UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes

Dissertação

Desempenho fisiológico de sementes e metabolismo antioxidante de plântulas de alface e de trigo sob ação dos extratos aquosos de buva e de azevém

Tuane Araldi da Silva

Pelotas, 2015

Tuane Araldi da Silva
Engenheira Agrônoma

Desempenho fisiológico de sementes e metabolismo antioxidante de plântulas de alface e de trigo sob ação dos extratos aquosos de buva e de azevém

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Zanatta Aumonde
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Amaral Villela

Pelotas, 2015
Rio Grande do Sul - Brasil

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas

Catalogação na Publicação

S586d Silva, Tuane Araldi da
Desempenho fisiológico de sementes e metabolismo antioxidante de plântulas de alface e de trigo sob ação dos extratos aquosos de buva e de azevém / Tuane Araldi da Silva; Tiago Zantta Aumonde, orientador; Francisco Amaral Villela, coorientador. — Pelotas, 2015.
80 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Asteraceae. 2. Qualidade fisiológica. 3. Poaceae. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Alelopatia. I. Aumonde, Tiago Zanatta, orient. II. Villela, Francisco Amaral, coorient. III. Título.

CDD: 631.521

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Tuane Araldi da Silva

Desempenho fisiológico de sementes e metabolismo antioxidante de plântulas de alface e de trigo sob ação dos extratos aquosos de buva e de azevém

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2015.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Tiago Zanatta Aumonde (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dr. Caroline Leivas Moraes
Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dr. Emanuela Garbin Martinazzo.
Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Dr. Tiago Pedó.
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho aos meus pais Elenir e Joel, ao meu irmão Thiago e ao meu namorado Everton.

Agradecimentos

A **Deus**, pelo dom da vida e por ter me concedido o privilégio de ter tantas pessoas especiais ao meu lado, as quais me auxiliaram a realizar este desafio.

Aos meus pais **Elenir Gloria Araldi da Silva** e **Paulo Joel Duarte da Silva** pelo exemplo de vida, carinho, orações e incentivo, que me fazem continuar sempre.

Ao meu irmão **Thiago Araldi da Silva**, que apesar da distância permanece sempre ao meu lado.

Ao meu namorado **Everton Sozo de Abreu** pelo carinho e companheirismo, sempre pronto a me auxiliar e incentivar.

A **Dionéia Maldaner**, minha irmã de coração, pela amizade e apoio.

Ao meu avô **Darcy Araldi** pelo carinho e preocupação comigo. E aos meus demais avós, pessoas queridas que já não estão mais entre nós, mas que certamente contribuíram muito nesse caminho.

A toda a minha **Família,** pelo incentivo, em especial as minhas madrinhas **Ivete, Grazieli** e **Salete Araldi**, pelo carinho.

Ao orientador **Prof. Tiago Zanatta Aumonde**, pela orientação, conselhos, incentivo e empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

A **Dominique Delias** pelo seu tempo e interesse destinados a me ensinar e auxiliar durante as análises de enzimas.

A **Renata Balaguez** e aos colegas da química orgânica, por disponibilizar as dependências do Laboratório de Síntese Orgânica Limpa.

A **Samantha R. Segalin**, **Priscila M. Marchi, Patricia Migliorini, Fernanda Caratti** e **Leticia Medeiros** pela amizade e auxilio durante a realização dos experimentos.

Ao **Felipe Koch** pela amizade e pelo fornecimento das sementes de trigo.

A **Ireni L. Carvalho** pelo auxilio no Laboratório de Sementes.

Aos **colegas**, **amigos**, **professores** e **estagiários** do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes que de alguma maneira colaboraram para a elaboração dos experimentos.

A banca examinadora: Dra. **Caroline L. de Moraes**, Dra. **Emanuela G. Martinazzo** e Dr. **Tiago Pedó** pela disponibilidade e contribuição com esse trabalho.

A **CAPES** pela concessão de bolsa.

Obrigada.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire.

Resumo

SILVA, Tuane Araldi. **Desempenho fisiológico de sementes e metabolismo antioxidante de plântulas de alface e de trigo sob ação dos extratos aquosos de buva e de azevém.** 2015.80f.Dissertação (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Sementes - UFPel, nos anos de 2012 a 2014 e objetivaram avaliar o efeito de diferentes concentrações de extratos vegetais sobre aspectos fisiológicos de sementes e plântulas de alface e trigo. Nos capítulos 1 e 2 foram utilizados extratos de folhas de buva (*Conyza bonariensis*) e azevém (*Lolium multiflorum*)nas concentrações 0; 2; 4; 6 e 8% e como espécie alvo foram utilizadas sementes de alface. No capítulo 3, a espécie alvo foi trigo e o extrato aquoso utilizado foi de folhas de *Lolium multiflorum* nas concentrações 0; 2; 4; 6 e 8%. Foram avaliados a germinação, a primeira contagem de germinação, o índice de velocidade de germinação, o comprimento de parte aérea e de raiz primária, a massa seca total de plântulas, a condutividade elétrica, a atividade das enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbarto-peroxidase (APX), peroxidação lipídica, peróxido de hidrogênio, emergência de plântulas, área foliar, comprimento de parte aérea e de raiz e massa seca total das plântulas emergidas. No capítulo 1, verificou-se que as maiores concentrações do extrato aquoso de buva proporcionaram maior inibição da germinação e do crescimento inicial de plântulas de alface. Houve aumento da condutividade elétrica em sementes de alface, níveis de peróxido de hidrogênio, da peroxidação lipídica e atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase, ascorbato-peroxidase. No capítulo 2 verificou-se que o extrato aquoso de folhas de azevém afetou negativamente a primeira contagem de germinação, o índice de velocidade de germinação e o crescimento de plântulas de alface. O aumento da concentração do extrato proporcionou a elevação na atividade das enzimas antioxidantes, sendo resultados mais pronunciados, observados nas concentrações de 6 e 8%. No capítulo 3, o índice de velocidade de germinação de sementes de trigo foi reduzido de forma marcante na concentração 8% do extrato de azevém. As concentrações mais altas do extrato resultaram nos maiores teores de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e atividades das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato-peroxidase.

Palavras chave: Asteraceae; poaceae; alelopatia; qualidade fisiológica; enzimas antioxidantes.

Abstract

SILVA, Tuane Araldi. **Physiological performance of seeds and antioxidant metabolism of lettuce seedlings and wheat under the action of aqueous extracts of horseweed and ryegrass.** 2015.80f. Dissertation (Master of Science)- Program in Science and Technology of Seeds, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

The works was carried out at the Seed Laboratory of Physiology - UFPel in the years 2012 to 2014 and aimed to evaluate the effect of different concentrations of plant extracts on physiological aspects of seeds and lettuce and wheat seedlings. In chapters 1 and 2 leaf extracts were used horseweed (*Conyza bonariensis*) and ryegrass (*Lolium multiflorum*) at concentrations of 0; 2; 4; 6 to 8% as the target species and lettuce seeds were used. In Chapter 3, the target species was wheat and the aqueous extract was of *Lolium multiflorum* leaves at concentrations of 0; 2; 4; 6 to 8%. We evaluated the germination, the first count, the germination rate index, shoot length and primary root, total seedling dry weight, electrical conductivity, the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbarto-peroxidase (APX), lipid peroxidation, hydrogen peroxide, seedling emergence, leaf area, shoot and root length and total dry mass of emerged seedlings. In Chapter 1, it was found that higher concentrations of the aqueous extract showed higher horseweed inhibition of germination and initial growth of lettuce seedlings. There was an increase of the electrical conductivity lettuce seeds, hydrogen peroxide levels, lipid peroxidation and activity of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase. In Chapter 2 it was found that the aqueous extract of ryegrass leaves negatively affected the first count, the germination speed index and the growth of lettuce seedlings. The increase of the extract concentration resulted in higher in antioxidant enzyme activity, being more pronounced results observed at concentrations of 6 to 8%. In Chapter 3, the wheat seed germination speed was reduced markedly in concentration 8% of ryegrass extract. Higher concentrations of the extract produced the highest yields of hydrogen peroxide, lipid peroxidation and activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase.

Keywords: Asteraceae; poaceae; allelopathy; physiological quality; antioxidant enzymes.

Sumário

Resumo vii
Abstract ix

1 Introdução 11

2 Capitulo I- Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface expostas à ação do extrato de *Conyza bonariensis* (L) Cronquist 11

2.1 INTRODUÇÃO 18

2.2 MATERIAL E MÉTODOS 19

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 24

2.4 CONCLUSÃO 29

3 Capítulo II- Ação do extrato de *Lolium multiflorum* L. em atributos fisiológicos de sementes e plântulas de alface 31

3.1 INTRODUÇÃO 32

3.2 MATERIAL E MÉTODOS 33

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 33

3.4 CONCLUSÃO 43

4 Capítulo III- Extrato aquoso de azevém: efeito no desempenho fisiológico de sementes e no metabolismo antioxidativo de plântulas de trigo 43

4.1 INTRODUÇÃO 44

4.2 MATERIAL E MÉTODOS 45

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50

4.4 CONCLUSÃO 59

5 Considerações finais 60

6 Referências bibliográficas 61

1. Introdução Geral

O termo alelopatia, derivado do grego *allelon* “de um para outro’’ e *pathós* que significa “sofrer”, foi mencionado pela primeira vez pelo cientista alemão Hans Molisch no ano de 1937 (RICE, 1984). Observações sobre alelopatia foram efetuadas há 2.000 anos, sendo que ocorrências já tinham sido registradas na década de 1920 (RICE, 1984; PUTNAM & TANG, 1986). Contudo, somente em 1984, o Inglês Elroy L. Rice chamou a atenção para o fenômeno, definindo a alelopatia como, o efeito de uma planta ou de microrganismos sobre outra planta, sendo os efeitos, resultado da liberação de compostos químicos inibitórios ou estimulantes para o ambiente.

Os compostos envolvidos na interferência alelopática são denominados compostos alelopáticos, aleloquímicos ou ainda fitotoxinas. Esse processo pode ocorrer de forma intraespecífica por autotoxidade, na qual, a planta sintetiza compostos químicos que irão prejudicar ou promover a germinação e/ou o desenvolvimento da própria espécie. Além disso, pode ocorrer de forma interespecífica por heterotoxidade, quando a relação ocorre entre indivíduos de espécies diferentes (ZENG et al., 2010). Considerando a autotoxidade e a heterotoxidade, a planta que libera compostos alelopáticos é definida como produtora ou planta doadora, e àquela afetada é chamada de planta alvo (CHON, 2006; FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

A maioria das substâncias com efeitos alelopáticos se constitui de metabólitos secundários, que por sua vez, são originados das rotas do acetato e/ou chiquimato (REIGOSA et al., 2005). A produção de compostos secundários, em determinadas situações representa forma de defesa a determinada condição de meio ambiente, sendo os mecanismos de proteção envolvidos, adquiridos durante o processo de evolução e sob a influência direta ou indireta de outras plantas (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Os metabólitos secundários são de grande importância na autodefesa vegetal, sendo que, diversas substâncias apontadas como alelopáticas são também relacionadas às funções de proteção ao ataque de pragas (MACÍAS et al., 2007;

CIPOLLINI et al., 2012). Estas substâncias podem atuar como uma maneira de comunicação entre diferentes processos relacionados ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas, permitindo diferenciar organismos que lhes são prejudiciais, benéficos ou indiferentes (DURIGAN & ALMEIDA, 1993).

Os metabólitos secundários são divididos em terpenos, componentes contendo nitrogênio e compostos fenólicos (VIZZOTTO et al., 2010). Atualmente são conhecidos aproximadamente 35.000 compostos do grupo dos terpenos (PAVARINI et al., 2012), que apresentam toxidez a insetos, herbívoros e a mamíferos (JÚNIOR, 2003; VEITCH et al., 2008), aproximadamente 15.000 compostos contendo nitrogênio (DEVIKA & KOILPILLAI, 2012), e 10.000 compostos fenólicos, entre estes, muitos relacionados à defesa contra patógenos (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Entre as principais fontes de aleloquímicos destacam-se restos vegetais em decomposição. Durante este processo ocorre a perda da integridade da membrana celular e a liberação de compostos que resultam em toxicidade aos organismos que estejam próximos (REIGOSA et al., 2005; MARASCHIN-SILVA & ÁQUILA, 2006). Fatores ambientais como temperatura e condições hídricas, influenciam na liberação de tais compostos (GATTI, 2004).

A síntese dos aleloquímicos pode ocorrer em diferentes órgãos do vegetal, como folhas, caules, raízes, flores, frutos, colmos, cascas, sementes e grãos de pólen (SOUZA FILHO et al., 2011). A concentração e a qualidade destes compostos podem ser modificadas, conforme o local de síntese, o estádio de desenvolvimento, a sazonalidade, a condição edafoclimática de cultivo, a idade da planta, com a espécie ou dentro da própria espécie (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; GOBBO-NETTO & LOPES, 2007; FURLAN et al., 2014).

A influência de fatores como a radiação ultravioleta e ataque de pragas, causam alterações na produção dos aleloquímicos (EINHELLIG, 1996). A ação do aleloquímico é pouco característica, sendo que cada substância pode apresentar diferentes funções, segundo sua concentração, translocação, detoxificação e composição química (ALMEIDA, 1988). É de conhecimento que os aleloquímicos podem ser liberados para o ambiente por lixiviação das superfícies do vegetal pela chuva, orvalho e neblina; por volatilização através das partes aéreas da planta, ou ainda, por exsudação através das raízes (GLIESSMAN, 2000; CIPOLLINI et al., 2012).

Modificações ou até mesmo inibições nos padrões de crescimento ou de desenvolvimento de organismos podem ocorrer pela ação dos aleloquímicos (SEIGLER, 1996). Compostos químicos sintetizados pela planta doadora podem afetar a germinação de sementes e o crescimento de plântulas da espécie receptora (WANDSCHEER & PASTORINI, 2008). Isto porque, podem interferir em estruturas citológicas e ultraestruturais (FERREIRA & ÁQUILA, 2000), na concentração e balanço hormonal e na estrutura e permeabilidade da membrana plasmática e na absorção e assimilação de nutrientes (SINGH et al., 2009); no movimento dos estômatos; na síntese de pigmentos e fotossíntese e no metabolismo de lipídios. Além destes, na respiração e na síntese de proteínas (TEERARAK et al., 2010); na atividade enzimática, nas relações hídricas e na indução de alterações em nível de DNA e RNA (SANTOS et al., 2010).

Extratos vegetais podem exercer ação alelopática, inibindo ou reduzindo a germinação, a velocidade de germinação e o crescimento inicial, como resposta de efeitos primários que ocorrem no processo metabólico das plantas (FERREIRA & BORGHETTI, 2004; PEDROL et al., 2006; BLANCO, 2007). O potencial alelopático tem sido avaliado através da aplicação de extratos bruto, aquoso, alcoólico, hidroalcoólico, etanólico e também através de óleos essenciais, derivados tanto de plantas cultivadas quanto de medicinais. Para a avaliação da resposta ao composto, tem sido utilizada sementes e plântulas de outras espécies e/ou da própria espécie (HOFFMANN et al., 2007).

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários deve ser testada em plantas indicadoras de atividade alelopática, as quais, devem apresentar germinação rápida e uniforme, além de elevada sensibilidade ao composto químico sob baixas concentrações (CARVALHO et al., 2014). As espécies comumente utilizadas como indicadoras são a alface (*Lactuca sativa*), o tomate (*Lycopersicon esculentum*) e o pepino (*Cucumis sativus*) (CIPRIANI et al., 2014).

Para a elaboração dos extratos utilizados em experimentos alelopáticos, se deve priorizar a utilização da água como solvente, à semelhança do que ocorre na natureza (INDERJIT & DAKSHINI, 1995). Nestes ensaios, devem ser determinados o pH e o potencial osmótico dos extratos. Isto porque, valores extremos desses dois parâmetros físico-químicos, podem afetar negativamente a germinação e o crescimento inicial de plântulas, potencializando o efeito tóxico do extrato (FERREIRA & AQUILA, 2000; ASTARITA et al.,1996).

Diversos trabalhos têm demonstrado o potencial alelopático proporcionado por compostos tóxicos presentes em extratos vegetais. A condição de toxicidez causada pelo extrato resulta na ocorrência de plântulas anormais e em necrose da raiz primária (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). Extratos de cascas e folhas maduras de *Blepharocalyx salicifolius* apresentam efeitos fitotóxicos sobre o crescimento inicial de *Echinochloa crusgalli* e *Euphorbia heterophylla* (HABERMANN, et al., 2015) O. extrato aquoso de folhas de *Araucária angustifolia* inibe a germinação, a velocidade de germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* (SILVEIRA et al., 2014).

Extratos de folhas de *Onopordum acanthium* inibem o crescimento de coleóptilos de trigo (WATANABE et al., 2014). O extrato de *Convolvulus arvensis* apresenta efeito altamente tóxico à germinação de sementes de *Cicer arietinum* (KHAN & KHAN, 2015). O extrato vegetal do *Hibiscus cannabinus* reduz a germinação das sementes de *Amaranthus retroflexus*, *Solanum lycopersicum*, *Cucumis sativus* e *Lolium multiflorum* (WEBBER et al., 2015). Em estudo realizado com extrato de *Thuja orientalis* é observada redução drástica da germinação, do vigor e do crescimento das plântulas de *Sinapis arvensis*, *Phalaris paradoxa* e *Lolium rigidum* (ISMAIL et al., 2015).

As folhas de *Sauveolens hyptis*, *Ricinus communis*, *Alternanthera sessilis* e *Malachra capitata*quando utilizadas para a elaboração de extratos aquosos na concentração de 5% reduzem a porcentagem de germinação, a massa das plântulas de sementes germinadas, o comprimento radicular e o índice de velocidade de germinação de sementes de *Vigna radiata* (JOSHI et al., 2015). O extrato aquoso de folhas de *Parthenium hysterophorus* reduz drasticamente a germinação de sementes de *Cyamopsis tetragonoloba* e promove a redução no comprimento da raiz (KUMAR et al., 2015). Efeitos alelopáticos inibitórios de extratos aquosos da inflorescência de *Parthenium hysterophorus* foram observados sobre a germinação e crescimento da parte aérea e de raízes de plântulas de *Zea mays* e *Sorghum bicolor* (NETSERE, 2015).

Extratos a base de acícula verde de *Pinus elliottii* reduz germinação, velocidade média de germinação e comprimento da parte aérea e raízes das plântulas de *Lactuca sativa*, *Bidens pilosa* e *Zea mays*, o efeito redutor aumenta conforme aumenta a concentração (SARTOR et al., 2015). Extrato aquoso e alcoólico de *Palicourea rígida* em concentrações de 10% e 20% reduzem a velocidade de germinação e o comprimento de parte aérea e de raízes de plântulas

de alface (OLIVEIRA et al., 2014). Extratos foliares da árvore *Pittosporum* undulatum, apresenta efeito inibitório na germinação de *Echinochloa crusgalli* (CARPANEZZI & GUALTIERI, 2014). Extratos aquosos de feijão-de-porco e feijão-de-porco + aveia preta, na concentração de 5%, proporcionam redução na qualidade fisiológica de sementes de *Lactuca sativa* (CARVALHO et al., 2014).

Entre as plantas da família Asteraceae, muitas são consideradas medicinais, pela presença de lactonas sesquiterpênicas, monoterpenos, alcalóides, compostos fenólicos e poliacetilênicos (SIMÕES, 2004). As lactonas sesquiterpênicas são um grupo de metabólitos secundários de plantas, que ocorrem em larga escala, sendo que mais de 4.000 lactonas sesquiterpênicas foram identificadas na família Asteraceae (MAGIERO et al., 2009). Em trabalho realizado com extrato aquoso de plantas de *Conyza canadenses*, observaram a redução da germinação de sementes de *Sorghum bicolor*, *Cucumis sativus*, *Brassica napus,* e *Brassica nigri* (GAO et al., 2009). Wang et al. (2010), verificaram que o extrato aquoso de *Conyza sumatrensis* apresenta efeito inibitório sobre a germinação de sementes, sendo que quanto maior a concentração do extrato menor a germinação.

A espécie *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, pertence à Família Asteraceae e pode apresentar efeito alelopático sobre outras espécies. É conhecida popularmente como buva e originária da América do Sul, ocorrendo no Uruguai, Argentina, Paraguai e nas regiões brasileiras do sul, sudeste e centro-oeste (LORENZI & MATOS, 2000). Essa planta é utilizada como medicinal para tratamentos de diferentes enfermidades e também como antisséptico (ASONGALEM et al., 2004). Em lavouras comerciais de cultivos agrícolas, a buva é considerada planta daninha de difícil controle, devido à sua resistência frente a ação de alguns herbicidas (PYON et al., 2004).

Algumas plantas da família Poaceae também apresentam ação inibitória sobre outras. A espécie *Lolium multiflorum* Lamark é originária da região mediterrânea (MONTEIRO et al., 1996) e conhecida popularmente como azevém, sendo bastante utilizada no estado do Rio Grande do Sul como pastagem de inverno (PUPO, 2002). Entretanto, na região Sul do Brasil, também é espécie considerada planta daninha nas culturas do *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Glycine max*e em pomares de *Malus domesticas* (ROMAN et al., 2004; VARGAS et al., 2004). Em pesquisa realizada por Naqvi (1972), verificou-se o efeito alelopático do azevém no crescimento de plantas de *Avena sativa*, *Bromus unioloides* e *Trifolium repens*,

sendo suas conclusões embasadas em atributos germinativos e de crescimento inicial de plântulas. Extratos de raiz de *Lolium multiflorum* inibiram a germinação e o crescimento de plântulas de *Galium aparine*, sendo que quanto maior a concentração do extrato maior a inibição causada nesses parâmetros (DONG et al., 2013).

A grande maioria das pesquisas tem abrangido a qualificação e quantificação de aleloquímicos, ou ainda, a avaliação dos impactos destes compostos sobre a germinação de sementes ou sob algum aspecto que diz respeito ao crescimento das plântulas ou plantas (ZENG et al., 2010). No entanto, os processos que ocorrem a nível celular, motivados pelos impactos da alteração do desenvolvimento vegetal (RICE, 1984), são pouco considerados. Torna-se importante a observação da ação desses compostos sobre as principais funções e respostas fisiológicas do genótipo nas diferentes fases do desenvolvimento (AUMONDE et al., 2012). Pesquisas com tal foco permitem avaliar de forma mais contundente, o efeito dos aleloquímicos sobre o desempenho vegetal.

Durante o desenvolvimento do vegetal, em resposta aos estresses biótico ou abiótico ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (JALEEL et al., 2007). Espécies reativas de oxigênio podem ter origem no metabolismo aeróbico e fotossintético e se constituem em componentes de vias de sinalização. Contudo, ao se acumularem nos tecidos vegetais refletem na peroxidação de lipídios, degradação de membranas celulares e morte celular (PACHECO et al., 2007). As principais espécies reativas de oxigênio são o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BAILEY-SERRES & PEREIRA, 2010).

O sistema antioxidante enzimático é importante na defesa da planta contra fatores bióticos ou abióticos. As plantas possuem mecanismos de defesa para a detoxificação de espécies reativas de oxigênio, os quais envolvem a ação das enzimas onde superóxido-dismutase (SOD), ascorbato-peroxidase (APX) e catalase (CAT) (APEL & HIRT, 2004). As enzimas do metabolismo antioxidante como a superóxido-dismutase, a peroxidase e a catalase, são responsáveis pela remoção de radicais livres formados em tecidos vegetais sob condições de estresse (MUNIZ et al., 2007; GILL & TUTEJA, 2010). Autores têm descrito que a ação de determinados aleloquímicos aumenta a atividade destas enzimas (SAMAJ et al., 2004; CRUZ-ORTEGA et al., 2007). Segundo Cruz-Ortega et al. (2002), o lixiviado

aquoso de *Callicarpa acuminata* inibe o crescimento radicular de *Lycopersicum esculentum* e aumenta a atividade da enzima catalase em raízes de tomateiro e de feijão.

Em trabalho realizado por Abenavoli et al. (2003), visando avaliar o efeito do aleloquímico cumarina em *Daucus carota*, os autores observaram que a presença de tal aleloquímico estimula a produção de glutamina sintetase, glutamato desidrogenase e a atividade da fosfoenolpiruvato-carboxilase; por outro lado, a malato-desidrogenase é inibida. Alguns exsudatos e o extrato fenólico de raiz de pepino mostraram efeito autotóxico sobre as raízes da mesma espécie; reduziram a permeabilidade dos estômatos, a transpiração foliar e fotossíntese, a atividade das enzimas peroxidase e superóxido-dismutase em raízes (YU et al., 2003).

A cumarina aplicada em *Triticum turgidum* tem efeito inibitório na germinação de sementes conforme a concentração do aleloquímico, retardando a reativação de peroxidases e aumentando a atividade da enzima superóxido-dismutase (ABENAVOLI et al., 2006). Prasad & Subhashini (1994), verificaram que o aleloquímico mimosina, presente em folhas e raízes de arroz, reprime a expressão de isoformas da peroxidase. Singh et al. (2002) relatam que lactonas sesquiterpênicas inibem a germinação de sementes de *Zea mays*.

O atributo fisiológico de sementes mais utilizado para a avaliação do efeito alelopático de um extrato vegetal é a germinação. Este atributo da qualidade da semente pode ser definido como a soma de processos físicos e fisiológicos que iniciam com a hidratação da semente e terminam com a protrusão da radícula (PESKE et al. 2012). Neste processo de retomada do crescimento, ocorre a ativação das enzimas alfa-amilase e beta-amilase, inicia a respiração e a hidrólise das reservas, visando o fornecimento de energia e esqueletos carbônicos para o embrião (FERREIRA & BORGHETTI, 2004; MARCOS FILHO, 2005).

Além da germinação, compostos químicos presentes em extratos vegetais podem afetar o vigor da semente. O vigor engloba a quantidade de energia que uma semente apresenta para realizar as funções do processo germinativo (PESKE et al., 2012) e normalmente permite avaliar de forma indireta as primeiras alterações nos processos bioquímicos associados à deterioração (CARVALHO, 2002).

O vigor pode ser avaliado pelo teste de condutividade elétrica, o qual possui relação com a integridade do sistema de membranas celulares, ou ainda, pela emergência de plântulas em substrato (MARCOS FILHO et al.,1987). Em sementes

deterioradas e/ou expostas a algum tipo de estresse, há perda na integridade dos sistemas de membranas, reduzindo a seletividade (PESKE et al., 2012). Em complementação, a avaliação do crescimento de plântulas é importante na determinação do potencial alelopático do extrato.

Neste contexto, estudos alelopáticos envolvendo as espécies *C. bonariensis* e *L. multiflorum* são passíveis de maiores pesquisas, por ocorrerem no Estado do Rio Grande do Sul e apresentarem possível influência no desempenho fisiológico de sementes e de plântulas de outras espécies cultivadas, constituindo-se assim, em problema para o setor agrícola. Nestas espécies, estudos envolvendo a associação entre avaliações rotineiras da qualidade da sementes e alterações fisiológicas em nível celular como a síntese e a degradação de compostos tóxicos, assumem importância, por possibilitarem a melhor compreensão do efeito do extrato sobre a semente e suas respectivas plântulas.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito alelopático dos extratos de buva (*Conyza bonariensis*) e de azevém (*Lolium multiflorum*) sobre sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e de trigo (*Triticum aestivum* L.).

2. Capitulo I

Respostas fisiológicas de sementes e plântulas de alface expostas à ação do extrato de *Conyza bonariensis* (L) Cronquist

2.1 Introdução

A espécie *Conyza bonariensis* (L) Cronquist pertencente à família Asteraceae, é uma planta autógama originária da América do Sul (KISSMAN & GROTH, 1999), popularmente conhecida como buva. Possui ciclo anual e caracteriza-se por ser muito prolífera, podendo produzir mais de 200 mil sementes viáveis em uma única planta (BHOWMIK & BEKECH, 1993); forma infestação densa e possui boa adaptabilidade ao sistema de semeadura direta ou de cultivo mínimo (LAMEGO et al., 2013), apresentando resistência ao herbicida glyphosate (PAULA et al., 2011).

Os aleloquímicos presentes em extratos de origem vegetal podem inibir ou estimular a germinação e o crescimento inicial de outras espécies (MACÍAS et al., 2007), ao danificarem ou inativarem vias do sistema metabólico. Estes compostos fitotóxicos podem alterar a fluidez da bicamada fosfolipídica do sistema de membranas celulares, ocasionar alterações em nível hormonal e fotossintético ou ainda acarretar acúmulo de espécies reativas de oxigênio (CHOU, 2006; PANDA & KHAN, 2009).

Em condições de estresse as plantas tendem a desenvolver respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, por meio de vários metabólitos secundários (OMEZZINE et al., 2014a). Alterações em nível metabólico que estão relacionadas à modificação da atividade enzimática antioxidante como da catalase, superóxido-dismutase e ascorbato-peroxidase, em plantas sob ação do aleloquímico, constituem tentativa de sobrevivência à nova condição de meio ambiente e estão relacionadas ao mecanismo de autodefesa vegetal (FORMAN et al., 2010; OMEZZINE et al., 2014a).

Estudos têm demonstrado o potencial alelopático de plantas daninhas e fornecido evidências convincentes de que a alelopatia é um importante componente do seu sucesso competitivo (CIPOLLINI et al., 2008; INDERJIT et al., 2008;

THORPE et al., 2009; CHAPLA & CAMPOS, 2010; PISULA & MEINERS, 2010). Contudo, embora a espécie *C. bonariensis* represente problema para a produtividade agrícola, as alterações fisiológicas ocasionadas por possíveis efeitos alelopáticos desta espécie ainda são pouco conhecidas.

Este trabalho objetivou avaliar a influência de concentrações do extrato de *C. bonariensis* sobre o desempenho fisiológico de sementes e no metabolismo antioxidativo de plântulas de alface.

2.2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, campus Capão do Leão, RS, Brasil.

O material vegetal empregado para a elaboração do extrato aquoso foram folhas de buva. A coleta das folhas foi realizada na segunda quinzena do mês de agosto, no ano de 2013, na região do planalto médio do Estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Santa Bárbara do Sul, sob coordenadas geográficas de latitude 28º22´09”S, longitude 53º14´46”W e altitude 511m. O clima regional é subtropical úmido, tipo Cfa, com precipitação total anual de 1.727mm, sendo janeiro o mês mais quente, com máxima normal de 30ºC, e julho o mês mais frio, com mínima normal de 8,6ºC. O solo é classificado como latossolo vermelho distrófico típico de textura média (BERG & KLAMT, 1997).

As plantas estavam em estádio de desenvolvimento vegetativo de 12 a 14 folhas, no momento de coleta, a qual foi realizada no período da manhã, entre nove e dez horas. Foram utilizadas folhas provenientes do terço médio das plantas, procedeu-se uma pré-secagem à sombra, durante oito horas. Depois disso, as folhas foram acondicionadas em papel Kraft e transportadas para o laboratório de Fisiologia de Sementes, onde as foram previamente lavadas em água destilada, secas em papel toalha e desidratadas à temperatura de 40ºC, até massa constante. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey, com peneira de malha 0,8mm, acondicionadas em sacos de papel Kraft, e mantidos em ambiente frio e seco (15ºC e 40% de UR).

Os tratamentos foram as concentrações de 0; 2; 4; 6 e 8% do extrato, sendo para tal, utilizados 0; 20; 40; 60 e 80 gramas de folhas trituradas de buva, respectivamente, em uma relação *m/v* entre material vegetal e água deionizada.

Ao material seco e triturado, foi adicionado 1 litro de água deionizada à temperatura 100ºC e mantido sob agitação constante por 30 minutos. Posteriormente, submetido a filtração a vácuo e o filtrado armazenado em frascos âmbar, sob refrigeração (10ºC).

Os extratos das diferentes concentrações tiveram o pH e o potencial osmótico determinados. O pH atingiu os valores de 7,02 e 7,8, enquanto que, o potencial osmótico de $-0{,}4.10^{-4}$ (concentração 0%) e $-1{,}93.10^{-4}$ MPa (concentração 8%). O pH foi determinado por pHmetro digital de bancada da marca Digimed®, modelo DM-22 e o potencial osmótico foi calculado segundo efetuado por Khaliqet et al. (2013).

Os efeitos das concentrações do extrato sobre o desempenho fisiológico de sementes de alface e o metabolismo antioxidativo de plântulas foram determinados a partir das seguintes avaliações, sobre sementes de alface:

Teste de germinação (%): conduzido por meio de quatro amostras com quatro subamostras de 50 sementes, semeadas em caixas tipo *gerbox*, sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecidas na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, com as diferentes concentrações do extrato. Posteriormente, as caixas foram transferidas para câmara de germinação tipo BOD a 20ºC e período luminoso de 12 horas. As avaliações foram efetuadas aos sete dias após a semeadura e os resultados foram resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Primeira contagem da germinação (%): realizada aos quatro dias após a semeadura, conjuntamente ao teste de germinação. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Índice de velocidade de germinação (IVG): obtido a partir de contagens diárias das sementes germinadas, com protrusão radicular mínima de 3 a 4mm. As contagens foram realizadas até a estabilização da germinação e o cálculo do índice de velocidade de germinação determinado conforme equação de Maguire (1962).

Condutividade elétrica: conduzida de acordo com metodologia proposta por Krzyzanowski et al. (1991), em quatro subamostras de 50 sementes. A massa das sementes foi previamente aferida, sendo as mesmas, submetidas posteriormente à embebição nas diferentes concentrações do extrato, pelo período de uma hora.

Após o período de embebição, as sementes foram lavadas com água destilada e transferidas para recipientes contendo 80mL de água deionizada, sendo mantidas em BOD, a temperatura constante de 20°C. A condutividade elétrica foi determinada após 3; 6 e 24 horas de embebição em água deionizada e os resultados foram expressos em μS cm^{-1} g^{-1} de semente.

Emergência de plântulas em casa de vegetação: o teste foi conduzido em quatro subamostras de 50 sementes. A semeadura foi efetuada em bandejas de poliestireno expandido de duzentas células, contendo como substrato areia lavada de granulometria média. Para isso, as sementes foram previamente colocadas entre três folhas de papel germitest umedecido com água destilada na proporção a 2,5 vezes a massa do papel seco, pelo período de cinco minutos, objetivando evitar danos por embebição. Em seguida, as sementes foram embebidas nas diferentes concentrações do extrato por uma hora e semeadas. Vinte e um dias após a semeadura foi realizada a contagem final do número de plântulas emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Comprimento de parte aérea e de raiz primária de plântulas: foram utilizadas quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência de plântulas em casa de vegetação. O comprimento de parte aérea foi obtido pela distância entre a inserção da porção basal da raiz primária ao ápice da parte aérea. O comprimento da raiz primária foi determinado pela distância entre sua parte apical e basal. Os resultados foram expressos em centímetros por plântula.

Massa seca total de plântulas: obtida a partir da massa de quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência em casa de vegetação. As plântulas foram acondicionadas em envelopes de papel pardo e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada a temperatura de 70°C, até massa constante. Os resultados foram expressos em gramas por plântula.

Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica: foram determinados a partir de amostras da massa fresca total provenientes do tecido vegetal, coletado de plântulas ao final do teste de germinação.

Aproximadamente 0,2g de amostra de tecido fresco foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% e o homogenato foi centrifugado a 13.000g, durante 20 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante utilizado para determinar o conteúdo de H_2O_2 e malondialdeído (MDA). Em tubos de ensaio, contendo 0,7mL de tampão fosfato de potássio 10mM

(pH 7,0) e 1mL de iodeto de potássio 1M, foram adicionados 0,3mL do sobrenadante, sendo incubados por 10 minutos a 30°C. Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados de acordo com Velikova et al. (2000) e a concentração de H_2O_2 expressa em µmol de H_2O_2 g^{-1} de massa fresca.

A peroxidação lipídica foi obtida via acúmulo de malondialdeído (MDA) e determinada por metodologia descrita por Cakmak & Horst (1991). Em tubos de ensaio contendo 0,3mL do sobrenadante foram adicionados 1,7mL do meio de reação de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 10% (p/v). E, em seguida o mesmo foi incubado a 90ºC, por 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e após, centrifugada a 10.000g durante cinco minutos, a 4°C. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 535 e 600nm e a quantidade de complexos MDA-TBA (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar (ε = 155 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}). Os resultados foram expressos em µmol g^{-1} MF.

Atividade das enzimas antioxidantes: avaliada em tecido vegetal fresco, proveniente de plântulas obtidas ao final do teste de germinação. Aproximadamente 0,2g de tecido vegetal foram maceradas em gral com pistilo e nitrogênio líquido, contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 20% e homogeneizados em 1,8mL de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8) contendo EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 20mM. O extrato foi centrifugado a 13.000g pelo período de 20 minutos à temperatura de 4ºC e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática.

Superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1): a atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a 560nm, em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), metionina 14mM, EDTA 0,1µM, NBT 75µM e riboflavina 2µM (GIANNOPOLITIS & RIES, 1997). Os resultados foram expressos em U g^{-1} MF.

Catalase (CAT - EC 1.11.1.6): determinada pela decomposição do H_2O_2 conforme proposto por Azevedo et al. (1998). A atividade da CAT foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240nm (ε = 39,4 × 10^3 M^{-1} cm^{-1}), durante dois minutos em meio de reação de 4mL que foi incubado a 30ºC, contendo extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5mM. Os resultados foram expressos em µmol H_2O_2 g^{-1} MF min^{-1}.

Ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11): determinada conforme metodologia de Nakano & Asada (1981) pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato (ASA) pelo tempo de 2 minutos a 290nm ($\varepsilon = 2{,}80 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$). O meio de reação foi incubado a 30ºC e composto por tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) ácido ascórbico 0,5mM, H_2O_2 0,1mM e extrato enzimático. Os resultados foram expressos em µmol Asc g^{-1} MF min^{-1}.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e, havendo significância a 5%, os dados foram ajustados por polinômios ortogonais.

2.3 Resultados e Discussão

A germinação e a primeira contagem de germinação apresentaram tendência ao decréscimo com o aumento da concentração do extrato de *Conyza bonariensis* (Figura 1a). O ponto de mínima resposta ocorreu na concentração 8% tanto para a primeira contagem de germinação, quanto para a germinação. Houve, na concentração de 8% em relação à concentração zero, redução de 89,7% na germinação de sementes e de 93,8% na primeira contagem de germinação.

A redução da germinação é indicativo do efeito tóxico do extrato sobre a retomada do crescimento do embrião, fato que pode estar relacionado a ação do composto sobre vias de hidrólise de reservas (MUNIZ et al., 2007). Os menores valores de germinação obtidos na primeira contagem estão relacionados à redução do vigor de sementes (KRZYZANOWSKY et al., 1999). Além disso, a redução da germinação, com o aumento da concentração do extrato verificada, está relacionada ao provável incremento na quantidade de aleloquímicos presentes nas maiores concentrações.

O extrato de parte aérea de *Trigonella foenum-graecum*, segundo Omezzine et al. (2014b), reduz em até 50% a germinação de sementes de alface ao elevar a concentração do extrato. Souza et al. (2005), ao avaliarem extratos aquosos de *Mikania glomerata*, Borella & Pastorini (2010) ao avaliar o efeito alelopático de *Phytolacca dioica* e Nery et al. (2013) ao analisarem a ação do extrato de *Raphanus sativus*, verificaram redução dos valores de primeira contagem da germinação de sementes de alface.

O índice de velocidade de germinação apresentou decréscimo ao aumentar a concentração do extrato de *C. bonariensis* (Figura 1b). O ponto de mínima resposta ocorreu na concentração de 8%. A redução do índice de velocidade de germinação com o incremento da concentração do extrato, demonstrou redução do número de sementes germinadas por dia. Houve diminuição de 16%; 59%; 78,6% e 85%, nas concentrações de 2; 4; 6 e 8%, respectivamente, quando comparada a concentração zero.

Este comportamento se deve a maior quantidade de compostos tóxicos nas concentrações mais elevadas do extrato, estando o efeito, diretamente relacionado à espécie do qual é extraído (WU et al., 2009). De acordo com Carvalho et al. (2014), extratos de *Canavalia ensiformis* e de *Sorgum bicolor*reduzem o índice de velocidade de germinação de sementes de alface na concentração de 10%. Hoffmann et al. (2007) relatam que o aumento da concentração do extrato aquoso de *Nerium oleander* e *Dieffenbachia amoena*, promove a redução do índice de velocidade de germinação de sementes de *Bidens pilosa.*

O crescimento de plântulas de alface foi influenciado negativamente pelo extrato utilizado (Figura 1c; 1d). Os pontos de mínima resposta foram observados na concentração de 7,7% para o comprimento de parte aérea e, na concentração de 6,4% para o comprimento de raiz primária. Ocorreu redução no comprimento de parte aérea e de raiz primária ao incrementar a concentração do extrato, sendo que plântulas sob ação da concentração 8% apresentaram redução de 89,5% em parte aérea e de 70,6% em raízes primárias, quando comparado a concentração 0%. Tais resultados corroboram com Peres et al. (2009), que observaram redução no crescimento de raiz de plântulas de alface sob ação do extrato de *Microgramma vacciniifolia*. De acordo Hu & Zhang (2013) a utilização do extrato aquoso de parte aérea de *Conyza canadenses* inibe o crescimento da parte aérea de *Plantago asiatica*, *Digitaria sanguinalis* e*Youngia japonica*.

A massa seca total de plântulas foi reduzida drasticamente ao elevar a concentração do extrato, a partir de 2% (Figura 1d). O ponto de mínima resposta para a massa seca total foi observado na concentração 5,5%. Em relação à concentração zero, houve redução de 86% na alocação de matéria seca de plântulas submetidas à concentração 2%. A redução do acúmulo de matéria seca pode estar relacionada à baixa translocação de assimilados das estruturas de

reserva da semente para a plântula exposta ao aleloquímico, sendo este, efeito da alteração na atividade das enzimas hidrolíticas (MUNIZ et al., 2007).

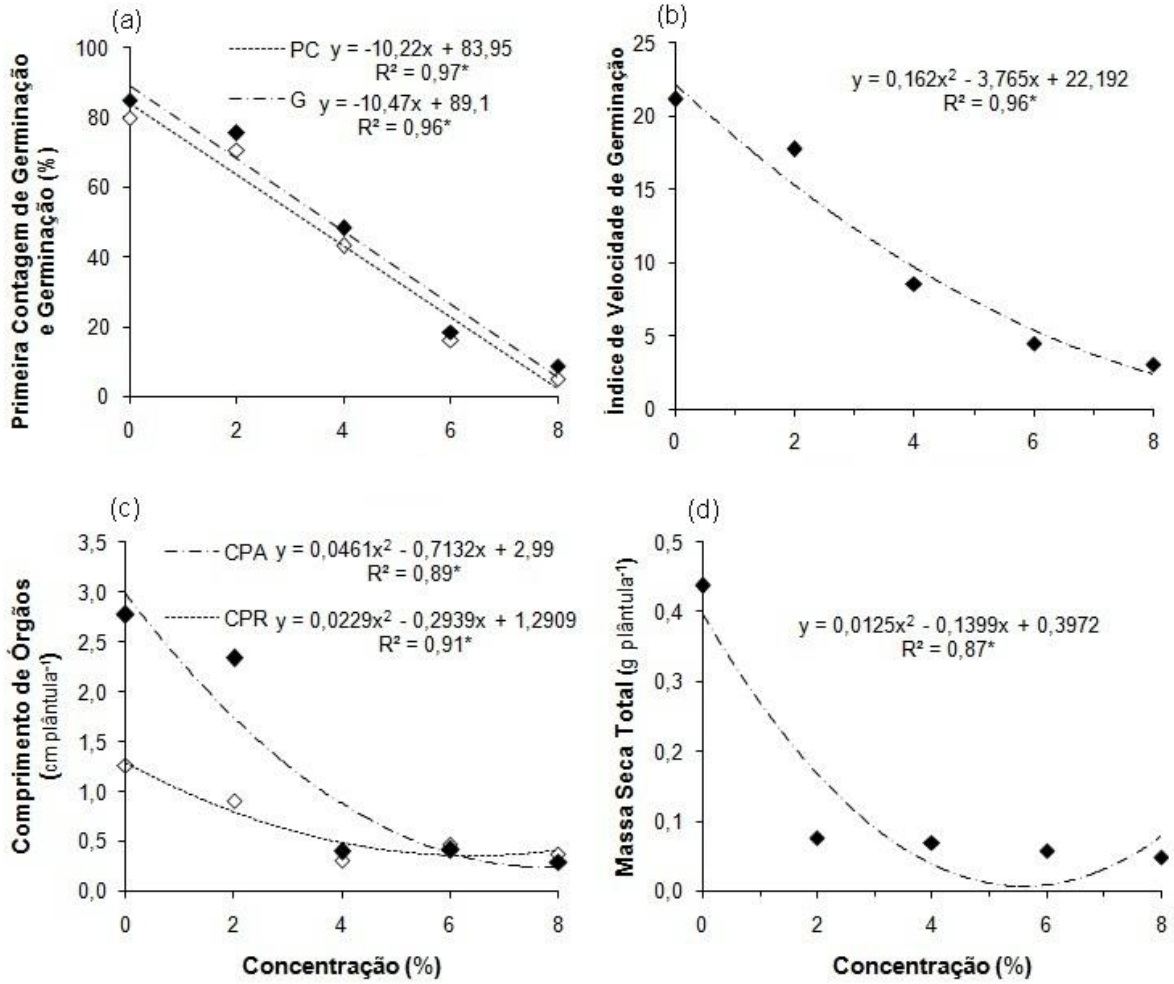

Figura 1. Primeira contagem de germinação (PC), germinação (G) - **(a)**, índice de velocidade de germinação - **(b)**, comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CPR) - **(c)** e massa seca total - **(d)** de plântulas de alface sob ação de diferentes concentrações do extrato de *C. bonariensis*, provenientes do teste de germinação (significativo a 5%*).

Estudos têm demonstrado que o efeito alelopático do extrato reduz a massa seca de plântulas. Carmo et al.(2007), ao realizarem estudo com extratos de folhas e de cascas de tronco de *Ocotea odorifera*, verificaram a redução da massa seca total de plântulas de *Sorghum bicolor*, indiferentemente da concentração. Tur et al (2012), observaram que extratos aquosos de folhas de *Dalberguia ecastaphilum* reduzem a massa seca total de plântulas, na concentração de 8%.

A condutividade elétrica, indiferentemente do tempo de embebição, aumentou até a concentração de 8% do extrato (Figura 2a). Os pontos de máxima resposta

ocorreram para 3; 6 e 24 horas de embebição nas concentrações de 6,7%; 6,3% e 6,2%, respectivamente. Sementes avaliadas após 3; 6 e 24 horas de embebição apresentaram, respectivamente, maior lixiviação de eletrólitos em nível de 46,3%; 47,7% e de 25,9% na concentração de 8%, comparativamente a concentração zero. O aumento da condutividade elétrica é indicativo da redução da capacidade de reorganização das membranas celulares (PESKE et al., 2012), aumentando a liberação de eletrólitos para o meio. Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Aumonde et al.(2012), ao analisarem a ação do extrato de folhas *Zantedeschia aethiopica* sobre sementes de alface, e com Comiotto et al. (2011), ao estudar o potencial alelopático de extrato aquoso de *Schinus molle* sobre sementes de alface, os quais verificaram que a condutividade elétrica aumenta com incremento na concentração do extrato e com o tempo de incubação das sementes.

A elevação nos valores de condutividade elétrica mantém relação com a redução de valores do índice de velocidade de germinação e primeira contagem de germinação, para as mesmas concentrações do extrato de *C. bonariensis*. Isto porque, estes atributos do vigor da semente, estão relacionados com alterações na fluidez e permeabilidade das membranas celulares (ABU-ROMMAN et al., 2010; HUSSAIN & REIGOSA, 2011).

A emergência de plântulas em casa de vegetação foi reduzida conforme o aumento da concentração do extrato (Figura 2b), alcançando na maior concentração (8%) a redução de 39,2% em relação à concentração zero. O ponto de mínima resposta para a emergência de plântulas ocorreu na concentração de 8% do extrato. Tais resultados são atribuidos a ação dos aleloquímicos, que atuam diretamente nos processos de degradação celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (QIAN et al., 2009), afetando o vigor das sementes. Silva et al. (2011) não verificaram diferenças na emergência de plântulas de alface, tomate e de cebolinha submetidas a ação de diferentes concentrações do extrato *Dicranopteris flexuosa*.

O comprimento de parte aérea e de raiz primária, em plântulas provenientes do teste de emergência em casa de vegetação foi decrescente com o aumento da concentração do extrato (Figura 2c). O ponto de mínima resposta, tanto para o comprimento de parte aérea quanto para o parâmetro comprimento de raiz primária foi na concentração de 8%. Em relação à concentração zero, houve redução de 59,8% e de 50% no comprimento de parte aérea e raiz primária, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Maraschin-Silva & Aqüila (2006), onde os

autores verificaram que o extrato de *Psychotria leiocarpa* nas maiores concentrações, reduz o comprimento de parte aérea de plântulas de alface. Silveira et al. (2012) ao avaliarem o efeito do extrato aquoso da *Mimosa tenuiflora* em sementes e plântulas de alface, observaram que quanto maior a concentração do extrato, menor o comprimento de parte aérea.

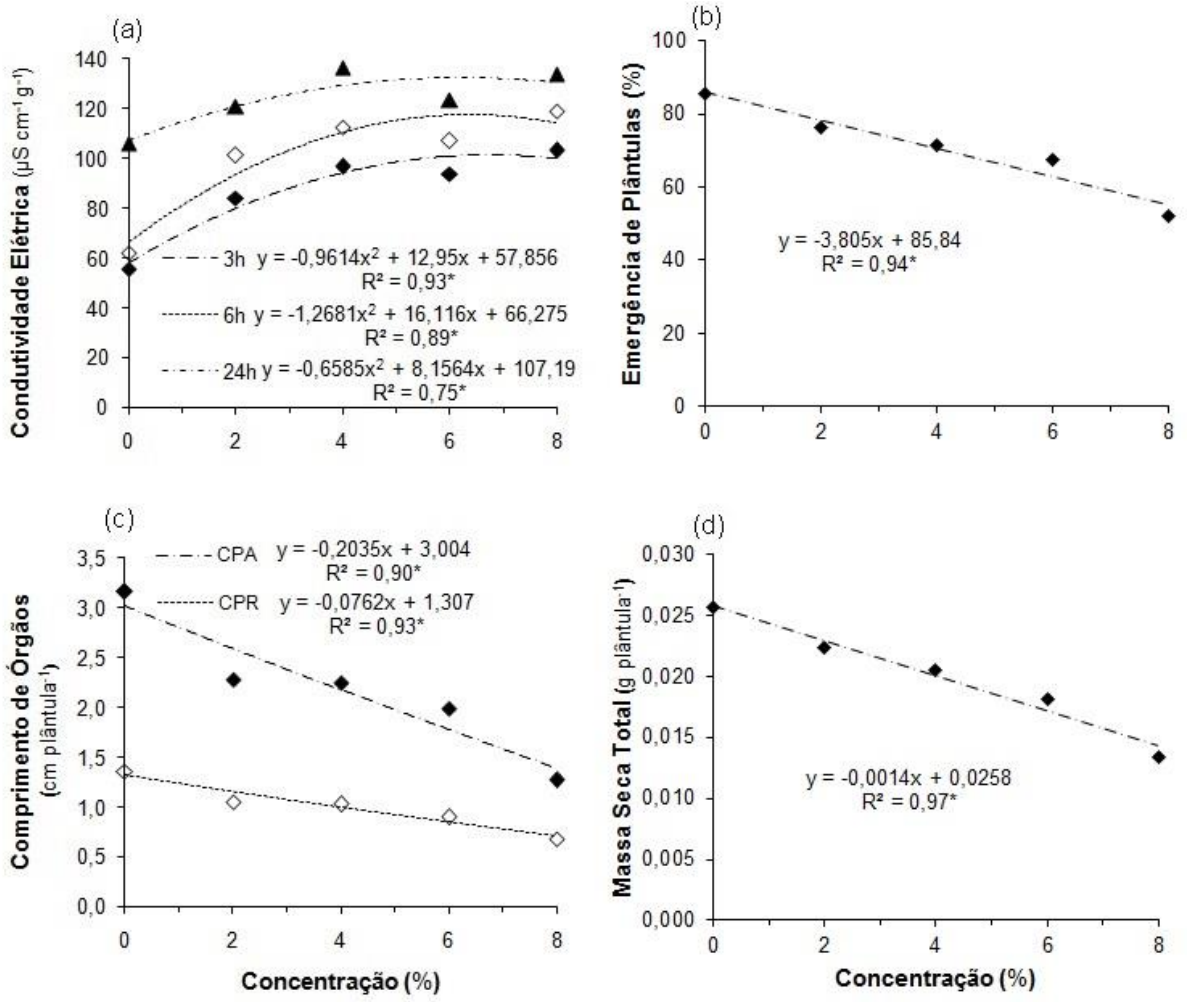

Figura 2. Condutividade elétrica de sementes após 3, 6 e 24 horas - **(a)**, emergência de plântulas em casa de vegetação - **(b)**, comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz primária (CPR) - **(c)** e massa seca total - **(d)** de plântulas de alface sob ação de diferentes concentrações do extrato de *C. bonariensis*, provenientes do teste de emergência de plântulas (significativo a 5%*).

A massa seca total de plântulas provenientes do teste de emergência, assim como daquelas obtidas do teste de germinação, apresentou redução (Figura 2d; 1d). O ponto de mínima resposta foi na concentração de 8% e houve diminuição de 89% na massa seca de plântulas expostas à concentração de 8%, comparativamente à concentração zero. O efeito tóxico dos aleloquímicos pode ocorrer sobre

fotossíntese, pela alteração no teor de clorofila ou pela redução na absorção de fótons (HUSSAIN & REIGOSA, 2011), refletindo no acúmulo de matéria seca. Contudo, Oliveira et al. (2014) ao analisarem o potencial alelopático de extratos aquosos de folhas de *Mimosa tenuiflora* sobre plântulas de alface, observaram aumento na massa seca de plântulas de alface, em concentrações superiores a 50%.

O teor de peróxido de hidrogênio, a peroxidação lipídica e a atividade de enzimas antioxidantes, ajustaram-se a tendência quadrática com elevados coeficientes de determinação ($R^2 \leq 0,91$) (Figura 3).

O teor de peróxido de hidrogênio foi crescente com a concentração do extrato (Figura 3a), assim como, a peroxidação lipídica (Figura 3b), atingindo um aumento de 33,5% e 33,8%, respectivamente, na concentração de 8% quando comparado com a concentração zero. O ponto de mínima resposta para o peróxido de hidrogênio foi verificado na concentração de 2,5%, e o ponto de máxima resposta para a peroxidação lipídica foi observado na concentração de 8%. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio afeta a permeabilidade dos canais de cálcio, resultando no aumento de cálcio livre no citosol (MORI & SCHROEDER, 2004), causando danos às células vegetais. A elevação dos níveis de H_2O_2 em tecidos vegetais pode estimular a elevação da atividade de enzimas antioxidantes e seu acúmulo pode conduzir ao estresse oxidativo (OMEZZINE et al., 2014a).

A atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) aumentou de forma marcante a partir da concentração de 4% do extrato, apresentando acréscimo até a maior concentração (Figura 3c). O ponto de mínima resposta foi observado para este parâmetro na concentração de 1,6%, ocorrendo aumento de 71,4%; 87,2% e de 95,2% para a concentrações 4; 6; e 8% respectivamente, quando comparadas a concentração zero. Contudo, a atividade da enzima catalase (CAT) foi elevada a partir da concentração de 2%, atingindo a máxima atividade em plântulas sob ação da concentração de 8% (Figura 3d). Verificou-se aumento de 50%; 60%; 60% e de 68%, para as concentrações 2; 4; 6 e 8%, respectivamente, quando comparadas a concentração zero. O ponto de máxima verificado para a enzima catalase foi na concentração de 8%. A enzima ascorbato-peroxidase (APX) apresentou incremento até a maior concentração do extrato (Figura 3e). Observou-se nas concentrações 2; 4; 6; e 8% um aumento de 12,5%; 26,7%; 35% e de 43,5%, comparado com a

concentração zero. O ponto de máxima para esse parâmetro foi determinado na concentração de 8%.

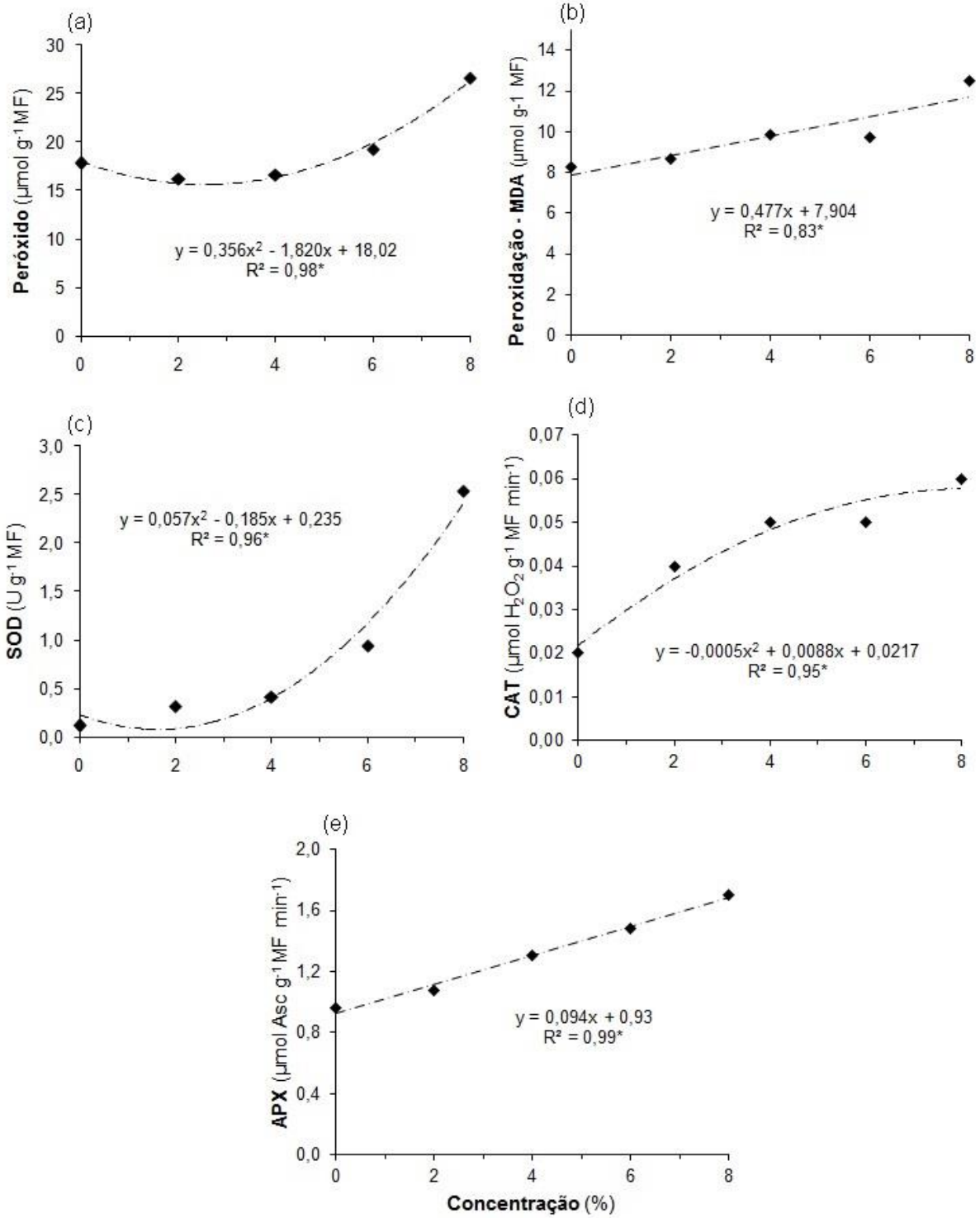

Figura 3. Peróxido de hidrogênio - **(a)**, peroxidação lipídica - **(b)**, atividade das enzimas: superóxido-dismutase (SOD) - **(c)**, catalase (CAT) - **(d)** e ascorbato-peroxidase (APX) **- (e)** em plântulas de alface provenientes do teste de germinação em condições laboratoriais sob ação de diferentes concentrações do extrato de *C. bonariensis* (significativo a 5% *).

O aumento das concentrações do extrato de *C. bonariensis* proporcionou um ambiente mais estressante às sementes e plântulas de alface, tendo resultado nos maiores teores de peróxido de hidrogênio em plântulas (Figura 3a) e na maior peroxidação lipídica (Figura 3b). A elevação nos teores de peróxido de hidrogênio, conduziu à elevação da atividade das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato-peroxidase (Figura 3c, 3d e 3e). Estas enzimas, são responsáveis pela defesa das células contra os radicais livres gerados sob condições de estresse (CARNEIRO et al., 2011).

Diversos autores têm relatado incremento na atividade das enzimas CAT, SOD e APX em resposta ao efeito alelopático de extratos vegetais (ROMERO-ROMERO et al., 2005; SINGH et al., 2009; SINGH et al., 2013). A enzima superóxido-dismutase promove a dismutação de radicais superóxido a peróxido de hidrogênio (AHMED et al., 2009), enquanto, a catalase degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular e enzima ascorbato-peroxidase, em água (GILL & TUTEJA, 2010). Tal ação ocorre visando a detoxificação dos tecidos, contudo, deve haver uma relação de equilíbrio entre a síntese e a degradação de radicais livres, visando evitar o estresse oxidativo (LI et al., 2010). Neste trabalho, o aumento na atividade das enzimas antioxidantes não foi eficaz para reverter a o efeito tóxico do extrato.

2.4 Conclusões

O extrato de *C. bonariensis* possui efeito alelopático em sementes e plântulas de alface.

As maiores concentrações do extrato (6 e 8%) proporcionam maior inibição da germinação e do crescimento inicial de plântulas.

O aumento da concentração do extrato resulta na elevação da condutividade elétrica em sementes, dos níveis de peróxido de hidrogênio, da peroxidação lipídica e das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato-peroxidase.

3. Capítulo II

Ação do extrato de *Lolium multiflorum* Lam. em atributos fisiológicos de sementes e plântulas de alface

3.1 Introdução

A utilização de determinadas espécies como plantas de cobertura do solo podem ocasionar ambientes mais competitivos por água, luminosidade e nutrientes (BRENNAN & SMITH, 2005; BERGKVIST et al, 2010; LAWLEY et al., 2012). A competição colabora para o desenvolvimento de mecanismos de defesa, baseados na síntese de metabólitos secundários (RICE, 1984).

Os resíduos vegetais de algumas espécies reduzem a germinação de sementes e o crescimento inicial das plantas, em decorrência dos compostos químicos produzidos e liberados para o ambiente (KRUIDHOF et al. 2011; BEZUIDENHOUT et al., 2012). Estes compostos, conhecidos como aleloquímicos, podem afetar diferentes processos metabólicos nas plantas (BLUM, 2011), como inibição da retomada do crescimento do embrião (CIPOLLINI et al., 2012), atuando diretamente na semente ou ainda, atuando diretamente na produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, ocasionando estresse oxidativo e morte celular (LI et al., 2010; ABUGRE et al., 2011).

O estresse oxidativo pode estar relacionado à fitoxicidez de extratos vegetais (AUMONDE et al., 2012). As plantas sob tal condição, respondem ao estresse, aumentando a atividade de enzimas que atuam na defesa contra a peroxidação de lipídeos, como a superóxido-dismutase, a catalase e a ascorbato-peroxidase, visando evitar colapso celular (PANDA & KHAN, 2009).

O azevém (*Lolium multiflorum* Lamark) é uma Poaceae utilizada como pastagem e também como cobertura de solo. Esta espécie pode produzir diferentes compostos alelopáticos, com efeito de inibição da germinação e do desenvolvimento de plantas cultivadas e daninhas (BUENO et al., 2007). Desse modo, o trabalho objetivou avaliar a influência da concentração do extrato de *L. multiflorum* sobre o

desempenho fisiológico de sementes e o metabolismo antioxidante de plântulas de alface.

3.2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

O material vegetal empregado para a elaboração do extrato aquoso foram folhas de azevém. A coleta das folhas foi realizada na segunda quinzena do mês de agosto, no ano de 2013, na região do planalto médio do estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Santa Bárbara do Sul, situada na latitude 28º22´09" S, longitude 53º14´46" W e altitude 511m. O clima regional é subtropical úmido, tipo Cfa, com precipitação total anual de 1.727mm, sendo janeiro o mês mais quente, com máxima normal de 30ºC, e julho o mês mais frio, com mínima normal de 8,6ºC. O solo é classificado como latossolo vermelho distrófico típico de textura média (BERG & KLAMT, 1997).

As plantas estavam em estádio de desenvolvimento reprodutivo, no momento de coleta das folhas, a qual foi realizada no período da manhã, entre nove e dez horas. Foram utilizadas folhas provenientes do terço médio das plantas, procedeu-se uma pré-secagem à sombra, durante oito horas. Depois disso, as folhas foram acondicionadas em papel Kraft e transportadas para o laboratório de Fisiologia de Sementes, onde as quais foram previamente lavadas em água destilada, secas em papel toalha e desidratadas à temperatura de 40ºC, até massa constante. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey, com peneira de malha 0,8mm, acondicionadas em sacos de papel Kraft, e mantidos em ambiente frio e seco (15ºC e 40% de UR).

Os tratamentos foram constituídos pelas concentrações do extrato de 0; 2; 4; 6 e 8%, em uma relação *m/v* entre material vegetal seco e água deionizada. Para tal, ao material seco e triturado, foi adicionado 1 litro de água deionizada à temperatura 100ºC e, após 30 minutos mantido em agitador magnético, submetido a filtração a vácuo.

O filtrado foi armazenado em recipiente âmbar, sob refrigeração, a 10ºC. Os extratos das diferentes concentrações tiveram o pH e o potencial osmótico aferidos. O pH atingiu os valores máximos e mínimos de 7,7 e 7,02 e potencial osmótico manteve-se entre -4.10^{-5} e -2.10^{-4} MPa, considerando a menor e a maior concentração do extrato. O pH foi determinado por pHmetro digital de bancada da marca Digimed®, modelo DM-22 e o potencial osmótico foi calculado segundo efetuado por Khaliq et al. (2013).

Como espécie alvo, foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), espécie sensível aos aleloquímicos e tolerante à ampla faixa de variação de pH e potencial osmótico (RICE, 1984). Para a avaliação do efeito das concentrações do extrato sobre o desempenho fisiológico de sementes e o metabolismo antioxidativo de plântulas de alface foram realizadas as seguintes avaliações:

Teste de germinação (%): conduzido por meio de quatro amostras com quatro subamostras de 50 sementes, semeadas em caixas tipo *gerbox*, sobre duas folhas de papel mata-borrão umedecidas na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, com as diferentes concentrações do extrato. Após, as caixas foram transferidas para câmara de germinação tipo BOD a 20ºC e período luminoso de 12h, mantido por quatro lâmpadas brancas fluorescentes de 25W, tipo luz do dia. As avaliações foram efetuadas aos sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Primeira contagem da germinação (%): conduzida conjuntamente ao teste de germinação e realizada aos quatro dias após a semeadura, sendo os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Índice de velocidade de germinação (IVG): foi obtido a partir de contagens diárias do número de sementes germinadas (protrusão radicular mínima de 3 a 4mm), sendo as contagens realizadas até a estabilização da germinação. A determinação do índice de velocidade de germinação foi possível pelo emprego da equação proposta por Maguire (1962).

Condutividade elétrica: determinada conforme metodologia de Krzyzanowski et al. (1991) e utilizando quatro subamostras de 50 sementes. A massa das sementes foi previamente avaliada, sendo as mesmas submetidas à embebição nos extratos nas diferentes concentrações, por uma hora. Transcorrido o tempo, as sementes foram lavadas com água destilada e transferidas para recipientes contendo 80mL de água deionizada, sendo então mantidas em BOD, sob

temperatura constante de 20°C. A condutividade elétrica foi determinada após 3; 6 e 24 horas e os resultados foram expressos em μS cm^{-1} g^{-1} de sementes.

Emergência de plântulas em casa de vegetação: o teste foi conduzido em quatro subamostras de 50 sementes e a semeadura efetuada em bandejas de poliestireno expandido de duzentas células, contendo como substrato areia lavada de textura média. Para isso, as sementes foram previamente dispostas entre três folhas de papel germitest umedecido com água destilada em quantidade análoga a 2,5 vezes a massa do papel seco por cinco minutos, objetivando evitar danos por embebição. Posteriormente, as sementes foram embebidas no extrato de diferentes concentrações pelo período de uma hora e semeadas. Vinte e um dias após a semeadura foi realizada a contagem final do número de plântulas, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Comprimento de parte aérea e de raiz primária de plântulas: foram avaliados ao final do teste de germinação e de emergência em casa de vegetação, por meio de quatro subamostras de 10 plântulas. O comprimento de parte aérea foi obtido pela distância entre a inserção da porção basal da raiz primária ao ápice da parte aérea. E, o comprimento da raiz primária foi determinado pela distância entre a parte apical e basal. Os resultados foram expressos em centímetros por plântula.

Massa seca total de plântulas: foi obtida a partir da massa de quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência em casa de vegetação. As plântulas foram acondicionadas em envelopes de papel pardo e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada a temperatura de 70°C, até massa constante. Os resultados foram expressos em gramas por plântula.

Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica: foram determinados ao final do teste de germinação a partir de aproximadamente 0,2 gramas de amostras de tecido de plântulas, macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 2mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 13.000g, durante 20 minutos e a 4ºC, sendo o sobrenadante utilizado para determinar o conteúdo de H_2O_2 e a peroxidação de lipídeos via acúmulo de malondialdeído (MDA).

Em tubos de ensaio, contendo 0,7mL de tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,0) e 1mL de iodeto de potássio 1M, foram adicionados 0,3mL do sobrenadante, e incubado por 10 minutos a 30°C. As leituras foram efetuadas em

espectrofotômetro a 390nm e a concentração de H_2O_2 expressa em µmol de H_2O_2 g^{-1} de massa fresca (VELIKOVA et al., 2000).

A peroxidação lipídica foi obtida via acúmulo de malondialdeído (MDA) e determinada por metodologia descrita por Cakmak & Horst (1991). Para isso, em tubos de ensaio contendo 0,3mL do sobrenadante foram adicionados 1,7mL do meio de reação de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 10% (*m*/*v*), em seguida incubado a 90ºC, por 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e após, centrifugadas novamente a 10.000g durante cinco minutos, a temperatura de 4°C e a absorbância do sobrenadante determinada em espectrofotômetro a 535 e 600nm. A quantidade de complexos MDA-TBA (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar (ε = 155 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}). Os resultados foram expressos em µmol MDA g^{-1} MF.

Atividade enzimática antioxidante: determinada ao final do teste de germinação a partir de aproximadamente 0,2g de amostras de matéria fresca de plântulas, maceradas em gral com pistilo e nitrogênio líquido, contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) 20% e homogeneizados em 1,8mL de tampão fosfato de potássio 100mM com pH 7,8, contendo EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 20mM. O extrato foi centrifugado a 13.000g por 20 min à temperatura de 4ºC e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática.

Superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1): a atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a 560nm em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), metionina 14mM, EDTA 0,1µM, NBT 75µM e riboflavina 2µM conforme Giannopolitis & Ries (1997). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima que produz uma inibição de 50% da redução fotoquímica do NBT. Os resultados foram expressos em U g^{-1} MF.

Catalase (CAT - EC 1.11.1.6): a atividade da CAT foi determinada pela decomposição do H_2O_2 conforme Azevedo et al. (1998). A atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240nm (ε = 39,4 × 10^3 M^{-1} cm^{-1}), durante o tempo de dois minutos em meio de reação de 4mL incubado a temperatura de 30ºC, contendo extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100mM com pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 12,5mM. Os resultados foram expressos em µmol H_2O_2 g^{-1} MF min^{-1}.

Ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11): determinada pelo emprego da metodologia idealizada por Nakano & Asada (1981) a partir do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato (ASA) por 2min a 290nm (ε = 2,80 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}). O meio de reação foi incubado a temperatura de 30^{o}C e composto por tampão fosfato de potássio 100mM com pH 7,0 e ácido ascórbico 0,5mM, H_2O_2 0,1mM e extrato enzimático. Os resultados foram expressos em µmol Asc g^{-1} MF min^{-1}.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos a 5% de probabilidade, foram ajustados por polinômios ortogonais.

3.3 Resultados e Discussão

Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis de germinação, massa seca total de plântulas provenientes do teste de germinação, condutividade elétrica após 24 horas de embebição e para massa seca de raiz primária de plântulas provenientes do teste de emergência de plântulas em casa de vegetação.

A germinação determinada no teste de primeira contagem de germinação, decresceu com o aumento da concentração do extrato *Lolium multiflorum* (Figura 1a). O ponto de máxima resposta foi observado na concentração zero e houve em relação à concentração zero, redução de 12,3%; 13,8% e de 54,3% quando as sementes foram submetidas ao efeito das concentrações 4; 6 e 8% do extrato, respectivamente. A diminuição dos valores de germinação obtida na primeira contagem reflete de maneira evidente a perda de vigor das sementes, atribuída ao efeito alelopático do extrato, especialmente nas concentrações de 6 e 8%. A concentração de aleloquímicos tende a ser maior na maior concentração do extrato. Resultados similares para a primeira contagem de germinação foram observados por Nery et al. (2013) ao estudarem o efeito do extrato de *Raphanus sativus* em sementes de alface.

O índice de velocidade de germinação foi reduzido pelo incremento da concentração do extrato (Figura 1b). Verificou-se ocorrência do ponto de máxima resposta na concentração zero. Ocorreu redução do vigor da semente a partir da concentração de 2%. Sendo esta redução para as concentrações de 4; 6 e 8% de 26,7%; 40,5% e de 62,5% quando comparadas a concentração zero,

respectivamente. A redução deste índice pode estar relacionada ao efeito do extrato sobre a permeabilidade e a seletividade das membranas celulares, com reflexo na redução do número de sementes germinadas por dia e na velocidade de germinação (CARILLO et al., 2010; ABUGRE et al., 2011). O índice de velocidade germinação de sementes de alface foi diminuído quando expostas a dos extratos de *Canavalia ensiformis* e *Sorghum bicolor*, na concentração 10% (CARVALHO et al.,2014).

O comprimento de parte aérea e de raiz primária diminuiu com a elevação da concentração do extrato (Figura 1c). O ponto de máxima resposta para comprimento de parte aérea foi na concentração 8%. O comprimento de parte aérea de plântulas sob o efeito das concentrações 2; 4; 6 e 8%, em relação às plântulas sob ação da concentração zero do extrato, foi de 4%; 50%; 57,5% e de 72%. Contudo verificou-se que os resultados de toxicidez foram mais evidentes em raiz primária, onde o comprimento foi reduzido em 59,6%; 68,3%; 71,5% e 80,7% nas concentrações 2; 4; 6 e 8%, respectivamente. O ponto de máxima verificado para esse parâmetro foi na concentração de 6,3%.

Estes resultados são condizentes com àqueles de Moraes et al. (2014), que avaliaram o efeito alelopático do extrato aquoso de folhas *de Lafoensia glyptocarpa* sobre o crescimento de *Sesamum indicum*. Redução do crescimento também foi verificada por Maraschin-Silva & Aqüila (2006), que constataram diminuição do comprimento de parte aérea em plântulas de alface submetidas ao extrato de *Psychotria leiocarpa*. Segundo Manoel et al. (2009), quando plântulas de tomate são expostas às maiores concentrações de extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*, ocorre redução no comprimento de raiz.

A condutividade elétrica determinada após 3 e 6 horas de embebição das sementes aumentou com a concentração do extrato (Figura 1d). O ponto de máxima resposta para a condutividade elétrica medida às 3 horas ocorreu na concentração de 6,1% do extrato, enquanto para a condutividade elétrica determinada após 6 horas, o ponto de máxima resposta ocorreu na concentração de 5,8%. Os maiores valores foram obtidos na concentração 8%; no período de embebição de 6 horas observou-se aumento de 40,8%; para a avaliação determinada após 3 horas de embebição houve um aumento de 40,3%, comparado a concentração zero. O aumento na condutividade elétrica também foi verificado por Aumonde et al. (2012) em sementes de alface expostas ao extrato de *Zantedeschia aethiopica*.

O aumento da condutividade elétrica em sementes de alface sob ação do extrato de *L. multiflorum*, assim como já verificado para outras espécies, está relacionado com a seletividade do sistema de membranas celulares e com o extravasamento de substâncias de reserva (KAUR et al., 2010). O demasiado extravasamento de eletrólitos mantém relação com a redução do vigor das sementes, as quais perdem grande parte das reservas que deveriam ser utilizadas para nutrir a plântula em desenvolvimento, nos seus estádios iniciais. A condutividade elétrica deve diminuir à medida que o tempo de embebição aumenta, isto como reflexo da reorganização do sistema de membranas celulares (PESKE et al., 2012).

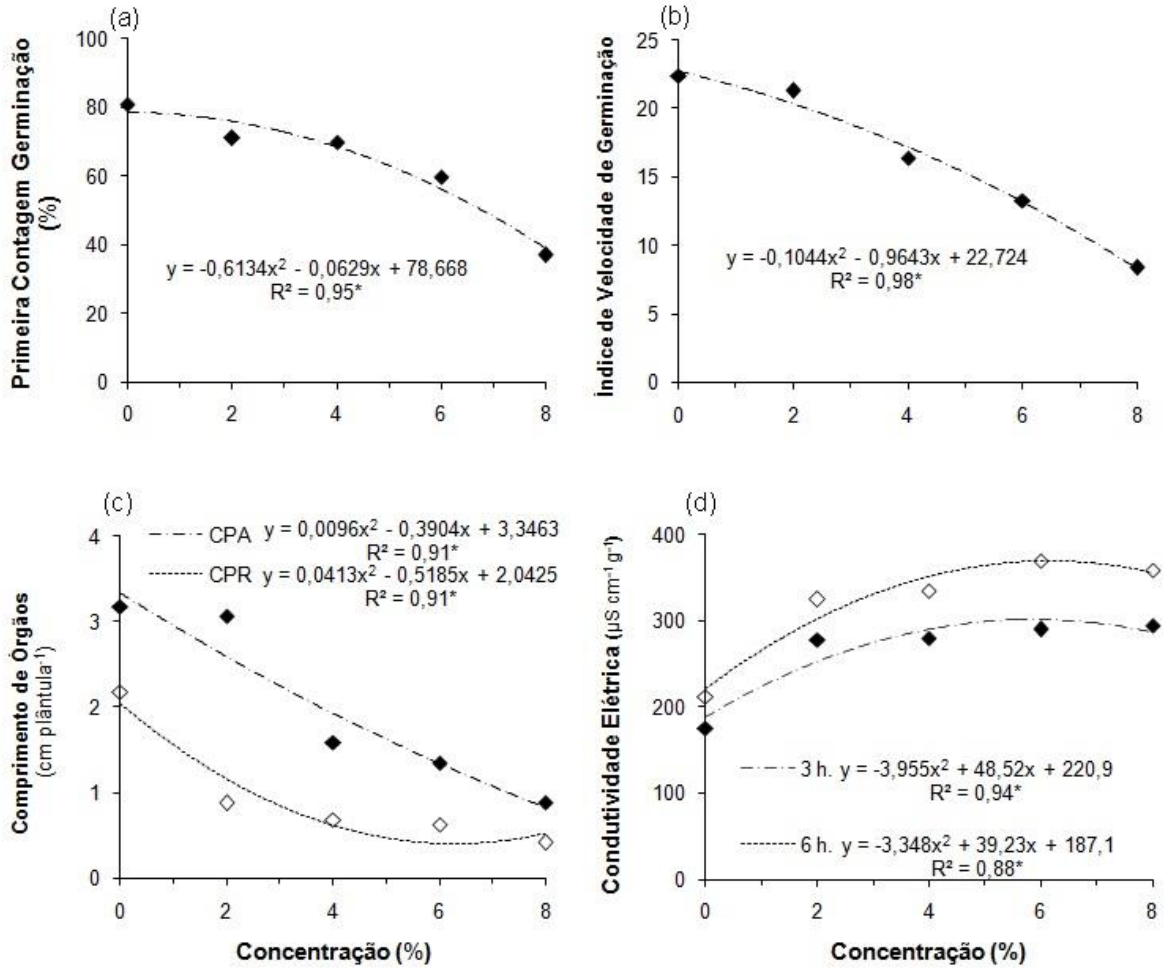

Figura 1. Primeira contagem de germinação - **(a)**, índice de velocidade de germinação - **(b)**, comprimento de parte aérea (CPA) e de raiz primária (CPR) - **(c)** e condutividade elétrica de sementes após 3 e 6horas de embebição - **(d),** de plântulas de alface provenientes do teste de germinação, sob ação de diferentes concentrações do extrato de *L. multiflorum* (significativo a 5%*).

A emergência de plântulas diminuiu com o aumento da concentração do extrato (Figura 2a). O ponto de máxima resposta foi verificado na concentração de 0,8%, sendo que para semente expostas às concentrações 6 e 8%, as reduções da emergência de plântulas foi de 32,9% e 59,6%, comparativamente a concentração zero. É provável que a liberação exacerbada de eletrólitos tenha colaborado para a redução do vigor de sementes, determinado pela primeira contagem, pelo índice de velocidade de germinação (Figura 1a; b) e pela emergência de plântulas (Figura 2a). Contudo, Silva et al. (2011) não encontraram diferenças na emergência de plântulas de alface, tomate e cebolinha quando submetidos a ação do extrato de *Dicranopteris flexuosa*.

O comprimento de parte aérea e raiz primária, em plântulas provenientes do teste de emergência, apresentaram decréscimo com o aumento da concentração do extrato (Figura 2b). O ponto de mínima resposta para os parâmetros comprimento de parte aérea e comprimento de raiz primária ocorreu na concentração de 8%. Em relação à concentração zero, houve redução de 36,5% e de 59,5% no comprimento de parte aérea e raiz primária, respectivamente. Sintomas de toxicidez são mais pronunciados na raiz do que na parte aérea (DAILIRI et al., 2011). Resultados similares foram obtidos por Lima & Moraes (2008), ao avaliarem o efeito do extrato aquoso de *Ipomoea fistulosa*, no crescimento inicial de parte aérea e raiz de alface e de tomateiro. Resposta semelhante também foi verificada por Moraes et al. (2014) ao investigarem o crescimento de plântulas de gergelim, submetidas a extratos aquosos de *Lafoensia glyptocarpa.*

A massa seca de parte aérea de plântulas provenientes do teste de emergência apresentou redução com a concentração do extrato, sendo os resultados mais evidentes observados na concentração de 8% (Figura 2c), o qual apresentou uma redução de 50%, comparado a concentração zero. O ponto de máxima resposta foi observado na concentração de 1%. A redução da massa seca ocorreu pela inibição ou redução da atividade enzimática, aliada a modificação da síntese de fitohormônios, responsáveis pela germinação das sementes (POLITYCKA&GMEREK, 2008). OS resultados deste trabalho diferem dos apresentados por Tur et al. (2012), para a variável massa seca total de plântulas de tomate, submetidas a ação do extrato de *Melia azedarach*.

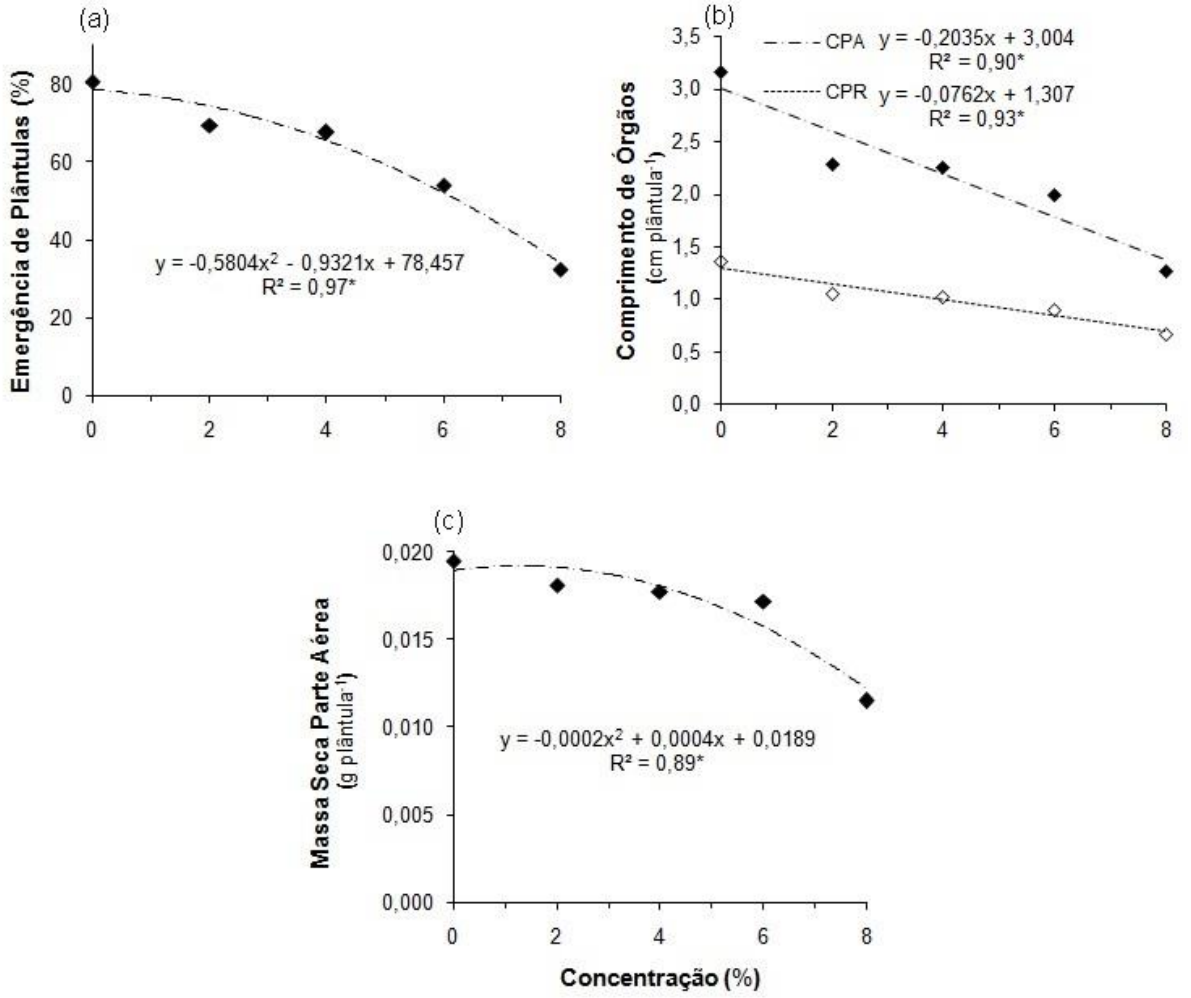

Figura 2. Emergência de plântulas em casa de vegetação - **(a)**, comprimento de parte aérea (CPA) e de raiz primária (CPR) - **(b)** e massa seca de parte aérea - **(c)** de plântulas de alface provenientes do teste de emergência em casa de vegetação,sob ação de concentrações do extrato de *L. multiflorum* (significativo a 5%*).

O teor de peróxido de hidrogênio e a peroxidação lipídica aumentaram em resposta ao estresse imposto pelo incremento da concentração do extrato *L. multiflorum* (Figura 3a e 3b), apresentando aumento de 49% e de 85,5%, na concentração de 8%, comparativamente à concentração zero. O ponto de máxima resposta para o teor de peróxido de hidrogênio foi na concentração de 7%, e para a peroxidação lipídica foi na concentração de 8% do extrato. A elevação do peróxido de hidrogênio em tecidos vegetais é resultado da ação estressora proporcionada pelas concentrações do extrato sobre plântulas de alface. O aumento do estresse ocasionado resulta no incremento de espécies reativas de oxigênio, as quais podem levar a peroxidação lipídica (APEL & HIRT, 2004; PANDA & KHAN, 2009).

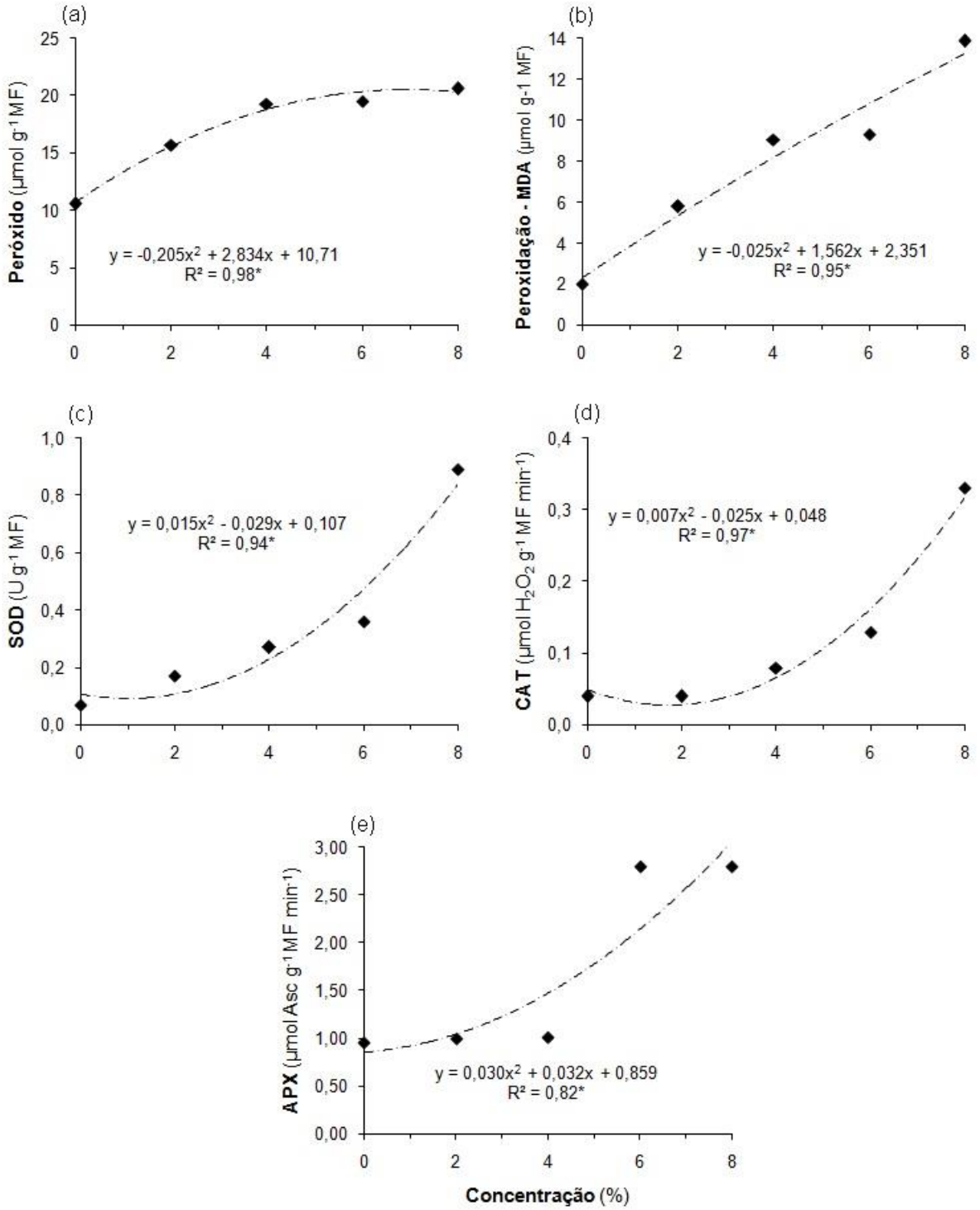

Figura 3. Peróxido de hidrogênio **- (a)**, peroxidação lipídica **- (b)**, atividade das enzimas: superóxido-dismutase (SOD) **- (c)**, catalase (CAT) **- (d)** e ascorbato-peroxidase (APX) **- (e)** em plântulas de alface originárias do teste de germinação sob ação de concentrações do extrato de *L. multiflorum* (significativo a 5% *).

Desta forma, em resposta a produção de peróxido de hidrogênio, houve alteração na atividade das enzimas antioxidantes (Figura 3c; 3d; e 3e). O ponto de mínima reposta para a enzima superóxido-dismutase ocorreu na concentração de

1%; para a catalase o ponto de mínima foi em 2%, enquanto para a ascorbato-peroxidase, foi na concentração zero. Tanto a enzima superóxido-dismutase quanto à catalase e a ascorbato-peroxidase tiveram atividade aumentada com a elevação da concentração do extrato.

Em relação às plântulas sob a concentração zero, àquelas sob efeito das concentrações de 4; 6 e 8% do extrato, apresentaram aumento de 74%; 80,5% e de 92% na atividade da enzima superóxido-dismutase. Nas mesmas concentrações, entretanto para a enzima catalase, o incremento na atividade foi de 50%; 69% e 88%. Já, para a enzima ascorbato-peroxidase houve aumento de 66% nas concentrações 4; 6 e 8% em relação a concentração zero. Harun et al. (2014), observou aumento na atividade das enzimas catalase, ascorbato-peroxidase e superóxido-dismutase em plântulas de alface ao aumentar a concentração do extrato de *Chrysanthemoides monilifera*.

É possível evidenciar neste trabalho que a elevação na atividade das enzimas antioxidantes não foi suficiente para eliminar os radicais livres produzidos (Figura 3a). Os radicais livres, provavelmente, são resultantes do efeito tóxico do extrato sobre o metabolismo de plântulas de alface e refletiram no seu inferior desempenho de crescimento, especialmente nas maiores concentrações do extrato de *L. multiflorum* (Figura 1; 2; 3). Esses resultados estão de acordo com Singh et al. (2013), os quais verificaram aumento da peroxidação lipídica ao avaliar a ação de folhas de *Brassica oleracea* cultivadas na presença de ácido cinâmico.

3.4 Conclusões

A utilização do extrato aquoso de folhas de *L. multiflorum* resulta efeito alelopático e afeta negativamente o desempenho fisiológico de sementes e plântulas de alface.

O aumento da concentração do extrato proporciona elevação na atividade das enzimas antioxidantes, e no teor de peroxidação lipídica e conteúdo de peróxido, sendo os resultados mais pronunciados, observados nas concentrações de 6 e 8% do extrato.

O aumento na atividade das enzimas antioxidantes não foi eficaz para reverter a o efeito tóxico do extrato, o que pode ser evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica e conteúdo de peróxido.

4. Capítulo III

Extrato aquoso de azevém: efeito no desempenho fisiológico de sementes e no metabolismo antioxidante de plântulas de trigo

4.1 Introdução

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um cereal consumido mundialmente. Que possui propriedades nutricionais de interesse (BOSCHINI et al., 2011). Atualmente a produção mundial é de aproximadamente 716 milhões de toneladas e entre os principais produtores estão a China, Índia, Estados Unidos e a Rússia (FAOSTAT, 2015). Esta cultura é de grande importância (PICCININ et al., 2013), tendo atingido na safra Nacional de 2014, a produtividade média de 3.682 kg ha^{-1}. Esta ocorrência possibilitou a produção de 5,9 milhões de toneladas, impulsionada por seus maiores produtores, os Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul (CONAB, 2015).

Fatores climáticos adversos, patológicos e a competição com plantas daninhas afetam o rendimento da cultura. Plantas de cobertura desempenham papel importante nos sistemas produtivos, ao possibilitarem a reciclagem de nutrientes e o aumento da matéria orgânica do solo (BLANCO-CANQUI et al., 2012). Contudo, a competição destas espécies com as espécies cultivadas tem se tornado problema crescente, devido principalmente, aos reflexos no crescimento dos cultivos (AGOSTINETTO et al., 2008).

O azevém é utilizado como planta de cobertura de solo e como pastagem, entretanto, é considerado como uma das principais plantas infestantes em lavouras de trigo (PAULA et al., 2011). Entre os fatores que possibilitam às plantas daninhas maior habilidade competitiva, estão a arquitetura, a germinação e rápido estabelecimento, o superior crescimento da parte aérea e do sistema radicular, a menor suscetibilidade às intempéries climáticas e a capacidade de síntese de compostos químicos com propriedades alelopáticas (SOUZA FILHO et al., 2010). A utilização desta espécie como planta de cobertura e pastagem (RUEDA-AYALA et al., 2015), pode afetar as culturas semeadas na sequência, pelos efeitos alelopáticos da palhada remanescente no solo (KRUIDHOF et al., 2008; BEZUIDENHOUT et al., 2012; LAWLEY et al., 2012). Devido ao fato do azevém ter capacidade de produzir

diferentes compostos alelopáticos, que inibem a germinação e o desenvolvimento de plantas cultivadas e daninhas (BUENO et al., 2007).

Os aleloquímicos podem atuar diretamente sobre estruturas da semente e da plântula, ou provocar produção e acúmulo de formas reativas de oxigênio, influenciando na permeabilidade e seletividade de membranas celulares (LI et al., 2010; SUNMONU & VAN STADEN, 2014). Desse modo, podem proporcionar a degradação celular, reduzir a velocidade e a porcentagem de germinação e promover alterações em nível hormonal e fotossintético, refletindo no crescimento inicial de plântulas (CARILLO et al., 2010; ABUGRE et al., 2011).

Enzimas do metabolismo antioxidante estão relacionadas à eliminação de radicais livres durante o processo de deterioração em sementes ou ainda, a sua degradação em plântulas sob condição de estresse (ROSA et al., 2005; AUMONDE et al., 2012). O estresse oxidativo pode alterar a permeabilidade e os fluxos através da membrana plasmática, podendo causar a redução do crescimento das plântulas (WEIR et al., 2014).

Estudos envolvendo extratos e compostos de origem vegetal têm sido conduzidos com objetivo de avaliar seu efeito sobre a germinação e o crescimento inicial de plantas cultivadas e daninhas (FERREIRA & AQUILA, 2000). O favorecimento ou a inibição desses eventos fisiológicos são processos mediados por compostos originários do metabolismo secundário vegetal, cuja síntese e concentração variam entre genótipos e órgãos, conforme a condição ambiental ou o nível de estresse imposto (YARNIA et al., 2009; OMEZZINE et al., 2014a).

Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar a influência da concentração do extrato de *L. multiflorum* sobre atributos fisiológicos de sementes e plântulas de trigo.

4.2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil.

O material vegetal empregado para a elaboração do extrato aquoso foram folhas de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). A coleta das folhas foi realizada na

segunda quinzena do mês de agosto, no ano de 2013, na região do planalto médio do estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Santa Bárbara do Sul, situada na latitude 28º22´09" S, longitude 53º14´46" W e altitude 511m. O clima regional é subtropical úmido, tipo Cfa, com precipitação total anual de 1.727mm, sendo janeiro o mês mais quente, com máxima normal de 30ºC, e julho o mês mais frio, com mínima normal de 8,6ºC. O solo é classificado como latossolo vermelho distrófico típico de textura média (BERG & KLAMT, 1997).

As plantas estavam em estádio de desenvolvimento reprodutivo, no momento de coleta das folhas, a qual foi realizada no período da manhã, entre nove e dez horas. Foram utilizadas folhas provenientes do terço médio das plantas, procedeu-se uma pré-secagem à sombra, durante oito horas. Depois disso, as folhas foram acondicionadas em papel Kraft e transportadas para o laboratório de Fisiologia de Sementes, onde foram previamente lavadas em água destilada, secas em papel toalha e desidratadas à temperatura de 40ºC, até massa constante. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas tipo Willey, com peneira de malha 0,8mm, acondicionadas em sacos de papel Kraft, e mantidos em ambiente frio e seco (15ºC e 40% de UR).

Para obtenção das diferentes concentrações do extrato aquoso empregou-se a relação *m/v* entre material vegetal seco e água deionizada. As concentrações utilizadas foram 0; 2; 4; 6 e 8%. Para isso, foram empregados 0; 20; 40; 60 e 80 g de folhas de azevém. Adicionou-se, a cada quantidade de folhas desidratadas e trituradas, um litro de água deionizada à 100ºC e após 30 minutos em agitação, os extratos foram submetidos à filtração a vácuo e o filtrado foi armazenado em recipiente âmbar, sob refrigeração a 10ºC. As diferentes concentrações dos extratos tiveram o pH e o potencial osmótico determinados. O pH atingiu os valores máximos e mínimos de 7,7 e 7,0 e o potencial osmótico manteve-se entre -4.10^{-5} e -2.10^{-4} MPa, considerando a menor e a maior concentração do extrato.O pH foi determinado por pHmetro digital de bancada da marca Digimed®, modelo DM-22 e o potencial osmótico foi calculado segundo realizado por Khaliq et al. (2013).

Como espécie alvo foram utilizadas sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) com umidade inicial de 13%. Para avaliar o efeito das concentrações do extrato sobre o desempenho de sementes e plântulas foram realizadas as seguintes avaliações:

Teste de germinação (%): foi conduzido por meio de quatro amostras com quatro subamostras de 50 sementes, semeadas sobre três folhas de papel *germitest* umedecidas na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, com as diferentes concentrações do extrato. Os rolos de papel *germitest* foram transferidos para câmara de germinação tipo BOD a 20ºC e com período luminoso de 12h. As avaliações foram efetuadas aos oito dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Primeira contagem da germinação (%): foi realizada aos quatro dias após a semeadura, conjuntamente ao teste de germinação. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

Índice de velocidade de germinação (IVG): obtido a partir de contagens diárias de sementes com protrusão radicular mínima de 3 a 4mm. As contagens do número de sementes germinadas foram realizadas até a estabilização da germinação. No cálculo do índice de velocidade de germinação foi empregada a equação proposta por Maguire (1962).

Condutividade elétrica: aferida de acordo com metodologia proposta e conduzida em quatro subamostras de 50 sementes (KRZYZANOWSKI et al., 1991). Para tal, as sementes tiveram sua massa previamente aferida e foram submetidas à embebição nas diferentes concentrações dos extratos, por uma hora. Decorrido o tempo, foram lavadas com água destilada, transferidas para recipientes polietileno contendo 80mL de água deionizada e mantidas em BOD, a temperatura constante de 20°C. A condutividade elétrica foi determinada após 3; 6 e 24 horas de embebição em água deionizada e os resultados foram expressos em $\mu S\ cm^{-1}\ g^{-1}$ de sementes.

Emergência de plântulas em casa de vegetação: o teste foi conduzido em quatro subamostras de 50 sementes e a semeadura foi efetuada em bandejas de polietileno, contendo como substrato areia lavada de textura média. Para isso, as sementes foram previamente dispostas entre três folhas de papel *germitest* umedecido com água destilada em quantidade análoga a 2,5 vezes a massa do papel seco por cinco minutos, objetivando evitar danos por embebição. Posteriormente, as sementes foram embebidas nas diferentes concentrações do extrato, pelo período de uma hora e semeadas. Vinte e um dias após a semeadura foi realizada a contagem final do número de plântulas, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Comprimento de parte aérea e de raiz primária de plântulas: para a determinação destes atributos de crescimento, foram utilizadas quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência em casa de vegetação. O comprimento de parte aérea foi obtido pela distância entre a inserção da porção basal da raiz primária ao ápice da parte aérea e, o comprimento da raiz primária foi mensurado pela distância entre sua parte apical e basal. Os resultados foram expressos em centímetros por plântula.

Massa seca de parte aérea e de raiz primária de plântulas: ambos os atributos de crescimento foram obtidos a partir da massa de quatro subamostras de 10 plântulas, ao final do teste de germinação e de emergência em casa de vegetação. As plântulas foram divididas em parte aérea e parte radicular, após foram acondicionadas em envelopes de papel pardo e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada sob temperatura de 70°C, até massa constante. Os resultados foram expressos em gramas por plântula.

Área foliar: a área foliar das plantas foi medida ao final do teste de emergência em casa de vegetação, a partir das folhas de quatro subamostras de 10 plantas. Para a medição da área foliar foi utilizado o medidor de área modelo LI 3100, LICOR, NE, USA e os resultados foram expressos em cm^2.

Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica: foram determinados em parte aérea e em raízes de plântulas obtidas ao final do teste de germinação. Aproximadamente 0,2g de amostras de tecido vegetal fresco foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%, sendo o homogenato foi centrifugado a 13.000g, durante 20 minutos e a temperatura de 4ºC. O sobrenadante foi utilizado para determinar o conteúdo de H_2O_2 e de malondialdeído (MDA). Os níveis de peróxido de hidrogênio foram determinados conforme Velikova et al. (2000). Para isso, em tubos de ensaio contendo 0,7mL de tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,0) e 1mL de iodeto de potássio a 1M, foram adicionados 0,3mL do sobrenadante, e procedido a incubação por 10 minutos a 30°C. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 390nm e a concentração de H_2O_2 expressa em µmol de H_2O_2 g^{-1} de massa fresca.

A peroxidação lipídica foi determinada via acúmulo de malondialdeído (MDA) e determinada pela metodologia descrita por Cakmak & Horst (1991). Para tal, em tubos de ensaio contendo 0,3mL do sobrenadante foram adicionados 1,7mL do meio

de reação de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (*m*/*v*) e TCA 10% (*m*/*v*), em seguida realizou-se a incubação a 90ºC, durante 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e após, realizou-se a centrifugação a 10.000g durante cinco minutos, a 4°C. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 535 e 600nm e a quantidade de complexos MDA-TBA (pigmento vermelho) foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar (ε = 155 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}). Os resultados foram expressos em µmol g^{-1} MF.

Atividade das enzimas antioxidantes: foi quantificada ao final do teste de germinação a partir de aproximadamente 0,2g de amostras de plântulas divididas em parte aérea e raízes. A determinação da atividade das enzimas antioxidantes foi efetuada separadamente para parte aérea e para raízes, que tiveram sua matéria fresca maceradas em gral e pistilo com nitrogênio líquido, contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) 20%. O material foi homogeneizado em 1,8mL de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8) contendo EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 20mM. O extrato foi centrifugado a 13.000g por 20 minutos e a temperatura de 4ºC, sendo o sobrenadante utilizado para mensurar a atividade enzimática.

Superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1): a atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) a 560nm, em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), metionina 14mM, EDTA 0,1µM, NBT 75µM e riboflavina 2µM (GIANNOPOLITIS & RIES, 1997). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima que produz uma inibição de 50% da redução fotoquímica do NBT. Os resultados foram expressos em U g^{-1} MF.

Catalase (CAT - EC 1.11.1.6): a atividade da CAT foi determinada pela decomposição do H_2O_2 (AZEVEDO et al., 1998) e o seu monitoramento foi pelo decréscimo na absorbância a 240nm (ε = 39,4 × 10^3 M^{-1} cm^{-1}), durante dois minutos em meio de reação de 4mL incubado a 30ºC, contendo extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5mM. Os resultados foram expressos em µmol H_2O_2 g^{-1} MF min^{-1}.

Ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11): a atividade da APX foi determinada por metodologia de Nakano & Asada (1981) pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato (ASA) por dois minutos a 290nm (ε = 2,80 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}). O meio de reação foi incubado a 30ºC e composto por tampão fosfato de

potássio 100mM (pH 7,0) ácido ascórbico 0,5mM, H_2O_2 0,1mM e extrato enzimático. Os resultados foram expressos em µmol Asc g^{-1} MF min^{-1}.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos a 5% de probabilidade, ajustados por polinômios ortogonais.

4.3 Resultados e Discussão

Não ocorreram diferenças significativas para as variáveis germinação, comprimento e massa seca de raiz primária de plântulas provenientes do teste de germinação. Resultados similares foram obtidos por Bueno et al. (2007), ao avaliarem o efeito alelopático de azevém sob o desenvolvimento de outras culturas. Por outro lado, Marcinkevičienė et al. (2013) ao avaliarem o efeito alelopático do extrato aquoso de parte aérea de azevém sobre a germinação e o estabelecimento de *Hordeum vulgare*, verificaram que em relação ao controle, houve redução de 43,7% na germinação quando sementes foram submetidas a concentração de 50% do extrato.

Os valores de primeira contagem de germinação foram decrescentes com o aumento da concentração do extrato de *Lolium multiflorum* (Figura 1a). O ponto de máxima resposta foi verificado, para esse parâmetro, na concentração de 1% do extrato e houve, em relação à concentração zero, redução de 36,9% na primeira contagem de germinação quando as sementes foram expostas a concentração de 8% do extrato. A redução do vigor das sementes nas maiores concentrações do extrato *L. multiflorum* pode ser resultado do aumento da toxicidez ocasionada no início do processo germinativo. Alguns metabólitos secundários podem reduzir a respiração e o metabolismo energético em sementes e plântulas (YARNIA et al., 2009), afetando o vigor. O aumento da toxicidez do extrato pode estar relacionado com a elevação da concentração de compostos tóxicos (WU et al., 2009). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva (2007) ao estudar extratos aquosos de jurema preta em sementes *de Sorghum bicolor* e *Cajanus cajan*.

O índice de velocidade de germinação foi reduzido pela elevação da concentração do extrato, sendo resultados mais drásticos observados na concentração de 8% (Figura 1b), o qual apresentou redução de 62%, ao ser

comparado a concentração zero. O ponto de mínima resposta para o índice de velocidade de germinação foi observado na concentração de 8%. A redução do índice de velocidade de germinação pode ter sido causada pelo efeito estressor do extrato de *L. multiflorum* na diminuição da capacidade de hidrólise e mobilização de reservas do endosperma para o embrião, conforme relatado por Muniz et al. (2007). Castagnara et al. (2012), verificaram redução no índice de velocidade de germinação de sementes de pepino quando expostas ao efeito alelopático do extrato de azevém. Moraes et al. (2012), observaram resultados semelhantes, nos quais o extrato de parte aérea de azevém reduziu em 65% o índice de velocidade de germinação de *Bidens pilosa*, quando comparado ao controle. Mubeen et al. (2011) observaram que o extrato de folha *Trianthima portulacastrum* reduziu de forma marcante o vigor de sementes de arroz.

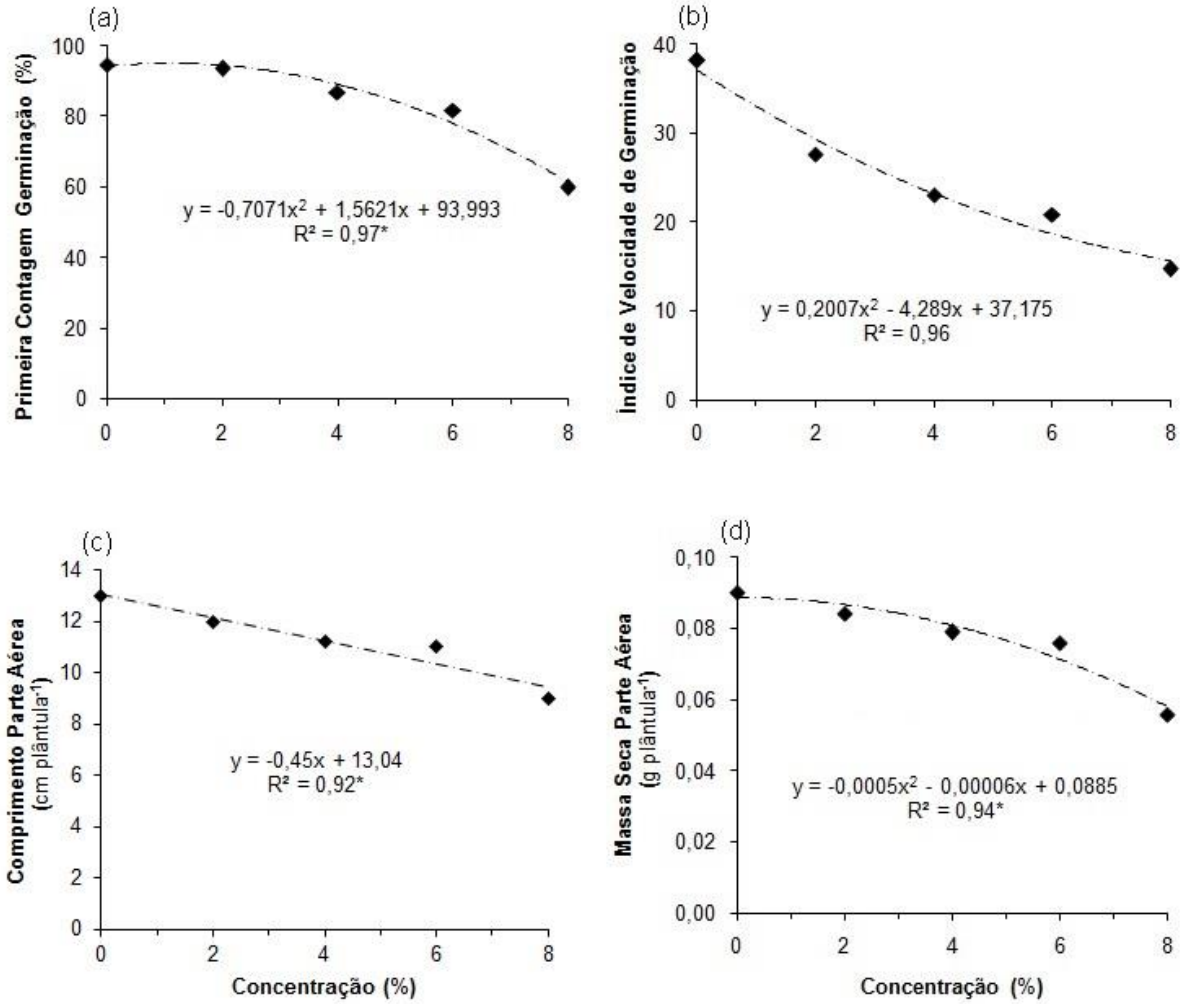

Figura 1. Primeira contagem de germinação **(a)**, índice de velocidade de germinação **(b)**, comprimento de parte aérea **(c)** e massa seca de parte aérea de plântulas de trigo provenientes do teste de germinação **(d)**, sob ação de diferentes concentrações do extrato de *L. multiflorum* (significativo a 5%*).

O comprimento de parte aérea foi reduzido até a maior concentração do extrato (Figura 1c). O ponto de máxima resposta para o comprimento de parte aérea foi verificado na concentração de zero. Ocorreu, em relação à concentração zero, redução de 24,4% e 30,8% neste atributo de crescimento quando plântulas foram expostas às concentrações de 4 e 8%, respectivamente. Em contrapartida, Kriaučiūnienė et al. (2013) observou que extrato de azevém, na concentração de 10% não interferiu no crescimento da parte aérea. De acordo com Souza Filho & Mourão (2010) a sensibilidade dos diferentes órgãos ao efeito tóxico do extrato é dependente da espécie. Extratos de raiz de *L. multiflorum* inibem a germinação e o crescimento de plântulas de *Galium aparine*, existindo relação positiva entre o aumento da concentração e a inibição (DONG et al., 2013).

A massa seca da parte aérea foi reduzida com o incremento da concentração do extrato (Figura 1d), onde a exposição na concentração 8% reduziu em 41% esse atributo, quando comparado a concentração zero. O ponto de máxima resposta para massa seca de parte aérea foi verificado na concentração zero. A redução na massa seca pode estar relacionada a maior quantidade de compostos químicos, conforme o aumento da concentração do extrato, aliado a alteração da atividade de enzimas hidrolíticas (MUNIZ et al., 2007). Os resultados encontrados nesse trabalho corroboram com aqueles encontrados por Moraes et al. (2010), os quais verificaram que o azevém apresenta potencial alelopático para reduzir a matéria seca da parte aérea de *Bibens pilosa*.

A condutividade elétrica ajustou-se ao modelo quadrático com elevado coeficiente de variação ($R^2 \leq 0,92$) (Figura 2a). O ponto de máxima resposta, para os três períodos de embebição das sementes, foi observado na concentração de 8%. A lixiviação de eletrólitos foi maior conforme o aumento da concentração do extrato, em sementes submetidas aos períodos de embebição de 3; 6; e 24 horas. Verificou-se um aumento quando comparado a concentração zero, de 35%, 31% e de 36%, na concentração de 8% para os períodos de embebição, 3; 6; e 24 horas, respectivamente. Estes resultados podem ser relacionados ao efeito do extrato sobre a seletividade ou na reorganização do sistema de membranas celulares, uma vez que, Peske et al. (2012) e Marcos Filho (2005) relatam que sementes com maior nível de estruturação de membranas, apresentam menor lixiviação de compostos de reserva.

A capacidade de reorganização de membranas, a disponibilidade e a eficiência de utilização de compostos de reserva possui relação com a expressão do vigor de sementes (WU, 2009), conforme evidenciado neste trabalho (Figura 1a; 1b). Tais resultados estão de acordo com os encontrados por Aumonde et al. (2012), ao analisarem a ação do extrato de *Zantedeschia aethiopica* na qualidade fisiológica de sementes de arroz vermelho.

A emergência de plântulas demonstrou pouco efeito quando as sementes foram submetidas às concentrações 2; 4 e 6% do extrato (Figura 2b). No entanto, foi possível verificar diminuição expressiva, em relação à concentração zero, na ordem de 11% quando sementes foram expostas a concentração de 8%. O ponto de máxima resposta para a emergência de plântulas foi observado na concentração 1,8%. A redução da emergência está associada ao efeito negativo dos aleloquímicos sobre as estruturas das sementes e das plântulas, influenciando na permeabilidade e seletividade de membranas celulares, ou ainda, ocasionando modificações em nível hormonal (CARILLO et al., 2010; ABUGRE et al., 2011). Nóbrega et al. (2009) ao estudarem influência alelopática de coberturas vegetais no crescimento de plântulas, verificaram redução da emergência de plântulas de soja.

O comprimento, a área foliar e massa seca de parte aérea e de raiz primária foram reduzidos pelo incremento da concentração do extrato (Figura 2c; 2d; 2e). Os pontos de máxima resposta para o comprimento de parte aérea e para a área foliar foram verificados na concentração 1,8% e 2,8%, respectivamente. O comprimento e a massa seca da parte aérea de plântulas sob o efeito da concentração 8% do extrato tiveram redução de 28,3% e 26,7%, quando comparado àquelas plântulas sob ação da concentração zero, respectivamente. Resposta similar ocorreu com comprimento e massa seca de raiz primária, havendo redução de 31,1% e 42,8%. No entanto, para o comprimento de raiz e massa seca de órgãos o ponto de mínima foi observado na concentração de 8%.

Ao estudarem o efeito da concentração do extrato de *Zingiber officinale* sobre comprimento da parte aérea e de raiz em plântulas de cebola e soja, Han et al. (2008), obtiveram resultados similares. Moraes et al. (2012), verificaram que o extrato de azevém proporciona redução da massa seca de raiz de *Bidens pilosa*. Hagemann et al. (2010), observaram que extratos da parte aérea de *Avena sativa* e *Avena strigosa* ocasionam redução no crescimento da raiz e do hipocótilo de *Euphorbia heterophylla.* Segundo Khan et al. (2012), o crescimento de plântulas

de trigo foi reduzido quando exposto ao extrato aquoso de *Parthenium hysterophorus*.

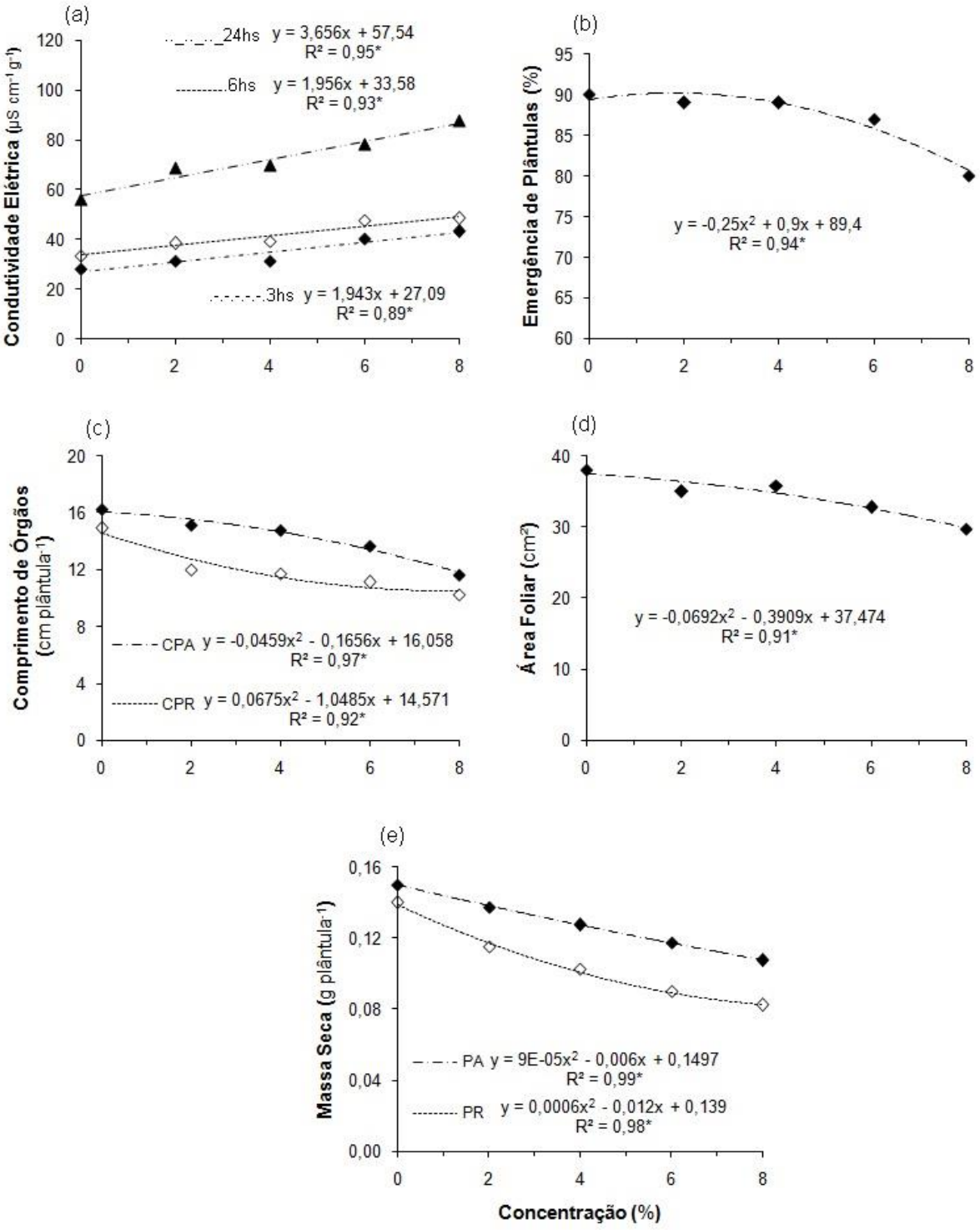

Figura 2. Condutividade elétrica de sementes após 3, 6 e 24h- **(a)**, emergência de plântulas em casa de vegetação - **(b)**, comprimento de parte aérea (CPA) e de raiz primária (CPR) - **(c)**, área foliar - **(d)** massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de parte radicular (MSPR) - **(e)** de plantas de trigo provenientes do teste de emergência,sob ação de diferentes concentrações do extrato de *L. multiflorum* (significativo a 5%*).

Diversos autores têm demonstrado que extratos vegetais apresentam inibição do crescimento de parte aérea de espécies cultivadas e daninhas. O extrato de parte aérea de capim-braquiária, segundo Souza et al. (2006), afeta negativamente o crescimento inicial de plantas de trigo.

A área foliar de plantas provenientes do teste de emergência em casa de vegetação foi reduzida pelo aumento da concentração do extrato (Figura 2d), colaborando com a redução da matéria seca da parte aérea (Figura 2e). A redução da área foliar pode estar relacionada à interferência de compostos alelopáticos sobre a formação do aparato fotossintético da planta. A redução da área foliar representa menor área de captação de energia radiante e, segundo Abu-Romman et al. (2010) e Carillo et al. (2010), os aleloquímicos podem alterar os teores de clorofila e afetar negativamente a fotossíntese.

O teor de peróxido de hidrogênio, determinado em raízes e parte aérea de plântulas de trigo, aumentou em resposta à elevação da concentração do extrato (Figura 3a; 4a). O ponto de mínima resposta para o teor de peróxido de hidrogênio em raízes de trigo foi verificado na concentração zero. Para o mesmo parâmetro, avaliado em parte aérea, o ponto de máxima resposta foi verificado na concentração 8% do extrato. O aumento no teor de peróxido de hidrogênio foi verificado de forma mais evidente na concentração 8%, que comparada à concentração zero, atingiu acréscimo de 15% em raízes e de 51% em parte aérea. A síntese e concentração de peróxido de hidrogênio no tecido vegetal são dependentes do nível de estresse imposto (OLIVEIRA et al., 2011) e o estresse tende a ser maior quanto mais elevada a concentração de compostos tóxicos no extrato (ISMAIL et al., 2015).

A peroxidação de lipídios quantificada nos mesmos tecidos, também foi incrementada até as maiores concentrações (Figura 3b e 4 b) e corrobora com a elevação nos níveis de peróxido de hidrogênio. O ponto de mínima resposta para os dois parâmetros ocorreu na concentração zero. Em relação à concentração zero, plântulas sob ação do extrato na concentração 8% apresentaram incremento na peroxidação de lipídeos na ordem de 42% em raízes e de 66%, em parte aérea. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Nazif et al. (2013), onde na presença do extrato de raízes e parte aérea de *Phytolacca latbenia*, a peroxidação de lipídeos é aumentada.

O estresse causado pelos aleloquímicos pode resultar em danos às membranas celulares e estimular os processos de peroxidação (ALONSO et al., 1997). O aumento das concentrações de peróxido de hidrogênio constitui indicativo de estresse oxidativo (MITTLER, 2002; ALVES et al., 2012), pois este composto tóxico, prejudica a função e integridade de membranas, muitas vezes de forma irreversível (DEUNER et al., 2011).

A enzima superóxido-dismutase em raízes e parte aérea, apresentou maior atividade em plântulas sob maiores concentrações do extrato (Figura 3c e 4c). Provavelmente, na tentativa de reduzir um possível dano celular ocasionado pela produção e acúmulo do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (SINHA &SAXENA, 2006). O aumento foi de 89% em raízes e 68% em parte aérea, na concentração 8%, comparada a concentração zero. Tais resultados corroboram com Yu et al. (2003) que obtiveram aumento da atividade da enzima superóxido-dismutase e da peroxidação lipídica, ao submeterem plântulas de pepino a diferentes concentrações e extratos desta mesma espécie. A enzima superóxido-dismutase é considerada essencial neste processo de remoção de espécies reativas de oxigênio, pois tem como função não só a conversão do radical $O_2^{\bullet-}$, mas também a capacidade de controlar outras espécies reativas de oxigênio (GARCIA, 2012; MAIA et al., 2012).

A atividade da enzima catalase, assim como da superóxido-dismutase, aumentou em resposta ao incremento da concentração do extrato (Figura 3d; 4d). A atividade da catalase foi maior nas raízes, independente da concentração utilizada. Observou-se um incremento de 50% e 60%, nas concentrações 6 e 8%, respectivamente, já em parte aérea para as mesmas concentrações houve aumento de 17% e 33%,quando comparadas a concentração zero. A enzima ascorbato-peroxidase, apresentou maior atividade nas raízes do que na parte aérea (Figura 3e; 4e), sendo superior em 50%; 56% e 61% nas concentrações 4; 6 e 8%, respectivamente, logo em parte aérea observou-se nas mesmas concentrações um aumento de 33%, 35% e 47%, quando comparadas a concentração zero.

O ponto de máxima resposta para a enzima catalase quantificada em parte aérea, foi na concentração 8% do extrato. Em raízes, o ponto de mínima resposta ocorreu na concentração de 2,5%. A enzima ascorbato-peroxidase, tanto em parte aérea quanto em raízes, apresentou o ponto de máxima resposta na concentração 8%.

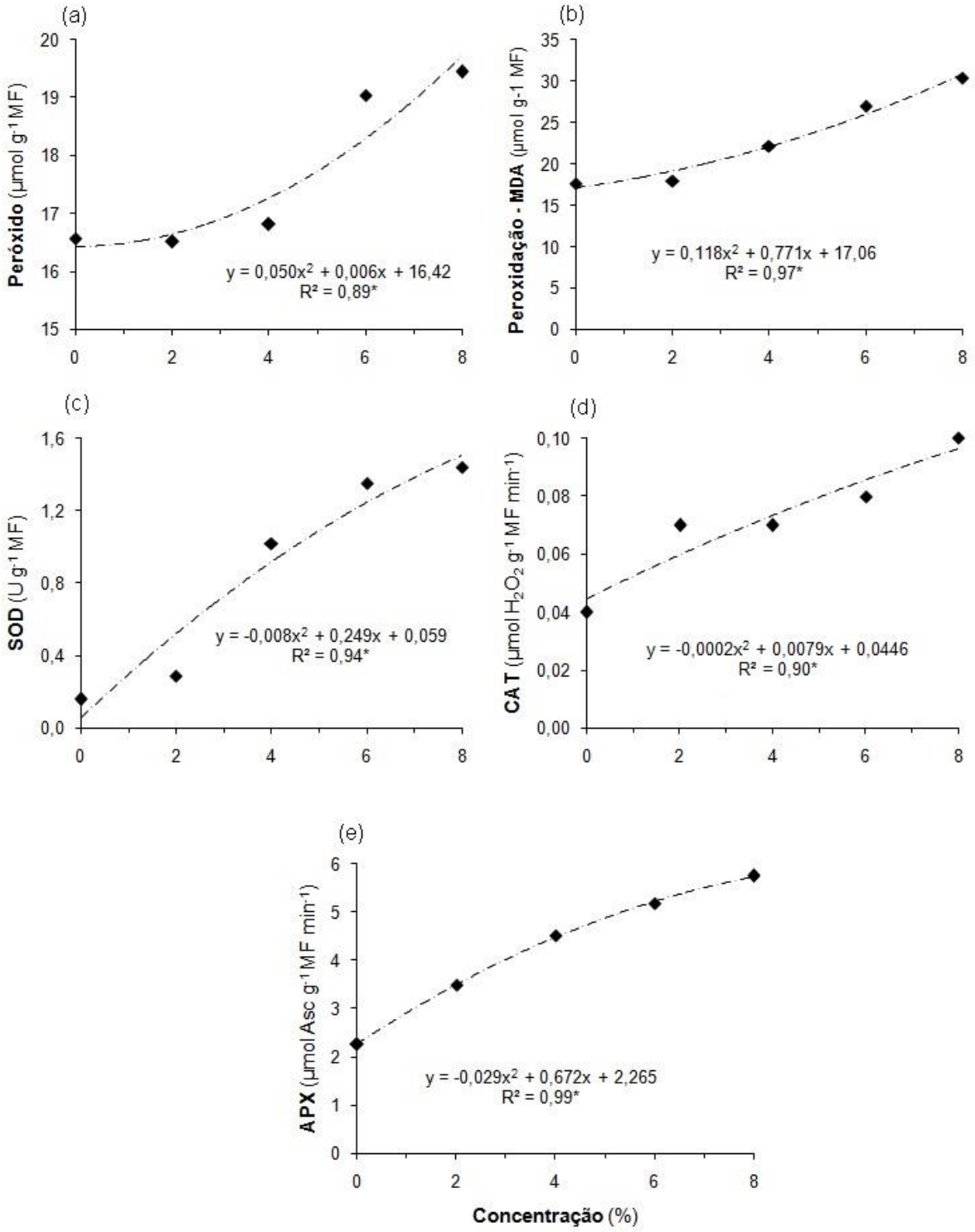

Figura 3. Peróxido de hidrogênio **- (a)**, peroxidação lipídica **- (b)**, atividade das enzimas: superóxido-dismutase (SOD) **- (c)**, catalase (CAT) **- (d)** e ascorbato-peroxidase (APX) **- (e)** em raízes de plântulas de trigo provenientes do teste de germinação,sob ação de diferentes concentrações do extrato de *L. multiflorum* (significativo a 5% *).

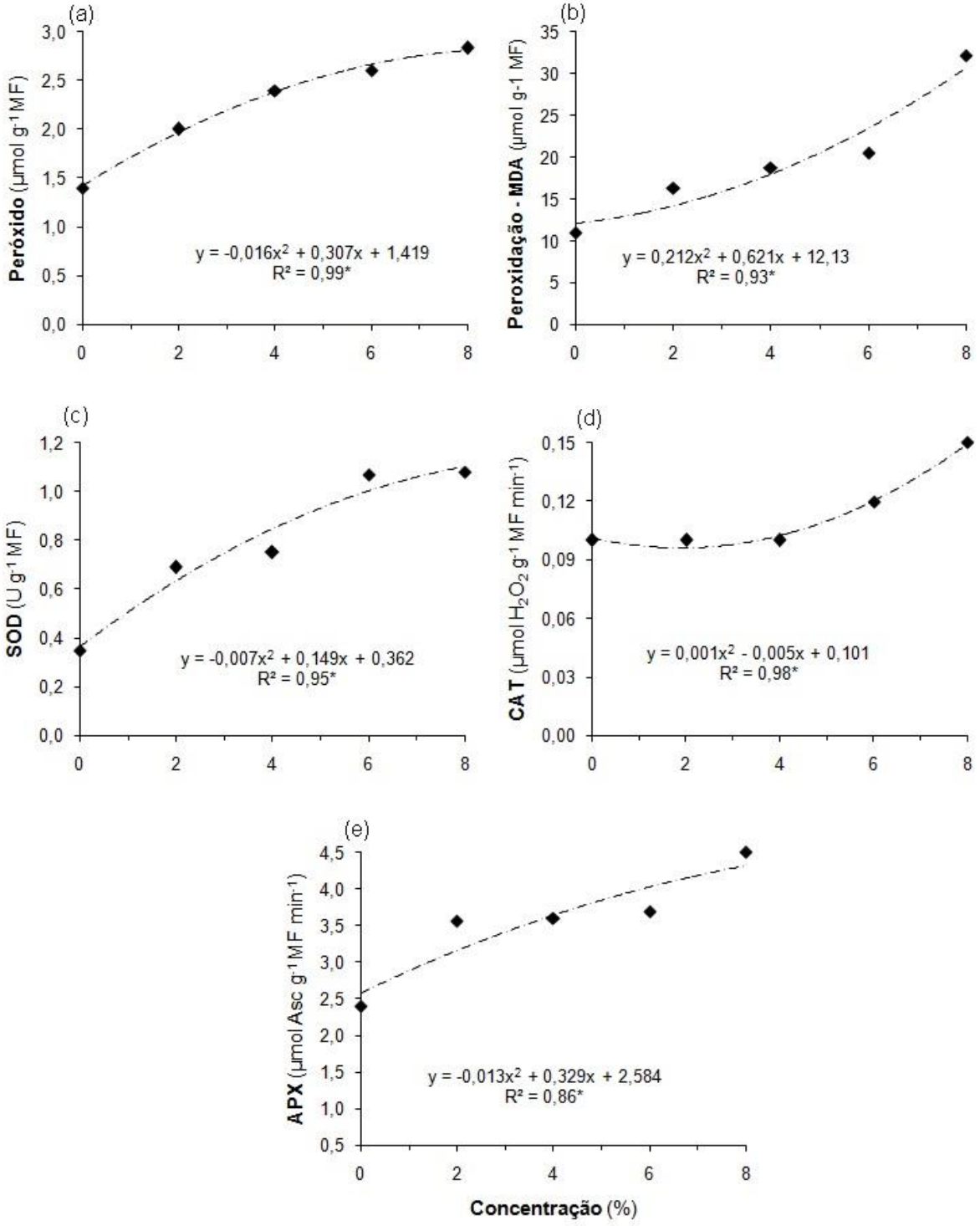

Figura 4. Peróxido de hidrogênio **- (a)**, peroxidação lipídica **- (b)**, atividade das enzimas: superóxido-dismutase (SOD) **- (c)**, catalase (CAT) **- (d)**, ascorbato-peroxidase (APX) **- (e)** em parte aérea de plântulas de trigo obtidas a partir do teste de germinação, sob ação de diferentes concentrações do extrato de *L. multiflorum* (significativo a 5% *).

Singh et al. (2009) observaram elevação na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, ao expor plântulas de milho ao extrato aquoso de *Nicotiana plumbaginifolia*. Abenavoli et al. (2006) verificaram que a cumarina aplicada em *Triticum turgidum* aumenta a atividade da enzima superóxido-dismutase. Harun et al. (2014), observaram aumento na atividade das enzimas catalase, ascorbato-peroxidase e superóxido-dismutase em plântulas de alface com o incremento da concentração do extrato de *Chrysanthemoides monilifera*.

Os resultados referentes à produção de peróxido de hidrogênio, peroxidação de lipídeos e atividade das enzimas antioxidantes, explicam em parte, os menores valores de comprimento e alocação de massa seca nas diferentes estruturas das plântulas sob influência das maiores concentrações do extrato. Além disso, a redução do vigor de sementes está relacionada à diminuição da capacidade de germinação e com o aumento do nível de peroxidação lipídica (BOGATEK et al., 2006).

A redução do índice de velocidade de germinação, o aumento da condutividade elétrica, dos níveis de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica, bem como, a ativação do sistema enzimático antioxidante em parte aérea e em raízes de plântulas de trigo sob ação do extrato de aquoso de folhas de azevém, sugerem que os danos ao desempenho inicial de sementes plântulas da espécie alvo utilizada, são decorrentes do efeito tóxico do extrato.

4.4 Conclusões

O extrato de *L. multiflorum* apresenta efeito alelopático em sementes e plântulas de trigo;

O índice de velocidade de germinação é reduzido de forma marcante na concentração 8% do extrato;

Concentrações mais altas resultam nos maiores teores de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica e atividades das enzimas superóxido-dismutase, catalase e ascorbato-peroxidase.

Considerações finais

O extrato aquoso de buva (*Conyza bonariensis*) quando testado em sementes e plântulas de alface e, o extrato de azevém (*Lolium multiflorum*) ao sertestado em sementes e plântulas de alface e de trigo demonstram efeito alelopático sobre as referidas espécies.

O extrato aquoso de buva resulta em inibição da germinação de sementes e do crescimento inicial de plântulas de alface.

A utilização do extrato de folhas de azevém reflete na redução de atributos do vigor de sementes de alface e de trigo.

O aumento da concentração do extrato aquoso de ambas as espécies, proporciona elevação nos teores de peróxido de hidrogênio, na peroxidação de lipídeos e na atividade das enzimas antioxidantes, sendo resultados mais pronunciados, observados nas concentrações de 8% do extrato. Estes resultados mantêm relação com a menor desempenho de plântulas sob tais concentrações.

Referências bibliográficas

ABENAVOLI, M.R; SORGONÀ, A.; SIDARI, M.; BADIANI, M.; FUGGI, A. Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) cells in suspension culture. **Journal of Plant Physiology**, v.160, n.1, p.227-237, 2003.

ABENAVOLI, M.R.; CACCO, G. SORGONÀ, A.; MARABOTTINI, R.; PAOLACCI, A.R.; CIAFFI, M.; BADIANI, M. The Inhibitory Effects of Coumarin on the Germination of Durum Wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*, cv. Simeto) Seeds. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, n.2, p.489-506, 2006.

ABUGRE, S.; APETORGBOR, A.K.; ANTWIWAA, A.; APETORGBOR, M.M.Allelopathic effects of ten tree species on germination and growth of four traditional food crops in Ghana.**Journal of Agricultural Technology**, v.7, n.3, p.825-834, 2011.

ABU-ROMMAN, S.; SHATNAWI, M.; SHIBLI, R. Allelopathic Effects of spurge (*Euphorbia hierosolymitana*) on wheat (*Triticum durum*). **American Eurasia Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.7, n.3, p. 98-302, 2010.

AGOSTINETTO, D.; RIGOLI, R.P.; SCHAEDLER, C.E.; TIRONI, S.P.; SANTOS, L.S. Período crítico de competição de plantas daninhas com a cultura do trigo. **Planta daninha**, v.26, n.2, p.271-278, 2008.

AHMED, C.B.; ROUINA, B.; SENSOY, S.; BOUKHRIS, M.; ABDALLAH F.B. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, n.1, p.345-352. 2009.

ALONSO, A.; QUEIROZ, C.S.; MAGALHÃES, A.C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta: BBA. Biomenbranes**, v.1323, n.1, p.75-84, 1997.

ALVES, J. D.; ZANANDREA, I.; DEUNER, S.; GOULART, P. F. P.; SOUZA, K. R. D.; SANTOS, M. S. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to waterlogging in *Sesbania virgata*. **Trees**, v.27, n.2, p.717-728, 2012.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n.1, p. 373-399, 2004.

ALMEIDA, F.S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 62p.

ASONGALEM, E.A.; FOYET, H.S.; NGOGANG, J.Y.; FOLEFOC, G.N.; DIMO, T.; KAMTCHOUING, P. Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, n.1, p.30-308, 2004.

ASTARITA, L.V., FERREIRA, A.G.; BERGONCI, J.I. *Mimosa bimucronata*: Allelopathy and osmotic stress. **Allelopathy Journal Allelopathy Journal,** v.3, n.1, p.43-50, 1996.

AUMONDE, T.Z.; MARTINAZZO, E.G.; BORELLA J.; PEDÓ, T., AMARANTE, L.; VILLELA, F.A.; MORAES, D. M. Alterações fisiológicas em sementes e metabolismo antioxidativo de plântulas de alface expostas à ação do extrato das folhas de *Zantedeschia aethiopica* Spreng. **Interciencia**, v.37, n.11, p.845-851, 2012.

AUMONDE, T.Z.; PEDÓ, T.; MARTINAZZO, E.G.; BORELLA, J.; AMARANTE, L.; VILLELA, F.A.; MORAES, D.M. Ação do extrato de *Zantedeschia aethiopica* na qualidade fisiológica de sementes, pigmentos fotossintéticos e metabolismo antioxidativo de plântulas de arroz vermelho. **Bioscience Journal**, v. 30, n.5, p.1412-1420, 2014.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum,**v.104, n.1,p.280-292, 1998.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimationsand Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v.59, p.313–339, 2008.

BABULA, P.; ADAM, V.; KIZEK, R.; SLADKY, Z.; HAVEL, L. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death.**Environmental and Experimental Botany**, v.65, n.9, p.330-337, 2009.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BERG, M.V.D.; KLAMT, E. Variabilidade espacial de características de solos na região do Planalto Médio, RS: I. análise da variância por amostragem aninhada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, n.3, p.393-399, 1997.

BERGKVIST, G.; ADLER, A.; HANSSON, M.; WEIH, M. Red fescue undersown in winter wheat suppresses *Elytrigia repens.***Weed Research Journal**, 50, pp. 447–455, 2010.

BEZUIDENHOUT, S.R.; REINHARDT, C.F.; WHITWELL, M.I. Cover crops of oats, stooling rye and three annual ryegrass cultivars influence maize and *Cyperus esculentus* growth.**Weed Research Journal**, v.52, n.1, p.153-160, 2012.

BHOWMIK, P.C. & BEKECH, M.M. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional tillage corn (*Zea mays*). **Agronomy**, v.1, n.1, p.67-71, 1993.

BLANCO-CANQUI, H.; CLAASSEN, M.M.; PRESLEY, D.R. Summer cover crops fix nitrogen, increase crop yield, and improve soil-crop relationships. **Agronomy Journal**, v.104, n.3, p.137-147, 2012.

BLANCO, J.A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. **Ecological Modelling***,* v.209, n.24, p.65-77, 2007.

BOGATEK, R.; GNIAZDOWSK, A.; ZAKRZEWSKA, S.W. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. **Biologia Plantarum,** v.50, n.1, p.156-158, 2006.

BLUM, U. **Plant-Plant Allelopathic Interactions: Phenolic Acids, Crop Cover and Weed Emergence.**1.ed. Springer, London: Dordrecht, Heidelberg. 2011. 200p.

BORELLA, J. & PASTORINI, L.H. Efeito alelopático de frutos de umbu (*Phytolacca dioica* L.) sobre a germinação e crescimento inicial de alface e picão-preto. **Ciência e Agrotecnologia**,v.35, n.5, p.1129-1135, 2010.

BOSCHINI, A.P.M.; SILVA, C.L.; OLIVEIRA, C.A.S.; OLIVEIRA JÚNIOR, M.P.; MIRANDA, M.Z.; & FAGIOLI, M. Aspectos quantitativos e qualitativos do grão de trigo influenciados por nitrogênio e lâminas de água. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental.** V.15, n.5, p.450-457, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: SNDA/ACS, 2009, 399p.

BRENNAN, E.B.; SMITH, R.F. Winter cover crop growth and weed suppression on the central coast of California.**Weed Technology**, v.19, n.1, p.1017-1024, 2005.

BUENO, J.; AMIAMA, C.; HERNANZ, J.L. No-tillage drilling of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.): Crop residue effects, yields and economic benefits**. Soil & Tillage Research**, v.95, n.1-2, p.61-68, 2007.

CAKMAK, I.; HORST, W.J.Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum,** v.83, n.1, p.463-468, 1991.

CARILLO, P.; COZZOLINO, C.; D'ABROSCA, B.; NACCA, F.; DELLA GRECA, M.; FIORENTINO, A.; FUGGI, A. Effects of the allelochemicals Dihydrodiconiferyl Alcohol and Lariciresinol on metabolism of *Lactuca sativa*.**The Open Bioactive Compounds Journal**, v.3, n.1, p.18-24, 2010.

CARPANEZZI, F.B.; GUALTIERI, S.C.J. Alelopatia de extratos aquosos foliares da exótica invasora *Pittosporum undulatum* na germinação e crescimento do capim-arroz. **Brazilian Journal of Forestry Research**. v.34, n.79, p.173-179, 2014.

CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer. **Acta Botanica Brasilica**, n.21, n.1, p.697-705, 2007.

CARNEIRO, M.M.L.C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P.V.; TEIXEIRA, S.B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M.A.; MORAES, D.M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4 p.752-761, 2011.

CARVALHO, J.A.; PINHO, E.V.R.V.P; OLIVEIRA, J.A; GUIMARÃES, R.M; BONOME, L.T. Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Citromelo swingle*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p 263-270, 2002.

CARVALHO, W.P.; CARVALHO, G.J.; NETO, D.O.A.; TEIXEIRA, L.G.V. Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. **Biosciense Journal**, v. 30, n.1, p.1-11, 2014.

CARVALHO, W.P.; CARVALHO, G.J.; ABBADE NETO, D.O.; TEIXEIRA, L.G.V. Alelopatia de extratos de adubos verdes sobre a germinação e crescimento inicial de alface. **Bioscience Journal**, v.30, n.1, p.1-11, 2014.

CASTAGNARA, D.D.; MEINERZ, C.C.; MULLER, S.F.; SCHMIDT, M.A.H.; PORTZ, T.M.; OBICI, L.V.; GUIMARÃES, V.F. Potencial alelopático de aveia, feijão guandu, azevém e braquiária na germinação de sementes e atividade enzimática do pepino. **Ensaios e Ciência**, v.16, n.2, p.31-42, 2012

CHAPLA, T.E.; CAMPOS, J.B. Allelopathic evidence in exotic guava (*Psidium guajava* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.6, p.1359-1362, 2010.

CHON, S.U.; NELSON, C.J; COUTTS, J.H. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) autotoxicity: Current status. **Allelopathy Journal**, v.18, n.1, p.57-80, 2006.

CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.18, n.1, p.609-630. 1999.

CHOU, C.H. Introduction to allelopathy. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy: A physiological process with ecological implications.** Edição especial. Dordrecht: Springer. 2006. 637p.

CIPOLLINI, D., STEVENSON, R., & CIPOLLINI, K. Contrasting effects of allelochemicals from two invasive plants on the performance of a nonmycorrhizal plant. **International Journal of Plant Sciences**, v.169, n.3, p.371-375, 2008.

CIPOLLINI, D.; RIGSBY, C.M.; BARTO, E.K. Microbes as target and mediators of allelopathy in plants. **Journal Chemical Ecology**, v.38, n.1, p.714-727, 2012.

CRUZ-ORTEGA, R.; NÚÑEZ-LARA, A.; ANAYA, A.L. Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.2, n.4, p.269-270, 2007.

CIPRIANI, F. A.; KAPLAN, M.A.C.; ISAIAS, R.M.S.; SOARES, G.L.G. Avaliação da fitotoxidez de *Tecoma stans* (L.) Kunth. **Floresta e Ambiente, Seropédica**, v. 21, n.1, 2014.

COMIOTTO, A. 1; MORAES, D. M.; LOPES, N. F. Potencial alelopático de extratos aquosos de aroeira sobre germinação e crescimento de plântulas de alface. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.3, p.23-31, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, segundo levantamento**. Safra 2015.

CRUZ-ORTEGA R.; AYALA-CORDERO G.; ANAYA A.L. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato.**Physiologia Plantarum**, v.116, n.1, p.20-27, 2002.

DAILIRI, M.S.; MAZLOOM, P.; TOUDAR, S.; ABOLFATHI, H. Inhibitive effects of barley on germintation and growth of seedling thorn-apple. **American-Eurasian Journal of Agricultural e Enviromental Sciences**, v.10, n.6, p.10000-10005, 2011.

DEUNER, C., MAIA, M.S., DEUNER, S., ALMEIDA, A.; MENEGHELLO, G.E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.711-720, 2011.

DEVIKA, R.; KOILPILLAI, J. An overview on plant secondary metabolites: Its medicinal importance. **Journal of Pharmacy Research**, v.5, n.2, p.984-986, 2012.

DONG, X.; GAO, C.; ZHANG, X.; LIU, Y.; LI, W.; WENG, B.Analysis of allelochemicals and allelopathic effects of *Lolium multiflorum* roots on weeds. **Acta Prataculturae Sinica,** v.4, n.1, p.68-79, 2013.

DORNING, M.; CIPOLLINI, D. Leaf and root extracts of the invasive shrub, *Lonicera maackii,* inhibit seed germination of three herbs with no autotoxic effects. **Plant Ecology**, v.184, n.2, p.287-296, 2006.

DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. **Noções sobre alelopatia**. Jaboticabal, FUNEP, 1993. 68p.

EINHELLIG, F.A. Interactions involving allelopathy in cropping systems. **Agronomy Journal**, v.88, n.1, p.886-893, 1996.

EL-SHABRAWI, H., KUMAR, B., KAUL, T., REDDY, M.K., SILNGLA-PAREEK, S.L.; SOPORY, S. K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. **Protoplasma:An International Journal of Cell Biology**, v.245, n.4, p.85-96, 2010.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statical Databases**. **2013.** Disponível em < http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> Acesso em 02 fev. 2015.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação:** do básico ao aplicado. Edição especial. Porto Alegre: Artmed, 2004, 321 p.

FERREIRA, G. F.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n.1, p.175-204, 2000.

FORMAN, H.J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v.49, n.1, p.835-842, 2010.

FURLAN F.H., MENDES E.R.S., DUCATTI K.R., MARCON G.C. DOMBROSKI T., AMORIM T.M.; RIET-CORREA F. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição da planta em Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, 2014.

GAO, X.; LI, M.; GAO, Z.; ZHANG, H.; SUN, Z., Allelopathic effects of *Conyza Canadensis* the germination and growth of wheat, sorghum, cucumber, rape and radish. **Allelopathy Journal**, v.23, n.2, p.287-296, 2009.

GARCIA, R. D'A**. Qualidade das mudas clonais de dois híbridos de eucalipto em função do manejo hídrico**. 75f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu-SP. 2012.

GATTI, A.B.; PEREZ, S.C.J.G.A.; LIMA, M.I.S. Atividade Aelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na Germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus* L. **Revista Acta Botânica Brasilica**. v.18, n.3, p.459-472, 2004.

GIANNOPOLITIS C.N.; RIES S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, n.1,p.309-314, 1997.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, p.909-930, 2010.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia:** processos ecológicos em agricultura sustentável. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFGRS, 2000. 653p.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machin ery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, p.909-930, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GORLA, C.M.; PEREZ, S.C.J.G.A. Influência de extratos aquosos de folhas de *Miconia albicanstriana*, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit e *Drimys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.19, n.2, p.260-265, 1997.

GULZAR, A.; SIDDIQUI, M.B. root-mediated allelopathic interference of bhringraj (Eclipta alba L.) Hassk. on peanut (*Arachis hypogaea*) and mung bean (*vigna radiata*). **Applied Soil Ecology**, v.87, n.2 p.72-80, 2015.

HABERMANN, E.; IMATOMI, M.; PEREIRA, V.C.; PONTES, F.C.; GUALTIERI, S.C.J. Atividade fitotóxica de cascas do caule e folhas de *blepharocalyx salicifolius* (myrtaceae) sobre espécies infestantes. **Acta botânica Colombiana**, v.20, n.1, p.153-162, 2015.

HAGEMANN, T.R.; BENIN, G.; LEMES, C.; MARCHESE, J.A.; MARTIN, T.N.; PAGLIOSA, E.S.; BECHE, E. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim bravo. **Bragantia**, v.69, n.3, p.509-518, 2010.

HAN, C-M.; PAN, K-W.; WANG, J-C.; LI, W. Allelopathic effect of ginger on seed germination and seedling growth of soybean and chive. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n.3, p.330-336, 2008.

HARUN, M.A.Y.A.;ROBINSON, R.W.;JOHNSON, J.; UDDIN, M.N. Allelopathic potential of *Chrysanthemoides monilifera* subsp. *Monilifera* (boneseed): A novel weapon in the invasion processes. **South African Journal of Botany,** v.93, n.5, p.157-166, 2014.

HOFFMANN, C.E.F.; NEVES, L.A.S.; BASTOS, C.F.; WALLAU, G.L. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.6, n.1, p.11-21, 2007.

HU, G.; ZHANG, Z.H.AqueousTissueExtractsof*Conyza canadensis*Inhibitthe GerminationandShootGrowthofThreeNativeHerbsWithnoAutotoxicEffects. **Planta Daninha,** v.31, n.4, p.69-811, 2013.

HUSSAIN, M. I.; REIGOSA, M. J. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heatenergy dissipation in three C3 perennial species. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.13, p. 453-4545, 2011.

ISMAIL, A.; MOHSEN, H.; BASSEM, J.; LAMIA, H. Chemical composition of *Thuja orientalis* L. essential oils and study of their allelopathic potential on germination and seedling growth of weeds. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, v.48, n.1, p.18-27, 2015.

INDERJIT, A.C.; DAKSHINI, K.M.M. On laboratory bioassays in allelopathy. **Botanical Review**, v.61, n.1, p.28-44, 1995.

INDERJIT, S.T.R.; CALLAWAY, R.M.; POLLOCK, J.L.; KAUR, J. Allelopathy and plant invasions: traditional, congeneric, and bio-geographical approaches. **Biological Invasions**, v.10, n.3, p.875-890, 2008.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARUM, R.; PANNEERSELVAN, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative 26 stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids and Surfaces. **Biointerfaces**, v.60, p.110-116, 2007.

JOSHI, N.; NANGIA, N.; JOSHI, A. Seed germination studies on allelopathic effects of weeds on *Vigna radiata*. **International journal of bioassays**, v.4, n.2, p. 3664-3666, 2015.

JÚNIOR, C.V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

KAUR, S.; SINGH, H.P.; MITTAL, S.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Phytotoxic effects of volatile oil from *Artemisia scoparia* against weeds and its possible use as a bioherbicide.**Industrial Crops and Products**, v.32, n.1, p.54-61, 2010.

KHAN, N., HASHMATULLAH, NAVEED, K., HUSSAIN, Z. & KHAN, S.A. Assessment of allelopathic effects of parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.) plant parts on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Pakistan Journal of Weed Science Research,** v.18, n.1, p.39-50, 2012.

KHAN, R.; KHAN, I.A. Varietal Response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Towards the Allelopathy of Different Weeds. **Sains Malaysiana**, v.44, n.1, p.25-30, 2015.

KHALIQ, A.;MATLOOB, A.; KHAN, M.B.; TANVEER, A.Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 21-28, 2013.

KISSMANN, K. G. & GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2.ed. São Paulo: BASF, 1999. v.2. 978 p.

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

KRUIDHOF, H.M.; BASTIAANS, L.; KROPFF, M.J. Ecological weed management by cover cropping: effects on weed growth in autumn and weed establishment in spring.**Weed Research Journal**, v.48, n.2, p.492-502, 2008.

KRUIDHOF, H.M.; GALLANDT, E.R.; HARAMOTO, E.R.; BASTIAANS, L. Selective weed suppression by cover crop residues: effect of seed mass and timing of species sensitivity. **Weed Research Journal**, v.51, n.1, p.177-186, 2011.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: Conceitos e testes.**Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

KUMAR, N.; BUDANIA, K.; GODARA, S. Allelopathic effect of P*arthenium hysterophorus* on guar crop seeds germination. **Life Sciences Leaflets**, v.60, n.3, p.61-68, 2015.

LABBAFY, F.; MAIGHANY, F.; HEJAZY, A.; KHALAJ, H.; BAGHESTANY, A.M.; ALLAHDADY, I.; MEHRAFARIN, A. Study of allelopathic interaction of wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereal* L.) using equal-compartment-agar method. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v.1, n.2, p.25-28, 2009.

LAMEGO, F.P.; KASPARY, T.E.; RUCHEL, Q.; GALLON, M.; BASSO, C.J.; SANTI, A.L. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate: coberturas de inverno e herbicidas em pré-semeadura da soja. **Planta Daninha**, v.31, n.2, p.433-442, 2013.

LAWLEY, Y.E.; TEASDALE, J.R.; WEIL, R.R. The mechanism for weed suppression by a forage radish cover crop.**Agronomy Journal**, v.104, n.2, p.205-214, 2012.

LI, Z.H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.D.; JIANG, D.A. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v.15, n.12, p.8933-8952, 2010.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Potencial alelopático de *Ipomoea fistulosa* sobre a germinação de alface e tomate. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n.1, p. 409-413, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, FRANCISCO J.A. **Plantas daninhas do Brasil:** terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. São Paulo: Nova Odessa. 2000. p.608.

MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; GALINDO, J.C.G. Allelopathy: a natural alternative for weed Control. **Pest Management Science**, v.63, n.4, p.327-348, 2007.

MAGIERO, E.C.; ASSMANN, J.M.; MARCHESE, J.A.; CAPELIN, D.; PALADINI M.V.; TREZZI, M.M. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v.11, n.3, p.317-324,2009.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlig emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MAIA, J. M.; SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; MACEDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p.342-349, 2012.

MANOEL, D.D.; DOICHE, C.F.R.; FERRARI, T.B.; FERREIRA, G. Atividade alelopática dos extratos fresco e seco de folhas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) e pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* link) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de tomate. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.63-70, 2009.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p.61-69, 2006.

MARCINKEVIČIENĖ, A; KRIAUČIŪNIENĖ , M. Z.; BOGUŽAS, V. AND VELIČKA, R. Allelopathic effects of cover crops on spring barley germination and establishment Aušra. **Journal of Food, Agriculture & Environment,**.v.11, n.3, p.684-688, 2013.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, n.1, p.83-104, 2000.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, n.9, p.405-410, 2002.

MONTEIRO, A.L.G.; MORAES, A.; CORRÊA, E.A.S. **Forragicultura no Paraná**. Londrina-PR: Comissão Paranaense de Avaliação de Forrageiras CPAF. 1996. p. 231-235.

MORAES, L.P.S. DE; GUALTIERI, S.C.J.; LIMA, M.I.S.; GATTI, A.B; PEREIRA, V.C.; MIRANDA, M.A.F.M. Efeitos alelopáticos de *Lafoensia glyptocarpa* Koehne sobre *Sesamum indicum* L. e sobre o crescimento de coleóptilos de *Triticum aestivum* L. **Iheringia Série Botânica**, v.69, n.1, p.37-48, 2014.

MORAES, P.V.D.; AGOSTINETTO, D.; PANOZZO, L.E.; BRANDOLT, R.R.; TIRONI, S.P.; OLIVEIRA, C.; MARKUS, C. Efeito alelopático de plantas de cobertura, na superfície ou incorporadas ao solo, no controle de picão-preto. **Revista da FZVA**, v.17, n.1, p.51-67, 2010.

MORAES, P.V.D; AGOSTINETTO, D.; PANOZZO, L.E.; VIGNOLO, G.K; SANTOS, L.S.; OLIVEIRA, E. Culturas de cobertura com potencial alelopático sobre a emergência de *Digitaria* spp. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias,** v.6, n.2, P. 293-299, 2011.

MORAES, P.V.D; AGOSTINETTO, D.; PANOZZO, L.E; GALON, L.; OLIVEIRA, C.; MAGRO, T.D. Potencial alelopático de extratos aquosos de culturas de cobertura de solo na germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa.* **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.4, p.1299-1314, 2012.

MORI, I.C.; SCHOROEDER, J.I. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. **Plant Physiology**, v.135, n.2, p.702-708, 2004.

MUBEEN, K., NADEEM, M.A., TANVEER, A. & ZAHIR, Z.A. Allelopathic effect of aqueous extracts of weeds on the germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Pakistan Journal of Life & Social Sciences**, v.9, n.1, p.87-92, 2011.

MUNIZ, F.R.; CARDOSO, M.G.; VON PINHO, E.V.R.; VILLELA, M. Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.195-204, 2007.

NAKADA, P.G.; OLIVEIRA, J.A.; MELO, L.C.; SILVA, A.A.; SILVA; P.A.; PERINA; F. J. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, n.3, v.32, p.042-051, 2010.

NAKANO, Y. & K. ASADA.Hydrogen peroxide is scavenged by ascobate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, n.1, p.867-880, 1981.

NAQVI, H.H. Preliminary studies of interference exhibited by Italian ryegrass. **Biologia (Lahore)**, v.18, n.1, p.201-210, 1972.

NAZIF, U.; UL HAQ, I.; SAFDAR, N.; MIRZA, B. Physiological and biochemical mechanisms of allelopathy mediated by the allelochemical extracts of *Phytolacca latbenia* (Moq.) H. Walter. **Toxicology and Industrial Health**, v.19, n.6, p.1-7, 2013.

NERY, M.C; CARVALHO, M.L.M.; NERY, F.C.; PIRES, R.M.O. Potencial alelopático de *Raphanus sativus* L. var. oleiferus. **Informativo ABRATES**, v.23, n.1, p.122-130, 2013.

NETSERE, A. Allelopathic Effects of Aqueous Extracts of an Invasive Alien Weed *Parthenium hysterophorus* L. on Maize and Sorghum Seed Germination and

Seedling Growth. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v.5, n.1, p.120-124, 2015.

NÓBREGA, L.H.P; LIMA, G.P.; MARTINS, G.I.; MENEGHETTI; A.M. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) sob cobertura vegetal. **Acta Scientiarum. Agronomy,** v.31, n.3, p.461-465, 2009.

OLIVEIRA, L.G.A.; BELINELO, V.J.; ALMEIDA, M.S.; AGUILAR, E.B.; VIEIRA FILHO, S.A. Alelopatia de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) na germinação e crescimento inicial de sorgo, pepino e picão preto. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.12, p.1-10, 2011.

OLIVEIRA, A.K.M.; MATIAS, R.; LOPES, S.S.; FONTOURA, F.M. allelopathy and influence of leaves of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) on seed germination and seedling formation in lettuce. **Bioscience Journal**, v.30, n.2, p.938-947, 2014.

OLIVEIRA, M.G.F.; SOUSA, F.A.; OLIVEIRA, K.R.M.; MALVINO, F.C.G.; GÓIS, D.S.; LOPES, K.P. Potencial alelopático de extratos aquosos de folhas de *Mimosa tenuiflora* e semente de *Achyrocline satureioides* sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de alface. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.10, n.3, p.26-33, 2014.

OMEZZINE, F.; LADHARI, A.; HAOUALA, R. Physiological and biochemical mechanisms of allelochemicals in aqueous extracts of diploid and mixoploid *Trigonella foenum-graecum* L. **South African Journal of Botany**, v.93, n.1, p167-178, 2014a.

OMEZZINE, F.; BOUAZIZ, M.; SIMMONDS, M.S.J.; HAOUALA, R. Variation in chemical composition and allelopathic potential of mixoploid *Trigonella foenum-graecum* L. with developmental stages. **Food Chemistry**, v.148, n.1, p.188-195, 2014b.

PACHECO, A. C.; CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO NETO, N. B.; CARVALHO, P. R.; PEREIRA, D. N.; PACHECO, J. G. E. Germinação de sementes de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] e calêndula (*Calendula officinalis* L.) tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, p.61-67, 2007.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.195, n.1, p.442-454, 2009.

PAULA, J. M. et al. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 29, n. 1, p. 217-227, 2011.

PAVARINI, D.P.; PAVARINI, S.P.; NIEHUESA, M.; LOPESA, N.P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.5-16, 2012.

PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L.; REIGOSA, M.J. Allelopathy and abiotic stress. In: **Allelopathy: A physiological process with ecological implications.** Dordrecht: Springer, 2006, p.171-209.

PERES, M.T.L.P.; SIMIONATTO, E.; HESS, S.C.; BONANI, V.F.L.; CANDIDO, A.C.S.; CASTELLI, C. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, v.32, n.4, p.897-901, 2009.

PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G.E. **Sementes:** Fundamentos Científicos e Tecnológicos. 3.ed. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 2012. 573p.

PICCININ, G.G.; BRACCINI, A.L.; DAN, L.G.M.; BAZO, G.L; HOSSA, K.R. & PONCE, R.M. Rendimento e desempenho agronômico da cultura do trigo em manejo com *Azospirillum brasilense*. **Revista Agrarian.** v.6, n.22, p.393-401, 2013.

PISULA, N. L.; MEINERS, S. J. Relative allelopathic potential of invasive plant species in a young disturbed woodland. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 137, n. 1, p. 81-87, 2010.

POLITYCKA, B.; GMEREK, J. Effect of ferulic and pcoumaric acidson the activity of hydrolytic enzymes and growth of radicals in germinating seeds of cucumber and pea. **Allelopthy Journal**, v.21, n.2, p.227-238, 2008.

PRASAD, M.N.V.; SUBHASHINI, P. Mimosine-inhibited seed germination, seedling growth, and enzymes of *Oryza sativa* L. **Journal of Chemical Ecology**, v.20, n.1, p.1689-1696, 1994.

PUPO, N.I.H. **Manual de pastagens e forrageiras:** formação, conservação, utilização. Campinas-SP: Instituto Campineiro de Estudo Agricola. 2002. p.172-180.

PUTNAM, A.R.; TANG, C.S. Allelopathy: State of the science. In: Putnam, A.R. and. Tang, C.S. **The science of allelopathy**. Edição especial. New York: John Wiley & Sons, 1986. P. 1-19.

PYON, J.Y.; PIAO, R.Z.; ROH, S.W.; SHIN, S.Y.; KWAK, S.S. Differential levels of antioxidants in paraquat - resistant and susceptible *Erigeron canadensis* biotypes in Korea. **Weed Biology and Management**, v.4, n.1, p.75-80, 2004.

QIAN, H.; XU, X.; CHEN, W.; JIANG, H.; JIN, Y.; LIU, W. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, v.75, n.3, p.368-375, 2009.

REIGOSA, M.J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. **Allelopathy:** a physiological process with ecological implications. Edição especial, Dordrecht: Springer, 2005, 637p.

REZENDE, C.P.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R.; SANTOS, I. P. A. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens plantas forrageiras. **Boletim Agropecuário.** Lavras: UFLA, 2003. 18p.

RICE, E.L**.Allelopathy***.* 2.ed. Academic Press: New York. 1984. 422p.

ROMAN, E. S.; VARGAS, L.; RIZZARDI, M.A.; MATTEI, R.W. Resistência de azevém (**Lolium multiflorum**) ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v.22, n.2, p.301-306, 2004.

ROMERO-ROMERO, T.; SANCHEZ-NIETO, S.; SAN JUAN-BADILLO, A.; ANAYA, A.L.; CRUZ-ORTEGA, R. Comparative effects of allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae). **Plant Science** v.168, n.4, p.1059-1066, 2005,

ROSA, S.D.V.F.; REZENDE, E.V.R.V.P.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.2, p.91-101, 2005.

RUEDA-AYALA, V.; JAECK, O.; GERHARDS, R. Investigation of biochemical and competitive effects of cover crops on crops and weeds. **Crop Protection,** v.71, n.1, p.79-87, 2015.

SAMAJ, J., F.; BALUSKA; D. MENZEL. New signalling molecules regulating root hair tip growth. **Trends Plant Science,** v.9, n.5, p.217-20, 2004.

SANTOS, J.B.; SILVEIRA, T.P.; COELHO, P.S.; COSTA, O.G.; MATTA, P.M.; SILVA, M.B.; DRUMOND NETO, A.P. Interferências de plantas daninhas na cultura do quiabo. **Planta Daninha**, v.28, n.2, p.255-262, 2010.

SARTOR, L.R.; LOPES, L.; MARTIN, T.N.; ORTIZ, S. Alelopatia de acículas de pínus na germinação e desenvolvimento de plântulas de milho, picão preto e alface **Bioscience Journal**, v.31, n.2, p.470-480, 2015.

SEIGLER, D.S. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. **Agronomy Journal**, v.88, n.6, p.876-885, 1996.

SILVA, V.S.; CÂNDIDO, A.C.S.; MULLER, C.; LAURA, V.A.; FACCENDA, O.; SIMIONATTO, E.; HESS, S.C.; PERES, M.T.L.P. Potencial fitotóxico de *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw. (Gleicheniaceae). **Acta Botânica Brasílica**, v.25, n.1, p.95-104, 2011.

SILVA, W. A. **Potencial alelopático de extratos do cumarú (*Amburana cearensis* A. C. Smith) e da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir) na germinação e crescimento de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), milho (*Zea mays* L.) e feijão guandu (*Cajanus cajan* L.).** Dissertação (mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2007.

SILVEIRA, B.D; HOSOKAWA, R.T.; NOGUEIRA, A.C.; WEBER, V.P. Atividade alelopática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Ciência Florestal, v.24, n.1, p.79-86, 2014.**

SILVEIRA, P.F.; MAIA, S.S.S.; COELHO, M.F.B. Potencial alelopático do extrato aquoso de cascas de jurema preta no desenvolvimento inicial de alface. **Revista Caatinga**, v.25, n.1, p.20-27, 2012.

SINGH, A.; SINGH, D.; SINGH, N.B. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. **Plant Growth Regulation**, v.58, n.1, p.163-171, 2009.

SING, H.P.; BATISH, D.R.; KAUR, S.; RAMEZANI, H.; KOHLI, R.K. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis.* **Annals Applied Biolpgy**, v.141, n.1, p.111-116, 2002.

SINGH, N.B; SUNAINA, K.Y; AMIST, N. Phytotoxic effects of cinnamic acid on cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata).**Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v.9, n.2, p.307-317, 2013.

SINHA, S.; SAXENA, R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacosidea content in medicinal plant *bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, v.62, n.8, p.1340-1350, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** Florianópolis: UFSC. Porto Alegre. 2004. p.1102.

SOUZA, L.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C.A. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.657-668, 2006.

SOUZA FILHO, A.P.S.; TREZZI, M.M.; INOUE, M.H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v.29, n.3, p.709-716, 2011.

SOUZA, S.A.M; CATTELAN, L.V.; VARGAS, D.P.; PIANA, C.F.B; BOBROWSKI, V.L; ROCHAETAL, B.H.G. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface. **Ciências Biológicas e da Saúde,** v.11, n., p.29-38, 2005.

SOUZA FILHO, A.P.S.; GURGEL, E.S.C.; QUEIROZ, M.S.M.; SANTOS, J.U.M. Atividade alelopática de extratos brutos de três espécies de Copaifera (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Planta Daninha**, v.28, n.4, p.743-751, 2010.

SOUZA FILHO, A.P.S.; MOURÃO JUNIOR, M. Padrão de resposta *de Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia* à atividade potencialmente alelopática de espécies de Poaceae. **Planta Daninha**, v. 28, n. especial, p.927-938, 2010.

SOUZA, K. R. D. Desenvolvimento de aerênquima e atividade enzimática em raízes de milho sob encharcamento. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras,2010

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. São Paulo: Artmed. 2013. 879p.

TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING, P. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. **Bioresource Technology**, v.101, n.1, p.5677-5684, 2010.

THORPE, A.S.; THELEN, G.C.; DIACONU, A.; CALLAWAY, R. M. Root exudate is allelopathic in invaded community but not in native community: field evidence for the novel weapons hypothesis. **Journal of Ecology**, v.97, n.4, p.641-645, 2009.

TUR, C.M.; MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; VILLELA, F. A. Atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de rabo-de-bugio sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de alface. **Revista brasileira de Biociências**, v.10, n.4, p.521-525, 2012.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Identificação de biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) resistentes ao herbicida glyphosate em pomares de maçã. **Planta Daninha**, v.22, n.4, p.617-622, 2004.

VELIKOVA, V., YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v.151, n.1, p.59-66, 2000.

VEITCH, G. E.; BOYER, A.; LEY, S. V. The Azadirachtin Story. Angewandte Chemie. **Weinheim**, v.47, n.49, p.9402-9429, 2008.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B**. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância.** Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316. 2010. 16 p.

WANDSCHEER, A.C.D.; PASTORINI, L.H. Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.949-953, 2008.

WANG, C.; DANG, H.S.; TAN, S.D. Study on allelopathy and invasiveness of *Conyza sumatrensis* in the thre Gorges reservoir of the Yangtze River. **Journal of Wuhan Botanical Research**, v.28, n.1, p.90-98, 2010.

WATANABE, Y.; NOVAES, P.; VARELA, R.M.; MOLINILLO, J.M.G.; KATO-NOGUCHI, H.; MACIAS, F.A. Phytotoxic Potential of *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae). **Chemistry & biodiversity**,v.11, n.8, p.1247-1256., 2014.

WEBBER, C.L.; WHITE JR., P.M.; MYERS, D.L.; TAYLOR, M.J.; SHREFLER, J.W. Impact of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Leaf, Bark, and Core Extracts on Germination of Five Plant Species. **Journal of Agricultural Science**, v.7, n.2; 2015.

WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.4, p.472-479, 2004.

WU, A.P.; YU, H.; GAO, S.O.; HUANG, Z.Y.; HE, W.M.; MIAO, S.L.; DONG, M. Differential belowground allelopathic effects of leaf and root of *Mikania micrantha***. Trees Structure and Function**, v.23, n.1, p.11-17, 2009.

WU, H.; WALKER, S. **Fleabane: Fleabane biology and control. 2014.** Disponível em: <http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2014.

YARNIA, M.; BENAM, M.B.K.; TABRIZI, E.F.M.Allelopathic effects of sorghum extracts on *Amaranthus retroflexus*seedgermination and growth.**Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.7, n.3-4, p.770-774, 2009.

YU, J.Q.; YE, S.F.; ZHANG, M.F.; HU, W.H. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber.**Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, n.1, p.129-139, 2003.

ZENG, R. S.; MALLIK, A. U.; LUO, S. **Allelopathy in sustaintable agriculture and forestry**. Edição especial. New York: Springer-Verlag, 2010. 426p.

ZHANG, D.; ZHANG, J.; YANG, W.; WU, F. Potential allelopathic eff ect of Eucalyptus grandis across a range of plantation ages. **Ecolology Research**, v.25, n.1, p.13-23, 2010.