estruturas típicas do haustório, mostrou ainda escassos elementos traqueais em direção ao hospedeiro e presença de tecido provascular, embora estivesse desprovido do corpo hialino.

Este haustório foi funcional, em razão do endófito ter alcançado o tecido do hospedeiro, não obstante esse haustório não se considerou maduro, devido à ausência de corpo hialino. Os haustórios formados aos 64 dias apresentaram todas as estruturas típicas, incluindo o corpo hialino totalmente desenvolvido, atravessado por várias sequências de elementos traqueais (Figura 14i).

6.4 PLÂNTULAS E PLANTAS COM E SEM HOSPEDEIRO

Aos 15 dias, plântulas de *E. grandiflora* sem hospedeiro (SH) (Figuras 2d; 15a), apresentaram desenvolvimento semelhante às plântulas com hospedeiro (CH) (Figura 7). Na estrutura interna, o hipocótilo exibiu uma estrutura vascular semelhante à raiz. Na região proximal da raiz, também ocorreu o alongamento das células do córtex e, nesta região, o xilema mostrou-se alterno ao floema, com disposição do tipo diarca, e havia formação de raiz lateral (Figura 15b). A única diferença observada foi a escassa pigmentação das raízes das plântulas SH (Figura 5a).

Aos 22 dias, plântulas de *E. grandiflora* SH não mostraram diferenças em relação ao desenvolvimento ocorrido até os 15 dias (Figura 15c). Plântulas CH apresentaram diferenças em relação ao desenvolvimento entre 15 e 22 dias, consistindo na presença de grãos de amido alocados no córtex da raiz e em menor quantidade no caule. Os elementos traqueais do xilema também apresentaram maior tamanho e com parede espessada (Figura 8a-c).

Em plântulas SH, aos 22 dias, as raízes exibiram em sua estrutura interna crescimento das células corticais com conteúdo denso, indicando a fase inicial da formação do haustório (Figura 15d). Plântulas SH formaram haustórios aos 36 e 43 dias após da germinação, comprovando que *E. grandiflora* não precisou do hospedeiro para formar haustórios.

Aos 64 dias, plantas de *E. grandiflora* SH e CH exibiram desenvolvimento semelhante ao da parte aérea, embora mostrassem diferenças notórias na estrutura interna da raiz.

Plantas SH apresentaram raízes pigmentadas, longas e ramificadas, com pouca formação de haustórios. Na estrutura interna, foi observada a formação abundante de grãos de amido no córtex da raiz principal e no interior destes grãos de amido, as imagens também revelaram a existência de pigmentação laranja, idêntica à encontrada em plantas CH (Figura 15f). Não obstante, as diferenças entre as duas foram evidentes nas raízes laterais, que estavam desprovidas de grãos de amido, ou com poucos destes, alocados nas células de parênquima do córtex das plantas SH (Figura 15g). De forma distinta, as plântulas CH exibiram abundante quantidade de grãos de amido no córtex da raiz lateral (Figura 10g). Em geral, tanto na raiz principal quanto na raiz lateral, o cilindro central de plantas SH apresentou menor desenvolvimento que em plantas CH, com escassos elementos traqueais do xilema, e sem formar ainda câmbio vascular (Figura 15f). Plantas CH apresentaram um cilindro central maior, com elementos traqueais de maior tamanho e com células do câmbio vascular (Figura 10d). Haustórios bem desenvolvidos foram registrados nas plantas SH (Figura 15h, i).

7. DISCUSSÃO

7.1. IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *E. grandiflora*

Diferenças morfológicas e de hábitat foram evidentes entre populações encontradas no interior e litoral do estado de Santa Catarina. As plantas encontradas no interior do estado são de tamanho maior, ocorrendo principalmente em banhados e localizadas acima de 800 metros de altitude. Plantas encontradas no litoral apresentam menor tamanho e ocorreram em campos abertos e pedregosos, numa altitude de 27-190. Segundo as poucas informações existentes da distribuição de *E. grandiflora*, as plantas se desenvolvem unicamente no interior do país. Desta maneira, as plantas localizadas no parque municipal da Lagoinha do Leste, Florianópolis, constituem o primeiro registro de ocorrência de *E. grandiflora* no litoral Brasileiro, pois não foram mencionados registros nos trabalhos de SOUZA; GIULIETTI, 2009; “speciesLink Network”, 2017; ICHASO; BARROSO, 1980), que mencionam os locais de ocorrência da espécie no Brasil.

Das plantas de *E. grandiflora* coletadas nesta pesquisa foram observadas algumas diferenças morfológicas, em relação as plantas localizadas no Departamento de Antioquia-Colômbia, baseado nos conhecimentos do autor das populações que ocorrem naturalmente nesse país. As principais diferenças foram a distância dos entrenós e a forma do limbo da folha. As plantas de SC apresentaram entrenós próximos, com folhas ovaladas, diferente das plantas ocorrentes na Colômbia, que apresentaram entrenós distantes, com folhas oval-lanceoladas ou lanceoladas, mencionado por SOUZA; GIULIETTI (2009), como raras para as plantas de *E. grandiflora* que ocorrem naturalmente no Brasil, que são ovaladas.

7.2. SEMENTE, GERMINAÇÃO E PLÂNTULA DE *E. grandiflora*

A partir das descrições foi possível conhecer as estruturas da semente e entender como elas influenciam na germinação e na emergência da plântula. O termo exotesta foi usado por CORNER (1976) para descrever o tegumento exterior das sementes da família Orobanchaceae; embora, essa estrutura é também chamada de testa (JOEL *et al.*2012). A exotesta de *E. grandiflora* está formada por

células alongadas longitudinalmente e funciona como uma estrutura de proteção (CORNER, 1976). Características visualizadas na superfície da exotesta e no endotélio das sementes de *E. grandiflora* foram similares às observadas pelo JOEL *et al.* (2012), para as sementes da planta parasita *Phelipanche aegyptiaca* (Orobanchaceae).

A epiderme externa mostrou uma parede celular que pode quebrar-se com facilidade; o endotélio consistiu em um tecido que revestiu ao perisperma e no início da embebição, teve a capacidade de absorver água para o interior dos tecidos revestidos. O perisperma encontrado nas sementes de *E. grandiflora*, foi também observado em outras sementes da família Orobanchaceae, como nas sementes do gênero *Striga* (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). De modo geral, referem os autores, o perisperma é particularmente visível nas sementes de plantas obrigatórias, as células do perisperma exibem numerosos corpos de óleo e de proteínas com conteúdo citoplasmático denso, que indica alta atividade metabólica. O perisperma, acrescentam os autores, fornece nutrientes ao desenvolvimento do embrião, e as células do perisperma permanecem ativas durante o processo de germinação, o restante perde-se durante esse processo.

Conforme JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN (2013), a presença do endosperma e do perisperma, varia com o gênero de Orobanchaceae. Em algumas hemiparasitas facultativas o endosperma é abundante, como em *Phelipanche*; que diferem de algumas plantas parasitas obrigatórias que, por sua vez, têm o endosperma pouco desenvolvido, ou com vestígios dele. Foi visualizado nas sementes de *E. grandiflora*, que são não endospermicas.

Foram também visualizadas reservas na semente de *E. grandiflora* concentradas nos cotilédones e em parte do hipocótilo, em concordância com o observado em plantas de *Cistanche* (Orobanchaceae) por QING-LIANG *et al.* (2011). Estas reservas podem diminuir em número com a emergência da radícula e o posterior alongamento da raiz, evidenciando a importância da existência do perisperma e dos cotilédones no fornecimento de nutrientes durante a germinação das sementes e no crescimento inicial da raiz (BEWLEY *et al.*, 2013; JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013; QING-LIANG *et al.*, 2011).

Os nutrientes armazenados nas sementes de algumas plantas são limitados e devem suportar o crescimento inicial da plântula (BEWLEY *et al.*, 2013), porém, para sobreviver depois da germinação, as plântulas precisam desenvolver a raiz rapidamente, para encontrar as raízes de um

hospedeiro apropriado e começar o parasitismo (HEIDE-JØRGENSEN, 2008).

No presente estudo foi verificado que sementes de *E. grandiflora* não foram dependentes do hospedeiro para a germinação. Resultados semelhantes foram obtidos para *E. grandiflora* (CARDONA, E.; MURIEL, 2015) e em *Rhamphicarpa fistulosa* (Orobanchaceae) (OUÉDRAOGO *et al.*, 1999). O resultado para *E. grandiflora* difere de outras parasitas obrigatórias da mesma família, como *Alectra*, *Striga*, *Orobanche*, *Cistanche* e *Phelipanche* que precisam de estimulantes da germinação, assim, sem a presença das raízes do hospedeiro não ocorre a germinação (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Este comportamento pode ser positivo para a sobrevivência das plântulas, devido ao fato de que as sementes só vão começar a germinação na presença do hospedeiro, aumentando a probabilidade da raiz do parasita de entrar em contato com a raiz do hospedeiro, devido ao fato de que as reservas nutricionais na semente podem ser limitadas (HEIDE-JØRGENSEN, 2008). Tal comportamento mostrou-se diferente nas sementes de *E. grandiflora*, tornando-se assim mais vulneráveis, porque não há garantia da presença de raízes do hospedeiro no momento da emergência da raiz.

O estágio de plântula é uma etapa crítica dentro do ciclo de vida das plantas parasitas, assim como a ligação inicial ao hospedeiro que começa nessa etapa; conseqüentemente, precisam absorver nutrientes para sobreviver, tornando-se mais crítico em sementes pequenas com menor quantidade de reservas de substâncias nutritivas (PRESS, 1995), como nas observações feitas em *E. grandiflora*.

A região com pelos radiculares observadas em plântulas de *E. grandiflora* também foi encontrada nas plântulas de *Rhamphicarpa fistulosa* (Orobanchaceae) (NEUMANN; SALLÉ; WEBER, 1998; OUÉDRAOGO *et al.*, 1999). Os pelos radiculares são extensões tubulares da epiderme que têm a função de captar água e íons móveis (PETERSON; FARQUHAR, 1996). BEWLEY *et al.* (2013) mencionam a importância destes pelos radiculares na estabilização da plântula no substrato. A presença destes pelos na região proximal e próximo ao ápice nas raízes de *E. grandiflora* parecem cumprir a função de absorver água e nutrientes, numa etapa crítica para a sobrevivência da plântula, que ainda não fez conexão com a raiz do hospedeiro, embora CARDONA; MURIEL (2015) enfatizem que a espécie depende dos hospedeiros para sobreviver.

Depois da emergência foi observado na raiz principal de *E. grandiflora* uma coifa pouco desenvolvida, características também referidas para as raízes de *Striga* e *Alectra*, nas primeiras etapas do desenvolvimento (OKONKWO; RAGHAVAN, 1982). No presente estudo, a raiz principal da plântula apresentou elementos vasculares maduros próximos da região do promeristema. Esta condição está em conformidade com a descrição de (ESAU, 1959), pois elementos vasculares desenvolvidos precocemente são característicos de raízes de crescimento lento. Em plântulas de *Alectra vogelii* e *Striga gesnerioides*, os elementos vasculares maduros da raiz principal estavam longe da região do promeristema (OKONKWO; RAGHAVAN, 1982), porém, cabe ressaltar que estas plantas geralmente apresentam crescimentorápido (DÖRR, 1997).

7.3. PLÂNTULA E INICIO DO PARASITISMO DE *E. grandiflora*

Em geral o desenvolvimento das plântulas de *E. grandiflora* foi lento quando comparado com plântulas de outros gêneros da família Orobanchaceae, tal como em *Rhamphicarpa* a qual formou estruturas reprodutivas aos 136 dias depois da germinação, ou em plântulas de *Striga* que com 14 dias apresentavam um crescimento da parte aérea de aproximadamente 6 cm (DÖRR, 1997; OUÉDRAOGO *et al.*, 1999). Esse desenvolvimento em *E. grandiflora* não foi atingido aos 64 dias da germinação e nenhuma das plantas formou estruturas reprodutivas no período analisado.

As diferenças internas e externas do sistema radicular, nas plantas de *E. grandiflora* aos 15, 22 e 64 dias após da germinação, demonstram que as plântulas precisam desenvolver rapidamente o sistema radicular, concentrando nas células do córtex da raiz e do haustório, substâncias de reserva em forma de grãos de amido.

Os grãos de amido foram mais visíveis a partir dos 22 dias após a germinação, podendo ser necessários para promover o crescimento do sistema radicular, favorecendo a aproximação com as raízes de *P. purpureume*, subsequente, o contato. Ademais no hipocótilo essas substâncias de reserva foram escassas, sendo observadas em poucas células do córtex.

Passados 64 dias, as diferenças foram mais notórias, com grãos de amido menores no caule, maiores e abundantes na raiz, evidenciando a importância que tem a acumulação de grãos de amido para as raízes

nas primeiras etapas do desenvolvimento de *E. grandiflora*. Estas características foram acompanhadas por um aumento no crescimento do sistema radicular, resultando em plantas com pouco crescimento da parte aérea e com raízes longas; o que foi também relatado por OKONKWO; RAGHAVAN (1982) para *Alectra vogelii* e *Striga gesneroides*. Porém, é provável que para a sobrevivência, *E. grandiflora* direciona todos os recursos necessários para o crescimento das raízes e para a formação dos haustórios e esta estratégia pode promover um rápido contato com a raiz do hospedeiro, como também referido por HEIDE-JØRGENSEN (2008) e OKONKWO; RAGHAVAN (1982). Um aspecto importante do armazenamento dessas substâncias de reserva nos haustórios e na raiz é que ela possibilita a futura floração e produção de sementes, mesmo se nas etapas finais do crescimento o hospedeiro morrer (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013), tornando-se assim, uma estratégia de sobrevivência da espécie.

No interior dos grãos de amido das células corticais da raiz e dos haustórios, foi visualizada uma pigmentação alaranjada, similar à observada no exterior das raízes, e possivelmente relacionada com ocarotenóide azafranina que de acordo com (KUHN, 1935), é abundante nas raízes. Em raízes de plantas aos 64 dias após a germinação, foram observadas no interior dos grãos de amido áreas electrodensas, que conforme EVERT (2006) e THOMSON; WHATLEY (1980), são pigmentos carotenóides organizados em forma de cristais, comumente chamados corpos de pigmentos. Este fato indica que a formação de pigmentos carotenóides de *E. grandiflora* poderia ocorrer dentro dos amiloplastos. Em geral, os carotenóides são acumulados em cromoplastos, que são plastídios sem clorofila e que proporcionam a cor vermelha, amarela e laranja de muitas flores, folhas velhas, frutas e algumas raízes (THOMSON; WHATLEY, 1980). Esses cromoplastos podem ser formados a partir de outros plastídios, como proplastídios, amiloplastos ou cloroplastos maduros (THOMSON; WHATLEY, 1980; WHATLEY, 1978). Esses plastídios também podem passar de amiloplastos para cromoplastos, embora o plastídio também pode ter as duas funções de conter amido e carotenóides, desenvolvendo-se nas etapas posteriores como amilocromoplasto (HORNER *et al.*, 2007).

Assim, as áreas electrodensas podem explicar porque nos grãos de amido são visíveis pigmentos laranja, e porque uma leve pigmentação externa das raízes poderia estar relacionada aos poucos grãos de amido formados no interior da raiz de *E. grandiflora*. O mesmo resultado acima descrito, ou seja, pouca pigmentação nas raízes de *E.*

grandiflora, foi observado anteriormente por CARDONA; MURIEL (2015). Apesar de observar pigmentação no exterior das raízes de plantas aos 22 dias, no interior dos grãos de amido esta pigmentação não foi visível. Isto poderia ser decorrente da metodologia utilizada, porque esses pigmentos, ainda em pequenas quantidades, podem ter sido lavados do tecido no processo de preparação (fixação e desidratação) das amostras para serem observadas nas diferentes microscopias.

As funções do carotenóide nas raízes da planta parasita *E. grandiflora* são desconhecidas. Não obstante, o papel dos carotenóides em algumas estruturas da planta expostas ao sol, como folhas, frutos e flores, é proteger os tecidos do estresse provocados pela luz e o calor. Em folhas, os carotenóides reduzem a necrose e também a peroxidação dos lipídios e esta proteção poderia ser atribuída pela prevenção do dano das membranas à oxidação (DALL'OSTO *et al.*, 2007; DAIVISON; HUNTER; HORTON, 2002; HAVAUX, 1998). Em geral, os carotenóides têm papel importante como antioxidante preventivo (HAVAUX, 1998; JALEEL *et al.* 2009).

Alguns tecidos das plantas, que não se encontram expostos ao sol, apresentam carotenóides de forma abundante, como é o caso das raízes de *E. grandiflora*. Nas raízes, os carotenóides poderiam estar relacionados ao aumento da tolerância da planta ao estresse hídrico (JALEEL *et al.*, 2009). Isto poderia explicar porque *E. grandiflora* tem um ampla capacidade para se adaptar em diferentes locais, nos banhados, comum para as populações encontradas em Água Doce e Campos Novos que ocorrem no interior do estado de Santa Catarina (SOUZA; GIULIETTI, 2009).

Em relação à parte aérea, com o desenvolvimento dos primórdios de folhas definitivas, aos 43 dias da germinação, foi finalizado o estágio de plântula, dando início ao crescimento da planta. O termo plântula é entendido como a fase que abrange a germinação consumada da semente até a formação das primeiras folhas (SOUZA, 2003). Em cada uma das estruturas da parte aérea foram observados dois tipos de tricomas, captados e não captados. Conforme SOUZA; GIULIETTI (2009), em plantas mais velhas de *E. grandiflora* esses tricomas concentram-se nas nervuras das folhas e são do tipo hispido-escabras. Os tricomas captados, que foram visíveis no final da germinação das sementes, apresentaram características morfológicas similares aos tricomas da planta parasita *Orobancha ramosa* (Orobanchaceae). Esses tricomas apresentaram tanto nas glândulas quanto na secreção, compostos químicos do grupo dos terpenos e dos

flavonóides, sendo que as secreções são acumuladas no espaço subcuticular da parte superior do ápice da glândula (SACCHETTI *et al.*, 2003). Tais características são diferentes dos tricomas não capitados, já que estes não apresentaram glândula e somente foram visíveis após 15 dias da germinação. Na classificação de tricomas feita por HALLAHAN (2000), os tricomas não captados de *E. grandiflora* são unicelulares e não apresentam ramificações. No presente estudo, os tricomas foram observados apenas em vistas frontais da superfície foliar, em microscopia eletrônica de varredura, não sendo possível confirmar se eram uni ou pluricelulares, porém não apresentavam ramificações.

A formação dos haustórios de *E. grandiflora* foi evidente desde os 22 dias da germinação, apresentando amplo número de haustórios laterais na raiz principal, na região proximal e nas raízes laterais. Resultados similares a estes também foram observados em plantas da mesma espécie a partir de rizomas (CARDONA; MURIEL, 2015). As plantas parasitas da família Orobanchaceae formam haustórios laterais unicamente quando a plântula estiver bem desenvolvida, com a emergência da raiz e dos cotilédones (WEBER, 1987).

No caso de *E. grandiflora*, foram visíveis cotilédones, hipocótilo, raiz principal, raízes laterais e haustórios entre os 15 e 22 dias após a germinação. De modo geral, o número de haustórios laterais que a planta pode formar, depende das qualidades do solo, da proximidade e da quantidade de raízes do hospedeiro presente na rizosfera (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013; KUIJT, 1977; SALONEN; PUUSTINEN, 1996). Não foram observados haustórios terminais nas raízes de *E. grandiflora*, que é uma característica das plantas holoparasitas e de algumas hemiparasitas obrigatórias, como *Orobanche* e *Striga*. Esse tipo de haustório é formado no ápice da raiz principal, depois da emergência da raiz, na etapa final da germinação (WESTWOOD *et al.*, 2010).

O início da formação dos haustórios de *E. grandiflora* ocorreu com uma dilatação no córtex da raiz. Esta dilatação foi descrita, por JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN (2013), como um alongamento no interior das células corticais, que se expande depois para as outras camadas das células, com conteúdo citoplasmático denso. No entanto, esses autores observaram que esta dilatação não precisou ser tão visível, nem foi necessária a formação de haustórios maduros para começar a ligação da planta parasita na raiz do hospedeiro. Isto foi observado claramente nos haustórios de *E. grandiflora*.

O fato mais importante para a ligação foi a proximidade entre as raízes do parasita e do hospedeiro. Na periferia do tecido, paralelo ao aumento da dilatação, foram observados pelos radiculares de diversos tamanhos, sendo bem importantes na fixação inicial.

Segundo HEIDE-JØRGENSEN; KUIJT (1993) e BAIRD; RIOPEL (1983), a emissão de pelos radiculares é um dos eventos estruturais iniciais no desenvolvimento do haustório, sendo uma das características mais visíveis dos haustórios de muitas espécies de Orobanchaceae.

Os pelos radiculares no haustório ajudam primeiro a capturar a raiz do hospedeiro, abrangendo-a densamente e assegurando o contato entre as epidermes das duas plantas, e, assim, facilitando a entrada do endófito do parasita no tecido do hospedeiro (CUI *et al.*, 2015). Para atingir esse objetivo com sucesso, algumas plantas parasitas de Orobanchaceae, tais como *Agalinis* e *Triphysaria* secretam na superfície dos pelos radiculares do haustório substâncias para melhorar a aderência dos pelos na raiz do hospedeiro (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). Em *Agalinis*, os pelos radiculares estão cobertos por papilas, revestidas por substâncias classificadas como hemiceluloses (BAIRD; RIOPEL, 1983). Em *Triphysaria*, os pelos secretam um material péctico semelhante a mucilagem (HEIDE-JØRGENSEN; KUIJT, J, 1995).

Nos pelos radiculares de *E. grandiflora* não foram observadas papilas, nem foi possível observar a presença das secreções nos mesmos. Porém a análise histológica revelou a presença de compostos pécticos no haustório, apresentando-se em maior concentração nos elementos traqueais e na interface entre as epidermes do parasita e do hospedeiro, próximo aos pelos radiculares. Este fato indica que esses compostos pécticos poderiam estar sendo secretados também nos pelos radiculares, uma vez que são uma extensão da epiderme. Haustórios com pelos radiculares, encontram-se presentes em plantas dos gêneros da família Orobanchaceae, tais como *Agalinis*, *Aureolaria*, *Buchnera*, *Phtheirospermum* e *Striga*. Contudo, haustórios das plantas parasitas *Lesquerexia*, *Orobanche* e *Pelipanchen* não apresentam pelos radiculares (CUI *et al.*, 2015; WEBER, 1987).

Logo depois que os pelos radiculares do haustório de *E. grandiflora* facilitaram o contato entre as duas epidermes, o haustório começou a invasão, permitindo que o endófito do parasita atingisse tecido vascular do hospedeiro, o que foi bem sucedido tanto para haustórios novos como os maduros. Durante o processo de invasão do haustório nas raízes do hospedeiro, duas estratégias para entrar no tecido

podem ser desenvolvidas e utilizadas (DÖRR, 1997). No entanto, em *E. grandiflora* somente foi evidente uma delas. A primeira foi por pressão mecânica no processo de ligação, exercida em parte, pelos pelos radiculares, e pelas progressivas divisões periclinais e anticlinais das células do ápice do haustório, que recobrem a raiz do hospedeiro (HEIDE-JORGENSEN; KUIJT, 1995; HOOD *et al.*, 1998). Segundo JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN (2013) a pressão mecânica exercida pelo haustório no tecido do hospedeiro poderia afastar o haustório do tecido pela própria pressão gerada.

Porém, como estratégia para manter-se fixado no tecido, as células do haustório secretam substâncias aderentes, tais como pectinas na interface parasita-hospedeiro (LOSNER-GOSHEN *et al.*, 1998; NEUMANN, *et al.*, 1999; PÉREZ-DE-LUQUE *et al.*, 2006). Essas substâncias pécticas foram observadas no haustório de *E. grandiflora* de cor rosa escuro, concentradas principalmente na interface parasita-hospedeiro. Resultados similares em *Orobanche* foram descritos por PÉREZ-DE-LUQUE *et al.* (2006), indicando forte presença de pectinas na interface, que cumprem a função de melhorar a ligação. Crescimentos anticlinais de células alongadas da epiderme do haustório com o hospedeiro constituem a interface parasita-hospedeiro (HEIDE-JØRGENSEN; KUIJT, 1993). As análises histológicas realizadas no presente estudo mostraram que no haustório essas substâncias foram abundantes observadas nas regiões intercelulares do corpo hialino, as quais reagiram mostrando coloração rosa-claro. Não obstante, foi observado por VISSER; DÖRR; KOLLMANN (1984), em *Alectra*, que o depósito celular, que é secretado nas células do corpo hialino, poderia estar relacionado com elementos polissacarídeos.

Na raiz do hospedeiro *P. Purpurem*, utilizado neste trabalho, foram observadas substâncias pécticas em pouca densidade. Conforme PÉREZ-DE-LUQUE *et al.* (2006), as células da raiz de *Pisum sativum* que não estavam em contato com o haustório de *Orobanche* indicaram ausência de pectinas. A presença de pectina nas raízes de *Pisum sativum* somente foi visível quando estava ligado ao haustório de *Orobanche*.

A segunda estratégia de invasão é a secreção de enzimas para degradar o tecido do hospedeiro, facilitando a entrada do endófito no parasita (CHANG; LYNN, 1986; NEUMANN.; SALLÉ; WEBER., 1998). Exemplo disso: em *Orobanche* (Orobanchaceae), sobre as células do endófito do haustório foi reportado a presença da enzima pectina-metil-esterase, que tem a função de degradar tecidos do hospedeiro (LOSNER-GOSHEN *et al.*, 1998). A combinação da pressão mecânica

como atividade enzimática permite a entrada do endófito e pode ser evidenciada na compressão e alteração das células do hospedeiro na interface parasita-hospedeiro (HEIDE-JØRGENSEN; KUIJT, 1993; LOSNER-GOSHEN *et al.*, 1998; NEUMANN; SALLÉ; WEBER, 1998). No presente estudo, essas alterações também foram visualizadas nas células da raiz de *P. purpureum* ligada no haustório de *E. grandiflora*. No entanto, não foi investigado se *E. grandiflora* produz este tipo de enzimas para degradar o tecido do hospedeiro.

Nos elementos traqueais do haustório que estavam crescendo em direção ao hospedeiro (Figura 13a), foi visualizada a presença de substâncias pécticas no espessamento da parede, diferente dos elementos traqueais do cilindro central da raiz, que não exibiram essas substâncias no espessamento (Figura 13a-detalle). A formação destes elementos pode estar relacionada com aontogenia de cada tecido.

Enquanto os elementos traqueais do cilindro central são originados nas células do procâmbio (EVERT, 2006), os elementos do haustório são originados a partir de tecido provascular, que é formado no periciclo (NEUMANN; SALLÉ; WEBER, 1998), o qual envolve os elementos traqueais. Cada elemento consiste de uma linha de elementos de xilema ininterruptos (HEIDE-JØRGENSEN; KUIJT, 1995). Existem diferenças na composição química das paredes dos elementos traqueais, mas não foi investigado se as substâncias pécticas que se encontram nos elementos traqueais do haustório, têm alguma relação com as pectinas secretadas na interface parasita-hospedeiro.

Depois de desenvolver uma continuidade vascular entre o hospedeiro e o haustório do parasita (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013), o endófito começa a absorver água e nutrientes, que são transportados pelos elementos traqueais até a base do haustório, que se conecta com os elementos traqueais do cilindro central na raiz do parasita. A base do haustório está implicada na regulação da continuidade fisiológica com a raiz (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013).

7.4. PLÂNTULAS E PLANTAS COM E SEM HOSPEDEIRO

Na primeira etapa do desenvolvimento, aos 15 dias, as plantas de *E. grandiflora* SH e CH não apresentaram diferenças no crescimento, porque nessa etapa não havia começado o parasitismo e provavelmente as plântulas sobreviveram das reservas restantes na semente e da própria absorção de nutrientes pelos radiculares. As

diferenças estruturais entre as plantas dos dois tratamentos, como aumento do número de grãos de amido nas células corticais, aumento no tamanho do cilindro central, maior pigmentação das raízes e quantidade de haustórios, foram observados durante o parasitismo, que começou no dia 22.

Os resultados mostraram que o desenvolvimento é maior depois do começo do parasitismo, devido ao fato de que plantas parasitas têm uma capacidade limitada de absorver nutrientes pelas suas raízes; porém, atingem um menor desenvolvimento (SEEL; PARSONS; PRESS, 1993). Em plantas SH, a formação dos haustórios e o aumento na pigmentação das raízes foram observados depois dos 36 dias e o aumento no número de grãos de amido foi observado aos 64 dias após a germinação.

Plantas SH desenvolvem um cilindro central de menor tamanho devido ao reduzido acesso da água (PHOENIX; PRESS, 2005), o que pode explicar, porque as plantas de *E. grandiflora* SH, no presente estudo, formaram elementos traqueais de menor tamanho, em todas as etapas do desenvolvimento, comparados com plantas CH. As plantas CH apresentaram cilindro central maior, o que poderia indicar maior capacidade para absorver água e nutrientes pela ligação parasita-hospedeiro, tornando importante o xilema do hospedeiro como principal fonte de água do parasita (PHOENIX; PRESS, 2005; SEEL; PARSONS; PRESS, 1993).

Em geral, plantas hemiparasitas que se encontram em ausência de um hospedeiro, apresentam crescimento lento, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular devido à dificuldade para absorver água (CARDONA; MURIEL, 2015; PHOENIX; PRESS, 2005; SEEL; PARSONS; PRESS, 1993; SVENSSON; CARLSSON, 2004). No presente estudo, o sistema radicular de *E. grandiflora* SH apresentou um crescimento vertical, diferente das plantas CH, o que pode estar relacionado à resposta quimiotrópica das raízes do parasita estimulada pelas raízes do hospedeiro (JOEL; GRESSEL; MUSSELMAN, 2013). No entanto, as plantas SH podem permanecer vivas depois de sete meses, desenvolvendo o sistema radicular, mas essas plantas não atingem a etapa reprodutiva (CARDONA; MURIEL, 2015).

Por outro lado, *E. grandiflora* não necessitou de um hospedeiro para formar haustórios. Não obstante, a formação foi tardia, se comparada com os haustórios formados em plantas CH, os quais foram produzidos de forma antecipada e em maior abundância. Resultados similares em plantas de *E. grandiflora* multiplicadas desde rizomas,

foram encontrados por CARDONA; MURIEL (2015). No presente estudo, plantas SH formaram haustórios em menor quantidade, se comparadas com plantas CH. Uma explicação que elucide as razões da formação antecipada e abundante de haustórios em plantas CH pode estar relacionada aos estímulos químicos produzidos nos exsudatos das raízes do hospedeiro, que induzem a formação de haustórios (WESTWOOD, *et al.*, 2010).

Algumas das moléculas relacionadas como fatores da indução de haustórios são os compostos flavonóides, tais como a xenognosina, a peonidina e a benzoquinona dimethoxybenzoquinona (2,6 DMBQ), que induzem a formação de haustórios nas plantas *Agalinis* e *Triphysaria* (ALBRECHT; YODER; PHILLIPS, 1999; LYNN *et al.*, 1981). Porém, apesar de que *E. grandiflora* não precisar de um hospedeiro para formar haustórios, os fatores que se encontraram nas raízes de *P. purpureum* poderiam induzir uma rápida formação de haustórios, o que foi constatado no tratamento de plantas CH. Nas raízes de *Pennisetum orientale* foram encontrados compostos fenólicos (KAYANI *et al.*, 2007), no entanto, se desconhece o efeito desses compostos na formação de haustórios em plantas parasitas. No extrato das raízes de sorgo (*Sorghum bicolor*) foi encontrado o composto 2,6 DMQ como fator de indução nos haustórios de *Striga* (CHANG; LYNN, 1986). O tipo de compostos nos exsudatos da raiz de *P. purpureum* e o efeito desses compostos sobre a indução dos haustórios nas raízes de *E. grandiflora* são desconhecidos.

8. CONCLUSÕES

Novos registros de *E. grandiflora* foram encontrados no estado de Santa Catarina, um no interior e outro no litoral do estado. As plantas localizadas no litoral constituem o primeiro registro de *E. grandiflora* em todo o litoral Brasileiro.

Os avanços encontrados no presente estudo contribuem ao entendimento substancial da primeira etapa inicial do parasitismo, permitindo conhecer os pontos principais da morfologia da germinação das sementes, do desenvolvimento das plântulas de *E. grandiflora* e da formação de haustórios bem como da acumulação de reservas nutricionais na raiz.

As sementes de *E. grandiflora* são não endospermicas, apresentam reservas nutricionais armazenadas no perisperma e em maior quantidade nos cotilédones, vitais para o desenvolvimento do embrião, posterior emergência da raiz e rápido desenvolvimento inicial da raiz.

Uma das estratégias de sobrevivência das plântulas de *E. grandiflora*, pode ser o alongamento das células corticais e a formação de pelos radiculares na região proximal da raiz, desenvolvidas desde o início da emergência da radícula. Os pelos estabilizam a plântula no substrato e têm a função de absorver água numa etapa crítica para a plântula, quando esta ainda não fez conexão com a raiz do hospedeiro.

A partir da emergência da raiz de *E. grandiflora*, as plântulas associadas com o hospedeiro *P. purpureum*, necessitaram de 22 dias para formar haustórios funcionais e parasitar a raiz de *P. purpureum*. *Escobedia grandiflora* exibe lento crescimento das plântulas, concentra todas as reservas nutricionais para desenvolver o sistema radicular e aproximar-se nas raízes do hospedeiro, formar haustórios, entrar no tecido e absorver água e nutrientes do hospedeiro, para iniciar o parasitismo. Estas características refletem-se no aumento das reservas nutricionais do sistema radicular, em forma de grãos de amido armazenados nas células corticais, que serão usadas para a formação de haustórios, do caule, das folhas e, por consequência, possibilitar futuras estruturas reprodutivas.

Os pelos radiculares dos haustórios de *E. grandiflora* são estruturas fundamentais no início do parasitismo uma vez que estabelecem uma aproximação com a raiz de *P. purpureum*; abrangem o tecido e fazem pressão mecânica para permitir a entrada do haustório no tecido do hospedeiro.

Sugere-se que as áreas electrodensas encontradas no interior dos grãos de amido, estão relacionadas com a pigmentação alaranjada nas raízes de *E. grandiflora*. Também, que esses pigmentos associados aos carotenóides poderiam formar-se nos amiloplastos corticais.

Os compostos pécticos desempenham um papel importante na estrutura do haustório de *E. grandiflora*. Eles são abundantes e ocorrem principalmente na interface das duas epidermes, melhorando a fixação do haustório nas raízes do hospedeiro pelas propriedades aderentes destes compostos. Estes compostos poderiam ser armazenados nas regiões intercelulares do corpo hialino, que são estruturas de armazenamento transitório.

Plantas sem hospedeiro, aos 64 dias da emergência da raiz, atingiram um desenvolvimento similar ao de plantas com hospedeiro, provavelmente pela capacidade para absorver alguns nutrientes pelos pelos radiculares.

Apesar de *E. grandiflora* não ser dependente da raiz do hospedeiro para desenvolver haustórios, a presença do hospedeiro promove a sua rápida formação, indicando que esses compostos encontrados na raiz do hospedeiro, induzem à formação de haustórios e poderiam aumentar o desenvolvimento da planta.

9. PERSPECTIVAS DO FUTURO

Estudos elaborados que confirmem a classificação taxonômica das plantas do interior e do litoral catarinense são necessários. Da mesma maneira, é oportuno comparar similaridades e diferenças, visando comprovar de forma inequívoca se as plantas das populações encontradas neste trabalho no estado de Santa Catarina pertencem a mesma espécie ou não, daquela descrita na Colômbia.

Para o processo de embebição, as sementes precisam da entrada de água no embrião, desta maneira a água precisa passar por cada um dos tecidos da planta, processo que não está bem descrito para as sementes de *E. grandiflora*, e que deve ser mais aprofundado.

Para verificar o efeito da acumulação dessas reservas nutritivas na raiz, durante o parasitismo de plântulas de *E. grandiflora*, são necessários estudos que quantifiquem essas reservas nas diferentes etapas do desenvolvimento, para serem comparados com os resultados deste estudo da estrutura e da ultraestrutura dos grãos de amido.

Dos pigmentos encontrados dentro dos grãos de amido, são necessários estudos para esclarecer quais são os compostos químicos aos que pertencem esses pigmentos, e quantificá-los nas diferentes etapas do desenvolvimento.

Análises histológicas devem ser feitas para comprovar a presença das secreções nos pelos radiculares, que tem a função de aderir-se no tecido do hospedeiro.

Com a descrição do processo de formação dos haustórios e posterior parasitismo, foi evidenciada a importância dos compostos pécticos, principalmente na aderência à raiz do hospedeiro. Esses compostos pécticos devem ser identificados e quantificados durante as diferentes etapas do desenvolvimento da planta, para conhecer assim o momento de maior concentração na planta.

Devem ser realizados estudos que avaliem o tempo total de sobrevivência de *E. grandiflora* sem hospedeiro.

Estudos adicionais relacionados ao tipo e efeito dos exsudatos do hospedeiro, na formação de haustórios e posterior desenvolvimento das plântulas de *E. grandiflora*, devem ser feitos

10. ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características morfológicas de *Escobedia grandiflora*. **(a)** Planta em estágio vegetativo; **(b)** raízes de cor laranja; **(c)** planta em floração; **(d)** planta em frutificação; **(e)** secção longitudinaldo fruto maduro; **(f)** semente madura. Barra: 500 μ m. Fonte: Cardona (2017).

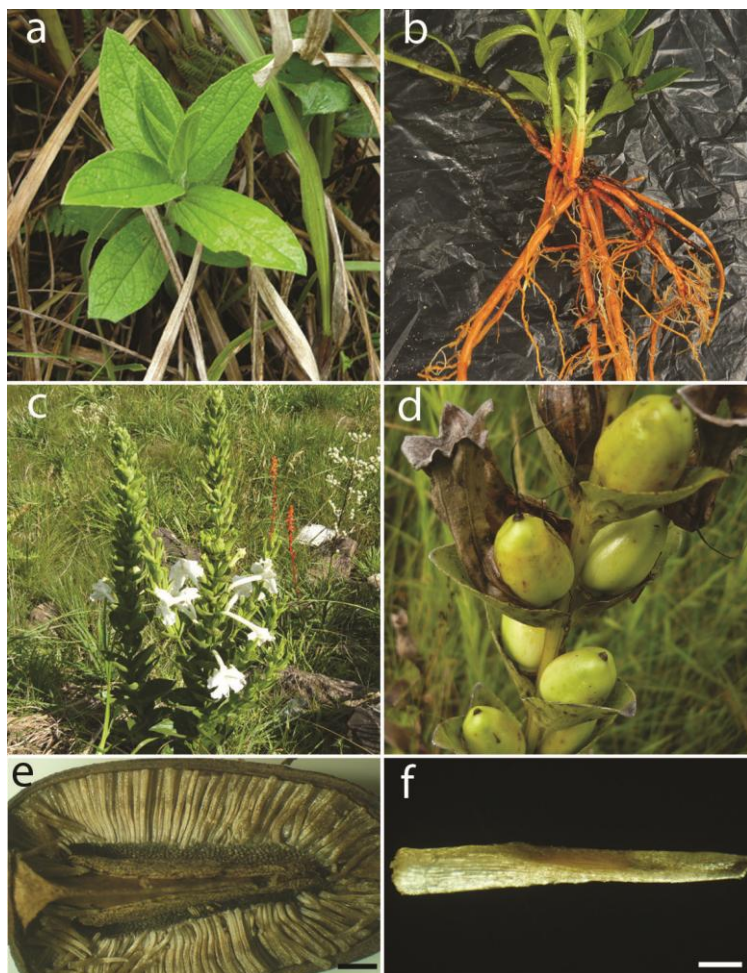


Figura 2. Origem da semente e estabelecimento dos ensaios de *Escobedia grandiflora* para (i) caracterização de sementes e (ii) comparação entre dois tratamentos com e sem a presença da planta parasita: **(a)** plantas adultas com frutos maduros (seta); **(b)** germinação de sementes; **(c)** hospedeiro plantado 30 dias antes da sementeira das sementes do parasita (seta); **(d)** plântulas do parasita sem hospedeiro aos 15 dias (seta); **(e)** e na presença do hospedeiro aos 15 dias após germinação (seta); **(f)** na presença do hospedeiro aos 64 dias após da emergência da raiz (seta). Legenda: Ho= Hospedeiro. Barra: (b)=3 cm, (c-f)= 300 μ m. Fonte: Cardona (2017).

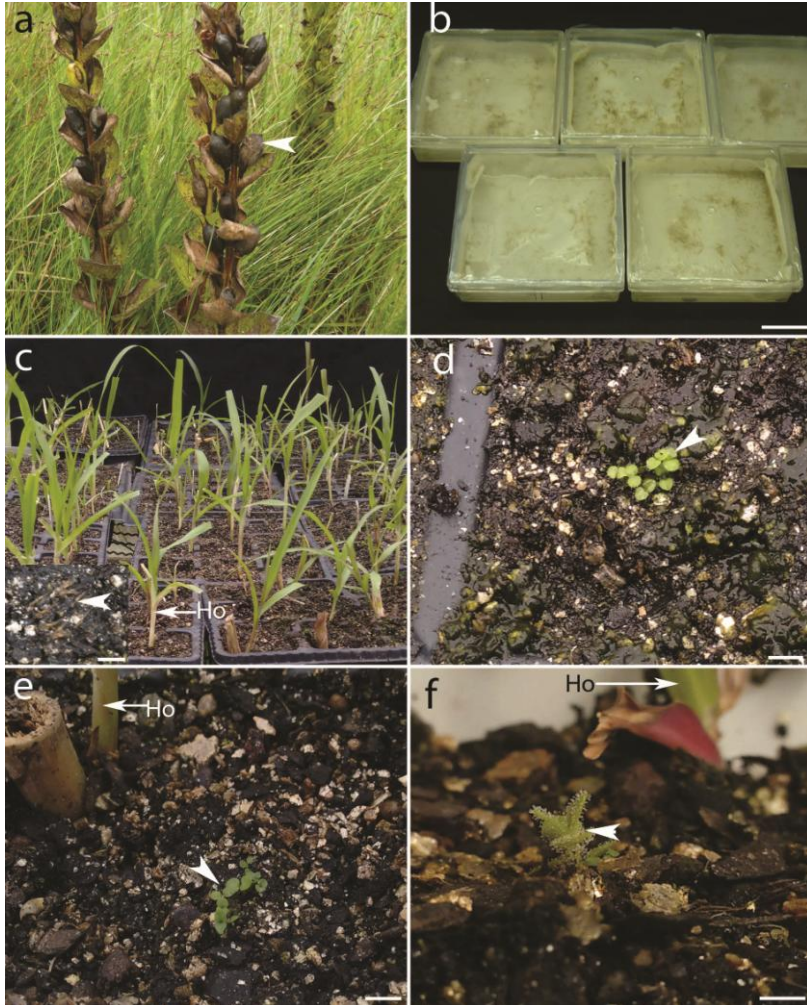


Figura 3. Localização das quatro populações naturais de *E. grandiflora*, nos municípios de: **(a)** Água Doce (SC); **(b)** Palmas (PR); **(c)** Campos Novos (SC); **(d)** Florianópolis (SC). Fonte: Google Earth.



Figura 4. Vista geral das populações naturais de *E. grandiflora*, nos municípios de: **(a)** Água Doce (SC); **(b)** Palmas (PR); **(c)** Campos Novos (SC); **(d)** Florianópolis (SC). Fonte: Cardona (2017).

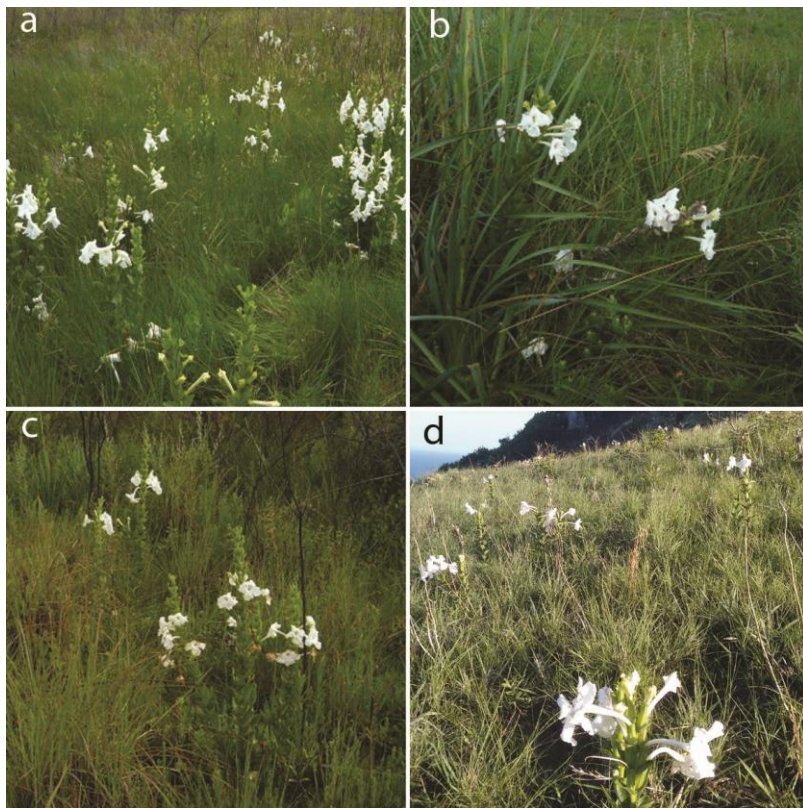


Figura 5. Morfoanatomia da semente de *E. grandiflora* e do início da germinação. **(a, c-d, i)** Fotomicrografia em ME; **(b, f)** electromicrografias em MEV **(e, g, h, j)** fotomicrografias em MO de secções longitudinais da semente. **(a)** Sementes maduras agrupadas num loculo do fruto, detalhe região hilar (cabeça de seta); **(b)** superfície da exotesta, em detalhe cavidade com parede exterior fragmentada (cabeça de seta); **(c)** semente madura; **(d, g)** sementes embebidas por 6 dias; **(e-f)** detalhe dos tegumentos, com presença de vestígios do endosperma (cabeça de seta); **(h)** Suspensor; **(i-j)** sementes embebidas em água por 10 dias, com detalhe do promeristema (cabeça de seta). Legendas: CD= Cotilédones; EM= Embrião; END= Endotélio; ET= Exotesta; HL= Hilo; PC= Procâmbio; PER= Perisperma; PR= Pericarpio; PRO= Protoderme; RAD= Radícula; SE= Semente; SS= Suspensor. Barra: (a)=2 mm, (detalhe a)= 500 μ m, (b, g, h)= 100 μ m, (detalhe b, e, detalhe j)= 20 μ m, (c, d, i)= 500 μ m, (f)= 10 μ m, (j)= 200 μ m. Fonte: Cardona (2017).

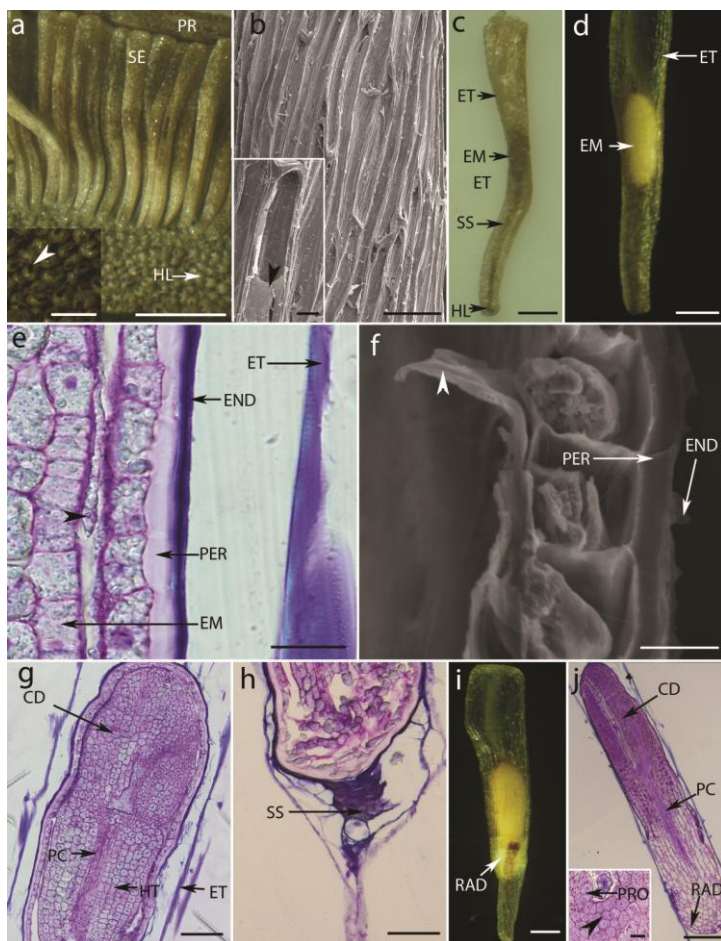


Figura 6. Morfoanatomia da plântula de *E. grandiflora* na germinação e início do desenvolvimento. **(a, e)** fotomicrografias em ME; **(b,g)** electromicrografias em MEV; **(c,d)** fotomicrografias de secções longitudinais em MO. **(a-c)** Detalhe da raiz rompendo a exotesta da semente (cabeça de seta); **(d-g)** plântulas após a germinação, com detalhe da região proximal da raiz com pelos radiculares (cabeça de seta); **(d)** plântula e detalhe das células com conteúdo denso (cabeça de seta); **(e)** plântula e detalhe da raiz principal em MC; **(f)** pelos radiculares na região proximal da raiz (cabeça de seta) observados em MC; **(g)** plântula com presença de tricomas capitados na face adaxial dos cotilédones e pelos radiculares na região proximal da raiz (cabeça de seta). Legendas: CC= Cilindro central; CD= Cotilédones; CF= Coifa; CO= Colo; ET= Exotesta; HT= Hipocótilo; PC= Procâmbio; PL= Pelos radiculares; PM= Promeristema; RP= Raiz do parasita; TRC= Tricomas capitados. Barras: (a, e)= 500 µm, (b)= 100 µm, (c, d, detalhe e, f, g)= 200 µm, (detalhe d)= 20 µm Fonte: Cardona (2017)

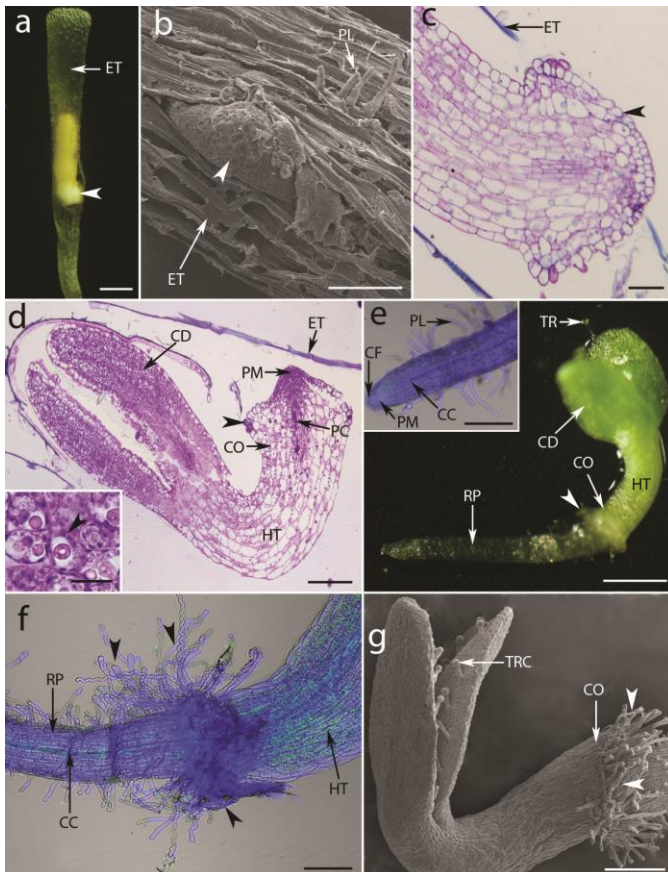


Figura 7. Morfoanatomia das plântulas de *E. grandiflora*, aos 15 dias, na presença de *P. purpureum*. **(a)** Fotomicrografia da plântula em ME, com detalhe de secção longitudinal do ápice da raiz; **(b)** electromicrografia, em MEV, da região proximal da raiz, com longos pelos radiculares (seta); **(c-e)** secções transversais da estrutura **(c)** do hipocótilo, **(d)** da raiz com um dos lados mostrando alongamento das células corticais (cabeça de seta) e **(e)** sistema radicular com início da ramificação lateral. Legendas: CD= Cotilédones; CF= Coifa; CT=Córtex; HT= Hipocótilo; EN= Endoderme; EP= Epiderme; FL= Floema; MX= Metaxilema; PE= Periciclo; PL= Pelos radiculares; PM= Promeristema; PX= Protoxilema; RL= Raiz lateral; XL= Xilema. Barras: (a)= 500 μ m; (b)= 200 μ m; (detalhe-a, c-d)= 50 μ m. Fonte: Cardona (2017).

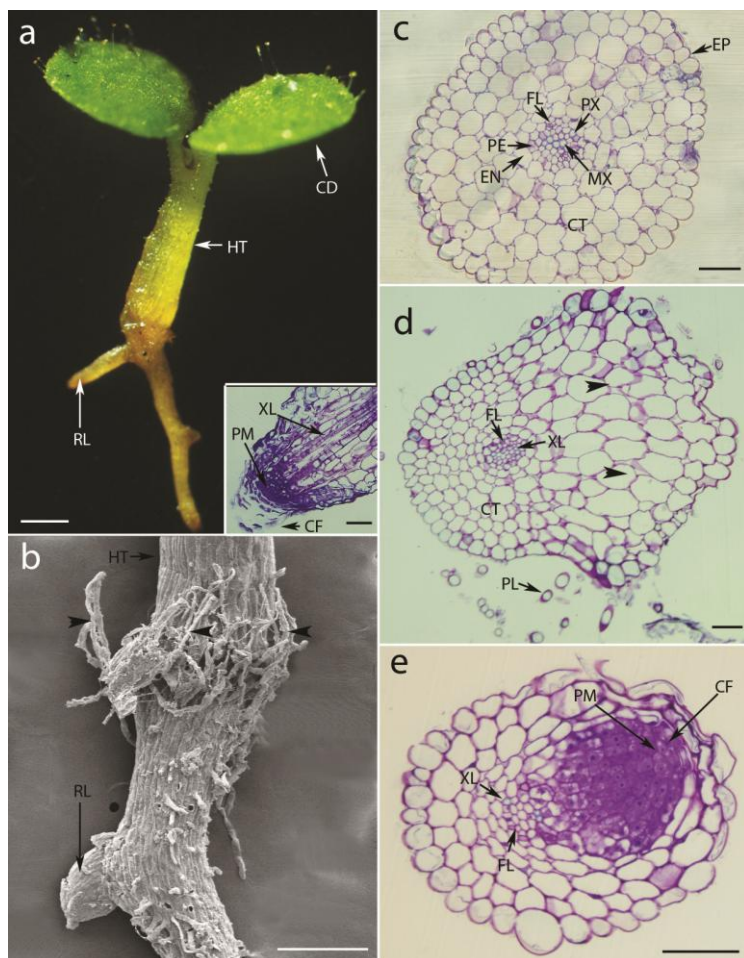


Figura 8. Morfoanatomia das plântulas de *E. grandiflora*, aos 22 dias, associadas ao *P. purpureum*. **(a, g)** Fotomicrografias em ME; **(d-e)** electromicrografias em MEV; **(b,c,f)** fotomicrografias de seções transversais em MO. **(a)** Plântula de com haustório em formação (cabeças de seta); **(b)** hipocótilo com grãos de amido (cabeças de seta); **(c)** detalhe do cilindro central e córtex (cabeça de seta indicando grãos de amido) da raiz; **(d)** colar de pelos radiculares na região proximal da raiz (cabeça de seta); **(e)** haustório desenvolvido; em detalhe, a abertura do haustório (cabeça de seta); **(f)** entrada do endófito do parasita (cabeça de seta) no sistema vascular do hospedeiro; **(g)** haustório do parasita ligando à raiz do hospedeiro. Legenda: CT= Córtex; EN= Endoderme; EL= Elementos traqueais; EP= Epiderme; FL= Floema; Ha= Haustório; HT= Hipocótilo; MX=Metaxilema; PE=Periciclo; PL=Pelos radiculares; PX= Protoxilema; RAH= Raiz do hospedeiro; RL= Raiz lateral; RP= Raiz do parasita; XL= xilema. Barra: (a)= 2 mm; (b)= 50 μ m; (c, detalhe e, f)= 20 μ m (d-e)= 100 μ m; (g)= 200 μ m. Fonte: Cardona (2017).

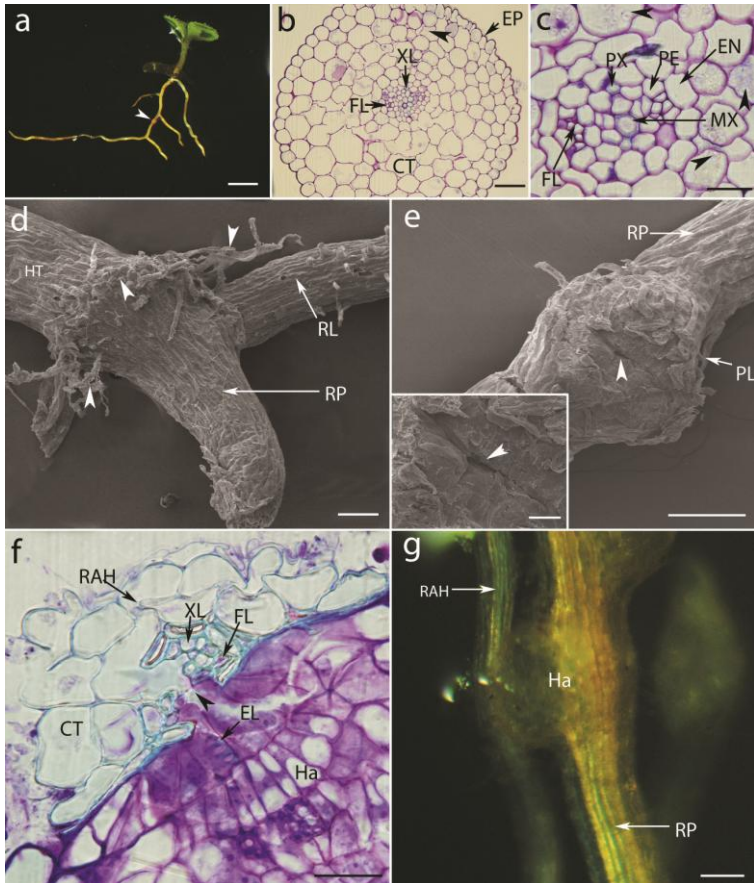


Figura 9. Morfoanatomia da parte aérea de *E. grandiflora*, aos 43 dias, com destaque dos indumentos: tricomas capitados e não capitados. **(a)** Planta com primórdios das folhas definitivas, em ME; **(b-d)** electromicrografias, em MEV, da superfície epidérmica da face adaxial dos três tipos foliares; **(c)** eofilo com detalhe dos tricomas; **(d)** formação inicial das folhas. Legendas: AP= Ápice; CD= Cotilédones; EPI= Epicótilo; EO= Eofilos; FO= Folhas; PED= Pedúnculo; TRC= Tricoma capitado; TRN= Tricoma não capitado. Barra: (a-b)= 500 μ m; (c-d)= 100 μ m; (detalhe c)= 50 μ m. Fonte: Cardona (2017).

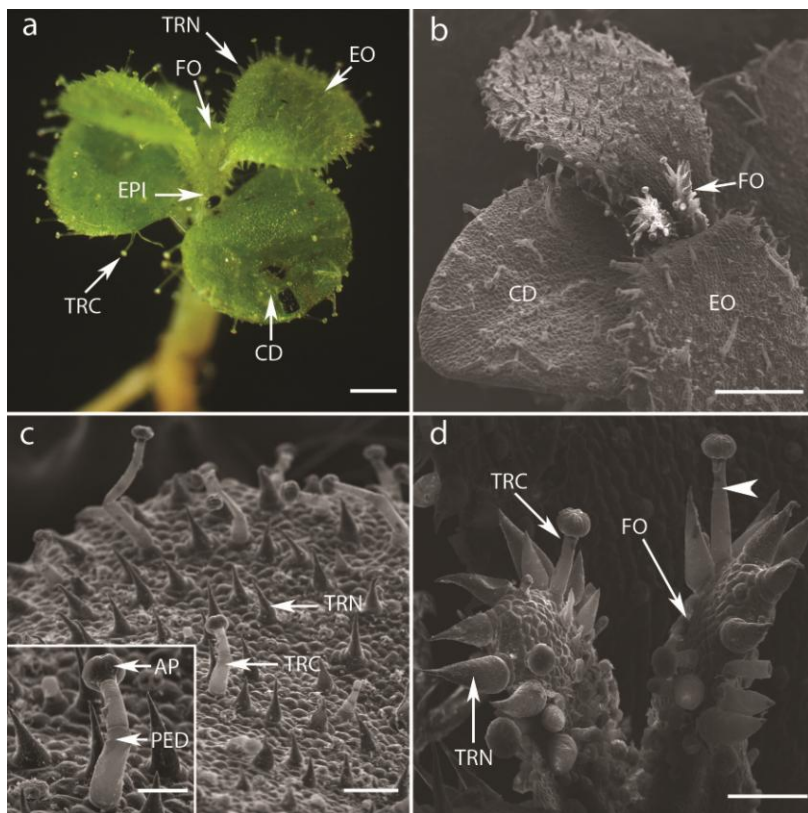


Figura 10. Morfoanatomia das plantas de *E. grandiflora*, aos 64 dias, associadas ao *P. purpureum*. **(a)** Planta parasitacom haustórios ligados nas raízes do hospedeiro (cabeça de seta), em ME; **(b)** electromicrografia, em MEV, da região proximal da raiz, com haustórios ligados na raiz do hospedeiro (cabeça de seta); **(c-g)** fotomicrografias, em MO, de secções transversais **(c)** caule com grãos de amido no córtex (cabeça de seta); **(d)** raiz com grãos de amido no córtex (cabeça de seta); **(e)** raiz lateral; **(f)** grãos de amido nas células corticais do caule e **(g)** grãos de amido nas células corticais em reação com o lugol (cabeças de seta). Legendas: CA= Caule; CD= Cotilédone; CV= Câmbio vascular ;EN= Endoderme; EP=Epiderme; FL= Floema; PE= Periciclo;RAH= Raiz do hospedeiro; RP= Raiz do parasita; XL= Xilema. Barra: (a)= 2 mm; (b)= 200 μ m; (c-d)= 100 μ m; (e-f)= 50 μ m; (detalhe f, g, detalhe g)= 20 μ m. Fonte: Cardona (2017).

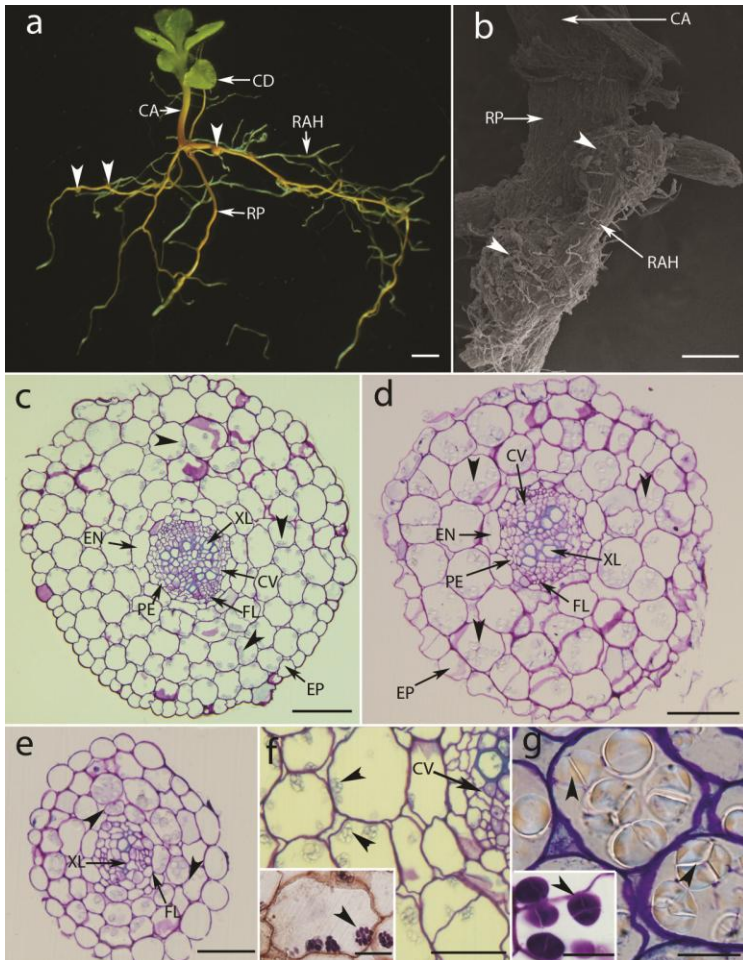


Figura 11. Grãos de amido no parênquima cortical da raiz de *E. grandiflora*. **(a)** Aspecto geral dos grãos de amido (cabeça de seta), em MEV; **(b-c)** detalhe dos amiloplastos com grãos de amido e áreas electrodensas (cabeça de seta). Legendas: GA= Grão de amido; PAC= Parede celular. Barra: (a)= 10 μ m; (b)= 2 μ m; (Detalhe b, c)= 1 μ m. Fonte: Cardona (2017).

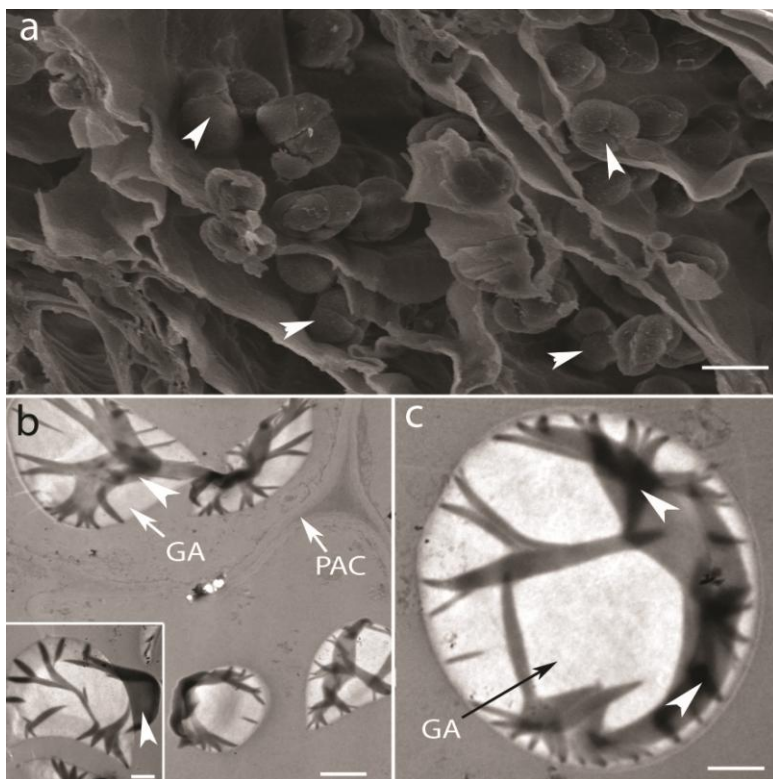


Figura 12. Aspectos morfoanatômicos do haustório de *E. grandiflora* ligado nas raízes de *P. purpureum*. (a) Electromicrografia em MEV, destacando o haustório com densos e longos pelos radiculares (cabeças de setas); (b-d, f) fotomicrografias em MO; (b) secção longitudinal do haustório maduro; (c) secção transversal da base do haustório, com grãos de amido no córtex (cabeça de seta); (d) secção transversal evidenciando as células do corpo hialino do haustório em reação com vermelho de rutênio, denota-se a presença de substâncias pécnicas de cor rosa na região intercelular; (e) elementos traqueais (cabeça de seta) do haustório observados em MC com fluorescência; (f) endófito de parasita (cabeça de setas) no interior do sistema vascular do hospedeiro. Legendas: CC= Cilindro central; CT= Córtex; EF= Endófito; EL= Elementos traqueais; Ha= Haustório; HB= Corpo hialino; PE= Periciclo; PV= Tecido provascular; RAH= Raiz do hospedeiro; RP= Raiz do parasita; XL= Xilema. Barra: (a-b, e)= 100 µm; (c)= 50 µm; (d, f)= 20 µm. Fonte: Cardona (2017).

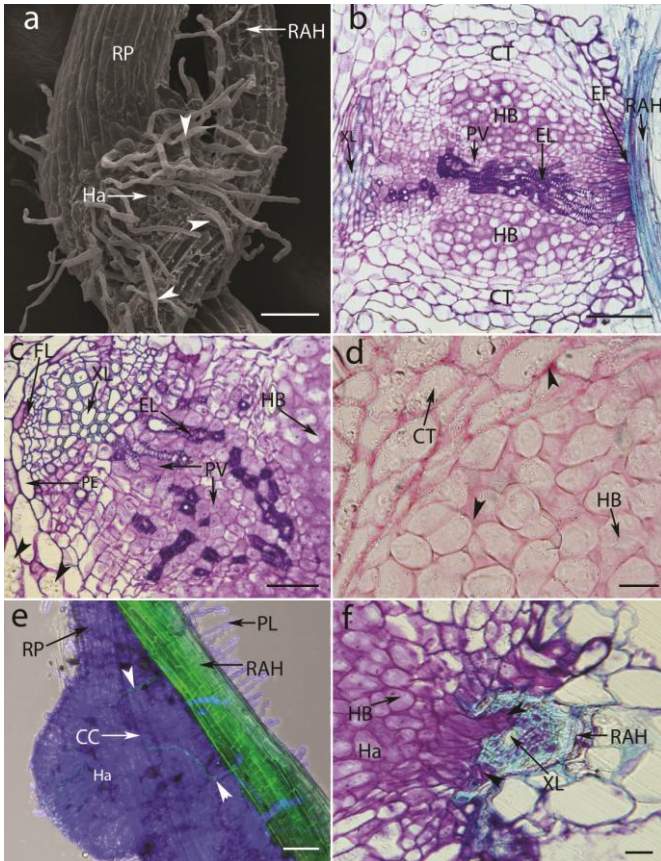


Figura 13. Haustório de *E. grandiflora*. **(a)** seção transversal do haustório, em MO, com secreção de compostos pécnicos concentrados no ápice do haustório (cabeça de seta) e detalhe dos elementos traqueais do cilindro central; **(b-d)** electromicrografias em MET das células do corpo hialino: **(b)** região intercelular do corpo hialino, preenchida com substâncias pécnicas; **(c-d)** células do corpo hialino com citoplasma denso, núcleo visível e com de grãos de amido. Legenda: EL=Elementos traqueais; CT= CórTEX; GA= grão de amido; HB= Corpo hialino; N= Núcleo; PAC= Parede celular; PV= Tecido provascular; RAH= Raiz do hospedeiro; VA= Vacúolo. Barra: (a)= 100 μ m; (detalhe a)= 50 μ m; (b-d)= 2 μ m. Cardona (2017).

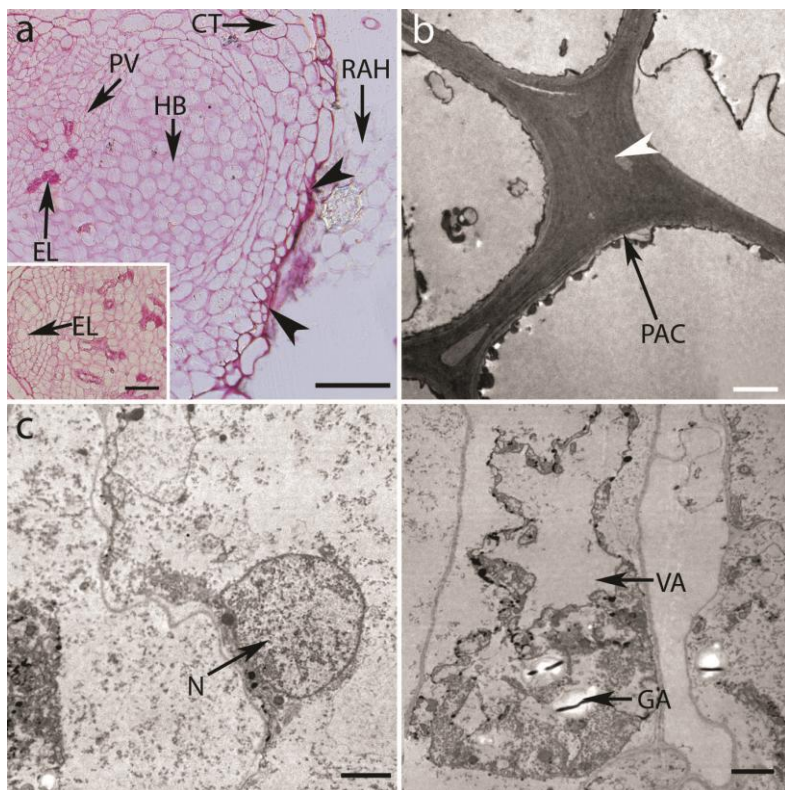


Figura 14. Formação do haustório de *E. grandiflora* e parasitismo nas raízes do *P. purpureum*. **(a-b)** Fase inicial de formação do haustório: **(a)** fotomicrografia, em MO, de secção longitudinal do crescimento das células corticais (cabeça de seta); **(b)** fotomicrografia da dilatação externa da raiz (cabeça de seta), em ME, com formação de pelos radiculares; **(c)** electromicrografia, em MEV, do haustório desenvolvido (cabeça de seta); **(d)** fotomicrografia dos pelos radiculares (cabeça de seta), em ME, começando abranger a superfície da raiz do hospedeiro; **(e)** electromicrografia, em MEV, dos pelos radiculares do haustório (cabeça de seta) abrangendo a raiz do hospedeiro; **(f)** fotomicrografia da autoflorescência da ligação parasita-hospedeiro com os elementos traqueais (cabeça de seta) sem entrar no tecido do hospedeiro, em detalhe haustório entrando no tecido, observada em MC; **(g)** haustórios parasitando raízes do hospedeiro, em ME; **(h-i)** fotomicrografias, em MO, de secções transversais de haustórios ligado na raiz do hospedeiro **(h)** aos 22 dias e **(i)** aos 64 dias, com o endófito (cabeça de seta) no interior do cilindro vascular do hospedeiro. Legendas: CT= Córtex; EL= Elementos traqueais; GA= Grãos de amido; Ha= Haustório; PL= Pelos radiculares; PV= Tecido provascular; RAH= Raiz do hospedeiro; RP= Raiz do parasita; XL= Xilema. Barras: (a, h)= 50 μ m; (b-c, e, detalhe f, i)= 100 μ m; (d, f-g)= 200 μ m. Fonte: Cardona (2017).

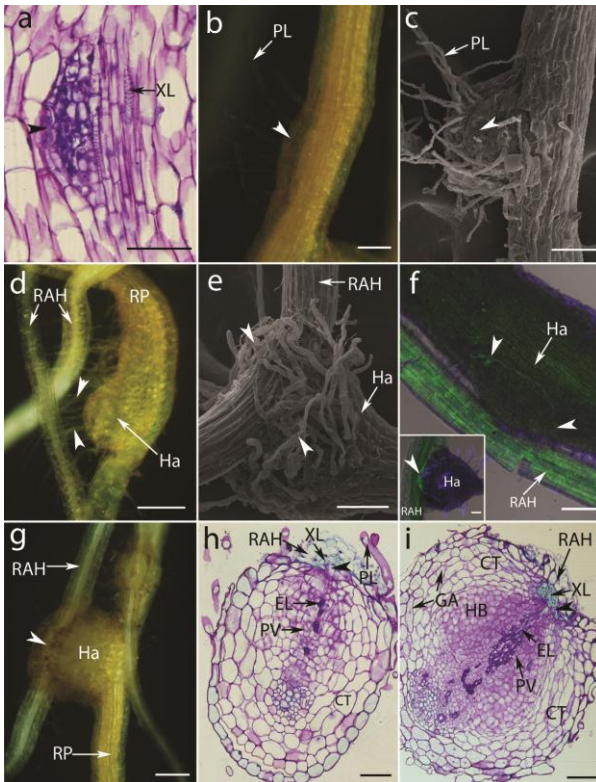
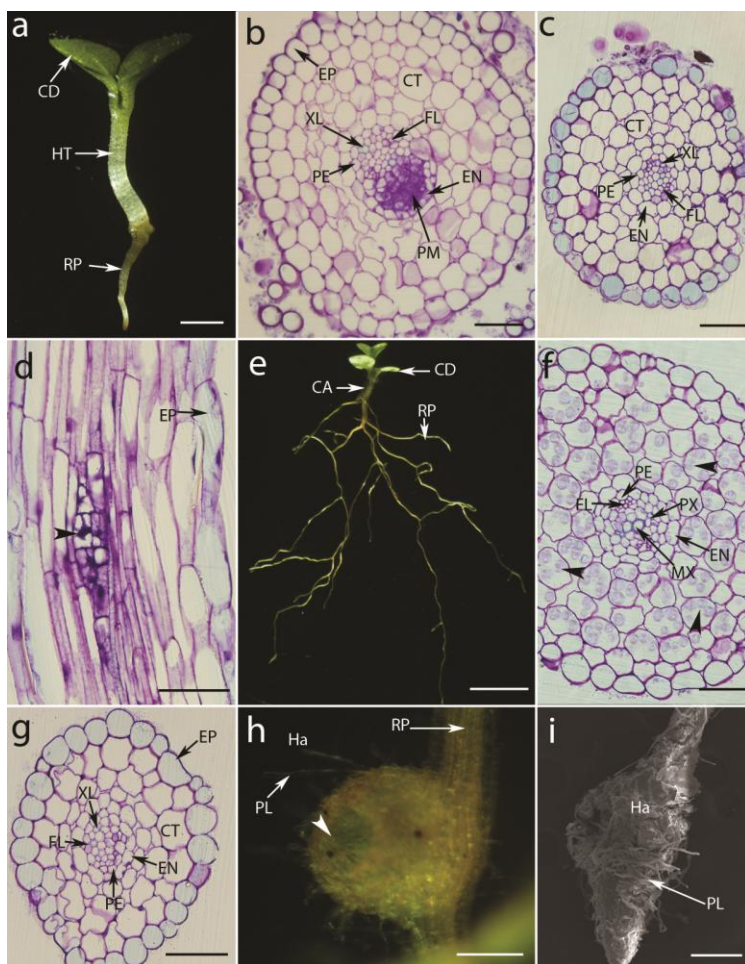


Figura 15. Morfoanatomia das plantas de *E. grandiflora* sem hospedeiro. Desenvolvimento das plantas (a-b) aos 15 dias, (c-d) 22 dias e (e-i) 64 dias da germinação. (a) Plântula, em ME; (b-d, f- g) fotomicrografias em MO. (b-c) Secções transversais da raiz principal; (d) secção longitudinal da fase inicial da formação do haustório (seta); (e) planta, em ME; (f-g) secções transversais (f) da raiz principal, com grãos de amido no córtex (cabeça de seta) e (g) da raiz lateral; (h) fotomicrografiado haustório, em ME; (i) electromicrografia do haustório, em MEV. Legendas: CA= Caule; CD= Cotilédones; CT= Córtex; EN= Endoderme; EP= Epiderme; FL= Floema; Ha= Haustório; HT= Hipocótilo; MX= Metaxilema; PE= Periciclo; PL= Pelos radiculares; PX= Protoxilema; RL= Raiz lateral; RP= Raiz do parasita; XL= Xilema. Barra: (a)= 1 mm; (b-d, f-g)= 50 µm; (e)= 5 mm; (h-i)= 200 µm. Fonte: Cardona (2017).



REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, H.; YODER, J. I.; PHILLIPS, D. A. Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *triphysaria versicolor*. **Plant physiology**, fev. 1999. v. 119, n. 2, p. 585–592.
- BAIRD, W. V.; RIOPEL, J. L. Experimental studies of the attachment of the parasitic angiosperm *magaliniis purpurea* to a host. **Protoplasma**, 1 out. 1983. v. 118, n. 3, p. 206–218.
- BENNETT, J. R.; MATHEWS, S. Phylogeny of the parasitic plant family orobanchaceae inferred from phytochrome a. **American journal of botany**, jul. 2006. v. 93, n. 7, p. 1039–1051.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds**. New York, NY: Springer New York, 2013.
- BURGUER, W.; BARRINGER, K. Botany: new series no 4, flora costaricensis. **Museum of natural history**, 2000. p. 39–40.
- BUSSMANN, R.; GLENN, A.; SHARON, D. Antibacterial activity of medicinal plants of northern peru - can traditional applications provide leads for modern science? **Indian journal of traditional knowledge**, 2010. v. 9, n. 4, p. 742–753.
- CARDONA, E.; MURIEL, S. B. M. Seed germination and plant development in *escobedia grandiflora* (orobanchaceae): evidence of obligate hemiparasitism? germinación de semillas y desarrollo de plantas en *escobedia grandiflora* (orobanchaceae):? evidencia de hemiparasitismo obligado? (2015). Disponível em: <http://www.academia.edu/download/38538556/43776-254903-2-PB_3.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2017.
- CHANG, M.; LYNN, D. G. The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. **Journal of chemical ecology**, 1 fev. 1986. v. 12, n. 2, p. 561–579.
- CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons. vol. 1 vol. 1**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976.
- CUI, S. *et al.* Haustorial hairs are specialized root hairs that support parasitism in the facultative parasitic plant, *phtheirospermum japonicum*. **Plant physiology**, 2016. p. 1492–1503.

DALL'OSTO, L. *et al.* Different roles of α - and β -branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. **Journal of biological chemistry**, 30 nov. 2007. v. 282, n. 48, p. 35056–35068.

DAVISON, P. A.; HUNTER, C. N.; HORTON, P. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in arabidopsis. **Nature**, 11 jul. 2002. v. 418, n. 6894, p. 203–206.

DÖRR, I. How striga parasitizes its host: a tem and sem study. **Annals of botany**, 1997. v. 79, n. 5, p. 463–472.

ESAU, K. **Plant anatomy**. Barcelona: Omega, 1959.

EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**. 3rd ed ed. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, 2006.

FERNÁNDEZ-APARICIO, M.; FLORES, F.; RUBIALES, D. The effect of orobanche crenata infection severity in faba bean, field pea, and grass pea productivity. **Frontiers in plant science**, 21 set. 2016. v. 7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5030276/>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of microscopy**, 1983. v. 132, n. 1, p. 81–85.

HALLAHAN, D. L. (Org.). **Plant trichomes**. San Diego: Academic Press, 2000.

HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends in plant science**, abr. 1998. v. 3, n. 4, p. 147–151.

HEIDE-JØRGENSEN, H. S. **Parasitic flowering plants**. Leiden : Boston: Brill, 2008.

HEIDE-JØRGENSEN, H. S.; KUIJT, J. Epidermal derivatives as xylem elements and transfer cells: a study of the host-parasite interface in two

species of triphysaria (scrophulariaceae). **Protoplasma**, 1 set. 1993. v. 174, n. 3–4, p. 173–183.

HEIDE-JORGENSEN, H. S.; KUIJT, J. The haustorium of the root parasite triphysaria (scrophulariaceae), with special reference to xylem bridge ultrastructure. **American journal of botany**, 1995. v. 82, n. 6, p. 782–797.

HOOD, M. E. *et al.* Primary haustorial development of striga asiatica on host and nonhost species. **Phytopathology**, jan. 1998. v. 88, n. 1, p. 70–75.

HORNER, H. T. *et al.* Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection. **American journal of botany**, 1 jan. 2007. v. 94, n. 1, p. 12–24.

HORRIDGE, G. A.; TAMM, S. L. Critical point drying for scanning electron microscopic study of ciliary motion. **Science**, 1969. v. 163, p. 817–818.

ICHASO, C. L. Morfologia das sementes de 35 gêneros de scrophulariaceae do brasil-sua aplicação à sistemática desta família. **Rodriguésia**, 1980. n. 53, p. 33–108.

_____; BARROSO, G. Escrofulariáceas. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí, SC: Herbário “Barbosa Rodrigues”, 1970, V. 1, p. 114.

JALEEL, C. A. *et al.* Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, 2009. v. 11, p. 100–105.

JOEL, D. M. *et al.* Seed ultrastructure and water absorption pathway of the root-parasitic plant phelipanche aegyptiaca (orobanchaceae). **Annals of botany**, 1 jan. 2012. v. 109, n. 1, p. 181–195.

JOEL, D. M.; GRESSEL, J.; MUSSELMAN, L. J. (Org.). **Parasitic orobanchaceae**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, NY: McGraw-Hill, 1940.

KAYANI, S. *et al.* Distribution of secondary metabolites in plants of quetta-balochistan. **Pak. j. bot.**, 2007. v. 39, n. 4, p. 1173–1179.

KUHN, R. Plant pigments. **Annual review of biochemistry**, 1935. v. 4, p. 479–496.

KUIJT, Job. Haustoria of phanerogamic parasites. **Annual review phytopathology**, 1977. v. 15, n. 1, p. 91–118.

LOSNER-GOSHEN, D. *et al.* Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant orobanchel. (orobanchaceae) in host roots. **Annals of botany**, fev. 1998. v. 81, n. 2, p. 319–326.

LYNN, D. G. *et al.* Isolation and characterization of the first host recognition substance for parasitic angiosperms. **Journal of the american chemical society**, 1 abr. 1981. v. 103, n. 7, p. 1868–1870.

MALÉCOT, V.; NICKRENT, D. L. Molecular phylogenetic relationships of olacaceae and related santalales. **Systematic botany**, 2008. v. 33, n. 1, p. 97–106.

MURIEL, S. B. M. *et al.* Indagaciones acerca del azafrán de raíz (escobedia grandiflora (l.f.) kuntze en antioquia - colombia: una especie olvidada. **Etnobiología**, 2015. v. 13, n. 2, p. 85–93.

NEUMANN, U. *et al.* Interface between haustoria of parasitic members of the scrophulariaceae and their hosts: a histochemical and immunocytochemical approach. **Protoplasma**, 1 mar. 1999. v. 207, n. 1–2, p. 84–97.

NEUMANN, Ulla; SALLÉ, G.; WEBER, H. Development and structure of the haustorium of the parasite rhamphicarpa fistulosa (scrophulariaceae). **Plant biology**, 1998. v. 111, n. 5, p. 354–365.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. **Protoplasma**, 1964. v. 59, n. 2, p. 368–373.

OKONKWO, S. N. C.; RAGHAVAN, V. Studies on the germination of seeds of the root parasites, *Alectra vogelii* and *striga gesnerioides*. i. anatomical changes in the embryos. **American journal of botany**, nov. 1982. v. 69, n. 10, p. 1636.

Orobanchaceae — the plant list. [S.l.], 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orobanchaceae/>>. Acesso em: 6 jan. 2017.

OUÉDRAOGO *et al.* New insights concerning the ecology and the biology of *rhamphicarpa fistulosa* (scrophulariaceae). **Weed research**, 1 abr. 1999. v. 39, n. 2, p. 159–169.

PENNELL, F. W. *Escobedia*: a neotropical genus of the scrophulariaceae. **Proceedings of the academy of natural sciences of philadelphia**, 1931. v. 83, p. 411–426.

PÉREZ-DE-LUQUE, A. *et al.* Protein cross-linking, peroxidase and -1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against orobanche *crenata*. **Journal of experimental botany**, 1 mar. 2006. v. 57, n. 6, p. 1461–1469.

PETERSON, R. L.; FARQUHAR, M. L. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. **The botanical review**, jan. 1996. v. 62, n. 1, p. 1–40.

PHOENIX, G. K.; PRESS, M. C. Linking physiological traits to impacts on community structure and function: the role of root hemiparasitic orobanchaceae (ex-scrophulariaceae). **Journal of ecology**, 1 fev. 2005. v. 93, n. 1, p. 67–78.

PRESS, Malcolm C. (Org.). **Parasitic plants**. 1. ed ed. London: Chapman & Hall, 1995.

PUESCHEL, C. M. Ultrastructure of tetrasporogenesis in *plamaria palmata* (rhodophyta). **Jornal phycology**, 1979. v. 15, p. 409–424.

QING-LIANG, C. *et al.* Postembryonic development of *cistanche tubulosa* (schrenk) whigt. **PakistanJornal ofBotany.**, 2011. v. 43, n. 4, p. 1823–1830.

REN, Y.-Q. *et al.* Host dependence and preference of the root hemiparasite, *pedicularis cephalantha* franch. (orobanchaceae). **Folia geobotanica**, 1 dez. 2010. v. 45, n. 4, p. 443–455.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The journal of cell biology**, 1 abr. 1963. v. 17, n. 1, p. 208–212.

RICHES, C. R.; HAMILTON, K. A.; PARKER, C. Parasitism of grain legumes by alectra species (scrophulariaceae). **Annals of applied biology**, 1 out. 1992. v. 121, n. 2, p. 361–370.

RÜMER, S. *et al.* An anatomical study of the haustoria of *rhinanthus minor* attached to roots of different hosts. **Flora - morphology, distribution, functional ecology of plants**, 22 maio. 2007. v. 202, n. 3, p. 194–200.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique and microscopy**. New York, NY: Oxford University press, 1999.

SACCHETTI, G. *et al.* Morphological and histochemical investigation on glandular trichomes of *orobanche ramosa* subsp. *nana* (orobanchaceae). **Phyton**, 2003. v. 43, p. 207–214.

SALONEN, V.; PUUSTINEN, S. Success of a root hemiparasitic plant is influenced by soil quality and by defoliation of its host. **Ecology**, 1996. v. 77, n. 4, p. 1290–1293.

SCHOLES, J. D.; PRESS, Malcolm C. *Striga* infestation of cereal crops - an unsolved problem in resource limited agriculture. **Current opinion in plant biology**, abr. 2008. v. 11, n. 2, p. 180–186.

SEEL, W. E.; PARSONS, A. N.; PRESS, M. C. Do inorganic solutes limit growth of the facultative hemiparasite *rhinanthus minor* l in the absence of a host? **New phytologist**, 1 jun. 1993. v. 124, n. 2, p. 283–289.

SILVA, M. A. B. Da *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de nova xavantina-mt, brasil. **Revista brasileira de farmacognosia**, set. 2010. v. 20, n. 4, p. 549–562.

SOUZA, L. A. ~dece. **Morfologia e anatomia vegetal célula, tecidos, órgãos e plântula**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2003.

SOUZA, V. Neotropical orobanchaceae - neotropikey from kew. [S.l.], 2012. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Orobanchaceae.htm>>. Acesso em: 6 jan. 2017.

SOUZA, V. C.; GIULIETTI, A. M. Levantamento das espécies de scrophulariaceae sensu lato nativas do brasil. **Pesquisas, botânica**, 2009. v. 60, p. 7–288.

Specieslink network. [S.l.], 20 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.splink.org.br/index>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

SVENSSON, B. M.; CARLSSON, B. Å. Significance of time of attachment, host type, and neighbouring hemiparasites in determining fitness in two endangered grassland hemiparasites. **Annales botanici fennici**, 2004. v. 41, n. 1, p. 63–75.

THOMSON, W. W.; WHATLEY, J. M. Development of nongreen plastids. **Ann. rev. plant physiol.**, 1980. v. 31, p. 375–394.

Tropicos - home. [S.l.], 2017. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Home.aspx>>. Acesso em: 8 jan. 2017.

TROVATO, A. *et al.* In vitro anti-mycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids. **Bollettino chimico farmaceutico**, out. 2000. v. 139, n. 5, p. 225–227.

ULLOA, C. Aromas y sabores andinos. **Botánica económica de los andes centrales**, 2006. p. 313–328.

VISSER, J. H.; DÖRR, I.; KOLLMANN, R. The “hyaline body” of the root parasitelectra orobanchoides benth. (scrophulariaceae)—its anatomy, ultrastructure and histochemistry. **Protoplasma**, 1 fev. 1984. v. 121, n. 1–2, p. 146–156.

WEBER, Hans Christian. Evolution of the secondary haustoria to a primary haustorium in the parasitic scrophulariaceae/orobanchaceae. **Plant systematics and evolution**, 1987. v. 156, n. 3–4, p. 127–131.

WESTWOOD, J. H. *et al.* The evolution of parasitism in plants. **Trends in plant science**, abr. 2010. v. 15, n. 4, p. 227–235.

WHATLEY, J. M. A suggested cycle of plastid developmental interrelationships. **The new phytologist**, 1978. v. 80, n. 3, p. 489–502.

WOLFE, A. D. *et al.* Phylogeny and biogeography of forobanchaceae. **Folia geobotanica**, 1 jun. 2005. v. 40, n. 2–3, p. 115–134.