

RESUMO GERAL

A alelopatia é definida como o efeito direto ou indireto, benéfico ou prejudicial, de compostos químicos que são produzidos e liberados no ambiente por plantas ou microorganismos sobre outros indivíduos. No Brasil, várias espécies de gramíneas africanas, entre elas espécies do gênero *Urochloa*, foram introduzidas acidentalmente ou para fins forrageiros, tornando-se invasoras de ecossistemas naturais, principalmente dos ambientes abertos, como campos e cerrados. A presença de gramíneas exóticas nestes ambientes dificulta o processo de regeneração natural, bem como interfere em plantios de espécies para fins de restauração. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Lactuca sativa* (alface), *Allium cepa* (cebola) e da espécie arbórea *Guazuma ulmifolia* (mutambo) em bioensaios em laboratório. Os biotestes foram realizados em diferentes concentrações (0, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹) do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA). Os parâmetros avaliados (porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento aéreo e radicular, atividade da enzima peroxidase e catalase, teor de clorofila e respiração celular das raízes foram influenciados em todos os testes realizados.

PALAVRAS-CHAVE: aleloquímicos, plantas invasoras, fitotoxicidade.

ABSTRACT

Allelopathy is defined as the direct or indirect beneficial or harmful effect of chemical compounds that are produced and released into the atmosphere by plants or microorganisms on other individuals. The allelochemicals are present in almost all plant tissues, including leaves, stems, roots, rhizomes, flowers, fruits and seeds, and its concentration is critical for self defense plants. Allelopathy can cause direct effects on growth and plant metabolism. In Brazil, several species of African grasses, including species of the genus *Urochloa*, or were accidentally introduced for fodder purposes, becoming invasive in natural ecosystems, especially of open habitats, such as fields and savannas. The presence of exotic grasses in these environments complicates the process of natural regeneration, as well as interfere in plantations of species for purposes restoration. Many experimental studies have shown that the presence of grasses can inhibit the growth and survival of seedlings of tree species, the most relating competition as the

main factor. The objective of this study was to evaluate the allelopathic potential of *Urochloa brizantha* and *Urochloa decumbens* on germination and seedling growth of *Lactuca sativa* (lettuce), *Allium cepa* (onion) and the tree species *Guazuma ulmifolia* (mutambo) in laboratory bioassays.

KEY - WORDS: allelochemicals, invasive plants, phytotoxicity.

INTRODUÇÃO GERAL

As espécies vegetais estão constantemente competindo no ambiente por luz, água e nutrientes, podendo resultar na redução da fecundidade, crescimento e sobrevivência dos indivíduos envolvidos (BEGON et al., 2007). Segundo este autor, a competição pode ocorrer de duas maneiras, por exploração ou por interferência. Na competição por exploração, os indivíduos interagem indiretamente entre si, respondendo à redução de recursos decorrente da atividade dos competidores. Já na competição por interferência, conhecida como alelopatia, ocorre através da produção e liberação no ambiente de substâncias (aleloquímicos) que são tóxicas para outras espécies. A síntese destas substâncias, oriundas do metabolismo secundário, pode interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outra planta (ALVES et al., 2004; BEGON et al., 2007).

O termo alelopatia, (do grego *allelon* = de um para o outro, *pathos* = prejuízo) foi proposto em 1937 pelo alemão Hans Molisch, para referir-se às interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas e inclusive entre microorganismos (RICE, 1984). Posteriormente, em 1996, a Sociedade Internacional de Alelopatia definiu-a como a “ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos” (MACIAS et al., 2000).

Os aleloquímicos têm como principal função a proteção dos organismos que os produzem. Sua ação não é muito específica, podendo exercer várias funções, dependendo mais da concentração e translocação do que da própria composição química. As plantas podem produzir dois tipos de aleloquímicos: as fitotoxinas e as fitoalexinas. As primeiras são continuamente produzidas pelas plantas, porém, quando esta é submetida a estresse, sua produção é aumentada. Já as fitoalexinas são produzidas somente quando a planta é submetida a estresse (PINTO et al., 2002). A resistência ou tolerância à estas substâncias é específica, sendo que espécies mais sensíveis tendem a apresentar menores taxas de sobrevivência, pois são influenciadas desde a sua germinação até seu crescimento (PERES et al., 2004).

Os aleloquímicos estão presentes em quase todos os tecidos da planta, incluindo folhas, caules, raízes, rizomas, flores, frutos e sementes, e sua concentração tem fundamental importância na auto defesa das plantas (MACÍAS et al., 2007). Essas substâncias podem ser liberadas no ambiente de várias maneiras: exsudação do sistema radicular, volatilização, decomposição de resíduos e lixiviação através da chuva ou sereno, de toxinas solúveis em água, da parte aérea ou de tecidos subterrâneos (SILVA et al. 2009). Após a liberação pela “planta doadora”, um composto alelopático pode seguir por diferentes vias (ou ser alterado), até causar o efeito negativo ou positivo na “planta receptora” (Figura 1) (REZENDE et al., 2000).

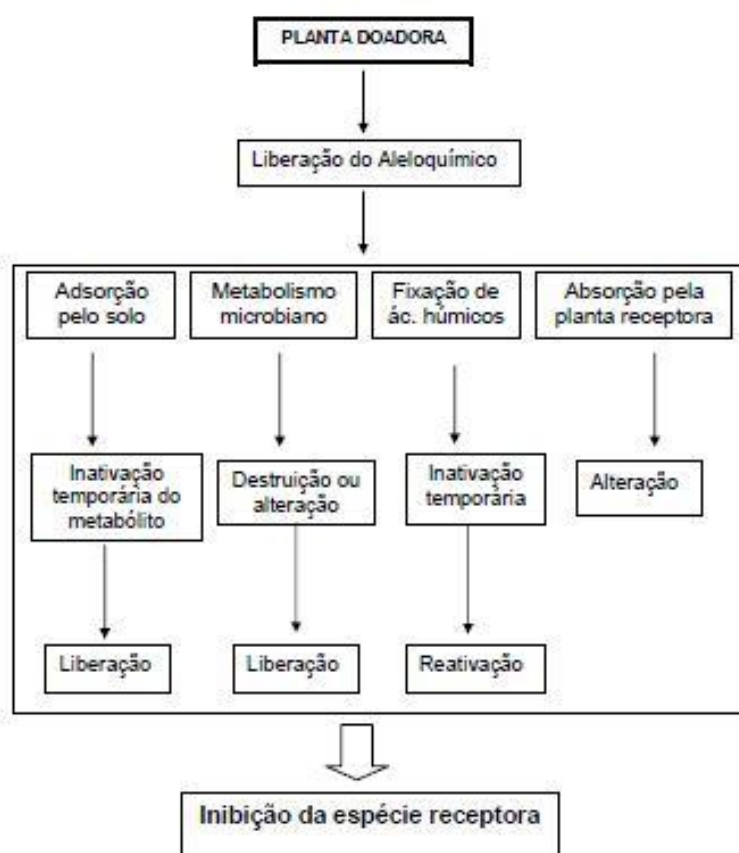


FIGURA 1. Vias prováveis seguidas por compostos químicos da liberação pela planta doadora até causar o efeito alelopático na espécie receptora. (Fonte: REZENDE et al., 2000).

Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas, tornando-se difícil esclarecer o modo de ação destes compostos (SEIGLER, 1996). A alelopatia pode causar efeitos diretos no crescimento e no metabolismo vegetal, tais como alterações em nível celular, fitormonal, fotossintético e respiratório, e ainda, causar efeitos indiretos na biodiversidade local, por causar alterações na sucessão vegetal, na estrutura, dominância de certas espécies e composição das comunidades vegetais (CHOU, 2006). Pode

83 também causar efeitos fisiológicos, devido a interações alelopáticas, na inibição da
84 porcentagem, velocidade da germinação e na redução do crescimento inicial (PEDROL et al.,
85 2006).

86 O mecanismo de ação dos aleloquímicos pode ser dividido em ações diretas e indiretas.
87 As ações indiretas incluem efeitos que promovem alterações nas propriedades do solo, bem
88 como alterações nas populações e/ou atividade de microorganismos, insetos, nematóides e
89 outras. As ações diretas envolvem os efeitos sobre vários aspectos do metabolismo e
90 desenvolvimento das plantas, bem como a inibição da germinação e crescimento (FRITZ et al.,
91 2007). As rotas de síntese de alguns produtos químicos alelopáticos já são conhecidas (Figura
92 2).

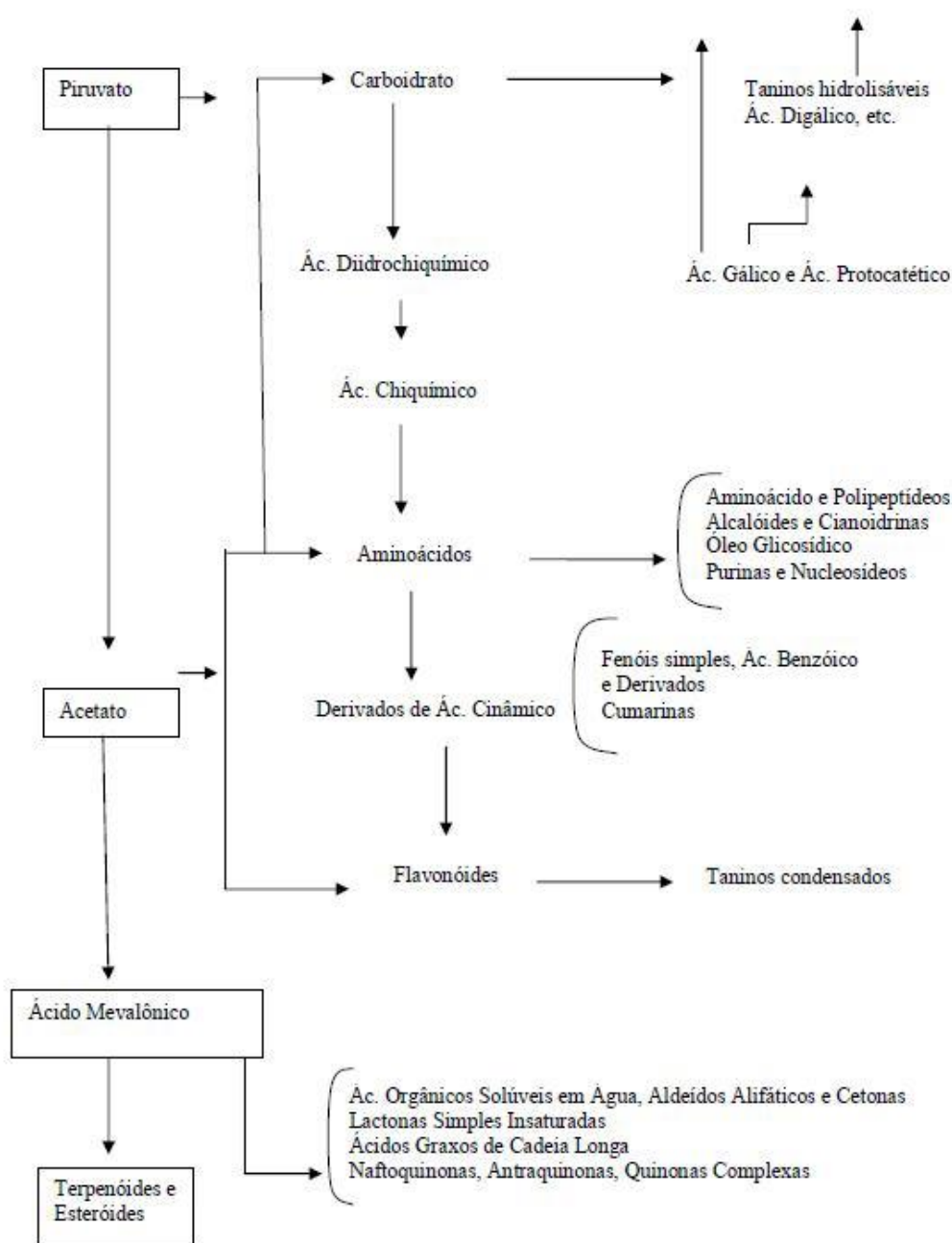


FIGURA 2. Rotas prováveis de síntese de alguns grupos de aleloquímicos. (Fonte: REZENDE et al., 2000).

O estudo de plantas para verificação de potenciais alelopáticos vem se tornando mais comum, muitas dessas plantas como a erva moura (*Solanum americanum* Mill.), *Hovenia dulcis* Thunb., vassoura (*Bacharis dracunculifolia* D.C) e capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) apresentam efeitos alelopáticos que, uma vez conhecidos, servem para a identificação de moléculas de interesse agrônomo, pois são precursoras de herbicidas, inseticidas,

fungicidas e outras moléculas com potenciais de uso (FERREIRA e AQUILA, 2000; BORELLA, 2012; WANDSCHEER et al., 2011).

No Brasil, várias espécies de gramíneas africanas, entre elas espécies do gênero *Urochloa*, foram introduzidas acidentalmente ou para fins forrageiros, tornando-se invasoras de ecossistemas naturais, principalmente dos ambientes abertos, como campos e cerrados (MATOS e PIVELLO, 2009). A presença de gramíneas exóticas nestes ambientes dificulta o processo de regeneração natural, bem como interfere em plantios de espécies para fins de restauração (PIVELLO, 2008). Vários estudos experimentais demonstraram que a presença de gramíneas pode inibir o crescimento e a sobrevivência de plântulas de espécies de árvores, a maioria relacionando a competição como principal fator (GARCÍA-ORTH e MARTINÉZ-RAMOS, 2011; PEREIRA et al., 2013). No entanto, estes estudos não determinam ao certo se estes resultados encontrados seriam decorrentes da competição por exploração ou resultado de competição por interferência. A inibição do estabelecimento e crescimento destas poderia ser atribuída, pelo menos em parte, à alelopatia e esta interação pode representar uma limitação importante no estabelecimento de espécies de árvores em áreas de pastagens.

Há na literatura estudos indicando que gramíneas forrageiras do gênero *Urochloa* apresentam potencial alelopático tanto nas sementes como na parte aérea e nas raízes, inibindo a germinação e desenvolvimento de plantas de diferentes espécies, como o feijão-guandu e eucalipto (FAGIOLI, 2000; SOUSA et al., 2003; BOCCHESI, 2007). No entanto, apesar de comprovada a atividade alelopática do gênero *Urochloa*, como inibitória da germinação e desenvolvimento inicial de plantas herbáceas (SOUZA FILHO et al., 2005; VERONKA et al., 2012), estudos enfocando a alelopatia do gênero na germinação de espécies arbóreas ainda são escassos na literatura, o que poderia afetar a re-introdução destas espécies em áreas degradadas via semeadura direta.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Lactuca sativa* (alface), *Allium cepa* (cebola) e da espécie arbórea *Guazuma ulmifolia* (mutambo) em bioensaios em laboratório.

REFERÊNCIAS

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R. e TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, p.1083-1086. 2004.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R. e HARPER, J. L.. Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas. 4ªed, **Artmed**. 2007.

BORELLA, J.; WANDSCHEER, A.C.D.; PASTORINI, L.H. Efeito alelopático de extratos de folhas de *Solanum americanum* sobre o vigor do rabanete. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.6, n.1, p.44, 2012.

BOCCHESI, R. A.; MELOTTO, A.M.; CÉSAR FILHO, L.C.C.; FERNANDES V.M.; FRANCESCHI, M.L.; LAURAS, A.V. Avaliação da competição entre *Brachiaria brizantha* cv Marandu, espécies arbóreas nativas do Cerrado e *Eucalyptus citriodora*. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, p.153-155, 2007.

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

FAGIOLI, M.; RODRIGUES, T. J. D.; ALMEIDA, A. R. P.; ALVES, P. L. Efeito inibitório da *Brachiaria decumbens* Stapf. Prain. e *B. brizantha* (Hochstex a. Rich.) Stapf. cv. marandu sobre a germinação e vigor de sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). **Boletim da Indústria Animal**. v.57, n.2, p.129-137, 2000.

FERREIRA, A.G. & AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. p. 175-204, 2000.

FRITZ, D.; BERNARDI, A.P.; HASS, J.S.; ASCOLI, B.M.; BORDIGNON, S.A. DE L. e POSER, G.V. Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthum* extracts on *Lactuca sativa* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.17, n.1, p.44-48. 2007.

167 GARCÍA-ORTH, X. e M. MARTÍNEZ-RAMOS. Isolated Trees and Grass Removal Improve
 168 Performance of Transplanted *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae) Saplings in Tropical
 169 Pastures. **Restoration Ecology**. v.19, p.24-34. 2011.

170

171 MACIAS, F.A.; GALLINDO, J.C.G. e MOLINILLO, J.M.G. Plant bio communicators:
 172 Aplication of allelopathic studies. In: **2000 Years of Natural Products Research Past, Present
 173 and Future**, Ed Teus J.C. Luijendijk, Phytoconsult, p.137-161, 2000.

174

175 MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M. e GALINDO, J. C. G. Allelopathy
 176 – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v.63, p.327-348, 2007.

177

178 MATOS, D. M. S.; PIVELLO, V. R. O impacto das plantas invasoras nos recursos naturais de
 179 ambientes terrestres - alguns casos brasileiros. **Ciência Cultura**, v. 61, n. 1, p. 27-30, 2009.

180

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

184

185 PEREIRA, S.R., LAURA, V.A., e SOUZA, A.L. T. Establishment of Fabacea e Tree Species
 186 in a Tropical Pasture: Influence of Seed Size and Weeding Methods. **Restoration Ecology**,
 187 v.21, p.67–74. 2013.

188

189 PERES, M.T.L.P.; SILVA, L.B.; FACCENDA, O. e HESS, S.C. Potencial alelopático de
 190 espécies de Pteridaceae (Pteridophyta). **Acta Botanica Brasilica**. v.18 ,n.4, p.723-730. 2004.

191

192 PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos
 193 Naturais: Atualidade, Ensaio e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

194

195 PIVELLO, V.R. Invasões biológicas no Cerrado Brasileiro: Efeitos da introdução de espécies
 196 exóticas sobre a biodiversidade. **Ecologia info3**. 2008.

197

198 REZENDE, S. P. et al. **Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens**.
 199 Boletim agropecuário. Universidade federal de lavras. Zootecnia/Forragicultura e Pastagens,
 200 UFPA, Lavras - MG. 56p. 2000.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2nd. New York: Academic Press, 1984.

SILVA, A.A.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R. e SANTOS J. B. Biologia de plantas daninhas. In: SILVA, A.A.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Ed. UFV, p. 1-61, 2009.

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

SOUSA, L. S.; VELINI, E. D. e MAIOMONI-RODELLA, R. C. S. Efeito alelopático de plantas daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.3, p.343-354, 2003.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 23, n.1, p. 25-32, 2005.

VERONKA, D.A.; MARQUES, D.C.; CAVADA, L.H.; LAURA, V.A.; VALLE, C.B.; FERREIRA, M.B.; FERREIRA, V.B.N.; GARCEZ, W.S.; RODRIGUES, A.P.D.C. **Efeito alelopático do extrato bruto de *Brachiaria decumbens* na germinação e no vigor de sementes e plântulas de *Brachiaria brizantha***. Documentos 188. Embrapa Gado de Corte, 2012.

WANDSCHEER, A.C.D.; BORELLA, J.; BONATTI, L.C.; e PASTORINI, L. H. Atividade alelopática de folhas e pseudofrutos de *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.1, p.25-30. 2011.

Capítulo 1

Atividade alelopática de *Urochloa brizantha* sobre a germinação, desenvolvimento e estresse oxidativo de plântulas de alface e cebola

Ana Paula Paniagua de Oliveira¹, MarizeTerezinha Lopes Pereira Peres², Valdemir Antônio Laura³

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brasil. ana.op.@hotmail.com

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Engenharias, Arquitetura e Urbanismo e Geografia, CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brasil.

³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

RESUMO

Experimentos em laboratório foram conduzidos para determinar o potencial de atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas obtidas em hexano (FH), acetato de etila (FAE) e etanol-água (FEA) de *Urochloa brizantha* sobre a germinação, o crescimento e estresse oxidativo de alface (*Lactuca sativa* var. Grand rapids) e cebola (*Allium cepa* var. Baia periforme). Os biotestes foram realizados nas concentrações 0, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹. Os parâmetros avaliados (% de germinação, IVG, crescimento aéreo e radicular) foram influenciados de maneira distinta e na grande maioria das vezes de modo dose-dependente, observando-se redução no número de sementes germinadas, retardando a germinação, redução no crescimento do hipocótilo/coleótilo de alface e cebola, e também no comprimento da radícula de alface e cebola. Na avaliação do metabolismo, quanto a atividade da enzima peroxidase, observou-se para ambas espécie-alvo que as soluções-teste aumentaram a atividade da enzima. Na avaliação da enzima catalase em alface o aumento foi observado na maior concentração de EEB e FH e nas demais soluções teste observou-se queda; em cebola todas as soluções-teste provocaram aumento em relação ao controle, exceto nas maiores concentrações de FEA. A produção de clorofila em alface aumentou somente para FH e FAE, e em cebola queda da produção em FAE e aumento em EEB e FEA. A atividade respiratória e a massa seca não diferiram em relação ao controle. Os resultados obtidos sugerem que *U. brizantha* apresenta potencial alelopático para as espécies alface e cebola, em especial para os parâmetros analisados.

PALAVRA-CHAVE: alelopatia, plantas invasoras, aleloquímicos.

Allelopathic activity *Urochloa brizantha* on germination, seedling growth and metabolism of lettuce and onion

ABSTRACT

Laboratory experiments were conducted to determine the potential for allelopathic activity of the crude ethanol extract (EEB) and semi-purified fractions obtained in hexane (FH), ethyl acetate (FAE) and ethanol - water (FEA) of *Urochloa brizantha* on germination, oxidative stress and growth of lettuce (*Lactuca sativa* var . Grand rapids) and onion (*Allium cepa* var . Baia piriform). The bioassays were performed at concentrations of 0, 250, 500 and 1000 mg.l⁻¹. The parameters evaluated (% germination, IVG, shoot and root growth) were influenced differently and in most cases a dose- dependent manner, with a reduction in the number of germinated seeds, delaying germination, reduced growth hypocotyl/coleoptile lettuce and onion, and also in radicle length of lettuce and onion. In the evaluation of metabolism and the activity of the peroxidase enzyme was observed for both target species that test solutions increased the enzyme activity. In the evaluation of the enzyme catalase in lettuce increase was observed at the highest concentration of EEB and FH and in the other test solutions observed falling; onion in all test solutions caused increased compared to control, except at the highest concentrations of FEA. The production of chlorophyll in lettuce increased only for FH and FAE, and falling onion production in FAE and increase in EEB and FEA. The respiration rate and dry mass did not differ from the control. The results suggest that *U. brizantha* presents allelopathic potential for species lettuce and onions, in particular for the parameters analyzed.

KEY-WORDS: allelopathy, invasive plants, allelochemicals.

INTRODUÇÃO

A alelopatia é definida como o efeito direto ou indireto, benéfico ou prejudicial, de compostos químicos que são produzidos e liberados no ambiente por plantas ou microorganismos sobre outros indivíduos (RICE, 1984; SILVA et al., 2009). Os compostos aleloquímicos têm origem no metabolismo secundário e sua principal função é a proteção dos organismos que os produzem (SOUZA-FILHO, 2006). Na natureza, estes compostos podem influenciar o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos circundantes (RAZAVI, 2011), representando um fator ecológico importante na estruturação das comunidades vegetais. Quando substâncias alelopáticas são liberadas no ambiente, os efeitos podem influenciar de

forma negativa ou positiva na germinação e/ou o desenvolvimento de plantas já estabelecidas, uma vez que os aleloquímicos podem proporcionar estresse oxidativo, atuando nos processos de degradação celular, causando danos em processos fisiológicos e alterando o desenvolvimento inicial das plântulas (ALMEIDA et al., 2008).

No Brasil, várias espécies de gramíneas africanas foram introduzidas acidentalmente ou para fins forrageiros. Atualmente cerca de 172 milhões de hectares são ocupados no país por pastagens, sendo destes 95 milhões com espécies do gênero *Urochloa* (muito conhecido como *Brachiaria*) e 60 milhões exclusivos da espécie *U. brizantha* (IBGE 2006). No entanto, em muitos casos, estas espécies tornarem-se invasoras de ecossistemas naturais, principalmente dos ambientes abertos, como campos e cerrados (MATOS e PIVELLO, 2009).

Há na literatura estudos indicando que gramíneas forrageiras do gênero *Urochloa* apresentam potencial alelopático tanto nas sementes como na parte aérea e nas raízes, agindo na inibição da germinação e desenvolvimento de plantas de diferentes espécies, como o feijão-guandu e eucalipto (FAGIOLI, 2000; SOUSA et al., 2003; BOCCHESI, 2007). Os efeitos de compostos potencialmente alelopáticos são pesquisados por meio de extratos aquosos e/ou alcoólicos derivados de plantas e aplicados sobre outros vegetais (VERONKA et al., 2012).

O conhecimento do potencial alelopático de *Urochloa* é importante para o entendimento do processo de ocupação e dominância de pastos formados com essas espécies, a fim de se entender o difícil estabelecimento de espécies nativas em campos ocupados por esta gramínea.

Assim, objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de *Urochloa brizantha* na germinação, crescimento e metabolismo de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*) em bioensaios em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o potencial alelopático de *Urochloa brizantha* foram coletados indivíduos adultos de *U. brizantha* (aproximadamente três quilos de matéria fresca) em dezembro de 2012, nos campos da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS (20°25'27''S e 54°41'16''O). O material coletado (porções aérea e subterrânea) foi fragmentado em pequenos pedaços e acondicionados em saco plástico a -7 °C. Posteriormente o material foi submetido a extração por meio de maceração com etanol absoluto (m/v, 1:2), à temperatura ambiente. Após 7 dias, foi realizada a filtração e o material sólido descartado, sendo o solvente evaporado (\pm 40 °C) sob vácuo em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB). Para obtenção das frações semipurificadas (FS), o EEB foi fracionado através de partição líquido-

líquido com solventes de diferentes graus de polaridade, hexano e acetato de etila, em funil de decantação, sendo obtidas as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAE) e etanol-água (FEA). O teor de água foi determinado a partir de uma alíquota do EEB e das frações, submetida à secagem (100 °C), até obtenção de massa constante. Para o preparo das soluções-teste, o EEB e as FS (FH, FAE, FEA) foram pesados, levando-se em consideração o teor de água e dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al., 2000), obtendo-se a solução estoque de 1000 mg.L⁻¹; as concentrações de 500 e 250 mg.L⁻² foram obtidas por diluição. As soluções-teste foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanossulfônico) a 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH 0,1 N (MACIAS et al., 2000). As frações foram ensaiadas com a eudicotiledônea alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids) e com a monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L. cv. Baia Periforme), pois estas espécies representam uma classe de espécies indicadoras em estudos alelopáticos, devido a sensibilidade a vários aleloquímicos e a resistência das sementes a ampla faixa de pH e potencial osmótico (RICE, 1984).

Nos bioensaios de germinação, foi aplicada a metodologia de Macias et al. (2000). Placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman n°. 1, ambos previamente autoclavados, receberam 5 mL das soluções-teste nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹. Em seguida, foram semeados sobre cada disco de papel filtro 50 diásporos das espécies alvo (alface e cebola), distribuídos aleatoriamente, com 4 repetições para cada solução, conforme Brasil (2009). Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com 5 ml de DMSO 0,1% e a solução tampão MES 10 mM, ajustando o pH para 6,0, quando necessário, com solução KOH 0,1 N (MACIAS et al., 2000). As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W m⁻²), umidade relativa (± 80%) e temperatura constante, adequada a cada espécie alvo (alface, 25 °C com luz interna constante; cebola, 15 °C e fotoperíodo de 12 h) (BRASIL, 2009). A germinação foi avaliada por meio de contagens diárias para a cebola e a cada 12 horas para alface. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão radicular com no mínimo 2 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando não ocorreu germinação por três dias consecutivos (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Nos bioensaios de crescimento foi utilizada a metodologia descrita por Macias et al. (2000). Após a germinação, tendo como critério a protrusão radicular de no mínimo 2,0 mm de comprimento, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento, sendo então transferidas para as placas de Petri contendo as soluções teste, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação. Após três dias da protrusão

radicular para alface e cinco dias para cebola, foi medido o comprimento da raiz e do hipocótilo/coleótilo (dez plântulas por placa), utilizando-se papel milimetrado. Posteriormente, essas plântulas foram levadas a estufa a 60°C até peso constante, para obtenção da massa seca.

Para a determinação dos teores de clorofila foram macerados 20 mg da parte aérea das plântulas-alvo em DMSO 0,1% (Dimetilsulfóxido), sendo posteriormente o macerado deixado em repouso no escuro por 24 horas, a temperatura ambiente. Após este período as absorbâncias das soluções contendo clorofila foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total (ARNON, 1949).

A respiração potencial das células radiculares foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifeniltetrazólio (TTC) pela atividade da enzima desidrogenase e do surgimento do formazan. Para a avaliação dessa característica as raízes foram cortadas a 1,0 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas (20 mg) e em seguida transferidas para tubos de ensaios, onde foram adicionados 3,0 mL de TTC 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os tubos de ensaios foram mantidos sob vácuo em dessecadores, por duas horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30°C por 15 horas. Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e descartadas; em seguida as raízes foram lavadas uma vez com água destilada que posteriormente, também foi drenada ao máximo e descartada. Os tubos de ensaios contendo as raízes foram novamente transferidos para banho-maria com água fervente ($\pm 100^\circ\text{C}$), sendo então adicionados 7 mL de etanol 95% (v/v) em cada um deles. Decorridos 10 minutos as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento a temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol a 95% (v/v). As absorbâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 530 nm e os resultados expressos nos valores da absorbância (STEPONKUS e LANPHEAR, 1967).

Para a avaliação da atividade enzimática, primeiramente as plântulas frescas (1,0 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e tampão fosfato de potássio (6,0 mL; 0,2 M; pH 7,0). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático (ZENG et al., 2001). Para a atividade da peroxidase (POD) uma alíquota de 10 μL de extrato foi adicionado em tubos de ensaio contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio (0,2 M; pH 7,0); em seguida os tubos foram levados para banho-maria até a estabilização da temperatura a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 100 μL de guaiacol (0,5%), 100 μL de H_2O_2 (0,08%) e, imediatamente, efetuou-se as leituras de absorbância em espectrofotômetro na

absorbância de 470 nm, com 3 repetições para cada tratamento. A atividade da POD foi calculada usando o coeficiente de extinção de $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e o resultado foi expresso em $\mu\text{moles de tetraguaiacol produzido (mg de proteína)}^{-1}$ (ZENG et al., 2001). Para a avaliação da atividade da catalase (CAT) 100 μL de extrato enzimático foram adicionados a 3,0 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (12,5 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0), a 30°C. Em seguida foi realizada as leituras da absorbância a 240 nm, com 3 repetições para cada tratamento (CAKMAK e MARSCHNER, 1992).

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, em relação à testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados em arco seno para a análise estatística. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS

A germinação e o vigor das duas espécies avaliadas (alface e cebola) foram influenciados de forma distinta tanto pela utilização de diferentes extratos, como pela concentração dos mesmos, mostrando-se dose dependente, exceto para o EEB em alface. O EEB e a FH inibiram a germinação de ambas as espécies-alvo em todas as concentrações ensaiadas. Sendo as maiores inibições verificadas na maior concentração do EEB e FH em cebola. (Tabela 1).

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) das duas espécies-alvo foi influenciado de forma inversamente proporcional em relação ao aumento da concentração, sendo o aumento das concentrações das soluções-teste reduziu de forma gradativa o valor do IVG, exceto para o EEB em alface. A fração FH foi a que mais interferiu no IVG de alface, e o EEB no IVG de cebola, atrasando a germinação (Tabela 1).

No crescimento da parte aérea das plântulas-alvo, todas as soluções-teste reduziram significativamente o crescimento do hipocótilo/coleóptilo de ambas as espécies (Figura 1). Para alface, a FH e a FAE apresentaram diferenças significativas entre as soluções-teste e o controle, porém não entre as diferentes concentrações. Para a espécie-alvo cebola, as soluções-teste apresentaram resultados semelhantes quanto ao parâmetro do crescimento aéreo, onde os ensaios demonstraram uma relação inversamente proporcional, isto é, com o aumento da concentração diminui o comprimento do coleóptilo (Figura 1).

O crescimento da raiz de plântulas de alface foi inibido em todas as soluções-teste e concentrações ensaiadas, com exceção do EEB. Assim como observado para a porção aérea de

alface, a raiz também sofreu maior queda no crescimento para FH e FAE, independente da concentração. Já para a cebola, nenhuma das soluções-teste influenciou no crescimento de raízes de plântulas, exceto o EEB (Figura 1).

A atividade enzimática das plântulas das duas espécies avaliadas foi influenciada tanto pelo tipo de extrato como pela concentração utilizada. Para a alface, a produção de peroxidase (POD) apresentou um aumento para as concentrações utilizadas, em relação ao controle (Figura 2), sendo a FEA a que apresentou o maior aumento da produção de peroxidase em qualquer uma das concentrações utilizadas, em relação ao controle. Já em cebola, a atividade da POD elevou-se e com o aumento da concentração utilizada em todas frações, exceto na FH, onde ocorreu uma queda na produção (Figura 2).

A atividade da catalase (CAT) em alface foi reduzida nas frações FAE e FEA com o aumento das concentrações utilizadas em relação ao controle; já para o EEB ocorreu uma queda nas menores concentrações e um aumento na maior concentração, e para a FH a diferença foi somente para a maior concentração. Para a cebola, observou-se um aumento na produção de catalase em todas as soluções-teste em relação ao controle (Figura 2).

A massa seca não apresentou diferença significativa em nenhuma solução-teste e concentração realizadas.

A produção de clorofila em plântulas de alface não foi influenciada pelo EEB e pela FEA. Para a fração FH, houve um aumento da produção em concentrações intermediárias enquanto que para a fração FAE o aumento da concentração resultou em aumento da produção de clorofila (Figura 3). Em plântulas de cebola, a produção de clorofila foi estimulada nas soluções-teste EEB e FEA; sendo que a maior produção de clorofila ocorreu para as concentrações intermediárias. Para a fração FH, não houve alteração significativa da produção de clorofila enquanto que na fração FEA, a maior concentração resultou em uma redução significativa de produção (Figura 3).

A atividade respiratória das células das raízes das plântulas de alface e cebola não sofreu influência na presença das soluções-teste em nenhuma concentração (Figura 3).

DISCUSSÃO

Os bioensaios de germinação de sementes na presença de extratos vegetais são pontos de partida para a investigação de alelopatia intra e inter específicos (HAMDI et al. 2001). Tanto para alface quanto para cebola, a queda no número de sementes germinadas foi proporcional ao aumento da concentração em todas as soluções teste, exceto para EEB em alface. Estudos recentes mostram que, além da porcentagem final de germinação, o padrão de germinação,

identificado por diferenças tanto na velocidade como na sincronia desse processo, também pode ser modificado pela ação de aleloquímicos (SANTANA et al., 2006). A importância desses estudos se baseia no fato de que as sementes constituem unidades biológicas por meio das quais processos ecológicos, como a invasão de novos nichos por espécies não nativas, a colonização de novos habitats e a regeneração da vegetação nativa, dentre outros, podem ser desencadeados.

Assim como a germinação foi influenciada de maneira geral para menor germinabilidade, o IVG também apresentou queda com o aumento das concentrações nos testes, fato que pode influenciar na sincronia da germinação e sobrevivência das espécies no campo; pois os aleloquímicos presentes em uma determinada espécie poderia diminuir a velocidade de germinação de outras e, se o desenvolvimento das outras espécies é prejudicado, mesmo germinando, a plântula não consegue vencer as interferências e se instalar, estabelecendo sua prole (FERREIRA e BORGUETTI, 2004). A redução no vigor das sementes, pode acarretar em uma perda progressiva da capacidade produtiva, redução na uniformidade da germinação, indicando maior ou menor probabilidade de sucesso após a semeadura (SANTANA e RANAL, 2006). No presente estudo, observou-se que o IVG das espécies teste foi, de forma geral, negativamente afetado por *U. brizantha*, sugerindo que esta espécie poderá alterar o padrão de estabelecimento de outras espécies a campo. Se analisar para as culturas agrícolas, não são desejados atrasos na germinação das sementes, pois predispõem as sementes por mais tempo ao ataque de pragas, doenças de solo e herbivoria (CASTAGNARA et al., 2012), podendo também justificar esse malefício para as comunidades vegetais naturais. Com a queda da porcentagem de germinação acompanhando o aumento das concentrações, na maior parte dos testes, e também com o menor vigor das sementes, pode inferir-se que substância química do metabolismo secundário presente nas soluções-teste de *U. brizantha* afetam a germinação das espécies-alvo. Abordando esse comportamento na natureza, o impedimento da germinação de sementes quimicamente sensíveis a substâncias alelofitotóxicas pode ter como consequência a diminuição da densidade de seus indivíduos o que, em médio e longo prazos, pode levar à extinção local dessa espécie, com implicações para a biodiversidade local (LEVIN, 1970; CALLAWAY et al. 2005).

Após a germinação outros fatores podem influenciar no estabelecimento de determinada espécie; como o tamanho absoluto das plântulas que pode afetar o seu estabelecimento em determinado ambiente, a competição por recursos e a herbivoria (GUREVITCH et al. 2009). Os resultados obtidos no presente estudo, indicam que substâncias alelopáticas produzidas por *U. brizantha*, presentes em todas as soluções-teste inibiram o crescimento radicular e aéreo de

alface, e o aéreo de cebola. A alteração no comprimento de órgãos da plântula está relacionada à modificação no balanço hormonal do vegetal (ALVES e SANTOS, 2002).

A produção de clorofila nas plântulas de alface e cebola não foi inibida na presença das soluções teste. O aumento da clorofila pode estar relacionado à tentativa de aclimação da espécie ao fator de estresse, devido sua função fotoprotetora (MARENCO e LOPES, 2005).

Quanto à influência na respiração celular das raízes para a cebola, não foram detectadas alterações significativas. A presença de aleloquímicos pode alterar a atividade respiratória celular interferindo em várias etapas desse processo (CHON et al., 2000). Estudos indicam que o milho teve a respiração das raízes inibida em até 90%, enquanto o pepino apresentou um aumento nessa atividade respiratória (DURIGAN e ALMEIDA 1993), portanto a respiração das células radiculares pode sofrer aumento ou queda, dependendo da natureza química dos compostos presentes nos vegetais estudados.

De maneira geral, as espécies teste utilizadas apresentaram aumento na produção de peroxidase pela exposição às soluções de *U. brizantha*, exceto para FH em cebola. Já para catalase (CAT) o aumento em alface foi somente para FH, porém em cebola observou-se aumento em todas as soluções teste. Alguns aleloquímicos induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, modificando a permeabilidade das membranas e a formação de lignina, que contribuem para a redução do comprimento da parte radicular ou aérea (FERRARESE et al., 2000). Devido a queda no comprimento da parte aérea, tal fator pode evidenciar a ineficiência destas enzimas no processo de desintoxicação dos tecidos da plântula ao ser submetida às maiores concentrações do extrato de *U. brizantha*.

Os vegetais constituem a fonte mais abundante para enzimas da classe oxidorreductase. A peroxidase faz parte deste grupo, atuando na proteção antioxidativa. e ainda catalisando uma variedade de reações envolvendo transferências de elétrons (CHANCE & MAEHLI, 1955). Segundo Rabinovitch et al. (2004) e Sinsabaugh (2010), a expressão da peroxidase parece ser uma resposta ao estresse oxidativo e à presença de compostos fenólicos. Estudos indicam que essas enzimas estão relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas em situações de estresse, ativando sua atividade se a planta detectar algum fator anormal no ambiente e que venha ocasionar estresse para sua sobrevivência (MARAFON et al., 2009).

Os aleloquímicos estimulam a produção de oxigênio reativo por diversos mecanismos. Por exemplo, o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o O₂ formando superóxido (FOREMAN et al., 2003). Estudos têm demonstrado que os aleloquímicos produzidos por *Secale cereale* L. reduziram o crescimento

radicular de *Cucumis sativus* L., pois causam mudanças nas estruturas celulares das raízes (BURGOS et al., 2004).

Os resultados obtidos evidenciam que os extratos de *U. brizantha* tem ação inibitória sobre o metabolismo das plantas-alvo, bem como interferem no crescimento. Verificou-se também aumento da atividade de enzimas antioxidantes o que indica indução do metabolismo de defesa em resposta aos extratos. Todos esses processos metabólicos são cruciais para o estabelecimento de qualquer planta. Todas as soluções teste interferiram no desenvolvimento e metabolismo das espécies ensaiadas, sendo a FH e a FAE as frações que causaram maior inibição no crescimento e na germinação, e a FH a que causou maior atividade de enzimas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que *U. brizantha* apresenta potencial alelopático para as espécies alface e cebola, em especial para os parâmetros de germinação, crescimento das plântulas e na produção de enzimas sinalizadoras de estresse.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEB), frações hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *Urochloa brizantha* sobre o

564 índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de alface e
 565 cebola.

566

<i>Urochloa brizantha</i> Germinabilidade (%G)			
Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹
Alface; Controle: 66,0			
EEB	36,0*	40,0*	34,0*
FH	35,0*	34,5*	34,0*
FAE	53,5	52,0	51,0
FEA	55,0	48,5	44,0
Cebola; Controle: 70,0			
EEB	59,5*	41,5*	24,5*
FH	73,5*	59,0*	31,0*
FAE	78,0	65,0*	64,5*
FEA	81,0	78,5	77,5
Índice de velocidade de germinação (IVG)			
Alface; Controle: 15,6			
EEB	13,5	13,0	12,5
FH	5,9*	3,5*	1,8*
FAE	12,1*	10,1*	7,1*
FEA	8,7*	8,5*	7,3*
Cebola; Controle: 6,1			
EEB	2,7*	2,6*	1,5*
FH	4,9*	4,1*	3,4*
FAE	5,4*	4,3*	3,8*
FEA	5,7	5,5	5,2

567

568

569

570

571

572

573

574

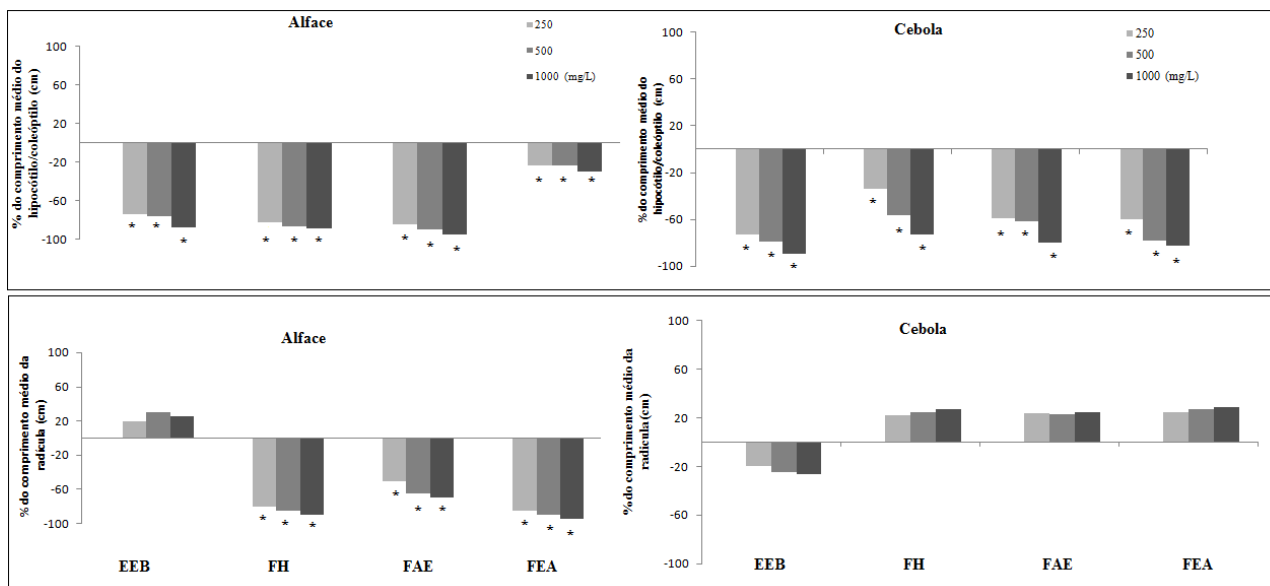


Figura 1. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *Urochloa brizantha* sobre o crescimento do hipocótilo/coleóptilo e radícula das plântulas de alface e cebola (EEB= extrato etanólico bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

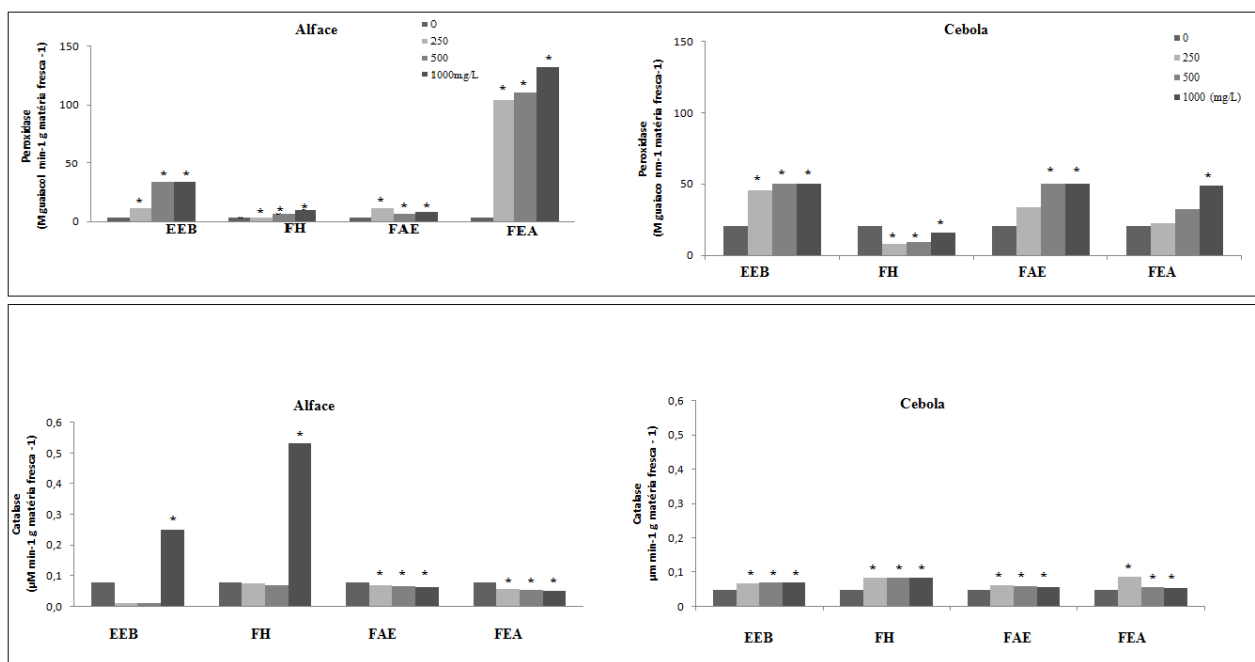


FIGURA 2. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *U. brizantha* sobre a atividade peroxidase e catalase das plântulas de alface e cebola. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (EEB= extrato etanólico bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

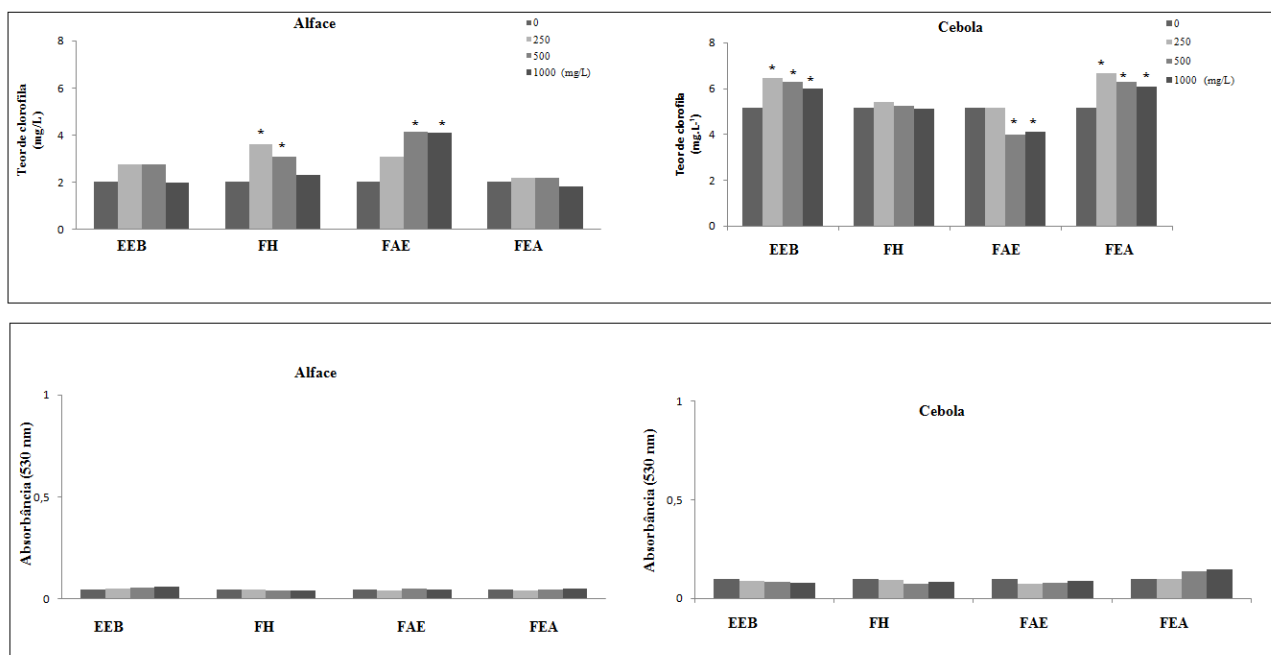


FIGURA 3. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *U. brizantha* sobre o teor médio de clorofila total a parte aérea e atividade respiratória das células das raízes das plântulas de alface e cebola. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (EEB= extrato etanólico bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. D. de; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- ALVES, S. M. & SANTOS, L. S. Natureza química dos agentes alelopáticos. In: SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. (Ed.). *Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais*. Belém:Embrapa Amazônia Oriental. p. 25-47. 2002.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Betavulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.
- BOCCHESI, R. A.; MELOTTO, A.M.; CÉSAR FILHO, L.C.C.; FERNANDES V.M.; FRANCESCHI, M.L.; LAURAS, A.V. Avaliação da competição entre *Brachiaria brizantha* cv Marandu, espécies arbóreas nativas do Cerrado e *Eucalyptus citriodora*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p.153-155, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, Brasília. 2009.
- BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E.; KIM, K.S.; KUK, Y.I. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). **Journal Chemistry Ecology**, v.30, n.3, p.671–689, 2004.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology**, v.98, p.1222–1227, 1992.
- CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M.; LABOSKI, T.; WEIR, T. & VIVANCO, J.M. Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants. **Journal of Ecology**, v.93, p. 576-583. 2005.

CASTAGNARA, D.D.; MEINERZ, C.C.; MULLER, S.F.; HARTMANN, S.M.; 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. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. v.16, n.2, p. 31-42. 2012.

CHANCE, B., MAEHLY, A.C. Assay of catalase and peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-775, 1955.

CHON, S.U.; COUTTS, J.H.; NELSON, C.J. Effects of light, growth media and seedling orientation on bioassays of alfafa autotoxicity. **Agronomy Journal**, v.92, p. 715-720, 2000.

DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n.9, p. 2079-2093, 2000.

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

FAGIOLI, M.; RODRIGUES, T. J. D.; ALMEIDA, A. R. P.; ALVES, P. L. Efeito inibitório da *Brachiaria decumbens* Stapf. Prain. e *B. brizantha* (Hochstex a. Rich.) Stapf. cv. marandu sobre a germinação e vigor de sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). B. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.57, n.2, p.129-137, 2000.

FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE FILHO. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiologia e Plantarum**, v. 22, p. 121-124, 2000.

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

FERREIRA, A.G. e BORGUETTI F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Ed. Artmed; 222 p. 2004.

FOREMAN, J.V.; DEMIDCHIK, J.H.F.; BOTHWELL, P.; MYLONA, H.; MIEDEMA, M.A.; TORRES, P.; LINSTED, S.; COSTA, C.; BROWNLEE, J.D.G.; JONES, J.M.; DAVIES, L.

Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v.422, n.6930, p.442-445, 2003.

GUREVITCH, J.; SCHEINER, S.M.; FOX, G.A. **Ecologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2009.

HAMDI, A.B. Laboratory bioassays for phytotoxicity: an exemple from wheat straw. **Agronomy Journal**. p.43-48. 2001.

IBGE. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf> Acesso em: 10 jan. 2014.

LEVIN, S.A. Community equilibria and stability, and an extension of the competitive exclusion principle. **The American Naturalist**.v.104,p.413-423. 1970.

MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; CASTELLANO, D.; VELSACO, R.F. Sesquiterpene lactones with potencial use as natural herbicides models.2. Guaianolides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5288-5296, 2000.

MARAFON, A.C.; HERTER, F.L.G.; BACARIN, M.A.; HAWERROTH, F.J. Atividade da peroxidase durante o período hibernar de plantas de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch.) cv. jubileu com e sem sintomas da morte precoce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.4, p. 938- 942, 2009.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 2. ed.Viçosa: UFV. 451 p. 2005.

MATOS, D. M. S.; PIVELLO, V. R. O impacto das plantas invasoras nos recursos naturais de ambientes terrestres: alguns casos brasileiros. **Ciência e Cultura**, v. 61, n.1, p. 27-30, 2009.

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASILCHENKO, L.G.Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. Applied. **Biochemistry and Microbiology**,v. 40, p. 1-17, 2004.

717 RAZAVI, S. M. Plant coumarins as allelopathic agents. **International Journal of Biological**
718 **Chemistry**, Pakistan, v. 5, n. 1, p. 86-90, 2011.

719

720 RICE, E.L. **Allelopathy**. 2nd. New York: Academic Press, 1984.

721

722 SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, C.V. & SILVA, R.M.G. Germination
723 measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**.v.17, p.43-52. 2006.

724

725 SINSABAUGH, R. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. **Soil**
726 **Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 391-404, 2010.

727

728 SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; SANTOS J. B. Biologia de plantas
729 daninhas. In: SILVA, A.A.; SILVA, J.F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa:
730 Ed. UFV, p. 1-61, 2009.

731

732 SOUSA, L. S.; VELINI, E. D.; MAIOMONI-RODELLA, R. C. S.; Efeito alelopático de plantas
733 daninhas e concentrações de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) no desenvolvimento
734 inicial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*). **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.3, p.343-354, 2003.

735

736 SOUZA-FILHO, A. P. da S. **Alelopatia e as plantas**. Belém:Embrapa Amazônia Oriental. 159
737 p. 2006.

738

739 STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyltetrazolium chloride method
740 of determining cold injury. **Plant Physiology**, v. 42, p. 1423-1426, 1967.

741

742 VERONKA, D.A.; MARQUES, D.C.; CAVADA, L.H.; LAURA, V.A.; VALLE, C.B.;
743 FERREIRA, M.B.; FERREIRA, V.B.N.; GARCEZ, W.S.; RODRIGUES, A.P.D.C. **Efeito**
744 **alelopático do extrato bruto de *Brachiaria decumbens* na germinação e no vigor de**
745 **sementes e plântulas de *Brachiaria brizantha***. Documentos 188. EmbrapaGado de Corte,
746 2012.

747

748 ZENG, R.S.; LUO, S.M.; SHI, Y.H.; SHI, M.S.; TU, C.Y. Physiological and Biochemical
749 Mechanism of Allelopathy of Secalonic Acid F on Higher Plants. **Agronomy Journal**, v. 93,
750 p. 72–79, 2001.

751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780

Capítulo 2

Atividade alelopática de *Urochloa decumbens* sobre a germinação, desenvolvimento e metabolismo de alface e cebola

Ana Paula Paniagua de Oliveira¹, Marize Terezinha Lopes Pereira Peres², Valdemir Antônio Laura³

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brasil. ana.op.@hotmail.com

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Engenharias, Arquitetura e Urbanismo e Geografia, CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brasil.

³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

RESUMO

Experimentos em laboratório foram conduzidos para determinar o potencial de atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB) e frações semipurificadas obtidas em hexano (FH), acetato de etila (FAE) e etanol-água (FEA) de *U. decumbens* sobre a germinação, o crescimento e metabolismo de alface (*Lactuca sativa* var. Grand rapids) e cebola (*Allium cepa* var. Baia periforme). Os biotestes foram feitos para diferentes concentrações (0, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹). Os parâmetros avaliados (% de germinação, IVG, crescimento aéreo e radicular) foram influenciados de maneira distinta e na grande maioria das vezes de modo dose-dependente, reduzindo o número de sementes germinadas, retardando germinação, reduzindo o crescimento do hipocótilo/coleótilo de alface e cebola, porém para radícula em alface aumentando o crescimento nas soluções-teste, e em cebola não diferindo do controle. Na avaliação do metabolismo observou-se que as soluções-teste elevaram a atividade da enzima peroxidase em ambas espécie-alvo. Na avaliação da enzima catalase em alface observou queda na produção na FAE e EEB, e aumento na FH, já em cebola observou aumento em todas as soluções-teste, exceto nas maiores concentrações da FAE. A produção de clorofila em alface apresentou aumento significativo no EEB e FAE, e em cebola na FAE e FEA. A atividade respiratória apresentou queda na respiração somente na FAE em alface, e em cebola não diferindo comparado ao controle. Os resultados obtidos sugerem que *U. decumbens* apresenta potencial alelopático para as espécies alface e cebola, em especial para os parâmetros analisados.

PALAVRAS- CHAVES: pastagem, fitotoxicidade, interferência química.

Allelopathic activity of *Urochloa decumbens* on the germination and seedlings of lettuce and onion

ABSTRACT

Laboratory experiments were conducted to determine the potential for allelopathic activity of the crude ethanol extract (EEB) and semi-purified fractions obtained in hexane (FH), ethyl acetate (FAE) and ethanol - water (FEA) of *U. decumbens* on germination, growth and

metabolism of lettuce (*Lactuca sativa* var . Grand rapids) and onion (*Allium cepa* var . Baia piriform). The bioassays were performed at different concentrations (0, 250 , 500 and 1000 mg.l⁻¹). The parameters evaluated (% germination , IVG, shoot and root growth) were influenced differently and in most cases a dose- dependent manner , reducing the number of germinated seeds, delaying germination , reducing growth of hypocotyl/ coleoptile of lettuce and onions, lettuce radicle however for increasing growth in test solutions, and onion did not differ from control. In the evaluation of metabolism was observed that the test solutions increased the activity of the peroxidase enzyme in both target species. In the evaluation of the enzyme catalase in lettuce observed drop in production in the FAE and EEB, and increased FH, onion already observed an increase in all test solutions except at the highest concentrations of FAE. The production of chlorophyll in lettuce showed a significant increase in EEB and FAE, and onion in the FAE and FEA. The respiratory activity decreased in respiration only in FAE lettuce, onion and no difference compared to the control. The results suggest that *U. decumbens* has allelopathic potential for species lettuce and onions, in particular for the parameters analyzed.

KEY- WORDS: pasture, phytotoxicity, chemical interference.

INTRODUÇÃO

Espécies de plantas invasoras geram grande problema para as plantas nativas de determinado ambiente, sendo a *Urochloa decumbens*, uma espécie introduzida como forrageira e que está se tornando uma importante infestante (KISSMANN, 1997). No Brasil, existem mais de 172 milhões de hectares (ha) de pastagem, dos quais aproximadamente 95 milhões de ha são cultivados com espécies de *Urochloa*, sendo constituídos, por *U. decumbens* (25 milhões de ha), (IBGE, 2006).

As plantas podem afetar quimicamente seu ambiente de várias maneiras, como empregar uma "guerra química" para obter vantagem sobre competidores. Tal fenômeno, denominado alelopatia, poderia ser uma das maneiras das plantas garantirem sucesso no estabelecimento (GUREVITCH, 2009). A alelopatia é definida como o efeito inibitório ou benéfico, direto ou indireto, de uma planta sobre outra, via produção de compostos químicos que são liberados no ambiente (RICE, 1984). Na natureza estes compostos podem influenciar o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos circundantes (RAZAVI, 2011), tornando-se um fator ecológico importante na formação das comunidades vegetais. A alelopatia poderá influenciar a germinação, uma vez que os aleloquímicos podem proporcionar estresse oxidativo, atuando nos

processos de degradação celular, causando danos em processos fisiológicos e alterando o desenvolvimento inicial das plântulas (ALMEIDA et al., 2008).

Maciel et al. (2003) avaliaram os efeitos alelopáticos de *U. decumbens* no desenvolvimento inicial de duas leguminosas, e observaram resultados positivos para alelopatia. Há ainda estudos que indicam a vantagem dessa espécie em liberar fitoquímicos de tecidos mortos, incorporados ao solo através de lixiviação, facilitando seus efeitos no campo, ou ainda a capacidade de *U. decumbens* reduzir drasticamente a quantidade de nitrogênio no solo (SOUZA et al. 1997).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de atividade alelopática de *Urochloa decumbens* na germinação, crescimento e metabolismo de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*), em bioensaios em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados indivíduos adultos (aproximadamente três quilos de matéria fresca) em dezembro de 2012, nos campos da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS (20°25'27''S e 54°41'16''O). O material coletado (porções aérea e subterrânea) foi fragmentado a -7 °C, para posterior extração através de maceração com etanol absoluto (m/v, 1:2), à temperatura ambiente. Após 7 dias, foi feita filtração e o material sólido descartado, sendo o solvente evaporado (± 40 °C) sob vácuo em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB). Para obtenção das frações semipurificadas (FS), o EEB foi fracionado por meio de partição líquido-líquido com solventes de diferentes graus de polaridade, hexano e acetato de etila, em funil de decantação, sendo obtidas as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAE) e etanol-água (FEA). O teor de água foi determinado a partir de uma alíquota das frações, submetida à secagem (100 °C), até obtenção de massa constante. Para o preparo das soluções-teste, o EEB e as FS (FH, FAE, FEA) foram pesados, levando-se em consideração o teor de água e dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al. 2000), obtendo-se a solução-teste estoque de 1000 mg.L⁻¹; as concentrações de 500 e 250 mg.L⁻¹ foram obtidas por diluição. As soluções-teste foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanossulfônico) a 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH 0,1 N (Macias et al. 2000). As soluções-teste foram ensaiadas com a eudicotiledônea alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids) e com a monocotiledônea cebola (*Allium cepa* L. cv. Baia Periforme) espécies indicadoras em estudos alelopáticos, devido a sensibilidade a vários aleloquímicos e a resistência das sementes a ampla faixa de pH e potencial osmótico (RICE, 1984) .

889 No bioensaio de germinação, foi aplicada a metodologia de Macias et al. (2000). Placas
890 de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1, ambos previamente
891 autoclavados, receberam 5 mL das soluções-teste nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg L⁻¹.
892 Em seguida, foram semeados sobre cada disco de papel filtro 50 diásporos das espécies alvo
893 (alface e cebola), distribuídos aleatoriamente, com 4 repetições para cada solução, conforme
894 Brasil (2009). Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com 5 mL somente de
895 DMSO 0,1% e a solução tampão MES 10nM. As placas de Petri contendo os diásporos foram
896 levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W m⁻²), umidade
897 relativa (\pm 80%) e temperatura constante, adequada a cada espécie alvo (alface, 25 °C com luz
898 interna constante; cebola, 15 °C e fotoperíodo de 12 h) (BRASIL, 2009). A germinação foi
899 avaliada por meio de contagens diárias para a cebola e a cada 12 horas para alface. Foram
900 consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão radicular com no mínimo 2
901 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando não ocorreu
902 germinação por três dias consecutivos (FERREIRA e AQUILA, 2000).

903 No bioensaio de crescimento foi utilizada a metodologia descrita por Macias et al. (2000).
904 Após a germinação, tendo como critério a protrusão radicular de no mínimo 2,0 mm de
905 comprimento, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento,
906 sendo então transferidas para as placas de Petri contendo as soluções-teste, utilizando-se
907 procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação. Após três dias da protrusão
908 radicular para alface e cinco dias para cebola, foi medido o comprimento da raiz e do
909 hipocótilo/coleótilo (dez plântulas por placa), utilizando-se papel milimetrado.
910 Posteriormente, essas plântulas foram levadas a estufa a 60°C até peso constante, para obtenção
911 da massa seca.

912 Para a determinação dos teores de clorofila foram macerados 20 mg da parte aérea das
913 plântulas em DMSO 0,1% (Dimetilsulfóxido), sendo posteriormente o macerado deixado em
914 repouso no escuro por 24 horas, a temperatura ambiente. Após este período as absorvâncias das
915 soluções contendo clorofila foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645
916 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de
917 clorofila total (ARNON, 1949).

918 A respiração potencial das células radiculares foi estimada por meio da redução do
919 cloridrato de trifeniltetrazólio (TTC) pela atividade da enzima desidrogenase e do surgimento
920 do formasan. Para a avaliação dessa característica as raízes foram cortadas a 1,0 cm a partir da
921 coifa, sendo tomadas as suas massas (20 mg) e em seguida transferidas para tubos de ensaios,
922 onde foram adicionados 3,0 mL de TTC 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os

tubos de ensaios foram mantidos sob vácuo em dessecadores, por duas horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30°C por 15 horas. Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e descartadas; em seguida as raízes foram lavadas uma vez com água destilada que posteriormente, também foi drenada ao máximo e descartada. Os tubos de ensaios contendo as raízes foram novamente transferidos para banho-maria com água fervente ($\pm 100^\circ\text{C}$), sendo então adicionados 7 mL de etanol 95% (v/v) em cada um deles. Decorridos 10 minutos as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento a temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol a 95% (v/v). As absorbâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 530 nm e os resultados expressos nos valores da absorbância (STEPONKUS e LANPHEAR, 1967).

Para a avaliação da atividade enzimática, primeiramente as plântulas frescas (1,0 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e tampão fosfato de potássio (6,0 mL; 0,2 M; pH 7,0). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático (ZENG et al., 2001). Para a atividade da peroxidase (POD) uma alíquota de 10 μL de extrato foi adicionado em tubos de ensaio contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio (0,2 M; pH 7,0); em seguida os tubos foram levados para banho-maria até a estabilização da temperatura a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 100 μL de guaiacol (0,5%), 100 μL de H_2O_2 (0,08 %) e, imediatamente, efetuou-se as leituras de absorbância em espectrofotômetro na absorbância de 470 nm, com 3 repetições para cada tratamento. A atividade da POD foi calculada usando o coeficiente de extinção de $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e o resultado foi expresso em μmoles de tetraguaiacol produzido $(\text{mg de proteína})^{-1}$ (ZENG et al., 2001). Para a avaliação da atividade da catalase (CAT) 100 μL de extrato enzimático foram adicionados a 3,0 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (12,5 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0), a 30°C. Em seguida foi realizada as leituras da absorbância a 240 nm, com 3 repetições para cada tratamento (CAKMAK e MARSCHNER, 1992).

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, em relação à testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados em arco seno para a análise estatística. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS

A germinação e o vigor das duas espécies avaliadas (alface e cebola) foram influenciados de forma distinta tanto pela utilização dos diferentes extratos, como pela concentração dos mesmos. As soluções-teste inibiram a germinação de alface e cebola em todas as concentrações ensaiadas, porém, as menores concentrações de FEA e FAE, acarretaram um estímulo na germinação, de ambas as espécies em relação ao controle, embora não significativo (Tabela 1).

O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) também sofreu influência distinta para ambas as espécies, onde as concentrações das soluções teste diminuíram de forma gradativa o valor do IVG para alface, com o aumento na concentração, fato que interfere no vigor das sementes. Para cebola observa-se que o EEB foi a única soluções-teste que interferiu no IVG em todas as concentrações, causando redução, ao passo que as soluções das frações FAE e FEA acarretaram aumento do IVG.

No crescimento das plântulas, todas as soluções-teste reduziram significativamente o crescimento do hipocótilo/coleótilo de ambas as espécies alvo, exceto o extrato bruto para alface que não apresentou diferença significativa no comprimento do hipocótilo em relação ao controle. E para cebola a FH, na maior concentração, foi a que causou maior fitotoxicidade no crescimento aéreo (Figura 1).

O crescimento da raiz de alface diferiu em todos os testes realizados apresentando menor crescimento, exceto para EEB (Figura 2).

A atividade da peroxidase (POD) foi aumentada em todos os testes para ambas espécies; sendo a FEA a solução-teste que causou a maior produção desta enzima nas três concentrações testadas. Em cebola observa-se que o efeito foi dose-dependente, exceto para FH (Figura 2).

A atividade de catalase (CAT) apresentou-se de forma distinta para as espécies alvo, porém em alface observa-se uma queda em sua produção nos testes realizados; somente para a FH ocorreu um pequeno aumento na atividade, ao passo que para cebola observa-se aumento da enzima em todos os testes realizados (Figura 2).

A produção de clorofila das plântulas de alface foi aumentada na presença do EEB para a maior concentração, e não apresentou diferença significativa para as frações quando comparado ao controle. Para cebola, observa-se um aumento da enzima quando submetida as frações mais polares e nas menores concentrações (Figura 3).

A atividade respiratória das células das raízes das plântulas de alface e cebola não sofreu influência quando submetida ao EEB e frações em nenhuma concentração, exceto na FAE em que a alface sofre uma gradativa queda na respiração.

DISCUSSÃO

Os bioensaios de germinação com extratos vegetais são ponto de partida para a investigação da alelopatia, embora haja controvérsia em relação a este tipo de experimento (HAMDI et al. 2001). Muitos pesquisadores afirmam que as sementes apresentam menor sensibilidade aos aleloquímicos do que as plântulas devido a processos seletivos e evolutivos (FERREIRA e AQUILA 2000). Porém estudos recentes mostram que, embora a porcentagem final de germinação não seja significativamente afetada pela ação de aleloquímicos, o padrão de germinação pode ser modificado, verificando-se diferenças na velocidade e na sincronia da germinação de sementes (SANTANA et al. 2006). No campo, a interferência da germinação de sementes quimicamente sensíveis a substâncias fitotóxicas liberadas por outros indivíduos, pode diminuir a densidade de certos indivíduos, podendo levar à extinção local dessa espécie, afetando a biodiversidade local (CALLAWAY et al. 2003).

Assim como a germinação foi influenciada de maneira geral para menor germinabilidade, o IVG também apresentou queda com o aumento das concentrações nos testes, fato que pode influenciar na sincronia da germinação e sobrevivência das espécies no campo; pois os aleloquímicos presentes em uma determinada espécie poderia diminuir a velocidade de germinação de outras e, se o desenvolvimento das outras espécies é prejudicado, mesmo germinando, a plântula não consegue vencer as interferências e se instalar, estabelecendo sua prole (FERREIRA e BORGUETTI, 2004). A redução no vigor das sementes, pode acarretar em uma perda progressiva da capacidade produtiva, redução na uniformidade da germinação, indicando maior ou menor probabilidade de sucesso após a semeadura (SANTANA e RANAL, 2006). No presente estudo, observou-se que o IVG das espécies teste foi, de forma geral, negativamente afetado por *U. decumbens*, sugerindo que esta espécie poderá alterar o padrão de estabelecimento de outras espécies a campo. Se analisar para as culturas agrícolas, não são desejados atrasos na germinação das sementes, pois predispõem as sementes por mais tempo ao ataque de pragas, doenças de solo e herbivoria (CASTAGNARA et al., 2012), podendo também justificar esse malefício para as comunidades vegetais naturais. Com a queda da porcentagem de germinação acompanhando o aumento das concentrações, na maior parte dos testes, e também com o menor vigor das sementes, pode inferir-se que substância química do metabolismo secundário presente nas soluções-teste de *U. decumbens* afetam a germinação das espécies-alvo.

O crescimento da radícula foi pouco influenciado nos tratamentos estudados, sendo que estudos realizado por Peres, 2004 indicam que a emergência da radícula ocorre às custas de suas reservas, por isso, acarreta menor sensibilidade à presença de aleloquímicos do que o crescimento das plântulas.

A atividade das enzimas peroxidase (POD) e catalase (CAT) aumentou em algumas soluções-teste estudadas, ao passo que em outras houve queda da atividade dessas enzimas. Alguns aleloquímicos induzem o aumento da atividade de enzimas oxidativas, modificando a permeabilidade das membranas e a formação de lignina, que contribuem para a redução do alongamento radicular (FERRARESE et al., 2000). O aumento na atividade da CAT já foi observado em outros estudos sob a ação de aleloquímicos, onde foi verificado que o ácido ferulico aumentou a atividade da CAT em plântulas de milho (DEVI e PRASAD, 1996). Os vegetais constituem a fonte mais abundante para enzimas da classe oxidorreductase. A peroxidase faz parte deste grupo, atuando na proteção antioxidativa. e ainda catalisando uma variedade de reações envolvendo transferências de elétrons (CHANCE; MAEHLY, 1955). Estudos indicam que essas enzimas estão relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas em situações de estresse (ROSSI e LIMA 2001).

Estudos têm demonstrado que os aleloquímicos produzidos por *Secale cereale* L. reduzem o crescimento radicular de *Cucumis sativus* L., pois causam mudanças nas estruturas celulares das raízes (BURGOS et al., 2004). O que sugere que os distúrbios nas membranas celulares resulta em mudanças na permeabilidade das membranas, destruição dos cloroplastos, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático. Esses processos fisiológicos anormais resultam na redução da fotossíntese, contribuindo para a redução do crescimento das plantas (BURGOS et al., 1994).

Em algumas classes de aleloquímicos a fotossíntese é inibida por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (CHOU, 1999). Porém nesse estudo não observamos a redução de clorofila para as espécie-alvo e sim um aumento na produção de clorofila em cebola, quando submetidas a FAE.

A atividade respiratória das células das raízes das plântulas de alface sob os tratamentos foi menor somente quando submetida a FAE nas maiores concentrações ensaiadas. A respiração celular também pode ser fortemente afetada pela presença de aleloquímicos (RICE, 1984; CHON et al., 2000) que interferem em várias etapas desse processo em um ou mais níveis, dos quais dependem as respostas observadas (CHON et al., 2000). Em estudo com compostos isolados das folhas, da casca dos frutos secos e da casca do tronco de indivíduos do gênero *Juglans* (Juglandaceae), foi observado redução em até 90% da respiração das raízes de milho, enquanto o macerado de folhas de artemisia (*Artemisia tridentata* Nutt.) acelerou a respiração das células radiculares de pepino (DURINGAN e ALMEIDA 1993). Logo, a respiração das células radiculares pode ser aumentada ou diminuída, dependendo da natureza química dos compostos presentes nos vegetais empregados.

Nos resultados de fitotoxicidade, verificou-se que os extratos de *U. decumbens* inibiram a germinação, o crescimento do hipocótilo/coleótilo, bem como estimularam a presença de enzimas que indicam fatores de estresse de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*). Os resultados obtidos evidenciam que os extratos de *U. decumbens* têm ação inibitória sobre as variáveis do metabolismo analisadas das plantas-alvo, com aumento da atividade de enzimas antioxidantes o que indica indução do metabolismo de defesa em resposta aos extratos. Todos esses processos metabólicos são cruciais para o estabelecimento de qualquer planta.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *Urochloa decumbens* sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de alface e cebola.

<i>Brachiaria decumbens</i>			
Índice de velocidade de germinação (IVG)			
Tratamento ¹	250 mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹
Alface; Controle: 66,0			
EEB	47,0	36,0	34,0*
FH	43,5	41,5	39,5
FAE	35,0*	34,5*	26,0*
FEA	56,5	53,5	48,5
Cebola; Controle: 85,0			

EEB	61,5*	59,5*	51,5*
FH	71,0*	68,0*	65,5*
FAE	65,0*	63,5*	68,0*
FEA	64,0*	61,5*	69,0*

Germinabilidade(%)			
Alface; Controle: 60,0			
EEB	23,7*	23,5*	17,0*
FH	32,5	30,5	27,0*
FAE	44,0	39,5	25,0*
FEA	45,0	39,0	37,5
Cebola; Controle: 83,0			
EEB	48,5*	39,5*	35,5*
FH	75,0	67,5	43,0*
FAE	85,0	78,5	75,0
FEA	85,0	78,5	75,5

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

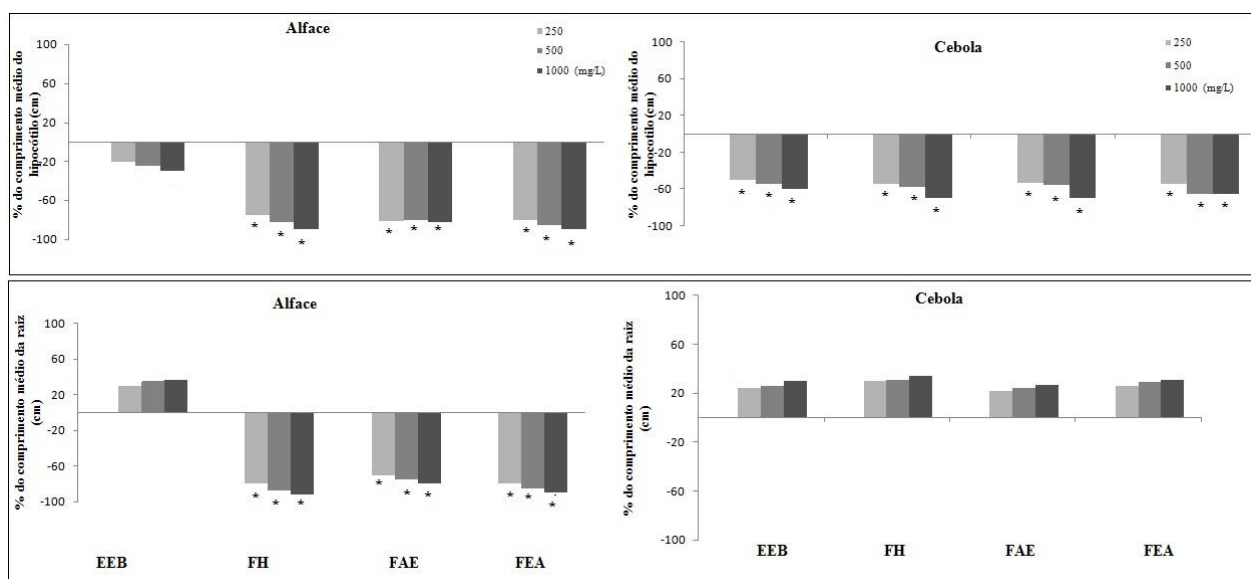


Figura 1. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *U. decumbens* sobre crescimento do hipocótilo/coleóptilo e raiz das plântulas de alface e cebola (EEB= extrato etanólico bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

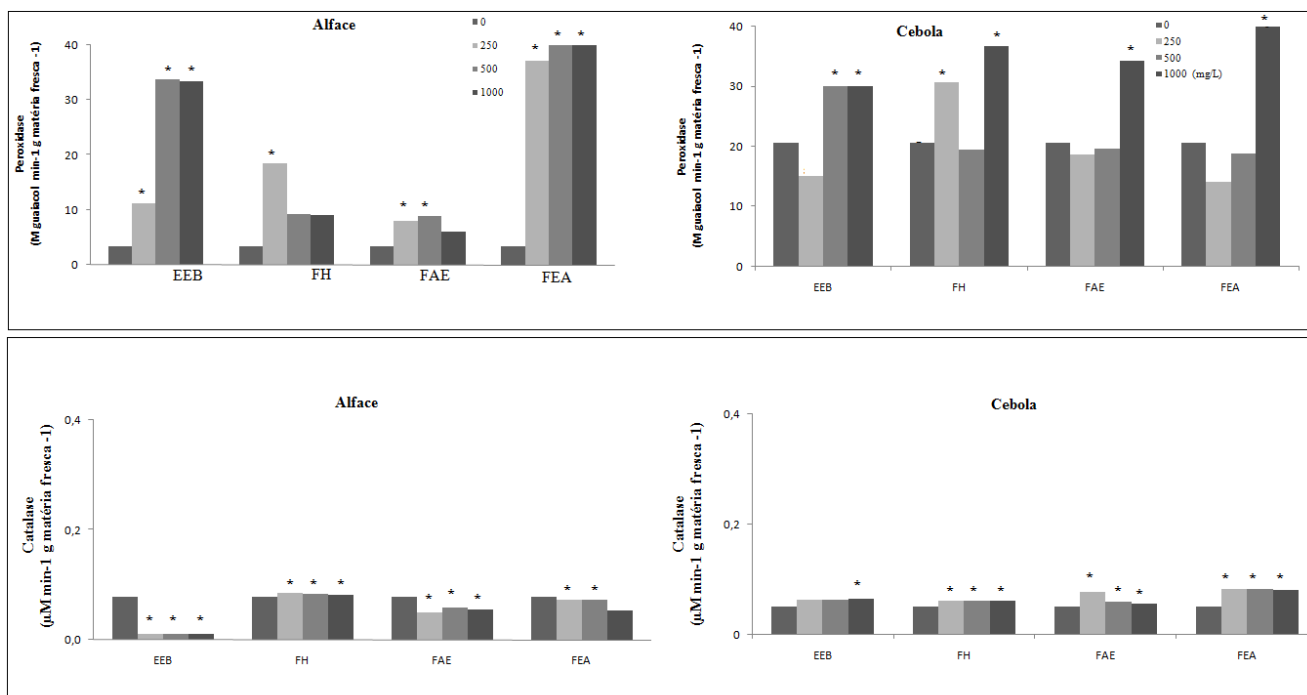


FIGURA 2. Efeito das diferentes concentrações do extrato de *U. decumbens* sobre a atividade peroxidase e catalase das plântulas de alface e cebola. (EEB= extrato etanólico bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

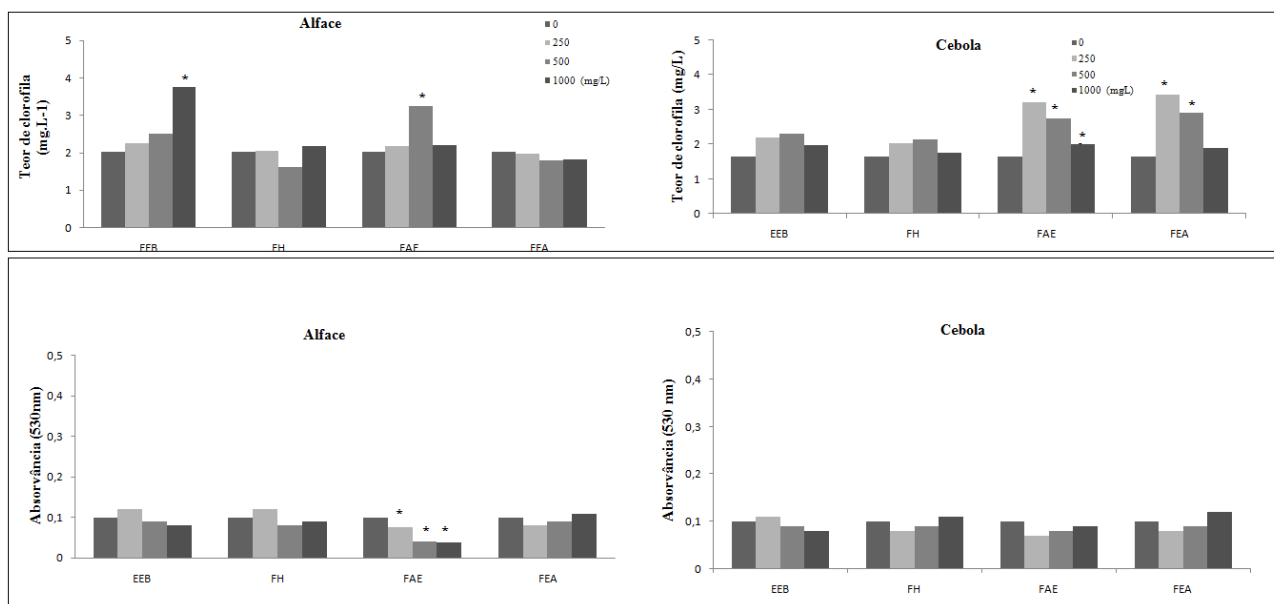


FIGURA 3. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *U. decumbens* sobre o teor médio de clorofila total na parte aérea e respiração das células das raízes das plântulas de alface e cebola. (EEB= extrato etanólico bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. D. de; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, F. M. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, Brasília. 2009.
- BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E.; KIM, K.S.; KUK, Y.I. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). **Journal Chemistry Ecology**, v.30, n.3, p.671–689, 2004.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology**, v.98, p.1222–1227, 1992.
- CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M.; LABOSKI, T.; WEIR, T. e VIVANCO, J.M. Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants. **Journal of Ecology**.p.576-583, 2005.
- CASTAGNARA, D.D.; MEINERZ, C.C.; MULLER, S.F.; HARTMANN, S.M.; 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: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. v.16, n.2, p. 31-42. 2012.
- CHANCE. B. AND A. C. MAEHLI. Assay of catalase and peroxidases. **Methods Enzymology**.v.2, p. 764-775, 1955.
- CHON, S.U.; COUTTS, J.H.; NELSON, C.J. Effects of light, growth media and seedling orientation on bioassays of alfafa autotoxicity. **Agronomy Journal**, v.92, p. 715-720, 2000.

1176
 1177 CHOU, C.H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical**
 1178 **Reviews in Plant Sciences**, v.18, n.5, p.609-630, 1999.
 1179
 1180 DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural
 1181 phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n.9, p. 2079-2093, 2000.
 1182
 1183 DEVI R.S. & PRASAD M.N.V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize
 1184 seedlings: implications in growth. **Biological Plants**.v. 38, p.387-395, 1996.
 1185
 1186 DURIGAN, J.C.; ALMEIDA, F.L.S. **Noções sobre alelopatia**. Jaboticabal: FUNEP, 1993.
 1187
 1188 FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE FILHO. Ferulic acid
 1189 uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiologia e Plantarum**, v. 22, p. 121-124,
 1190 2000.
 1191
 1192 FERREIRA, A.G. e AQUILA, M.E.A. Alelopatia, uma área emergente da ecofisiologia.
 1193 **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12** (edição especial), p.175-204, 2000.
 1194
 1195 FERREIRA, A.G. e BORGUETTI F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Ed.
 1196 Artmed; 222 p. 2004.
 1197
 1198 GUREVITCH, J.; SCHEINER, S.M.; FOX, G.A. **Ecologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed.
 1199 2009.
 1200
 1201 HAMDI, A.B. Laboratory bioassays for phytotoxicity: an exemple from wheat straw.
 1202 **Agronomy Journal**, p.43-48, 2001.
 1203
 1204 IBGE. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf)
 1205 [agropecuaria/censoagro/brasil_2006/ Brasil_censoagro2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf)> Acesso em: 10 jan. 2014.
 1206 KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira. 825 p. 1997.
 1207
 1208 MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; CASTELLANO, D.; VELSAO, R.F. Sesquiterpene
 1209 lactones with potencial use as natural herbicides models. 2. Guaianolides. **Journal of**
 1210 **Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5288-5296, 2000.

1211

1212 MACIEL, C. D. G. et al. Influência do manejo da palhada de capim-braquiária (*Brachiaria*

1213 *decumbens*) sobre o desenvolvimento inicial de soja (*Glycine max*) e amendoim-bravo

1214 (*Euphorbia heterophylla*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 3, p. 365-373, 2003.

1215

1216 PERES, M.T.L.P.; SILVA, L.B.; FACCENDA, O.; HESS, S.C. Potencial alelopático de

1217 espécies de Pteridaceae (Pteridophyta). **Acta Botanica Brasilica**.v.18,n.4, p.723-730. 2004.

1218

1219 RAZAVI, S. M. Plant coumarins as allelopathics agents. **International Journal of Biological**

1220 **Chemistry**, Pakistan, v. 5, n. 1, p. 86-90, 2011.

1221

1222 RICE, E.L. **Allelopathy**. 2nd. New York: Academic Press, 1984.

1223

1224 ROSSI, C.; LIMA, G.P.P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de

1225 sementes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p.197-199, 2001.

1226

1227 SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, C.V. e SILVA, R.M.G. Germination

1228 measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**.p.43-52. 2006.

1229

1230 STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyltetrazoliumhloride method

1231 of determining cold injury. **Plant Physiology**, v. 42, p. 1423-1426, 1967.

1232

1233 ZENG, R.S.; LUO, S.M.; SHI, Y.H.; SHI, M.S.; TU, C.Y. Physiological and Biochemical

1234 Mechanism of Allelopathy of Secalonic Acid F on Higher Plants. **AgronomyJournal**, v. 93, p.

1235 72–79, 2001.

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

Capítulo 3

Potencial alelopático de duas espécies de *Urochloa* sobre *Guazuma ulmifolia*

Ana Paula Paniagua de Oliveira¹, Marize Terezinha Lopes Pereira Peres², Valdemir Antônio Laura³

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brasil. ana.op.@hotmail.com

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Engenharias, Arquitetura e Urbanismo e Geografia, CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brasil.

³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

RESUMO

A inibição do estabelecimento de espécies arbóreas em áreas de pastagem poderia, pelo menos em parte, ser atribuída à alelopatia, e esta interação pode representar uma limitação por alterar tanto os padrões de germinação como de crescimento destas espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de *U. brizantha* e *U. decumbens* na germinação, crescimento e metabolismo de *Guazuma ulmifolia*. Os biotestes foram feitos para diferentes concentrações (0, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹). Os parâmetros avaliados (% de germinação, IVG, crescimento aéreo e radicular) foram influenciados de maneira distinta e na grande maioria das vezes de modo dose-dependente, reduzindo o número de sementes germinadas, retardando germinação, reduzindo o crescimento do hipocótilo/coleótilo. Os resultados obtidos sugerem que *U. brizanthae* *U. decumbens* apresentam potencial alelopático para *G. ulmifolia* em especial para os parâmetros de germinação, crescimento da parte aérea e radicular, bem como alteraram o metabolismo, indicando a indução de estresse da espécie arbórea.

PALAVRAS-CHAVE: gramínea, atividade biológica, aleloquímicos.

Allelopathic potential of two species of *Urochloa* on *Guazuma ulmifolia*

ABSTRACT

Inhibition of establishment of trees in a grazing areas could, at least in part, be attributed to allelopathy , and this interaction can represent a limitation by changing the patterns of both germination and growth of these species. The objective of this study was to evaluate the

allelopathic potential *U. brizantha* and *U. decumbens* on germination, growth and metabolism *Guazuma ulmifolia*. The bioassays were performed at different concentrations (0, 250, 500 and 1000 mg.l⁻¹). The parameters evaluated (% germination, IVG, shoot and root growth) were influenced differently and in most cases a dose- dependent manner, reducing the number of germinated seeds, delaying germination, reducing growth of hypocotyl/coleoptile. The results suggest that *U. brizantha* e *U. decumbens* present allelopathic potential for *G. ulmifolia* especially for the parameters of germination, growth of shoots and roots, as well as altered metabolism, indicating the induction of stress on the tree species.

KEY- WORDS: grass, biological activities, allelochemicals

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas tropicais têm sido intensamente alterados nas últimas décadas (FAO 1999) e grande parte destas áreas têm sido destinadas à formação de pastagens (CHEUNG et al., 2010). Muitas destas áreas, contudo, têm sido abandonadas devido à diminuição na produtividade por exaustão do solo ou mudanças na economia local (HOLL 1998; HOOPER et al., 2002; FLORENTINE e WESTBROOKE 2004). Após o abandono, áreas intensamente utilizadas por um longo período normalmente não contemplam mais em seu banco de sementes espécies-alvo desejáveis, e a recolonização natural tende a ser lenta ou inviável (WAGNER et al., 2011). Por isso uma reintrodução ativa é normalmente necessária (PYWELL et al., 2007).

Diversos trabalhos têm mostrado a eficácia da utilização de semeadura direta de espécies arbóreas em projetos de restauração, como técnica de menor custo financeiro e de mais fácil operacionalização que plantio de mudas (CAMARGO et al., 2002; WOODS e ELLIOTT, 2004; SOVU et al., 2010). Segundo Mattei & Rosenthal (2002), ainda há poucos exemplos de implantação de florestas por semeadura direta na América Latina, sendo que ainda são necessários experimentos que avaliem a eficiência dessa técnica em áreas de pastagens abandonadas (FLORENTINE e WESTBROOKE, 2004) e os fatores que podem influenciar negativamente a utilização da mesma.

A competição com gramíneas pode inibir o crescimento e a sobrevivência de plântulas de espécies de árvores em áreas de pastagem, conforme relatado por Griscom et al. (2009), García-Orth e Martínéz-Ramos (2011) e Pereira et al. (2013). No entanto, estes estudos não determinam ao certo se estes resultados encontrados seriam somente decorrentes da competição por exploração ou se seriam adicionalmente resultado de competição por interferência. A

competição por interferência, conhecida como alelopatia, ocorre através da produção e liberação no ambiente de substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas (aleloquímicos) que são tóxicas para outras espécies. A síntese destas substâncias, oriundas do metabolismo secundário, pode interferir em alguma etapa do ciclo de vida de outra planta, desde a sua germinação (PERES, 2004; BEGON et al., 2007). Assim, a inibição do estabelecimento de espécies arbóreas em áreas de pastagem poderia, pelo menos em parte, ser atribuída à alelopatia, e esta interação pode representar uma limitação por alterar tanto os padrões de germinação como crescimento destas espécies.

Gramíneas africanas do gênero *Urochloa*, amplamente conhecidas com braquiárias, foram introduzidas no Brasil para fins forrageiros e são amplamente distribuídas pelo país, tornando-se, inclusive, invasoras de ecossistemas naturais (MATOS e PIVELLO, 2009). Características do gênero como reprodução vegetativa e por sementes, ciclo reprodutivo rápido, alta eficiência fotossintética e na utilização de nutrientes e elevadas taxas de crescimento (LEVINE et al., 2003) o tornam altamente competitivo em relação às espécies arbóreas. Assim, estudos que avaliem a influência de espécies do gênero *Urochloa* sobre o estabelecimento de espécies arbóreas são importantes para fornecer informações que subsidiem a re-introdução destas em pastagens abandonadas. Mais especificamente, em projetos que utilizem a semeadura direta, seria importante avaliar o potencial alelopático das espécies de gramíneas sobre a germinação de sementes de árvores.

Guazuma ulmifolia, popularmente conhecida como chico-magro ou mutambo, é uma espécie arbórea com ampla distribuição pela América tropical (CARVALHO, 2007), podendo ser encontrada em áreas de Cerrado, Mata Atlântica (RIBEIRO e WALTER, 1998; SANTOS et al., 2005), Floresta Amazônica, Caatinga e Pantanal (CARVALHO, 2007). É uma espécie pioneira, apresentando crescimento rápido, grande adaptação ao fogo e não é exigente quanto a solos, habitando tanto sítios secos como úmidos (CARVALHO, 2007). Além disso, desempenha um importante papel ecológico, pois seus frutos servem de alimento para a fauna (ALMEIDA et al., 1998; CARVALHO 2007). Por todas essas características é uma espécie amplamente utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas. No entanto, não são registrados na literatura estudos que enfoquem a germinação e desenvolvimento de plântulas desta espécie sob a influência de gramíneas do gênero *Urochloa*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial alelopático de *U. brizantha* e *U. decumbens* na germinação, crescimento e metabolismo de *Guazuma ulmifolia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o potencial alelopático de *U. brizantha* e *U. decumbens* foram coletados indivíduos adultos das duas espécies (aproximadamente três quilos de matéria fresca (de cada espécie) em dezembro de 2012, nos campos da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS (20°25'27''S e 54°41'16''O). O material coletado (porções aérea e subterrânea) foi fragmentado e acondicionado em saco plástico a -7 °C, para posterior extração através de maceração com etanol absoluto (m/v, 1:2), à temperatura ambiente. Após 7 dias, foi feita filtração e o material sólido descartado, sendo o solvente evaporado (\pm 40 °C) sob vácuo em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB). Para obtenção das frações semipurificadas (FS), o EEB foi fracionado por meio de partição líquido-líquido com solventes de diferentes graus de polaridade, hexano e acetato de etila, em funil de decantação, sendo obtidas as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAE) e etanol-água (FEA). O teor de água foi determinado a partir de uma alíquota do EEB e FS, submetida à secagem (100 °C), até obtenção de massa constante. Para o preparo das soluções, o EEB e as FS (FH, FAE, FEA) foram pesados, levando-se em consideração o teor de água e dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN et al., 2000), obtendo-se a solução estoque de 1000 mg.L⁻¹; as concentrações de 500 e 250 mg.L⁻¹ foram obtidas por diluição. As soluções-teste foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico) a 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH 0,1 N (MACIAS et al. 2000). As soluções-teste foram ensaiadas com sementes de *G. ulmifolia*, obtidas pelo viveiro do Instituto Brasileiro de Florestas (IBF).

As sementes de *G. ulmifolia* foram escarificadas termicamente com água quente a 100°C por 5 min para a quebra da dormência (CARVALHO, 2007). No bioensaio de germinação, foi aplicada a metodologia de Macias et al. (2000). Placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman n°. 1, ambos previamente autoclavados a 100 °C por 24 horas, receberam 5 mL das soluções nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg L⁻¹. Em seguida, foram semeados sobre cada disco de papel filtro 50 diásporos da espécie alvo, distribuídos aleatoriamente, com 4 repetições para cada solução. Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com 5 ml somente de DMSO a 0,1% e a solução tampão MES. As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W m⁻²), umidade relativa (\pm 80%) e temperatura constante (27 °C, com fotoperíodo de 12 h). A germinação foi avaliada por meio de contagens diárias, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão radicular com no mínimo 2 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando não ocorreu germinação por três dias consecutivos (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Nos bioensaios de crescimento foi utilizada a metodologia descrita por Macias et al. (2000). Após a germinação, tendo como critério a protrusão radicular de no mínimo 2,0 mm de comprimento, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20 plântulas), para cada tratamento, sendo então transferidas para as placas de Petri contendo as soluções tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação. Após cinco dias da protrusão radicular, foi medido o comprimento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo (dez plântulas por placa), utilizando-se papel milimetrado. Posteriormente, essas plântulas foram levadas a estufa a 60°C até peso constante, para obtenção da massa seca.

Para a determinação dos teores de clorofila foram macerados 20 mg da parte aérea das plântulas em DMSO 0,1% (Dimetilsulfóxido), sendo posteriormente o macerado deixado em repouso no escuro por 24 horas, a temperatura ambiente. Após este período as absorbâncias das soluções contendo clorofila foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total (ARNON, 1949).

A respiração potencial das células radiculares foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifeniltetrazólio (TTC) pela atividade da enzima desidrogenase e do surgimento do formazan. Para a avaliação dessa característica as raízes foram cortadas a 1,0 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas (20 mg) e em seguida transferidas para tubos de ensaios, onde foram adicionados 3,0 mL de TTC 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os tubos de ensaios foram mantidos sob vácuo em dessecadores, por duas horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30°C por 15 horas. Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e descartadas; em seguida as raízes foram lavadas uma vez com água destilada que posteriormente, também foi drenada ao máximo e descartada. Os tubos de ensaios contendo as raízes foram novamente transferidos para banho-maria com água fervente ($\pm 100^\circ\text{C}$), sendo então adicionados 7 mL de etanol 95% (v/v) em cada um deles. Decorridos 10 minutos as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento a temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol a 95% (v/v). As absorbâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 530 nm e os resultados expressos nos valores da absorbância (STEPONKUS e LANPHEAR, 1967).

Para a avaliação da atividade enzimática, primeiramente as plântulas frescas (1,0 g) foram maceradas em nitrogênio líquido e tampão fosfato de potássio (6,0 mL; 0,2 M; pH 7,0). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático (ZENG et al., 2001). Para a atividade da peroxidase (POD) uma alíquota de

10 µl de extrato foi adicionado em tubos de ensaio contendo 1 ml de tampão fosfato de potássio (0,2 M; pH 7,0); em seguida os tubos foram levados para banho-maria até a estabilização da temperatura a 25°C. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de guaiacol (0,5%), 100 µL de H₂O₂ (0,08%) e, imediatamente, efetuou-se as leituras de absorbância em espectrofotômetro na absorbância de 470 nm, com 3 repetições para cada tratamento. A atividade da POD foi calculada usando o coeficiente de extinção de 25,5 mM⁻¹ cm⁻¹ e o resultado foi expresso em µmoles de tetraguaiacol produzido (mg de proteína)⁻¹ (ZENG et al., 2001). Para a avaliação da atividade da catalase (CAT) 100 µL de extrato enzimático foram adicionados a 3,0 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (12,5 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM; pH7,0), a 30°C. Em seguida foi realizada as leituras da absorbância a 240 nm, com três repetições para cada tratamento (CAKMAK e MARSCHNER, 1992).

Os dados foram submetidos à análise de variância para cada solução e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, em relação à testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados em arco seno para a análise estatística. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS

As soluções-teste de *U. brizantha* e *U. decumbens* inibiram a germinação de *G. ulmifolia* de modo dose-dependente.(Tabela 1).O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi influenciado de forma distinta em relação às duas espécies de gramíneas. As soluções de *U. brizantha* atrasaram a germinação de *G. ulmifolia* em relação ao controle. Ainda, se observou maior atraso com o aumento da concentração, exceto para a menor concentração do EEB, onde não houve diferença quando comparado ao controle. Já na presença das soluções de *U. decumbens*, observou-se um atraso na germinação menos acentuado, uma vez que em concentrações baixas das soluções não houve alteração do IVG, em relação ao controle (Tabela 1).

As duas espécies de gramíneas avaliadas reduziram o crescimento tanto da porção aérea como da radicular de plântulas de *G. ulmifolia* (Figura 1). Considerando-se a influência de *U. brizantha*, notou-se que com a presença de qualquer solução-teste,independente da concentração, houve inibição do crescimento aéreo de *G. ulmifolia*. Para *U. decumbens* foi

1449 encontrada uma relação inversamente proporcional, sendo que o aumento da concentração das
1450 soluções utilizadas resultou em uma redução do comprimento do hipocótilo de *G. ulmifolia*
1451 (Figura 1). Este segundo padrão foi semelhante ao encontrado para o crescimento da raiz de
1452 plântulas de *G. ulmifolia* submetidas tanto à soluções de *U. brizantha* como de *U. decumbens*
1453 (Figura 1).

1454 A atividade enzimática da peroxidase (POD) em plântulas de *G. ulmifolia* variou em
1455 função da espécie de *Urochloa* avaliada. Para *U. brizantha*, a produção POD aumentou
1456 significativamente somente nas concentrações mais altas do EEB, FAE e FEA (Figura 2).
1457 Plântulas de *G. ulmifolia* submetidas às soluções *U. decumbens* apresentaram aumento da
1458 atividade da POD somente nas concentrações de 500 e 1000 (mg/L) do EEB. A atividade da
1459 catalase (CAT) não sofreu alteração em nenhum dos testes realizados (Figura 2).

1460 A produção de clorofila em plântulas de *G. ulmifolia* apresentou padrões distintos em
1461 relação às duas espécies de *Urochloa*. Em *U. brizantha* observou-se aumento da produção de
1462 clorofila em todas as soluções ensaiadas, independentemente da concentração avaliada. Em *U.*
1463 *decumbens* observou-se esse aumento somente para o EEB e FEA, sendo que para FAE, nas
1464 maiores concentrações da solução observou-se redução dos teores de clorofila (Figura 3).

1465 A atividade respiratória das células das raízes das plântulas de *G. ulmifolia* foi reduzida
1466 em todas as soluções ensaiadas de *U. brizantha*. Já na presença da *U. decumbens*, com exceção
1467 da fração FH, um aumento na concentração das soluções-teste resultou em aumento da atividade
1468 respiratória das raízes de *G. ulmifolia* (Figura 3).

1469 A massa seca não apresentou diferença em relação ao controle.

1471 DISCUSSÃO

1472 Os bioensaios de germinação de sementes na presença de extratos vegetais são pontos de
1473 partida para a investigação de efeitos de alelopatia intra e interespecíficos (HAMDI et al. 2001).
1474 Ambas as espécies de *Urochloa* inibiram a germinação de *G. ulmifolia* (Tabela 1). No campo,
1475 o impedimento da germinação de sementes quimicamente sensíveis a substâncias
1476 alelofitotóxicas pode ter, como consequência, a diminuição da densidade de seus indivíduos o
1477 que, em médio e longo prazos, pode levar à extinção local dessa espécie, com implicações para
1478 a biodiversidade local (LEVIN 1970; CALLAWAY et al., 2003). Assim, a re-introdução de *G.*
1479 *ulmifolia* via semeadura direta em áreas de pastagem deve levar em consideração a densidade
1480 de sementes adequada para sobrepor este primeiro obstáculo oferecido pelas espécies de
1481 gramíneas para a germinação da espécie arbórea.

Estudos recentes mostram que, além da porcentagem final de germinação, o padrão de germinação, identificado por diferenças tanto na velocidade como na sincronia desse processo, também pode ser modificado pela ação de aleloquímicos (FERREIRA e BORGUETTI 2004, SANTANA et al., 2006). Essa alteração também foi encontrada no presente estudo, através da modificação do IVG de *G. umlifolia* sob a influência das duas gramíneas (Tabela 1). O atraso na germinação, em decorrência do efeito alelopático encontrado, pode resultar na redução da probabilidade de estabelecimento da espécie em condições de campo, uma vez que submete as sementes à exposição prolongada a inimigos naturais no solo como fungos (DALLING et al., 2011) e predadores vertebrados e invertebrados (DOUST et al., 2008), aumentando as chances de mortalidade dos indivíduos ainda em fase de semente (PEREIRA et al., 2013). Além disto, os projetos de re-introdução de espécies arbóreas com fins de recuperação ambiental tendem a ser implantados em épocas com maior disponibilidade hídrica, principalmente em regiões com déficit hídrico por períodos prolongados. Assim, o atraso na germinação de sementes poderia ainda acarretar em falha no estabelecimento de plântulas, caso a disponibilidade de água já tenha se tornado muito reduzida (PEREIRA et al., 2013).

Além das alterações na germinação de sementes, foram detectadas também alterações no tamanho das plântulas em função da presença das soluções-teste de ambas as espécies de gramíneas utilizadas. Os resultados obtidos mostraram que as soluções-teste inibiram o crescimento aéreo e radicular de *G. ulmifolia* (Figuras 1 e 2). Segundo Alves e Santos (2002), a alteração no comprimento de órgãos da plântula está relacionada à modificação no balanço hormonal do vegetal. A redução do tamanho de plântulas pode representar um segundo obstáculo ao estabelecimento de espécies arbóreas em áreas de pastagens, já que plantas maiores tendem a ter vantagens através do acesso mais precoce de água em camadas mais profundas do solo (LEISHMAN e WESTOBY, 1994) e ser potencialmente melhores competidoras (HENKIN et al., 1998; WOODS e ELLIOTT, 2004; SCHMIDT, 2008; LARSON, et al., 2011). Pereira (2012) avaliando o estabelecimento de sete espécies arbóreas de Cerrado via semeadura direta sob competição com *U. brizantha*, observou que a intensidade da competição entre as espécies arbóreas e *U. brizantha* foi reduzida após 15 meses da semeadura. A autora sugere que, após esse período, as raízes das espécies arbóreas superariam a zona de competição radicular com as gramíneas. Outros estudos com espécies arbóreas também encontraram o mesmo padrão (GARAU et al., 2009; GUNARATNE et al., 2011). Assim, o tamanho inicial de plântulas de espécies arbóreas, resultado da interferência alelopática, pode influenciar a capacidade competitiva de plântulas por recursos no solo, alterando os padrões de estabelecimento das espécies.

Os vegetais constituem a fonte mais abundante para enzimas da classe oxidorreductase. A peroxidase faz parte deste grupo, atuando na proteção antioxidativa e, ainda, catalisando uma variedade de reações envolvendo transferências de elétrons (CHANCE; MAEHLY, 1955). Segundo Rabinovitch et al. (2004) e Sinsabaugh (2010), a expressão da peroxidase parece ser uma resposta ao estresse oxidativo e à presença de compostos fenólicos. Estudos indicam que essas enzimas estão relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas em situações de estresse (ROSSI e LIMA 2001). No presente estudo, detectou-se um aumento da atividade da peroxidase (POD) em plântulas de *G. ulmifolia* principalmente quando submetidas as altas concentrações das soluções teste de *U. brizantha* (Figura 3), sugerindo, mais uma vez que esta espécie teria um maior efeito deletério sobre a espécie arbórea estudada. O aumento da atividade de enzimas oxidativas, induzido pela ação de aleloquímicos, pode modificar a permeabilidade das membranas celular e a formação e deposição de lignina, que contribuem para a redução do alongamento radicular (FERRARESE et al., 2000). Assim, o estresse oxidativo decorrente das altas concentrações das soluções-teste poderia ser um dos fatores contribuindo para a redução do tamanho de plântulas constatado no presente estudo (Figura 2)

De maneira geral, a produção de clorofila em *G. ulmifolia* foi estimulada na presença das soluções teste, exceto para as maiores concentrações de FAE de *U. decumbens*. Como uma tentativa de aclimação da espécie, pode-se relacionar o aumento da clorofila, com a sua função fotoprotetora e captação de energia para a fotossíntese (MARENCO; LOPES, 2005). Já a diminuição da clorofila mantém a relação ao fato de compostos aleloquímicos interferirem na fotossíntese, alterando o teor de clorofila envolvendo algumas enzimas, influenciando negativamente a eficiência de processos fotossintéticos (HUSSAIN; REIGOSA, 2011).

A presença de aleloquímicos pode alterar a respiração celular interferindo em várias etapas (CHON et al., 2000). Observou-se que as soluções teste de cada espécie atuaram de forma distinta, onde para *U. brizantha* todos os testes reduziram a taxa de respiração radicular, e para *U. decumbens* todos os testes apresentaram uma maior taxa de respiração celular radicular, exceto para FH. Estudos têm demonstrado que os aleloquímicos produzidos por *Secale cereale* L. reduzem o crescimento radicular de *Cucumis sativus* L., pois causam mudanças nas estruturas celulares das raízes (BURGOS et al., 2004). Com esses resultados sugere-se que os distúrbios nas membranas celulares resulta em mudanças na permeabilidade das membranas, destruição dos cloroplastos, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático. Esses processos fisiológicos anormais resultam na redução da fotossíntese, contribuindo para a redução do crescimento das plantas (SONG et al., 1996).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que os extratos de *U. brizantha* e *U. decumbens* tem ação inibitória sobre o metabolismo de *G. ulmifolia*, afetando tanto a germinação como o crescimento de plântulas. Verificou-se também aumento da atividade de enzimas antioxidantes o que indica indução do metabolismo de defesa em resposta aos extratos. Todos esses processos metabólicos são importantes para o estabelecimento das espécies vegetais e os dados obtidos neste estudo mostram que as espécies de gramíneas avaliadas apresentam potencial para restringir a re-introdução de *G. ulmifolia* em áreas de pastagem via semeadura direta devido à competição por interferência.

CONCLUSÃO

Extratos de *U. brizantha* e *U. decumbens* inibem a germinação, o crescimento inicial de plântulas, bem como alteram o metabolismo de *G. ulmifolia* indicando a indução de estresse da espécie arbórea.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEB), frações hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE) e fração etanol-água (FEA) de *U. brizantha* e *U. decumbens* sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (%G) de *Guazuma ulmifolia*.

Brachiaria brizantha
Germinabilidade (%)

Brachiaria decumbens
Germinabilidade (%)

Tratamento ¹	250mg.L ⁻¹	500mg.L ⁻¹	1.000mg.L ⁻¹	Tratamento ¹	250mg.L ⁻¹	500 mg.L ⁻¹	1.000 mg.L ⁻¹
Controle:60,0				Controle: 60,0			
EEB	54,0	38,0*	24,0*	EEB	48,0*	44,0*	14,0*
FH	20,0*	16,0*	10,0*	FH	54,0	46,0*	24,0*
FAE	28,0*	18,0*	8,0*	FAE	54,0	52,0*	28,0*
FEA	34,0*	26,0*	18,0*	FEA	54,0*	44,0*	32,0*

Índice de velocidade de germinação (IVG)				Índice de velocidade de germinação (IVG)			
Controle: 3,06				Controle: 3,06			
EEB	3,26*	2,58*	1,59*	EEB	2,94	2,23*	0,87*
FH	0,88*	0,87*	0,46*	FH	4,20*	3,53*	1,54*
FAE	1,22*	0,94*	0,33*	FAE	3,29	3,06	1,67*
FEA	1,61*	1,58*	0,91*	FEA	3,00	2,60*	1,84*

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608

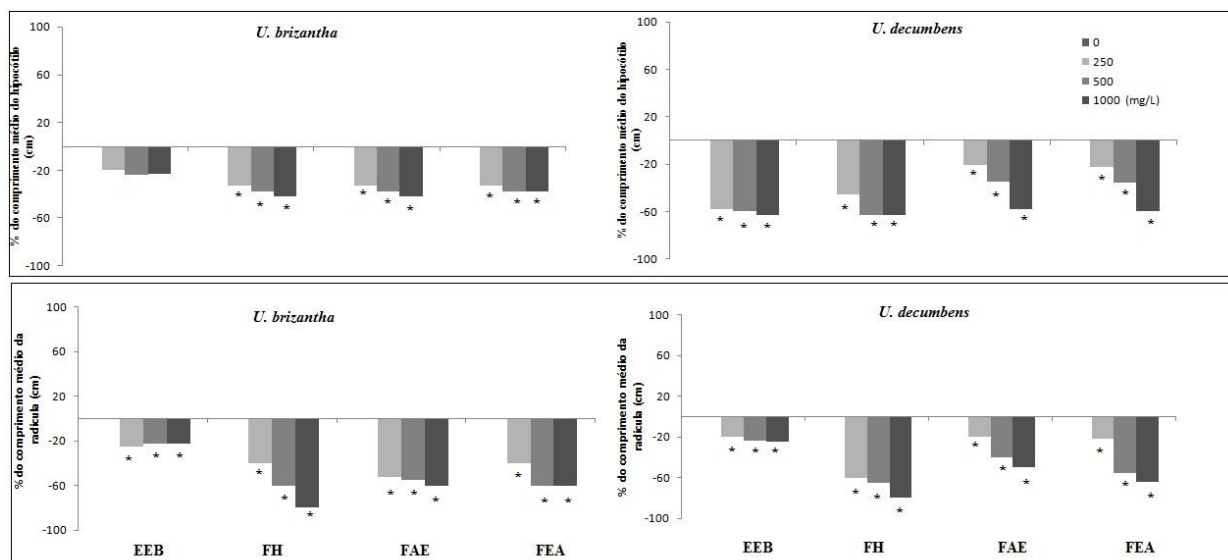


Figura 1. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* sobre o crescimento do hipocótilo e radícula das plântulas de *Guazuma ulmifolia* (EEB= espécie extrato bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

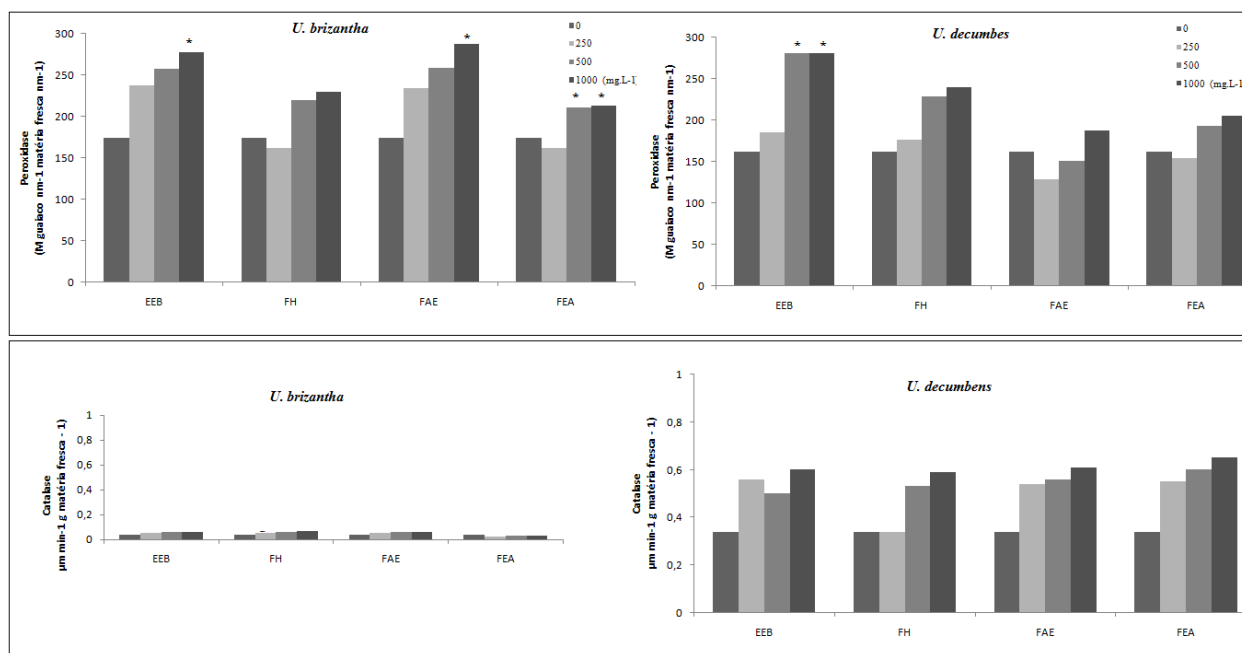


FIGURA 2. Efeito das diferentes concentrações do extrato de *U. brizantha* e *U. decumbens* sobre a atividade peroxidase e catalase das plântulas de *Guazuma ulmifolia*. Médias seguidas da mesma letra do controle não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (EEB= espécie extrato bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água).

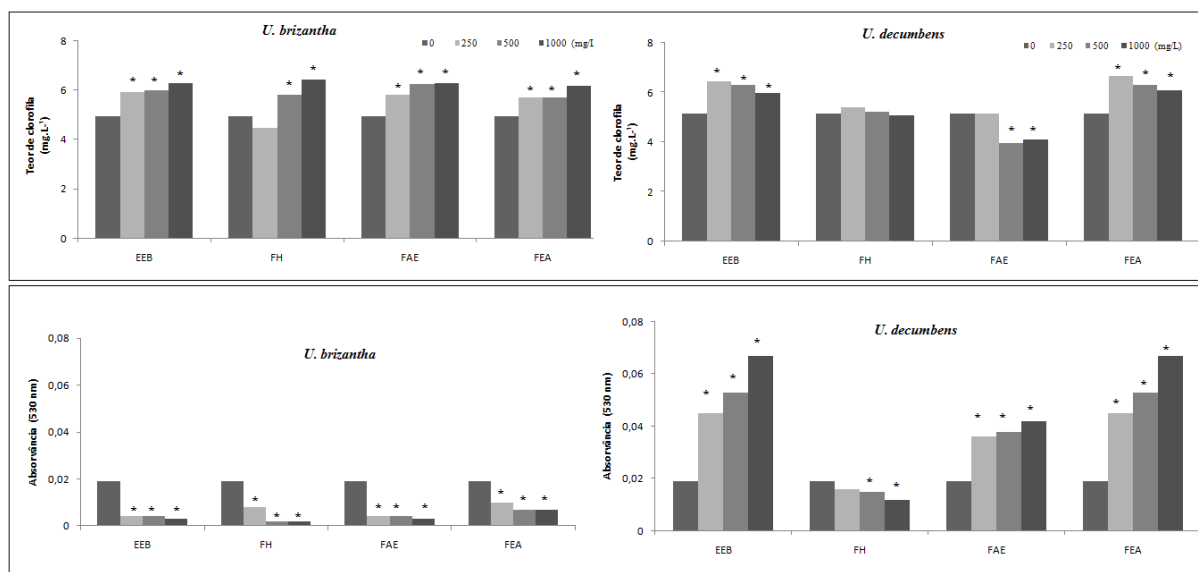


FIGURA 3. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *U. brizantha* e *U. decumbens* sobre o teor médio de clorofila total e respiração celular das raízes das plântulas de *Guazuma ulmifolia*. (EEB= espécie extrato bruto; FH= fração hexânica; FAE= fração acetato de etila; FEA= fração etanol água). Dados expressos em percentual em relação ao controle. * A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

REFERÊNCIAS

- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts .Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.
- ALVES, S. M. & SANTOS, L. S. Natureza química dos agentes alelopáticos. In: SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. (Ed.). **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 25-47. 2002.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. & RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Brasília, Embrapa- CPAC, 464 pp. 1998.
- BEGON, M., TOWNSEND, C.R. & HARPER, J.L. **Ecologia de Indivíduos a Ecosystemas** (4ª edição). Ed. Artmed, 2007.

1679

1680 BURGOS, N.R.; TALBERT, R.E.; KIM, K.S.; KUK, Y.I. Growth inhibition and root
 1681 ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*).
 1682 **Journal Chemistry Ecology**, v.30, n.3, p.671–689, 2004.

1683

1684 CALLAWAY, R.M.; RIDENOUR, W.M.; LABOSKI, T.; WEIR, T. & VIVANCO, J.M. 2005.
 1685 Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants. **Journal of**
 1686 **Ecology**.v.93, p.576-583. 2005.

1687

1688 CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance
 1689 activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean
 1690 leaves. **Plant Physiology**, v.98, p.1222–1227, 1992.

1691

1692 CAMARGO, J. L. C., I. D. K. FERRAZ, AND A. M. IMAKAWA. Rehabilitation of degraded
 1693 areas of Central Amazonia using direct sowing of forest tree seeds. **Restoration Ecology**. v.10,
 1694 p.636-644. 2002.

1695

1696 CARVALHO, P.E.R. Mutamba *Guazuma ulmifolia*. Circular **Técnica 141**. ISSN 1517-5278.
 1697 **Embrapa Florestas**. 2007.

1698

1699 CHANCE, B., MAEHLY, A.C. Assay of catalase and peroxidase. **Methods in Enzymology**,
 1700 v. 2, p. 764-775, 1955.

1701

1702 CHEUNG, K. C., D. LIEBSCH, AND M. C. M. MARQUES. Forest recovery in newly
 1703 abandoned pastures in Southern Brazil: implications for the Atlantic Rain Forest resilience.
 1704 **Natureza e Conservação**.v.8, p.66-70. 2010.

1705

1706 CHON, S.U.; COUTTS, J.H.; NELSON, C.J. Effects of light, growth media and seedling
 1707 orientation on bioassays of alfafa autotoxicity. **Agronomy Journal**, v.92, p. 715-720, 2000.

1708

1709 DALLING, J. W., A. S. DAVIS, B. J. SCHUTTE, AND A. E. ARNOLD. Seed survival in soil:
 1710 interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. **Journal of**
 1711 **Ecology**.v.99, p.89-95. 2011.

1712

1713 DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural
 1714 phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n.9, p. 2079-2093, 2000.

1715

1716 DOUST, S. J., P. D. ERSKINE, AND D. LAMB. Restoring rainforest species by direct seeding:
 1717 Tree seedling establishment and growth performance on degraded land in the wet tropics of
 1718 Australia. **Forest Ecology and Management**.v.256, p.1178-1188. 2008.

1719

1720 FAO. State of the World's Forests. **Food and Agriculture Organization of the United**
 1721 **Nations**, Rome. 1999.

1722

1723 FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE FILHO. Ferulic acid
 1724 uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiologia e Plantarum**, v. 22, p. 121-124,
 1725 2000.

1726

1727 FERREIRA, A.G. & AQUILA, M.E.A. Alelopatia, uma área emergente da ecofisiologia.
 1728 **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12 (edição especial), p.175-204. 2000.

1729

1730 FERREIRA AG, BORGUETTI F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Ed.
 1731 Artmed; 222 p. 2004.

1732

1733 GARAU, A. M., C. M. GHERSA, J. H. LEMCOFF, AND J. J. BARAÑAO. Weeds in
 1734 *Eucalyptus globulus* subsp. maidenii (F. Muell) establishment: effects of competition on sapling
 1735 growth and survivorship. **New Forests**.v.37, p.251-264. 2009.

1736

1737 GARCÍA-ORTH, X., AND M. MARTÍNEZ-RAMOS. Isolated Trees and Grass Removal
 1738 Improve Performance of Transplanted *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae) Saplings in
 1739 Tropical Pastures. **Restoration Ecology**. v.19, p.24-34. 2011.

1740

1741 GUNARATNE, A. M. T. A., C. V. S. GUNATILLEKE, I. A. U. N. GUNATILLEKE, H. M.
 1742 S. P. MADAWALA WEERASINGHE, AND D. F. R. P. BURSLEM. Release from root
 1743 competition promotes tree seedling survival and growth following transplantation into human-
 1744 induced grasslands in Sri Lanka. **Forest Ecology and Management**, v.262, p.229-236. 2011.

1745

1746 GRISCOM, H. P., B. W. GRISCOM, AND M. S. ASHTON. Forest Regeneration from Pasture
 1747 in the Dry Tropics of Panama: Effects of Cattle, Exotic Grass, and Forested Riparia.
 1748 **Restoration Ecology**.v.17, p.17-126. 2009.

1749

1750 FLORENTINE, S. K., AND M. E. WESTBROOKE. Restoration on abandoned tropical
 1751 pasturelands – do we know enough? **Journal of Nature Conservation**.v.12, p.85-94. 2004.

1752

1753 HAMDI, A.B. Laboratory bioassays for phytotoxicity: an exemple from wheat straw.
 1754 **Agronomy Journal**.43-48. 2001.

1755

1756 HENKIN, Z., N. G. SELIGMAN, U. KAFKAFI, AND D. PRINZ. End-of-season soil water
 1757 depletion in relation to growth of herbaceous vegetation in a sub-humid Mediterranean dwarf-
 1758 shrub community on two contrasting soils. **Plant and Soil**.v.202, p.317-326. 1998.

1759

1760 HOLL, K. D. Effects of above- and below-ground competition of shrubs and grass on
 1761 *Calophyllum brasiliense* (Camb.) seedling growth in abandoned tropical pasture. **Forest**
 1762 **Ecology and Management**.v.109, p.187-195. 1998.

1763

1764 HOOPER, E., R. CONDIT, AND P. LEGENDRE. Responses of 20 native tree species to
 1765 reforestation strategies for abandoned farmland in Panama. **Ecological Application**.v.12,
 1766 p.1626-1641. 2002.

1767

1768 HUSSAIN, M. I.; REIGOSA, M. J. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations,
 1769 PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation
 1770 in three C3 perennial species. **Journal of Experimental Botany**. Oxford. v. 62, n. 13, p. 453-
 1771 4545, 2011.

1772

1773 LARSON, D. L., J. B. BRIGHT, P. DROBNEY, J. L. LARSON, N. PALAIA, P. A. RABIE,
 1774 S. VACEK, D. WELLS. Effects of planting method and seed mix richness on the early stages
 1775 of tall grass prairie restoration. **Biological Conservation**.v.144, p.3127-3139. 2011.

1776

1777 LEISHMAN, M. R., AND M. WESTOBY. The role of seed size in seedling establishment in
 1778 dry soil conditions – experimental evidence from semi-arid species. **Journal of Ecology**.v.82,
 1779 p.249-258. 1994.

1780 LEVIN, S.A. Community equilibria and stability, and an extension of the competitive exclusion
 1781 principle. **The American Naturalist**.v.104, p.413-423. 1970.

1782

1783 LEVINE, J. M. et al. Mechanisms underlying the impacts of exotic plants invasions. **Proc.**
 1784 **Royal Soc. London**, v. 270, n. 1517, p. 775-781, 2003.

1785

1786 MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; CASTELLANO, D.; VELSACO, R.F. Sesquiterpene
 1787 lactones with potencial use as natural herbicides models.2. Guaianolides. **Journal of**
 1788 **Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5288-5296, 2000.

1789

1790 MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações**
 1791 **hídricas e nutrição mineral**. 2. ed. Viçosa: UFV. 451 p. 2005.

1792

1793 MATTEI, V. L., AND M. D. ROSENTHAL. Direct seeding of canafístula (*Peltophorum*
 1794 *dubium* (Spreng.) Taub.) to regenerate shrubs. **Revista Árvore**.v.26, p.649-654. 2002.

1795

1796 MATOS, D. M. S.; PIVELLO, V. R. O impacto das plantas invasoras nos recursos naturais de
 1797 ambientes terrestres – alguns casos brasileiros. **Ciência Cultura**, v. 61, n. 1, p. 27-30, 2009.

1798

1799 PEREIRA, S. R.; LAURA, V.A.; SOUZA, A.L.T. Superação de dormência de sementes como
 1800 estratégia para restauração florestal de pastagem tropical. **Pesquisa agropecuária brasileira**,
 1801 Brasília, v.48, n.2 p. 148-156, 2013.

1802

1803 PERES, M.T.L.P.; SILVA, L.B.; FACCENDA, O.; HESS, S.C. Potencial alelopático de
 1804 espécies de Pteridaceae (Pteridophyta). **Acta botânica brasílica**.v.18, n.4,p.723-730. 2004.

1805

1806 PYWELL, R. F., J. M. BULLOCK, J. B. TALLOWIN, K. J. WALKER, E. A. WARMAN,
 1807 AND G. MASTERS. 2007. Enhancing diversity of species-poor grasslands: an experimental
 1808 assessment of multiple constraints. **Journal of Applied Ecology**.v.44, p.81-94.

1809

1810 RABINOVICH, M.L.;BOLOBOVA, A.V.; VASILCHENKO, L.G.Fungal decomposition of
 1811 natural aromatic structures and xenobiotics: A review. **Applied. Biochemistry and**
 1812 **Microbiology**,v. 40, p. 1-17, 2004.

1813 RIBEIRO, J. F. & WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano, M. S. &
 1814 Almeida, S. P. (Org.) **Cerrado: Ambiente e Flora**. Brasília, Embrapa – CPAC, p. 89-166.
 1815 1998.

1816

1817 ROSSI, C.; LIMA, G.P.P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de
 1818 sementes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p.197-199, 2001.

1819

1820 SANTANA, D.G.; RANAL, M.A.; MUSTAFA, C.V. & SILVA, R.M.G. Germination
 1821 measurements to evaluate allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**.p.43-52. 2006.

1822

1823 SCHMIDT, L.A review of direct sowing versus planting in tropical afforestation and land
 1824 rehabilitation. Development and Environment Series 10-2008. **Forest & Landscape**
 1825 **Denmark**. 2008.

1826

1827 SINSABAUGH, R. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. **Soil**
 1828 **Biology and Biochemistry**. v. 42, p. 391-404, 2010.

1829

1830 SONG, F.M.; ZHENG, Z.; CHUN, G.X. Role of active oxygen and membrane lipid
 1831 peroxidation in plant pathogen interactions. **Plant Physiol. Commun.**, v.32, n.5, p.377-385,
 1832 1996.

1833

1834 SOVU, P. S., M. TIGABU, AND P. C. ODÉN. Restoration of Former Grazing Lands in the
 1835 Highlands of Laos Using Direct Seeding of Four Native Tree Species. **Mountain Research**
 1836 **and Development**.v.30, p.232-243. 2010.

1837

1838 STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyltetrazolium chloride method
 1839 of determining cold injury. **Plant Physiology**, v. 42, p. 1423-1426, 1967.

1840

1841 WAGNER, M., R. F. PYWELL, T. KNOPP, J. M. BULLOCK, AND M. S. HEARD. The
 1842 germination niches of grassland species targeted for restoration: effects of seed pre-treatments.
 1843 **Seed Science Research**.v.21, p.117-131. 2011.

1844

1845 WOODS, K., AND S. ELLIOTT. Direct seeding for forest restoration on abandoned agricultural
 1846 land in northern Thailand. **Journal of Tropical Forest Science**. v.16, p.248-259. 2004.

1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877

ZENG, R.S.; LUO, S.M.; SHI, Y.H.; SHI, M.S.; TU, C.Y. Physiological and Biochemical Mechanism of Allelopathy of Secalonic Acid F on Higher Plants. **Agronomy Journal**, v. 93, p. 72–79, 2001.

NORMAS PARA SUBMISSÃO DOS ARTIGOS

Revista Árvore

1880 - O conteúdo e as opiniões apresentadas nos trabalhos publicados não são de responsabilidade
1881 desta revista e não representam necessariamente as opiniões da Sociedade de Investigações
1882 Florestais (SIF), sendo o autor do artigo responsável pelo conteúdo científico do mesmo.

1883 - Ao submeter um artigo, o(s) autor(es) deve(m) concordar(em) que seu copyright seja
1884 transferido à Sociedade de Investigações Florestais - SIF, se e quando o artigo for aceito para
1885 publicação.

1886 Primeira Etapa (exigida para submissão do Manuscrito)

1887 Submeter os artigos somente em formatos compatíveis com Microsoft-Word. O sistema aceita
1888 arquivos até 10MB de tamanho.

1889 O Manuscrito deverá apresentar as seguintes características: espaço 1,5; papel A4 (210 x 297
1890 mm), enumerando-se todas as páginas e as linhas do texto, páginas com margens superior,
1891 inferior, esquerda e direita de 2,5 cm; fonte Times New Roman 12; e conter no máximo 16
1892 laudas, incluindo tabelas e figuras. Tabelas e figuras devem ser limitadas a 5 no conjunto.

1893 Na primeira página deverá conter o título do manuscrito, o resumo e as três (3) Palavras-Chaves.

1894 Não se menciona os nomes dos autores e o rodapé com as informações, para evitar a
1895 identificação dos mesmos pelos avaliadores.

1896 Nos Manuscritos em português, os títulos de tabelas e figuras deverão ser escritos também em
1897 inglês; e Manuscritos em espanhol ou em inglês, os títulos de tabelas e figuras deverão ser
1898 escritos também em português. As tabelas e as figuras devem ser apresentadas ao final do texto,
1899 numeradas com algarismos arábicos consecutivos junto as legendas, e sua localização
1900 aproximada deve ser indicada no texto com uma chamada entre dois parágrafos: Entra Figura
1901 1; Entra Tabela 3. Os títulos das figuras deverão aparecer na sua parte inferior antecidos da
1902 palavra Figura mais o seu número de ordem. Os títulos das tabelas deverão aparecer na parte
1903 superior e antecidos da palavra tabela seguida do seu número de ordem. Na figura, a fonte
1904 (Fonte:) deve aparecer na parte superior, na tabela, na parte inferior. As figuras deverão estar
1905 exclusivamente em tons de cinza e, no caso de coloridas, será cobrada a importância de
1906 R\$100,00/página, para versão impressa.

1907 **Forma dos manuscritos**

1908 **O Manuscrito em PORTUGUÊS deverá seguir a seguinte sequência:**

1909 TÍTULO em português; RESUMO (seguido de Palavras-chave não incluindo palavras do
 1910 título); TÍTULO em inglês; ABSTRACT (seguido de Keywords não incluindo palavras do
 1911 título); 1. INTRODUÇÃO (incluindo revisão de literatura e o objetivo); 2. MATERIAL E
 1912 MÉTODOS; 3. RESULTADOS; 4. DISCUSSÃO; 5. CONCLUSÃO; 6.
 1913 AGRADECIMENTOS (se for o caso) e 7. REFERÊNCIAS (alinhadas à esquerda e somente as
 1914 citadas no texto).

1915 **O manuscrito em INGLÊS deverá obedecer à seguinte sequência:**

1916 TÍTULO em inglês; ABSTRACT (seguido de Keywords não incluindo palavras do título);
 1917 TÍTULO em português; RESUMO (seguido de Palavras-chave não incluindo palavras do
 1918 título); 1. INTRODUCTION (incluindo revisão de literatura e o objetivo); 2. MATERIAL
 1919 AND METHODS, 3. RESULTS; 4. DISCUSSION; 5. CONCLUSION; 6.
 1920 ACKNOWLEDGEMENT (se for o caso) e 7. REFERENCES (alinhadas à esquerda e somente
 1921 as citadas no texto).

1922 **O manuscrito em ESPANHOL deverá obedecer à seguinte sequência:**

1923 TÍTULO em espanhol; RESUMEN (seguido de Palabras-clave não incluindo palavras do
 1924 título); TÍTULO do manuscrito em Português; RESUMO em Português (seguido de palavras-
 1925 chave não incluindo palavras do título); 1. INTRODUCCIÓN (incluindo revisão de literatura e
 1926 objetivo); 2. MATERIALES Y METODOS; 3. RESULTADOS; 4. DISCUSIÓN; 5.
 1927 CONCLUSIÓN; 6. RECONOCIMIENTO (se for o caso) e 7. REFERENCIAS (alinhadas à
 1928 esquerda e somente as citadas no texto).

1929 No caso das línguas estrangeiras, será necessária a declaração de revisão lingüística de um
 1930 especialista.

1931 Os subtítulos, quando se fizerem necessários, serão escritos com letras iniciais maiúsculas,
 1932 antecidos de dois números arábicos colocados em posição de início de parágrafo.

1933 No texto, a citação de referências bibliográficas deverá ser feita da seguinte forma: colocar o
 1934 sobrenome do autor citado com apenas a primeira letra maiúscula, seguido do ano entre
 1935 parênteses, quando o autor fizer parte do texto. Quando o autor não fizer parte do texto, colocar,

1936 entre parênteses, o sobrenome, em maiúsculas, seguido do ano separado por vírgula. As
1937 referências bibliográficas utilizadas deverão ser preferencialmente de periódicos nacionais ou
1938 internacionais de níveis A/B do Qualis. A Revista Árvore adota as normas vigentes da ABNT
1939 2002 - NBR 6023.

1940 Não se usa "et al." em itálico e o "&" deverá ser substituído pelo "e" entre os autores.

1941 A Introdução deve ser curta, definindo o problema estudado, sintetizando sua importância e
1942 destacando as lacunas do conhecimento (“estado da arte”) que serão abordadas no artigo. Os
1943 Métodos empregados a população estudada, a fonte de dados e critérios de seleção, dentre
1944 outros, devem ser descritos de forma compreensiva e completa, mas sem prolixidade. A seção
1945 de Resultados devem se limitar a descrever os resultados encontrados sem incluir
1946 interpretações/comparações. O texto deve complementar e não repetir o que está descrito em
1947 tabelas e figuras. A Discussão deve começar apreciando as limitações do estudo (quando for o
1948 caso), seguida da comparação com a literatura e da interpretação dos autores, extraindo as
1949 conclusões e indicando os caminhos para novas pesquisas. O resumo deverá ser do tipo
1950 informativo, expondo os pontos relevantes do texto relacionados com os objetivos, a
1951 metodologia, os resultados e as conclusões, devendo ser compostos de uma seqüência corrente
1952 de frases e conter, no máximo, 250 palavras. (ABNT-6028).

1953 Para submeter um Manuscrito à Revista, o(s) autor(es) deverá(ão) entrar no site
1954 <www.revistaarvore.ufv.br> e clicar no link “**Submissão de Artigos**”.

1955 *Copyright*

1956 *Ao submeter um artigo, o(s) autor(es) deve(m) concordar(em) que seu copyright seja*
1957 *transferido à Sociedade de Investigações Florestais - SIF, se e quando o artigo for aceito*
1958 *para publicação.*

1959 *O conteúdo e as opiniões apresentadas nos trabalhos publicados não são de responsabilidade*
1960 *desta revista e não representam necessariamente as opiniões da Sociedade de Investigações*
1961 *Florestais (SIF), sendo o autor do artigo responsável pelo conteúdo científico do mesmo.*