

Daiane Salete Broch Mignoni

Potencial fitotóxico de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo

2015

Daiane Salete Broch Mignoni

Potencial fitotóxico de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

Orientadora: Prof^a Dr^a MARCIA REGINA BRAGA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Mignoni, Daiane Salete Broch

M636p Potencial fitotóxico de sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit / Daiane Salete Broch Mignoni -- São Paulo, 2015.
89 p. il.

Tese (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015
Bibliografia.

1. Alelopatia. 2. Carboidrato. 3. Catequina. I. Título

CDU: 581.524.13

*“Eu não posso mudar a direção do vento, mas eu posso ajustar
as minhas velas para sempre alcançar meu destino”*

Jimmy Dean

DEDICO

À Deus, por que “tudo posso naquele que me fortalece”

Ao meu marido Jailton

Agradecimentos

E ao término deste trabalho quero agradecer aos que contribuíram para que eu conseguisse concluir com êxito mais esta etapa importante da minha vida.

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos, por me renovar, fortalecer a cada dia e me guiar nos caminhos do bem.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Dra. Marcia Regina Braga, pela oportunidade, orientação, compreensão e, principalmente, pela confiança depositada em mim ao longo desses anos. Muito Obrigada.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Patrícia Pinho Tonini, Dra. Maria Tereza Grombone-Guaratini e Dr. Marco Aurelio Tiné, pelas sugestões de melhoria apresentadas.

À pesquisadora Dra. Luce Maria Brandão Torres do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica por toda a ajuda prestada e por sanar várias dúvidas.

Ao Dr. Luciano Freschi do Departamento de Botânica da USP (Universidade de São Paulo) pela colaboração nas análises de extração e quantificação de ABA.

À funcionária Ana Alice, por toda ajuda e apoio.

À técnica de laboratório, Mary Monteiro, por toda a ajuda, apoio, pelos conselhos de “mãe” e por todo seu carinho. Obrigada.

Ao técnico de laboratório, Pedro Bige Wasinger, por toda a ajuda e atenção. Obrigada.

À minha família, meus pais, Claudio e Iraci e minhas irmãs, Juliane e Marta pelo carinho, apoio e incentivo.

Aos meus sogros e cunhada Jucilene Mignoni por todo apoio e carinho.

Ao meu esposo Jailton, em especial, por todo amor, paciência, companheirismo e incentivo ao longo desses anos. Muitas das minhas conquistas são frutos de sua ajuda e por acreditar em mim. Muito Obrigada. Amo Você!

À minha gatinha de estimação “Lara” pela companhia diária e distração que me proporciona.

À minha querida amiga Fernanda Zaninette por todo carinho, pelos abraços de apoio, por me ouvir, pelas conversas quando nas horas de dificuldades e também por compartilhar muitos momentos de alegria durante todos esses anos de convivência. Espero que nossa amizade perpetue. Te Adoro!

Às minhas queridas amigas, Juliana Zerlin (Xú), Emanuela Oliveira Joaquim (Manu), Kássia Mantovani Fardin (kassinha), Cynthia Murakami, Leila Milena Díaz Camacho, Fernanda Casseiro, Michele Silva (Mi) e a Profa. Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho pelos almoços divertidos, regados à salada de frutas, pelos vários momentos de alegrias, pelas palavras e abraços de apoio. Com vocês, meus dias sempre foram alegres, divertidos e de aprendizado. Obrigada “meninas” por tudo.

Aos doutorandos Rodrigo Cabral e Evandro Vieira por toda ajuda, apoio, pela amizade e conversas científicas.

Aos queridos amigos e pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica que me ajudaram direta ou indiretamente, pelo carinho, amizade e companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Instituto de Botânica e ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pela infraestrutura oferecida para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Central Analítica da USP pelas análises feitas para a identificação da mimosina.

Enfim, a todos aqueles que me apoiaram e incentivaram, meu Muito Obrigada.

Resumo

Sesbania virgata (Cav.) Pers. (sesbania) e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena) são duas leguminosas, pioneiras, utilizadas por décadas na restauração de áreas degradadas. *Sesbania*, nativa da América do Sul, é de crescimento rápido e apresenta comportamento invasor em várias regiões. O flavonóide (+)-catequina é a principal fitotoxina encontrada nos exsudatos de suas sementes. Estudos prévios indicaram que ácido abscísico (ABA) está presente nas sementes de *Sesbania*, entretanto, sua liberação ainda era desconhecida. Os exsudatos de *Sesbania* são capazes de inibir a germinação e o crescimento inicial de espécies cultivadas. Eles também atrasaram a mobilização dos carboidratos de reserva em sementes de espécies nativas tropicais. Entretanto, a atividade inibidora de seus exsudatos ainda não havia sido avaliada sobre espécies exóticas. *Leucena*, espécie exótica, nativa do Sul do México e do Norte da América Central, produz grande quantidade de sementes e é considerada espécie invasora no Brasil. O objetivo deste trabalho foi estudar a exsudação de substâncias bioativas das sementes de *leucena* e seus efeitos em espécies cultivadas, e, avaliar a sensibilidade de *leucena* às fitotoxinas exsudadas de sementes de *Sesbania*. Os resultados mostraram que sementes de *leucena* exsudam durante a embebição, açúcares, ABA, mimosina e compostos fenólicos, estes últimos, encontrados em maiores proporções. Seus exsudatos afetaram o crescimento inicial de tomate e arroz. Mimosina comercial inibiu o desenvolvimento das espécies-alvo, sugerindo ser a substância responsável pelo efeito alelopático dos seus exsudatos. Ao analisar a co-germinação de *Sesbania* com *leucena* foi observado atraso na germinação das sementes e inibição no desenvolvimento inicial da espécie exótica. ABA é exsudado pelas sementes de *Sesbania* até o 3º dia após a embebição, porém, este hormônio e (+)-catequina isolados não causaram os mesmos efeitos da co-germinação sobre *leucena*, indicando que outras substâncias presentes nos exsudatos de *Sesbania* são responsáveis pela ação observada. Fitotoxinas exsudadas de sementes de *Sesbania* atrasaram a mobilização dos carboidratos de reserva das sementes de *leucena*, reduzindo a atividade da endo- β -mananase. Os resultados obtidos mostraram que exsudatos de sementes de *leucena* causaram efeito alelopático sobre espécies cultivadas e a mimosina isolada mostrou ser um potente aleloquímico. Por outro lado, *leucena* foi sensível as fitotoxinas das sementes de *Sesbania*, entretanto, os efeitos parecem não ser somente devido à presença de catequina e o ABA.

Palavras-Chave: Alelopatia, ácido abscísico, carboidrato de reserva, (+)-catechin

Abstract

Sesbania virgata (Cav.) Pers. (*Sesbania*) and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (*leucena*) are two legume species, pioneers, utilized for decades in restoration of degraded areas. *Sesbania* is native to South America, described as invasive in several regions. The flavonoid (+)-catechin is the main phytotoxin found in its seed exudates. Previous studies demonstrated that abscisic acid (ABA) is present in *Sesbania* seeds, however, whether it is exudate is still unknown. The seed exudates of *Sesbania* are able to inhibit the germination and development of crop species. They also delay the mobilization of storage carbohydrates in tropical native species. However, the inhibitory activity of their exudates has not been evaluated on exotic species. *Leucena*, is an exotic species, native to Southern Mexico and Northern Central America. It produces many seeds and is considered as an invasive species in Brazil. The aim of this work was to study the exudation of bioactive substances from *leucena* seeds and their effects on crop species, together with evaluating the sensitivity of *leucena* to phytotoxins exuded from *Sesbania* seeds. The results showed that *leucena* seeds exude at the beginning of imbibition process, sugars, ABA, mimosine and phenolic compounds, the latter found in higher proportions. Exudates of *leucena* seeds affected the initial growth of tomato and rice. Commercial mimosine inhibited the development of the crop species, suggesting that this substance could be responsible for allelopathic effect of *leucena* exudates. The co-germination of *Sesbania* with *leucena* caused delay in the germination and inhibition the seedling growth in *leucena*. ABA is exuded by *Sesbania* seeds until the third day imbibition, however, this hormone and (+)-catechin did not cause the same effects observed by the co-germination of *leucena* with *Sesbania*, suggesting that other substances present in *Sesbania* exudates could be responsible for these effects. Phytotoxins from *Sesbania* seed delayed the mobilization of storage carbohydrates of *leucena* seeds and reduced the activity of endo- β -mannanase. The results showed that exudates from *leucena* seeds caused allelopathic effect on crop species and mimosine proved to be a potent allelochemical found in the seed exudate of this species. On the other hand, *leucena* was sensitive to the phytotoxins exuded by *Sesbania* seeds, however, the inhibitory effects could not be solely attributed to the presence of catechin and ABA in the exudates.

Key-words: Allelopathy, abscisic acid, storage carbohydrates, (+)-catechin

Sumário

Introdução.....	1
1 Alelopatia.....	1
2 Alelopatia x espécies invasoras.....	3
3 Aleloquímicos liberados por sementes	4
4 <i>Sesbania virgata</i>	5
5 <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	8
6 <i>Sesbania virgata</i> x <i>Leucaena leucocephala</i>	9
Objetivos.....	11
Parte 1. Efeito dos exsudatos de sementes de <i>L. leucocephala</i> e de mimosina comercial sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial das plântulas de tomate e arroz	12
1 Metodologia.....	12
1.1 Material biológico.....	12
1.2 Obtenção dos exsudatos de sementes de leucena	12
1.3 Quantificação de compostos nos exsudatos de sementes leucena	12
1.4 Quantificação e identificação da mimosina nos exsudatos de leucena.....	13
1.5 Quantificação de ácido abscísico (ABA) nos exsudatos de leucena.....	13
1.6 Extração e análise de carboidratos solúveis presentes nos exsudatos de sementes leucena.....	14
1.7 Análise qualitativa dos carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)	15
1.8 Bioensaios com exsudatos de sementes de leucena	15
1.9 Delineamento experimental e Análise Estatística.....	16
2 Resultados.....	17
2.1 Compostos exsudatos pelas sementes de leucena	17
2.2 Efeito dos exsudatos de sementes de leucena na germinação e crescimento inicial de tomate e arroz	20
3 Discussão.....	23
Parte 2. Efeitos da co-germinação de sementes de <i>S. virgata</i> sobre a germinação e mobilização dos carboidratos de reserva de sementes de leucena.....	29
4 Metodologia.....	29
4.1 Material Biológico.....	29
4.2 Curva de co-germinação com número crescente de sementes de sesbania.....	29
4.3 Análises dos carboidratos	30

4.3.1	<i>Extração e análise quantitativa de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD).....</i>	30
4.3.2	<i>Extração e quantificação de amido</i>	30
4.3.3	<i>Extração de galactomanano do endosperma de leucena.....</i>	30
4.3.4	<i>Hidrólise ácida e composição do galactomanano.....</i>	31
4.4	<i>Ensaio enzimáticos.....</i>	31
4.4.1	<i>Extração e quantificação das atividades de α-galactosidase e β- manosidase</i>	31
4.4.2	<i>Extração e quantificação da atividade endo-1,4-β-mananase.....</i>	32
4.4.3	<i>Quantificação de proteínas</i>	33
5	<i>Resultados.....</i>	34
5.1	<i>Efeito da co-germinação de sesbania sobre a germinação, crescimento inicial e mobilização dos carboidratos de reserva de leucena</i>	34
5.2	<i>Mobilização do galactomanano e atividade de enzimas relacionadas ao processo de degradação do galactomanano no endosperma de leucena co-germinadas com duas sementes de sesbania.....</i>	40
5.2.1	<i>Análises no endosperma.....</i>	40
6	<i>Discussão.....</i>	45
	<i>Parte 3: Efeitos dos exsudatos de sementes de S. virgata, da catequina comercial e do ácido abscísico (ABA) na germinação e crescimento inicial das sementes e plântulas de L. leucocephala</i>	53
7	<i>Metodologia.....</i>	53
7.1	<i>Material Biológico.....</i>	53
7.2	<i>Ensaio de germinação das sementes de leucena com catequina comercial e exsudatos de sementes de sesbania</i>	53
7.3	<i>Quantificação de ABA nos exsudatos de sementes de sesbania.....</i>	53
7.4	<i>Ensaio com inibidor da síntese de ABA.....</i>	54
8	<i>Resultados.....</i>	55
8.1	<i>Efeito dos exsudatos brutos de sementes de sesbania e de substâncias isoladas sobre a germinação e crescimento inicial de leucena.....</i>	55
9	<i>Discussão.....</i>	61
	<i>Considerações Finais: Como os dados obtidos no presente estudo suportam a teoria da resistência de espécies nativas frente à invasão de espécies exóticas</i>	65
	<i>Conclusão</i>	67
	<i>Bibliográficas.....</i>	68

Introdução

1 Alelopatia

A alelopatia é um fenômeno que consiste na liberação de compostos químicos por uma planta no ambiente e que podem influenciar o crescimento e o estabelecimento de espécies vizinhas (incluindo microorganismos), em ecossistemas naturais e manejados (Rice 1984; Teasdale *et al.* 2012). Tais compostos, denominados fitotoxinas ou aleloquímicos vegetais, em sua maioria derivam do metabolismo secundário das plantas e podem ser liberados no ambiente por meio de lixiviação, exsudação de raiz, volatilização, decomposição dos resíduos vegetais ou ainda por difusatos de sementes (Figura 1) (Perry *et al.* 2007; Albuquerque *et al.* 2010). Interações mediadas quimicamente já foram descritas em florestas, no ambiente aquático e em ecossistemas agrícolas. A alelopatia vem ganhando espaço cada vez maior no âmbito ecológico, contribuindo também para explicar o potencial de invasão de plantas exóticas e seus efeitos na flora natural (Erhard & Gross 2006; Belz 2007; Pelissier 2013).

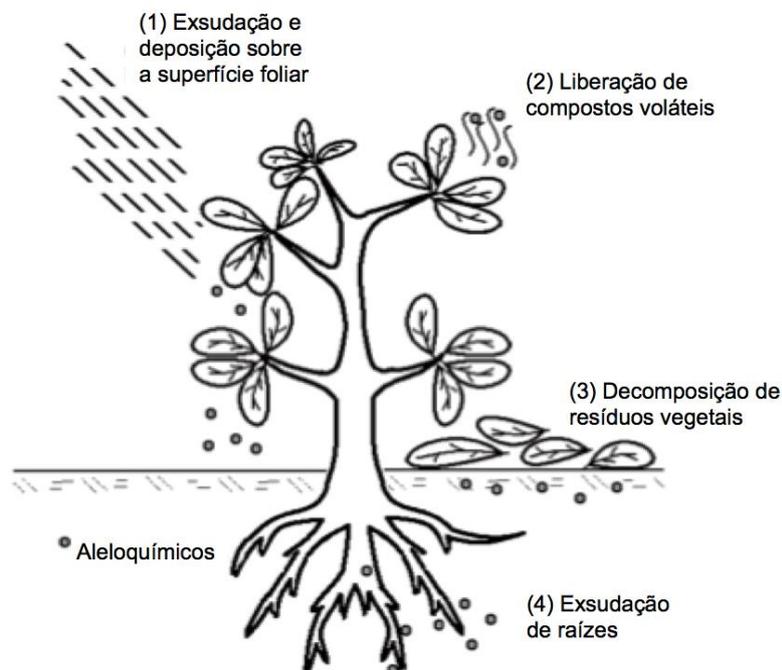


Figura 1: Possíveis vias de liberação dos aleloquímicos das plantas no ambiente (Adaptado de Albuquerque *et al.* 2010)

Os aleloquímicos são diferentes em estrutura química, variam em concentração e localização nos tecidos vegetais entre as espécies e sua ação depende desta e das mudanças tanto bióticas quanto abióticas do ambiente (Weir *et al.* 2004). Os efeitos dos aleloquímicos podem ser estimulatórios ou inibitórios e essas substâncias podem interferir em vários processos como na germinação de sementes, atividade fotossintética, expressão gênica, captação de íons, balanço hídrico e, ainda, nos mecanismos hormonais de indução de crescimento das plantas. Além disso, os efeitos dependem da espécie doadora e alvo, bem como das substâncias envolvidas (Rice 1984; Reigosa *et al.* 1999; Perry *et al.* 2007; Teasdale *et al.* 2012).

Centenas de aleloquímicos derivados de vegetais já foram identificados, mas a resistência ou tolerância a eles é uma característica espécie-específica e os efeitos variam. Juglona, por exemplo, é uma fitotoxina presente em *Juglans nigra* e em outras espécies de *Juglans*, com atividades antibacteriana, fungicida, antiparasitária e inseticida. Tem efeito inibitório no desenvolvimento larval de insetos e é tóxica para peixes e animais (Higa *et al.* 1998; Lee & Lee 2008; Babula *et al.* 2009). Além disso, a juglona é capaz de inibir o crescimento de plantas cultivadas como *Zea mays* L. (milho) e *Glycine max* L. Merr (soja), bem como de *Arabidopsis thaliana* e *Sinapis arvensis* L (mostarda), afetando o crescimento da raiz e reduzindo a taxa fotossintética, a condutância estomática e a respiração (Chi *et al.* 2011).

O aleloquímico BOA (2-benzoxazolinone), um metabólito secundário presente em diversas culturas de gramíneas, apresenta forte atividade contra bactérias, fungos e insetos, além disso, atua como um dos principais produtos químicos de defesa para os cereais (Friebe 2001). Baixa concentração de BOA (1 μ M) inibiu totalmente a germinação das sementes de *Lolium perenne* (Hussain *et al.* 2008). Em *Phaseolus aureus*, o aleloquímico, além de afetar o crescimento, reduziu o conteúdo de proteínas e carboidratos nas suas folhas e raízes (Batish *et al.* 2006).

Outro exemplo de aleloquímicos é o dos cineoles, moléculas voláteis encontradas como componentes de óleos essenciais de diversas plantas aromáticas como: *Eucalyptus* spp., *Laurus nobilis* L., *Salvia* spp., *Xanthoxylum rhetsa* D. C., *Cunila spicata* e *Artemisia* spp (Romagni *et al.* 2000). Um dos maiores constituintes desses óleos essenciais é o 1,8-cineol, descrito como potente aleloquímico, pois afeta o crescimento e desenvolvimento vegetal. Ele atua como inibidor da síntese de DNA e a proliferação celular dos meristemas apicais

radiculares de diferentes plantas (Koitabashi *et al.* 1997). Este aleloquímico, nas concentrações de 10 e 100 µg/g, de solo, atrasou a germinação e reduziu o crescimento radicular e da parte aérea de *Echinochloa crusgalli* e de *Brassica campestris* (Romagni *et al.* 2000; Yoshimura *et al.* 2011).

2 Alelopatia x espécies invasoras

A invasão biológica é considerada atualmente a segunda maior causa de extinção de espécies nativas, sendo antecedida apenas pela modificação de habitats por atividades antrópicas (Ziller 2001; Coradin 2006; Campos *et al.* 2006; Rodolfo *et al.* 2008).

Diversas hipóteses têm sido propostas para tentar explicar o sucesso das plantas exóticas e invasoras em um determinado ambiente, como o rápido crescimento e a melhor utilização dos recursos quando comparadas às plantas nativas. Porém, cada vez mais evidências apontam para a alelopatia como mecanismo que contribui para o sucesso de muitas plantas invasoras e que tem impactos sobre a estrutura e funcionamento das comunidades de plantas nativas (Murrell *et al.* 2011; Bauer *et al.* 2012). A hipótese das “novas armas químicas” sugere que aleloquímicos produzidos e liberados pelas espécies exóticas e invasoras apresentam maior efeito alelopático sobre plantas das áreas invadidas do que sobre aquelas ocorrentes na área nativa. Segundo esta hipótese, plantas que co-ocorrem com espécies que secretam aleloquímicos desenvolveram mecanismo de tolerância a esses compostos (Perry *et al.* 2005; Inderjit *et al.* 2008; Thorpe *et al.* 2009). Estudos que suportam esta hipótese tem demonstrado que, *Centaurea maculosa* Lam., recentemente classificada como *Centaurea stoebe* (Asteraceae), espécie originária da Eurásia, inibe o crescimento das espécies nativas da América do Norte, o que não ocorre com as espécies da sua área de origem (Callaway *et al.* 2005; Thorpe *et al.* 2009). Estes estudos sugerem que este comportamento se deve, dentre outros, o fato que *C. stoebe* libera de suas raízes pulsos de altas concentrações de uma mistura racêmica de (+) e (-) catequina, o que pode ser uma vantagem competitiva durante seu estabelecimento em sua nova região (Bais *et al.* 2002, Perry *et al.* 2007; Bais & Kaushik 2010).

Catequinas são flavonóides encontrados em muitos vegetais na forma de dois enantiômeros, a (+) e a (-) catequina (Figura 2). Esses flavonóides têm sido relacionados a diversas atividades fitotóxicas e antifúngicas e sua presença tem sido relatada em raízes,

folhas e sementes de diferentes espécies (Ceballos *et al.* 1998; Bais *et al.* 2002; Simões *et al.* 2008, El Id *et al.* 2015).

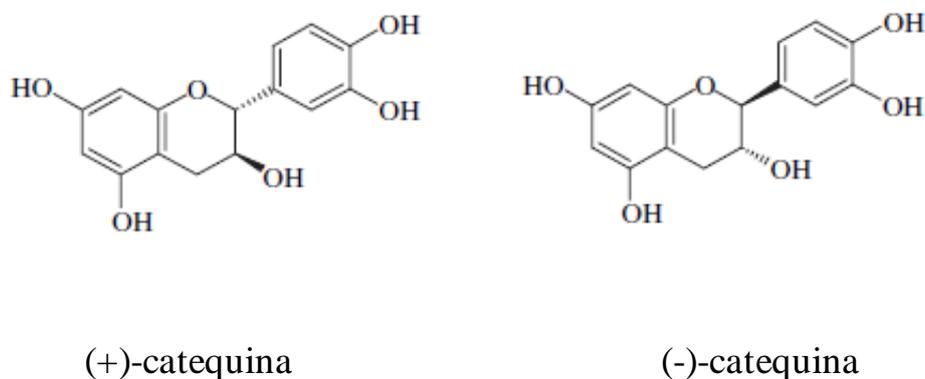


Figura 2: Estrutura química do flavonóide (+) e (-)-catequina (Adaptado Alford *et al.* 2009)

Na literatura existe uma ampla discussão relacionada ao efeito da catequina exsudada por plantas exóticas sobre populações nativas de regiões temperadas. Alguns autores sugerem que a (\pm)-catequina é uma fitotoxina fraca e possui, na verdade, forte atividade antioxidante no combate contra o estresse oxidativo. No entanto, outros pesquisadores demonstram que ela possui potente atividade fitotóxica contra várias espécies de vegetais (Bais *et al.* 2003; Blair *et al.* 2005; 2006; Inderjit *et al.* 2008; Simões *et al.* 2008; Duke *et al.* 2009; Thorpe *et al.* 2009; Kaushik *et al.* 2010; Bais & Kaushik 2010). Outros estudos questionam a atividade fitotóxica dessa substância em ambiente natural, sugerindo que a atividade é dependente da sua estabilidade em diferentes tipos e pH de solo, bem como, das interações com os seus constituintes como metais pesados e com os microrganismos nele presentes (Perry *et al.* 2007; Pollock *et al.* 2009; Thorpe & Callaway 2011). Até o momento, poucos são os trabalhos que discutem o efeito da (\pm)-catequina exsudada por espécies nativas e por sementes (Simões *et al.* 2008; El Id *et al.* 2015).

3 Aleloquímicos liberados por sementes

Folhas e raízes são os órgãos preferencialmente utilizados nos estudos que buscam substâncias com atividade alelopática, sendo que poucas informações são encontradas abordando aleloquímicos liberados pelas sementes. Sementes também possuem a capacidade de liberar fitotoxinas após o início do processo de embebição, que podem contribuir para o comportamento invasivo de algumas espécies (Ndakidemi & Dakora 2003).

A região do solo que envolve as sementes durante a germinação é denominada espermosfera. Durante o início de embebição das sementes, ocorre a liberação de diversos compostos de reservas como carboidratos, lipídeos, proteínas, tornando esta região muito atrativa para herbívoros e microorganismos. A liberação de substâncias fitotóxicas capazes de repelir ou inibir o crescimento de patógenos e de outras espécies competidoras pode ser uma estratégia competitiva e vantajosa para o seu estabelecimento inicial (Nelson 2004).

Em sementes da espécie *Abutilon theophrasti*, os principais compostos encontrados foram flavonóides (delfinidina, cianidina, quercetina, miricetina, catequina e epicatequina) capazes de inibir a germinação e o crescimento radicular de plantas-alvo e também de fungos decompositores de sementes (Souza Filho *et al.* 2011). Das sementes de *Hymenaea courbaril*, foram isoladas duas substâncias com atividade fitotóxica e antifúngica, a ipomopsina e a himineína, exsudadas logo no início do processo de embebição (Simões 2008; Simões *et al.* 2008).

Ceballos *et al.* (1998) observaram, através de estudos anatômicos das sementes de duas espécies de *Sesbania* (Fabaceae), altas concentrações de compostos fenólicos e, por meio de localização histológica, demonstraram que esses compostos estão localizados principalmente no tegumento e no parênquima sub-hilar das sementes, sendo rapidamente liberados durante o processo de embebição. Esses mesmos autores verificaram que 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.

4 *Sesbania virgata*

Sesbania virgata Cav. Pers. (sesbania) (Figura 3) é uma espécie tropical (Fabaceae), nativa da América do Sul, encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, bem como no Paraguai, Argentina e Uruguai (Pott & Pott 1994). Ela é pioneira, de crescimento rápido e tolera a inundação. Essas características permitem que a espécie seja utilizada na recuperação de áreas degradadas (Florentino *et al.* 2009; Schiavo *et al.* 2009; Souza *et al.* 2010). Andrade (2006) verificou que, há cerca de duas décadas, sesbania era praticamente desconhecida na região Nordeste do Brasil, quando então começou a ocupar margens de rios e reservatórios, revelando-se mais recentemente como uma invasora capaz de provocar sérios

impactos nos ecossistemas, sobretudo, em matas ciliares, onde a mesma é capaz de suprimir a regeneração natural e de formar maciços populacionais dominantes.



Figura 3: *Sesbania virgata*. Aspecto da árvore (A), Folha (B), Flor (C) e Fruto (D) e Semente (E) (Fotos: Jailton Mignoni 2015)

As sementes de sesbania acumulam galactomanano nas células do endosperma, um polissacarídeo de reserva que é mobilizado após a germinação e cujos produtos de degradação são utilizados para o desenvolvimento do embrião (Buckeridge & Dietrich 1996). 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. O flavonóide (+)-catequina, encontrado nos exsudatos de suas sementes, afeta a germinação e o crescimento inicial em diversas espécies vegetais. Além da catequina, outros compostos foram detectados nos seus exsudatos. Ácido abscísico (ABA) foi detectado no tegumento das

sementes de sesbania, porém, não se sabe se é exsudado (Simões 2008; Simões *et al.* 2008; Tonini *et al.* 2006; 2010; Praxedes *et al.* 2011).

Estudos realizados pelos membros do grupo de pesquisa no qual este trabalho está vinculado demonstraram que os exsudatos de sementes de sesbania causam atraso na germinação, no desenvolvimento e na mobilização dos carboidratos de reserva em espécies cultivadas. Nas espécies nativas *Enterolobium contortisiliquum* e *Peltopodium dubium*, pertencentes a diferentes estágios sucessionais e que co-ocorrem com sesbania, estes efeitos foram bem menos intensos. Catequina isolada, por sua vez, afetou o crescimento radicular de todas as espécies testadas (Simões *et al.* 2008; Veronesi 2013; Coelho 2014; El Id *et al.* 2015). Os efeitos dos exsudatos de sesbania e da catequina isolada ainda não haviam sido avaliados em espécies que não co-ocorrem com sesbania, ou seja, que não possuem história evolutiva em comum com ela.

Recentemente, uma nova hipótese sugere que efeitos fitotóxicos mais intensos são esperados entre plantas que não têm histórias evolutivas comuns. Estes efeitos são observados especialmente entre espécies exóticas introduzidas em novos ambientes onde as plantas locais, por não apresentarem estratégias adaptativas selecionadas para lidar com as fitotoxinas exsudadas no meio pelas plantas introduzidas, acabam por ter seu desenvolvimento comprometido e seu *fitness* diminuído (Carmo *et al.* 2012). Cummings *et al.* (2012) propõem que esse efeito pode ser no sentido inverso, de modo a aumentar a resistência das comunidades nativas à invasão. Plantas exóticas e invasoras podem ser suscetíveis aos aleloquímicos produzidos por espécies nativas o que poderia dificultar ou impedir a invasão. Entretanto, alguns aspectos ecológicos devem ser levados em consideração, por exemplo, ambientes degradados podem facilitar a entrada e invasão de espécies exóticas e invasoras. Além disso, essas espécies em sua nova região possuem, em geral, poucos herbívoros/predadores especialistas e, a falta destes, pode contribuir para aumentar a distribuição e abundância das invasoras. Por outro lado, herbívoros generalistas iriam evitar a predação nestas espécies, por elas apresentarem produtos químicos novos de defesa o que também contribuiria para a invasão (Mack *et al.* 2000; Parker & Hay 2005; Cappuccino & Carpenter 2005; Schaffner *et al.* 2011).

Estudos relacionados ao efeito e à resistência das espécies nativas sobre espécies exóticas são escassos e os efeitos associados a aleloquímicos exsudados por sementes nessas condições são praticamente desconhecidos.

5 *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

Leucaena leucocephala, (leucena) espécie exótica, pioneira, também da família Fabaceae, é nativa do Sul do México e do Norte da América Central (Figura 4) e cultivada para diversos fins econômicos como obtenção da madeira e celulose, forragem para animais domésticos (caprinos) e adubação. Como muitas leguminosas, leucena faz simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos presentes no solo, e por isso, mas não somente, tem sido frequentemente cultivada no Brasil para a recuperação florestal, uma vez que melhora a qualidade físico-química e biológica do solo (Pires *et al.* 2001; Slot *et al.* 2012; Vishwakarma *et al.* 2012). Por ser uma espécie de alta tolerância à seca, resistente a pragas e doenças e com capacidade de crescer em uma grande variedade de tipos de solo, tornou-se importante na agrosilvicultura. Além disso, a composição nutricional indicou que suas sementes são grandes fontes de proteína e energia para os animais (Ahmed & Abdelti 2009).



Figura 4: *Leucaena leucocephala*. (a) Inflorescência (D: representa o diâmetro), (b) Inflorescência com botões, (c) Folhas, (d) Fruto, (e) Sementes e (f) Aspecto geral (Adaptado: Pandey & Kumar 2013)

Souza Filho *et al.* (1997) observaram que o extrato aquoso das sementes de leucena apresentou efeito fitotóxico sobre três plantas invasoras de pastagens, afetando principalmente o alongamento radicular de desmódio (*Desmodium adscendens* (Sw) DC.), guanxuma (*Sida rhombifolia* K. Sch.) e assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). Os autores sugerem que, provavelmente, este efeito está associado ao aleloquímico mimosina (b-[N-(3-hidroxi-4-oxopiridil)]-a-aminopropiônico) (Figura 5), um aminoácido não protéico que está presente nas sementes (12,1% na matéria seca) (Ward & Harris 1976).

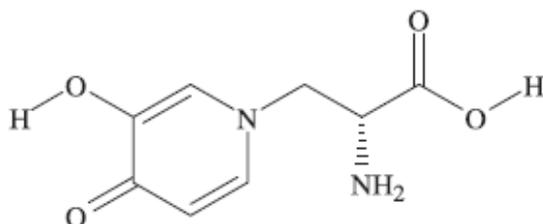


Figura 5: Estrutura química da mimosina (Adaptado de Xuan *et al.* 2006)

6 *Sesbania virgata* x *Leucaena leucocephala*

No Brasil, sesbania e leucena são consideradas espécies invasoras, mas ambas foram utilizadas por décadas para recuperar áreas degradadas. Suas sementes têm em comum o fato de possuírem como principal carboidrato de reserva galactomanano e que perfaz, respectivamente, 21,2 e 10,4 %, da massa seca. O galactomanano presente no endosperma das sementes, além do papel de reserva, possui importante função no controle da hidratação do embrião durante o processo de embebição (Buckeridge *et al.* 2000).

Sesbania, por demonstrar grande plasticidade e tolerância a diferentes ambientes com baixa fertilidade, tem sido promissora em experimentos em campo para a restauração de áreas degradadas por extração de argila e em solos contendo lixo urbano (Coutinho *et al.* 2005; Nóbrega *et al.* 2008). Em estudos *in vitro* realizados com os exsudatos de suas sementes, a catequina liberada para o meio parece não ser a única substância responsável pelos efeitos fitotóxicos descritos para a espécie, sendo que outros compostos presentes nos exsudatos podem contribuir para seu comportamento agressivo, por exemplo, o ácido abscísico (ABA) (Tonini *et al.* 2010; Veronesi 2013; Coelho 2014; El Id *et al.* 2015).

Compreender os mecanismos existentes nas espécies invasoras e exóticas que garantem seu sucesso em novos ambientes é fundamental para entender as interações planta-

planta e os processos ecofisiológicos envolvidos nas vantagens adaptativas que algumas espécies apresentam durante seu estabelecimento inicial, contribuindo assim, para estudos do comportamento invasor e para o processo de recuperação de áreas degradadas. Poucos são os trabalhos relativos ao papel dos aleloquímicos liberados das sementes nativas sobre espécies exóticas e sua influência na degradação dos carboidratos de reserva e atividade das enzimas relacionadas a essa degradação. Sendo assim, sesbania e leucena que possuem características comuns foram selecionadas para este trabalho visando testar a hipótese que algumas espécies exóticas e invasoras podem ser sensíveis aos aleloquímicos produzidos por espécies nativas, e estas por sua vez, aumentam sua resistência contra a invasão por plantas exóticas (Carmo *et al.* 2012; Cummings *et al.* 2012).

Objetivos

Geral

Avaliar o efeito alelopático mútuo entre a espécie nativa invasora sesbania e a exótica leucena.

Específicos

- Avaliar o efeito alelopático dos exsudatos de sementes de leucena e da mimosina comercial sobre a germinação e o crescimento inicial de sementes e plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.).
- Analisar o efeito dos exsudatos de sementes de sesbania, bem como da (+)-catequina comercial, sobre a germinação e o crescimento inicial das sementes e plântulas de leucena.
- Avaliar o efeito da co-germinação das sementes de sesbania sobre a germinação e a degradação dos carboidratos de reserva das sementes de leucena, testando a hipótese que espécies exóticas invasoras são sensíveis aos aleloquímicos exsudados por espécies nativas.
- Quantificar o ácido abscísico (ABA) nos exsudatos de sementes de sesbania e avaliar seu efeito sobre a germinação e desenvolvimento de leucena.

Parte 1. Efeito dos exsudatos de sementes de *L. leucocephala* e de mimosina comercial sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial das plântulas de tomate e arroz

1 Metodologia

1.1 Material biológico

- Sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena) e de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Santa Cruz Kada foram adquiridas no comércio local.
- Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) cv. Ourominas foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA, Santo Antônio de Goiás, GO.

1.2 Obtenção dos exsudatos de sementes de leucena

Sementes de leucena foram escarificadas mecanicamente com auxílio de lixa, na região oposta ao crescimento da radícula, e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio comercial a 10% (solução original contendo cloro ativo 2,5% p/p) por 10 minutos e lavadas abundantemente com água destilada autoclavada, conforme descrito por Cardoso *et al.* (2012). As sementes foram colocadas em placas de Petri (15 cm de diâmetro) contendo papel de filtro embebido em água destilada (0,7 mL/semente) e mantidas em câmara climatizada (Estufa BOD) a 25°C±2°C, em fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. A cada dia após o início do processo de embebição (1º ao 5º dia), as sementes foram removidas das placas e os exsudatos obtidos foram coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur. O papel de filtro foi lavado com água destilada (105 ml/placa) e a água de lavagem reunida aos exsudatos, e estes, filtrados em membrana de náilon, congelados e liofilizados. O potencial osmótico e o valor de pH dos exsudatos de diferentes dias foram determinados através de Osmômetro Vapro® 5520 e do pHmetro EDGE® Hanna®, respectivamente.

1.3 Quantificação de compostos nos exsudatos de sementes leucena

Alíquotas dos exsudatos liofilizados de sementes de leucena, obtidos a cada dia do processo germinativo (item 1.2), foram diluídas em água destilada na concentração de 1 mg mL⁻¹ e submetidas à dosagem de açúcar total pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), sendo utilizada glucose como padrão. O conteúdo de aminoácidos totais livres foi quantificado pelo método descrito por Yem & Cooking (1955), utilizando leucina como

padrão. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) tendo albumina de soro bovino como padrão. Fenóis totais foram quantificados pelo método Folin-Ciocalteu (adaptado de Marinova *et al.* 2005), usando ácido gálico como padrão. Catequina foi quantificada pelo método de vanilina clorídrica como método preliminar conforme Broadhurst & Jones (1978) e pelo sistema de HPLC Varian (Simões 2008) comparada à (+)-catequina comercial (Sigma-Aldrich).

1.4 Quantificação e identificação da mimosina nos exsudatos de leucena

Mimosina foi quantificada pelo método descrito por Champanerkar *et al.* (2010). A 25 miligramas (mg) dos exsudatos liofilizados (item 1.2) foram adicionados 10 mL de metanol. A amostra foi agitada em vórtex durante 2 minutos e então solubilizada sob agitação constante por 60 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 4600 g por 15 minutos e filtrado através de papel de filtro Whatman nº 41 (E. Merck), sendo o sobrenadante recolhido e denominado solução B. Ao resíduo foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico (HCl) 1% e, após a agitação em vórtex durante 2 minutos, a solução permaneceu em repouso por 12 horas a temperatura ambiente. O material foi filtrado através de papel de filtro Whatman nº 41 e o sobrenadante recolhido foi denominado solução C. Um mL da solução C foi diluído na fase móvel (metanol:formiato de amônio 10 mM (80:20, v/v) até atingir o volume de 10 mL, então filtrado e injetado (20 µL) em coluna C₁₈ em sistema de HPLC Varian, com separação realizada em gradiente linear contendo metanol:formiato de amônio 10 mM (80:20, v/v) com fluxo de 1 mL min⁻¹ a 280 nm. Mimosina comercial (Sigma) foi utilizada como padrão. Uma alíquota da solução C (2 mL) foi seca em evaporador do tipo “speedvac” e dissolvida em metanol (1 mL) para identificação da mimosina por espectrometria de massas (EM). Os picos foram comparados com o padrão de mimosina comercial. Essa análise foi realizada no Departamento de Química da USP (Universidade de São Paulo) conforme descrito por Champanerkar *et al.* (2010).

1.5 Quantificação de ácido abscísico (ABA) nos exsudatos de leucena

As extrações de ABA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da USP, sob a supervisão do Dr. Luciano Freschi. Para a extração de ABA, 10 mg de massa seca dos exsudatos de sementes de leucena obtidos no item 1.2 foram colocados em um tubo eppendorf e a eles adicionados 500 µL de água deionizada, sendo o pH ajustado para 2,5 a 3,0 com ácido acético p.a. Em seguida, foram adicionados 500

μL de acetato de etila e 100 ng de padrão marcado de ABA ($[^2\text{H}_6]$ -ABA). As amostras foram agitadas em vórtex, centrifugadas a 14200 g por 5 minutos, sendo a fase superior coletada e transferida para novo eppendorf. Este procedimento foi repetido por três vezes, as frações foram reunidas e completamente secas sob vácuo. O material resultante foi dissolvido em 100 μL de metanol, transferido para o inserto do frasco de análise e novamente seco. Posteriormente, foram adicionados 30 μL de metanol e 10 μL de trimetilsilil-diazometano, e as amostras foram sililadas por incubação a temperatura ambiente durante 30 minutos e, na sequência, secas sob nitrogênio gasoso. Após a adição de 30 μL de metanol, as amostras foram solubilizadas e analisadas em cromatógrafo a gás com monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI) Hewlett-Packard modelo 6890, acoplado a um espectrômetro de massas modelo 5973. Utilizou-se uma coluna de separação DB-5ms (30m, 0,25mm, 0,5 μm fil-Agilent), tendo hélio como gás de arraste, com fluxo de 0,83 mL min^{-1} . As injeções foram realizadas por meio de injetor automático Hewlett-47Packard modelo LS-1100 e o volume injetado de cada amostra foi de 2 μL , com modo de injeção splitless, velocidade linear de 33,9cm/seg. A quantificação do ABA foi realizada conforme descrito por Ludwig Muller *et al.* (2008). Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) 134, 162 e 190 correspondentes ao ABA endógeno e 138, 166 e 194 correspondentes ao $[^2\text{H}_6]$ -ABA. A concentração endógena de ABA foi obtida pela comparação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 190 e 194.

1.6 Extração e análise de carboidratos solúveis presentes nos exsudatos de sementes leucena

Alíquotas de 50 mg de exsudatos liofilizados (item 1.2) de sementes de leucena foram submetidos à extração de carboidratos solúveis, conforme descrito por Carvalho *et al.* (2013). Ao material foi acrescentado 5 mL de etanol 80%. A mistura foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 80°C, por 15 minutos. Após centrifugação (Sorvall Super T21, Kendro Laboratory Products, USA) a 1000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido e o resíduo submetido ao mesmo procedimento por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório (r-215, Buchi, Switzerland) a 36°C, até completa remoção do etanol. Os extratos foram retomados em 2 mL de água destilada e analisados quanto aos teores de açúcares totais pelo mesmo método descrito no item 1.3. A leitura da absorbância foi realizada a 490 nm, em espectrofotômetro (SP-22 Bioespectro, Curitiba, PR).

1.7 Análise qualitativa dos carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)

Alíquota de 1 mL dos extratos obtidos pela extração etanólica descrita no item 1.6 foram purificados em coluna de troca aniônica de 5 mL, utilizando resinas Dowex de troca catiônica 50x8 (100-200 mesh) e aniônica 1x8 (52-100 mesh). A eluição foi realizada com 30 mL de água deionizada e o volume final teve o pH ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio 0,4 M. Após a purificação, as amostras foram liofilizadas, retomadas em 2 mL de água deionizada e novamente submetidas a quantificação de açúcares para ajuste da concentração a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A análise da composição dos açúcares solúveis foi realizada por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em cromatógrafo líquido DIONEX modelo ICS-3000 (Dionex, ThermoScientific, USA), utilizando uma coluna Carbo-Pac PA1. Os carboidratos solúveis foram eluídos isocraticamente com 60 mM de NaOH, com fluxo de 0,25 ml min^{-1} , por 35 minutos. A identificação dos açúcares foi feita por comparação com os tempos de retenção obtidos com padrões comerciais (Sigma) disponíveis de frutose, glucose, sacarose, rafinose, estaquiase. Para análise de monossacarídeos neutros oriundos da parede celular, foi utilizada eluição isocrática com NaOH 16 mM, com fluxo de 0,25 ml min^{-1} , em tempo de corrida de 35 min, sendo os açúcares identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de fucose, ramnose, arabinose, galactose, glucose, xilose e manose.

1.8 Bioensaios com exsudatos de sementes de leucena

Este ensaio avaliou o efeito dos exsudatos das sementes de leucena e da mimosina comercial isoladamente em sementes de tomate, arroz e em sesbania. Para tanto, cinco sementes das diferentes espécies foram desinfestadas com hipoclorito de sódio comercial a 10% por 10 minutos, lavadas com água destilada autoclavada e distribuídas em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo papel de filtro umedecidos com 3,5 mL de exsudatos de sementes de leucena (1° a 5° dia) ou mimosina comercial (1 mg mL^{-1}). Para controle do ensaio, cinco sementes de cada planta-teste foram colocadas em placas com 3,5 mL de água destilada autoclavada. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas mantidas em câmara climatizada B.O.D. a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas de luz por cinco dias. A distribuição das placas dentro da câmara foi inteiramente casualizada. A germinação foi avaliada diariamente, tendo como critério a emergência radicular. No 5° dia, as plântulas foram

removidas das placas de Petri, sendo avaliado o comprimento da radícula e do hipocótilo. As massas frescas foram obtidas com o auxílio de balança, e o material foi seco em liofilizador e pesado até obter peso constante.

1.9 Delineamento experimental e Análise Estatística

Em todos os ensaios realizados neste trabalho, o delineamento experimental foi totalmente casualizado, com no mínimo três repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando programa SISVAR 5.3 (Ferreira 2010) e realizado o teste de comparação das médias dos diferentes tratamentos, por Tukey, com nível de significância de 5% de probabilidade.

2 Resultados

2.1 *Compostos exsudatos pelas sementes de leucena*

Nos exsudatos de sementes de leucena foram detectados proteínas, compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos durante o processo de embebição e germinação das sementes (Figura 6 A-D). Foi observado maior teor destes compostos no 4º dia após o início da embebição com decréscimo no 5º dia. Os compostos fenólicos aparecem em maior proporção quando comparados às outras substâncias (Figura 6 B).

O aminoácido não protéico, mimosina, foi liberado por sementes de leucena com teores similares até o 3º dia, decrescendo após este período (Figura 6 E). Ácido Abscísico (ABA) foi exsudado em maior quantidade no 4º dia, seguido de decréscimo no 5º dia (Figura 6 F). Catequina não foi detectada nos exsudatos das sementes de leucena.

As análises por HPAEC/PAD mostraram que sacarose, glucose e arabinose foram encontradas em menores quantidades nos exsudatos de leucena quando comparados a ramnose, galactose e manose, com aumento a partir do 3º dia de embebição (Figura 7 A-C). Galactose e manose/xilose foram os açúcares exsudados em maior quantidade, sendo encontrados principalmente após o 2º dia de embebição (Figura 7 D-F). Oligossacarídeos da série rafínosica como rafinose e estaquiose não foram detectados nos exsudatos durante o processo germinativo.

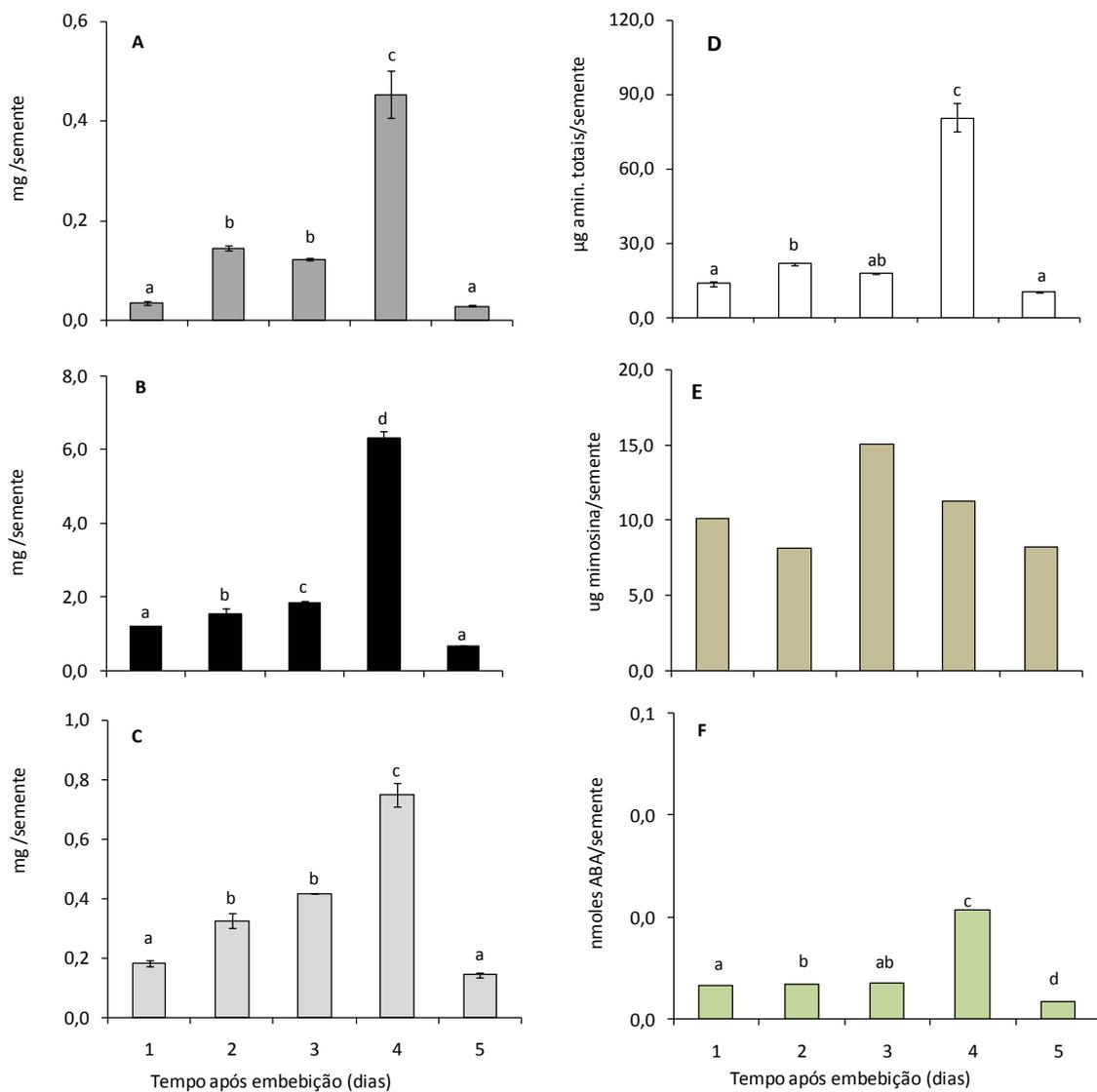


Figura 6: Conteúdo de proteínas (A), compostos fenólicos (B), açúcares (C), aminoácidos (D), mimosina (E) e ácido abscísico (F) nos exsudatos de sementes de leucena durante o processo germinativo. As barras representam o desvio padrão das médias de triplicatas (A-D). A ausência das barras e letras na figura E deve-se a uso de duplicatas técnicas. Letras iguais não diferem estatisticamente entre os dias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

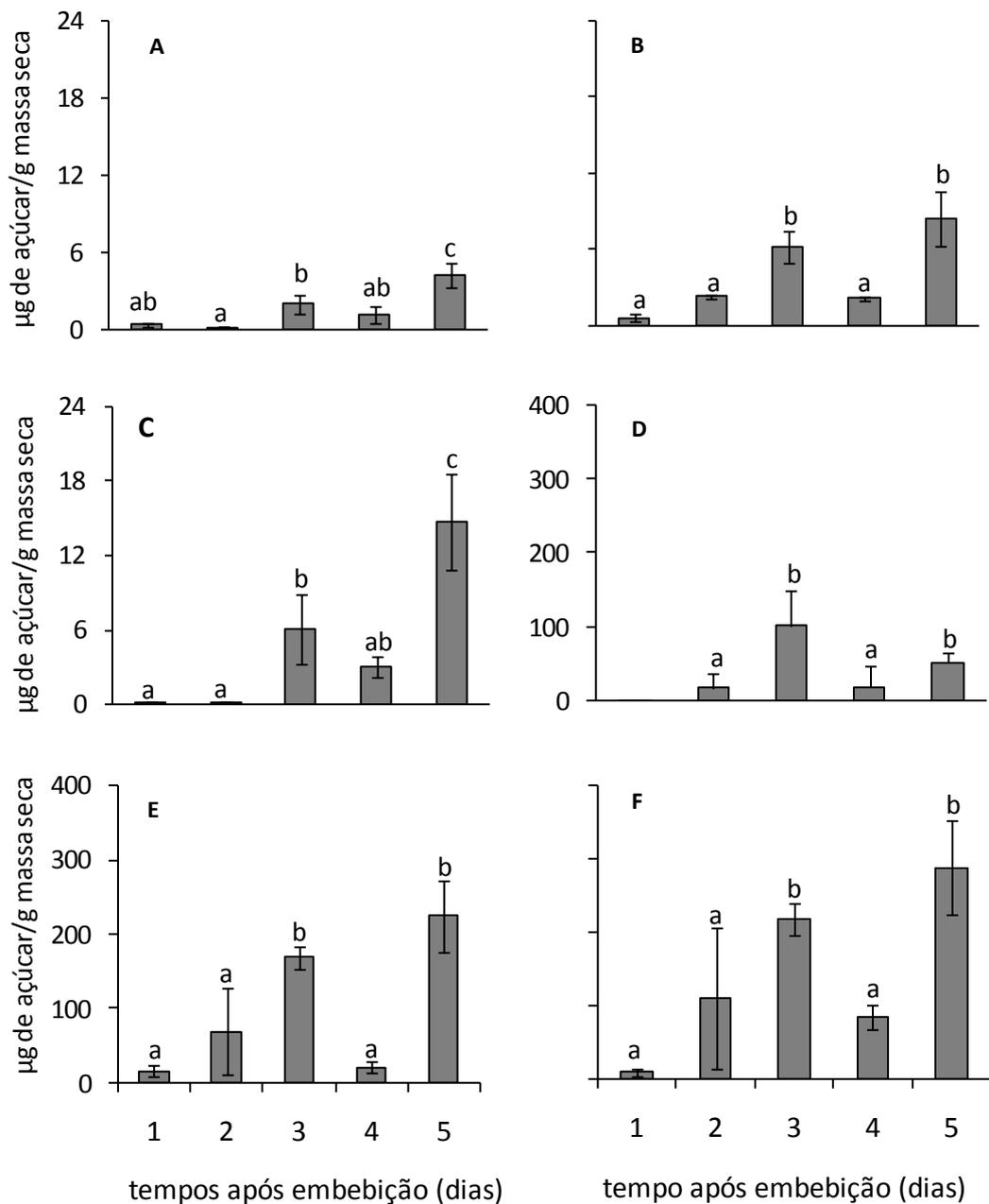


Figura 7: Carboidratos solúveis presentes nos exsudatos de sementes de leucena durante cinco dias de processo de embebição e germinação, detectados por análises em HPAEC/PAD. Sacarose (A), Glucose (B), Arabinose (C), Ramnose (D), Galactose (E) e Manose/xilose (F). As barras representam o desvio padrão das médias das triplicatas (N=3). Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os dias.

2.2 Efeito dos exsudatos de sementes de leucena na germinação e crescimento inicial de tomate e arroz

Na presença dos exsudatos de leucena não foi observada alteração significativa na porcentagem de germinação e no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de tomate e arroz. Embora aparentemente haja uma tendência de atraso na germinação das sementes de tomate na presença dos exsudatos do 1º, 2º, 3º e 5º dia e estímulo à germinação quando na presença dos exsudatos do 4º dia, diferenças significativas não foram observadas comparadas ao controle (Tabelas 1 e 2). Interferência nesses processos também não foi observada por efeito da mimosina comercial em tomate (Tabela 1). Em arroz, mimosina parece interferir, já que menores valores nestes parâmetros foram observados, porém não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle (Tabela 2).

Por outro lado, os resultados das Tabelas 1 e 2 indicam efeitos dos exsudatos de sementes de leucena no crescimento e desenvolvimento de tomate e arroz. Exsudatos a partir do 1º dia de embebição afetaram o crescimento radicular de tomate, enquanto que somente os do 3º dia diminuíram o comprimento do hipocótilo (Tabela 1). Em arroz, maior efeito dos exsudatos dos diferentes dias foi observado na redução do comprimento do hipocótilo (Tabela 2). A mimosina comercial afetou severamente o crescimento radicular e do hipocótilo em ambas as plantas-teste quando comparadas ao controle.

Maior valor de massa fresca e massa seca foi observado nas sementes de tomate germinadas nos diferentes tratamentos, entretanto, na presença da mimosina comercial, somente a massa seca diferiu estatisticamente em relação ao controle (Tabela 1). Diferentemente, em arroz, as massas fresca e seca não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2).

Apenas pela avaliação do aspecto visual das plântulas de tomate e arroz após cinco dias de tratamento com os exsudatos de sementes de leucena e a mimosina, notam-se os efeitos alelopáticos das substâncias exsudadas principalmente após o 3º dia e também alterações comparáveis àquelas provocadas pela mimosina sobre o crescimento de ambas as espécies (Figura 8).

Tabela 1. Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), massas frescas e secas e crescimento inicial das plântulas de tomate, após o 5º dia de germinação na presença dos exsudatos de sementes de leucena (1º ao 5º dia) e de mimosina comercial (1 mg mL⁻¹). O controle refere-se ao tratamento com água destilada autoclavada N=3 (5 sementes/replicata).

Tratamentos	% G	IVG	Massa Fresca (mg)	Massa seca (mg)	Compr. Radícula (cm)	Compr. Hipocótilo (cm)
Controle	93,3	2,9 ± 0,56	17,2 ± 1,76	6,5 ± 2,23 b	2,43 ± 0,67 a	1,04 ± 0,14 a
Exsudato 1º dia	73,3	2,4 ± 0,64	18,1 ± 0,21	9,7 ± 1,68 ab	0,29 ± 0,11 bc	0,74 ± 0,19 a
Exsudato 2º dia	73,3	2,1 ± 0,76	14,8 ± 0,21	7,9 ± 0,65 ab	0,60 ± 0,08 bc	0,73 ± 0,15 a
Exsudato 3º dia	86,7	2,5 ± 0,35	18,8 ± 1,19	8,4 ± 2,08 ab	0,13 ± 0,04 bc	0,12 ± 0,05 b
Exsudato 4º dia	100,0	3,0 ± 0,85	22,2 ± 4,59	8,0 ± 2,80 ab	1,15 ± 0,27 b	0,69 ± 0,01 a
Exsudato 5º dia	73,3	2,6 ± 0,46	21,4 ± 1,69	11,3 ± 1,3 ab	0,25 ± 0,08 c	0,20 ± 0,11 a
Mimosina	86,7	2,5 ± 0,49	26,0 ± 3,60	12,2 ± 1,8 a	0,19 ± 0,08 c	0,10 ± 0,00 b

Colunas seguidas da mesma letra ou ausentes não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), massas frescas e secas e crescimento inicial das plântulas de arroz, após o quinto dia de germinação na presença dos exsudatos de sementes de leucena (1º ao 5º dia) e de mimosina comercial (1 mg mL⁻¹). O controle refere-se ao tratamento com água destilada autoclavada N=3 (5 sementes/replicata).

Tratamentos	% G	IVG	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Compr. Radícula (cm)	Compr. Hipocótilo (cm)
Controle	93,3	3,4 ± 0,8	0,50 ± 0,04	0,13 ± 0,006	2,70 ± 0,06 a	1,54 ± 0,02 a
Exsudato 1º dia	93,3	3,5 ± 0,4	0,47 ± 0,04	0,12 ± 0,127	2,71 ± 0,12 a	1,14 ± 0,01 bc
Exsudato 2º dia	93,3	3,4 ± 0,8	0,45 ± 0,02	0,13 ± 0,001	2,77 ± 0,33 a	1,55 ± 0,07 b
Exsudato 3º dia	86,6	3,1 ± 0,4	0,47 ± 0,02	0,12 ± 0,004	1,38 ± 0,28 ab	1,14 ± 0,02 cd
Exsudato 4º dia	93,3	3,6 ± 0,4	0,41 ± 0,01	0,13 ± 0,009	1,97 ± 0,23 a	1,40 ± 0,08 bc
Exsudato 5º dia	86,6	3,4 ± 0,5	0,44 ± 0,02	0,13 ± 0,005	1,79 ± 0,23 a	1,10 ± 0,14 d
Mimosina	60,0	1,7 ± 1,1	0,43 ± 0,04	0,13 ± 0,008	0,15 ± 0,12 b	0,10 ± 0,01 e

Colunas seguidas da mesma letra ou ausentes não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

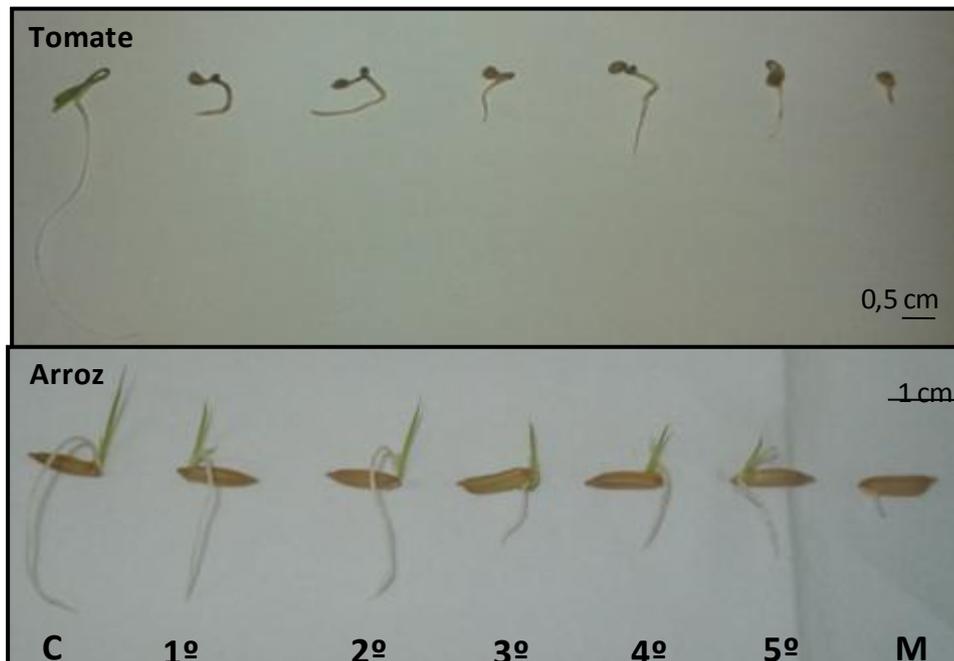


Figura 8: Aparência das plântulas de tomate e arroz germinadas na presença dos exsudatos de sementes de leucena obtidos do 1º ao 5º dia posterior o início da embebição e da mimosina comercial (M) (1 mg mL^{-1}) e após cinco dias de tratamento. O controle (C) representa as plântulas germinadas em água destilada autoclavada.

3 Discussão

No presente trabalho, sementes da leucena quando escarificadas completaram seu processo de embebição aproximadamente em dois dias em contato com a água, momento em que ocorre a protusão da radícula. Já nas primeiras 24 horas de embebição ocorre a exsudação de açúcares, proteínas e substâncias bioativas. Simões (2008) verificou que, nos exsudatos de sementes de sesbania, os açúcares encontrados logo no início do processo de embebição são provavelmente produtos da degradação dos oligossacarídeos da série rafinose, que são formados por galactose e sacarose. Esses açúcares foram descritos como reserva presente na camada do aleurona sendo degradados antes da protusão da radícula, parte deles sendo encontrada nos exsudatos (Buckeridge & Dietrich 1996). Possivelmente, o mesmo ocorre durante o processo de embebição das sementes de leucena, que assim como sesbania, é uma leguminosa que possui endosperma (Buckeridge *et al.* 1995) e na qual elevados teores de oligossacarídeos da série rafínósica foram encontrados durante a maturação de suas sementes (Chien *et al.* 1996).

O endosperma das sementes de leucena é composto principalmente de galactomanano, um polissacarídeo de reserva, que a plântula utiliza para o seu crescimento inicial (Buckeridge *et al.* 1995). Durante o processo de germinação das sementes de leguminosas, o conteúdo de oligossacarídeos da série rafínósica tende a diminuir durante as fases iniciais da embebição. A degradação do galactomanano tem início após a protusão da radícula pela ação de enzimas que hidrolisam o polissacarídeo até seus monossacarídeos constituintes que são manose e galactose. Estes, posteriormente, são translocados para o embrião e utilizados para o seu crescimento e desenvolvimento (Buckeridge & Dietrich, 1996; Buckeridge *et al.* 2004), o que pode explicar a ausência de oligossacarídeos da série da rafinose e o aumento dos níveis de açúcares, manose e galactose, nos exsudatos de leucena após o 2º dia de embebição (Figura 7 E e F).

A maior quantidade de açúcares nos exsudatos de sementes de leucena (Figura 7) coincidiu com os maiores efeitos fitotóxicos observados no crescimento e desenvolvimento das plântulas de tomate e arroz (Tabela 1 e 2). Altas concentrações de manose podem estar relacionadas ao efeito, visto que, mesmo em baixas concentrações, ela pode ser fitotóxica (Pego *et al.* 1999; Baskin *et al.* 2001). Simões (2008) verificou grande quantidade de açúcares (manose e galactose) nos exsudatos de sementes de sesbania coletados até o 6º dia de

germinação e, no mesmo período de maior exsudação desses açúcares, houve redução no crescimento das plântulas de alface e tomate. No presente estudo, compostos de reserva exsudados de leucena também podem ter contribuído para intensificar os efeitos ocasionados pelos exsudatos no desenvolvimento das plântulas de tomate e arroz.

Assim como descrito para sesbania, ao longo do processo de embebição e exsudação das substâncias pelas sementes de leucena também foram observados maiores efeitos fitotóxicos em plântulas de tomate e arroz, o que sugere aumento da exsudação de substâncias inibidoras com a germinação nestas espécies. Ceballos *et al.* (1998) descrevem que durante o processo de germinação, no qual ocorre a liberação de parte dos açúcares para o ambiente, a semente fica mais vulnerável ao ataque de patógenos e de herbívoros. Substâncias bioativas exsudadas das sementes que são capazes de restringir ou inibir este ataque podem conferir vantagens no período de estabelecimento inicial da plântula. No presente estudo, compostos fenólicos foram exsudados em altas concentrações com valores bem superiores ao de outras substâncias por sementes de leucena (Figura 6 B). A presença de compostos fenólicos no tegumento das sementes, assim como no endosperma e folhas de leucena, já foi descrita (Chou & Kuo 1986; Serrato-Valenti *et al.* 1994; 1995; Kader *et al.* 2008). Em extratos aquosos de folhas de leucena foram identificados diversos compostos fenólicos dentre eles: quercetina, ácido gálico, ácido ferúlico e *p*-cumárico (Chou & Kuo 1986). Simões *et al.* (2008) detectaram altas concentrações de catequina, composto fenólico, nos exsudatos de sementes de sesbania e que apresentou atividade fitotóxica em diferentes espécies. Neste trabalho, não foi detectada a presença da catequina nos exsudatos de sementes de leucena, indicando que outras substâncias fenólicas devem ser aquelas exsudadas pelas suas sementes.

Compostos fenólicos podem inibir a germinação de esporos e o crescimento micelial de diferentes fungos patogênicos, assim como, a germinação de sementes (Chérif *et al.* 2007; Mandal *et al.* 2010). Por outro lado, alguns desses compostos, como os flavonóides, apresentam importante papel no estabelecimento de simbiose de leguminosas com bactérias no solo, agindo como substâncias atrativas que induzem a nodulação (Cesco *et al.* 2012). Dessa forma, fenólicos podem agir de modo diferenciado. Cabe lembrar que, leucena é uma leguminosa que faz simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio presentes no solo (Pires *et al.* 2001). A grande quantidade dessas substâncias fenólicas exsudadas durante o processo de embebição e germinação pelas suas sementes pode, assim, estar relacionada ao processo de simbiose da espécie com os microorganismos do solo.

Substâncias exsudadas, tais como açúcares, compostos fenólicos e aminoácidos podem mascarar o efeito alelopático dos extratos por interferir no pH e serem osmoticamente ativos (Ferreira & Aquila 2000). No presente trabalho, o potencial osmótico dos exsudatos de leucena de diferentes dias variou de 130-134 MOsmol (-0,34 MPa) e o pH manteve-se ao redor de 5,0, valores muito próximos a aqueles encontrados na água utilizada como controle (-0,33 MPa e 5,5, respectivamente). Gatti *et al* (2004) verificaram que os extratos aquosos de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* apresentaram variação no potencial osmótico de -0,13 a -0,35 MPa e de 5,1 e 6,4 nos valores de pH. De acordo com os mesmos autores, extratos com pH extremamente ácido ou alcalino podem afetar negativamente a germinação de sementes e o crescimento de plântulas. No presente trabalho, o pH dos exsudatos de leucena manteve-se próximo de 5,0 sugerindo que este, provavelmente não interferiu no efeito alelopático causado em tomate e arroz. Extrato de folhas senescentes de *Sapindus saponaria* apresentou potencial osmótico de -0,30 MPa e a germinação de sementes de *Ipomoea grandifolia* não foi afetada na presença de solução de PEG (polietilenoglicol) no mesmo potencial osmótico (Grisi *et al.* 2012). Testes com soluções inertes (por exemplo, PEG) não foram realizados neste estudo, porém, os valores do potencial osmótico dos exsudatos de leucena foram muito similares ao da água utilizada como controle no ensaio, indicando que este fator não deve ser responsável pelos efeitos fitotóxicos causados na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e arroz.

Ácido abscísico (ABA) foi detectado em exsudatos das sementes de leucena logo no 1º dia de embebição, com aumento significativo no 4º dia, entretanto, em quantidades bem inferiores se comparado a outras substâncias exsudadas (Figura 6 F). O ABA, em determinadas concentrações, pode causar atraso da germinação, redução do crescimento da radícula e inibição da mobilização de reservas de sementes (Grot & Karsen 1992; Potomati & Buckeridge 2002; Kermode 2005; Tonini *et al.* 2006). Ye *et al.* (2011) verificaram que baixa concentração de ABA (1µM) aplicada exógenamente afetou a germinação de sementes de arroz durante o processo de embebição das sementes. Na literatura, não há relatos da presença de ABA nos exsudatos de sementes de leucena, porém, sua participação nos efeitos alelopáticos observados no presente trabalho é uma possibilidade a ser investigada.

Em todas as partes da planta de leucena foi detectada a presença de mimosina, um aminoácido não protéico, que apresenta potencial alelopático (Soedarjo & Borthakur 1996; Xuan *et al.* 2006; Ali *et al.* 2010). No presente trabalho, mimosina foi detectada nos exsudatos de sementes de leucena ao longo do processo de embebição e germinação de suas

sementes. Sua presença foi confirmada através de análise por espectrometria de massas (EM) e ionização no modo negativo por comparação com padrão autêntico de mimosina comercial (dados não mostrados). Ela foi observada em maior quantidade no 3º dia após início da embebição (Figura 6 E), enquanto o teor de aminoácidos totais livres foi maior no 4º dia de germinação, o que indica que há exsudação de outros aminoácidos além da mimosina durante a germinação de leucena. Maior efeito inibitório no comprimento radicular e do hipocótilo das plântulas de tomate coincidiu com o mesmo período de maior exsudação de mimosina pelas sementes de leucena. Efeitos similares também foram observados nos ensaios com mimosina comercial (Tabela 1), sugerindo que esta possa estar relacionada aos efeitos alelopáticos causados pelos exsudatos de leucena em sementes de tomate e arroz. Xuan *et al.* (2006) verificaram diferença nos teores de mimosina em diferentes partes da planta e fases de desenvolvimento de leucena após a imersão em água destilada por curtos períodos de tempo. Sementes imaturas exsudaram maior quantidade de mimosina ($4,11 \text{ mg L}^{-1}$) se comparadas a sementes quiescentes ($1,79 \text{ mg L}^{-1}$). O mesmo ocorreu para outros tipos de órgãos e tecidos da planta, sendo a quantidade de mimosina exsudada proporcional ao período de desenvolvimento da planta, o que pode explicar as variações dessa substância observadas ao longo do período germinativo no presente trabalho (Figura 6 E). Os mesmos autores observaram a exsudação da mimosina pelas sementes até as 24 horas de embebição. Neste trabalho, foi demonstrado que a exsudação da mimosina persiste ao longo do processo de germinação, além das 24 horas.

A concentração de mimosina encontrada nos exsudatos de leucena é de cerca de $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo bem inferior àquela à de mimosina comercial (1 mg mL^{-1}) utilizada nos ensaios. Xuan *et al.* (2006) analisaram o efeito da mimosina comercial em seis diferentes espécies indicadoras: *Brassica rapa*, *Phaseolus vulgaris*, *Bidens pilosa*, *Lolium multiflorum*, *Mimosa pudica* e na própria leucena. Em doses de 1 a 10 mg L^{-1} a mimosina estimulou a emergência da radícula em todas as espécies, porém, em 50 e 1000 mg L^{-1} o crescimento foi inibido para quatro das espécies acima, menos para *M. pudica* e leucena. Prasad & Subhashini (1994) verificaram que mimosina na concentração de 100 ppm afetou significativamente a germinação e o crescimento radicular em sementes e plântulas de arroz, porém, na concentração de 50 ppm não houve diferença, assim como, não foi observado diferença na massa fresca da raiz e hipocótilo. Diferente disso, no presente estudo, mimosina comercial alterou a massa seca de tomate (Tabela 1), sugerindo possível efeito inibidor no processo de embebição de água que, por conseguinte, tem influência no processo de germinação e

crescimento inicial da plântula. Outro aminoácido não protéico também descrito com potencial alelopático é o L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) encontrado nas raízes, folhas e sementes de *Mucuna pruriens*. DC. Ele foi capaz de reduzir o crescimento de soja (*Glycine max*) e ervas daninhas (Nishihara *et al.* 2004; Topal e Kocaçaliskan 2006; Soares *et al.* 2011). Isto sugere que esses compostos apresentam efeitos alelopáticos característicos capazes de conferir vantagens sobre espécies-alvo.

MBOA (6-metoxi-2-benzoxazolinona) um potente aleloquímico presente em espécies da família Poaceae, inibiu a germinação das sementes de 12 plantas-alvo dentre elas tomate, alface, agrião, arroz e outras espécies de cereais. As 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). No presente estudo, sementes e plântulas de tomate parecem ter sofrido maior influência dos exsudados de leucena e da mimosina isolada, comparadas as de arroz, indicando que diferentes espécies apresentam sensibilidade distinta aos aleloquímicos contidos nos exsudatos dessa espécie exótica.

O potencial alelopático dos extratos de folhas de leucena em diferentes concentrações foi avaliado em alface (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max*) e em corda de viola (*Ipomoea grandifolia*) e picão-preto (*Bidens pilosa* L.), estas últimas, espécies consideradas invasoras em culturas de soja. Os resultados apontaram inibição da germinação e crescimento inicial da alface e redução nos mesmos parâmetros para as espécies invasoras com o aumento da concentração dos extratos, porém os mesmos efeitos não foram observados para soja (Mauli *et al.* 2009). Sherer *et al.* (2005) verificaram que extrato aquoso do fruto de leucena na menor concentração (20%) afetou a porcentagem de germinação e o comprimento radicular de canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng), espécie arbórea nativa. Neste trabalho, os exsudatos de sementes de leucena e a mimosina comercial não afetaram a germinação e o crescimento inicial das sementes e plântulas de sesbania, espécie nativa com comportamento invasor (dados não apresentados). Xuan *et al.* (2006) verificaram que a quantidade de mimosina varia de acordo com o órgão e tecido de leucena. Mimosina é encontrada em maior quantidade em folhas jovens, seguida nas sementes maduras, isso pode explicar as variações dos efeitos fitotóxicos de diferentes partes da planta de leucena sobre diferentes espécies.

A presença de mimosina em diversas partes da planta de leucena, por vezes, em altas concentrações, tem despertado interesse do ponto de vista ecológico, já que constitui substância promissora na possibilidade de utilização como herbicida natural e na remediação

de solos. No solo, a mimosina pode formar um complexo ferroso, por se ligar a íons de ferro. A adição de cloreto férrico (FeCl_3) à mimosina na proporção 4:6 mostrou que a toxicidade da mesma foi reduzida, sugerindo que esta razão pode trazer benefícios para diminuir o problema da toxicidade do solo causado pela mimosina em áreas onde leucena cresce. Por outro lado, mimosina isolada de folhas jovens de leucena adicionada em solos cultivados pode ser utilizada no controle biológico de ervas daninhas (Gupta & Atreja 1988; Xuan *et al.* 2006).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que as sementes de leucena exsudam diversos metabólitos que pouco afetam a germinação, porém agem negativamente no crescimento e o desenvolvimento de outras espécies. Mimosina parece ser o principal composto com potencial alelopático, entretanto, outros compostos exsudados, não identificados, podem contribuir para seu comportamento de espécie exótica invasora bem sucedida.

Parte 2. Efeitos da co-germinação de sementes de *S. virgata* sobre a germinação e mobilização dos carboidratos de reserva de sementes de leucena

4 Metodologia

4.1 Material Biológico

- Sementes de *S. virgata* (Cav.) Pers (sesbania) foram coletadas de matrizes existentes no município de Lavras, MG.
- Sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena) foram adquiridas no comércio local.

4.2 Curva de co-germinação com número crescente de sementes de sesbania

Sementes de sesbania e leucena foram escarificadas mecanicamente com lixa, desinfestadas com hipoclorito de sódio comercial a 10% (cloro ativo 2,5% p/p) por 10 minutos e lavadas abundantemente com água destilada autoclavada antes dos ensaios.

Um número crescente de sementes de sesbania (1 a 5) foi distribuído em caixas tipo gerbox transparentes (3,5 x 3,5 x 4,5 cm) contendo papel de filtro e ao lado de sementes de leucena. Um ensaio inverso também foi realizado com o aumento do número de sementes de leucena e uma semente de sesbania. As sementes foram embebidas com 5 mL de água destilada e as caixas foram mantidas em câmara climatizada B.O.D a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. O ensaio foi realizado com três repetições biológicas contendo doze sementes de leucena ou de sesbania em cada repetição, totalizando trinta e seis sementes por tratamento. A germinação foi monitorada por cinco dias sendo a emergência radicular utilizada como critério de germinação. Após este período, as sementes e plântulas de ambas as espécies foram retiradas das placas de Petri e o comprimento da radícula e hipocótilo das plântulas, assim como, massa fresca e seca foi avaliado. O material coletado de leucena foi congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e utilizado para as análises de carboidratos solúveis. Posteriormente, um novo ensaio de co-germinação com duas sementes de sesbania e uma semente de leucena foi realizado sob as mesmas condições descritas acima. A cada dia, o endosperma das sementes de leucena foi separado manualmente do tegumento e embrião e coletado, pesado, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer - 20°C para extração de galactomanano e análises enzimáticas.

4.3 Análises dos carboidratos

4.3.1 Extração e análise quantitativa de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)

Cem miligramas de massa seca do material obtido no item 4.2 foram submetidos à extração de carboidratos solúveis seguindo o método de Carvalho *et al.* (2013) e conforme descrito nos itens 1.6 e 1.7 (Parte 1) deste trabalho. Os resíduos da extração foram liofilizados para posterior quantificação de amido.

4.3.2 Extração e quantificação de amido

O resíduo da extração dos carboidratos solúveis do item acima 4.3.1 foi utilizado para a quantificação do amido pelo método enzimático, conforme descrito por Amaral *et al.* (2007). Ao material (10 mg) foi adicionado 0,5 mL (120 U mL^{-1}) de alfa-amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (Megazyme®), diluída em tampão MOPS [ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico] 10 mM pH 6,5, sendo a incubação das amostras 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 adicionada uma solução contendo 0,5 mL (30 U mL^{-1}) de amiloglicosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (Megazyme®), em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, seguida por incubação. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 30 unidades de enzima. Após as quatro incubações descritas acima, foram acrescentados 100 µL de ácido perclórico 0,8 M para interromper a reação e precipitar proteínas. A quantificação do amido foi realizada através da liberação de glicose pela quebra enzimática. Desta forma, foram incubados 20 µL de extrato e 300 µL do reagente GODPOD (Glicose PAP Liquiform/ Centerlab®), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase (GOD-POD) e 4-aminoantipirina e fenol em pH 7,5, a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, o teor de glicose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA em comprimento de onda de 490 nm, utilizando glicose (Sigma) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.3.3 Extração de galactomanano do endosperma de leucena

Uma amostra dos endospermas isolados de leucena (item 4.2) foi seca, moída, pesada e homogeneizada em água destilada (100 mL g^{-1} de pó) a 80°C, por 8 horas. O extrato foi

filtrado em membrana de náilon e submetido à precipitação com três volumes de etanol comercial a 4°C, durante 24 horas. Após precipitação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado coletado por filtração em membrana e lavado com etanol puro e acetona. Após secagem a temperatura ambiente, o galactomanano foi solubilizado em água destilada a 60°C e centrifugado a 6000 g por 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado, liofilizado e pesado.

4.3.4 Hidrólise ácida e composição do galactomanano

Dois miligramas do galactomanano obtido conforme descrito no item 4.3.3, foram colocados em ampola de vidro e a ele adicionados 50 µL de ácido sulfúrico 72%. A mistura foi aquecida a 30°C em banho-maria por 45 min. Após esta etapa, 850 µL de água destilada foram acrescentados na solução. As ampolas foram seladas em bico de Bunsen e o material foi hidrolisado em autoclave a 121°C, 1,5 atm por 1 h. Após hidrólise, o pH da solução foi neutralizado com hidróxido de sódio (NaOH) 50%. As amostras foram purificadas utilizando resinas Dowex catiônica e aniônica, quantificadas quanto ao teor de açúcares totais e analisadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPAEC/PAD) (conforme itens 1.6 e 1.7 Parte 1). Os monossacarídeos neutros foram eluídos isocraticamente com NaOH 16 mM, com fluxo de 0,25 ml min⁻¹, em tempo de corrida de 35 min, e identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais (Sigma) de fucose, ramnose, arabinose, galactose, glucose, xilose e manose. Com base nessas análises foi calculada a razão manose:galactose do galactomanano.

4.4 Ensaios enzimáticos

Foram analisadas as atividades das enzimas: α-galactosidase, endo-β-mananase e β-manosidase relacionadas à degradação do galactomanano utilizando os endospermas de leucena.

4.4.1 Extração e quantificação das atividades de α-galactosidase e β-manosidase

A extração de α-galactosidase (EC 3.2.1.22) e de β-manosidase (EC 3.2.1.25) foi realizada conforme descrito por Reid & Meier (1973) e Buckeridge & Dietrich (1996), sendo utilizados 50 mg de endosperma de sementes de leucena dos ensaios de co-germinação com 2 sementes de sesbania ou de germinação com água destilada autoclavada (controle) (item 4.2). As amostras foram maceradas usando nitrogênio líquido, homogeneizadas em 1 mL de

tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,8) e os extratos deixados em repouso por 30 minutos em banho de gelo. A seguir, os extratos foram centrifugados a 13000 g por 5 minutos em microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5415R (5 °C) e o sobrenadante recuperado.

As atividades da α -galactosidase e β -manosidase foram avaliadas utilizando 10 μ L de extrato, 10 μ L de tampão McIlvaine (fosfato de sódio 200 mM + ácido cítrico 100 mM) pH 4,4 e 10 μ L de substrato específico *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (PNP, Sigma) a 50 mM (α -galactosidase) e *p*-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (β -manosidase) incubando-se a mistura por 20 minutos a 45°C. A atividade foi interrompida acrescentando 1 mL de carbonato de sódio 200 mM e o produto formado foi quantificado por leitura das absorbâncias (405 nm) em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201). O coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenil (18400 M⁻¹ cm⁻¹) (Reid & Meier 1973) foi usado para calcular a quantidade de *p*-nitrofenol liberado em unidades de μ mol galactose min⁻¹ mg⁻¹ e μ mol manose min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Todas as análises foram realizadas em triplicatas técnicas para cada uma das três replicatas biológicas.

4.4.2 Extração e quantificação da atividade endo-1,4- β -mananase

Para a extração de endo-1,4- β -mananase (EC 3.2.1.78) foram utilizados 100 mg de endosperma de sementes de leucena congelados e macerados (item 4.2). 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 minutos sob agitação (vortex) em banho de gelo e, em seguida, o material foi centrifugado a 13000 g por 5 minutos em microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5415R (5°C) e o sobrenadante recolhido. Alíquotas (500 μ L) do extrato enzimático foram adicionadas a tubos de ensaio de vidro (16 x 120 mm) e mantidas a 40°C por 5 minutos. A atividade de endo-1,4- β -mananase foi avaliada utilizando pastilhas Beta-Mannazyme (Megazyme, lote 50201). A reação foi interrompida exatamente 10 minutos após a adição da pastilha com 10 mL de Trizma Base 2%, pH 8,5. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 5 min. e, em seguida, foram agitados e o conteúdo filtrado com papel Whatman N° 41. A absorbância das soluções foi lida a 590 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201). As análises foram realizadas em triplicatas. A atividade foi calculada, sendo uma unidade (U) de enzima definida de acordo com as pastilhas Beta-Mannazyme (Megazyme, Lote 50201).

4.4.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada em todos os extratos enzimáticos utilizando o método de Bradford (1976), tendo albumina de soro bovino 1 mg mL^{-1} (Sigma) como padrão.

5 Resultados

5.1 Efeito da co-germinação de sesbania sobre a germinação, crescimento inicial e mobilização dos carboidratos de reserva de leucena

A presença de sementes de sesbania reduziu a porcentagem de germinação das sementes de leucena. Apesar da tendência de redução já ser observada com duas sementes, diferenças significativas foram encontradas apenas na presença de cinco sementes de sesbania, com inibição em 70% comparada ao controle (Figura 9 A). O índice de velocidade de germinação (IVG) foi reduzido com o aumento do número de sementes de sesbania, atingindo valores de inibição de 72% na presença de cinco sementes (Figura 9 B). O tempo médio de germinação foi maior quando sementes de leucena foram co-germinadas com duas e três sementes de sesbania, sendo observada menor sincronização da germinação das sementes de leucena na presença de número crescente de sementes de sesbania (Figura 9 C).

Ao final do ensaio de co-germinação com sesbania, verificou-se menor massa fresca das plântulas de leucena germinadas na presença de cinco sementes de sesbania, porém, a co-germinação não alterou a massa seca (Figura 9 D). Por outro lado, houve drástica redução no comprimento radicular e do hipocótilo das plântulas de leucena, atingindo valores de inibição de 95 e 91%, respectivamente, na presença de cinco sementes de sesbania comparadas ao controle (Figura 9 E e F).

A Figura 10 mostra o efeito do número crescente das sementes de sesbania sobre o desenvolvimento das plântulas de leucena, após cinco dias de tratamento. Observa-se nitidamente a redução do comprimento radicular e inibição do hipocótilo com quatro e cinco sementes de sesbania, assim como, alterações na coloração, morfologia e no diâmetro das raízes primárias de leucena, evidenciando a ação alelopática das sementes de sesbania sobre a espécie-teste. Por outro lado, o aumento do número de sementes de leucena não afetou significativamente a germinação e o crescimento e desenvolvimento das plântulas de sesbania (dados não apresentados).

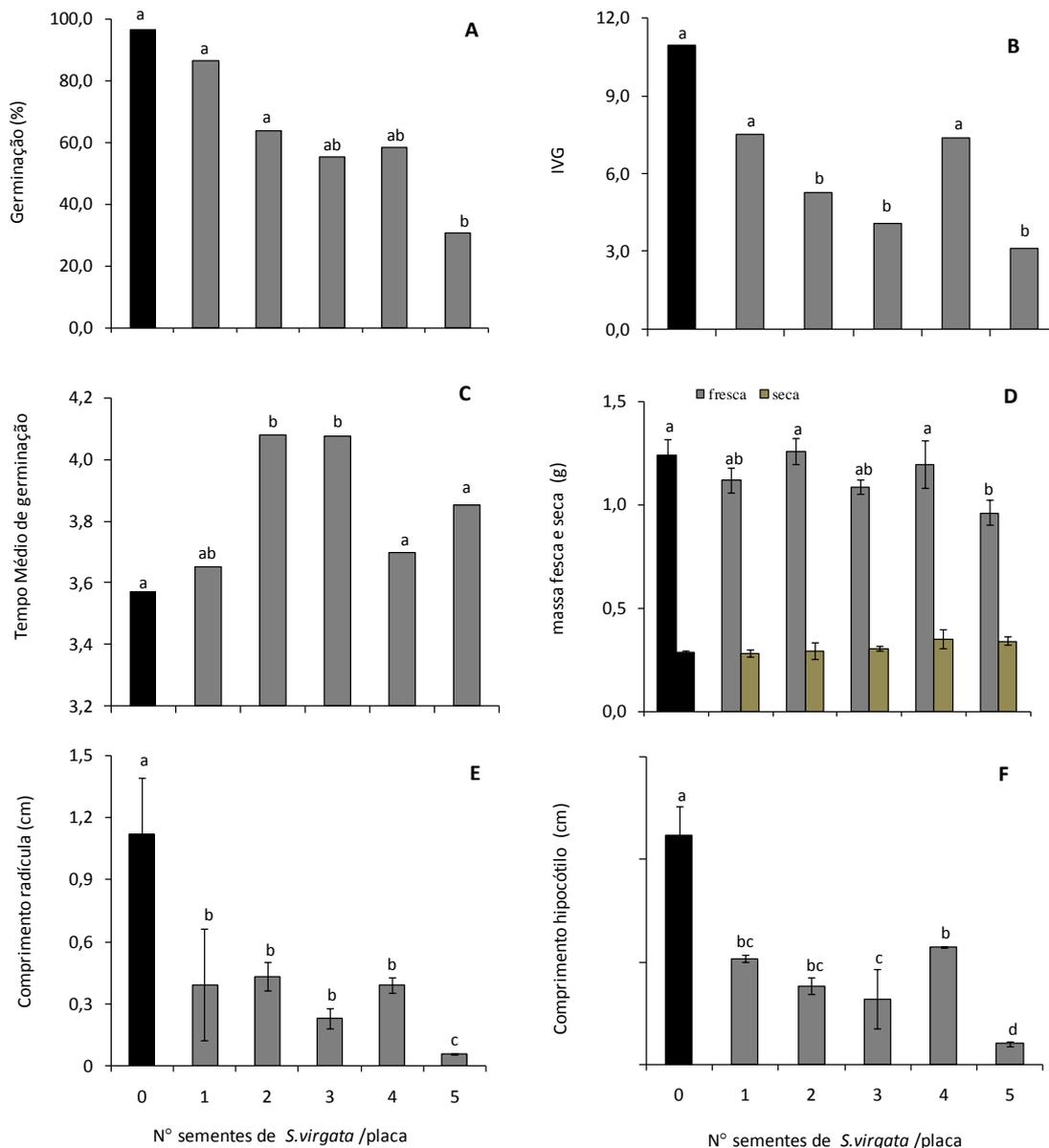


Figura 9. Efeito do número crescente de sementes de sesbania na germinação (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), tempo médio de germinação (C), massa fresca e seca (D), comprimento da radícula (E) e comprimento do hipocótilo (F) das sementes e plântulas de leucena após cinco dias de germinação. (■) Controle (sem sesbania) e (■) Co-germinação. As barras representam o desvio padrão das médias N=3 (12 sementes/replicata). As letras diferentes representam as diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05).



Nº sementes *S. virgata*/placa

Figura 10. Aspecto das plântulas de leucena germinadas na presença de um número crescente de sementes de sesbania, após cinco dias de germinação. O controle refere-se à plântula de leucena germinada em água destilada sem a presença de sementes de sesbania. A seta indica a raiz de leucena com alteração de coloração e forma.

No que se refere à mobilização dos carboidratos de reserva, a partir de duas sementes de sesbania foi observado atraso na degradação dos carboidratos solúveis nas sementes e plântulas de leucena e o efeito persistiu com o aumento do número de sementes (Figura 11). Isso foi comprovado com a detecção de menores quantidades de glicose e de frutose, embora, para glicose tenha sido observada apenas tendência de redução (Figura 11 A e B) e maiores teores de sacarose e oligossacarídeos da série rafinose (rafinose e estaquiose) (Figura 11 C, D e E), comparados ao controle. Na Figura 12, o perfil cromatográfico por HPLC confirma o atraso na mobilização dos carboidratos de reserva de leucena quando germinadas na presença de sementes de sesbania. Além disso, foi observada redução significativa no acúmulo de amido nas plântulas de leucena quando co-germinadas com duas ou mais sementes de sesbania. Embora a presença de uma semente de sesbania pareça promover o acúmulo de amido, não foi observada diferença estatística quando comparada ao controle (Figura 13).

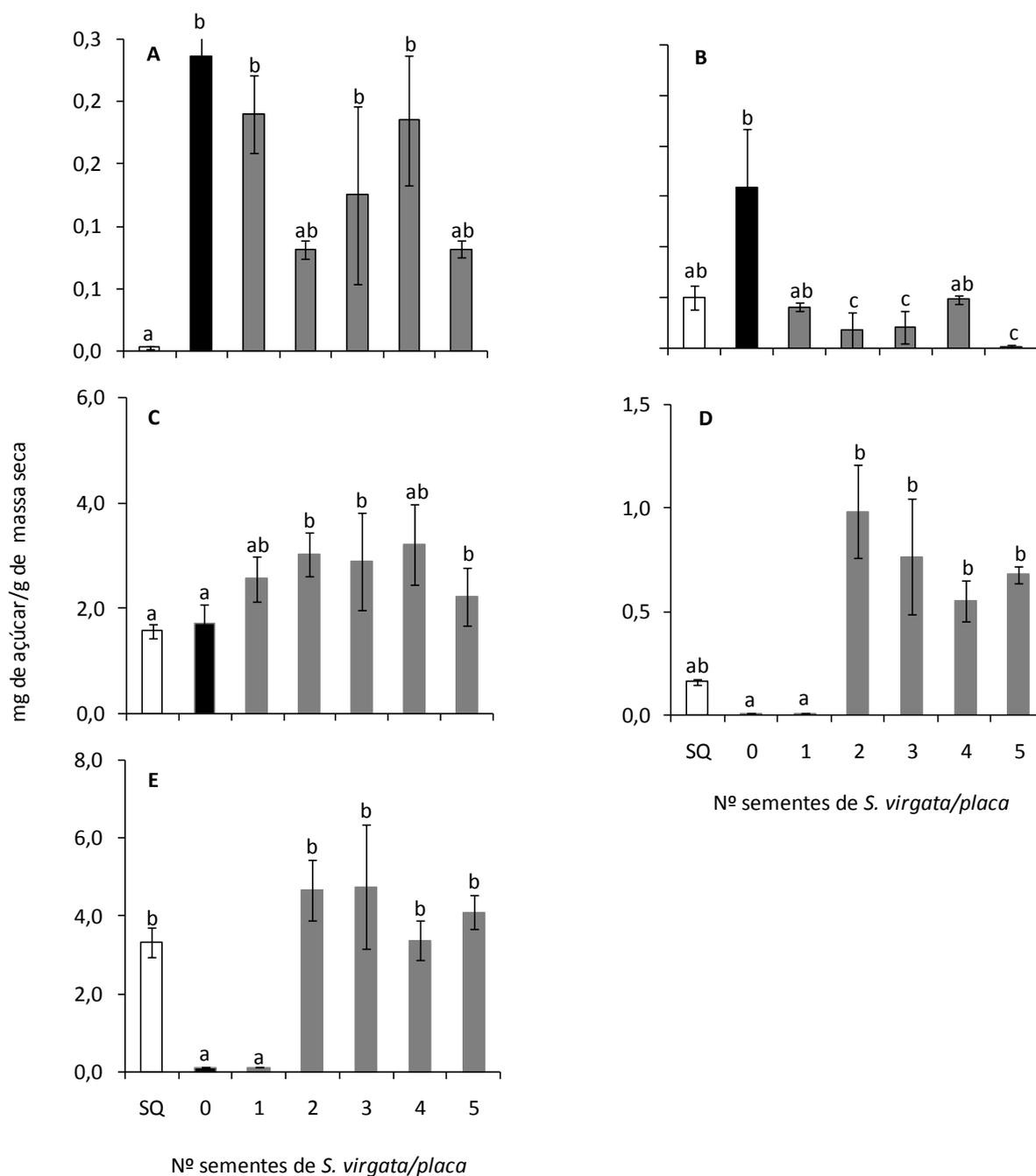


Figura 11. Conteúdo dos carboidratos solúveis das sementes e plântulas de leucena após cinco dias de germinação obtido por análise em HPAEC/PAD. Glucose (A), Frutose (B), Sacarose (C), Rafinose (D) e Estaquiase (E). (□) Sementes quiescentes (SQ), (■) Controle (0) semente germinada sem a presença de sesbania e (■) Co-germinação (1 a 5). As barras representam o erro padrão das médias N=3 (12 sementes/replicata). Letras iguais não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05).

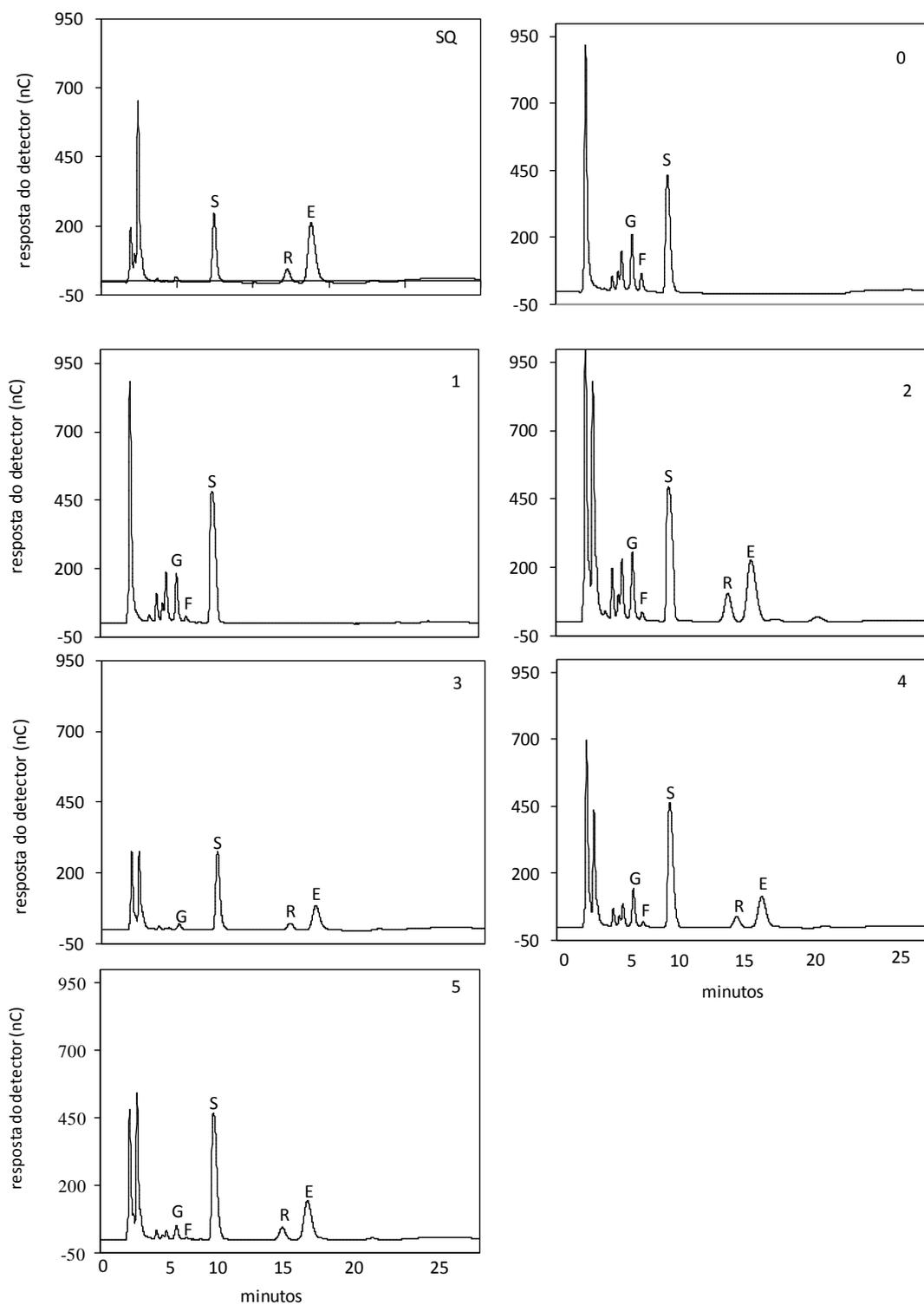


Figura 12. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos açúcares solúveis em leucena após cinco dias de germinação. Sementes quiescentes (SQ), sementes controle (0) sementes sem a presença de sesbania ou sementes co-germinadas com número crescente com sementes de sesbania (1 a 5). G= Glucose, F=Frutose, S=Sacarose, R=Rafinose e E= Estaquiiose.

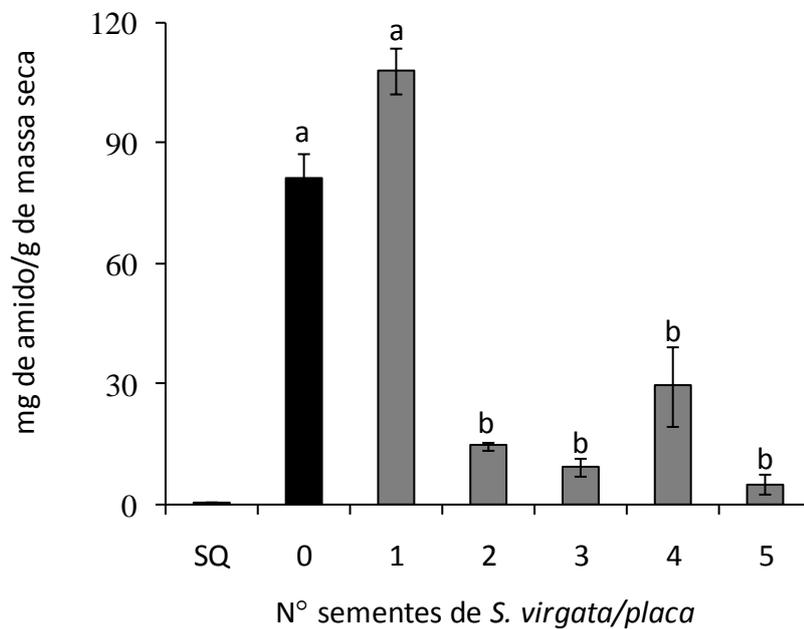


Figura 13. Conteúdo de amido das sementes e plântulas de leucena após cinco dias de germinação, sem a presença de sementes de sesbania (0) ou co-germinadas com número crescente de sementes de sesbania (1 a 5) e em sementes quiescentes (SQ). (□) semente quiescente, (■) Controle (sem sesbania) e (▒) Co-germinação. As barras representam o erro padrão das médias N=3 (12 sementes/replicatas). As letras diferentes representam as diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05).

5.2 Mobilização do galactomanano e atividade de enzimas relacionadas ao processo de degradação do galactomanano no endosperma de leucena co-germinadas com duas sementes de sesbania

5.2.1 Análises no endosperma

Foi observado decréscimo na massa fresca e na massa seca do endosperma das sementes de leucena germinadas com água destilada durante o processo de embebição e germinação, indicando a degradação dos carboidratos de reserva presentes neste tecido. Em contraste, verificou-se massas fresca e seca significativamente maiores nos endospermas de sementes de leucena co-germinadas com duas sementes de sesbania, principalmente no 4º e 5º dia de germinação (Figura 14 A e B).

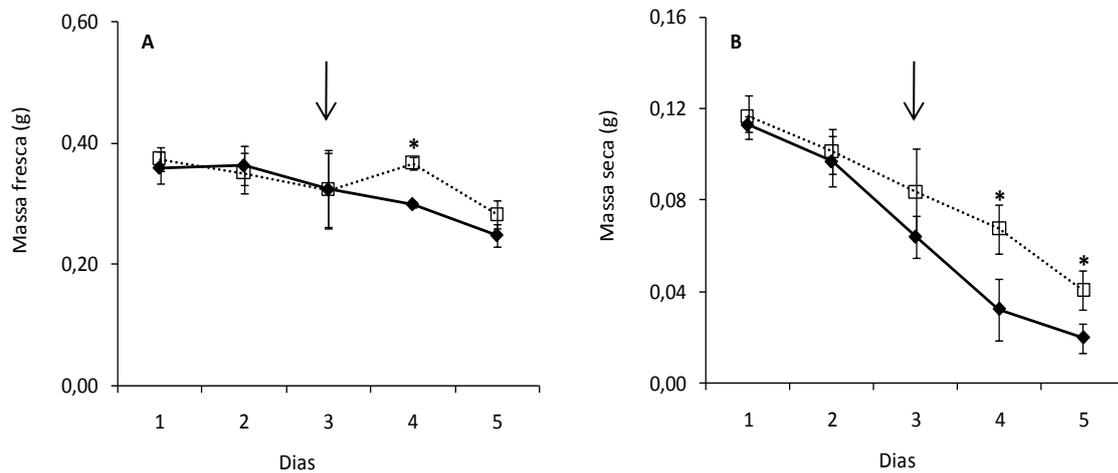


Figura 14. (A) Massas fresca e seca (B) do endosperma de leucena durante cinco dias de germinação. (♦) Controle (sem a presença de sesbania) e (□) co-germinação (duas sementes de sesbania). As barras representam o desvio padrão da média, N=3 (12 sementes/ replicata). As setas indicam o início da degradação do galactomanano. (*) Refere-se à diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey ($P<0,05$).

Com relação à atividade das enzimas responsáveis pela degradação do galactomanano presente nos endospermas de leucena foi observada maior atividade total e específica da α -galactosidase no 1º dia do processo de embebição (Figura 15 A e B). Apesar da tendência de menor atividade das enzimas nos endospermas das sementes co-germinadas, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos neste período. A atividade da enzima decresceu no 2º dia, porém, permaneceu maior no endosperma das sementes co-

germinadas com sesbania ao longo do processo germinativo, apresentando diferença significativa no 3º e 4º dias comparada ao controle.

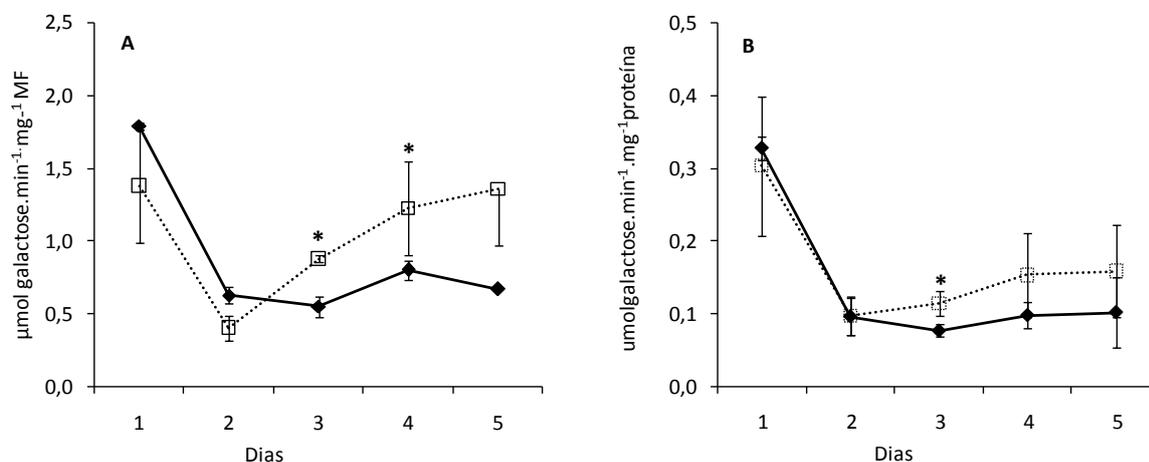


Figura 15. Atividade total (A) e específica (B) de α -galactosidase do endosperma de leucena durante cinco dias de germinação. (◆) Controle e (□) co-germinação com 2 sementes de sesbania. As barras representam o desvio padrão da média, N=3 (12 sementes por replicata). (*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05).

Quando comparados os tratamentos controle e co-germinação, não foi observada diferença significativa na atividade total da β -manosidase durante os cinco dias de tratamento (Figura 16 A). Para a atividade específica desta enzima somente foi detectada diferença significativa no 1º dia do início da embebição (Figura 16 B). Esses resultados estão coerentes com a ausência de diferença na proporção de manose no mesmo período (Figura 17).

A atividade total e específica de endo- β -mananase nos endospermas das sementes de leucena co-germinadas foi detectada somente a partir do 2º dia de embebição em comparação ao controle, indicando que sua atividade foi alterada em função da co-germinação. Ao longo do processo germinativo, a atividade desta enzima foi menor nos endospermas co-germinados, embora, diferença estatística somente tenha sido encontrada no 2º dia de embebição para a atividade total e no 5º dia de germinação para a atividade específica (Figura 18 A e B).

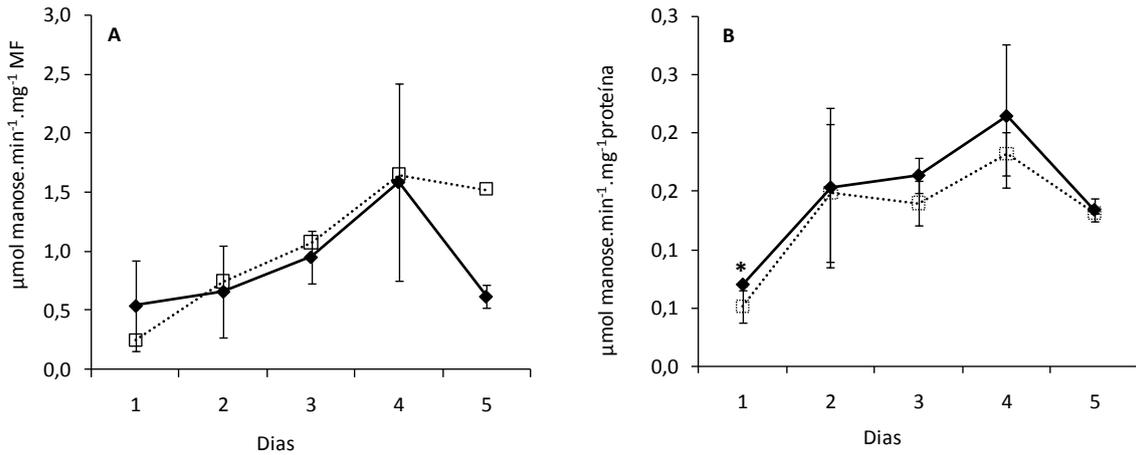


Figura 16. Atividade total (A) e específica (B) de β -manosidase do endosperma de leucena durante cinco dias de germinação. (♦) Controle e (□) co-germinação com 2 sementes de sesbania. As barras representam o desvio padrão da média, N=3 (12 sementes por replicata). (*) Refere-se à diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05).

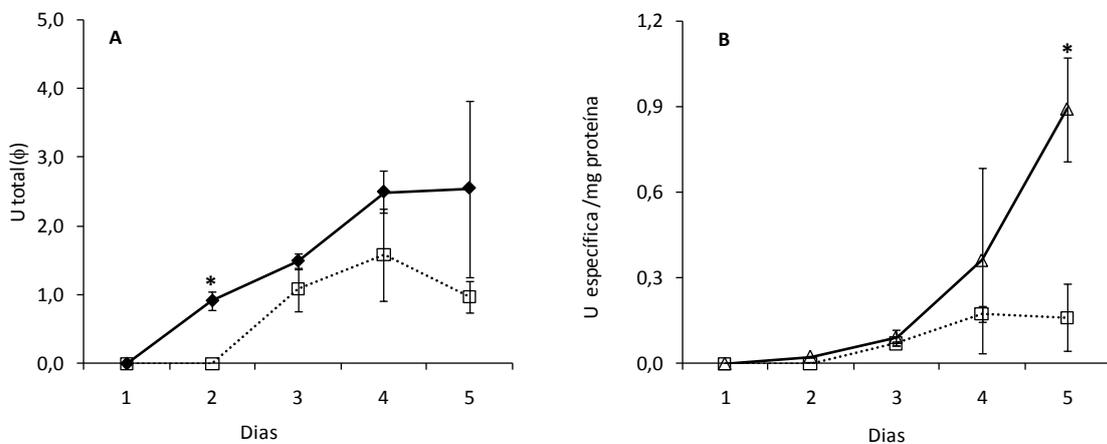


Figura 17. Atividade total (A) e específica (B) de endo- β -mananase do endosperma de leucena durante cinco dias de germinação. (♦) Controle e (□) co-germinação com 2 sementes de sesbania. As barras representam o desvio padrão da média, N=3 (12 sementes por replicata). (*) Refere-se à diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05). (φ) Uma unidade (U) de enzima foi definida de acordo com as pastilhas Beta-Mannazyme (Megazyme, Lote 50201).

A análise dos monossacarídeos por HPAEC/PAD evidenciou a presença de manose e galactose como monossacarídeos majoritários no endosperma de leucena. Maior proporção de galactose foi encontrada nos endospermas das sementes co-germinadas no 1º e 2º dia de embebição comparada ao controle, enquanto que manose não diferiu estatisticamente ao longo do período do ensaio de co-germinação (Figura 18). Arabinose, xilose e glucose também foram detectados, porém, em menor proporção. Os teores de glucose foram significativamente menores no 1º e 2º dia de embebição nos endospermas das sementes co-germinadas comparadas ao controle, enquanto arabinose e xilose não diferiram entre os tratamentos durante o ensaio (Figura 18).

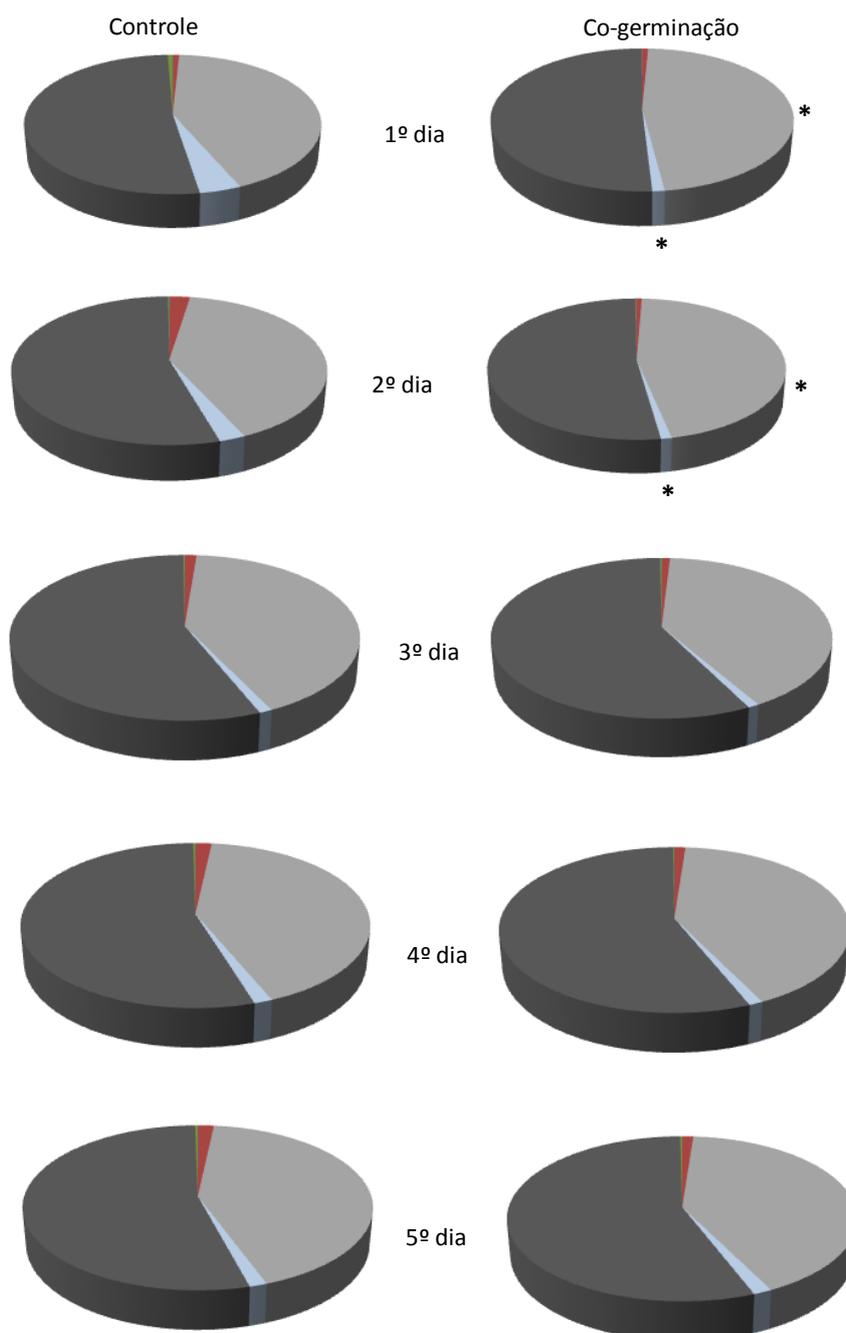


Figura 18. Proporção relativa de monossacarídeos neutros (%) encontrada no endosperma de leucena durante cinco dias de germinação em água destilada, sem a presença de sesbania (Controle) e na co-germinação com 2 sementes de sesbania, determinada por HPAEC/PAD, N=3 (12 sementes por replicata). (■) Arabinose, (■) Glucose, (■) Galactose, (■) Manose e (■) xilose. (*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05).

6 Discussão

Durante o processo de embebição e germinação das sementes de sesbania diversas substâncias são exsudadas, como açúcares, material protéico e compostos fenólicos, sendo que a exsudação destas decresce ao longo do processo germinativo (Simões 2008). De acordo com a Figura 9A, os resultados dos experimentos da co-germinação demonstraram que as substâncias exsudadas pelas sementes de sesbania afetam negativamente a germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) de leucena, efeito este intensificado com o aumento do número de sementes. Veronesi (2013) verificou que a presença de uma semente de sesbania na co-germinação com duas espécies nativas que co-ocorrem com sesbania (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong e *Peltophorum dubium*) afeta de forma positiva a germinação e o IVG, indicando que as substâncias exsudadas possam exercer efeito estimulante para estas espécies. Por outro lado, o aumento do número de sementes de sesbania (1 a 5/placa) causou efeitos drásticos na germinação e crescimento das sementes e plântulas de tomate. Entretanto, sementes de alface foram menos sensíveis aos efeitos da co-germinação com sesbania (Simões 2008). El Id *et al.* (2015) analisaram o efeito alelopático da co-germinação com número variável de sementes de sesbania (5 e 10/placa) sobre a germinação e o desenvolvimento de duas espécies florestais (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong e *Sapindus saponaria* L.) e em duas espécies agrônomicas (*S. lycopersicum* e *O. sativa*) sob condições laboratoriais e em viveiro. Os autores verificaram atraso na germinação para as espécies agrônomicas e redução do crescimento das plântulas em todas as espécies avaliadas. De acordo com o presente estudo, maior efeito das sementes de sesbania sobre leucena foi observado com o aumento do número de sementes e, por conseguinte, das concentrações das substâncias exsudadas. Interessante notar que, embora sementes de sesbania exsudem substâncias que afetam o crescimento de leucena, esta também libera compostos bioativos ao longo do processo germinativo, como a mimosina, descrita como um potente herbicida (Xuan *et al.* 2006). Entretanto, seus exsudatos e a mimosina comercial não afetaram o crescimento e desenvolvimento de sesbania, sugerindo a presença de estratégias de resistência de sesbania aos aleloquímicos liberados por essa espécie exótica (dados não mostrados).

Zangh *et al.* (2011) avaliaram o efeito da co-germinação com número crescente de sementes (5, 10, 20 e 40) de *Ligularia virgaurea*, uma espécie invasora em áreas degradadas

na China, sobre sementes de gramíneas nativas. Os resultados apontaram dois grupos de espécies de acordo com a sensibilidade diante da toxicidade dos aleloquímicos liberados por sementes de *L. virgaurea*. O primeiro grupo refere-se às espécies sensíveis: *Festuca sinensis* e *Agrostis gigantean*, que sofreram forte inibição da germinação e do crescimento inicial com o aumento do número de sementes de *L. virgaurea* e como estratégia de sobrevivência, aumentaram o tempo médio de germinação. O segundo grupo, menos sensível (*Bromus inermis* e *Elymus nutans*) teve menor inibição nos parâmetros avaliados. Os autores concluíram que nas áreas onde *L. virgaurea* é invasora é comum encontrar mais espécies do segundo grupo, ou seja, menos sensíveis aos aleloquímicos de suas sementes, se comparadas às espécies do primeiro grupo. Além disso, sugeriram que a alta produção de sementes e consequente liberação de aleloquímicos pode ser uma estratégia da espécie invasora para reduzir a competição. El Id (2012) (comunicação pessoal) fez um levantamento no município de Lavras-Minas Gerais (Brasil) das espécies que ocorrem no mesmo ambiente de sesbania. Algumas das espécies como: *Croton urucurana* Baill., *Copaifera langsdorffii* Desf., e *Psidium guajava* L. foram encontradas próximas de sesbania, enquanto leucena cresce à uma distância maior. De acordo com o presente estudo, em condições naturais, leucena pode não ocorrer em locais onde sesbania cresce, visto que, apresentou sensibilidade aos aleloquímicos das sementes da espécie nativa.

Quando sementes de espécies sensíveis são expostas a aleloquímicos a germinação pode ser inibida, mas caso ela ocorra, as plântulas podem ser afetadas (Rice 1979). Recentemente, exsudatos de sementes de agrião (*Lipidium sativum*) na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estimularam o crescimento do hipocótilo e reduziram o comprimento radicular de *Amaranthus caudatus* comparados ao controle (Iqbal & Fry 2012). Os autores sugerem que estes efeitos de estímulo estão relacionados ao alongamento das células epidérmicas do hipocótilo e não na divisão celular, já que análises por microscopia revelaram que o número de células não aumentou significativamente (28%) para acompanhar o ritmo do alongamento total do hipocótilo (129%) e isto resultou na redução da circunferência do mesmo. No presente estudo, as plântulas de leucena co-germinadas com sementes de sesbania apresentaram redução no crescimento do hipocótilo, diferenças morfológicas nas raízes primárias e coloração escura, o que não ocorre com as plântulas do controle, indicando efeito das substâncias de sesbania sobre o crescimento dos diferentes órgãos (Figura 10). Segundo Yamagushi *et al.* (2011), o escurecimento, a fragilidade e as alterações morfológicas das raízes são danos que indicam a ação de substâncias tóxicas presentes nos extratos. Catequina,

BOA e ácido cinâmico, substâncias tóxicas para algumas espécies de plantas, agem no meristema radicular induzindo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) desencadeando diversas sinalizações incluindo mudanças na expressão gênica e, por vezes, levando a morte celular do tecido e órgão (Soltys *et al.* 2013). Chi *et al.* (2011) verificaram que o aleloquímico juglona induziu o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) em sementes de arroz ainda nas primeiras horas, provocando diminuição do comprimento da radícula, diferenças morfológicas e também escurecimento em relação as plântulas do controle.

A coloração escura observada nas raízes de leucena (Figura 10) por co-germinação com sesbania já foi observada e descrita em raízes de outras espécies como: *E. contortisiliquum* e *P. dubium*, espécies cultivadas (tomate e arroz) e *Arabidopsis thaliana* quando germinadas e crescidas na presença dos exsudatos ou das sementes de sesbania. Esse efeito é muito similar ao observado quando as espécies são submetidas a germinação com a (+)-catequina comercial, um flavonóide, presente nos exsudatos de sementes de sesbania (Simões 2008; Veronesi 2013; Coelho 2014; El Id *et al.* 2015). Efeitos semelhantes também foram observados em raízes de *Arabidopsis thaliana* e alface quando cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de uma mistura racêmica de (\pm)-catequina em ensaios (Duke *et al.* 2009). Bais *et al.* (2003) descrevem que 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 conseqüente condensação do citoplasma e morte celular.

Reduções significativas observadas no comprimento das plântulas de leucena no presente trabalho foram confirmadas pelas diferenças nas massas frescas, principalmente quando leucena foi germinada na presença de cinco sementes de sesbania (Figura 9 D). El Id *et al.* (2015) verificaram menores massas fresca e seca das plântulas de tomate, arroz, *E. contortisiliquum* e *S. saponaria* após co-germinação com cinco e dez sementes de sesbania. Esses dados confirmam a ação alelopática das sementes de sesbania com maior intensidade sobre o crescimento e desenvolvimento das plântulas de diferentes espécies.

Os aleloquímicos, além de inibirem a germinação ou determinar o ritmo de crescimento das plântulas, podem interferir no processo de mobilização de substâncias de reserva necessárias ao crescimento, afetando as enzimas envolvidas neste processo (Kamal 2011). Neste estudo, foi observado atraso na mobilização dos carboidratos solúveis em leucena com

o aumento do número de sementes de sesbania. Buckeridge & Dietrich (1996) descrevem que os oligossacarídeos da série da rafinose (rafinose, estaquiose e verbasose) são os primeiros carboidratos de reserva mobilizados durante a germinação das sementes de *S. marginata* (= *virgata*) e também em outras espécies de leguminosas como *Trigonella foenum-graecum*, *Dimorphandra mollis*, *E. contortistilium* e *P. dubium*. Esses açúcares são encontrados tanto no embrião quanto no endosperma e, como consequência da mobilização destes, ocorre acúmulo de galactose e sacarose livres nesses tecidos (Reid 1971; Buckeridge *et al.* 1995; Veronesi *et al.* 2014). O processo de degradação dos oligossacarídeos da série rafinósica ocorre pela ação de enzimas hidrolíticas, sendo a α -galactosidase responsável pela hidrólise das unidades de galactose da rafinose, estaquiose e verbasose e as invertases pela quebra da sacarose em glucose e frutose livres (Buckeridge *et al.* 2004). Este processo de mobilização ocorre logo após a hidratação dos tecidos, porém antes da protusão da radícula, e os produtos da mobilização servem como fonte de energia para a germinação (Buckeridge & Dietrich 1996). Chien *et al.* (1996) observaram que as sementes leucena acumulam maior quantidade de estaquiose, seguida de sacarose e rafinose durante o processo de maturação, o mesmo foi observado neste trabalho nas sementes quiescentes de leucena (Figura 11). Embora diferenças significativas não tenham sido encontradas no teor de matéria seca ao final do ensaio de co-germinação, constatou-se atraso na mobilização dos carboidratos solúveis das plântulas de leucena (Figura 10 e 11), com menor degradação de oligossacarídeos da série rafinósica (rafinose e estaquiose) e da sacarose por ação dos exsudatos de sesbania. Como consequência, foram observados baixos teores de glucose e frutose, indicando efeito dos aleloquímicos exsudados das sementes de sesbania. Entretanto, não é possível inferir se o atraso na mobilização dos oligossacarídeos se dá no endosperma ou no embrião, visto que os extratos utilizados para a quantificação destes açúcares foram obtidos das sementes e plântulas inteiras, não sendo analisada a degradação dos carboidratos de forma isolada nos diferentes tecidos.

Veronesi (2013) verificou, em ensaios de co-germinação com sesbania, menores teores de carboidratos solúveis tanto nos embriões quanto nos endospermas de *P. dubium*, entretanto, não houve diferenças nas atividades de α -galactosidase e invertase, sugerindo que os menores teores dos carboidratos solúveis possam estar relacionados com a força de dreno do embrião em desenvolvimento associado com o aumento do índice de velocidade de germinação de *P. dubium* quando co-germinadas com sesbania. Lara Núñez *et al.* (2009) verificaram que os lixiviados aquosos de partes aéreas de *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae)

causaram atraso na degradação dos carboidratos de reserva e reduziram a atividade de enzimas do metabolismo de sacarose nas sementes de tomate, sugerindo que houve menor disponibilidade de glicose e frutose para o crescimento e desenvolvimento do embrião. Essa condição também poderia explicar os baixos teores de glicose e frutose encontrados em leucena co-germinadas (Figura 11 A e B).

Segundo Bewley *et al.* (2013), sementes que acumulam mananos e galactomananos como carboidratos de reserva de parede celular normalmente não acumulam amido em seus tecidos durante a formação da semente. No entanto, após a germinação, há um aumento no nível deste polissacarídeo de reserva nessas sementes devido à mobilização dos carboidratos presentes no endosperma, que fornece quantidades elevadas de monossacarídeos transportados a partir deste tecido e armazenados no embrião (Buckeridge & Dietrich 1996; Dirk *et al.* 1999). Conforme esperado, nas sementes de leucena, que possuem endosperma, foi observado acúmulo de amido quando germinadas em água destilada ou na presença de uma semente de sesbania. Por outro lado, foi verificado atraso significativo no acúmulo de amido em suas sementes quando da co-germinação com pelo menos duas sementes de sesbania (Figura 13). Esses resultados indicam efeito dos exsudatos destas sementes sobre o metabolismo do amido no desenvolvimento inicial de leucena, possivelmente devido o atraso da mobilização dos oligossacarídeos da série da rafinose oriundos do endosperma. Além disso, esses resultados levaram à escolha de duas sementes de sesbania para os experimentos subsequentes.

Além dos oligossacarídeos da série da rafinose, muitas sementes de leguminosas, possuem o galactomanano como carboidrato de reserva presente no endosperma que, após a protusão da radícula, é completamente hidrolisado produzindo manose e galactose. Estes monossacarídeos servem como fonte de energia para o crescimento da plântula (Buckeridge & Dietrich 1996; Potomoti & Buckeridge 2002; Pollard *et al.* 2008). Três enzimas estão envolvidas na degradação do galactomanano: a α -galactosidase (EC 3.2.1.22), a endo- β -mannanase (EC 3.2.1.78) e a β -mannosidase (EC 3.2.1.25) (Reid & Meier 1972; McCleary & Mathenson 1976; Buckeridge & Dietrich, 1996). As sementes de leucena contêm cerca de 20-25% de galactomanano, composto de 57% de manose e 43% de galactose (Unrau 1961). No presente trabalho, esta proporção de manose e galactose foi muito similar apresentando valores de 54 e 42 % respectivamente, entretanto, não foi possível calcular o teor do galactomanano devido o baixo rendimento. Recentemente, Nwokocha & Willians (2012) obtiveram rendimento de apenas 9% do polissacarídeo a partir de sementes leucena. Este

valor é menor do que o rendimento de 15-30% usualmente encontrado nas sementes da espécie (Unrau 1961; Pamplona & Zerrudo 2008).

Em sementes de *S. marginata* (=virgata), na medida em que ocorre diminuição da massa seca dos endospermas, aumenta a do embrião, indicando que os produtos da degradação do galactomanano (manose e galactose) são rapidamente translocados para o embrião em crescimento (Buckeridge & Dietrich 1996). Na Figura 14 B, o decréscimo de massa seca dos endospermas das sementes controle de leucena ao longo do processo germinativo indica a mobilização do galactomanano. Já a co-germinação com duas sementes de sesbania causou aumento das massas a partir do 3º dia após a embebição, período em que se inicia o processo de degradação do galactomanano, sugerindo que a exsudação de substâncias alelopáticas das sementes de sesbania pode interferir na degradação deste polissacarídeo (Figuras 14 A e B). Potomati & Buckeridge (2002) observaram maior massa fresca nos endospermas e menor nos embriões de sesbania após sete dias de germinação na presença do ácido abscísico (ABA) (10^{-4} M) comparada ao controle. Os autores descrevem que a menor massa fresca encontrada no embrião é consequência do efeito do hormônio que atrasou a degradação do galactomanano no endosperma que apresentou baixa atividade de α -galactosidase, indicando interferência do ABA na mobilização das reservas de sesbania.

No presente estudo, os resultados obtidos referentes à degradação do galactomanano mostraram discretas diferenças no conteúdo dos monossacarídeos derivados da mobilização (Figura 18). Pequena quantidade de arabinose, xilose e glucose foi observada nos endospermas das sementes de leucena. A glucose foi detectada em menores proporções no início da embebição nos endospermas co-germinados. Isso possivelmente, se deve ao atraso na mobilização dos oligossacarídeos da série rafinose e não na mobilização do galactomanano, já que este é composto principalmente por manose e galactose (Figura 18). Por outro lado, de acordo com McCleary (1983), em sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), manose e galactose podem ser convertidas em glucose no embrião em desenvolvimento.

No endosperma das sementes de leucena co-germinada com sesbania, a atividade α -galactosidase foi maior a partir do 3º dia comparada ao controle, entretanto, neste mesmo período, não foi observada diferença significativa na proporção da galactose presente no tecido, somente no início do processo de embebição das sementes (Figura 18). Tonini *et al.* (2007) detectaram atividade de α -galactosidase no endosperma de sementes de sesbania

somente a partir do 2º dia de embebição com pico no 3º dia, porém, a ausência do tegumento durante a embebição levou ao aumento da atividade da α -galactosidase e degradação do galactomanano, indicando que o tecido possa desempenhar um papel importante durante a mobilização do galactomanano na semente de sesbania, participando do controle da produção, modificação e/ou armazenamento das hidrolases. Em algumas sementes como *Cyamopsis tetragonolobus* (guar), *Trigonella foenum-graecum* e *Medicago sativa* a mobilização do galactomanano no endosperma requer a participação da camada do aleurona (Reid & Meier 1972; Reid 1985). De acordo com Lisboa *et al.* (2006), a ação da α -galactosidase no galactomanano é uma condição necessária para promover o acesso da endo- β -mananase à cadeia principal do galactomanano em sementes de sesbania. Isto pode explicar a detecção da atividade α -galactosidase logo no início da embebição nos endospermas das sementes de leucena (Figura 15).

A enzima endo- β -mananase hidrolisa a cadeia principal de manose do galactomanano liberando manobiose e manotriose, que por sua vez, são hidrolisados a manose livre por ação de β -manosidase (Dirk *et al.* 1995). A proporção de manose presente nos endospermas de leucena não foi alterada do início ao fim do tratamento, assim como não foram observadas grandes diferenças na atividade β -manosidase (Figuras 16 e 17). Recentemente, Coelho (2014) verificou que a atividade da endo- β -mananase foi inibida em sementes de tomate germinadas na presença de aleloquímicos exsudados por sementes de sesbania. Entretanto, essa inibição não pode ser atribuída à catequina exsudada de suas sementes, já que a atividade da enzima não foi alterada quando as sementes foram tratadas com catequina comercial (1 mg mL⁻¹). Aleloquímicos de extratos de folhas de *Sycios deppei* reduziram significativamente a atividade endo- β -mananase nas sementes de tomate, enquanto que a atividade β -manosidase foi maior. Além disso, a expressão dos genes relacionados à atividade de endo- β mananase foi baixa nas sementes tratadas comparada ao controle (Lara Núñez *et al.* 2009). No presente estudo, a atividade endo- β -mananase nos endospermas de leucena também foi alterada na presença de sementes de sesbania, sugerindo que sua atividade possa ser controlada, alterada e/ou modulada por influência das substâncias exsudadas pelas sementes de sesbania.

Com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a presença de sementes de sesbania afetou a germinação, o crescimento e o desenvolvimento das plântulas de leucena. O aumento do número de sementes de sesbania atrasou a mobilização dos carboidratos de reserva da espécie exótica, evidenciado pelos maiores teores de oligossacarídeos da série rafínosica e consequente redução no acúmulo de amido de suas sementes. Por outro lado, a

co-germinação com duas sementes de sesbania não alterou de forma significativa a mobilização do galactomanano presente nos endosperma de sementes de leucena, já que não foram observadas grandes mudanças no conteúdo de açúcares durante o processo de degradação do polissacarídeo. Entretanto, alterou a atividade de α -galactosidase e endo- β -mananase. Em resumo, leucena mostrou-se sensível aos aleloquímicos exsudados das sementes de sesbania, os quais interferiram no seu desenvolvimento inicial.

Parte 3: Efeitos dos exsudatos de sementes de *S. virgata*, da catequina comercial e do ácido abscísico (ABA) na germinação e crescimento inicial das sementes e plântulas de *L. leucocephala*

7 Metodologia

7.1 Material Biológico

- Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers (sesbania) foram coletadas de matrizes existentes no município de Lavras, MG.
- Sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena) foram adquiridas no comércio local.

7.2 Ensaio de germinação das sementes de leucena com catequina comercial e exsudatos de sementes de sesbania

Sementes de sesbania foram escarificadas, desinfestadas e distribuídas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) (6 sementes em cada placa) contendo papel de filtro, à elas adicionadas 7 mL de água destilada, sendo germinadas em câmara climatizada do tipo BOD a 25°C, por cinco dias. A cada dia, as sementes de sesbania foram retiradas e nos seus exsudatos foram colocadas três sementes de leucena também escarificadas e desinfestadas. Em paralelo, três sementes de leucena foram colocadas em placas de Petri com catequina comercial (1mg mL⁻¹) e ou em água destilada, que foi utilizada como controle. O experimento foi realizado com cinco repetições com três sementes cada replicata, totalizando quinze sementes por tratamento. Diariamente, a germinação foi avaliada e no 5º dia o comprimento radicular e do hipocótilo foi medido. As massas frescas foram obtidas com o auxílio de balança, e o material posteriormente foi seco em liofilizador e pesado novamente e determinado a massa seca.

7.3 Quantificação de ABA nos exsudatos de sementes de sesbania

As extrações de ABA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da USP, com a colaboração do Dr. Luciano Freschi, sob as mesmas condições já descritas no item 1.5 (Parte 1).

7.4 Ensaio com inibidor da síntese de ABA

Neste ensaio foi utilizado fluridona como inibidor da síntese de ABA. Um primeiro teste foi feito sem o conhecimento prévio das reais concentrações de ABA presentes nos exsudatos de sesbania. Dessa forma, sementes de sesbania e de leucena foram escarificadas, desinfestadas e co-geminadas (proporção 2:1) em uma placa de Petri (9 cm) contendo papel de filtro embebido com 0,7 ml/semente de água destilada, ABA ou fluridona (inibidor de ABA) comercial (Sigma) nas concentrações de 10 e 100 μM . As sementes foram germinadas sob as mesmas condições descritas no item acima 7.2. Como controles foram utilizadas sementes de leucena ou de sesbania germinadas separadamente em ABA, fluridona ou água destilada. Após o conhecimento da quantidade de ABA exsudado por semente de sesbania, um novo ensaio foi realizado. Sementes de sesbania e leucena foram novamente co-germinadas (proporção 2:1) na presença de ABA, fluridona (~670 nmoles/placa) e ou com água destilada autoclavada. As sementes das espécies foram germinadas separadamente conforme ensaio anterior e, em ambos os ensaios, a germinação foi avaliada diariamente. No 5º dia, as plântulas de leucena foram retiradas das placas de Petri e avaliadas quanto o comprimento radicular e do hipocótilo. As massas frescas foram obtidas com o auxílio de balança, e o material foi posteriormente seco em liofilizador e pesado.

8 Resultados

8.1 Efeito dos exsudatos brutos de sementes de sesbania e de substâncias isoladas sobre a germinação e crescimento inicial de leucena

De acordo com os dados, a porcentagem de germinação e o IVG das sementes de leucena foram reduzidos quando germinadas na presença de substâncias exsudadas no 2º dia por sementes de sesbania. Embora, tenha sido observada tendência a redução em comparação ao controle, exsudatos do 3º e 5º dia não afetaram significativamente esses parâmetros. Exsudatos do 2º ao 4º dia também reduziram significativamente o comprimento radicular e hipocótilo das plântulas de leucena. Menor massa fresca foi detectada na presença dos exsudatos do 2º, 4º e 5º dia, entretanto, em todos os tratamentos a massa seca não foi alterada. Catequina comercial não apresentou nenhum efeito nos diferentes parâmetros avaliados comparada ao controle (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), massas fresca e seca, comprimento radicular e do hipocótilo das sementes e plântulas de leucena após cinco dias de germinação na presença de água destilada (Controle), exsudatos de sementes de sesbania de diferentes dias (1° ao 5° dia) ou catequina comercial (1mg mL⁻¹).

Tratamentos	% G	IVG	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Comp. Radicular (cm)	Comp. Hipocótilo (cm)
Controle	53,3 a	2,46 a	0,51 ± 0,19 a	0,25 ± 0,37 a	3,20 ± 1,79 a	3,16 ± 1,08 a
Exsudato 1° dia	60,0 a	2,53 a	0,53 ± 0,08 a	0,08 ± 0,04 a	2,62 ± 0,69 a	2,78 ± 0,69 a
Catequina comercial	57,3 a	2,72 a	0,59 ± 0,09 a	0,09 ± 0,01 a	3,34 ± 1,58 a	3,82 ± 1,28 a
Controle	78,3 a	3,49 a	0,66 ± 0,11 a	0,09 ± 0,00 a	5,54 ± 2,49 a	4,56 ± 1,27 a
Exsudato 2° dia	41,3 b	1,95 b	0,42 ± 0,15 b	0,07 ± 0,02 a	1,61 ± 1,61 b	2,08 ± 1,02 b
Catequina comercial	68,0 ab	2,86 ab	0,66 ± 0,11 a	0,09 ± 0,00 a	4,38 ± 1,30 ab	4,49 ± 0,95 a
Controle	61,3 ab	2,88 a	0,58 ± 0,23 a	0,08 ± 0,02 a	5,11 ± 3,26 a	4,58 ± 2,39 a
Exsudato 3° dia	45,3 a	2,14 a	0,31 ± 0,10 a	0,07 ± 0,01 a	0,64 ± 0,58 b	1,20 ± 0,81 b
Catequina comercial	49,3 a	2,22 a	0,45 ± 0,09 a	0,08 ± 0,01 a	2,15 ± 1,25 ab	2,52 ± 1,07 ab
Controle	69,3 a	3,19 a	0,64 ± 0,11 a	0,09 ± 0,00 a	4,95 ± 2,71 a	4,08 ± 1,37 a
Exsudato 4° dia	40,0 b	1,71 b	0,30 ± 0,05 b	0,08 ± 0,01 a	0,19 ± 0,08 b	1,20 ± 0,26 b
Catequina comercial	73,3 a	3,49 a	0,60 ± 0,05 a	0,09 ± 0,00 a	3,52 ± 0,91 a	3,54 ± 0,44 a
Controle	61,3 a	2,91 a	0,56 ± 0,09 a	0,08 ± 0,00 a	3,77 ± 1,50 a	3,38 ± 0,95 a
Exsudato 5° dia	54,6 a	2,44 a	0,30 ± 0,02 b	0,08 ± 0,00 a	0,21 ± 0,03 b	1,38 ± 0,38 b
Catequina comercial	70,6 a	3,29 a	0,62 ± 0,18 a	0,09 ± 0,01 a	4,00 ± 1,02 a	3,84 ± 1,16 a

Médias±desvio padrão. Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre os tratamentos do mesmo dia pelo teste de Tukey (P<0,05). N= 5 (3 sementes por replicata).

A Tabela 4 mostra os resultados do ensaio prévio realizado com fluridona e ABA (10 e 100 µM) nas sementes de leucena co-germinadas com sesbania (2:1). Os diferentes tratamentos não afetaram a germinação e o IVG das sementes de leucena, embora, se observe menores valores nas sementes tratadas com fluridona. O tempo médio de germinação foi maior nas sementes co-germinadas com fluridona (10 µM). Na presença do inibidor (10 e 100 µM), o comprimento radicular e do hipocótilo foi reduzido, enquanto que na co-germinação com fluridona (10 µM) somente o comprimento radicular apresentou redução significativa nas plântulas de leucena (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TM), comprimento radicular e do hipocótilo das sementes e plântulas de leucena após cinco dias de germinação na presença de água destilada (Controle), Fluridona 10 e 100 μM , co-germinação (2:1) com água e fluridona 10 e 100 μM .

Tratamentos	% G	IVG	TM	Compr. Radicular (cm)	Compr. Hipocótilo (cm)
Controle	76,0	5,97	3,56	3,48 \pm 0,43 a	2,26 \pm 0,20 a
fluridona 10μM	64,0	2,03	3,56	2,02 \pm 0,15 b	1,70 \pm 0,16 b
Fluridona 100μM	70,6	2,49	3,59	2,44 \pm 0,36 b	1,92 \pm 0,12 ab
Co-germinação +água	62,6	4,66	3,79 a	1,00 \pm 0,06 a	1,42 \pm 0,18 a
Co-germ.+Fluridona 10μM	33,3	2,24	4,00 b	0,39 \pm 0,17 b	0,85 \pm 0,25 a
Co-germ.+Fluridona 100μM	62,6	4,73	3,63 a	0,82 \pm 0,21 a	1,44 \pm 0,33 a

Médias \pm desvio padrão. Letras iguais ou ausentes nas colunas não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). N=3 (5 sementes por replicata).

A quantificação de ácido abscísico (ABA) nos exsudatos de sementes de sesbania revelou que no primeiro dia de embebição das sementes ocorre maior liberação (2,4 nmoles/semente) com decréscimo significativo no 2º e 3º dias (1,1 e 0,65 nmoles/semente respectivamente), e ausência do hormônio a partir do 4º dia do início da germinação das sementes (Figura 19).

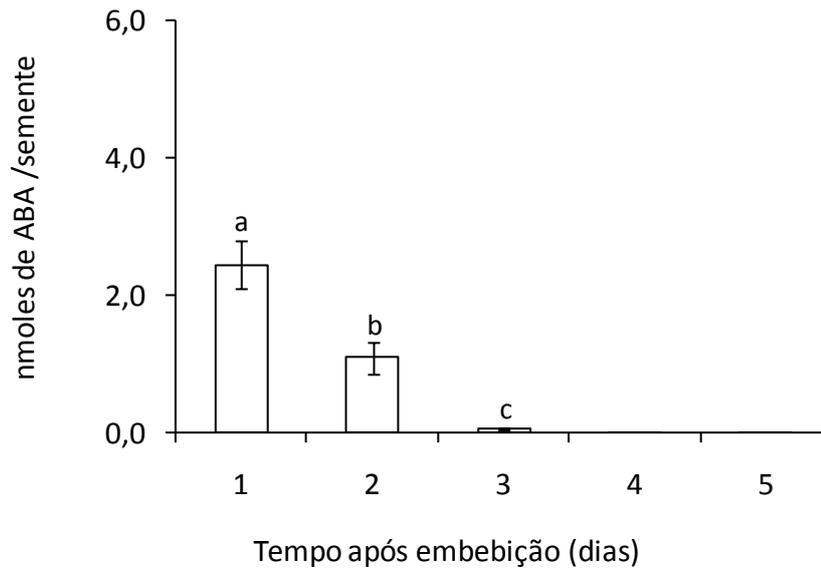


Figura 19: Quantificação de ácido abscísico (ABA) presente nos exsudatos de sementes de sesbania durante o processo de embebição e germinação. As barras indicam o erro padrão das médias (N=6). As letras referem-se à diferença estatística entre os dias pelo teste de Tukey (P<0,05).

Referente ao ensaio combinando ABA e fluridona, não houve diferença significativa na germinação e no IVG das sementes de leucena nos diferentes tratamentos, embora, se observe um estímulo quando germinadas com ABA+fluridona. É possível observar claramente que, na presença de somente fluridona, leucena teve seu comprimento radicular e do hipocótilo afetados. O mesmo ocorreu quando leucena foi co-germinada com sesbania+fluridona, sugerindo que leucena é sensível ao inibidor de ABA, conforme pode ser constatado pela Figura 20 e também pelo ensaio anterior (Tabela 5). A presença de ABA não afetou a germinação e o crescimento das sementes e plântulas de leucena, apesar da concentração deste hormônio utilizado neste ensaio ser bem maior do que aquela exsudada (333 nmoles) por semente de sesbania.

Tabela 5. Porcentagem de germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TM), massa fresca e seca, comprimento radicular e do hipocótilo das sementes e plântulas de leucena após cinco dias de germinação na presença de água destilada (Controle), fluridona+ABA comercial (333,3 nmoles), co-germinação (2:1) com água, Fluridona ou ABA.

Tratamentos	%G	IVG	TM	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Compr. Radicular (cm)	Compr. Hipocótilo (cm)
Controle <i>Leucaena</i>	80	0,81	3,10	0,14 ± 0,06	0,029 ± 0,006	3,04 ± 2,46	1,70 ± 1,04
ABA	60	0,77	3,50	0,13 ± 0,06	0,024 ± 0,003	3,37 ± 2,28	1,62 ± 1,49
Fluridona	80	0,43	4,20	0,10 ± 0,05	0,024 ± 0,005	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ABA+Fluridona	100	0,95	3,90	0,13 ± 0,03	0,024 ± 0,004	3,67 ± 2,31	1,66 ± 1,66
Co-germinação+água	80	0,73	3,85	0,12 ± 0,04	0,027 ± 0,003	1,85 ± 1,67	1,12 ± 1,63
ABA	60	0,77	3,50	0,08 ± 0,05	0,027 ± 0,005	1,92 ± 1,69	1,24 ± 1,14
Fluridona	60	0,22	4,60	0,07 ± 0,01	0,023 ± 0,001	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ABA+Fluridona	100	0,77	3,93	0,10 ± 0,01	0,025 ± 0,001	0,95 ± 0,64	0,90 ± 0,82

Médias±desvio padrão. Letras ausentes nas colunas não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05). N=5 (1 semente por replicata)

A Figura 20 mostra o aspecto das plântulas de leucena após tratamento com ABA e fluridona. Nitidamente é observada a inibição do crescimento de leucena na presença de fluridona, o que não ocorre com ABA. Por outro lado, a co-germinação com sementes de sesbania combinada com ABA e fluridona afetou o desenvolvimento inicial de leucena que apresentou redução no crescimento, alterações morfológicas e o escurecimento das raízes primárias comparada ao controle (Figura 21).



Figura 20. Aspecto geral das plântulas de leucena após cinco dias de germinação na presença de água destilada (C), ácido abscísico (ABA), fluridona, (Flu).

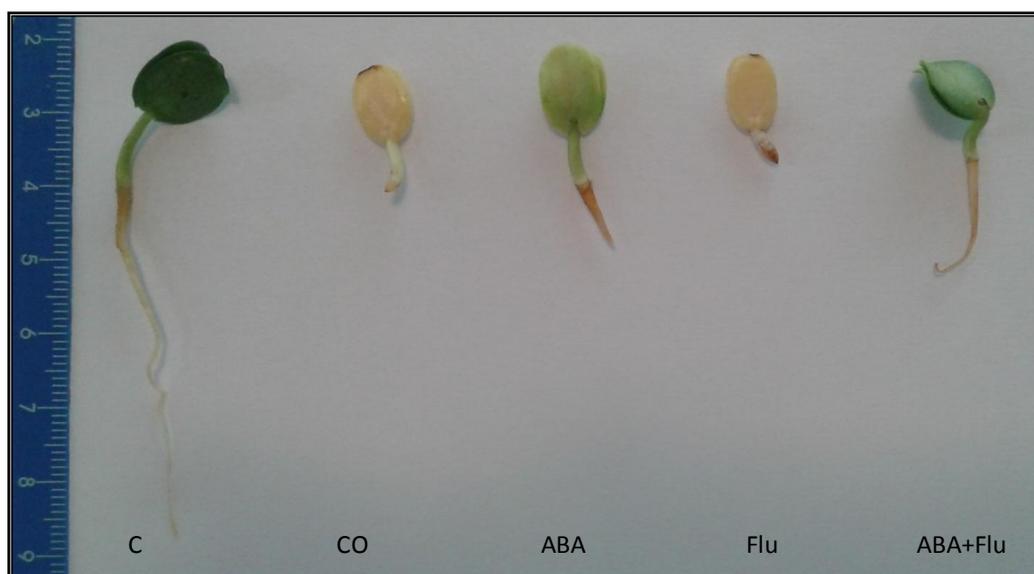


Figura 21. Aspecto geral das plântulas de leucena após cinco dias sem a presença de sementes de sesbania (C), co-germinadas em água destilada (CO), ácido abscísico (ABA) e fluridona (Flu).

A fitotoxina catequina tem sido proposta como substância mediadora da invasão de *Centaurea stoebe*, espécie originária da Eurásia, em regiões da América do Norte, afetando as comunidades nativas. Entretanto, a relevância ecológica desta substância depende, em parte, de concentrações liberadas e de sua estabilidade no solo para influenciar o crescimento e desenvolvimento de plantas vizinhas (Perry *et al.* 2007). (+)-Catequina foi detectada no tegumento das sementes de sesbania sendo liberada em altas concentrações nos exsudatos de suas sementes (235 µg/semente) logo nas primeiras 24 horas de embebição com decréscimo após esse período (Simões *et al.* 2008). Catequina isolada dos exsudatos de sementes de sesbania afetou drasticamente o crescimento e o desenvolvimento de *A. thaliana* e *O. sativa*, sugerindo que sua exsudação possa ser uma estratégia competitiva contra outras espécies durante seu estabelecimento inicial e contribuir para seu comportamento invasor (Simões 2008). No presente trabalho, leucena foi germinada na presença de (+)-catequina (Sigma) na concentração de 1 mg mL⁻¹, quantidade esta um pouco abaixo daquela catequina liberada pelo total de sementes de sesbania utilizadas neste ensaio (1,410 mg mL⁻¹). Altas concentrações de catequina e dos exsudatos brutos de sesbania (até 4 mg mL⁻¹) foram anteriormente ensaiadas em sementes de tomate e arroz e não afetaram a germinação de ambas as espécies, porém, reduziram o comprimento radicular. Tomate foi mais sensível aos efeitos da catequina do que arroz, entretanto, os efeitos dos exsudatos brutos foram superiores comparados aos da catequina comercial. A possibilidade de um possível efeito osmótico foi descartada através de testes com polietilenoglicol (PEG 6000) (Coelho 2014). De acordo com a Tabela 3, é possível constatar que os efeitos causados pelos exsudatos de sesbania sobre a germinação e o crescimento de leucena parecem não ser ocasionados pela catequina, mas devem-se, possivelmente, a outras substâncias exsudadas por essas sementes. Veronesi (2013) verificou que catequina comercial (1mg mL⁻¹) também não afetou a germinação, IVG e o desenvolvimento inicial das sementes e plântulas de *P. dubium*. Por outro lado, a catequina isolada de folhas de *Tachigali myrmecopyla* inibiu o crescimento da radícula e do hipocótilo de *Mimosa pudica*, planta daninha que infesta área de pastagens na Amazônia e pertencente à mesma subfamília de leucena (Lobo *et al.* 2008). Inderjit *et al.* (2008) descrevem que o efeito da catequina varia substancialmente e seu metabolismo pode ser altamente dinâmico em solos naturais. Em baixas concentrações no solo, a catequina afetou o crescimento das plântulas de *Koeleria macrantha*, co-ocorrente e de *Bambusa arundinacea* (bambu) não co-ocorrente com

Centaurea stoebe (= *maculosa*) espécie considerada agressiva e dominante na América do Norte, cujo comportamento invasor é atribuído principalmente a exsudação de catequina pelas suas raízes. Dessa forma, sugere-se que o efeito da catequina é espécie-específico, variando de acordo com a sensibilidade da espécie alvo e da concentração.

Aleloquímicos exsudados em diferentes dias por sementes de sesbania reduziram o crescimento da radícula e do hipocótilo de leucena (Tabela 3). Iqbal & Fry (2012) avaliaram o efeito dos exsudatos das sementes de agrião de diferentes dias sobre o crescimento inicial de *A. caudatus*. Os mesmos autores verificaram que compostos exsudados no 1º dia estimularam ainda mais o crescimento do hipocótilo, assim como, causaram forte redução no comprimento radicular das plântulas-alvo comparado com os compostos exsudados após o 3º dia. Os autores concluíram que a rápida liberação dos compostos bioativos teria um papel ecológico de proteger a espécie doadora das espécies concorrentes, as quais se tornariam plantas frágeis incapazes de competir. De acordo com o presente estudo, aleloquímicos exsudados a partir do 2º dia por sementes de sesbania reduziram o comprimento radicular e do hipocótilo de leucena (Tabela 3). A exsudação de compostos alelopáticos durante o processo de germinação de sesbania sugere um efeito inibidor contra a espécie exótica quando no início de seu estabelecimento. Entretanto, ao que parece, esta estratégia não se deve a exsudação de catequina a qual não afetou o desenvolvimento das plântulas da espécie-alvo.

No mesmo período em que ocorre a exsudação de maior concentração de catequina pelas sementes de sesbania, ABA também é exsudado até o 3º dia após a embebição (Figura 19). Este hormônio é conhecido por atrasar a germinação e estar envolvido no mecanismo de quebra de dormência das sementes (Potomati & Buckeridge 2002). Tonini *et al.* (2006) detectaram a presença de ABA endógeno no tegumento das sementes de sesbania logo no 1º dia de embebição, entretanto, no 3º dia o hormônio foi detectado no embrião dessas sementes, indicando que este possa ter um papel como modulador das interações bioquímicas e fisiológicas entre os tecidos durante a germinação e o crescimento inicial das sementes e plântulas de sesbania. Por outro lado, a presença de ABA exógeno (10^{-4} M) atrasou a degradação de proteínas no endosperma e reduziu a atividade α -galactosidase no mesmo tecido durante a degradação da galactomanano, sugerindo que o ABA possa desempenhar diferentes papéis nessa espécie, dependendo de sua concentração, atuando como modulador ou inibidor nas sementes e plântulas de sesbania (Tonini *et al.* 2010). Diferentemente, no presente estudo, ABA parece não influenciar o crescimento e desenvolvimento de leucena,

embora, a concentração utilizada tenha sido menor do que as dos ensaios acima mencionados e não foram realizadas análises bioquímicas nas sementes tratadas com esse hormônio.

A fluridona é um inibidor que converte o fitoeno em fitoflueno na via de biossíntese dos carotenóides, principais precursores do ABA em plantas. Desta forma, a inibição da carotenogênese deve impedir a biossíntese de ABA (Bartels & Watson 1978; Fong & Schiff 1979; Yoshioka *et al.* 1998). No presente trabalho, fluridona mostrou-se bastante tóxica para leucena, sendo observada inibição do crescimento da raiz e da parte aérea (Figuras 20 e 21). Além disso, considerando-se que o ABA já está presente nos exsudatos, fluridona talvez não exerça seu papel como inibidor da sua biossíntese. Apesar de fluridona ser frequentemente utilizada em ensaios como inibidor de ABA, outros inibidores podem ser testados como norflurazon, ou ainda, um antagonista da ação do hormônio (Suttle *et al.* 2012).

Os resultados obtidos com os ensaios acima parecem indicar que ABA e catequina não estão associados aos efeitos causados pelos exsudatos de sesbania sobre o crescimento e nas alterações morfológicas observadas em leucena, sugerindo que outras substâncias presentes nos exsudatos possam agir como aleloquímicos. Simões (2008) detectou grande quantidade de açúcares solúveis nos exsudatos do 4º e 5º dia das sementes de sesbania. Estudos mostram que baixas concentrações de manose e glucose inibem a germinação e o crescimento radicular de sementes e plântulas de *Arabidopsis thaliana* (Pego *et al.* 1999; Baskin *et al.* 2001). Uma proteína foi isolada das sementes de sesbania e apresentou atividade antifúngica inibindo o crescimento dos fungos filamentosos (Praxedes *et al.* 2011). Além disso, sesbanimida, um potente alcalóide encontrado nas sementes de *Sesbania spp.* também foi detectado nos exsudatos de sementes de *S. virgata* (Simões 2008), e desta forma, é possível sugerir que os efeitos observados pelos exsudatos de suas sementes, possam estar relacionados a esse alcalóide. Talvez a sesbanimida possa também estar envolvida na redução de absorção de água, efeito este, observado nas menores massas fresca de leucena (Tabela 3). Várias substâncias bioativas presentes nos exsudatos de sesbania podem agir sinergicamente e assim causar os efeitos inibitórios observados em leucena.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que substâncias exsudadas a partir do 2º dia de embebição das sementes de sesbania afetam a germinação e o crescimento inicial de leucena. Catequina parece não estar envolvida nestes efeitos quando comparada ao controle, assim como o ABA, que é exsudado no mesmo período que o flavonóide. Desta forma, sugere-se que estes efeitos são devido a ação de outras substâncias

presentes nos exsudatos como o alcalóide sesbanimida, por exemplo, que apresenta potente atividade biológica (Simões 2008).

Com o presente trabalho conclui-se que o ABA é exsudado pelas sementes de sesbania já nas primeiras 24 horas de embebição das sementes, e assim como a catequina, não afetou a germinação e o crescimento inicial de sementes e plântulas de leucena. Entretanto, os exsudatos brutos causam efeitos, indicando a presença e ação de outras substâncias bioativas nos exsudatos de sesbania que interferem no desenvolvimento de leucena.

Considerações Finais: Como os dados obtidos no presente estudo suportam a teoria da resistência de espécies nativas frente à invasão de espécies exóticas

No presente trabalho foi demonstrado que leucena sofreu efeitos de inibição de crescimento e desenvolvimento inicial, além de alterações no metabolismo dos carboidratos ao longo da germinação quando na presença das sementes e dos exsudatos de sesbania. Considerando que sesbania e leucena são duas espécies pioneiras, com ciclo de vida curto, em condições naturais é possível que sesbania possa impedir o crescimento de leucena, e esta, levar desvantagem principalmente nos estágios iniciais de colonização do ambiente, quando entraria em contato com os aleloquímicos das sementes de sesbania. Isso poderia explicar a não ocorrência de leucena no mesmo ambiente em que sesbania ocorre, apesar de leucena também exsudar de suas sementes substâncias alelopáticas como a mimosina. Costa & Durigan (2010) avaliaram o crescimento e comportamento de leucena em uma área de campo. Após duas décadas de seu plantio, leucena em sua área limitada, apresentou alta densidade de indivíduos regenerantes e nenhum deles foi amostrado além dos limites da área onde a espécie foi plantada. Assim, os autores sugeriram que leucena não se comporta como espécie invasora e agressiva, mas como espécie ruderal, aquela que ocorre em ambiente altamente perturbado pela ação humana, também denominada pioneira antrópica. Entretanto, a utilização da espécie não é recomendável quando a meta do plantio for a recuperação da diversidade de espécies arbóreas.

Cummings *et al.* (2012) descrevem que a hipótese das novas armas químicas pode ocorrer de forma inversa e aumentar a resistência das comunidades nativas à invasão. Os autores apresentam uma nova hipótese denominada, “segurança interna”, na qual propõem que plantas introduzidas podem ser mais suscetíveis aos aleloquímicos produzidos por espécies nativas e assim os impactos das espécies exóticas invasoras em áreas de reflorestamento seriam reduzidos. Os mesmos autores avaliaram o efeito da serrapilheira de 17 espécies arbóreas nativas sobre o crescimento de *Sacharum spontaneum*, uma gramínea invasora, e concluíram que a serrapilheira causou forte inibição no crescimento de *S. spontaneum*. Corroborando a hipótese, aleloquímicos de *Polygonella myriophylla* (Small. Horton) espécie nativa da Flórida inibiram a invasão de gramíneas de origem sul-americanas como *Paspalum notatum* (Weidenhamer & Romeo 2005). Além disso, plântulas de *Schima superba*, *Castanopsis chinensis*, *Castanopsis fissa*, *Cryptocarya chinensis* (Hance) espécies arbóreas nativas, inibiram o crescimento de *Mikania micrantha* H.B.K. em solo, espécie altamente invasora em florestas e áreas agrícolas na China (Hou *et al.* 2012). Em resumo, os

dados obtidos neste trabalho suportam a hipótese de segurança interna (Cummings *et al.* 2012) que sugere que espécies introduzidas são sensíveis aos aleloquímicos liberados por espécies nativas e estas podem adquirir resistência à invasão. Este efeito seria mais visível durante o processo de colonização do ambiente por ambas as espécies estudadas neste trabalho. No caso do ambiente já colonizado por sesbania ou por outras espécies de plantas, leucena levaria desvantagem considerando que é uma espécie pioneira heliófita que necessita de luz para seu estabelecimento e crescimento (Pandey & Kumar 2013). No caso de clareiras ou áreas devastadas a desvantagem poderia ser devida aos efeitos fitotóxicos de aleloquímicos exsudados por sesbania. Embora, leucena também exsude de suas sementes substâncias fitotóxicas, a espécie mostrou-se sensível aos aleloquímicos de sesbania, mas esta, por sua vez, não sofreu nenhuma influência quando na presença das fitotoxinas exsudadas por sementes da espécie exótica.

Conclusão

Corroborando a hipótese da segurança interna, os dados obtidos neste trabalho indicam que leucena é sensível aos aleloquímicos exsudados por sementes de sesbania. Os efeitos observados não puderam ser atribuídos à catequina e ao ABA presente nos exsudatos de sesbania, sugerindo que outras substâncias exsudadas ou o sinergismo entre elas, seja responsável pelas alterações no crescimento e desenvolvimento da espécie exótica estudada.

Bibliográficas

Ahmed, M.E. & Abdelti, K.A. 2009. Chemical composition and amino acids profile of *Leucaena leucocephala* seeds. *International Journal of Poultry Science* 10:966-970.

Albuquerque, M.B., Santos, R.C., Lima, L.M., Melo-Filho, P.A., Nogueira, R.J.M.C., Câmara, C.A.G. & Ramos, A.R. 2010. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 31:379-395.

Alford, E.R., Vivanco, J.M. & Paschke, M.W. 2009. The effects of flavonoid allelochemicals from knapweeds on legume–rhizobia candidates for restoration. *Restoration Ecology* 17:506–514.

Ali, S.F., Rawat, L.S., Meghvansi, M.K. & Mahna, S.K. 2010. Screening of rhizobial isolates of *leucaena leucocephala* Lam. for mimosine degradation ability. *Journal of Phytology* 2:1-6.

Amaral, L.I.V., Costa, P.M.F., Aidar, A.P.M., Gaspar, M. & Buckeridge, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34:425-431.

Andrade, L.A. 2006. Espécies exóticas invasoras no Nordeste do Brasil: Impactos nos ecossistemas locais. *Sociedade Botânica do Brasil* 752 p.

Babula, P., Adam, J., Kizek, R., Sladky, Z. & Havel, L. 2009. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environmental and Experimental Botany* 65:330–337.

Bais, H.P. & Kauschik, S. 2010. Catechin secretion and phytotoxicity fact not fiction. *Communicative & Integrative Biology* 3:468-470.

Bais, H.P., Walker, T.S., Stermitz, F.R., Hufbauer, R.A. & Vivanco, J.M. 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (+)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* 128:1173-1179.

Bais, H.P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R.M. & Vivanco, J.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301:1377-1380.

Bartels, P.G. & Watson, C.W. 1978. Inhibition of carotenoid synthesis by fluridone and norflurazon. *Weed Science*. 26:198-203.

- Baskin, T.I., Remillong, E. & Wilson, J.E.** 2001. The impact of mannose and other carbon sources on the elongation and diameter of the primary root of *Arabidopsis thaliana*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:481–488.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Setia, N., Kaur, S., & Kohli, R.K.** 2006. 2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiology Biochemistry* 44:819–827.
- Bauer, J.T., Shannon, S.M., Stoops, R.E. & Reynolds, H.L.** 2012. Context dependency of the allelopathic effects of *Lonicera maackii* on seed germination. *Plant Ecology* 213:1907-1916.
- Belz, R.G.** 2007. Allelopathy in crop/weed interactions—an update. *Pest Management Science* 63:308–326.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. & Nonogaki, H.** 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. *Springer New York* 392p.
- Blair, A.C., Hanson, B.D., Brunk, G.R., Marrs, R.A., Westra, P., Nissen, S.J. & Hufbauer, R.A.** 2005. New techniques and finds in the study of a candidate allelochemical implicated in invasion success. *Ecology Letters* 8:1039-1047.
- Blair, A.C., Nissen, S.J., Brunk, G.R. & Hufbauer, R.A.** 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.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Broadhurst, R.B. & Jones, W.T.** 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29:788-794.
- Buckeridge, M.S., Panegasi, V.R., Rocha, D.C. & Dietrich, S.M.C.** 1995. Seed galactomannan in the classification and evolution of the leguminosae. *Phytochemistry* 38: 871-875.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C.** 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae) *Plant Science* 117:33-43.
- Buckeridge, M.S., Dietrich, S.M.C. & De Lima, D.U.** 2000. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. Carbohydrate Reserves in Plants-Synthesis and Regulation. *Developments in Crop Science* 26: 283-316.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. & Aidar, M.P.M.** 2004. Mobilização de reservas. In: Germinação: Do básico ao aplicado. Ferreira, A.G. & Borghetti, F. Porto Alegre: *Art Med*, 163-185p.

- Callaway, R.M., Ridenour, W.M., Laboski, T., Weir, T. & Vicanco, J.M.** 2005. Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants. *Journal of Ecology* 93:576-583.
- Campos, J.B., Tossulino, M.G.P. & Muller, C.R.C.** 2006. Unidades de conservação ação para valorização da biodiversidade. Curitiba: Governo do Estado do Paraná. 344p.
- Cappuccino, N. & Carpenter, D.** 2005. Invasive exotic plants suffer less herbivory than non-invasive exotic plants. *Biology Letters* 1:435-438.
- Cardoso, E.A., Alves, A.U., Cavalcante, I.H.L., Farias, S.G.G. & Santiago, F.E.M.** 2012. Métodos para superação de dormência em sementes de leucena. *Ciências Agrárias* 55:220-224.
- Carmo, F.M.S., Poeiras, L.M., Gonçalves, A.B., De Mello, S.M., Neto, J.A.A.M., De Lima e Borges, E.E. & Da Silva, E.F.** 2012. Germinação do banco de sementes de espécies nativas sob dossel de espécies exóticas. *Revista Árvore* 36:583-591.
- Carvalho, C.P., Hayashi, A.H. Braga, M.R. & Nievola, C.C.** 2013. Biochemical and anatomical responses related to the *in vitro* survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 71:144-154.
- 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.
- Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G., Tomasi, N., Pinton R., Terzano R., Neumann, G., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L. & Nannipieri, P.** 2012. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biology and Fertility Soils* 48:123-149.
- Champanerkar, P.A., Vaidya, V.V., Shailajan, S. & Menon, S.N.** 2010. A sensitive, rapid and validated liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for determination of mimosine in *Mimosa pudica* Linn. *Natural Science* 7:713-717.
- Chérif, M., Arfaoui, A. & Rhaïem, A.** 2007. Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal Plant Protection* 2:7-21.
- Chi, C.W., Fu, F.S., Huang, L.T., Chen, A.Y., Chen, C.C. & Huang, J.H.** 2011. Identification of transcriptome profiles and signaling pathways for the allelochemical juglone in rice roots. *Plant Molecular Biology* 77:591-607.
- Chien, C.T.E., Lin, Tsan-Piao., Juo, Chiun-Gung. & Her, Guor-Rong.** 1996. Occurrence of a novel galactopinitol and its changes with other non reducing sugars during development of *Leucaena leucocephala* Seeds. *Plant Cell Physiology* 37:539-54.

- Chou, C.H. & Kuo, Y.L.** 1986. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. Allelopathic exclusion of understory by *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Journal of Chemical Ecology* 6:1431-1448.
- Coelho, L.C.S.** 2014. Potencial alelopático *in vitro* dos exsudatos de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. sobre tomate e arroz e em fungos micorrízicos arbusculares na fase assimbiótica. Tese de Doutorado. *Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.*
- Coradin, L.** 2006. Espécies exóticas invasoras: situação brasileira. Ministério do Meio Ambiente, *Secretaria de Biodiversidade e Florestas Brasília: MMA* 24p.
- Costa, J.N.M.N. & Durigan, G.** 2010. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae): Invasora ou Ruderal? *Revista Árvore* 34:825-833.
- Coutinho, M.P., Carneiro, J.G.A., Barroso, D.G., Rodrigues, L.A., Figueiredo, F.A.M.M.A., Mendonça, A.V.R. & Novaes, A.B.** 2005. Crescimento de mudas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. plantadas em uma área degradada por extração de argila. *Floresta* 35:231-239.
- Cummings, J.A., Parker, I.M. & Gilbert, G.S.** 2012. Allelopathy: a tool for weed management in forest restoration. *Plant Ecology* 213:1975-1989.
- Dirk, L.M.A., Griffen, A.M., Downie, B. & Bewley, J.D.** 1995. Multiple isozymes of endo- β -d-mannanase in dry and imbibed seeds. *Phytochemistry* 40:1045-1056.
- Dirk, L.M.A., Van der Krol, A.R., Vreugdenhil, D., Hilhorst, H.W.M. & Bewley, J.D.** 1999. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:41-50.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Duke, S.O., Blair A.C., Dayan, F.E., Johnson R.D., Meepagala K.M., Cook, D. & Bajsa, J.** 2009. Is (-)-catechin a novel weapon of spotted knapweed (*Centaurea stoebe*)? *Journal of Chemical Ecology* 35:141-153.
- El Id, V.L., Costa, B.V., Mignoni, D.S.B., Veronesi, M.B., Simões, K., Braga, M.R. & Santos-Junior, N.A.** 2015. Phytotoxic effect of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. on seeds of agronomic and forestry species. *Journal of Forestry Research* 26: 339-346.
- Erhard, D. & Gross, E. M.** 2006. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton. *Aquatic Botany* 85 pp 203-211.
- Ferreira, D.F.** 2010. SISVAR-Sistema de análise de variância. *Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1 CD.*
- Ferreira, A.G. & Áquila, M.E.A.** 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12:175-204.

- Florentino, L.A., Guimarães, A.P., Rufini, M., Da Silva, K. & De Souza Moreira, F.M.** 2009. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Scientia Agricola* 66:667-676.
- Fong, F. & Schiff, J.A.** 1979. Blue-light-induced absorbance changes associated with carotenoids in *Euglena*. *Planta* 146:119-127.
- Friebe, A.** 2001. Role of benzoxazinones in cereals. *Journal Crop Products* 4:379-400.
- Gatti, A.B., Perez, S.C.J.G.A. & Lima, M.I.S.** 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botânica Brasileira* 18:459-472.
- Grisi, P.U., Ranal, M.A., Gualtieri, S.C.J. & Santana, D.J.** 2012. Allelopathic potential of *Sapindus saponaria* L. leaves in the control of weeds. *Acta Scientiarum Agronomy* 34:1-9.
- Grot, S.P.C. & Karsen, C.M.** 1992. Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. Studies with the *sitiens* mutant. *Plant Physiology* 99:952-958.
- Gupta, H.K. & Atreja, P.P.** 1988. Influence of ferric chloride treated *Leucaena leucocephala* on metabolism of mimosine and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone in growing rabbits. *Animal Feed Science Technology* 74:45-55.
- Higa, M., Ogihara, K. & Yogi, S.** 1998. Bioactive naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 46:1189-1193.
- Hou, Y.P., Peng, S.L., Ni, G.Y. & Chen, L.Y.** 2012. Inhibition of invasive species *Mikania micrantha* H.B.K. by native dominant trees in China. *Journal of Allelopathy* 29:307-314.
- Hussain, M.I., Gonzalez, L. & Reigosa, M.J.** 2008. Germination and growth response of four plant species towards different allelochemicals and herbicides. *Allelopathy Journal* 22:101-110.
- Inderjit, Pollock, J.L., Callaway, R.M. & Holben, W.** 2008. Phytotoxic effects of (±)-catechin *in vitro*, in soil, and in the field. *Plos One* 3:1-11.
- Iqbal, A. & Fry, S.** 2012. Potent endogenous allelopathic compounds in *Lepidium sativum* seed exudate: effects on epidermal cell growth in *Amaranthus caudatus* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 63:2595-2604.
- Kader, D.A.E., Molina, E.A., Monteiro, K.C., Gutierrez, O., Troncone, G., & León de Pinto, G.** 2008. Analytical data of seed gum from *Leucaena leucocephala*. *Revista de La Facultad Agronomía LUZ* 25:95-108.
- 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, F.A.** 2008. Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the germination and α -amylase activity in lettuce seeds. *Journal Plant Physiology* 162:1304-1307.
- Kaushik, S., Bais, H.P., Biedrzycki, M.L. & Venkatachalam, L.** 2010. Catechin is a phytotoxin and a pro-oxidant secreted from the roots of *Centaurea stoebe*. *Plant Signaling & Behavior* 5:1088-1098.
- Kermode, A.R.** 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:319–344.
- Koitabashi, R., Suzuki, T., Kawazu, T., Sakai, A., Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T.** 1997. 1,8-cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris*. *Journal of Plant Research* 110:1-6.
- Lara-Núñez, A., Sánchez-Nieto, S., Anaya, A.L. & Cruz Ortega, R.** 2009. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 136:180-192.
- Lee, C.H. & Lee, H.S.** 2008. Acaricidal activity and function of mite indicator using plumbagin and its derivatives isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots (Ebenaceae). *Journal Microbiology Biotechnology* 18:314–321.
- Lisboa, C.G.S., Tonini, P.P., Tiné, M.A.S., & Buckeridge, M.S.** 2006. Endomannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:269-280.
- Lôbo, L.T., Castro, K.C.F., Arruda, M.S.P., Silva, M.N., Arruda, A.C., Müller, A.H., Arruda, G.M.S.P. & Santos, A.S.** 2008. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Química Nova* 31:493-497.
- Ludwig-Muller, J., Georgiev, M. & Bley, T.** 2008. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. *Process Biochemistry* 43:15-23.
- Mack, R.N., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M. & Bazzaz, F.A.** 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10:689-710.
- Mandal, S.M., Chakraborty, D. & DEY, S.** 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling Behavior* 5:359-368.
- Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M.** 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40:255-260.

- Mauli, M.M., Fortes, A.M.T., Rosa, D.M., Piccolo, G., Marques, D.S., Corsato, J.M. & Leszczynski, R.** 2009. Alelopatia de leucena sobre soja e plantas invasoras *Ciências Agrárias* 30:55-62.
- McCleary, B.V.** 1983. Enzymic interaction in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of $\text{exo-}\beta\text{-mannanase}$. *Phytochemistry* 22:649-658.
- McCleary, B.V. & Matheson, N.K.** 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 15:43-47.
- Murrell, C., Gerber, E., Krebs, C., Parepa, M., Schaffner, U. & Bossdorf, O.** 2011. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *American Journal of Botany* 98:38-43.
- Ndavidemi, P.A. & Dakora, F.D.** 2003. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. *Functional Plant Biology* 30:729-745.
- Nelson, E.B.** 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42:271-309.
- Nishihara, E., Parvez, M.M., Araya, H. & Fujii, Y.** 2004. Germination growth response of different plant species to the allelochemical L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). *Plant Growth Regulation* 42:181-189.
- Nóbrega, R.S.A., De Paula, A.L., Boas, R.C.V., Nóbrega, J.C.A., & Moreira, F.M.S.** 2008. Parâmetros morfológicos de mudas de *sesbania virgata* (Cav.) Pers e de *Anadenanthera peregrina* (L.) cultivadas em substrato fertilizado com composto de lixo urbano. *Revista Árvore* 32:597-607.
- Nwokocha, L.M. & Williams, P.T.** 2012. Rheological characterization of the galactomannan from *Leucaena leucocephala* seed. *Carbohydrate Polymers* 90:833-838
- Pamplona, B.S. & Zerrudo, J.V.** 2008. Composition analysis of ipil-ipil *Leucaena leucocephala* (lam.) de Wit seed gum. *Forest Products Research and Development Institute* 18:4-14.
- Pandey, V.C. & Kumar, A.** 2013. *Leucaena leucocephala*: an underutilized plant for pulp and paper production. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:1165-1171.
- Parker, J. D. & Hay, M. E.** 2005. Biotic resistance to plant invasions? Native herbivores prefer non-native plants. *Ecology Letters* 8:959-967.
- Pego, J.V., Weisbeek, P.J. & Smeekens, S.C.M.** 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology* 119:1017-1023.
- Pellissier, F.** 2013. Improved germination bioassays for allelopathy research. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:23-30.

- Perry, L.G., Thelen, G.C., Ridenour, W.M., Weir, T.L., Callaway, R.M., Paschke, M.W. & Vivanco, J.M.** 2005. Dual role for an allelochemical: (\pm)-catechin from *Centaurea maculosa* root exudates regulates conspecific seedling establishment. *Journal of Ecology* 93: 1126-1135.
- Perry, L.G., Thelen, G.C., Ridenour, W.M., Callaway, R.M., Paschke, M.W. & Vivanco, J.M.** 2007. Concentrations of the allelochemical (\pm)-catechin in *Centaurea maculosa* soils. *Journal Chemical Ecology* 33:337-344.
- Pires, N.M., Prates, H.T., Pereira Filho, I.A.P., Oliveira Junior, R.S.O. & Faria, T.C.L.** 2001. Atividade alelopática de leucena sobre espécies de plantas daninhas. *Scientia Agrícola* 58:61-65.
- Pollard, M.A., Kelly, R., Fischer, P.A., Windhab, E.J., Eder, B. & Amado, R.** 2008. Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples? *Food Hydrocolloids* 22:1596-1606.
- Pollock, J.L., Callaway, R.M., Thelen, G.C. & Holben, W.E.** 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, M.S.** 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, V.J.** 1994. Plantas do Pantanal. EMPRAPA/CPAP/SPI, Corumbá, 320p.
- Prasad, M.N.V. & Subhashini, P.** 1994. Mimosine-inhibited seed germination, seedling growth and enzymes of *Oryza sativa* L. *Journal of Chemical Ecology* 20:1689-1696.
- Praxedes, P.G., Zerlin, J.K., Dias, L.O. & Pessoni, R.A.B.** 2011. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Brazilian Journal Biology* 71:687-692.
- Reid, J.S.G.** 1971. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Legum.). *Planta* 100:131-142.
- Reid, J.S.G.** 1985. Structure and function in legume-seed polysaccharides. In: Brett C, Hilman JR (eds) Biochemistry of plant cell walls. *Cambridge University Press*, Cambridge, 259-268
- Reid, J.S.G. & Meier, H.** 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilisation in germination seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta* 106:44-60.

- Reid, J.S.G. & 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.
- Reigosa, M.J., Sánchez-Moreiras, A. & Gonzáles, L. 1999.** Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews Plant Sciences* 18:577-608.
- Rice, E.L. 1979.** Allelopathy. An update. *Botanical Review* 45: 15-109
- Rice, E.L. 1984.** Allelopathy. London: Academic Press, 422p.
- Rodolfo, A.M., Cândido Junior, J.F., Temponi, L.G. & Gregorini, M.Z. 2008.** *Citrus aurantium* L. (laranja-apepu) em *Hovenia dulcis* Thunb. (uva-do-japão): espécies exóticas invasoras da trilha do Poço Preto no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 6:16-18.
- Romagni, J.C., Allen, S.N. & Dayan, F.E. 2000.** Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology* 26:303-313.
- Schaffner, U., Ridenour, W.M., Wolf, V.C., Bassett, T., Muller, C., Muller-scharer, H., Sutherland, S., Lortie, C.J. & Callaway, R.M. 2011.** Plant invasions, generalist herbivores, and novel defense weapons. *Ecology* 92: 829-835.
- Schiavo, J.A., Martins, M.A. & Rodrigues, L.A. 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.
- Serrato-Valenti, G., Cornara, L., Guisellini, P. & Ferrando, M. 1994.** Testa structure and histochemistry related to water uptake in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Annals of Botany* 73:531-537.
- Serrato-Valenti, G., De Vries, M. & Cornara, L. 1995.** The hilar region in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seed: structure, histochemistry and the role of the lens in germination. *Annals of Botany* 75: 569-574.
- Sherer, L.M., Zucareli, V., Zucareli, C.A. & Fortes, A.M.T. 2005.** Efeito alelopático do extrato aquoso de folha e de fruto de leucena (*Leucaena leucocephala* Wit) sobre a germinação e crescimento de raiz da canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng.). *Ciências Agrárias* 26:161-166.
- 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, São Paulo.
- Simões, K., Du, J., Kretschmar, F., Broeckling, C.D., Stermitz, F.S., Vivanco, J.M. & Braga, M.R. 2008.** Phytotoxic catechin leached by seeds of tropical weed *Sesbania virgata*. *Journal Chemical Ecology* 34:681-687.

- Slot, M., Palow, D. & Kitajima, K.** 2012. Seed reserve dependency of *Leucaena leucocephala* seedling growth for nitrogen and phosphorus. *Functional Plant Biology* 40:244-250.
- Soares, A.R., Ferrarese, M.L.L., Siqueira-Soares, R.C., Marchiosi, R., Finger-Teixeira, A. & Ferrarese-Filho, O.M.** 2011. The allelochemical L-dopa increases melanin production and reduces reactive oxygen species in soybean roots. *Journal chemical ecology* 37:891-898.
- Soedarjo, M. & Borthakur, D.** 1996. Mimosine produced by the tree legume *Leucaena* provides growth advantages to some *Rhizobium* strains that utilize it as a source of carbon and nitrogen. *Plant Soil* 186:87-92.
- Soltys, D., Gniazdowska, A., & Bogatek, R.** 2013. Inhibition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) root growth by cyanamide is not always accompanied with enhancement of ROS production. *Plant Signaling & Behavior* 8:5 DOI: 10.4161/psb.23994.
- Souza, C.V., Agra, M.F.P., Andrade, A.L., Oliveira, G.I. & Oliveira, S.L.** 2010. 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, A.P., Rodrigues, R.A. & Rodrigues, T.J.D.** 1997. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32:165-170.
- Souza Filho, A.P.S., Trezzi, M.M. & Inoue, M.H.** 2011. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. *Planta Daninha* 29:709-716.
- Suttle, J.C., Abramns, S.R., Stefano-Beltran, L.DE. & Huckle, L.L.** 2012. Chemical inhibition of potato ABA-8'-hydroxylase activity alters *in vitro* and *in vivo* ABA metabolism and endogenous ABA levels but does not affect potato microtuber dormancy duration. *Journal of Experimental Botany* 63:695-709.
- Teasdale, J.R., Rice, C.P., Cai, G. & Mangum, R.W.** 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.
- Thorpe, A.S. & Callaway, R.M.** 2011. Biogeographic differences in the effects of *Centaurea stoebe* on the soil nitrogen cycle: novel weapons and soil microbes. *Biological Invasions* 13: 1435-1445.
- Thorpe, A.S., Thelen, G.C., Diaconu, A. & Callaway, R.M.** 2009. Root exudate is allelopathic in invaded community but not in native community: field evidence for the novel weapons hypothesis. *Journal of Ecology* 97:641-645.
- Tonini, P.P., Lisboa, C.G.S., Freschi, L., Mercier, H., Mazzoni-Viveiros, S.C. & Buckeridge, M.S.** 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees Structure and Function* 6:669-678.

- Tonini, P.P., Lisboa, C.G.S., Silva, C.O., Mazzoni-Viveiros, S.C., & Buckeridge, M.S.** 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees* 21:13-21.
- Tonini, P.P., Purgato, E. & Buckeridge, S.M.** 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.
- Topal, S. & Kocaçalışkan, I.** 2006. Allelopathic effects of DOPA against four weed species. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi DPÜ* 11:27-32.
- Unrau, A.M.** 1961. The constitution of a galactomannan from the seeds *Leucaena glauca*. *Journal of Organic Chemistry* 26: 3097-3101.
- Veronesi, M.B.** 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.
- Veronesi, M., Simões, K., Santos-Junior, N.A., & Braga, M.R.** 2014. Carbohydrate mobilization in germinating seeds of *Enterolobium contortisiliquum* and *Peltophorum dubium* (Fabaceae), two tropical trees used for restoration. *Australian Journal of Botany* 62:132-140.
- Vishwakarma, R.K., Srivastava, S., Singh, S. & Khan, B.M.** 2012. Molecular cloning and characterization of two differentially expressed cellulose synthase gene isoforms in *Leucaena leucocephala*: A pulp yielding tree species. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3: 92-100.
- Ward, K.A. & Harris, R.L.N.** 1976. Inhibition of wool follicle DNA synthesis by mimosine and related 4(1H)-pyridones. *Australian Journal of Biological Sciences* 29:189-196.
- Weidenhamer, J.D. & Romeo, J.T.** 2005. Allelopathy as a mechanism for resisting invasion: the case of *Polygonella myriophylla*. *Birkhäuser Switzerland* 20:167-17
- Weir, T.L., Park, S.W. & Vivanco, J.M.** 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7:472-479.
- Xuan, T.D., Elzaawely, A.A., Deba, F., Fukuta, M. & Tawata, S.** 2006. Mimosine in *Leucaena* as a potent bio-herbicide. *Agronomy for Sustainable Development* 26:89-97.
- Yamagushi, Q.M., Gusman, S.G. & Vestena, S.** 2011. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill., e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. *Ciências Agrárias* 4:1361-1374.
- Ye, N., Zhu, G., Liu, Y., Zhang, A., Li, Y., Liu, R., Shi, L., Jia, L., & Zhang, J.** 2011. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany* 26:1-14.

- Yemm, E.W. & Cooking, E.C.** 1955. The determination of amonio acids with ninhydrin. *Analyst* 80:209-213.
- Yoshimura, H., Sawai, Y., Tamotsu, S. & Sakai, A.** 2011. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells. *Journal of Chemical Ecology* 37:320-328.
- Yoshioka, T., Endo, T. & Satoh, S.** 1998. Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell Physiology* 39:307-312.
- Zhang, S., Liu, J., Bao, X. & Niu, K.** 2011. Seed-to-seed potential allelopathic effects between *Ligularia virgaurea* and native grass species of Tibetan alpine grasslands. *Ecological Research* 26: 47-52.
- Ziller, S.R.** 2001. Plantas exóticas invasoras: a ameaça da contaminação biológica. *Ciência Hoje* 30:77-79.