

LEILYANE CONCEIÇÃO DE SOUZA COELHO

**"POTENCIAL ALELOPÁTICO *IN VITRO* DOS
EXSUDATOS DE *SESBANIA VIRGATA* (CAV.) PERS.
SOBRE TOMATE E ARROZ E EM FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA FASE
ASSIMBIÓTICA"**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LEILYANE CONCEIÇÃO DE SOUZA COELHO

"POTENCIAL ALELOPÁTICO *IN VITRO* DOS
EXSUDATOS DE *SESBANIA VIRGATA* (CAV.) PERS.
SOBRE TOMATE E ARROZ E EM FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA
FASE ASSIMBIÓTICA"

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Leilyane Conceição de Souza Coelho


e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Marcia Regina Braga
Coorientador: Dr. Fábio Sérgio Barbosa da Silva

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C65p Coelho, Leilyane Conceição de Souza, 1981-
Potencial alelopático *in vitro* dos exsudatos de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sobre tomate e arroz e em fungos micorrízicos arbusculares na fase assimbiótica / Leilyane Conceição de Souza Coelho. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Márcia Regina Braga.
Coorientador: Fábio Sérgio Barbosa da Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aleloquímicos. 2. Carboidratos. 3. Fabaceae. 4. Sementes. 5. Micorriza. I. Braga, Márcia Regina. II. Silva, Fábio Sérgio Barbosa da. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *In vitro* allopathic potential of exudates of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. on tomato and rice and asymbiotic phase of the arbuscular mycorrhizal fungi

Palavras-chave em inglês:

Allelochemicals

Carbohydrates

Fabaceae

Seeds

Mycorrhizas

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Márcia Regina Braga [Orientador]

Márcia Maria Camargo de Moraes

Cláudio José Barbedo

Patrícia Pinho Tonini

Kelly Simões

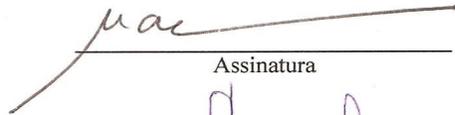
Data de defesa: 29-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

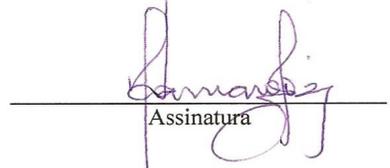
Campinas, 29 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

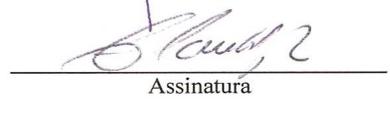
Dra. Marcia Regina Braga (Orientadora)


Assinatura

Dra. Marcia Maria Camargo de Morais


Assinatura

Dr. Cláudio José Barbedo


Assinatura

Dra. Patrícia Pinho Tonini


Assinatura

Dra. Kelly Simões


Assinatura

Dra. Aline Andreia Cavalari Corete

Assinatura

Dr. Marco Aurélio Silva Tiné

Assinatura

Dr. Danilo da Cruz Centeno

Assinatura

RESUMO

Sesbania virgata (Cav.) Pers. é uma Fabaceae com potencial para revegetação de áreas degradadas e que forma simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Suas sementes possuem aleloquímicos que são exsudados no início do processo de embebição e encontrados no ambiente que circunda a semente germinante. Ao analisar a co-germinação de *S. virgata* com sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), foi observada inibição da germinação e redução no índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de tomate, afetando severamente o crescimento inicial da plântula. Para arroz (*Oryza sativa* L.), os únicos parâmetros sensíveis à co-germinação com *S. virgata* foram o comprimento radicular e da parte aérea. A avaliação dos efeitos alelopáticos de extratos aquosos de exsudatos de sementes de *S. virgata* sobre essas espécies agrônomicas mostrou que a germinação e o crescimento das plântulas foram afetados já com a menor concentração utilizada (1 mg mL⁻¹). Além disso, em presença do exsudato, as sementes de tomate e arroz mostraram redução na mobilização dos carboidratos de reserva, fato não observado quando (+)-catequina comercial foi utilizada, sugerindo que existem outros compostos alelopáticos em sementes de *S. virgata*, além da (+)-catequina, que podem interferir no desenvolvimento das espécies estudadas. Os exsudatos de sementes de *S. virgata* reduziram a atividade da endo- β -mananase e aumentaram a da invertase ácida vacuolar em tomate, enquanto que a (+)-catequina comercial promoveu a atividade da endo- β -mananase e inibiu a da invertase ácida de parede celular. Ao examinar os efeitos de exsudatos brutos de sementes e de raízes de *S. virgata* em relação à fase assimbiótica de FMA, avaliando-se a germinação e o crescimento micelial *in vitro* de esporos de *Gigaspora albida* Becker & Hall, foi observado estímulo a *G. albida* somente na presença dos exsudatos de sementes. Pode-se concluir que as sementes de *S. virgata* apresentam efeito alelopático sobre as espécies agrônomicas avaliadas, inibindo o seu crescimento e interferindo com a mobilização de reservas, e que seus exsudatos exercem efeitos positivos sobre a fase assimbiótica de *G. albida*.

Palavras chave: aleloquímicos, carboidratos de reserva, Fabaceae, sementes, micorrizas

ABSTRACT

Sesbania virgata (Cav.) Pers. is a legume species with potential for restoration of degraded areas and that forms symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Their seeds have allelochemicals that are exudated at the beginning of the imbibition process and found in the environment that surrounds the germinating seed. Co-germination of *S. virgata* with seeds of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) caused reduction in the germination percentage and germination speed index (IVG) of tomato, severely affecting seedling initial growth. Co-germination of rice (*Oryza sativa* L.) with *S. virgata* reduced root length and the growth of the aerial part of rice seedlings. The allelopathic effects of the *S. virgata* seed exudates on germination and seedling growth of these agronomic species were seen at the lowest assayed concentration (1 mg mL⁻¹). In addition, in the presence of the exudates, reduction in mobilization of storage carbohydrates was observed in seeds of tomato and rice, an effect that was not seen when commercial (+)-catechin was used. These results suggest that, besides (+)-catechin, there are other allelopathic compounds in seeds of *S. virgata* that can interfere with the development of the agronomic species. In tomato, seed exudates of *S. virgata* reduced the activity of endo- β -mannanase and increased vacuolar acid invertase, whereas commercial (+)-catechin promoted the activity of endo- β -mannanase and inhibited cell wall acid invertase. When seed or root exudates of *S. virgata* were assayed on the assymbiotic phase of the AMF, spore germination and mycelial growth of *Gigaspora albida* Becker & Hall were stimulated *in vitro* only in the presence of the seed exudates. We concluded that seeds of *S. virgata* have allelopathic effect on agronomic species, inhibiting their growth and interfering with the mobilization of reserves and that their exudates exert positive effects on the assymbiotic phase of *G. albida*.

Keywords: allelochemicals, storage carbohydrates, Fabaceae, seeds, mycorrhizas

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
AGRADECIMENTOS	xvii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv

Introdução

1 Alelopatia	1
2 Metodologias <i>in vitro</i> de estudo da alelopatia	3
3 Alelopatia na germinação de sementes e crescimento inicial	5
4 Aleloquímicos em sementes	8
5 Efeitos alelopáticos sobre a mobilização das reservas de sementes	11
5.1 Mobilização das reservas de sementes de tomate e arroz	12
6 Efeitos alelopáticos na simbiose com microrganismos	14
6.1 Fungos micorrízicos arbusculares	16
7 Importância do conhecimento dos processos alelopáticos	23
8 <i>Sesbania virgata</i>	23

Objetivos

27

Parte 1. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de sementes de *Sesbania virgata* na germinação, crescimento inicial e mobilização de reservas de tomate e arroz

1 Material e Métodos	29
1.1 Material biológico	29
1.2 Co-germinação em câmara de crescimento de sementes de <i>S. virgata</i> e sementes de tomate ou arroz	29
1.3 Germinação de sementes de <i>S. virgata</i>	30
1.4 Obtenção de extratos aquosos dos exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i>	30
1.5 Bioensaios de fitotoxicidade dos exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i> e (+)-catequina comercial em tomate	31
1.6 Bioensaios de fitotoxicidade dos exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i> e (+)-catequina comercial em arroz	31

1.7 Extração e quantificação de carboidratos solúveis das sementes de tomate e arroz	32
1.8 Análise de carboidratos solúveis por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD)	32
1.9 Extração e quantificação de amido das sementes de tomate e arroz	33
1.10 Ensaio enzimáticos	34
1.10.1 Extração e determinação de atividade de α -galactosidase	34
1.10.2 Extração e determinação de atividade de α -amilase	34
1.10.3 Extração e determinação de atividade de endo-1,4- β -mananase	35
1.10.4 Extração e determinação de atividade de invertases	35
1.10.5 Quantificação de proteínas	36
1.11 Delineamento experimental e análise estatística	36
2 Resultados	37
2.1 Co-germinação de sementes de <i>S. virgata</i> e sementes de tomate e arroz	37
2.2 Bioensaios de fitotoxicidade dos exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i> e (+)-catequina comercial em tomate e arroz	39
2.3 Análises bioquímicas	46
3 Discussão	55
4 Conclusão	63

Parte 2. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de *Sesbania virgata* sobre a fase assimbiótica do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora albida*

1 Material e Métodos	65
1.1 Obtenção de exsudatos brutos de sementes de <i>Sesbania virgata</i>	65
1.2 Obtenção de exsudatos brutos de raízes de <i>Sesbania virgata</i>	65
1.3 Quantificação dos exsudatos de <i>Sesbania virgata</i>	66
1.4 Ensaio de germinação <i>in vitro</i> de <i>Gigaspora albida</i>	66
1.5 Análise estatística dos dados	67
2 Resultados	68
3 Discussão	71
4 Conclusão	73

Considerações Finais

Referências Bibliográficas

DEDICATÓRIA

Aquele que desde o princípio reina, criador do
universo, Deus do impossível.

Aos meus queridos pais FLORÊNCIO e
ELUZINETE.

À AKSONNOAN, meu esposo, minha vida.

Aos meus amados sobrinhos: Alexandre José,
João Marcelo, Maria Alice e Maria Clara.

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais uma etapa, resultado de muitos esforços, dedicação e trabalho, gostaria de agradecer aos que contribuíram de alguma forma para que o êxito fosse alcançado.

À minha orientadora Dra. Márcia Regina Braga, pelo acolhimento, incentivo, apoio e, principalmente, pela paciência e grande compreensão. Obrigada pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Fábio Sérgio Barbosa da Silva, pela ajuda na implantação e condução do projeto, por todo incentivo, amizade, exemplo profissional e conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural (PPG/BCE) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Um agradecimento especial à Líliam Panagio, secretária do PPG/BCE, pela atenção e eficiência no atendimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro (CAPES/DINTER e CAPES/PROAP).

À Universidade de Pernambuco – UPE, em especial ao Campus Petrolina, pelo apoio oferecido durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do Doutorado Interinstitucional (DINTER) UNICAMP/UPE: Adauto Almeida Neto, Daiane Galvão, Izabel Arruda, Juliana Maranhão, Mônica Moreira, Maria das Neves Figueiroa, Tânia Guimarães e Viviane Tannuri. Um agradecimento especial à Dai pela oportunidade de dividirmos, inicialmente (2010.2), o mesmo “teto” em Campinas, pela confiança, amizade, convívio e conversas. Foi muito bom te conhecer.

Aos pesquisadores, funcionários, técnicos e amigos do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica (IBt) da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Um agradecimento especial à Daiane Mignoni pelo grande auxílio nas

análises laboratoriais, por toda ajuda prestada ao longo deste trabalho e pelo apoio, carinho e amizade. Obrigada Dai.

Aos companheiros do Alojamento do IBt pelo convívio. Um agradecimento especial às mineiras Fernanda Silva e Lílian Cangussu, às baianas Marthinha Böker e Simone Oliveira, às paulistanas Camila Galvão e Laura Benitez, e à sul-mato-grossense Josiane Quevedo, pela amizade, convivência diária e momentos de alegria e relaxamento. Bom saber que Deus colocou esses “anjinhos” no meu caminho. Pessoas especiais como vocês sempre ficarão guardadas no meu coração.

Aos professores (Fábio Barbosa, Francineyde Alves e Maryluce Campos) e aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Enzimologia e Fitoquímica Aplicada à Micologia (LEFAM)/UPE Campus Petrolina.

Às amigas que já existiam antes de iniciar essa trajetória, Daniella Alencar, Izabella Gomes, Marcella Leite, Marcela Freitas (Marcelinha), Morgana Amaral e Tathiana Rangel, pela energia positiva e pelo carinho.

Aos meus irmãos, Marcelo e Marcelle (Kaká), cunhados, Cláudia e Alexandre, e sobrinhos, Alexandre José, João Marcelo, Maria Alice e Maria Clara, pela existência e carinho.

Aos meus pais, Florêncio e Eluzinete, por tudo que fizeram e fazem por mim.

Ao meu esposo, Aksonnoan, companheiro indispensável, que acreditou em mim, apoiando-me. Sem você meu ânimo teria se enfraquecido ao longo do caminho.

A Deus, por suas graças, por todas as portas abertas e por tornar tudo possível, por me amparar nos momentos difíceis, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me estimularam e me apoiaram em distintos momentos, meu carinhoso muito obrigada!

*"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."*

Cora Coralina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1. Possíveis vias para a liberação de aleloquímicos no ambiente.	1
Figura 2. Representação gráfica da espermosfera.	9
Figura 3. Características morfológicas da simbiose micorrízica arbuscular.	20
Figura 4. Aspecto geral, inflorescência e frutos com sementes de <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers.	24

Parte 1. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de sementes de *Sesbania virgata* na germinação, crescimento inicial e mobilização de reservas de tomate e arroz

Figura 1. Aparência das plântulas de tomate (A) e arroz (B) co-germinadas com <i>Sesbania virgata</i> , após 5 dias.	38
Figura 2. Efeito da solução de extratos aquosos dos exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i> (EAS) e de (+)-catequina comercial, em diferentes concentrações e dias, na germinação das sementes de tomate (A-D) e de arroz (E-H). O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As letras comparam as médias dos diferentes tratamentos em relação ao controle. Letras maiúsculas referem-se ao efeito da solução de EAS e minúsculas de (+)-catequina. As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	40
Figura 3. Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, em diferentes concentrações, no comprimento radicular e da parte aérea das plântulas de tomate (A e C) e de arroz (B e D), respectivamente, após 5 dias do início da embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).	41
Figura 4. Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, em diferentes concentrações, na matéria fresca e seca das plântulas de tomate (A e C) e de arroz (B e D), respectivamente, após 5 dias do início da embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem	

estatisticamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 42

Figura 5. Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , na germinação das sementes de tomate (**A**) e de arroz (**B**), durante quatro dias de embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 44

Figura 6. Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , na matéria fresca e seca das plântulas de tomate (**A** e **C**) e de arroz (**B** e **D**), respectivamente, durante quatro dias de embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 45

Figura 7. Efeito da solução de EAS e da (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , em radícula (setas) das plântulas de tomate (**A**) e de arroz (**B**), após 4 dias do início da embebição. 46

Figura 8. Teor de açúcares solúveis totais e de açúcares redutores das sementes de tomate (**A** e **C**) e de arroz (**B** e **D**), respectivamente, embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante quatro dias. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras indicam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos diferentes tratamentos, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 47

Figura 9. Conteúdo de amido das sementes de tomate (**A**) e de arroz (**B**) embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante quatro dias de embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras indicam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 48

Figura 10. Quantidade de glucose (**A**), frutose (**B**) e sacarose (**C**) nas sementes de tomate embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante quatro dias de embebição. Dados obtidos por análise de HPAEC/PAD. O controle refere-se à germinação das sementes somente com água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos

diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

49

Figura 11. Quantidade de glucose (**A**), frutose (**B**) e sacarose (**C**) nas sementes de arroz embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante quatro dias de embebição. Dados obtidos por análise de HPAEC/PAD. O controle refere-se à germinação das sementes somente com água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

50

Parte 2. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de *Sesbania virgata* sobre a fase assimbiótica do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora albida*

Figura 1. Cromatogramas obtidos da análise por LC/MS: padrão de catequina comercial (**A**) e exsudatos de sementes de *Sesbania virgata* (**B**). Picos: 1 = catequina (tempo de retenção 14,7 min); 2 = dímero de catequina (tempo de retenção 12,3 min).

70

LISTA DE TABELAS

Parte 1. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de sementes de *Sesbania virgata* na germinação, crescimento inicial e mobilização de reservas de tomate e arroz

Tabela 1 – Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), massas fresca e seca e crescimento inicial das plântulas de tomate e arroz no ensaio de co-germinação com <i>Sesbania virgata</i> , após 5 dias.	37
Tabela 2 – Atividade de α -galactosidase em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de <i>Sesbania virgata</i> ou (+)-catequina comercial (1 mg mL ⁻¹)	51
Tabela 3 – Atividade de α -amilase em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de <i>Sesbania virgata</i> ou (+)-catequina comercial (1 mg mL ⁻¹)	52
Tabela 4 – Atividade de endo- β -mananase em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de <i>Sesbania virgata</i> ou (+)-catequina comercial (1 mg mL ⁻¹)	53
Tabela 5 – Atividade de invertases em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de <i>Sesbania virgata</i> ou (+)-catequina comercial (1 mg mL ⁻¹)	54

Parte 2. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de *Sesbania virgata* sobre a fase assimbiótica do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora albida*

Tabela 1 – Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de esporos de <i>Gigaspora albida</i> , em meio agar-água suplementado com diferentes concentrações de exsudatos brutos de sementes e de raízes de <i>Sesbania virgata</i> , aos 7 e 14 dias após inoculação.	68
Tabela 2 – Crescimento micelial (mm/esporo germinado) <i>in vitro</i> de esporos de <i>Gigaspora albida</i> , em meio agar-água suplementado com diferentes concentrações de exsudatos brutos de sementes e de raízes de <i>Sesbania virgata</i> , aos 7 e 14 dias após inoculação.	69
Tabela 3 – Conteúdo de carboidratos solúveis, proteínas totais, fenóis totais, flavonóides totais e taninos condensados (mg mL ⁻¹) em exsudatos brutos de	

sementes e de raízes de *Sesbania virgata*

69

Introdução

1 Alelopatia

A alelopatia é um fenômeno que consiste na liberação de compostos químicos por uma planta que podem influenciar o crescimento e o estabelecimento de plantas vizinhas, em ecossistemas naturais e manejados, incluindo microrganismos (Rice 1984; Teasdale et al. 2012). As substâncias envolvidas nos processos alelopáticos são denominadas aleloquímicos ou fitotoxinas, podendo ser encontradas em diferentes concentrações nas várias partes das plantas (folhas, caules, raízes, rizomas, sementes e flores). Elas são liberadas para o ambiente por diferentes processos (Figura 1), como lixiviação, volatilização, exsudação radicular, exsudação após embebição das sementes e decomposição de tecidos vegetais (Albuquerque et al. 2010; Belinelo et al. 2008; Ferreira & Áquila 2000; Perry et al. 2007).

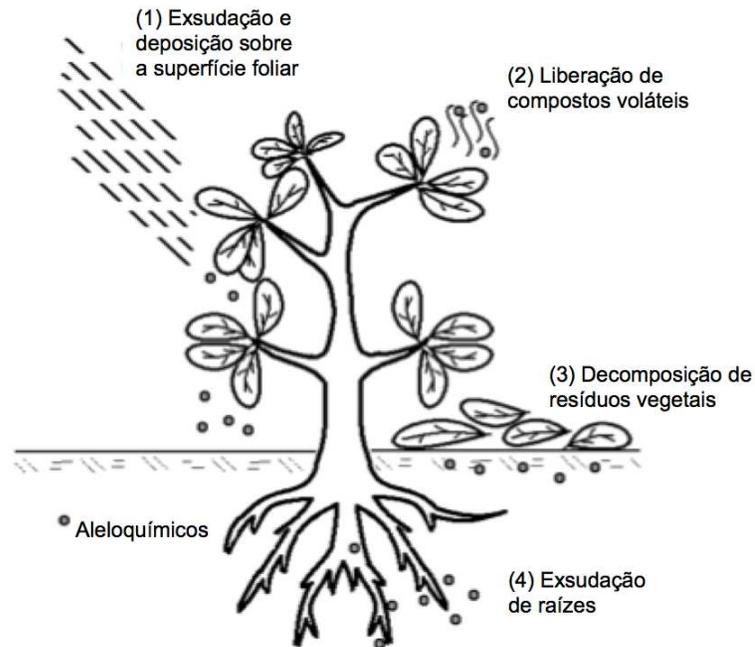


Figura 1. Possíveis vias para a liberação de aleloquímicos no ambiente (Adaptado: Albuquerque et al. 2010).

Aleloquímicos variam em sua estrutura química, modos de ação e efeitos nas plantas (Weir et al. 2004), podendo agir sobre a divisão e o alongamento celular, permeabilidade das membranas celulares, abertura estomática, fotossíntese, respiração, além de interferir nos mecanismos hormonais de indução de crescimento (Rice 1984). O modo de ação dos aleloquímicos pode ser direto ou indireto. O primeiro compreende alterações celulares e metabólicas da planta receptora, incluindo modificações no funcionamento de membranas, na absorção de nutrientes e de água, na atividade fotossintética e respiratória, entre outras. No modo de ação indireto ocorrem alterações nas propriedades e condições nutricionais do solo, além de alterações de populações e/ou atividade dos microrganismos (Ferreira & Áquila 2000; Maraschin-Silva & Áquila 2006; Meier & Bowman 2008).

Efeitos alelopáticos podem ser inibitórios ou estimulatórios, dependendo da espécie que contém os aleloquímicos e da planta-alvo, bem como dos compostos envolvidos (Belinelo et al. 2008; Pellissier 2013). Alves et al. (2004) observaram efeitos inibitórios de extratos voláteis de óleos essenciais de canela, alecrim-pimenta, capim-citronela e alfavaca-cravo na germinação e no comprimento da raiz de plântulas de alface, e tais efeitos variaram de acordo com a concentração do óleo. O extrato volátil de óleo de jaborandi estimulou o crescimento da radícula e não provocou inibição da germinação de sementes de alface, caracterizando um efeito alelopático benéfico.

Os efeitos alelopáticos são mediados por diferentes categorias de compostos secundários, como compostos fenólicos, flavonóides, terpenóides, alcalóides e esteróides. A ampliação do conhecimento desses compostos deve-se aos recentes avanços na química de produtos naturais, por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação. A atividade alelopática é provavelmente causada pela ação conjunta de vários aleloquímicos e não pelo efeito de um composto isoladamente (Ferreira & Áquila 2000; Inderjit et al. 2002; Inderjit & Duke 2003; Lorenzo & González 2010).

A atividade de aleloquímicos pode ser influenciada por condições abióticas e bióticas do ambiente, que podem diminuir ou aumentar a intensidade de seus efeitos (Bauer et al. 2012). Na presença de luz ultravioleta e em condições alcalinas, aleloquímicos de *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel, por exemplo, tiveram seus efeitos potencializados (Rudrappa et al. 2009); catequina, aleloquímico produzido por *Centaurea maculosa* Lam., tem sua concentração no solo influenciada por metais, levando a efeitos altamente variáveis deste composto sobre o crescimento de outras

espécies (Pollock et al. 2009). Microrganismos do solo podem degradar aleloquímicos, diminuindo ou eliminando as interações alelopáticas (Kaur et al. 2009). Zhu et al. (2011) observaram que as comunidades microbianas do solo têm potencial para atenuar ou eliminar os efeitos fitotóxicos dos aleloquímicos liberados por *Eupatorium adenophorum* Spreng., uma das espécies exóticas mais destrutivas na China.

2 Metodologias *in vitro* de estudo da alelopatia

A liberação de aleloquímicos pode ser aumentada ou reduzida pela idade da planta, tipo de órgão vegetal, cultivar e diversos fatores ambientais. Nesse sentido, a escolha de uma metodologia adequada para a identificação de plantas alelopáticas e/ou dos aleloquímicos liberados é importante (Albuquerque et al. 2010). Souza Filho et al. (2010) revisaram protocolos relacionados aos bioensaios desenvolvidos em condições de laboratório e utilizados para caracterizar as propriedades alelopáticas de extratos vegetais e de substâncias isoladas. O bioensaio mais utilizado é a germinação de sementes, bom indicador das reais potencialidades de um dado aleloquímico. Trata-se de um teste de grande validade para o estudo da alelopatia, pois é um método simples, rápido e requer pequena quantidade da solução a ser estudada (Pires & Oliveira 2011).

Bioensaios conduzidos em placas de Petri constituem a técnica mais comum e têm como finalidade avaliar os efeitos de extratos de plantas com diferentes solventes, óleos essenciais, substâncias naturais isoladas ou compostos comerciais sobre a germinação e o crescimento inicial de uma determinada planta-alvo. Os extratos são geralmente obtidos a partir de folhas, mas é possível ensaiar extratos de diferentes órgãos vegetais (caules, raízes, flores, frutos e sementes). Em tal técnica, a parte inferior da placa de Petri é normalmente revestida com papel de filtro e as sementes da planta-alvo são germinadas em soluções que contêm a(s) substância(s) com potencial alelopático, muitas vezes, em diferentes concentrações. As placas são mantidas sob condições de fotoperíodo e temperatura ótimos para a germinação das espécies-alvo selecionadas. Velocidade e porcentagem de germinação, bem como comprimento radicular e da parte aérea, são as variáveis comumente avaliadas nestes bioensaios (Albuquerque et al. 2010). Apesar do amplo uso desta técnica, uma das grandes limitações é a falta de padronização dos procedimentos experimentais. Cuidados devem ser tomados para que as respostas possam ser reproduzíveis (Simões et al. 2013; Souza Filho et al. 2010). Os testes podem ser realizados em laboratório à temperatura ambiente,

porém, como a temperatura tem efeito sobre a germinação e na ação alelopática, é desejável que a mesma seja controlada. Dessa forma, é comum o estudo em temperaturas entre 22 e 28 °C em câmaras de germinação do tipo BOD (Ferreira & Borghetti 2004).

Ferreira & Áquila (2000), em revisão sobre alelopatia, discutem metodologias e bioensaios mais usuais e apontam alguns cuidados que diminuem o problema de perda de umidade nas placas, como a utilização de mais de uma folha de papel filtro por placa, vedação das placas utilizando películas plásticas e a introdução de recipientes com água dentro da câmara de germinação. Os autores não recomendam macerar o material com potencial alelopático nem extraí-lo com solventes orgânicos, pois podem ser obtidos resultados que na natureza não seriam observados.

As sementes são excelentes materiais para bioensaios, pois, quando reidratadas podem germinar e, como consequência, sofrem rápidas mudanças fisiológicas, tornando-se altamente sensíveis a estresses ambientais. Existem espécies mais sensíveis que outras, como *Lactuca sativa* L. (alface), *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Cucumis sativus* L. (pepino) e *Brassica chinensis* L. (couve-da-malásia), consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática e muito usadas em bioensaios de laboratório. Tais espécies apresentam germinação rápida e uniforme e um grau de sensibilidade que permite expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (Alves et al. 2004; Ferreira & Áquila 2000; Ferreira & Borghetti 2004).

Quando os bioensaios são realizados em placas de Petri ou caixas tipo gerbox em laboratório, a extensão da radícula, que deve ser no mínimo 50 % do tamanho da semente, é o critério usual para avaliação da germinação. A germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, porém a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente o critério é simplesmente se ocorre ou não a germinação. O acompanhamento da germinação deve ser diário ou em tempos mais curtos que 24 horas (Ferreira & Áquila 2000). Muitas vezes o efeito alelopático não se dá sobre a germinabilidade (percentual final de germinação no tempo), mas sobre outros parâmetros do processo, como exemplo, a velocidade de germinação (Ferreira & Borghetti 2004). Massa seca da raiz e/ou da parte aérea bem como o comprimento das plântulas ou radículas são os parâmetros mais usados para avaliar o efeito alelopático sobre o crescimento (Ferreira & Áquila 2000).

Fujii et al. (2003) desenvolveram um método para identificação de atividade alelopática de lixiviados de folhas, denominado método sanduíche. Esse método consiste

em adicionar matéria seca das folhas em estudo entre duas camadas de agar, sendo uma importante ferramenta para identificar efeito alelopático das folhas em condições de laboratório. Sementes da planta-alvo são semeadas aleatoriamente em cada placa. O agar é utilizado por ser uma substância que permite melhor translocação dos compostos solúveis em água até a espécie-alvo (Albuquerque et al. 2010; Fujji et al. 2003).

Pellissier (2013) avaliou um novo método para bioensaios de germinação em alelopatia baseado nas diferenças morfológicas das sementes das espécies indicadoras. Neste método, denominado “BEST” (Biometrics Enhanced Seed Test), inspirado em farmacologia, a quantidade de aleloquímico ensaiada é calculada de acordo com a biometria das sementes (volume, massa, superfície, forma e área de contato). O autor comparou, pelo método convencional (concentrações idênticas) e BEST, os efeitos do aleloquímico BOA (2-benzoxazolinona) sobre sementes de duas espécies-alvo (*L. sativa* e *Raphanus sativus* L.). O método BEST forneceu resultados mais diferenciados que contribuíram para a avaliação mais realista da suscetibilidade de sementes de diferentes espécies ao aleloquímico.

O conjunto de metodologias empregadas possibilita conhecer as espécies com atividades alelopáticas, com bom grau de segurança, no intuito de avaliar seus efeitos inibitórios, suas fontes e seu comportamento no ambiente para aplicação, por exemplo, como herbicidas (Souza Filho et al. 2010; Vyvyan 2002).

3 Alelopatia na germinação de sementes e crescimento inicial

A germinação de sementes é uma sequência de eventos metabólicos que resulta no surgimento do eixo embrionário, geralmente da radícula, através dos tecidos circundantes (Bewley et al. 2013). Trata-se de um processo complexo que depende de diversos fatores, como temperatura, luz, água e composição de gases na atmosfera (Cabral et al. 2003). Em sementes viáveis e não dormentes, a absorção de água (embebição) constitui a primeira etapa da germinação e promove a reativação do metabolismo que conduz à expansão do embrião.

O processo germinativo, do ponto de vista fisio-bioquímico, consiste das seguintes fases: embebição, aumento das atividades metabólicas com a transcrição substancial de novos genes e mobilização das reservas armazenadas (Bewley et al. 2013). A maior mudança que ocorre durante a germinação de sementes é o rápido aumento da

respiração (Bewley 1997), envolvendo a glicólise, a via das pentoses, o ciclo dos ácidos tricarbóxicos e a fosforilação oxidativa.

Diferentes fitotoxinas interferem na germinação de sementes e/ou no desenvolvimento de outras plantas, com efeitos na produção de metabólitos, fotossíntese, respiração, transporte de membrana e na sinalização química intracelular (Ferreira & Áquila 2000). Para os autores, os efeitos alelopáticos são manifestações secundárias de mudanças anteriores, ocorridas inicialmente em nível molecular e celular, podendo ser observados tanto na germinação quanto no crescimento da plântula, sendo a germinação menos sensível aos aleloquímicos.

Soares et al. (2002), ao avaliar o efeito de extratos aquosos de folhas de *Caesalpinia pluviosa* DC. e *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Caesalpinaceae), *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula e *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. (Mimosaceae), *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard e *Erythrina speciosa* Andrews (Fabaceae), leguminosas arbóreas brasileiras, sobre a germinação e o desenvolvimento radicular de alface (*L. sativa* cv. "Grand Rapids"), observaram que a maioria das espécies ensaiadas inibiu o desenvolvimento radicular de alface, mas apenas *M. artemisiana* apresentou efeito inibidor significativo sobre sua germinação. Este efeito foi revertido pela filtração em polivinilpirrolidona, sugerindo a natureza fenólica das toxinas envolvidas.

Mourão Júnior & Souza Filho (2010) determinaram e caracterizaram o padrão de atividade alelopática em oito espécies de Leguminosae, em função de variações de espécies, fonte de extratos (folhas e raízes) e sensibilidade das plantas-alvo (ervas daninhas que infestam as áreas de pastagens cultivadas da Amazônia: *Mimosa pudica* L. e *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby). Os resultados indicaram que as espécies estudadas não apresentaram padrão semelhante no tocante aos efeitos potenciais alelopáticos. Para a maioria das espécies, as folhas foram a principal fonte de aleloquímicos e, em termos de padrão de respostas das espécies-alvo, o alongamento da radícula foi mais sensível aos efeitos dos extratos, ficando o alongamento do hipocótilo como o de menor sensibilidade.

O efeito alelopático de extratos de folhas frescas e secas de *Nicotiana tabacum* L. e *Eucalyptus grandis* W. Hill foi avaliado sobre a germinação e desenvolvimento inicial de três hortaliças (alface, brócolis e repolho) (Goetze & Thomé 2004). Os autores relataram que os extratos diminuíram a velocidade de germinação das hortaliças, principalmente aqueles obtidos a partir de folhas secas, nos quais as sementes não germinaram, e o número final de sementes germinadas foi afetado em quase todos os tratamentos,

independentemente do tipo de extrato utilizado. As hortaliças tiveram o comprimento da parte aérea e da raiz afetado em todos os tratamentos, comparados ao controle, e o peso fresco final foi influenciado pelos extratos elaborados a partir de folhas frescas de tabaco.

O potencial alelopático de frações semipurificadas (hexano, acetato de etila e etanol-água) do extrato etanólico da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link foi avaliado através de ensaios de germinação e de crescimento de *L. sativa* (alface), *S. lycopersicum* (tomate), *Allium cepa* L. (cebola) e *Triticum aestivum* L. (trigo), sob condições de laboratório. Todas as frações estudadas interferiram na germinação e no crescimento inicial das plantas-alvo, sendo verificado efeito alelopático mais evidente no índice de velocidade de germinação e no crescimento radicular das plântulas do que na porcentagem final de sementes germinadas (Cândido et al. 2010).

A interferência alelopática ocorre tanto em comunidades naturais de plantas quanto no crescimento das culturas agrícolas (Bell & Koeppel 1972). Na literatura há diversos trabalhos relatando que plantas daninhas têm efeito alelopático sobre a germinação de sementes e o crescimento de mudas de plantas de culturas economicamente importantes (Gulzar & Siddiqui 2014; Mulatu et al. 2011; Sisodia & Siddiqui 2010). Costa et al. (1996), analisando a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), verificaram que a germinação e o crescimento das plântulas foram prejudicados pelos extratos aquosos de algumas leguminosas usadas como adubo verde, variando a intensidade do efeito em função da espécie vegetal e das concentrações. Efeitos alelopáticos sobre a germinação de sementes de feijão também foram avaliados por Carvalho et al. (2012). Segundo Bais et al. (2003), espécies invasoras ameaçam a integridade de comunidades nativas e o estabelecimento de monoculturas em novos habitats.

A maioria dos estudos avalia o efeito de aleloquímicos extraídos de folhas ou exsudados por raízes e como estes podem influenciar a habilidade de uma planta em se tornar invasiva em um novo ambiente (Walker et al. 2003). Poucos relatos referem-se à química na região que circunda a semente germinante. Sementes também possuem a capacidade de liberar aleloquímicos após o início do processo de embebição, que podem contribuir para o comportamento invasivo de algumas espécies (Ndakidemi & Dakora 2003).

4 Aleloquímicos em sementes

As sementes podem contribuir para os estudos relacionados à prospecção de atividade alelopática como fonte de compostos químicos promissores e vários trabalhos comprovam a relevância dessa abordagem (Anaya et al. 1993; Inoue et al. 2010; Mendonça 2008; Simões et al. 2008; Souza Filho 2002; Souza Filho et al. 2011; Villagrasa et al. 2006; Xuan & Tsuzuki 2002).

A exsudação de substâncias por sementes é iniciada com a embebição, considerada a fase I do processo germinativo. Após hidratação completa, segue-se um período de absorção de água limitada (fase II), no qual ocorrem várias reações metabólicas que desencadeiam a protrusão da radícula, como por exemplo, a síntese de mRNAs e proteínas e a formação de mitocôndrias. Com a protrusão da radícula, o processo de germinação é finalizado e inicia-se o desenvolvimento da plântula (fase III). Esse período também é acompanhado por um aumento da exsudação de metabólitos de baixo peso molecular seguido pelo aumento dos produtos de degradação dos compostos de reserva, como por exemplo, os carboidratos de parede celular, utilizados como fonte de carbono inicial para o desenvolvimento de plântulas (Bewley et al. 2013; Nelson 2004; Nonogaki et al. 2010).

Souza Filho et al. (2011) relataram a importância das sementes como fonte alternativa de compostos químicos com atividade alelopática. Entre os aleloquímicos produzidos por sementes destacam-se os alcalóides, flavonóides, benzoxazinóides e resinas glicosídicas, que atuam na repelência de insetos, na inibição do desenvolvimento de patógenos nas sementes, na inibição do desenvolvimento inicial de plantas daninhas e como sinalizadores positivos para a simbiose com microrganismos do solo.

O solo que circunda a semente germinante representa a espermosfera (Figura 2), zona de curta duração onde ocorre interação microbiana em torno da semente. Esta região é dinâmica e estabelecida pela liberação de compostos assim que a semente começa a hidratar. Diferenças no tamanho, massa, morfologia, composição química e outras características de sementes de diferentes espécies vegetais afetam a quantidade e a qualidade dos exsudatos liberados durante a germinação. Uma grande variedade de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e substâncias voláteis foi detectada em exsudatos de sementes (Nelson 2004).

Os exsudatos oriundos de sementes também possuem potencial de exercer efeitos inibitórios em sementes e plântulas de outras espécies. Souza Filho (2002)

estudou os efeitos alelopáticos de extratos hidroalcoólicos da parte aérea, raízes e sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) e verificou que, independentemente da espécie-alvo (*M. pudica*, *Urena lobata* L., *S. obtusifolia* e *S. occidentalis*), as sementes apresentaram atividade alelopática inibitória da germinação de sementes e do alongamento da radícula mais intensa do que os demais extratos, sendo as principais fontes de substâncias químicas com atividades potencialmente alelopáticas no feijão-de-porco.

Extratos hidroalcoólicos preparados a partir de sementes, folhas e caules de *Annona crassiflora* Mart. foram avaliados em bioensaios de germinação e desenvolvimento de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf, *Euphorbia heterophylla* L. e *Ipomoea grandifolia* (L. f.) Lam. (Inoue et al. 2010). Os autores constataram que o extrato obtido a partir das sementes de *A. crassiflora* levou a resultados mais promissores na inibição das plantas daninhas. Triterpenóides de sementes de *Swietenia humilis* Zucc., com comprovado efeito antifúngico, bactericida e com atividade antiviral, inibiram o crescimento de raízes de *Amaranthus hypochondriacus* L. e *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (Anaya et al. 1993).

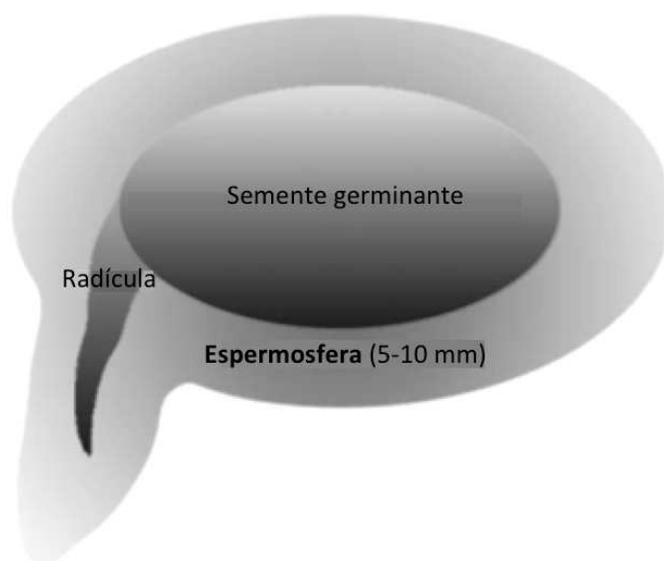


Figura 2. Representação gráfica da espermosfera (Adaptado: Nelson 2004).

A alfafa (*Medicago sativa* L.) tem sido investigada como uma espécie que apresenta tanto a autotoxicidade como a heterotoxicidade, pois contém compostos

fitotóxicos solúveis em água que são inibidores não somente da própria espécie, mas também de outras. Xuan & Tsuzuki (2002) investigaram as diferenças no potencial alelopático de oito variedades de alfafa e confirmaram a presença dos aleloquímicos tanto nas plantas como nas sementes. Entretanto, o potencial alelopático diferiu entre os extratos aquosos tanto de material fresco quanto seco bem como nos lixiviados da germinação de sementes de alfafa, sugerindo que aleloquímicos são distribuídos de forma diferente nas variedades ensaiadas.

De acordo com o estágio ontogenético das sementes presentes no banco de sementes do solo, o efeito alelopático varia, aumentando com a sua idade. Sementes próximas à senescência apresentam maior capacidade de liberar metabólitos secundários enquanto sementes novas, recém-dispersas, são capazes de reabsorver açúcares, aminoácidos e outros metabólitos por transporte ativo (Souza Filho et al. 2011). Na planta, a concentração de aleloquímicos aumenta abruptamente alguns dias após a germinação e, em seguida, diminui progressivamente. O aumento de concentração dessas substâncias, por sua vez, indica que os aleloquímicos são sintetizados durante o crescimento da plântula (Villagrasa et al. 2006).

Mendonça (2008) analisou os metabólitos secundários com atividade alelopática em extratos aquosos de sementes de *C. ensiformis*, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e avaliou a atividade alelopática sobre a germinação das plantas daninhas corda-de-viola (*J. grandifolia*) e trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.). No estudo alelopático registraram-se resultados satisfatórios com relação à inibição de germinação das sementes das plantas daninhas devido à presença de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido *p*-anísico e genisteína.

Ceballos et al. (1998), ao estudar a anatomia das sementes e a localização histológica de compostos fenólicos em duas espécies de *Sesbania* (Fabaceae), demonstraram que substâncias fenólicas estão localizadas principalmente no tegumento e no parênquima sub-hilar das sementes e que os tecidos atuam em conjunto para facilitar a rápida exsudação destes compostos durante o processo de embebição das sementes. A espécie anual *S. vesicaria* (Jacq.) Elliott libera o flavonóide luteolina e pequenas quantidades de proantocianidinas, enquanto a espécie perene *S. drummondii* (Rydb.) Cory libera principalmente proantocianidinas.

Simões et al. (2008) isolaram e identificaram, a partir do tegumento de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., o flavonóide (+)-catequina, aleloquímico rapidamente

liberado para o ambiente em altas concentrações (235 µg/semente) durante a germinação.

Compostos liberados pelas sementes também estão envolvidos na interação planta-microrganismos, especialmente na espermosfera, servindo como sinal regulatório positivo para a simbiose com microrganismos do solo (Ceballos et al. 1998; Philips 1992). Quercetina, flavonóide dominante nas sementes de alfafa, afeta o crescimento de bactérias do solo formadoras de nódulos fixadores de nitrogênio (*Rhizobium meliloti*) e promove a germinação de esporos e o crescimento micelial de fungos micorrízicos arbusculares (Gianinazzi-Pearson et al. 1989; Tsai & Philips 1991).

5 Efeitos alelopáticos sobre a mobilização das reservas de sementes

A extensão e protrusão da radícula através do tegumento da semente indica o término do processo de germinação e o início do crescimento ativo da plântula (fase III). Durante esta fase, substâncias oriundas em grande parte da mobilização de reservas são liberadas para o meio. Triglicerídeos são degradados por lipases em ácidos graxos e, posteriormente, pelas enzimas da β -oxidação, em acetato. Proteinases e peptidases degradam proteínas em aminoácidos e, a partir do amido e outros polissacarídeos, açúcares simples são disponibilizados por α e β -amilases, α -glucosidases e dextrinases para o suprimento do metabolismo (Bewley et al. 2013; Nelson 2004).

Os aleloquímicos podem interferir na mobilização das reservas necessárias para o crescimento do embrião durante e após a germinação, afetando as enzimas envolvidas neste processo ou o transporte de hormônios (ácido abscísico, giberelinas, etileno, brassinosteróides, auxinas e citocininas). Tais compostos alteram a síntese ou a atividade de enzimas *in vivo* e *in vitro*, atuando nos processos de degradação celular e, assim, impedindo a germinação e o desenvolvimento inicial, bem como em outros processos fisiológicos vitais às plantas (Kucera et al. 2005; Sampietro 2010).

Em *Sicyos deppei* G. Don (Cucurbitaceae), uma espécie invasora endêmica do México, os lixiviados aquosos de partes aéreas mostraram forte efeito inibidor sobre outras plantas, ocasionando atraso na germinação e redução severa do crescimento da radícula (Lara-Núñez et al. 2006). Em sementes de tomate, ensaios *in vitro* revelaram que as fitotoxinas produzidas por essa espécie atrasam a degradação dos carboidratos de reserva, reduzem a atividade de enzimas do metabolismo de sacarose e de hidrólise de parede celular e aumentam o teor de ácido abscísico (Lara-Núñez et al. 2009).

Compostos fenólicos extraídos de solos cultivados com *Pinus laricio* Poiret, spp. calabrica, inibiram a germinação das sementes da própria espécie e foram capazes de reduzir a atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose-fosfato isomerase e aldolase, envolvidas na glicólise e na via oxidativa das pentoses fosfato, as quais asseguram níveis de ATP e esqueletos de carbono suficientes para a germinação das sementes (Muscolo et al. 2001). Lixiviados aquosos da serapilheira de *Eucalyptus globulus* Labill. reduziram a atividade da enzima α -amilase em sementes de *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. cv. AKP-2, resultando em inibição da germinação (Padhy et al. 2000).

Singh et al. (2009) verificaram que concentrações crescentes dos lixiviados aquosos de folhas de *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. diminuíram o conteúdo dos açúcares solúveis totais e aumentaram o conteúdo de amido em sementes de milho. Os autores sugerem que estas diferenças na mobilização das reservas possam ter ocorrido devido a uma inibição na síntese de ácido giberélico e na síntese do ácido indol-3-acético, que são hormônios de crescimento e conhecidos por regular a produção de amilase durante a germinação das sementes, ou ainda sugerem que houve uma indução da síntese do ácido abscísico conhecido por ser um potente inibidor de germinação e da mobilização dos compostos de reserva em sementes de *S. virgata* (Tonini et al. 2010).

5.1 Mobilização das reservas de sementes de tomate e arroz

A germinação da semente é iniciada graças às reservas próprias do embrião e depois mantida com o consumo dos componentes dos tecidos de reserva, pela atividade enzimática e pelo fluxo dos componentes solúveis às regiões de crescimento onde há rápido consumo (Carvalho & Nakagawa 2000; Neves et al. 2007). O carboidrato de reserva mais comumente encontrado nas sementes é o amido. Nos cereais como, por exemplo, o arroz e o trigo, o amido é a principal reserva que é degradada durante a germinação em unidades menores e solúveis, fornecendo substratos para gerar energia (ATP) e garantir o estabelecimento inicial da plântula (He et al. 2011). Existem várias enzimas capazes de catalisar a hidrólise do amido (enzimas amilolíticas), relacionadas ao processo de mobilização de nutrientes para germinação da semente. No endosperma da semente, o amido é hidrolisado pela α -amilase (EC 3.2.1.1), uma endoenzima que atua dentro da cadeia linear de forma aleatória, rompendo ligações α -(1 \rightarrow 4), produzindo

oligossacarídeos que contêm ligações α -(1→6), além de glicose e maltose, substrato solúvel, disponível para o desenvolvimento do embrião (Silva et al. 2008).

A quebra do amido nas sementes parece ser um pré-requisito para a germinação e posterior crescimento das plântulas (Conley et al. 1999). A indução de α -amilase em sementes de muitas plantas é regulada por giberelinas (Ritchie & Gilroy 1998). Kato-Noguchi & Macías (2008) analisaram a atividade α -amilásica nas sementes de 12 espécies-alvo quando germinadas com MBOA, um metabólito secundário obtido de Poaceae, e verificaram que a atividade amilásica nas sementes foi inibida por MBOA. Os autores sugeriram que a biossíntese de giberilina foi inibida por MBOA não havendo assim a indução da atividade de α -amilase e, como consequência, houve a inibição de degradação de reservas.

Além disso, as sementes também apresentam, mesmo em pequenas quantidades, monossacarídeos e oligossacarídeos da série rafinose, o primeiro tipo de reserva a ser metabolizado na fase inicial da germinação (Bewley et al. 2013). Açúcares como a sacarose, glicose e frutose são essenciais no metabolismo da planta. Esses açúcares servem como substratos para a respiração, podendo ser fonte de carbono para a produção de uma grande variedade de metabólitos, incluindo aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos mais complexos como a celulose e o amido. A sacarose desempenha papel importante no processo germinativo das sementes e desenvolvimento das plântulas fornecendo energia e regulando a expressão gênica (Bonome et al. 2011). A sacarose é hidrolisada por invertases, produzindo quantidades equimolares de glicose e frutose. A maior atividade invertásica está associada ao período de intenso crescimento das plantas e participação no processo de divisão e expansão das células das sementes (Dietrich & Figueiredo Ribeiro 1986).

Existem pelo menos três isoformas de invertase nos tecidos, diferindo entre si pela localização celular e propriedades. Pode-se distinguir a atividade em cada um dos compartimentos celulares pela propriedade da enzima que se está detectando a atividade. A invertase ácida vacuolar está localizada no vacúolo, é solúvel e possui pH ótimo em torno de 4,6. Outra isoforma está presente na parede celular, é insolúvel e também possui pH ótimo em torno de 4,6 (invertase ácida de parede celular). A terceira isoforma, a invertase neutra citosólica, está localizada no citoplasma, é solúvel e possui pH ótimo em torno de 7,0 (Molle & Tiné 2009; Sturm 1999; Sturm & Tang 1999).

Em algumas leguminosas, ao invés do amido, polissacarídeos de reserva de parede celular (mananos, glucomananos, galactomananos, xiloglucanos e galactanos)

estão presentes, constituindo os principais carboidratos de reserva (Buckeridge & Reid 1996; Dietrich & Figueiredo Ribeiro 1986).

Os mananos são compostos de reserva detectados em sementes de várias espécies, incluindo o tomate. Além dos mananos (68 %), glucanos (21 %) e galactanos (5 %) também estão presentes em sementes de tomate, constituindo as principais reservas utilizadas durante a germinação e crescimento inicial da plântula. Estes carboidratos ocorrem como polissacarídeos de reserva de parede celular; a degradação e mobilização dos mananos durante a germinação e o crescimento pós-germinativo das plântulas é realizada pela ação de três enzimas: α -galactosidase, endo-1,4- β -mananase e β -manosidase (Lara-Núñez et al. 2009).

A enzima α -galactosidase (EC 3.2.1.22) catalisa a hidrólise de ligações α -galactosídicas liberando a α -D-galactose, a partir de resíduos α -D-galactosídeos em oligossacarídeos simples, tais como melibiose, rafinose e estaquiose, como também a partir de polissacarídeos mais complexos (Fujimoto et al. 2003; Góes & Ribeiro 2002; Lahuta et al. 2000). Os oligossacarídeos são fontes primárias de energia e substrato para a síntese de novos compostos durante a embebição e germinação das sementes (Edwards et al. 1992). A atividade enzimática, especialmente a da α -galactosidase, aumenta nesta fase (Kontos & Spyropoulos 1996) e sua principal função em algumas sementes é a de degradar os galactomananos de reserva no início da germinação (Góes & Ribeiro 2002). A enzima endo-1,4- β -mananase (EC 3.2.1.78), ou endo- β -mananase, atua clivando ligações β -(1 \rightarrow 4) entre os resíduos de manose na cadeia principal de manano.

6 Efeitos alelopáticos na simbiose com microrganismos

Compostos químicos com funções alelopáticas têm outros papéis ecológicos, como defesa da planta, quelação de nutrientes e regulação da biota do solo, de modo que afetam a decomposição e a fertilidade do solo (Inderjit et al. 2011). Para Mummey & Rillig (2006), plantas invasoras têm impacto sobre a composição e função da comunidade microbiana do solo. Os autores usaram métodos moleculares para examinar a estrutura da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em locais dominados por *C. maculosa* e em áreas campestres nativas adjacentes. Tanto a diversidade de FMA quanto a quantidade de hifas extrarradiculares foram alteradas pela invasão de *C. maculosa*,

sugerindo fortes impactos potenciais sobre os processos ecossistêmicos mediados por FMA.

Callaway et al. (2004) indicaram que *C. maculosa* pode causar mudanças na composição da comunidade microbiana do solo invadido, em parte pela liberação de catequina, um aleloquímico com atividade fitotóxica e antimicrobiana (Bais et al. 2002). Os autores demonstraram que *C. maculosa* tem maior efeito alelopático sobre espécies nativas da América do Norte do que sobre espécies nativas europeias que co-ocorrem *in vitro* e no campo. Assim, os efeitos inibidores da catequina sobre a densidade microbiana são mais intensos sobre os microrganismos encontrados nos solos norte-americanos do que os de solos europeus. Em alguns solos e para algumas espécies, é a interação da catequina com as comunidades microbianas do solo que causa a inibição do crescimento das plantas (Inderjit et al. 2011).

Em outro exemplo, *Alliaria petiolata* (M. Bieb.) Cavara & Grande, nativa da Europa e invasora na América do Norte, tem seu domínio, em parte, atribuído à produção de aleloquímicos e seus efeitos sobre a diversidade e abundância de FMA. Variações na quantidade de sinigrina (principal aleloquímico de *A. petiolata*) determinam o impacto negativo na simbiose micorrízica e no crescimento de plantas nativas. Essas diferenças biogeográficas são consistentes com a “hipótese das novas armas” (Callaway & Ridenour 2004), que sugere que algumas espécies de plantas invasoras possuem aleloquímicos únicos, poderosas armas bioquímicas que funcionam como mediadores de novas interações planta-comunidade microbiana do solo, para os quais as espécies nativas são mais resistentes (Inderjit et al. 2008; 2009; 2011; Lankau 2012). Populações nativas, como *Pilea pumila* (L.) A. Gray, que se adaptam a altas concentrações de sinigrina são mais tolerantes à concorrência do invasor e capazes de manter a colonização micorrízica em suas raízes (Callaway et al. 2008; Lankau 2012).

Nas interações planta-microrganismos, compostos produzidos por sementes também exercem papel nos casos da associação simbiótica de algumas fabáceas com bactérias fixadoras de nitrogênio (Ndakidemi & Dakora 2003). Sabe-se que *S. virgata* estabelece uma simbiose específica e eficiente com *Azorhizobium doebereinae* (syn. *A. johanna*), no entanto, esta associação não inibe a ocorrência de outras bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas, que ocorrem saprofiticamente próximo ao seu sistema radicular (Florentino & Moreira 2009; Florentino et al. 2009). Bomfeti et al. (2013) evidenciaram que *S. virgata* apresenta uma versatilidade no modo de

infecção e no tipo de nódulo como um ajuste às mudanças nas condições ambientais de crescimento.

No caso da simbiose micorrízica arbuscular, os benefícios vão muito além da nutrição de plantas individualizadas, pois eles também contribuem para a estruturação de comunidades vegetais. Para Schiavo et al. (2009), a inoculação com FMA pode contribuir para melhoria da qualidade de mudas, por meio do aumento da absorção de nutrientes do solo, principalmente os de baixa mobilidade, como fósforo, favorecendo a recuperação de áreas degradadas.

Sabe-se que existem plantas que contêm nos exsudatos radiculares moléculas capazes de estimular a germinação de esporos e o crescimento de FMA (Buee et al. 2000; Nagahashi & Douds 2000; Nair et al. 1991; Tahat et al. 2010). Estas moléculas não são sintetizadas ou são inativadas em plantas não hospedeiras (Oba et al. 2002). Estudos já desenvolvidos, em condições de campo, demonstram que o cultivo de leguminosas (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Crotalaria spectabilis* Roth, *C. breviflora* DC., *C. mucronata* Desv., *Mucuna aterrima* (Piper & Tracy) Merr., *M. pruriens* (L.) DC. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp.) favorece a esporulação e a diversidade de espécies de FMA (Benedetti et al. 2005).

Pesquisas relacionando os efeitos alelopáticos de resíduos vegetais e extratos das mais variadas espécies e seus efeitos no desenvolvimento de outras culturas são inúmeros. Porém, pouco se sabe sobre as características de liberação de exsudatos durante a germinação de sementes e são praticamente desconhecidos os seus efeitos em relação a comunidade microbiana edáfica, em especial aos FMA.

6.1 Fungos micorrízicos arbusculares

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) constituem um grupo heterogêneo de fungos pertencentes ao Filo Glomeromycota (Schüßler et al. 2001) que se associam simbioticamente com raízes de mais de 90 % das espécies de plantas, participando do funcionamento da maioria dos ecossistemas terrestres (Bonfante & Genre 2010; Smith & Read 2008).

Na simbiose micorrízica arbuscular, a relação mutualista ocorre entre os FMA e o sistema de raízes da maioria das plantas. Trata-se da associação terrestre mais difundida, de ampla ocorrência sob condições naturais, caracterizada pela penetração inter e intracelular do micélio fúngico e formação de estruturas ramificadas, os arbúsculos, sem

causar alterações macroscópicas visíveis (Garg & Chandel 2010; Parniske 2008).

Registros fósseis de 460 milhões de anos indicam a origem ancestral dos FMA e da simbiose micorrízica, sugerindo que os FMA desempenharam papel fundamental para a adaptação das plantas ao ambiente terrestre (Redecker et al. 2000). Apesar dos FMA serem generalistas e a simbiose micorrízica arbuscular ser considerada em grande parte não específica, evidências de compatibilidade física e funcional têm sido documentadas (Croll et al. 2008; Helgason et al. 2002). Por outro lado, plantas das famílias Cruciferae (Brassicaceae), Cariofilaceae, Chenopodiaceae, Juncaceae, Poligonaceae e Proteaceae raramente ou nunca hospedam FMA (Smith & Read 2008).

Na simbiose micorrízica arbuscular, há uma translocação de nutrientes em movimentos bidirecionais. A partir do fungo não apenas fósforo (P) e nitrogênio (N), mas também micronutrientes como zinco (Zn), cobre (Cu) e ferro (Fe) são fornecidos à planta. Por sua vez, os FMA se beneficiam a partir de carboidratos do hospedeiro que são translocados para o micélio extrarradicular (Bucher et al. 2009; Garg & Chandel 2010; Selosse & Rousset 2011).

Os benefícios conferidos pelos FMA às plantas são diversos e incluem: melhoria do estado nutricional do hospedeiro, que pode ser traduzido em aumento do crescimento e da produtividade (Andrade et al. 2013; Baslam et al. 2011; Siqueira et al. 2002); aumento da tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos (seca, salinidade, poluição de metais pesados, compactação do solo) (Evelin et al. 2009; Gianinazzi et al. 2010; Kiers et al. 2011) e redução de danos causados por fitopatógenos (Garg & Chandel 2010). Os FMA ainda podem favorecer a estruturação e a agregação do solo da rizosfera, não apenas pela ação física da rede de hifas extrarradiculares mas também pela produção de um grupo de proteínas, denominado proteínas do solo relacionadas à glomalina (PSRG) (Cavalcante et al. 2009; Sousa et al. 2012; Willis et al. 2013).

A simbiose micorrízica arbuscular é caracterizada pelas estruturas que se formam dentro das células do córtex da planta hospedeira, chamadas arbúsculos. Tais estruturas são consideradas os sítios para a troca de nutrientes entre os parceiros da simbiose (Bago et al. 1998; Parniske 2008). Segundo Bonfante & Genre (2010), os arbúsculos são estruturas efêmeras e permanecem ativos por apenas 4 a 5 dias. Após esse período, senescem e são degradados e a célula vegetal retoma seu metabolismo normal, tornando-se apta para abrigar um novo arbúsculo.

Outra estrutura intrarradicular formada pelos FMA, exceto os da família Gigasporaceae, Paraglomaceae e Archaeosporaceae, é a vesícula (Saggin Júnior & Silva

2005; Willis et al. 2013). Tais estruturas globosas ou alongadas podem ser formadas dentro ou entre as células corticais, armazenam lipídios e aumentam a eficácia de fragmentos de raízes como propágulos (Siqueira et al. 2002; Willis et al. 2013).

As estruturas extrarradiculares compreendem o micélio, os esporos e as células auxiliares. Os FMA desenvolvem uma extensa rede de hifas no solo (micélio extrarradicular), conectadas às hifas internas no tecido cortical, que pode atingir vários centímetros a partir da raiz, aumentando a área de absorção e oferecendo transferência eficiente de nutrientes e água. Além da função de absorção, o micélio asseptado inicia a colonização de outras raízes, favorecendo a agregação do solo e, na maioria das espécies, é onde ocorre a formação de esporos (Harrison 2005; Moreira & Siqueira 2006; Parniske 2008; Rillig 2004).

Os esporos formados pelos glomeromicetos são assexuados e servem para sua disseminação e sobrevivência. Constituem uma única célula multinucleada, com diâmetro variando de 22 a 1050 μm (Souza et al. 2010a). Tal estrutura apresenta fisiologia particular, podendo germinar e interromper o crescimento muitas vezes no solo, mesmo na ausência de sinais derivados de uma planta hospedeira (Requena et al. 2007; Willis et al. 2013).

Os esporos, denominados glomerosporos, termo criado por Goto & Maia (2006), agrupando diferentes tipos de esporos produzidos por FMA (glomoide, gigasporoide e acaulosporoide), desenvolvem paredes grossas com mais de uma camada e mostram diferenças em muitos caracteres morfológicos (Souza et al. 2010a). A diversidade estrutural nos esporos forma a base da taxonomia e da sistemática de FMA, mas métodos moleculares também têm sido empregados (Cavalcante et al. 2009).

Os FMA são biotróficos obrigatórios e dependem estritamente de seus hospedeiros para crescimento e reprodução (Bonfante & Genre 2010; Harrison 2005). O ciclo de vida dos FMA inicia-se pela germinação de esporos, que são formados no solo ou no interior de raízes (Maia & Yano-Melo 2001; Souza et al. 2010a), e se completa com o estabelecimento da simbiose em plantas hospedeiras compatíveis.

De acordo com Willis et al. (2013), o ciclo de vida dos FMA é dinâmico, rápido e divide-se em três fases: assimbiótica, pré-simbiótica e simbiótica. A fase assimbiótica inclui germinação de esporos, sob condições apropriadas de água e temperatura, e crescimento limitado do tubo germinativo por cerca de 2 a 3 semanas. Durante esta fase, na ausência de sinais do hospedeiro, o fungo utiliza reservas de triglicerídeos, uma das

principais formas de armazenamento de carbono dos FMA (Bago et al. 2000; Requena et al. 2007).

A fase pré-simbiótica é caracterizada pela presença de sinais a partir de exsudatos radiculares, que estimulam a ramificação de hifas (Akiyama et al. 2005; Bonfante & Genre 2010; Bücking et al. 2008; Parniske 2008). Estudos apontam que o diálogo molecular entre os simbioses antecede o contato físico e que no processo de comunicação estão envolvidas moléculas vegetais e fúngicas (Bonfante & Requena 2011; Kiriachek et al. 2009). Uma vez que o contato entre os simbioses é estabelecido, ocorrem mudanças morfológicas significativas em ambos os parceiros, coordenadas por uma troca recíproca de sinais, resultando no desenvolvimento da simbiose micorrízica arbuscular (Besserer et al. 2006; Bonfante & Genre 2010; Harrison 2005).

A fase simbiótica inicia-se com o contato físico entre o fungo e a raiz por meio da formação do apressório na superfície das células epidérmicas. A resposta da célula vegetal para este contato se dá através do desenvolvimento do aparato de pré-penetração (PPA) por meio do qual ocorre a penetração no córtex radicular (Bonfante & Genre 2010; Bucher et al. 2009; Willis et al. 2013). Dois tipos estruturais de arbúsculos podem se desenvolver: *Arum*, que se caracteriza por extensas hifas intercelulares e formação de arbúsculos intracelulares, e *Paris*, no qual a fase intercelular é ausente e as hifas crescem diretamente a partir de uma célula para outra, formando hifas intracelulares enoveladas (Figura 3) (Franken et al. 2002).

Após a colonização das raízes, hifas extrarradiculares são produzidas e crescem no solo. A rede de micélio extrarradicular pode desenvolver estruturas ramificadas de absorção (BAS), envolvidas na absorção de minerais (Bago et al. 1998), na colonização micorrízica e na produção de esporos, que atuam como estruturas de reserva e propagação, completando, assim, o ciclo de vida dos FMA (Garg & Chandel 2010; Requena et al. 2007).

A sobrevivência dos FMA é baseada na germinação repetida dos esporos e na rápida colonização das raízes das plantas. Na ausência de uma espécie vegetal hospedeira, o esporo germinado interrompe o desenvolvimento da hifa, ocorrendo senescência caracterizada pela formação de septos e retração do conteúdo citoplasmático a partir do ápice hifálico (Franken et al. 2002; Giovannetti et al. 2010).

Esporos de FMA formados no solo são capazes de germinar e crescer em condições físicas, químicas e microbiológicas adequadas, na ausência de plantas hospedeiras, mas são incapazes de produzir micélio extensivo e completar seu ciclo de

vida sem estabelecer uma simbiose funcional com um hospedeiro apropriado (Giovannetti 2000; Giovannetti et al. 2010).

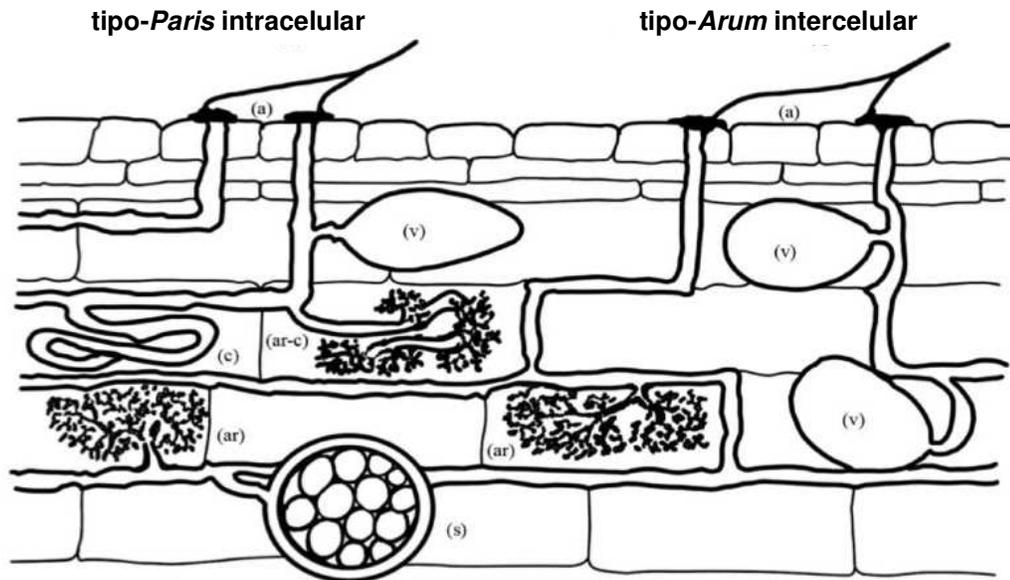


Figura 3. Características morfológicas da simbiose micorrízica arbuscular (Adaptado: Willis et al. 2013). (a) = apressórios, (ar) = arbúsculos altamente ramificados (tipo-Arum), (ar-c) = hifas arbusculares e (c) = hifas enoveladas (tipo-Paris), (s) esporo, (v) = vesículas.

Tommerup (1984) descreveu que a germinação de esporos de FMA consiste em quatro fases: hidratação das proteínas celulares e colóides, aumento da atividade metabólica, com ativação e formação de ácido ribonucléico e enzimas, protrusão do tubo germinativo e crescimento das hifas em direção às raízes do hospedeiro ou morte.

O início do processo germinativo envolve uma série de mudanças morfológicas e é marcado pelo aumento da atividade e alterações no citoplasma dos esporos, ocorrendo divisão nuclear, formação de grande número de vesículas e movimentos citoplasmáticos. Tais movimentos resultam em acúmulo do citoplasma, espessamento da camada mais interna e digestão da parede intermediária do esporo e, finalmente, emissão do tubo germinativo, resultante de provável pressão física (Siqueira et al. 1985).

As transformações que ocorrem durante a germinação são dependentes da concomitante ativação do metabolismo. Na fase assimbiótica, independente do hospedeiro, o crescimento do tubo germinativo e seu desenvolvimento é limitado, a partir da mobilização de triglicerídeos, glicogênio e trealose. Os fluxos de carbono durante esta

fase ocorrem pelas vias da gliconeogênese, do ciclo do glioxilato, do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, da glicólise, do ciclo oxidativo das fosfopentoses e do ciclo da ureia (Bago et al. 1999; 2000).

O aumento da utilização de carbono e nitrogênio armazenados pelos FMA quando sinais de uma raiz hospedeira são percebidos permite ao fungo usar seus recursos de forma mais eficiente e evita que suas reservas sejam comprometidas na ausência da parceria simbiótica (Bécard et al. 2004). Bago et al. (1999) sugeriram que a dependência do fungo é devida à uma ou mais deficiências metabólicas, o que impede a formação de novos propágulos e caracteriza a natureza biotrófica obrigatória dos FMA.

Esporos de FMA germinam de maneira diferente dependendo do gênero. Siqueira et al. (1985) descreveram que a germinação ocorre por três principais mecanismos: através de compartimentos periféricos, diretamente através da parede do glomerosporo ou por recrescimento da hifa de sustentação. Em *Glomus*, ocorre a projeção de tubos germinativos únicos ou múltiplos através da hifa de sustentação. Por outro lado, os tubos germinativos de espécies dos gêneros *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* emergem diretamente através da parede do esporo e diferentes estruturas de germinação podem ser formadas (Giovannetti et al. 2010). A estrutura mais simples é produzida por glomerosporos de *Gigaspora*, uma parede germinativa formada pela camada de parede mais interna; espécies de *Scutellospora* germinam após o desenvolvimento de escudos de germinação dentro das camadas internas da parede dos esporos; e uma estrutura especializada (placa germinativa ou orb) foi descrita em *Acaulospora*, *Pacispora* e *Kuklospora* (Dotzler et al. 2006; Giovannetti & Gianinazzi-Pearson 1994; Maia et al. 2010).

Após a germinação, as hifas geralmente seguem um crescimento linear para frente, com uma forte dominância apical e com ramificações regulares, em ângulo reto. O alongamento dos tubos germinativos dá origem a uma rede micelial com baixa taxa de crescimento e extensão limitada, altamente variável entre os indivíduos. As hifas são asseptadas, com paredes espessas (cerca de 5-10 μm de largura), onde se observa um fluxo ativo e bidirecional de citoplasma e núcleos (Giovannetti et al. 2010). Uma característica particular dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* é o desenvolvimento de células auxiliares, relacionadas ao armazenamento transitório, à reprodução e ao desenvolvimento e/ou produção micelial e reparo (Franken et al. 2002; Souza & Declerck 2003).

Apesar dos esporos de FMA possuírem a capacidade metabólica para a germinação e crescimento limitado das hifas, tais eventos são maximizados quando os

fatores indutores endógenos ou exógenos forem favoráveis (Nagahashi & Douds 2000). A germinação, formação de tubo germinativo e produção limitada de micélio assimbiótico podem ser afetadas por diversos fatores físicos, químicos e biológicos (Maia et al. 2010).

Esporos de FMA são capazes de germinar espontaneamente em água destilada ou em agar-água utilizando suas reservas nutricionais (Maia & Yano-Melo 2001; Siqueira et al. 1985), no entanto, o crescimento do micélio cessa quando as reservas do esporo são exauridas e/ou raízes hospedeiras não estão presentes no ambiente (Buee et al. 2000). O crescimento das hifas e ramificação e a atividade de transcrição dos FMA são estimulados por exsudatos semi-purificados de raízes de espécies vegetais micotróficas (Buee et al. 2000). Bücking et al. (2008) demonstraram que a respiração é aumentada em resposta aos exsudatos radiculares.

Compostos presentes nos exsudatos radiculares de plantas hospedeiras estimulam a germinação de esporos, o crescimento e a ramificação de hifas, e sua divisão nuclear (Buee et al. 2000; Ishii et al. 1997; Nagahashi & Douds 2000; Nair et al. 1991; Rojas-Andrade et al. 2003; Tahat et al. 2010; Tawaraya et al. 1996). Foi demonstrado que os compostos ativos liberados pela raiz do hospedeiro, conhecidos como fatores de ramificação, incluem estrigolactonas (Akiyama et al. 2005). Besserer et al. (2006) verificaram que, além da ramificação de hifas, as estrigolactonas causam aumento na densidade e atividade de mitocôndrias nas hifas de *Glomus intraradices*, sugerindo que elas podem estimular o catabolismo de lipídios do fungo.

Flavonóides são referidos como sinais radiculares capazes de atuar na ativação de genes de nodulação em rizóbio, estimulando a germinação e o crescimento micelial de FMA, e são responsáveis pela colonização micorrízica e pelo mecanismo molecular ativo do processo de colonização radicular e estabelecimento da simbiose (Gianinazzi-Pearson et al. 1989; Nair et al. 1991; Romero & Siqueira 1996; Scervino et al. 2005; 2006; 2009a; Siqueira et al. 1991; Soares et al. 2005). Entretanto, foi demonstrado, usando mutantes de milho deficientes em chalcona-sintase, enzima-chave na biossíntese de flavonóides, que esses compostos não são essenciais ao estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular (Bécard et al. 1995; 2004; Buee et al. 2000).

A maioria dos estudos em relação à fase assimbiótica de FMA tem focado nos efeitos de exsudatos radiculares e são poucos os relatos sobre os efeitos de exsudatos de sementes (Tsai & Phillips 1991). Souza Filho et al. (2011) relataram a importância das sementes como fonte alternativa de compostos químicos com atividade alelopática que atuam como sinalizadores positivos para a simbiose com microrganismos do solo.

Visando a elucidar os efeitos de diferentes compostos nos estádios de crescimento assimbiótico de FMA, com destaque para espécies dos gêneros *Gigaspora* e *Glomus*, muitos estudos têm sido conduzidos (Aikawa et al. 2000; Cantor et al. 2011; Ellouze et al. 2012; Kirk et al. 2005; Malyt et al. 2006; Oba et al. 2002; Sannazzaro et al. 2004; Scervino et al. 2005; 2006; 2008; 2009b).

7 Importância do conhecimento dos processos alelopáticos

O estudo dos processos alelopáticos é fundamental para o entendimento das interações dos organismos, tanto nos ecossistemas naturais, como nos agrícolas (Miller 1996). No cenário da agricultura, a alelopatia pode ter influência nas interações entre as plantas nas comunidades bióticas, na produtividade dos campos agrícolas e no controle de doenças. A aplicação de compostos alelopáticos antes, após ou concomitantemente ao uso de herbicidas sintéticos pode aumentar o efeito global de ambos os materiais (Ferreira & Áquila 2000). Além disso, as classes químicas envolvidas nos processos alelopáticos podem ser investigadas e novas substâncias biologicamente ativas descobertas. Os aleloquímicos podem também fornecer estruturas ou modelos básicos para o desenvolvimento de novos herbicidas sintéticos, mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente (Macías et al. 1998). Desse modo, a identificação de aleloquímicos pode ser importante para várias áreas de conhecimento como agricultura, etnobotânica, etnofarmacologia, sistemática, ecologia, fitoquímica e fisiologia vegetal.

Estudos relativos ao potencial dos aleloquímicos sob condição de campo ainda são escassos, mas de grande relevância, considerando que no solo essas substâncias estão sujeitas a processos de retenção, transporte e transformação, que determinam sua dinâmica (Inderjit & Weston 2000). Além disso, desenvolver plantas geneticamente modificadas para serem alelopáticas às plantas invasoras através de métodos de engenharia genética também se apresenta como perspectiva no sentido de aumentar a biossíntese e a liberação de aleloquímicos (Taiz & Zeiger 2009).

8 *Sesbania virgata*

Sesbania virgata (Cav.) Pers. (Fabaceae) é uma leguminosa arbustiva (Figura 4), nativa da América do Sul, que ocorre naturalmente no Brasil (regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste) bem como no Paraguai, Argentina e Uruguai. É encontrada em margens de

estradas, cavas de extração de argila, locais próximos ao mar e, principalmente, em matas ciliares, estando associada aos estádios iniciais de sucessão ecológica. Trata-se de uma planta de interesse para recuperação de áreas degradadas devido à sua rusticidade, boa disponibilidade de sementes e capacidade de estabelecer simbiose com rizóbio e FMA, que ajuda na absorção de nutrientes em solos de baixa fertilidade (Araujo et al. 2004; Bomfeti et al. 2013; Braggio et al. 2002; Chaves et al. 2003; Florentino et al. 2009; Potomati & Buckeridge 2002; Pott & Pott 1994; Schiavo et al. 2009).

A espécie tem sido descrita como invasora em solos úmidos e alagados, especialmente em culturas de arroz irrigado (Kissmann & Groth 1999). Andrade (2006) verificou que *S. virgata* se apresenta como invasora na caatinga e ecossistemas associados, particularmente em matas ciliares, tanto de rios quanto de reservatórios artificiais de água, onde é capaz de suprimir a regeneração natural das espécies vegetais nativas e formar maciços populacionais dominantes, provocando sérios impactos.

Sementes de *S. virgata* mantêm-se viáveis por longos períodos, o que favorece a formação de bancos transitórios de sementes no solo, e apresentam dormência tegumentar, o que as tornam impermeáveis à água, garantindo sua sobrevivência até que encontrem condições favoráveis para os processos de germinação e estabelecimento das plântulas (Pott & Pott 1994; Silva et al. 2011; Souza et al. 2010b). Suas sementes, como a de muitas leguminosas, são conhecidas por acumular galactomanano nas células do endosperma, um polissacarídeo de reserva de parede celular que é mobilizado após a germinação, e cujos produtos de degradação são utilizados para o desenvolvimento do embrião (Buckeridge & Dietrich 1996).



Figura 4. Aspecto geral, inflorescência e frutos com sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fonte: <http://lailahuber.blogspot.com.br/2011/05/arbores-nativos-sesbania-virgata-rama.html>; Adaptado: Filardi et al. 2007).

Em *S. virgata*, parte dos açúcares gerados durante a mobilização do galactomanano é exsudada para o meio de embebição, juntamente com substâncias fitotóxicas e antifúngicas, sugerindo a existência de estratégias competitivas e de defesa que garantem o estabelecimento inicial da plântula (Simões 2008). Segundo Nelson (2004), os níveis mais elevados de exsudação em sementes ocorrem dentro das primeiras 12 horas imediatamente após a embebição ser iniciada. O flavonóide (+)-catequina é a principal fitotoxina exsudada por sementes de *S. virgata*, sendo encontrada no tegumento das sementes e liberada em altas concentrações (235 µg de (+)-catequina/semente) após 24 horas de embebição (Simões et al. 2008).

Catequinas são produtos da via dos flavonóides e podem ser usadas como produtos finais que se acumulam sob certas condições ou na formação de taninos condensados, pelos quais o interesse tem aumentado devido às suas propriedades físico-químicas que os tornam relevantes para a saúde humana, defesa de plantas e agricultura (Broeckling & Vivanco 2008).

Ceballos et al. (1998) estudaram a exsudação de aleloquímicos por duas espécies de *Sesbania* e verificaram que elas liberam catequinas, proantocianidinas e luteolina durante o processo germinativo. Em *S. drummondii* (espécie perene), a molécula de (+)-catequina foi encontrada em quantidade superior à de (-)-catequina e em *S. vesicaria* (espécie anual) houve o predomínio de (-)-catequina.

Efeitos fitotóxicos da (+)-catequina isolada a partir de exsudatos de sementes de *S. virgata* foram avaliados em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. e arroz (*Oryza sativa* L.) (Simões et al. 2008). Os autores registraram efeitos extremamente tóxicos às raízes de *A. thaliana*, nas concentrações de 200 e 500 µg mL⁻¹, causando escurecimento, total inibição da formação das raízes laterais e redução da biomassa, após 7 dias. Em plântulas de arroz, o efeito foi menos drástico.

A co-germinação das sementes de *S. virgata* com *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong e *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., espécies nativas co-ocorrentes, causa atraso na mobilização dos carboidratos solúveis e do amido nas sementes dessas espécies florestais (Veronesi 2014). Chaves et al. (2003) relataram que as mudas de *S. virgata* desenvolvem-se bem em substrato de resíduos agroindustriais, enquanto Coutinho et al. (2006) evidenciaram que as mudas desta espécie apresentam bom estabelecimento e crescimento em substrato de cavas de extração de argila, sendo desnecessário o uso de adubação orgânica. Este comportamento pode estar relacionado, em parte, à presença

e/ou liberação de aleloquímicos pelas sementes ou partes da planta como raízes e folhas, o que reduziria a competição com espécies com as quais dividiria o ambiente.

Recentemente, El Id et al. (2014) observaram efeitos alelopáticos de sementes de *S. virgata* sobre a germinação e sobre o desenvolvimento de duas espécies agronômicas (*S. lycopersicum* e *O. sativa*), em experimentos de co-germinação *in vitro*. Semelhante a esse modelo experimental, neste estudo, testou-se a hipótese de que os efeitos alelopáticos de sementes de *S. virgata* sobre a germinação e sobre o crescimento inicial de plântulas de tomate (*S. lycopersicum*) e de arroz (*O. sativa*) devem-se à interferência com o processo de mobilização de carboidratos de reserva das sementes das espécies-alvo utilizadas.

Além disso, testou-se a hipótese de que os exsudatos brutos de sementes e de raízes de *S. virgata* influenciam a fase assimbiótica do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora albida* Becker & Hall.

Objetivos

- Avaliar os efeitos da co-germinação e de extratos aquosos obtidos de exsudatos de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae), bem como de (+)-catequina comercial, sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.) *in vitro*.
- Estudar o efeito de extratos aquosos obtidos de exsudatos de sementes de *S. virgata*, bem como de (+)-catequina comercial, sobre a degradação dos carboidratos de reserva nas sementes das plantas-alvo utilizadas.
- Analisar o efeito de exsudatos brutos de sementes e de raízes de *S. virgata* sobre a germinação e o crescimento micelial inicial *in vitro* de *Gigaspora albida*.

Parte 1. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de sementes de *Sesbania virgata* na germinação, crescimento inicial e mobilização de reservas de tomate e arroz

1 Material e Métodos

1.1 Material biológico

- Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae) obtidas de indivíduos existentes no município de Lavras, MG.
- Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Santa Cruz Kada) adquiridas no comércio local (Isla[®]).
- Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. var. Ourominas) obtidas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Santo Antônio de Goiás, GO.

1.2 Co-germinação em câmara de crescimento de sementes de *S. virgata* e sementes de tomate ou arroz

Com o objetivo de avaliar o efeito de *S. virgata* sobre a germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG), as massas dos embriões frescos e secos e o crescimento inicial de plântulas de tomate e arroz, realizou-se co-germinação da semente de *S. virgata* com sementes das duas espécies agrônômicas, nas proporções 1:5 (tomate) e 1:3 (arroz). Os ensaios foram efetuados em caixas Gerbox contendo papel de filtro inicialmente umedecido com 3 mL de água destilada. As caixas foram mantidas em câmara de germinação (BOD modelo 347 FG, Fanem[®]) a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias. No 2º, 3º e 4º dias do ensaio, 1 mL de água destilada foi adicionado às caixas para repor a água evaporada e/ou absorvida. Para controle do ensaio, as sementes agrônômicas foram germinadas na ausência de sementes de *S. virgata*. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram extensão radicular igual ou superior a 2 mm.

O IVG foi calculado segundo Maguire (1962), de acordo com a expressão:

$$IVG = N_1/1 + N_2/2 + N_3/3 + \dots N_n/n,$$

onde, N_1 , N_2 , N_3 e N_n são o número de sementes germinadas no primeiro, segundo, terceiro e enésimo dias após a semeadura, respectivamente.

1.3 Germinação de sementes de *S. virgata*

Sementes de *S. virgata* (1000 sementes) foram selecionadas com o mesmo padrão de cor do tegumento (marrom claro) e tamanho (cerca de 5 mm de comprimento) e escarificadas manualmente com uso de lixa (P80 3M). Na sequência, as sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 10 %, durante 20 minutos, e lavadas com água destilada autoclavada por quatro vezes consecutivas. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram distribuídas em placas de Petri de vidro com 15 cm de diâmetro (50 sementes/placa) contendo papel de filtro qualitativo (Qualy[®]) embebido em água destilada autoclavada (35 mL). As placas foram transferidas para câmara de germinação (BOD modelo 347 FG, Fanem[®]) a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, e mantidas nessas condições por 48 horas.

1.4 Obtenção de extratos aquosos dos exsudatos de sementes de *S. virgata*

Sementes de *S. virgata* do ensaio descrito acima (item 1.3), após 48 h de embebição em contato com água, momento no qual ocorre a protrusão da radícula, foram removidas das placas e os exsudatos coletados por lavagem dos papéis de filtro com água destilada por três vezes, com o mesmo volume fornecido inicialmente às sementes para a embebição. Os exsudatos foram filtrados em membrana de náilon e liofilizados (Simões 2008). Após pesagem, os exsudatos foram dissolvidos em água destilada autoclavada nas concentrações 1, 2 e 4 mg mL⁻¹ e, então, utilizados nos bioensaios de fitotoxicidade com as espécies agronômicas.

Taninos condensados foram quantificados nos exsudatos brutos de sementes pelo método de vanilina clorídrica (Broadhurst & Jones 1978), usando (+)-catequina (Sigma-Aldrich) como padrão.

1.5 Bioensaios de fitotoxicidade dos exsudatos de sementes de *S. virgata* e (+)-catequina comercial em tomate

Sementes de tomate (2010 sementes) foram desinfestadas superficialmente por imersão durante 30 minutos em solução de NaClO comercial a 10 % e lavadas por quatro vezes com água destilada autoclavada. Em um primeiro experimento, 10 sementes de tomate foram germinadas em cada placa de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo papel de filtro, e embebidas com 3 mL de solução de extratos aquosos dos exsudatos de sementes de *S. virgata* (EAS) ou de (+)-catequina (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 1, 2 e 4 mg mL⁻¹, por 5 dias. Em um segundo experimento, 50 sementes de tomate foram germinadas em cada placa de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo papel de filtro e embebidas em 15 mL de solução de EAS ou de (+)-catequina comercial, na concentração de 1 mg mL⁻¹, por 4 dias. Sementes germinadas com água destilada autoclavada foram utilizadas como controle. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Em ambos os experimentos, as sementes foram incubadas em câmara de germinação (BOD modelo 347 FG, Fanem[®]) a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: percentual de germinação, comprimento da radícula e da parte aérea e peso das matérias frescas e secas das plântulas.

1.6 Bioensaios de fitotoxicidade dos exsudatos de sementes de *S. virgata* e (+)-catequina comercial em arroz

Sementes de arroz (825 sementes) foram desinfestadas primeiramente com etanol 80 % por 30 segundos, lavadas com água destilada esterilizada e mantidas por 20 minutos em solução de NaClO comercial a 10 %. Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada e, por último, mantidas por 30 minutos em solução 0,2 % do fungicida Derosal[®] (Bayer), sendo posteriormente lavadas com água destilada autoclavada por quatro vezes consecutivas. Foram efetuados dois experimentos semelhantes aos do item 1.5, porém a quantidade de sementes de arroz e o volume das soluções aplicadas foram ajustados de acordo com o tamanho da placa e o tamanho das sementes. Sendo assim, em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo papel de filtro, foram germinadas 5 sementes de arroz, embebidas com 2 mL de solução de EAS ou de (+)-catequina (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 1, 2 e 4 mg mL⁻¹, por 5 dias, para o

primeiro experimento. No segundo experimento, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo papel de filtro, foram germinadas 20 sementes de arroz, embebidas com 8 mL de solução de EAS ou de (+)-catequina comercial, na concentração de 1 mg mL^{-1} , por 4 dias. Como controle, sementes foram germinadas com água destilada autoclavada. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. As sementes foram incubadas sob as mesmas condições e submetidas a avaliações conforme descrito no item 1.5.

1.7 Extração e quantificação de carboidratos solúveis das sementes de tomate e arroz

Sementes e plântulas de tomate e arroz procedentes dos ensaios descritos nos itens 1.5 e 1.6 foram coletadas, sendo o tegumento das sementes de arroz retirado. As sementes e plântulas foram maceradas e submetidas à extração com etanol 80 % (1 mL/semente), por 3 vezes, em banho-maria a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos, para a obtenção dos açúcares solúveis. Após centrifugação a 2000 rpm, em centrífuga Sorvall® Super T21, por 10 minutos, os sobrenadantes de cada extração foram reunidos e concentrados até secura em rota-evaporador, ressuspensos em água destilada (2 mL) e utilizados para quantificação de açúcares totais e redutores pelos métodos do fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956) e Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), respectivamente, tendo glucose (Sigma) como padrão.

1.8 Análise de carboidratos solúveis por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD)

Para análise da composição dos açúcares solúveis totais nas sementes de tomate e arroz, alíquotas de 1 mL (extrato das sementes de tomate) e 500 μL (extrato das sementes de arroz), obtidas no item 1.7, foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna contendo 5 mL de resina catiônica (Dowex 50W X 8, 100-200 mesh) e 5 mL de resina aniônica (Dowex 1W X 8, 52-100 mesh). A eluição dos açúcares foi feita com água deionizada (30 mL) e as amostras recolhidas das colunas de troca iônica tiveram seu pH ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (0,4 M). Após a purificação, as amostras foram liofilizadas, concentradas em 1 mL de água deionizada e novamente submetidas à quantificação de açúcares totais (Carvalho et al. 1998).

Alíquotas contendo o equivalente a 400 µg de açúcar total mL⁻¹ de extrato das sementes de tomate ou arroz foram filtradas em membranas Millipore (0,45 µm) e analisadas por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo ICS-3000 em coluna CarboPac PA1 (4 X 250 mm). Os monossacarídeos neutros e oligossacarídeos foram eluídos isocriticamente com 100 mM de hidróxido de sódio, com fluxo de 0,25 mL min⁻¹, por 25 min. A identificação dos carboidratos solúveis, glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose, foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais (Sigma). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

1.9 Extração e quantificação de amido das sementes de tomate e arroz

Os resíduos das extrações dos carboidratos solúveis das sementes e plântulas de tomate e arroz (item 1.7) foram secos em evaporador (speedvac) e utilizados para a quantificação do amido. O amido foi quantificado pelo método enzimático, conforme descrito por Amaral et al. (2007), sendo utilizados 10 mg de material para cada tratamento. Ao material foi adicionado 0,5 mL de alfa-amilase (120 U mL⁻¹) termoestável de *Bacillus licheniformis* (EC 3.3.1.1, Megazyme), diluída em 70,08 mL de tampão MOPS [ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico] 10 mM pH 6,5, e a incubação das amostras foi efetuada a 75 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 120 unidades de enzima. As amostras foram resfriadas até 50 °C (em banho-maria), sendo então adicionado 0,5 mL de solução contendo amiloglicosidase (30 U mL⁻¹) de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3, Megazyme), em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5, seguido por incubação a 50 °C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 30 unidades de enzima. Após as quatro incubações descritas, foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico (0,8 M) para interromper a reação enzimática e precipitar as proteínas. Em seguida, foi realizada uma incubação por 15 minutos a 30 °C com reagente Glucose PAP Liquiform (Centerlab), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase (GOD-POD), 4-aminoantipirina e fenol (pH 7,5), e o teor de amido foi determinado em leitor de microplacas de ELISA a 490 nm, utilizando glucose (Sigma) como padrão.

1.10 Ensaios enzimáticos

1.10.1 Extração e determinação de atividade de α -galactosidase

A extração de α -galactosidase (EC 3.2.1.22) foi realizada conforme descrito por Reid & Meier (1973) e Buckeridge & Dietrich (1996), sendo utilizados 50 mg de material fresco de sementes de tomate e de arroz após 4 dias de embebição em solução de EAS, de (+)-catequina comercial (1 mg mL^{-1}) ou de água destilada autoclavada (controle). Os tecidos das sementes coletadas foram macerados usando nitrogênio líquido, homogeneizados em 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,8) e deixados em repouso por 30 min em banho de gelo. A seguir, os extratos foram centrifugados a 13000 rpm por 5 min em microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5415R ($5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e o sobrenadante recuperado.

A atividade da enzima foi avaliada utilizando 10 μL de extrato, 10 μL de tampão McIlvaine (fosfato de sódio 200 mM + ácido cítrico 100 mM) pH 4,4 e 10 μL de substrato específico *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (PNP, Sigma) 50 mM, incubando-se a mistura por 20 min a $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A atividade foi interrompida acrescentando 1 mL de carbonato de sódio 200 mM e o produto formado foi quantificado por leituras das absorbâncias (405 nm) em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201). O coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenil ($18400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Reid & Meier 1973) foi usado para calcular a quantidade de *p*-nitrofenol liberado em unidades de $\mu\text{mol galactose min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. Todas as análises foram realizadas em triplicatas técnicas para cada uma das três replicatas biológicas.

1.10.2 Extração e determinação de atividade de α -amilase

Para a extração de α -amilase (EC 3.2.1.1) foram utilizadas amostras de sementes e plântulas de tomate e de arroz de aproximadamente 50 mg, congeladas e maceradas em nitrogênio líquido. Ao macerado foi acrescentado 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e a mistura foi mantida por 30 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com agitação casual. Na sequência o material foi centrifugado a 13000 rpm por 5 min em microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5415R ($5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e o sobrenadante recolhido.

A atividade de α -amilase foi avaliada adicionando-se 50 μL de extrato enzimático a 50 μL de solução de amido 1 % em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e

incubando-se a mistura por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida acrescentando 50 µL de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e levando-se à fervura por 10 min. A quantificação foi realizada por ensaio colorimétrico a 570 nm em leitor de microplacas de ELISA, utilizando maltose (Sigma) como padrão (Bernfeld 1955; Lara-Núñez et al. 2009). Foram utilizados como tempo zero da reação extratos pré-fervidos. As análises foram realizadas em triplicatas técnicas para cada uma das três replicatas biológicas.

1.10.3 Extração e determinação de atividade de endo-1,4-β-mananase

Para a extração de endo-1,4-β-mananase (EC 3.2.1.78) foram utilizados 100 mg de sementes e plântulas de tomate e de arroz congeladas e maceradas em nitrogênio líquido. Ao macerado foi acrescentado 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,4) contendo azida de sódio 0,02 %. A suspensão foi mantida por 15 min com agitação (vortex) e, em seguida, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 5 min em microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5415R (5 °C) e o sobrenadante recolhido.

Alíquotas (500 µL) do extrato enzimático foram adicionadas a tubos de ensaio de vidro (16 x 120 mm) e mantidas a 40 °C por 5 min. A atividade de endo-1,4-β-mananase foi avaliada utilizando pastilhas Beta-Mannazyme (Megazyme, lote 50201). A reação foi interrompida exatamente 10 min após a adição da pastilha com 10 mL de Trizma Base 2 %, pH 8,5 (Sigma). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 5 min e, em seguida, foram agitados e o conteúdo filtrado. A absorbância das soluções da reação foi lida a 590 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201). As análises foram realizadas em triplicatas.

1.10.4 Extração e determinação de atividade de invertases

A extração de invertases (EC 3.2.1.26) foi realizada conforme protocolo descrito por Shimon-Kerner et al. (2000). Foram pesados aproximadamente 100 mg de material para ambas as espécies. As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM contendo 20 % de glicerol e 20 µM de sulfato de manganês (pH 7,5). Após centrifugação a 13000 rpm por 10 min em microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5415R (5 °C), o sobrenadante foi recolhido e utilizado para as análises da atividade das invertases vacuolar e citosólica. O material insolúvel foi submetido a lavagem com 1 mL de tampão HEPES-NaOH 50 mM contendo 0,5 mM de Na₂EDTA, 2,5 mM de ditioneitol

(DTT), 0,5 % de albumina de soro bovino (BSA) e 1 % de polivinilpirrolidona (PVP), pH 7,5. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo submetido a nova extração com o mesmo tampão descrito acima acrescido de 1 M de NaCl, por 2 h em banho de gelo. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para avaliação da atividade invertásica de parede celular (apoplástica).

Para determinação da atividade invertásica ácida vacuolar foram utilizados 100 μ L de extrato enzimático e 100 μ L de tampão acetato de sódio 500 mM contendo 60 mM de sacarose e 0,01 % de BSA (pH 5,7). Foi realizada incubação da mistura por 30 min a 40 °C. A reação foi interrompida por fervura (5 min). Foram utilizados como tempo zero da reação extratos pré-fervidos.

A determinação da atividade invertásica neutra citosólica ocorreu sob as mesmas condições descritas acima, porém com tampão de incubação em pH 7,5. Para a determinação da atividade invertásica ácida de parede celular, foi utilizado tampão a pH 4,7. Após a fervura, estas amostras apresentaram-se turvas, sendo assim, necessária a centrifugação por 10 min antes de realizar o ensaio colorimétrico de quantificação.

A quantificação da atividade das três enzimas foi realizada através de ensaio colorimétrico utilizando o reagente Glucose PAP Liquiform (Centerlab), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase (GOD-POD), 4-aminoantipirina e fenol (pH 7,5), e a leitura foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas de ELISA, utilizando glucose (Sigma) como padrão. Todas as análises foram realizadas em duplicatas técnicas para cada uma das três replicatas biológicas.

1.10.5 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas em todos os extratos enzimáticos foi efetuada utilizando o método de Bradford (1976), tendo albumina de soro bovino (Sigma) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicatas técnicas para cada uma das três replicatas biológicas.

1.11 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando adequado, as

médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$), com o auxílio do programa SISVAR 5.1 (Ferreira 2011).

2 Resultados

2.1 Co-germinação de sementes de *S. virgata* e sementes de tomate e arroz

Sementes de tomate co-germinadas com *S. virgata* tiveram a germinação negativamente afetada, havendo redução da velocidade, da massa fresca e do crescimento inicial das plântulas. Com exceção da massa seca, todos os testes realizados foram significativos, comparados ao controle. No arroz, os únicos parâmetros sensíveis à co-germinação com sementes de *S. virgata* foram o comprimento radicular e da parte aérea, em relação ao controle (Tabela 1).

Ao final do período (5 dias) do ensaio de co-germinação com *S. virgata*, foi observada inibição significativa da germinação (53 %) para as sementes de tomate, quando comparada ao controle. Verificou-se que a velocidade de germinação das sementes de tomate foi reduzida em 70 %, ao final do período (5 dias) do ensaio de co-germinação com *S. virgata*, sendo observada menor sincronização da germinação ao longo do tempo. Diferenças significativas nos valores de massa fresca foram registradas apenas para o tomate (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), massas fresca e seca e crescimento inicial das plântulas de tomate e arroz no ensaio de co-germinação com *Sesbania virgata*, após 5 dias

	%G	IVG	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)	Comprimento (cm)	
					Radícula	Parte aérea
Tomate (controle)	100,0 a	3,1 a	81,1 a	12,0 a	3,58 a	1,61 a
Tomate + <i>S. virgata</i>	46,6 b	0,9 b	30,8 b	14,0 a	0,17 b	0,04 b
Arroz (controle)	66,6 a	1,2 a	109,9 a	65,1 a	0,88 a	0,35 a
Arroz + <i>S. virgata</i>	77,7 a	1,7 a	104,4 a	71,0 a	0,21 b	0,05 b

Médias ($n = 3$) seguidas da mesma letra para cada espécie separadamente não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Aos cinco dias após a semeadura, os resultados permitem constatar que a co-germinação com *S. virgata* não alterou a quantidade da matéria seca no período inicial de crescimento das espécies avaliadas (Tabela 1). Em relação ao crescimento inicial das plântulas, diferenças significativas foram observadas para ambas as espécies no comprimento da radícula (CR) e da parte aérea (CPA). Para o tomate, CR e CPA foram reduzidos em 95,3 % e 97,5 %, respectivamente; em arroz, a redução do crescimento foi de 76,1 % e 85,7 %, respectivamente (Tabela 1).

Registros da aparência das plântulas de tomate e arroz foram feitos ao final dos cinco dias após instalação do ensaio de co-germinação com *S. virgata*, em comparação ao controle (Figura 1). Estes resultados evidenciam a ação alelopática de *S. virgata* nas espécies-alvo.

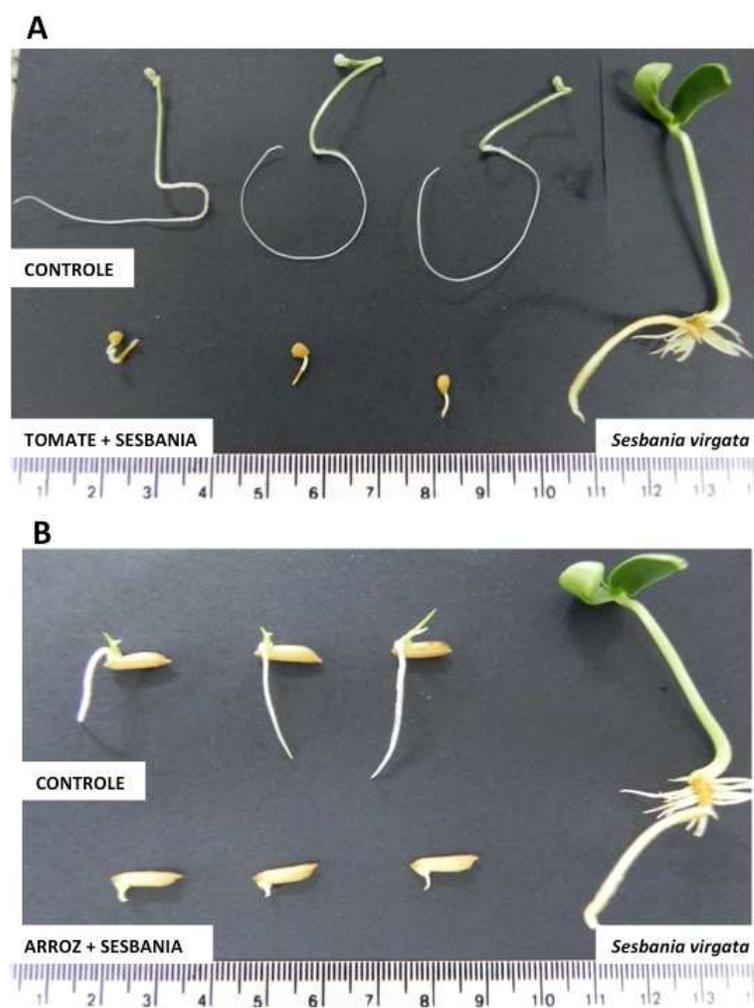


Figura 1 – Aparência das plântulas de tomate (A) e arroz (B) co-germinadas com *Sesbania virgata*, após 5 dias.

2.2 Bioensaios de fitotoxicidade dos exsudatos de sementes de *S. virgata* e (+)-catequina comercial em tomate e arroz

Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar o efeito dos exsudatos de sementes de *S. virgata* e da (+)-catequina comercial sobre a germinação de sementes (Figura 2) e o crescimento das plântulas de tomate e arroz (Figura 3).

As diferentes concentrações dos EAS utilizadas exerceram maior influência na germinação das sementes de tomate, desde o 2º dia de embebição até o término do experimento, no 5º dia, fato não observado com as sementes de tomate embebidas com catequina, nas mesmas concentrações (Figura 2 A-D). Apenas no 2º dia de embebição, foi observado forte efeito inibitório da catequina na germinação das sementes de tomate (Figura 2 A). Para as sementes de arroz, pode-se observar algum efeito dos tratamentos no 2º dia após o início da embebição (Figura 2 E). A partir do 3º dia (Figura 2 F-H), a germinação foi menos afetada em comparação com as sementes de tomate no mesmo período.

O crescimento radicular foi afetado nas plântulas de tomate e arroz germinadas com EAS e com catequina, a partir da concentração 1 mg mL^{-1} (Figura 3 A-B). Este efeito foi também observado no comprimento da parte aérea das plântulas de ambas as espécies (Figura 3 C-D). Quanto à variável matéria fresca, foi possível observar o mesmo padrão de resposta em tomate (Figura 4 A). Já para as sementes de arroz, observou-se redução da matéria fresca apenas com EAS, nas diferentes concentrações (Figura 4 B), quando comparadas ao controle. Não foi observada diferença significativa na matéria seca entre os diferentes tratamentos utilizados (Figura 4 C-D).

Esses resultados sugerem um possível potencial alelopático dos exsudatos de sementes de *S. virgata* e da catequina nas espécies avaliadas. A possibilidade de um efeito osmótico foi descartada com o teste realizado com soluções de polietilenoglicol (PEG 6000), não sendo observada influência da osmolaridade na germinação das sementes de tomate e de arroz (dados não apresentados).

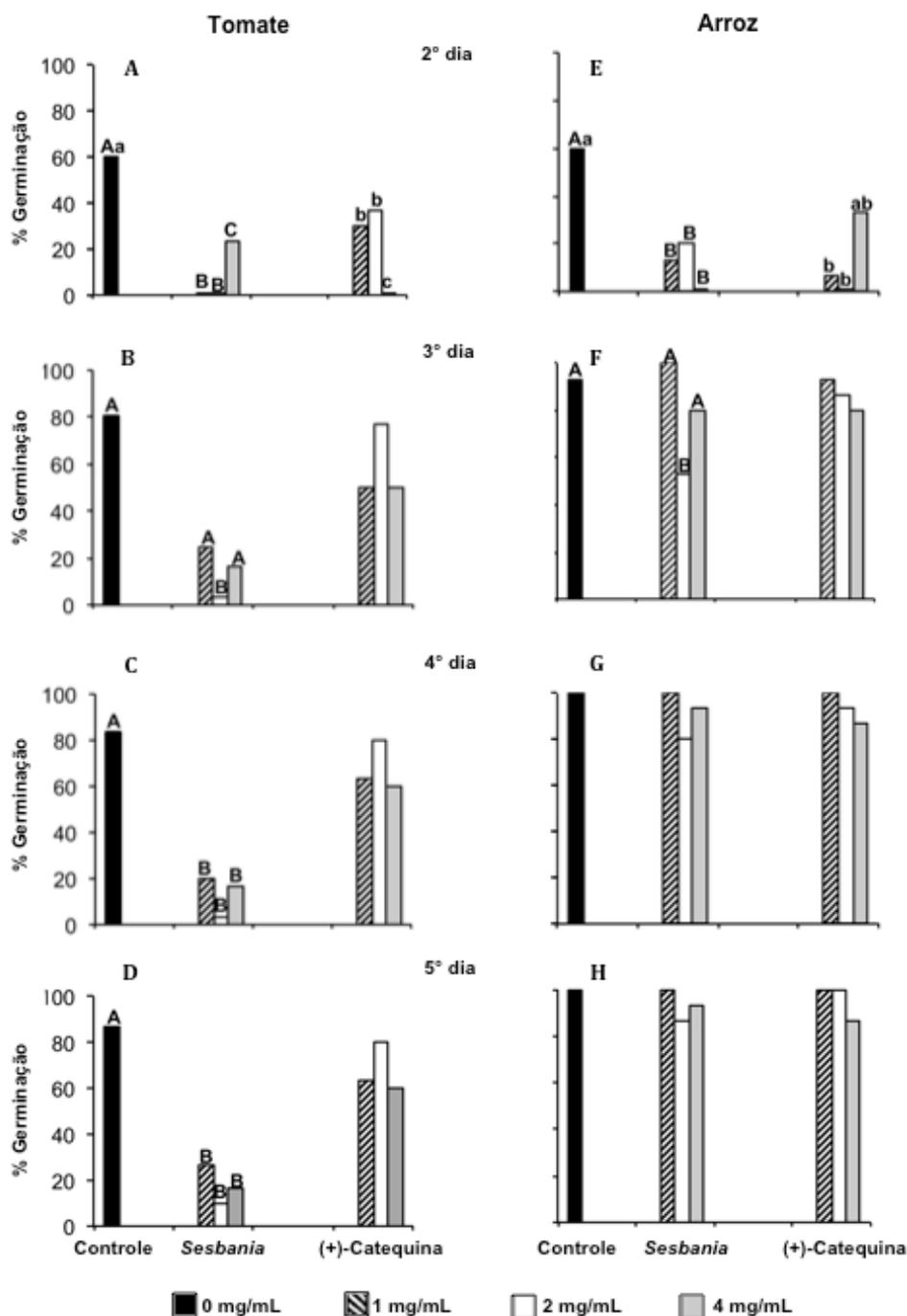


Figura 2 – Efeito da solução de extratos aquosos dos exsudatos de sementes de *S. virgata* (EAS) e de (+)-catequina comercial, em diferentes concentrações e dias, na germinação das sementes de tomate (A-D) e de arroz (E-H). O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As letras comparam as médias dos diferentes tratamentos em relação ao controle. Letras maiúsculas referem-se ao efeito da solução de EAS e minúsculas de (+)-catequina. As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

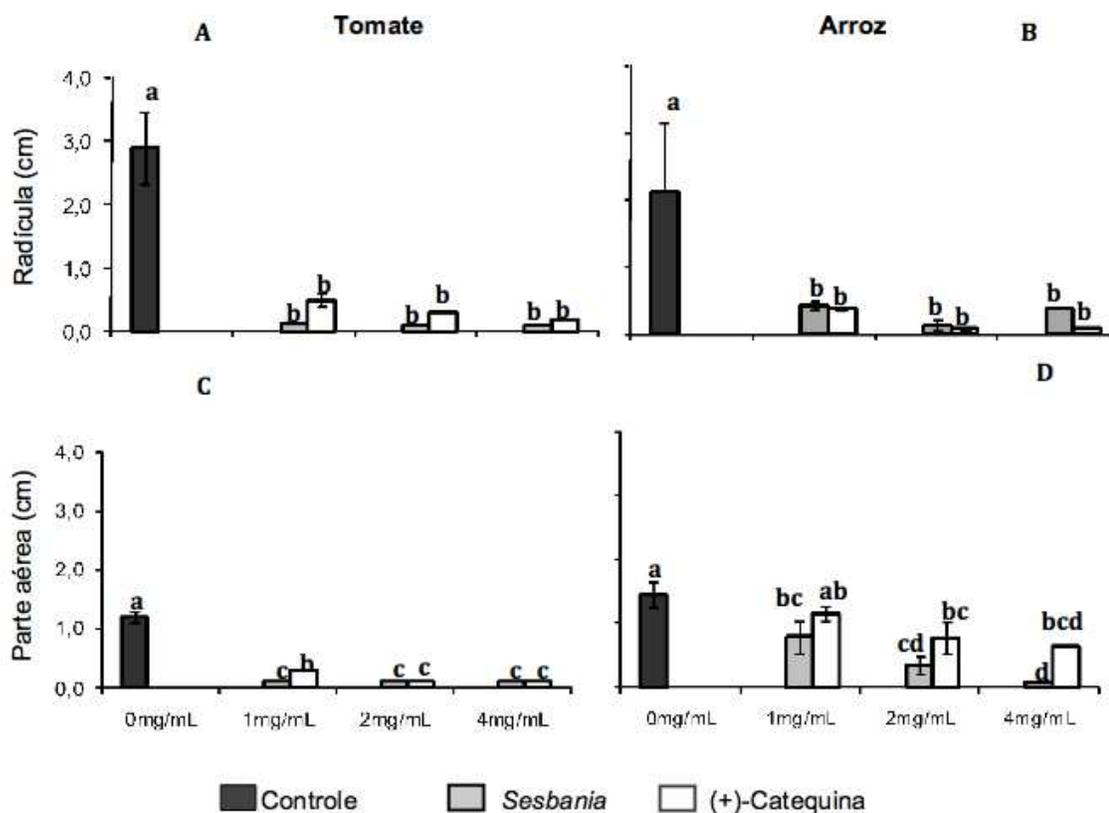


Figura 3 – Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, em diferentes concentrações, no comprimento radicular e da parte aérea das plântulas de tomate (**A** e **C**) e de arroz (**B** e **D**), respectivamente, após 5 dias do início da embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

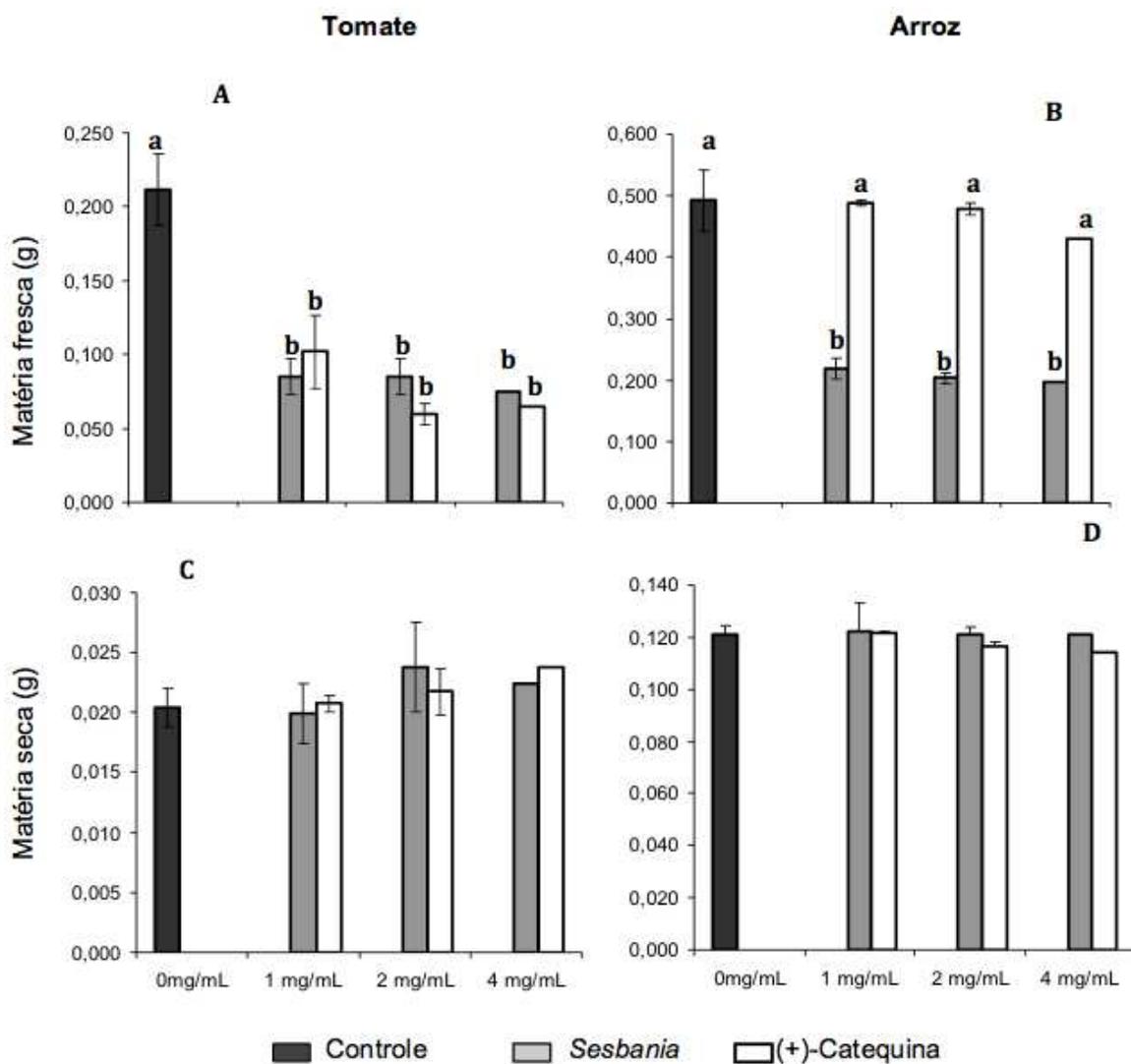


Figura 4 – Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, em diferentes concentrações, na matéria fresca e seca das plântulas de tomate (**A** e **C**) e de arroz (**B** e **D**), respectivamente, após 5 dias do início da embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com base nos resultados obtidos após este primeiro experimento, observou-se que, já com a concentração de 1 mg mL^{-1} , o crescimento das plântulas de tomate e arroz foram severamente afetados. Assim, novos ensaios foram conduzidos utilizando esta concentração.

Os resultados do segundo experimento confirmaram que a germinação das sementes de tomate foi afetada por EAS (Figura 5 A), em relação ao controle. Para as sementes de arroz, foi observada redução significativa no percentual de germinação com EAS apenas no 2º dia de embebição (Figura 5 B), comparado ao controle, indicando um atraso no processo. A partir do 3º e 4º dia, não foi verificada diferença significativa no percentual de germinação entre os tratamentos (Figura 5 B). Quanto às medidas de matéria fresca e seca, após 4 dias de embebição, não foram registradas diferenças significativas nos diferentes tratamentos, em relação ao controle (Figura 6). No entanto, houve diferenças pontuais significativas para o exsudato de sementes de *S. virgata* em tomate e para a catequina em arroz.

Ao final de 4 dias de embebição, o comprimento radicular e o desenvolvimento das plântulas de tomate e arroz foram afetados pela presença de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} (Figura 7). O comprimento radicular e da parte aérea das plântulas de tomate tratadas com EAS foram severamente afetados, sendo registrada uma redução de 89,1 e 80,9 %, respectivamente, em relação ao controle. Resultados semelhantes foram obtidos nas sementes tratadas com catequina, que tiveram seu comprimento radicular e da parte aérea reduzidos em 80,1 e 55,5 %, respectivamente, em comparação ao controle. As plântulas de arroz tiveram redução no comprimento radicular de 57,7 % na presença de EAS, já as tratadas com catequina reduziram em 37,7 % o comprimento radicular, em relação ao controle. Já para o comprimento da parte aérea não foi observada diferença estatística entre os diferentes tratamentos.

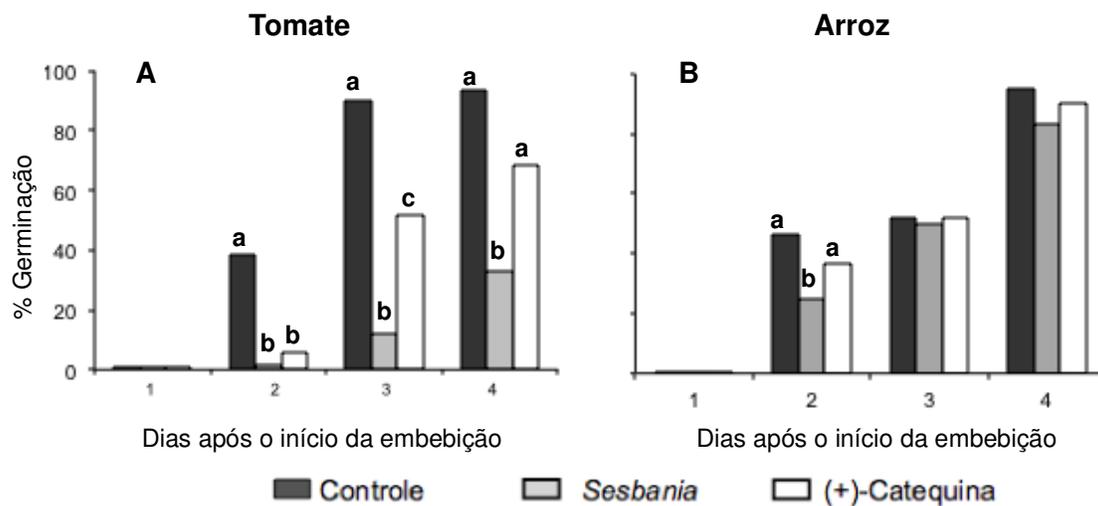


Figura 5 – Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , na germinação das sementes de tomate (**A**) e de arroz (**B**), durante quatro dias de embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

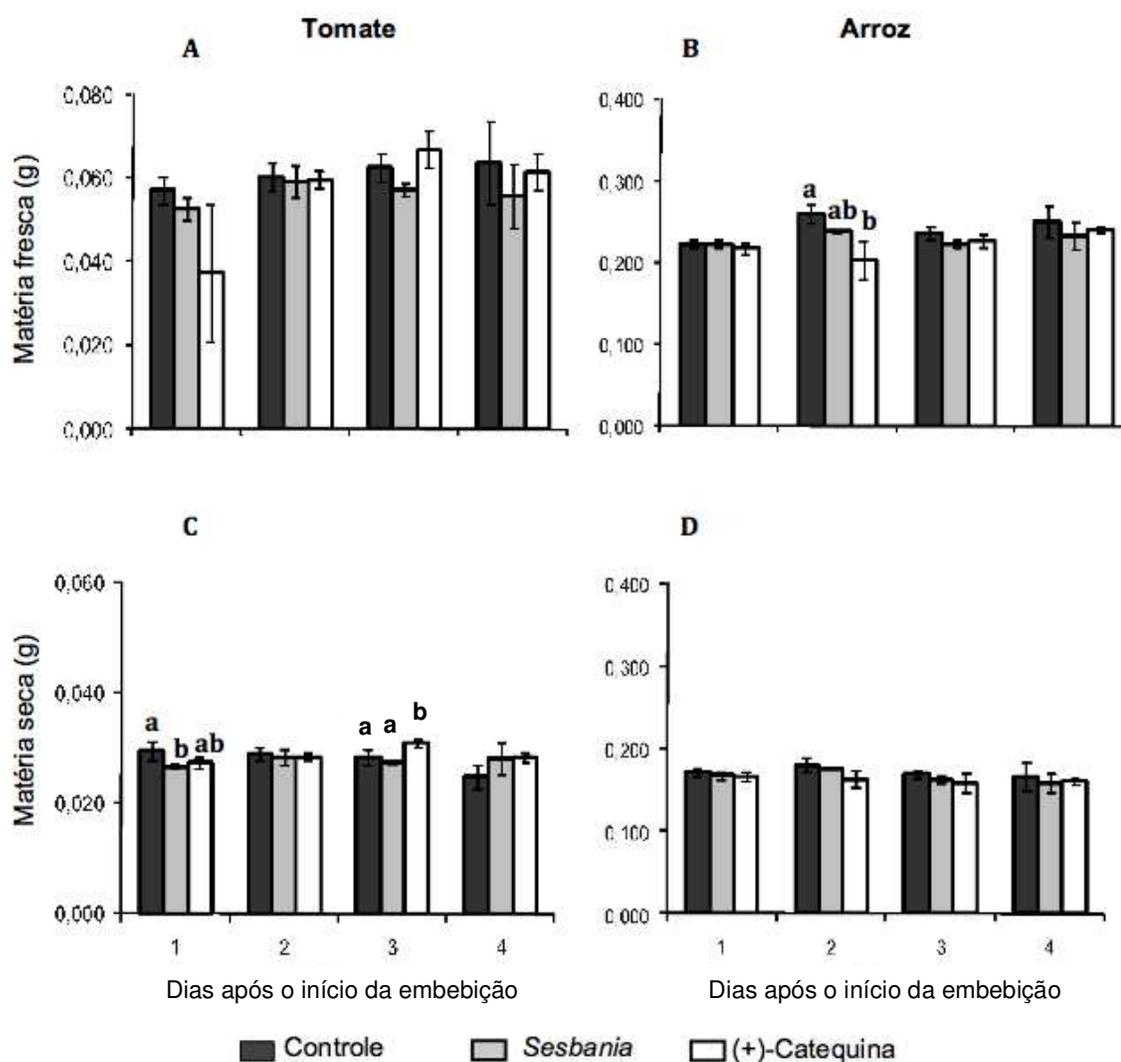


Figura 6 – Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , na matéria fresca e seca das plântulas de tomate (**A** e **C**) e de arroz (**B** e **D**), respectivamente, durante quatro dias de embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

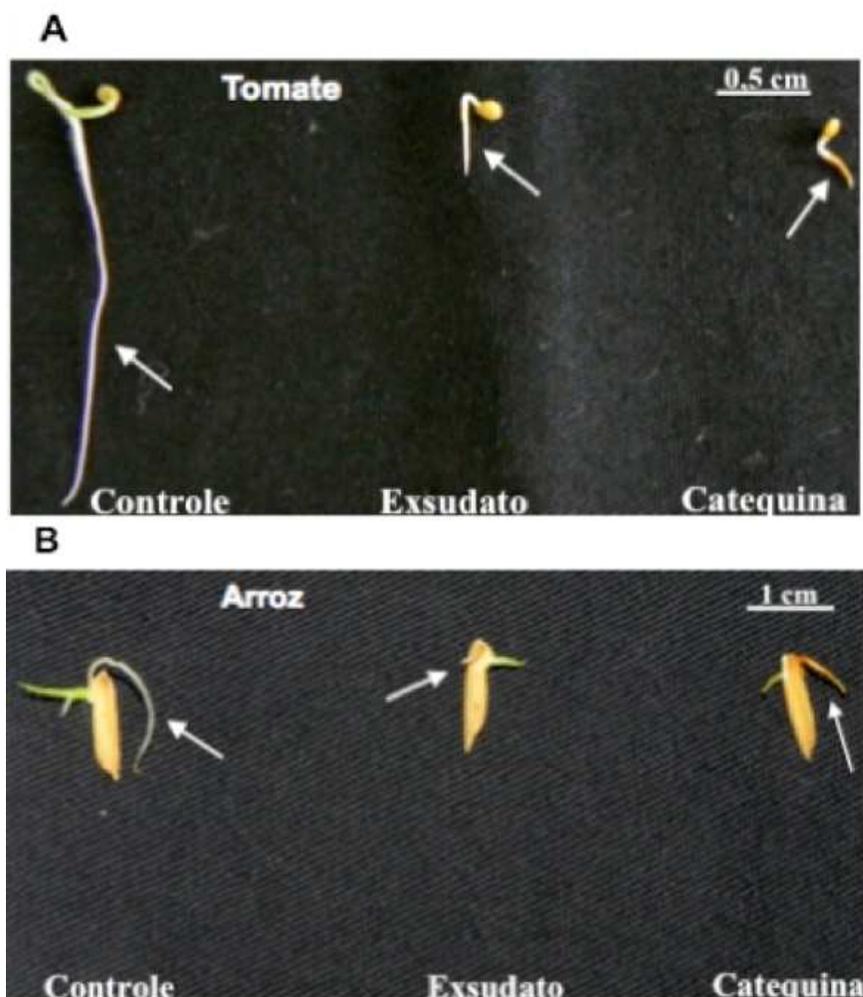


Figura 7 – Efeito da solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , na radícula (setas) das plântulas de tomate (**A**) e de arroz (**B**), após 4 dias do início da embebição.

2.3 Análises bioquímicas

Em relação ao conteúdo de carboidratos, foi observada redução nos níveis de açúcares solúveis totais das sementes de tomate germinadas em água destilada ao longo do experimento (Figura 8 A). Por outro lado, tal fato não foi observado nas sementes tratadas com EAS ou catequina até o 3º dia de germinação. Açúcares redutores aumentaram a partir do início da embebição, nas sementes controle e tratadas com catequina, mas não naquelas mantidas com os exsudatos de *S. virgata* (Figura 8 C). Em

arroz, houve uma redução significativa tanto para os teores de açúcares solúveis totais quanto para os redutores, a partir do 3º dia de embebição, das sementes tratadas com EAS, comparadas ao controle e à catequina (Figura 8 B-D).

Em sementes de tomate, foi observada tendência de aumento do teor de amido ao longo do processo germinativo no ensaio com água destilada (Figura 9 A). Essa tendência não foi observada no tratamento com os exsudatos de *S. virgata*. O conteúdo de amido das sementes de arroz (Figura 9 B) não diferiu estatisticamente nos diferentes tratamentos e dias, o que sugere que a presença de EAS ou da catequina não interferiu na mobilização deste carboidrato de reserva.

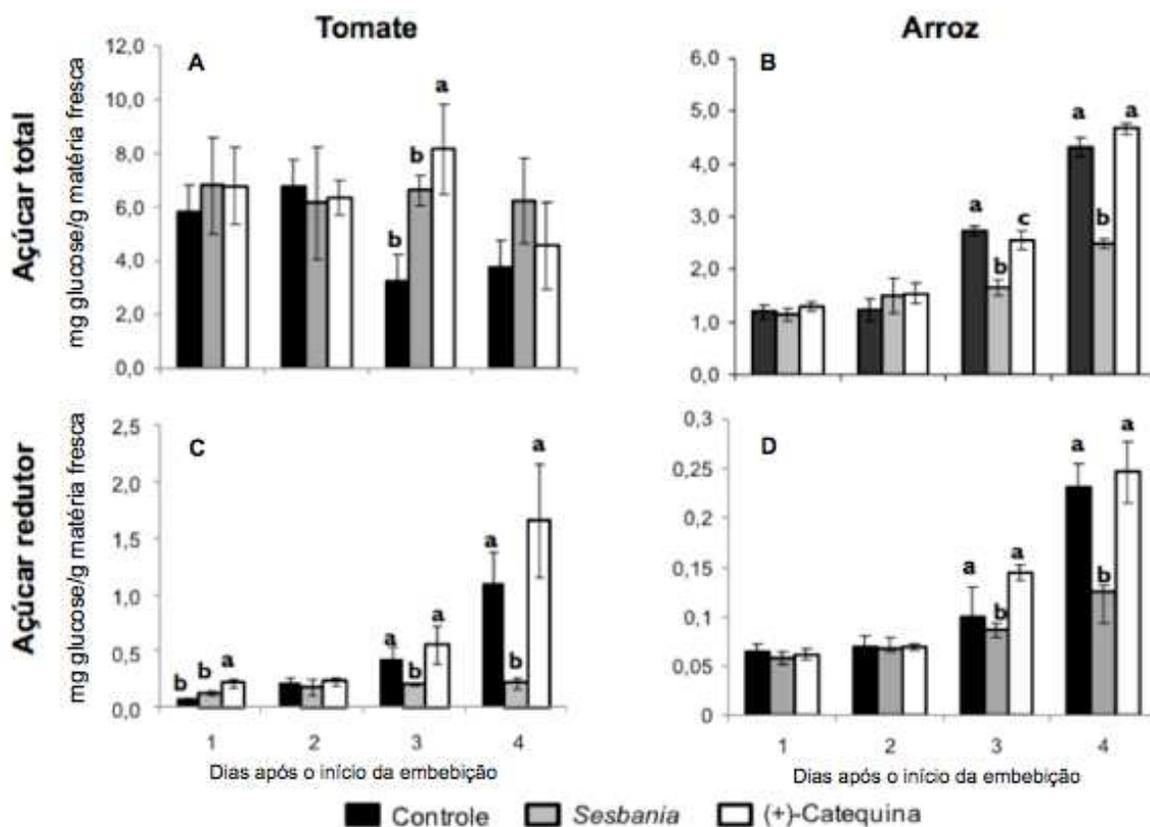


Figura 8 – Teor de açúcares solúveis totais e de açúcares redutores das sementes de tomate (A e C) e de arroz (B e D), respectivamente, embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante quatro dias de embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras indicam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

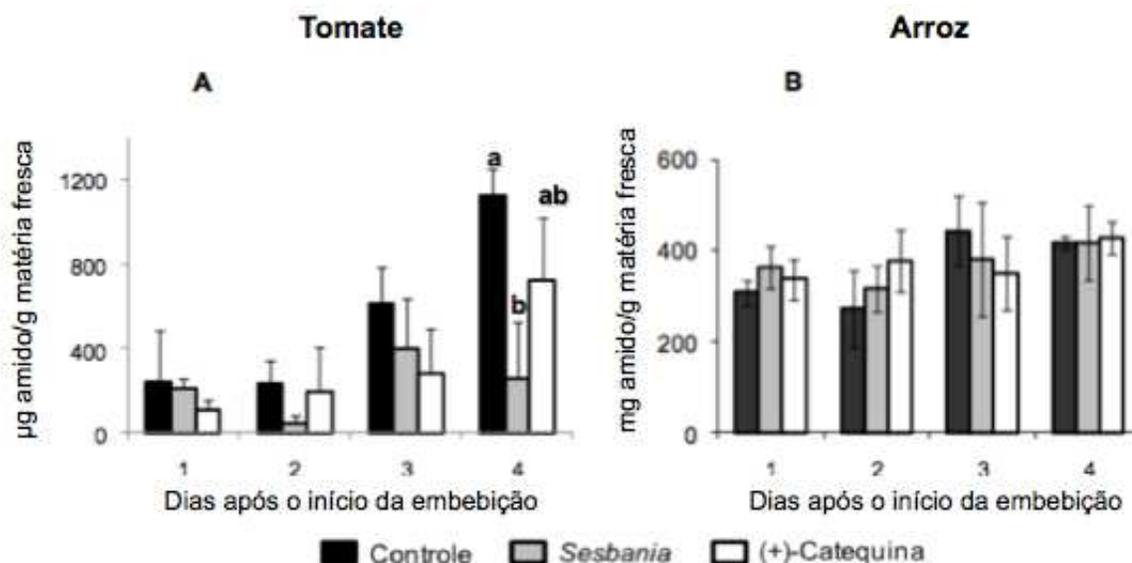


Figura 9 – Conteúdo de amido das sementes de tomate (A) e de arroz (B) embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante quatro dias de embebição. O controle refere-se à germinação das sementes em água destilada. As barras indicam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Foram observados menores teores de glucose e frutose nas sementes de tomate por efeito do tratamento com exsudatos de *S. virgata*, porém sem diferença significativa no conteúdo de sacarose (Figura 10). Em sementes de arroz, os teores de glucose foram maiores naquelas germinadas na presença dos exsudatos de sementes de *S. virgata*, com aumento até o 4º dia de embebição, sugerindo que houve mobilização diferencial das reservas destas sementes (Figura 11 A). Já os teores de frutose foram menores na presença de EAS, principalmente no 3º e 4º dia de embebição (Figura 11 B), e o conteúdo de sacarose mostrou diferença apenas no 2º dia de embebição entre os tratamentos e o controle (Figura 11 C). É importante considerar que os extratos utilizados para as análises de carboidratos foram obtidos das plântulas inteiras, ou seja, as partes das plântulas não foram separadas em raízes, parte aérea e tegumento e, portanto, não sabemos se o efeito observado nos carboidratos de reserva ocorreu em partes específicas da plântula em resposta ao estresse alelopático.

Tomate

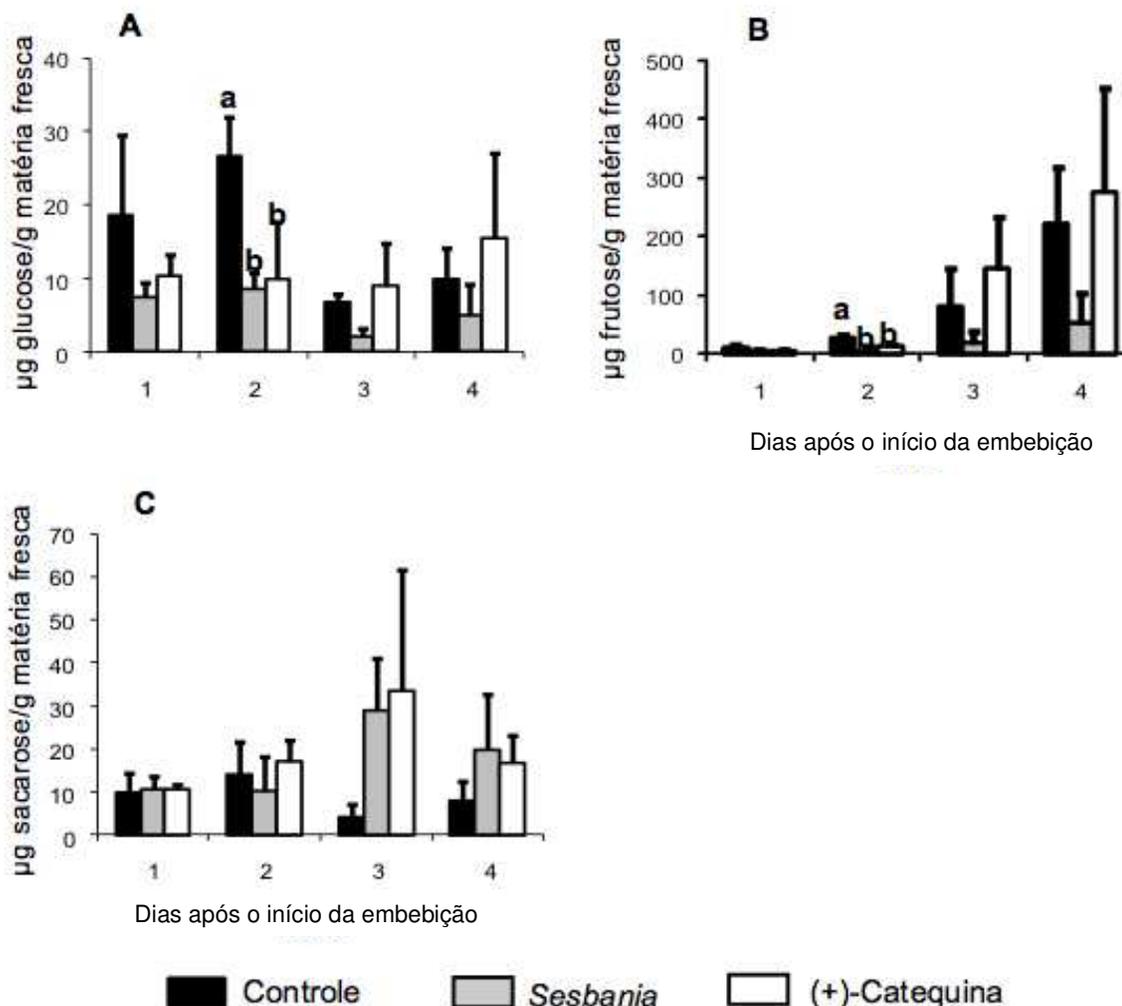


Figura 10 – Quantidade de glucose (A), frutose (B) e sacarose (C) nas sementes de tomate embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante 4 dias de embebição. Dados obtidos por análise de HPAEC/PAD. O controle refere-se à germinação das sementes somente com água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

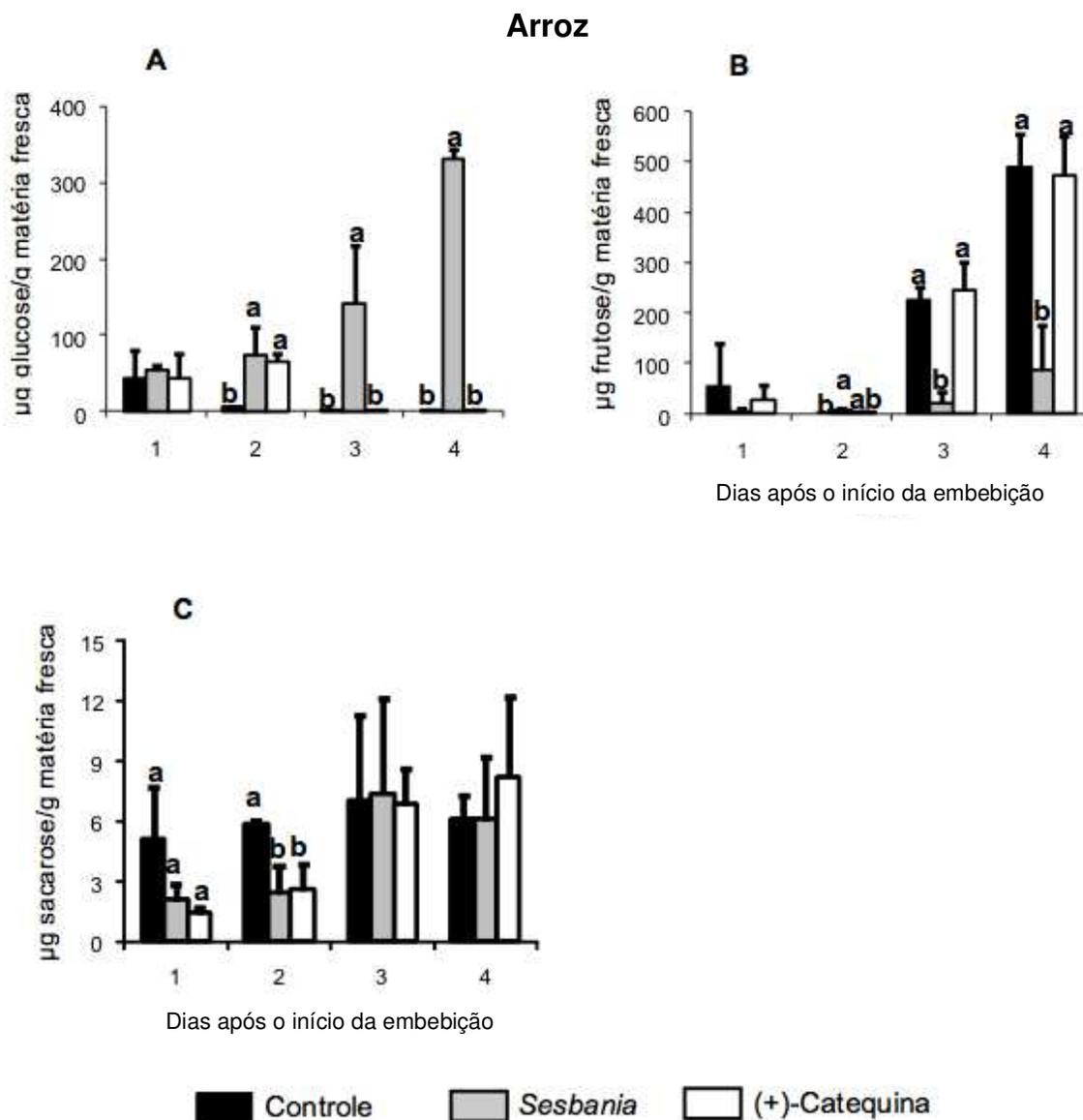


Figura 11 – Quantidade de glucose (A), frutose (B) e sacarose (C) nas sementes de arroz embebidas com solução de EAS e de (+)-catequina comercial, na concentração 1 mg mL^{-1} , durante 4 dias de embebição. Dados obtidos por análise de HPAEC/PAD. O controle refere-se à germinação das sementes somente com água destilada. As barras representam o desvio padrão das médias ($n = 3$). As letras iguais ou ausentes não diferem estatisticamente a cada dia nos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As atividades das enzimas α -galactosidase, α -amilase, endo- β -mananase e invertases são apresentadas nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas na atividade de α -galactosidase, α -amilase e invertase neutra citosólica em nenhum dos tratamentos avaliados, 4 dias após a embebição. Em arroz, as atividades de endo- β -mananase, invertase ácida vacuolar e de parede celular também não mostraram diferenças entre os tratamentos. Por outro lado, em tomate, a atividade de endo- β -mananase foi inibida significativamente por exsudatos de *S. virgata* e estimulada por (+)-catequina, quando comparada ao controle. Verificou-se que as atividades das invertases ácidas foram alteradas em função dos tratamentos, com diferenças significativas para o tomate. A atividade de invertase ácida vacuolar foi maior nas sementes germinadas na presença de exsudatos de sementes de *S. virgata*, já a atividade da invertase ácida localizada na parede celular foi reduzida quando as sementes de tomate germinaram ou com exsudatos de *S. virgata* ou com (+)-catequina comercial (Tabela 5).

Tabela 2 – Atividade de α -galactosidase em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de *S. virgata* ou (+)-catequina comercial (1 mg mL⁻¹)

Espécie	Tratamento	Atividade de α -galactosidase	
		Atividade total [†] (U min ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹ de proteína)
Tomate	Controle	2,632 ± 0,263 a	0,015 ± 0,002 a
	Exsudato	1,825 ± 0,452 a	0,009 ± 0,002 a
	Catequina	2,441 ± 0,756 a	0,013 ± 0,003 a
Arroz	Controle	0,474 ± 0,044 a	0,004 ± 0,0 a
	Exsudato	0,342 ± 0,041 a	0,003 ± 0,0 a
	Catequina	0,415 ± 0,064 a	0,003 ± 0,001 a

Médias ($n = 3$) seguidas da mesma letra do controle não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, entre os tratamentos para cada espécie

[†]Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol galactose por minuto de reação (U min⁻¹).

Tabela 3 – Atividade de α -amilase em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de *S. virgata* ou (+)-catequina comercial (1 mg mL⁻¹)

Espécie	Tratamento	Atividade de α -amilase	
		Atividade total [†] (U min ⁻¹)	Atividade específica (U mg ⁻¹ de proteína)
Tomate	Controle	5,136 ± 2,355 a	0,070 ± 0,026 a
	Exsudato	9,764 ± 6,796 a	0,105 ± 0,070 a
	Catequina	6,398 ± 0,387 a	0,095 ± 0,016 a
Arroz	Controle	18,141 ± 7,789 a	0,358 ± 0,219 a
	Exsudato	25,523 [‡]	0,432 [‡]
	Catequina	14,944 ± 5,254 a	0,311 ± 0,2 a

Médias ($n = 3$) seguidas da mesma letra do controle não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, entre os tratamentos para cada espécie

[†]Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol maltose por minuto de reação (U min⁻¹)

[‡]Atividade encontrada em apenas uma das replicatas.

Tabela 4 – Atividade de endo- β -mananase em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de *S. virgata* ou (+)-catequina comercial (1 mg mL⁻¹)

Espécie	Tratamento	Atividade de endo- β -mananase	
		Atividade total [†] (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹ de proteína)
Tomate	Controle	0,573 ± 0,024 a	0,533 ± 0,040 a
	Exsudato	0,221 ± 0,037 b	0,139 ± 0,010 b
	Catequina	0,694 ± 0,061 c	0,675 ± 0,068 c
Arroz	Controle	0,379 ± 0,031 a	0,225 ± 0,027 a
	Exsudato	0,323 ± 0,024 a	0,144 ± 0,065 a
	Catequina	0,396 ± 0,041 a	0,242 ± 0,029 a

Médias ($n = 3$) seguidas da mesma letra do controle não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, entre os tratamentos para cada espécie

[†]Uma unidade (U) de enzima foi definida de acordo com as pastilhas Beta-Mannazyme (Megazyme, lote 50201).

Tabela 5 – Atividade de invertases em sementes de tomate e arroz, após quatro dias de embebição em água (controle), exsudato de sementes de *S. virgata* ou (+)-catequina comercial (1 mg mL⁻¹)

Espécie	Tratamento	Atividade total de invertases [†] (U min ⁻¹)		
		Invertase ácida vacuolar	Invertase neutra citosólica	Invertase ácida de parede celular
Tomate	Controle	0,049 ± 0,045 a	0,0	0,029 ± 0,0 a
	Exsudato	0,123 ± 0,003 b	0,0	0,0
	Catequina	0,023 [‡]	0,0	0,011 ± 0,007 b
Arroz	Controle	0,113 ± 0,014 a	0,013 [‡]	0,0
	Exsudato	0,110 ± 0,035 a	0,008 ± 0,008 a	0,0
	Catequina	0,154 ± 0,024 a	0,019 ± 0,013 a	0,055 ± 0,050

Médias ($n = 3$) seguidas da mesma letra do controle não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, entre os tratamentos para cada espécie

[†]Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol glucose por minuto de reação (U min⁻¹)

[‡]Atividade encontrada em apenas uma das replicatas.

3 Discussão

Os testes de germinação para o estudo dos efeitos alelopáticos, em geral, embora muito utilizados, são menos sensíveis do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas, como por exemplo, a variação na massa ou no comprimento da radícula ou da parte aérea (Ferreira & Áquila 2000). No entanto, a redução da germinação tem sido relatada para diversas espécies quando sementes são tratadas com solução aquosa que possui potencial alelopático. Em estudos realizados por Ribeiro et al. (2009), extratos aquosos de raízes, folhas e bainha das folhas de *Crinum americanum* L. diminuíram a porcentagem de germinação e o crescimento inicial das plântulas para todas as espécies ensaiadas (alface, gergelim e rabanete – espécies olerícolas; picão-preto, capim-arroz e corda-de-viola – espécies invasoras de culturas). Maraschin-Silva & Áquila (2006) verificaram que extratos aquosos foliares das cinco espécies ensaiadas, *Cecropia pachystachya* Trec. (Urticaceae), *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Fabaceae), *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltldl (Rubiaceae), *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax (Euphorbiaceae) e *Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg., Lanj. & Boer (Moraceae), causaram atraso na germinação bem como efeitos tóxicos no crescimento da planta-alvo (alface).

O efeito alelopático de sementes e de extratos aquosos foliares de *S. virgata* sobre a germinação e o desenvolvimento de duas espécies florestais (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong e *Sapindus saponaria* L.) e duas espécies agrônômicas (*S. lycopersicum* e *O. sativa*) foram analisados por El Id et al. (2014), em condições laboratoriais e em viveiro. Os autores verificaram a inibição ou atraso do processo germinativo apenas para as espécies agrônômicas e redução do crescimento das plântulas em todas as espécies avaliadas em ensaios de co-germinação. Nas espécies arbóreas nativas, que co-ocorrem com *S. virgata* em ambiente natural, o efeito inibidor de *S. virgata* sobre o crescimento foi menor. Nenhum efeito inibidor foi observado nos extratos foliares, indicando que a semente de *S. virgata* contém os aleloquímicos responsáveis por sua interferência na germinação e crescimento inicial de outras espécies.

No presente trabalho, a co-germinação de *S. virgata* com as espécies agrônômicas confirmou os resultados de El Id et al. (2014), com inibição e atraso na germinação, que persistiram ao longo do experimento apenas em tomate (Tabela 1). Esses resultados foram similares aos encontrados por Lara-Núñez et al. (2009), que observaram inibição da germinação de sementes de tomate tratadas com lixiviados

aquosos da parte aérea de *S. deppoi*, na concentração de 0,5 % em meio agar. Para o arroz, no bioensaio de fitotoxicidade, foi observado apenas um atraso inicial no processo germinativo, não havendo diferença a partir do 4º dia do início da embebição das sementes (Figura 2). Em trabalho desenvolvido por Simões (2008), quando sementes de tomate e alface foram germinadas com os exsudatos de sementes de *S. virgata* obtidos em diferentes dias de embebição, as sementes de tomate sofreram inibição da germinação, fato não observado para as sementes de alface. De acordo com o que foi também observado no presente estudo, sementes diferentes apresentam sensibilidade distinta aos aleloquímicos contidos nos exsudatos de sementes de *S. virgata*.

Goetze & Thomé (2004), após analisarem o efeito alelopático de *N. tabacum* e *E. grandis* na germinação e desenvolvimento inicial de alface, brócolis e repolho, relataram que todas as hortaliças tiveram o peso fresco final afetado pelos extratos elaborados a partir de folhas frescas de tabaco. O mesmo foi observado para as sementes agrônômicas avaliadas no presente estudo, após co-germinação com *S. virgata* (Tabela 1). As diferenças significativas constatadas na massa fresca das plântulas de tomate por efeito da co-germinação com sementes de *S. virgata* sugerem efeito inibidor no processo de embebição de água o que, conseqüentemente, tem influência no processo de mobilização de reservas durante a germinação e crescimento inicial do embrião.

O flavonóide (+)-catequina é o principal metabólito exsudado por sementes de *S. virgata*, sendo encontrada no tegumento das sementes e liberada em altas concentrações (235 µg de (+)-catequina/semente) após 24 horas de embebição (Simões et al. 2008). No presente trabalho, a concentração de (+)-catequina detectada nos exsudatos brutos de sementes de *S. virgata*, por dosagem de taninos condensados pelo método de vanilina clorídrica (Broadhurst & Jones 1978), foi de 279 µg mL⁻¹, valor correspondente a cerca de 30% da concentração de (+)-catequina comercial (1 mg mL⁻¹) empregada nos bioensaios de fitotoxicidade. Pelos resultados apresentados na Figura 4, parece que a redução na embebição de água nas sementes de tomate tratadas com EAS em comparação às sementes controle pode estar relacionada à presença de (+)-catequina nesses exsudatos. Porém, isso não foi observado para o arroz, uma vez que o tratamento com (+)-catequina não alterou o teor de matéria fresca das sementes como observado pela ação dos exsudatos de sementes de *S. virgata*. Isso sugere que o efeito alelopático observado sobre as sementes de arroz deve-se a outras substâncias exsudadas pelas sementes de *S. virgata*.

Segundo Correia et al. (2005), quando o efeito de extratos no desenvolvimento de plântulas é avaliado em placas de Petri ou gerbox, observa-se que o sistema radicular é mais afetado, pois a absorção e a concentração de fitotoxinas são favorecidas neste órgão devido ao maior contato entre a radícula e o papel de filtro, e que a inibição da germinação, por vezes, não é observada nas sementes. No presente trabalho, observou-se que, para arroz, o efeito inibidor dos exsudatos de sementes de *S. virgata* é na embebição de água e no crescimento da radícula, mas não sobre a germinação. Por outro lado, sementes de tomate já sofrem inibição da germinação (Figuras 2 e 5) e da reativação do metabolismo do eixo embrionário.

No que se refere aos bioensaios de fitotoxicidade do presente trabalho (Figuras 2 e 5), os resultados permitem constatar que os efeitos causados pelos exsudatos de *S. virgata* sobre a germinação de sementes de tomate parecem não ser ocasionados pela (+)-catequina, encontrada no tegumento das sementes (Simões et al. 2008), mas possivelmente devem-se a outras substâncias exsudadas por essas sementes. Sesbanimida, um potente alcalóide encontrado nas sementes de *Sesbania* spp., parece estar associado ao efeito tóxico e à restrição do crescimento de outras espécies vegetais (Powell et al. 1990; van Staden & Grobbelaar 1995). Como a presença da sesbanimida também foi relatada em sementes de *S. virgata* (Simões 2008), é plausível sugerir que os efeitos observados pelos exsudatos de suas sementes, em tomate, no presente trabalho, possam estar relacionados a esses alcalóides. Talvez a sesbanimida possa também estar envolvida na redução na absorção de água pelas sementes de arroz germinadas com os exsudatos de *S. virgata*, discutida anteriormente (Figura 4 A). Além disso, uma proteína com atividade antifúngica foi isolada de sementes de *S. virgata* (Praxedes et al. 2011) indicando que a espécie possui várias substâncias bioativas em suas sementes, que podem agir isolada- ou sinergicamente para causar os efeitos inibitórios observados.

Simões et al. (2008) observaram que tratamentos com o flavonóide (+)-catequina de fonte comercial (Sigma-Aldrich) ou isolada dos exsudatos de sementes de *S. virgata* foram extremamente tóxicos, nas concentrações de 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, às raízes de *A. thaliana*, causando escurecimento, total inibição da formação de raízes laterais e redução da biomassa. Em plântulas de arroz (*O. sativa*), os autores observaram efeito menos drástico do que para *A. thaliana*. No presente trabalho, efeitos mais severos dos exsudatos de *S. virgata* também foram observados sobre as radículas de tomate em comparação com arroz (Figura 3). Porém, em ambos os casos foram observados escurecimento e fragilidade das raízes, danos fitotóxicos típicos da ação da molécula de

(+)-catequina (Bais et al. 2002; 2003), o que sugere que a interferência sobre o crescimento radicular causada pelos exsudatos de sementes de *S. virgata* deve-se à exsudação desse flavonóide. Essa sugestão foi reforçada pelo uso da (+)-catequina comercial nos ensaios com arroz e tomate, que resultou em efeito fitotóxico similar ao observado pelo tratamento com EAS (Figuras 3 e 7). O efeito tóxico da (+)-catequina deve-se à rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), seguida por incremento no influxo de cálcio, redução do pH citoplasmático, com consequente condensação do citoplasma e morte celular (Bais et al. 2003).

Reduções significativas observadas no comprimento das plântulas de tomate e arroz no presente trabalho (Tabela 1, Figuras 1, 3 e 7) reforçam a ação alelopática das sementes de *S. virgata* no crescimento das plântulas das espécies-alvo. Efeitos de aleloquímicos liberados por sementes sobre o crescimento vegetal, embora menos frequentes do que aqueles relatados para outras partes das plantas, foram previamente descritos por Anaya et al. (1993), El Id et al. (2014), Inoue et al. (2010), Mendonça (2008), Simões et al. (2008), Souza Filho (2002), Souza Filho et al. (2011), Villagrasa et al. (2006) e Xuan & Tsuzuki (2002), destacando a importância de sementes como fontes de substâncias químicas com atividade potencialmente alelopática.

Os efeitos da (+)-catequina sobre as plantas podem variar substancialmente (Pollock et al. 2009) também de acordo com variações do ambiente. A (+)-catequina comercial (Sigma-Aldrich) inibiu o crescimento da parte aérea e raiz das sementes de mostarda branca, quando mantidas no escuro, em meio agar na concentração de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, porém, na presença de luz intensa não foi observado o mesmo efeito (Chobot et al. 2009). Além disso, algumas espécies são capazes de inativar os aleloquímicos exsudados (Blair et al. 2006). MBOA (6-metoxi-2-benzoxazolinona), um metabólito secundário de Poaceae, inibiu a germinação das sementes de 12 plantas-alvo: arroz (*O. sativa*), trigo (*Triticum aethiopicum* Jakubz), centeio (*Secale cereale* L.), cebola (*A. cepa*), aveia-selvagem (*Avena fatua* L.), capim-arroz (*E. crus-galli*), azevém (*Lolium rigidum* Gaudin), agrião (*Lepidium sativum* L.), alface (*L. sativa*), tomate (*S. lycopersicum*), cenoura (*Daucus carota* L.) e amaranto (*Amaranthus retroflexus* L.), sendo observada maior inibição com o aumento da concentração. Entretanto, espécies da família Poaceae (capim-arroz, aveia-selvagem, arroz, centeio, azevém e trigo) foram menos sensíveis a esse inibidor do que as outras espécies vegetais (Kato-Noguchi & Macías 2008). Olofsdotter et al. (1999) observaram que diferentes efeitos alelopáticos em arroz podem ser explicados pelo fato de algumas cultivares possuírem potencial para controlar plantas

daninhas, pois também são capazes de liberar no ambiente substâncias que reduzem o desenvolvimento destas espécies. Desse modo, os resultados obtidos no presente estudo, em relação aos efeitos distintos dos exsudatos de sementes de *S. virgata* em tomate e arroz e da própria (+)-catequina comercial, podem não ser unicamente consequência da sensibilidade da espécie à substância ativa liberada.

Durante o processo de germinação de sementes e/ou no desenvolvimento de plântulas ocorre a mobilização de reservas para a formação de novas estruturas celulares. Os dados apresentados nesse trabalho (Figuras 8 a 11) mostram alteração na mobilização de reservas durante a germinação e crescimento inicial da plântula quando as sementes de tomate e arroz foram submetidas ao tratamento com exsudatos de sementes de *S. virgata*, resultando em atraso do processo. Embora diferenças significativas não tenham sido observadas no teor de matéria seca por efeito desses exsudatos, a quantificação de açúcares totais e redutores indica diferenças nos seus conteúdos em relação ao controle, no 3º dia após o início da embebição, nas sementes de tomate e arroz (Figura 8). Em tomate, o decréscimo no teor de açúcares totais, com o consequente aumento de açúcares redutores nas sementes germinadas em água destilada, sugere ocorrência de hidrólise de carboidratos solúveis, como a sacarose, sugestão corroborada pelo decréscimo detectado na quantidade desse dissacarídeo e incremento de glucose e frutose (Figura 10). Nos tratamentos com exsudatos de sementes de *S. virgata* ou (+)-catequina comercial isso não foi observado, evidenciando que o atraso no metabolismo desses açúcares pode ser devido à presença desse aleloquímico.

Sementes que tem hemiceluloses como os mananos e galactomananos como carboidratos de reserva de parede celular normalmente não acumulam amido em seus tecidos (Bewley et al. 2013). No entanto, após a germinação, há um aumento no nível deste polissacarídeo nessas sementes devido à mobilização do endosperma, que fornece quantidades elevadas de monossacarídeos transportados a partir do endosperma e armazenados no embrião (Buckeridge & Dietrich 1996; Dirk et al. 1999). Conforme esperado, nas sementes de tomate germinadas em água destilada foi observado acúmulo de amido a partir do 2º dia do início da embebição (Figura 9 A). Entretanto, esses teores foram bem menores no tratamento com exsudatos de sementes de *S. virgata*, indicando atraso ocasionado pelos aleloquímicos exsudados na mobilização de reservas do endosperma de tomate.

O amido fornece glicose para ser utilizada tanto na respiração, para gerar energia, quanto para compor estruturas físicas durante o crescimento do embrião na fase de germinação (Magalhães et al. 2010). Os açúcares oriundos da quebra do amido são alocados para as demais partes da planta como carboidratos na forma de açúcares solúveis totais. Em arroz, foi observado aumento no conteúdo de carboidratos solúveis totais e redutores com a germinação das sementes em água destilada (Figura 8 B e D), possivelmente como resultado da hidrólise do amido. Embora essa sugestão não seja corroborada pelos dados da Figura 9 B, é possível que variações no teor desse polissacarídeo de reserva tenham ocorrido porém tenham sido de magnitude inferior às detectáveis pelo método utilizado. Entretanto, os aumentos nos teores dos monossacarídeos glicose e frutose ao longo do processo germinativo são mais um indício da hidrólise dessas reservas. Aos 4 dias, o teor de açúcares solúveis totais e redutores nas sementes de arroz foi similar entre os tratamentos controle e (+)-catequina comercial, porém superior ao observado nas sementes germinadas com os exsudatos de sementes de *S. virgata*, sugerindo atraso na provável mobilização de amido e ausência de efeito da (+)-catequina nesse processo. Esses resultados estão de acordo com as menores quantidades de frutose detectadas no tratamento com exsudatos de sementes de *S. virgata* quando comparados às sementes controle e tratadas com (+)-catequina comercial (Figura 11).

Estudos realizados mostraram que os extratos de raízes, folhas e caules de girassol aumentaram significativamente o conteúdo de açúcares solúveis observados nas plântulas de duas variedades de trigo (Kamal 2011). Singh et al. (2009) verificaram que os lixiviados aquosos de folhas de *N. plumbaginifolia*, em maiores concentrações, diminuíram o conteúdo dos açúcares totais e aumentaram o conteúdo de amido em sementes de milho. Os autores sugerem que estas diferenças na mobilização das reservas possam ter ocorrido devido a uma inibição da síntese de ácido giberélico e da síntese do ácido indol-3-acético, que são hormônios de crescimento e conhecidos por regular a produção de amilase durante a germinação das sementes, ou ainda sugerem que houve uma indução da síntese do ácido abscísico (ABA), conhecido por ser um potente inibidor de germinação e da mobilização dos compostos de reserva em sementes de *S. virgata* (Tonini et al. 2010).

Em sementes de tomate, a α -galactosidase, encontra-se tanto na parede celular quanto no citoplasma e está envolvida na mobilização de reservas de carboidratos durante e após a germinação (Feurtado et al. 2001), sendo citada na literatura como

responsável pelo amolecimento do tegumento. Desempenha também papel fundamental na estrutura da parede celular, estando envolvida na modificação ou degradação de mananos estruturais (Bassel et al. 2001). No presente estudo, os valores de atividade de α -galactosidase encontrados nas sementes de tomate foram maiores do que os detectados nas sementes de arroz, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 2), o que sugere ausência de efeito direto dos aleloquímicos, presentes nos exsudatos de *S. virgata*, incluindo a (+)-catequina, sobre a atividade dessa enzima.

Kato-Noguchi et al. (2010) verificaram que benzoxazinonas contendo ácido hidroxâmico, substância encontrada em várias espécies de gramíneas como milho, trigo e centeio, afetaram o crescimento das raízes de agrião na concentração de 0,3 mM e inibiram a atividade da α -amilase, sugerindo que o crescimento da raiz está correlacionado diretamente com a atividade de α -amilase não somente na germinação da semente mas também no desenvolvimento das mudas. Apesar dos tratamentos com exsudatos de sementes de *S. virgata* em tomate e arroz terem afetado negativamente o comprimento radicular das plântulas e interferido com o metabolismo de amido, em comparação às do controle, a atividade α -amilásica nas espécies-alvo não foi afetada pelos tratamentos após quatro dias de embebição (Tabela 3).

A presença de atividade de endo- β -mananase tem sido correlacionada com protrusão da radícula, de modo que um aumento na sua atividade pode reduzir a restrição mecânica causada pelo endosperma e facilitar a protrusão radicular (Mo & Bewley 2003; Dietrich & Figueiredo Ribeiro 1986). Takaki & Dietrich (1980) observaram que a atividade da mananase em sementes de café aumenta somente 10 dias após a embebição, estando esta associada ao amolecimento do endosperma e à disponibilização de carboidratos para o crescimento do embrião, durante o processo de germinação (Silva et al. 2004). Pelos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que os tratamentos avaliados afetaram diretamente a endo- β -mananase, com diferenças significativas para a espécie-alvo tomate (Tabela 4), com inibição pelos exsudatos de sementes de *S. virgata* e aumento de sua atividade por tratamento das sementes de tomate com a (+)-catequina comercial. Essa redução de atividade ocasionada pelo tratamento com os exsudatos de sementes de *S. virgata* está de acordo com o menor acúmulo de amido observado nas sementes de tomate (Figura 9), indicando que há menor mobilização do manano presente no endosperma e, conseqüentemente, menor disponibilidade de açúcares para serem transferidos e armazenados no embrião.

A (+)-catequina comercial, por sua vez, embora tenha causado redução do comprimento radicular em tomate, teve efeito estimulante sobre a atividade da endo- β -mananase, sugerindo que ambos processos ocorrem de modo independente, uma vez que a redução na força de dreno do embrião não reflete em diminuição na atividade da enzima envolvida na mobilização do manano no endosperma. Isso explicaria o porquê de haver acúmulo de amido no tratamento com (+)-catequina em tomate aos 4 dias (Figura 9), apesar da forte redução observada no crescimento radicular (Figura 3). Por outro lado, a ação dos exsudatos de sementes de *S. virgata* nitidamente interfere com a mobilização das reservas no endosperma de tomate, motivo pelo qual o acúmulo de amido é menor aos 4 dias se comparado à (+)-catequina e ao tratamento controle, possivelmente por influência direta sobre a atividade da endo- β -mananase.

Verificou-se, no presente estudo, que as atividades das invertases ácidas foram alteradas em função dos tratamentos, com diferenças significativas apenas para o tomate. Ensaio *in vitro* realizados por Lara-Núñez et al. (2009) revelaram que as fitotoxinas produzidas por *S. deppoi* (Cucurbitaceae) reduziram a atividade de invertase ácida de parede celular em tomate, assim como observado para os exsudatos de *S. virgata* no presente trabalho. A redução nessa atividade por efeito dos exsudatos de *S. virgata* pode estar relacionada ao menor acúmulo de açúcares redutores observado nas sementes de tomate sob este tratamento (Figura 8). As tendências observadas nos teores de sacarose e de glucose e frutose, mostradas na Figura 10, são coerentes com essa redução da atividade invertásica aos 4 dias de tratamento. A menor atividade de invertase ácida de parede celular em sementes pode estar relacionada com o atraso na germinação e com a inibição do crescimento da raiz e, conseqüentemente, com a maior quantidade de sacarose observada (Figura 10 C). Embora o tratamento com (+)-catequina comercial também tenha diminuído a atividade da invertase ácida de parede celular em tomate, essa inibição não resultou em variações nos teores de monossacarídeos e sacarose similares às observadas pelos efeitos dos exsudatos, o que sugere mais uma vez que esse flavonóide não é o único responsável pelos efeitos alelopáticos observados. Por outro lado, a atividade da invertase ácida vacuolar foi estimulada em sementes de tomate pelos exsudatos de *S. virgata*, contrastando com os teores de açúcares encontrados, mostrando que as substâncias bioativas presentes em sementes de *S. virgata* tem ação distinta sobre as invertases localizadas em diferentes compartimentos celulares.

4 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que *S. virgata* libera de suas sementes, além da (+)-catequina, outros aleloquímicos que atuam de modo diferenciado sobre a mobilização de reservas na germinação de sementes das espécies agronômicas avaliadas (tomate e arroz), interferindo no desenvolvimento inicial das plântulas. Além disso, o tomate mostrou-se mais sensível aos aleloquímicos de *S. virgata*, já que sua fitotoxicidade foi observada durante a germinação, fato não constatado para as sementes de arroz.

Parte 2. Efeitos *in vitro* dos exsudatos de *Sesbania virgata* sobre a fase assimbiótica do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora albida*

1 Material e Métodos

1.1 Obtenção de exsudatos brutos de sementes de *Sesbania virgata*

Sementes de *S. virgata* (1000 sementes) foram selecionadas com o mesmo padrão de cor do tegumento (marrom claro) e tamanho (cerca de 5 mm de comprimento) e escarificadas manualmente com uso de lixa (P80 3M). Na sequência, as sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 10 %, durante 20 minutos, e lavadas com água destilada esterilizada por quatro vezes consecutivas. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram distribuídas em placas de Petri de vidro com 150 mm de diâmetro (50 sementes/placa) contendo papel de filtro qualitativo (Qualy[®]) embebido em água destilada autoclavada (35 mL). As placas foram transferidas para câmara de germinação (BOD modelo 347 FG, Fanem[®]) a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 48 horas, exsudatos brutos de sementes de *S. virgata* foram coletados e armazenados em diferentes volumes para posterior liofilização.

1.2 Obtenção de exsudatos brutos de raízes de *Sesbania virgata*

Sementes de *S. virgata* foram germinadas conforme descrito acima e, após 6 dias em câmara de germinação, 300 plântulas foram transferidas para vasos de polietileno (cinco plântulas por vaso) preenchidos com 500 g de quartzo autoclavado como substrato. Os vasos permaneceram em casa de vegetação em regime de rega diária com água destilada em volume inferior à capacidade de campo (50 mL). As plântulas foram irrigadas com solução nutritiva de Hoagland (50 mL) no primeiro dia do experimento. Após 5 dias, cada vaso foi regado com volume fixo de água destilada (100 mL), superior à capacidade de campo, e os lixiviados coletados para obtenção de exsudatos brutos de raízes, que foram armazenados em diferentes volumes para posterior liofilização.

1.3 Quantificação dos exsudatos de *Sesbania virgata*

Carboidratos solúveis, proteínas totais, fenóis totais, flavonóides totais e taninos condensados foram determinados nos exsudatos brutos de sementes e de raízes de *S. virgata*. Os carboidratos solúveis foram quantificados pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956), utilizando glicose (Vetec[®]) como padrão. Proteínas totais foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando BSA (Sigma) como padrão, e os fenóis totais foram quantificados pelo método Folin-Ciocalteu utilizando ácido tânico (Sigma) como padrão (Monteiro et al. 2006). Flavonóides totais foram quantificados de acordo com Araújo et al. (2008), usando rutina (Sigma) como padrão, e taninos condensados foram quantificados pelo método de vanilina clorídrica (Broadhurst & Jones 1978), usando (+)-catequina (Sigma-Aldrich) como padrão.

Alíquotas dos exsudatos brutos aquosos de *S. virgata* foram também fracionados com acetato de etila (2:1 v/v). Os vestígios de água presentes na fração orgânica recolhida foram eliminados por filtração em sulfato de sódio anidro (Sigma-Aldrich). A fração orgânica foi filtrada, concentrada por evaporação e retomada em 1 mL de metanol para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS). Os picos foram comparados com (+)-catequina (Sigma-Aldrich). Essa análise foi realizada no Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), como descrito por Simões et al. (2008).

1.4 Ensaio de germinação *in vitro* de *Gigaspora albida*

Diferentes volumes de exsudatos brutos de *S. virgata* liofilizados foram ressuspensos em 3 mL de água destilada, obtendo-se diferentes concentrações: **1** (2,8 µg), **2** (8,4 µg), **3** (13,9 µg), **4** (19,5 µg) e **5** (27,9 µg equivalentes de (+)-catequina mL⁻¹) de exsudatos de sementes e **1** (0,14 µg), **2** (0,42 µg), **3** (0,70 µg), **4** (0,98 µg) e **5** (1,40 µg equivalentes de (+)-catequina mL⁻¹) para os exsudatos de raízes. Todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa estéril (FilterPro[®]), com membrana de 33 mm de diâmetro e 0,22 µm de diâmetro de poro, antes de serem assepticamente incorporadas ao meio agar-água.

O controle foi preparado com a incorporação asséptica da mesma quantidade de água destilada ao meio. Para inoculação, foram usados esporos de *Gigaspora albida* N. C. Schenck & G. S. Smith (UFPE 01), pertencente ao banco de inóculo do Laboratório de

Micorrizas, do Departamento de Micologia, da Universidade Federal de Pernambuco. Os esporos foram extraídos do solo conforme metodologia de Gerdemann & Nicolson (1963) e Jenkins (1964). Em câmara de fluxo laminar, esporos de FMA selecionados foram desinfestados em solução comercial de hipoclorito de sódio (0,05 %/2 min) e lavados quatro vezes em água destilada autoclavada (Nuutila et al. 1995). Grupos de cinco esporos superficialmente desinfestados foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo 8 mL de meio agar-água (2,0 %), autoclavado a 121 °C/15 min e suplementado com os exsudatos de *S. virgata*. As placas foram vedadas com Parafilm M®, envolvidas em papel alumínio e incubadas em temperatura ambiente (28 ± 2 °C) e umidade do ar relativa de 60-80 % (Silva 2006). Aos 7 e 14 dias da inoculação, avaliou-se o percentual de germinação dos esporos e determinou-se o comprimento micelial (mm/esporo germinado) pelo método de Newman (1966), em estereomicroscópio (40 ×), após coloração das hifas com solução aquosa de azul de Tripán (0,05 %). Para cada época de avaliação, 7 e 14 dias, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 concentrações de exsudatos de *S. virgata* em 4 repetições, totalizando 24 parcelas experimentais/tempo de avaliação/tipo de exsudato.

Sob as mesmas condições citadas acima, um ensaio foi realizado com uma solução-estoque de (+)-catequina (Sigma-Aldrich), na concentração de 279 $\mu\text{g mL}^{-1}$, baseando-se na concentração de (+)-catequina detectada nos exsudatos brutos de sementes de *S. virgata*, valor aproximadamente 95 % maior em relação aos exsudatos brutos radiculares. Para determinar se tal composto exerce efeito em relação à fase assimbiótica de *G. albida*, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos (0; 2,8; 8,4; 14,0; 19,5 e 28,0 $\mu\text{g catequina mL}^{-1}$), em quatro repetições.

1.5 Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos à ANOVA e, quando apropriado, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), com o auxílio do programa ASSISTAT, versão 7.6 beta (Silva 2008).

2 Resultados

Na presença de exsudatos brutos de sementes de *S. virgata*, a germinação dos esporos de *G. albida* variou de 20 a 46,6 % aos sete dias e de 20 a 60 % no 14º dia de incubação (Tabela 1), indicando viabilidade dos esporos. O meio suplementado com a maior concentração de exsudatos estimulou a germinação de esporos (46,6 %) após 7 dias, resultado não observado no 14º dia. Em relação ao crescimento micelial, houve maior produção micelial no meio suplementado com a menor concentração de exsudatos, após 7 dias; no entanto, aos 14 dias a presença de exsudatos brutos de sementes de *S. virgata* não interferiu na produção de micélio assimbiótico de *G. albida* (Tabela 2).

Não houve efeito significativo de exsudatos brutos radiculares de *S. virgata* sobre o percentual de germinação de esporos e o crescimento micelial de *G. albida*, independentemente do tempo de avaliação (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Porcentagem de germinação *in vitro* de esporos de *Gigaspora albida*, em meio agar-água suplementado com diferentes concentrações de exsudatos brutos de sementes e de raízes de *Sesbania virgata*, aos 7 e 14 dias após inoculação

Tempo	Tratamentos					
	Exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i> (μg equivalentes de catequina mL^{-1})					
	0	2,79	8,37	13,95	19,53	27,90
7 dias	20,00 b	20,00 b	33,32 ab	33,32 ab	30,00 ab	46,65 a
14 dias	46,65 ab	60,00 a	45,00 ab	53,32 ab	20,00 c	33,32 bc
	Exsudatos de raízes <i>S. virgata</i> (μg equivalentes de catequina mL^{-1})					
	0	0,14	0,42	0,70	0,98	1,40
7 dias	15,00 a	10,00 a	15,00 a	5,00 a	10,00 a	0 a
14 dias	20,00 a	35,00 a	10,00 a	10,00 a	5,00 a	0 a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Registrou-se maior concentração de carboidratos solúveis, proteínas, fenóis, flavonóides e taninos condensados nos exsudatos brutos de sementes de *S. virgata*, quando comparados aos exsudatos brutos radiculares (Tabela 3).

Tabela 2 – Crescimento micelial (mm/espore germinado) *in vitro* de esporos de *Gigaspora albida*, em meio agar-água suplementado com diferentes concentrações de exsudatos brutos de sementes e de raízes de *Sesbania virgata*, aos 7 e 14 dias após inoculação

Tratamentos						
Exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i> (μg equivalentes de catequina mL^{-1})						
Tempo	0	2,79	8,37	13,95	19,53	27,90
7 dias	0 b	0,69 a	0,18 b	0 b	0 b	0 b
14 dias	0,93 a	0,49 a	0,66 a	0,41 a	1,28 a	0,58 a
Exsudatos de raízes <i>S. virgata</i> (μg equivalentes de catequina mL^{-1})						
Tempo	0	0,14	0,42	0,70	0,98	1,40
7 dias	0,03 a	0 a	0,08 a	0 a	0 a	0 a
14 dias	0,05 a	0,07 a	0,05 a	0,23 a	0,11 a	0 a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 3 – Conteúdo de carboidratos solúveis, proteínas totais, fenóis totais, flavonóides totais e taninos condensados (mg mL^{-1}) em exsudatos brutos de sementes e de raízes de *Sesbania virgata*

Exsudatos de <i>S. virgata</i>	Carboidratos solúveis	Proteínas totais	Fenóis totais	Flavonóides totais	Taninos condensados
mg mL^{-1}					
Sementes	298,6	28,4	104,8	0,012	0,279
Raízes	33,9	4,2	0	0,004	0,013

A presença de catequina e um dímero de catequina foi confirmada em exsudatos de sementes de *S. virgata* por LC/MS (Figura 1). Catequina comercial usada como controle nos ensaios não teve efeito na fase assimbiótica de *G. albida* (dados não apresentados).

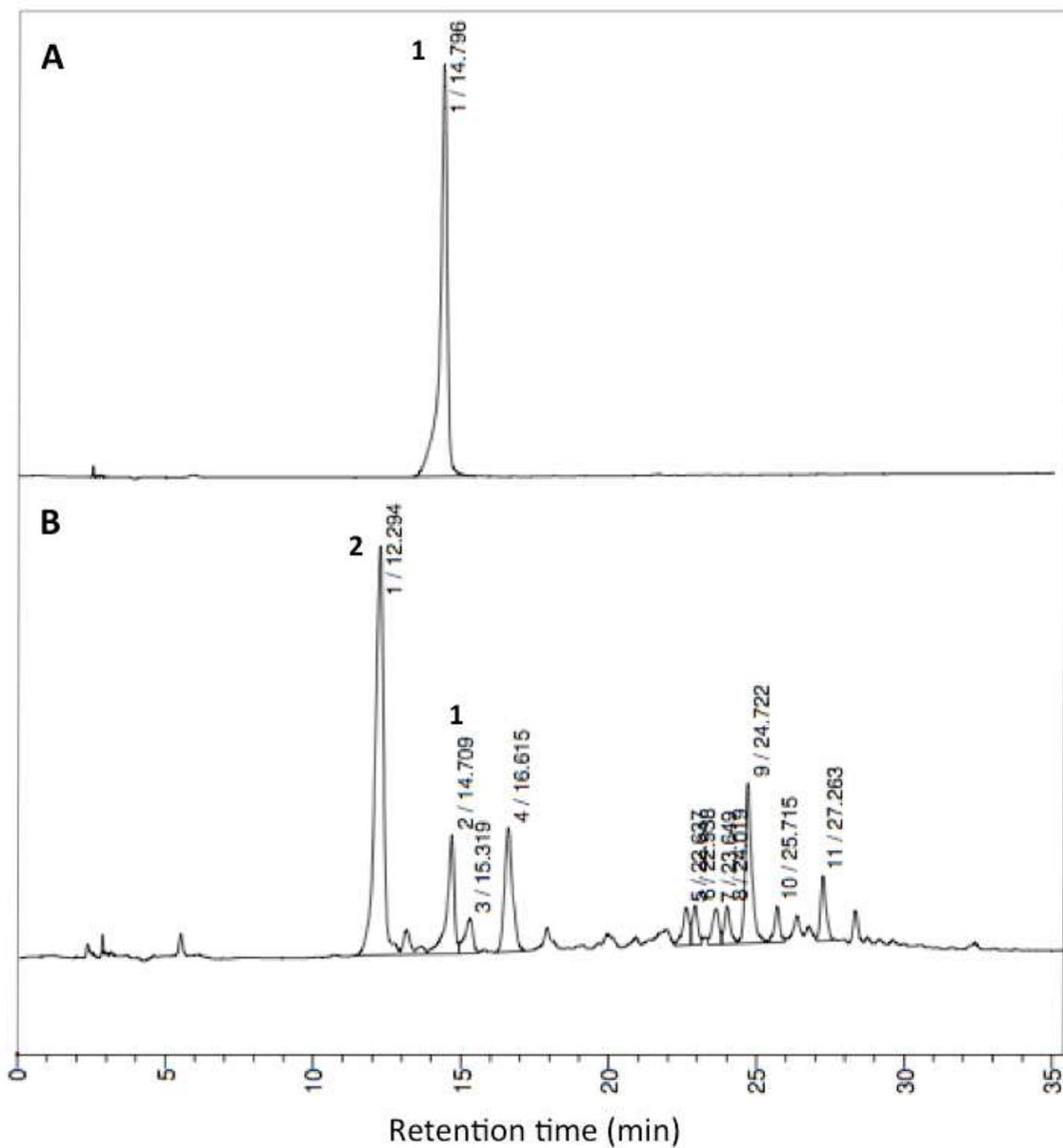


Figura 1. Cromatogramas obtidos da análise por LC/MS: padrão de catequina comercial (**A**) e exsudatos de sementes de *Sesbania virgata* (**B**). Picos: 1 = catequina (tempo de retenção 14,7 min); 2 = dímero de catequina (tempo de retenção 12,3 min).

3 Discussão

Compostos presentes nos exsudatos de sementes de *S. virgata* favoreceram a germinação de esporos de *G. albida*. A caracterização dos exsudatos (Tabela 3) confirmou que diferentes compostos foram liberados pelas sementes, principalmente açúcares, provavelmente como resultado da mobilização de carboidratos de reserva que ocorre no início do processo de embebição, como relatado por Buckeridge & Dietrich (1996). Além de açúcares, compostos fenólicos presentes nos exsudatos podem também ter promovido a germinação. Simões et al. (2008) observaram que (+)-catequina foi rapidamente liberada do tegumento das sementes de *S. virgata* no primeiro dia de embebição em níveis maiores que aqueles relatados para outras espécies de *Sesbania* (Ceballos et al. 1998).

Neste trabalho foi utilizado o método de coleta direta de exsudatos brutos, sem recorrer aos métodos convencionais de extração usando solventes ou mesmo ao fracionamento. Bücking et al. (2008) concluíram que exsudatos brutos de raízes diferem daqueles parcialmente purificados em seu efeito sobre o crescimento pré-simbiótico de FMA. Os autores mostraram que exsudatos brutos aceleraram lentamente a germinação de esporos de *Glomus intraradices* e também estimularam a ramificação dos tubos germinativos; quando exsudatos de raízes parcialmente purificados foram adicionados, os esporos germinaram posteriormente e o número de ramificações após 14 dias não diferiu do controle.

Os resultados obtidos (Tabela 1) não corroboram os dados verificados por Tahat et al. (2010). Esses pesquisadores estudaram o efeito de diferentes exsudatos radiculares sobre a germinação de *Glomus mosseae* e evidenciaram diferenças na germinação devido à qualidade e fonte do exsudato. A germinação dos esporos foi melhor estimulada pelo aumento do volume de exsudatos de raízes não micorrizadas de tomate e milho.

Apenas os exsudatos de sementes de *S. virgata* foram eficazes em estimular o crescimento micelial (Tabela 2), sugerindo a existência de substâncias sinalizadoras que estimulam a ramificação de hifas nos exsudatos liberados pelas sementes. A forma de obtenção dos exsudatos radiculares no presente estudo pode ser responsável, em parte, pela ausência de efeito sobre o crescimento micelial de *G. albida*. Para Diop (2003), a qualidade em vez da quantidade de exsudatos radiculares está mais envolvida com o efeito estimulante.

Há situações em que exsudatos radiculares estimulam a ramificação das hifas de esporos germinados de espécies de *Gigaspora* (Buee et al. 2000; Nagahashi & Douds 2000; Akiyama et al. 2005), o que diverge dos resultados obtidos neste ensaio. Nestes trabalhos, os exsudatos radiculares de todas as espécies de plantas avaliadas apresentaram atividade indutora da ramificação de hifas, com exceção dos exsudatos de raízes não hospedeiras. Portanto, generalizações sobre os efeitos de exsudatos devem ser evitadas e o tipo, a dose e a etapa da fase assimbiótica (germinação ou crescimento micelial) devem ser considerados.

Estudos relatam que os flavonóides são os componentes dos exsudatos radiculares capazes de estimular a germinação de esporos, o crescimento micelial e a ramificação de vários FMA. Em muitos casos, eles também são responsáveis pela colonização micorrízica e pelo mecanismo molecular ativo do processo de colonização radicular e estabelecimento da simbiose (Gianinazzi-Pearson et al. 1989; Nair et al. 1991; Romero & Siqueira 1996; Scervino et al. 2005; 2006; 2009a; Siqueira et al. 1991; Soares et al. 2005). Entretanto, foi demonstrado, usando mutantes de milho deficientes em chalcona-sintase, enzima-chave na biossíntese de flavonóides, que esses compostos não são essenciais ao estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular (Bécard et al. 1995; 2004; Buee et al. 2000). A caracterização dos exsudatos radiculares empregados neste estudo (Tabela 3) aponta para pequenas concentrações disponíveis desses compostos, sugerindo a presença de outras substâncias responsáveis pela ativação da fase assimbiótica de *G. albida*. A complexa composição dos exsudatos de sementes de *S. virgata*, verificada pela análise com LC/MS (Figura 1), sugere que múltiplos compostos poderiam ser responsáveis pelo efeito estimulante observado na fase assimbiótica de *G. albida*, como foi documentado por Ndakidemi & Dakora (2003). É provável que tais moléculas tenham atuado de modo sinérgico, resultando na produção de micélio assimbiótico registrada (Tabela 2). Nesse sentido, Tsai & Phillips (1991) relataram que flavonóides liberados naturalmente de sementes de alfafa (*M. sativa*) promoveram a germinação *in vitro* de esporos de *Glomus etunicatum* e *Glomus macrocarpum*.

O flavonóide (+)-catequina é o principal metabólito exsudado por sementes de *S. virgata*, sendo encontrada no tegumento das sementes e liberada em altas concentrações (235 µg de (+)-catequina/semente) após 24 horas de embebição (Simões et al. 2008). No entanto, tal molécula não estimulou a fase assimbiótica de *G. albida* (dados não apresentados), indicando que provavelmente outras moléculas exsudadas estejam envolvidas no estímulo da fase assimbiótica. Estudos com outros isolados de FMA ainda

são necessários para determinar o efeito benéfico de exsudatos de *S. virgata*. Apenas o isolamento, a caracterização química e ensaios com os compostos isolados ajudará a identificar se o efeito de exsudatos de *S. virgata* é devido especificamente a um deles ou à combinação de várias substâncias.

4 Conclusão

Nossos resultados mostram que exsudatos de sementes e de raízes de *S. virgata* exercem papel diferenciado sobre a fase assimbiótica de *G. albida*, estimulando a germinação de esporos e o crescimento micelial inicial quando o meio é suplementado com exsudatos de sementes. Estes efeitos não puderam ser atribuídos à catequina, que é exsudada por sementes de *S. virgata* no início do processo de embebição.

Considerações Finais

Neste trabalho foi demonstrado que as sementes de *Sesbania virgata* apresentam efeito alelopático sobre as espécies agrônômicas avaliadas (tomate e arroz), causando inibição ou atraso da germinação das sementes, respectivamente, e reduzindo o desenvolvimento inicial das plântulas. Extratos aquosos de exsudatos de sementes de *S. virgata* afetaram a germinação, o comprimento radicular e da parte aérea das sementes de tomate. Em arroz, o comprimento radicular e da parte aérea foram as únicas variáveis que diferiram significativamente em relação ao controle. Além disso, na presença dos exsudatos de sementes de *S. virgata*, as sementes de tomate e arroz mostraram redução na mobilização dos carboidratos de reserva, o que não foi observado quando (+)-catequina comercial foi utilizada. Os ensaios enzimáticos realizados mostraram, para o tomate, efeitos dos exsudatos de sementes de *S. virgata* na atividade das enzimas endo- β -mananase e invertases ácidas. Assim, conclui-se que embora os efeitos alelopáticos dos exsudatos de sementes de *S. virgata* sejam distintos em tomate e arroz, em ambas espécies ocorre interferência no processo de mobilização de reservas das sementes, evidenciada por uma forte inibição do crescimento radicular. Esses efeitos não podem ser atribuídos unicamente à catequina exsudada pelas sementes, o que sugere que existem outros compostos alelopáticos nas sementes de *S. virgata*, além da (+)-catequina, que podem interferir no desenvolvimento das espécies alvo.

Ao examinar os efeitos de exsudatos brutos de *S. virgata* em relação aos FMA, foi observado que a fase assimbiótica de *Gigaspora albida* mostrou-se mais sensível à presença dos exsudatos de sementes em relação aos radiculares, sugerindo que *S. virgata* libera de suas sementes compostos que podem atuar como moléculas-sinais que estimulam a simbiose micorrízica arbuscular. Esse efeito não pode ser atribuído à (+)-catequina exsudada pelas sementes de *S. virgata*.

Referências Bibliográficas

- Aikawa J, Ishii T, Kuramoto M, Kadoya K. 2000. Growth stimulants for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in satsuma mandarin pomace. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 69:385-389.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824-827.
- Albuquerque MB, Santos RC, Lima LM, Melo Filho PA, Nogueira RJMC, Câmara CAG, Ramos AR. 2010a. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 31:379-395.
- Alves MCS, Medeiros Filho S, Innecco R, Torres SB. 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39:1083-1086.
- Amaral LIV, Costa PMF, Aidar APM, Gaspar M, Buckeridge MS. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34:425-431.
- Anaya AL, Hernández-Bautista BE, Pelayo-Benevides HR, Calera M, Fernandez-Luiselli E. 1993. Allelopathy in Mexican plants. *In Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications* (Inderjit, KMM Dakshini, FA Einhellig, eds.). American Chemical Society, Washington, p. 224-241.
- Andrade LA. 2006. Espécies exóticas invasoras no nordeste do Brasil: impactos nos ecossistemas locais. *In Os avanços da Botânica no início do século XXI: Morfologia, Fisiologia, Taxonomia, Ecologia e Genética* (JEA Mariath, RP Santos, eds.). Sociedade Botânica do Brasil, Porto Alegre, p. 524-528.
- Andrade SAL, Malik S, Sawaya ACHF, Bottcher A, Mazzafera P. 2013. Association with arbuscular mycorrhizal fungi influences alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:867-880.
- Araujo EC, Mendonça AVR, Barroso DG, Lamônica KR, Silva RF. 2004. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Revista Brasileira de Sementes* 26:105-110.

- Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque UP. 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 120:72-80.
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y. 1998. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhiza fungi. *New Phytologist* 139:375-388.
- Bago B, Pfeffer PE, Douds Jr DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y. 1999. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* 121:263-271.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124:949-957.
- Bais HP, Walker TS, Stermitz FR, Hufbauer RA, Vivanco JM. 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (\pm)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* 128:1173-1179.
- Bais HP, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301:1377-1380.
- Baslam M, Garmendia I, N Goicoechea. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:5504-5515.
- Bassel GW, Mullen RT, Bewley JD. 2001. Alpha-Galactosidase is synthesized in tomato seeds during development and is localized in the protein storage vacuoles. *Canadian Journal of Botany* 79:1417-1424.
- Bauer JT, Shannon SM, Stoops RE, Reynolds HL. 2012. Context dependency of the allelopathic effects of *Lonicera maackii* on seed germination. *Plant Ecology* 213:1907-1916.
- Bécard G, Taylor LP, Douds Jr DD, Pfeffer PE, Doner LW. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:252-258.
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany* 82:1186-1197.

- Belinelo VJ, Czepak MP, Vieira Filho SA, Menezes LFT, Jamal CM. 2008. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. *Caatinga* 21:12-16.
- Bell DT, Koeppe DE. 1972. Noncompetitive effects of giant foxtail on the growth of corn. *Agronomy Journal* 64:321-325.
- Benedetti T, Antonioli ZI, Giracca EMN, Steffen RB. 2005. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares na cultura do milho após uso de espécies de plantas de cobertura de solo. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 4:44-51.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases, alpha and beta. *In* *Methods in Enzymology I* (SP Colowick SP, NO Kaplan, eds.). Academic Press, New York, p. 149-158.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLOS Biology* 4:1239-1247.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. 2013. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer, New York, 392p.
- Blair AC, Nissen SJ, Brunk GR, Hufbauer RA. 2006. A lack of evidence for an ecological role of the putative allelochemical (\pm)-catechin in spotted knapweed invasion success. *Journal of Chemical Ecology* 32:2327-2331.
- Bomfeti CA, Ferreira PAA, Carvalho TS, De Rycke R, Moreira FMS, Goormachtig S, Holsters M. 2013. Nodule development on the tropical legume *Sesbania virgata* under flooded and non-flooded conditions. *Plant Biology* 15:93-98.
- Bonfante P, Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1:1-11.
- Bonfante P, Requena N. 2011. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14:451-457.
- Bonome TLS, Moreira SAF, Oliveira LEM, Sotero AJ. 2011. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the brazilian rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss) Muell.-Arg.]. *Acta Physiology Plant* 33:211-219.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Braggio MM, Lima MEL, Veasey EA, Haraguchi M. 2002. Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Arquivo do Instituto de Biologia* 69:49-53.
- Broadhurst RB, Jones WT. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29:788-794.
- Broeckling CD, Vivanco JM. 2008. A selective, sensitive, and rapid in-field assay for soil catechin, an allelochemical of *Centaurea maculosa*. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1189-1196.
- Bucher M, Wegmüller S, Drissner D. 2009. Chasing the structures of small molecules in arbuscular mycorrhizal signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 12:500-507.
- Buckeridge MS, Dietrich SMC. 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science* 117:33-43.
- Buckeridge MS, Reid JSG. 1996. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 4:153-162.
- Bücking H, Abubaker J, Govindarajulu M, Tala M, Pfeffer PE, Nagahashi G, Lammers P, Shachar-Hill Y. 2008. Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 180:684-695.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:693-698.
- Cabral EL, Barbosa DCA, Simabukuro EA. 2003. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. *Acta Botânica Brasilica* 17:609-617.
- Callaway RM, Ridenour WM. 2004. Novel weapons: A biochemically based hypothesis for invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2:436-443.
- Callaway RM, Thelen GC, Rodriguez A, Holben WE. 2004. Soil biota and exotic plant

invasion. *Nature* 427:731-733.

Callaway RM, Cipollini D, Barto K, Thelen GC, Hallett SG, Prati D, Stinson K, Klironomos J. 2008. Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* 89:1043-1055.

Cândido ACS, Schmidt V, Laura VA, Faccenda O, Hess SC, Simionatto E, Peres MTL. 2010. Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link (Fabaceae, Caesalpinioideae): bioensaios em laboratório. *Acta Botanica Brasilica* 24:235-242.

Cantor A, Hale A, Aaron J, Traw MB, Kalisz S. 2011. Low allelochemical concentrations detected in garlic mustard-invaded forest soils inhibit fungal growth and AMF spore germination. *Biological Invasions* 13:3015-3025.

Carvalho NM, Nakagawa J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. FUNEP, Jaboticabal, 588p.

Carvalho MAM, Pinto MM, Figueiredo-Ribeiro RCL. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* (Asteraceae) as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21:281-285.

Carvalho WP, Carvalho GJ, Andrade MJB, Fonseca G, Andrade L, Valaci F, Oliveira DP. 2012. Alelopatia de adubos verdes sobre feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista brasileira de Biociências* 10:86-93.

Cavalcante UMT, Goto BT, Maia LC. 2009. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica* 5:180-208.

Ceballos L, Hossaert-Mckey M, Mckey D, Andary C. 1998. Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of *Sesbania* (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of polyphenolic compounds in anti-pathogen defense of seedlings. *Chemoecology* 8:141-151.

Chaves LLB, Carneiro JGA, Barroso DG, Leles PSS. 2003. Efeitos da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada na produção de mudas de sesbânia em substrato constituído de resíduos agroindustriais. *Revista Árvore* 27:443-449.

Chobot V, Huber C, Trettenhanh G, Hadacek F. 2009. (\pm)-Catechin: chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? *Journal of Chemical Ecology* 35:980-996.

Conley TR, Peng HP, Mingh CS. 1999. Mutations affecting induction of glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 119:599-608.

Correia NM, Centurion MAPC, Alves PLCA. 2005. Influência de extratos aquosos de sorgo sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de soja. *Ciência Rural* 35:498-503.

Costa ASV, Pessanha GG, Duque FF. 1996. Efeito dos extratos de quatro leguminosas, utilizadas como adubo verde, sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres* 43:792-807.

Coutinho MP, Carneiro JGA, Barroso DG, Rodrigues LA, Siqueira J. 2006. Substratos de cava de extração de argila enriquecidos com subprodutos agroindustriais e urbanos para produção de mudas de sesbânia. *Revista Árvore* 30:147-153.

Croll D, Wille L, Gamper HA, Mathimaran N, Lammers PJ, Corradi N, Sanders IR. 2008. Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 178:672-687.

Dietrich SMC, Figueiredo Ribeiro RCL. 1986. Carboidratos de reserva em plantas superiores e sua importância para o homem. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 61:65-71.

Diop TA. 2003. *In vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi: advances and future prospects. *African Journal of Biotechnology* 2:692-697.

Dirk LMA, van der Krol AR, Vreugdenhil D, Hilhorst HWM, Bewley JD. 1999. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:41-50.

Dotzler N, Krings M, Taylor TN, Agerer R. 2006. Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota: Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert. *Mycological Progress* 5:178-184.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.

Edwards M, Scott C, Gidley MJ, Reid JSG. 1992. Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. *Planta* 187:67-74.

El Id VL, Costa BV, Mignoni DSB, Veronesi MB, Simões K, Braga MR, Santos Junior NA. Phytotoxic effect of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. on seeds of agronomic and forestry species. *Journal of Forestry Research*. No prelo 2014.

Ellouze W, Hamel C, Cruz AF, Ishii T, Gan Y, Bouzid S, St-Arnaud M. 2012. Phytochemicals and spore germination: At the root of AMF host preference? *Applied Soil Ecology* 60:98-104.

Evelin H, Kapoor R, Giri B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* 104:1263-1280.

Ferreira DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039-1042.

Ferreira AG, Áquila MEA. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12:175-204.

Ferreira AG, Borghetti F. 2004. Germinação: do básico ao aplicado. *Artmed*, Porto Alegre, 323p.

Feurtado JA, Banik M, Bewley JD. 2001. The cloning and characterization of α -galactosidase present during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed. *Journal of Experimental Botany* 52:1239-1249.

Filardi FLR, Garcia FCP, Carvalho-Okano RM. 2007. Espécies lenhosas de Papilionoideae (Leguminosae) na estação ambiental de Volta Grande, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 58:363-378.

Florentino LA, Moreira FMS. 2009. Symbiotic and phenotypic characteristics of *Azorhizobium doebereinae*, microsymbiont of *Sesbania virgata*. *Revista Árvore* 33:215-226.

Florentino LA, Guimarães AP, Rufini M, Silva K, Moreira FMS. 2009. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Scientia Agricola* 66:667-676.

Franken P, Kuhn G, Gianinazzi-Pearson V. 2002. Development and molecular biology of arbuscular mycorrhizal fungi. *In* *Molecular Biology of Fungal Development* (HD Osiewacs, ed.). CRC Press, New York, p. 325-348.

Fujii Y, Parvez SS, Parvez MM, Ohmae Y, Iida O. 2003. Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biology and*

Management 3:233-241.

Fujimoto Z, Kaneko S, Momma M, Kobayashi H, Mizuno H. 2003. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with D-galactose. *Journal of Biological Chemistry* 278:20313-20318.

Garg N, Chandel S. 2010. Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30:581-599.

Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244.

Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519-530.

Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7:243-255.

Giovannetti, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. *In Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* (Y Kapulnik, DD Douds, eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 47-68.

Giovannetti M, Gianinazzi-Pearson V. 1994. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 98:705-715.

Giovannetti M, Avio L, Sbrana C. 2010. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth – physiological and genetic aspects. *In Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* (H Koltai, Y Kapulnik, eds.). Springer, Dordrecht, p. 3-32.

Góes SP, Ribeiro MLL. 2002. α -galactosidade: aspectos gerais e sua aplicação em produtos a base de soja. *Semina: Ciências Agrárias* 23:111-119.

Goetze M, Thomé GCH. 2004. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* e *Eucalyptus grandis* sobre a germinação de três espécies de hortaliças. *Revista Brasileira de Agrociência* 10:43-50.

Goto BT, Maia LC. 2006. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. *Mycotaxon* 96:129-132.

- Gulzar A, Siddiqui MB. 2014. Allelopathic effect of aqueous extracts of different part of *Eclipta alba* (L.) Hassk. on some crop and weed plants. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development* 6:55-60.
- Harrison MJ. 2005. Signalling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59:19-42.
- He D, Han C, Yao J, Shen S, Yang P. 2011. Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics* 11:2693-2713.
- Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90:371-384.
- Inderjit, Weston LA. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? *Journal Chemical Ecology* 26:2111-2118.
- Inderjit, Duke SO. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217:529-539.
- Inderjit, Streibig JC, Olofsdotter M. 2002. Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research. *Physiologia Plantarum* 114:422-428.
- Inderjit, Pollock JL, Callaway RM, Holben W. 2008. Phytotoxic effects of (\pm)-catechin *in vitro*, in soil, and in the field. *PLOS One* 3:e2536.
- Inderjit, Kaur R, Kaur S, Callaway RM. 2009. Impact of (\pm)-catechin on soil microbial communities. *Communicative & Integrative Biology* 2:127-129.
- Inderjit, Wardle DA, Karban R, Callaway RM. 2011. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in Ecology and Evolution* 26:655-662.
- Inoue MH, Santana DC, Souza Filho APS, Possamai ACS, Silva LE, Pereira MJB, Pereira KM. 2010. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. *Planta Daninha* 28:489-498.
- Ishii T, Narutaki A, Sawada K, Aikawa J, Matsumoto I, Kadoya K. 1997. Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügge) roots. *Plant and Soil* 196:301-304.
- Jenkins WR. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report* 48:692.

- Kamal J. 2011. Impact of allelopathy of sunflower (*Helianthus annuus* L.) roots extract on physiology of wheat (*triticum aestivum* L.). African Journal of Biotechnology 65:14465-14477.
- Kato-Noguchi H, Macías FA. 2008. Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and α -amylase activity in lettuce seeds. Journal Plant Physiology 162:1304-1307.
- Kato-Noguchi H, Macías FA, Molinillo JM. 2010. Structure-activity relationship of benzoxazinones and related compounds with respect to the growth inhibition and alpha-amylase activity in cress seedlings. Journal of Plant Physiology 167:1221-1225.
- Kaur H, Kaur R, Kaur S, Baldiwin IT, Inderjit. 2009. Taking ecological function seriously; soil microbial community can obviate allelopathic effects of released metabolites. PLOS One 4:e4700.
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuysen P, Jansa J, Bücking H. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. Science 333:880-882.
- Kiriachek SG, Azevedo LCB, Peres LEP, Lambais MR. 2009. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. Revista Brasileira de Ciência do Solo 33:1-16.
- Kirk JL, Moutoglis P, Klironomos J, Lee H, Trevors JT. 2005. Toxicity of diesel fuel to germination growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. Plant and Soil 270:23-30.
- Kissmann KG, Groth D. 1999. Plantas infestantes e nocivas. BASF, São Bernardo do Campo, 978p.
- Kontos F, Spyropoulos CG. 1996. Seed coat inhibits the production of α -galactosidase and endo- β -mannanase in the endosperm of developing carob seed. Plant Physiology and Biochemistry 34:787-793.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seeds dormancy release and germination. Seed Science Research 15:281-307.
- Lahuta L, Gorecki RJ, Michalczyk D, Piotrowicz-cieslak ALC. 2000. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. Electronic Journal Polish

Agricultural Universities 3:1-10.

Lankau RA. 2012. Coevolution between invasive and native plants driven by chemical competition and soil biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:11240-11245.

Lara-Núñez A, Romero-Romero T, Ventura JL, Blancas V, Anaya AL, Cruz-Ortega R. 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant, Cell and Environment* 29:2009-2016.

Lara-Núñez A, Sánchez-Nieto S, Anaya AL, Cruz-Ortega R. 2009. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 136:180-192.

Lorenzo P, González L. 2010. Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Ecosistemas* 19:79-91.

Macías FA, Varela RM, Torres A, Oliva RM, Molinillo JMG. 1998. Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. *Phytochemistry* 48:631-636.

Magalhães RS, Borges LEE, Berger APA. 2010. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake durante a germinação. *Ciência Florestal* 4:589-595.

Maguire JD. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.

Maia LC, AM Yano-Melo. 2001. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspor albida* in different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:281-285.

Maia LC, FSB Silva, BT Goto. 2010. Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomerosporos. In *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil* (JO Siqueira, FA Souza, EJBN Cardoso, SM Tsai, eds.). Editora UFLA, Lavras, p. 75-118.

Malty JS, Siqueira JO, Moreira FMS. 2006. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbióticos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:285-291.

Maraschin-Silva F, Áquila MEA. 2006. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botanica*

Brasilica 20:61-69.

Meier CL, Bowman WD. 2008. Phenolic-rich leaf carbon fractions differentially influence microbial respiration and plant growth. *Oecologia* 158:95-107.

Mendonça RL. 2008. Determinação de aleloquímicos por HPLC/UV-Vis em extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformes* e estudo da atividade alelopática. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP.

Miller DA. 1996. Allelopathy in forage crop systems. *Agronomy Journal* 88:854-859.

Mo B, Bewley JD. 2003. The relationship between β -mannosidase and endo- β -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds. *Journal of Experimental Botany* 54:2503-2510.

Molle FRD, Tiné MAS. 2009. Catabolismo de sacarose durante a mobilização do galactomanano e sua importância na estratégia de sobrevivência de plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Hoehnea* 36:259-268.

Monteiro JM, Albuquerque UP, Lins Neto EMF, Araújo EL, Albuquerque MM, Amorim ELC. 2006. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:338-344.

Moreira FMS, Siqueira JO. 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Editora UFLA, Lavras, p. 543-661.

Mourão Júnior M, Souza Filho APS. 2010. Diferenças no padrão da atividade alelopática em espécies da família Leguminosae. *Planta Daninha* 28:939-951.

Mulatu W, Gezahegn B, Solomon T. 2011. Allelopathic effects of an invasive alien weed *Parthenium hysterophorus* L. compost on lettuce germination and growth. *African Journal of Agricultural Research* 4:1325-1330.

Mummey DL, Rillig MC. 2006. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant Soil* 288:81-90.

Muscolo A, Panuccio MR, Sidari M. 2001. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination. Respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. *Plant Growth Regulation* 35:31-35.

- Nagahashi G, Douds Jr DD. 2000. Partial separation of root exudates components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycological Research* 104:1453-1464.
- Nair MG, Safir GR, Siqueira JO. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology* 57:434-439.
- Ndakidemi PA, Dakora FD. 2003. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. *Functional Plant Biology* 30:729-745.
- Nelson EB. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42:271-309.
- Neves LAS, Moraes DM, Lopes NF, Abreu CM. 2007. Vigor de sementes e atividade bioquímica em plântulas de arroz submetidas a ácidos orgânicos. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* 13:79-88.
- Newman EI. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* 3:139.
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD. 2010. Germination – Still a mystery. *Plant Science* 179:574-581.
- Nuutila AM, Vestberg M, Kauppinen V. 1995. Infection of hairy roots strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Reports* 14:505-509.
- Oba H, Tawaraya K, Wagatsuma T. 2002. Inhibition of pre-symbiotic hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by root exudates of *Lupinus* spp.. *Soil Science and Plant Nutrition* 48:117-120.
- Olofsdotter M, Watson A, Pigginn C. 1999. Allelopathy in rice. *International Rice Research Institute*, p. 27-37.
- Padhy B, Patnaik PK, Tripathy AK. 2000. Allelopathic potential of *Eucalyptus* leaf litter leachates on germination of seed ling growth of finger millet. *Allelopathy Journal* 7:69-78.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis. *Nature Reviews Microbiology* 6:763-773.

- Pellissier F. 2013. Improved germination bioassays for allelopathy research. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:23-30.
- Perry LG, Thelen GC, Ridenour WM, Callaway RM, Paschke MW, Vivanco JM. 2007. Concentrations of the allelochemical (\pm)-catechin in *Centaurea maculosa* soils. *Journal of Chemical Ecology* 33:337-344.
- Phillips DA. 1992. Flavonoids: plant signal to soil microbes. Recent advances. *Phytochemistry* 26:201-231.
- Pires NM, Oliveira VR. 2011. Alelopatia. In *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas* (RS Oliveira Jr, J Constantin, MH Inoue, eds.). Omnipax, Curitiba, p. 95-123.
- Pollock JL, Callaway RM, Thelen GC, Holben WE. 2009. Catechin-metal interactions as a mechanism for conditional allelopathy by the invasive plant *Centaurea maculosa*. *Journal of Ecology* 97:1234-1242.
- Potomati A, Buckeridge MS. 2002. Effect of abscisic acid on the mobilization of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25:303-310.
- Pott A, Pott VJ. 1994. *Plantas do Pantanal*. EMBRAPA/CPAP/SPI, Corumbá, 320p.
- Powell RG, Plantiner RD, Suffenss M. 1990. Occurrence of sesbanimide in seed of toxic *Sesbania* species. *Weed Science* 38:148-152.
- Praxedes PG, Zerlin JK, Dias LO, Pessoni RAB. 2011. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Brazilian Journal of Biology* 71:687-692.
- Redeker D, Kodner R, Graham L. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920-1921.
- Reid JSG, Meier H. 1973. Enzymic activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidase and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112:301-308.
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68:33-40.

- Ribeiro JPN, Matsumoto RS, Takao LK, Voltarelli VM, Lima MIS. 2009. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. *Revista Brasileira de Botânica* 32:183-188.
- Rice EL. 1984. *Allelopathy*. Academic Press, London, 422p.
- Rillig MC. 2004. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters* 7:740-754.
- Ritchie S, Gilroy S. 1998. Gibberellins: regulating genes and germination. *New Phytologist* 140:363-383.
- Rojas-Andrade R, Cerda-García-Rojas CM, Frías-Hernández JT, Dendooven L, Olalde-Portugal V, Ramos-Valdivia AC. 2003. Changes in the concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscular mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. *Mycorrhiza* 13:49-52.
- Romero AGF, Siqueira JO. 1996. Atividade de flavonóides sobre esporos do fungo micorrízico *Gigaspora gigantea* *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31:517-522.
- Rudrappa T, Choi YS, Levia DF, Legates DR, Lee KH, Bais HP. 2009. *Phragmites australis* root secreted phytotoxin undergoes photo-degradation to execute severe phytotoxicity. *Plant Signaling and Behavior* 4:506-513.
- Saggin Júnior OJ, Silva EMR. 2005. Micorriza arbuscular – papel, funcionamento e aplicação da simbiose. *In* *Processos biológicos do sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável* (AM Aquino, RL Assis, eds.). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 101-149.
- Sampietro DA. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. Disponível em:
<<http://www.ual.es/personal/edana/bot/mh/complemento/docufijos/revalelo.htm>>. Acesso em: 16 out. 2010.
- Sannazzaro AI, Álvarez CL, Menéndez AB, Pieckenstain FL, Albertó EO, Ruiz OA. 2004. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters* 230:115-121.
- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. 2005. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of

Gigaspora and *Glomus*. Mycological Research 109:789-794.

Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Bompadre MJ, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. 2006. Glycosidation of apigenin results in a loss of its activity on different growth parameters of arbuscular mycorrhizal fungi from the genus *Glomus* and *Gigaspora*. Soil Biology and Biochemistry 38:2919-2922.

Scervino JM, Sampedro I, Ponce MA, Rodríguez MA, Ocampo JA, Godeas A. 2008. Rhodotorulic acid enhances root colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi due to its stimulatory effect on the pre-symbiotic stages of the AM fungi. Soil Biology and Biochemistry 40:2474-2476.

Scervino JM, Ponce MA, Monica ID, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A. 2009a. Development of arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of different patterns of *Trifolium repens* shoot flavonoids. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 9:102-115.

Scervino JM, Gottlieb A, Silvani VA, Pégola M, Fernández L, Godeas AM. 2009b. Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. Soil Biology and Biochemistry 41:1753-1756.

Schiavo JA, Martins MA, Rodrigues LA. 2009. Avaliação nutricional de mudas de *Acacia mangium*, *Sesbania virgata* e *Eucalyptus camaldulensis* inoculadas com fungos micorrízicos, em casa de vegetação e em cava de extração de argila. Acta Scientiarum. Agronomy 31:701-707.

Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Research 105:1413-1421.

Selosse M, Rousset F. 2011. The Plant-Fungal Marketplace. Science 333:828-829.

Shimon-Kerner N, Mills D, Merchuk JC. 2000. Sugar utilization and invertase activity in hairy-root and cell-suspension cultures of *Symphytum officinale*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62:89-94.

Silva FAS. 2008. Sistema de Assistência Estatística – ASSISTAT versão 7.6 beta (em linha). Departamento de Engenharia Agrícola/DEAG, CTRN, Universidade Federal de Campina Grande/UFCG, Paraíba, Brasil, Campina Grande. Disponível em <http://www.assistat.com/>.

- Silva FSB. 2006. Fase assimbiótica, produção, infectividade e efetividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em substratos com adubos orgânicos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.
- Silva EAA, Toorop PE, Van Elst AC, Hilhorst HWM. 2004. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L., cv. Rubi) seed germination. *Planta* 220:251-261.
- Silva RN, Duarte GL, Lopes NF, Moraes DM, Pereira AL. 2008. Composição química de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a estresse salino na germinação. *Revista Brasileira de Sementes* 30:215-220.
- Silva PEM, Santiago EF, Daloso DM, Silva EM, Silva JO. 2011. Quebra de dormência em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Idesia* 29:39-45.
- Simões K. 2008. Substâncias fitotóxicas e antifúngicas em sementes de leguminosas que acumulam galactomanano e xiloglucano como carboidratos de reserva de parede celular. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Simões K, Du J, Kretzschmar FS, Broeckling CD, Stermitz FS, Vivanco JM, Braga MR. 2008. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. *Journal of Chemical Ecology* 34:681-687.
- Simões MS, Madail RH, Barbosa S, Nogueira ML. 2013. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. *Biotemas* 26:29-36.
- Singh A, Singh D, Singh NB. 2009. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv.. *Plant Growth Regulation* 58:163-171.
- Siqueira JO, Sylvia DM, Gibson J, Hubbel DH. 1985. Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 31:965-972.
- Siqueira JO, Safir GR, Nair MG. 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist* 118:87-93.
- Siqueira JO, Lambais MR, Stürmer SL. 2002. Fungos micorrízicos arbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. *Biociência* 12:12-21.
- Sisodia S, Siddiqui MB. 2010. Allelopathic effect by aqueous extracts of different parts of *Croton bonplandianum* Baill. on some crop and weed plants. *Journal of Agricultural*

Extension and Rural Development 2:22-28.

Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge. 787 p.

Soares GLG, Scalon VR, Pereira TO, Vieira DA. 2002. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de algumas leguminosas arbóreas brasileiras. Floresta e Ambiente 9:119-125.

Soares ACF, Martins MA, Mathias L, Freitas MSM. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings. Scientia Agricola 62:331-336.

Somogyi M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry 160:61-68.

Sousa CS, Menezes RSC, Sampaio EVSB, Lima FS. 2012. Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos. Semina: Ciências Agrárias 33:3033-3044.

Souza FA, Declerck S. 2003. Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. Mycologia 95:1004-1012.

Souza FA, Stürmer SL, Carrenho R, Trufem SFB. 2010a. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil (JO Siqueira, FA Souza, EJBN Cardoso, SM Tsai, eds.). Editora UFLA, Lavras, p. 15-73.

Souza CV, Agra MFP, Andrade AL, Oliveira GI, Oliveira SL. 2010b. Germinação de sementes da invasora *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sob efeito de luz, temperatura e superação de dormência. Ciências Agrárias 4:889-894.

Souza Filho APS. 2002. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcóolicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Planta Daninha 20:357-364.

Souza Filho APS, Guilhon GMSP, Santos LS. 2010. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – revisão crítica. Planta Daninha 28:689-697.

Souza Filho APS, Trezzi MM, Inoue MH. 2011. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. Planta Daninha 29:709-716.

Sturm A. 1999. Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development

and Sucrose Partitioning. *Plant Physiology* 121:1-7.

Sturm A, Tang G. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in plant science* 4:401-407.

Suda CNK, Giorgini JF. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12:226-245.

Tahat MM, Sijam K, Othman R. 2010. The role of tomato and corn root exudates on *Glomus mosseae* spores germination and *Ralstonia solanacearum* growth in vitro. *International Journal of Plant Pathology* 1:1-12.

Taiz L, Zeiger E. 2009. *Fisiologia Vegetal*. Artmed, Porto Alegre, 848p.

Takaki M, Dietrich SMC. 1980. Effect of GA3 and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. *Journal of Experimental Botany* 31:1643-1649.

Tawaraya K, Watanabe S, Yoshida E, Wagatsuma T. 1996. Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 6:57-59.

Teasdale JR, Rice CP, Cai G, Mangum RW. 2012. Expression of allelopathy in the soil environment: soil concentration and activity of benzoxazinoid compounds released by rye cover crop residue. *Plant Ecology* 213:1893-1905.

Tommerup IC. 1984. Effect of soil water potential on spore germination by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 83:193-202.

Tonini PP, Purgato E, Buckeridge SM. 2010. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). *Annals of Botany* 4:607-616.

Tsai SM, Phillips DA. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology* 57:1485-1488.

van Staden J, Grobbelaar N. 1995. The effect of sesbanimide and *Sesbania* seed extracts on germination and seedling growth of a number of plant species. *Environmental and Experimental Botany* 35:321-329.

Veronesi MB. 2013. Avaliação da tolerância de duas espécies nativas às fitotoxinas exsudadas por *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.. Dissertação de Mestrado, Instituto de

Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo-SP.

Villagrasa M, Guillamón M, Labandeira A, Taberner A, Eljarrat E, Barceló AD. 2006. Benzoxazinoid allelochemicals in wheat: distribution among foliage, roots, and seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1009-1015.

Vyvyan RJ. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58:1631-1646.

Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132:44-51.

Weir TL, Park S-W, Vivanco JM. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7:472-479.

Willis A, Rodrigues BF, Harris PJC. 2013. The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Science* 32:1-20.

Xuan TD, Tsuzuki E. 2002. Varietal differences in allelopathic potential of alfalfa. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188:2-7.

Zhu X, Zhang J, Ma K. 2011. Soil biota reduce allelopathic effects of the invasive *Eupatorium adenophorum*. *PLOS One* 6:e25393.