

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS VEGETAIS MEDIANTE ALELOQUÍMICOS

OXIDATIVE STRESS IN VEGETABLE CELLS MEDIATED
BY ALLELOCHEMICALS

Gustavo Dias de Almeida¹; Moises Zucoloto²; Mariana Caldas Zetun³;
Inácio Coelho⁴ e Fabrício Moreira Sobreir⁵

Resumo. A alelopatia é uma interação entre dois organismos, onde um componente é afetado e o outro permanece estável. Esta interação pode ser fonte de descobertas para novos compostos fitotóxicos naturais com baixa toxicidade aos organismos não alvos de controle. A maior parte dos aleloquímicos são metabólitos secundários como os terpenóides, compostos fenólicos e ácido cianídrico, entre outros. A atuação dos aleloquímicos é variada e afeta um grande número de reações bioquímicas, resultando em diferentes modificações fisiológicas nas plantas, como na atividade enzimática, divisão e estrutura de células, permeabilidade das membranas e captação de íons, culminando na redução ou inativação da germinação e crescimento das plantas. Efeitos dos aleloquímicos sobre a fotossíntese e respiração tem sido melhor caracterizados, embora vários trabalhos tenham demonstrado a atuação desses compostos no estresse oxidativo, resultando em um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, os quais em concentrações elevadas são danosos às células. Dessa forma, o conhecimento dos mecanismos de atuação dos aleloquímicos é necessário para o desenvolvimento de técnicas de manejo sustentável na agricultura.

Palavras chaves: Alelopatia, estresse oxidativo, germinação, desenvolvimento radicular.

Abstract. Allelopathy is an interaction among two organisms, where one of that is affected and the other stays stable. It can be source for discoveries of new natural phytotoxic compounds with low toxicity to the organisms that are not target of control. Most of the allelochemicals are secondary metabolites like terpenoids, phenolic compounds, organic cyanides and longchain fatty acids. The performance of the allelochemicals can be different according the situations, and it affects a great number of biochemical reactions, resulting in different physiologic modifications in the plants. Allelochemicals could affect different pathways, like, the enzymatic activity, division and structure of cells, permeability of the membranes and ions reception, culminating in reduction or inactivation of the germination and plant growth. Effects of the allelochemicals on the photosynthesis and breathing has been better characterized, however, several researches had demonstrated the performance of those compounds in oxidative stress, resulting in an increase of oxygen reactive species production which in high concentrations are harmful to cells. In that way, the knowledge of mechanisms of allelochemicals performance is necessary for the development of sustainable techniques in agriculture.

Key words: Allelopathy, oxidative stress, germination, root development.

INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de produzir substâncias químicas com propriedades que afetam benéfica ou

maléficamente outras espécies de plantas em um fenômeno denominado alelopatia, cujo significado é de origem grega *allelon* (de um para outro) e *pathós* (sofrer) (Molisich, 1937). Desta forma, alelopatia refere-

¹ Engenheiro Agrônomo. Mestrando em Fitotecnia, Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, CEP: 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. <gdalmeida.ufv@hotmail.com>

² Engenheiro Agrônomo. Mestrando em Produção Vegetal, Departamento de Engenharia Rural do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES). Alto Universitário, s/n, Centro, CP 16, CEP.: 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil. <moiseszucoloto@hotmail.com>

³ Graduanda em Medicina Veterinária, aluna de iniciação científica (PIBIC/UFES), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES). Alto Universitário, s/n, Centro, CP 16, CEP: 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil. <maricz@hotmail.com>

⁴ Professor Associado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, (CCA-UFES). Alto Universitário, s/n, Centro, CP 16, CEP: 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil. <ruiamario@cca.ufes.br>

⁵ Graduando em Agronomia, aluno de iniciação científica (PIBIC/UFES), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, (CCA-UFES). Alto Universitário, s/n, Centro, CP 16, CEP: 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil. <sobreirafm@bol.com.br>

Recibido: Marzo 26 de 2008; aceptado: Mayo 28 de 2008.

se a qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente (Rice, 1984). Atualmente, a Sociedade Internacional de Alelopatia define esta interação como sendo “vários processos envolvendo a produção de metabólitos secundários em plantas, algas, bactérias e vírus, que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícolas; um estudo da função dos metabólitos secundários, sua significância em organizações biológicas, origem evolutiva e elucidação dos mecanismos envolvendo relações planta-planta, planta-microorganismo, planta-vírus, planta-inseto e interações entre planta-solo-planta” (Gniazdowska e Bogatek, 2005).

Esses compostos são encontrados em diferentes partes da planta e distribuídos em concentrações variadas durante o seu ciclo de vida. Os aleloquímicos quando liberados em quantidades suficientes causam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação, no crescimento e/ou no desenvolvimento de plantas já estabelecidas e, ainda, no desenvolvimento de microorganismos (Carvalho, 1993).

Os efeitos alelopáticos dependem dos aleloquímicos liberados no ambiente pelas plantas doadoras, fato este que distingue alelopatia da competição, pois essa última envolve a redução ou a retirada de algum fator do ambiente necessário à outra planta no mesmo ecossistema, como água, luz e nutrientes. Já na alelopatia somente um organismo é afetado, enquanto o outro permanece estável (Radosevich, Holt e Chiersa 1997). Nesse sentido, problemas relacionados às plantas daninhas têm sido tratados somente sob o ponto de vista da competição, sendo que pouca atenção tem sido dada às perdas econômicas em campos infestados causadas pelas interferências alelopáticas destas plantas daninhas sobre a cultura (Einhelg e Leather, 1988).

Compostos fitotóxicos naturais (incluindo aleloquímicos) podem apresentar alto potencial para o controle de ervas daninhas (Souza Filho, 2006). Geralmente esses compostos apresentam baixa toxicidade aos organismos não alvo de controle, sendo fonte potencial para descoberta de novas moléculas de herbicidas menos agressivas ao ecossistema (Morales *et al.*, 2007).

ALELOPATIA E SEUS EFEITOS

Desde a antiguidade sabe-se que algumas espécies vegetais podem prejudicar o crescimento de outras que estão nas suas proximidades, sendo que durante muito tempo esse fato foi considerado um fenômeno inexplicável (Rodrigues, Rodrigues e Reis, 1992).

Nas últimas décadas, a função da alelopatia em ecossistemas naturais e manejados tem despertado o interesse de muitos pesquisadores (Maraschin e Alves-Áquila, 2005). A alelopatia é reconhecida como um mecanismo ecológico que influencia na sucessão vegetal primária e secundária, englobando todos os estádios sucessionais (Reigosa, Sánchez e González, 1999), na formação de comunidades vegetais e na dinâmica entre diferentes formações (Rizvi *et al.*, 1992), na dominância de certas espécies vegetais, afetando a biodiversidade local (Reigosa, Sánchez, e González, 1999) e a agricultura, sendo a última alvo da maioria dos estudos envolvendo este mecanismo.

Existem dúvidas se as substâncias alelopáticas representam o produto final do metabolismo celular ou se são sintetizadas pelas plantas com funções específicas. Alguns pesquisadores defendem a primeira hipótese, pois existem maiores quantidades de agentes aleloquímicos nos vacúolos das células, onde seriam depositados para evitar sua própria autotoxicidade. Já outros consideram que a produção desses compostos é regida pelas leis da genética e que estão sendo constantemente sintetizados e degradados pelas plantas (Rezende e Pinto, 2003).

De acordo com Miller (1996), a autotoxicidade e a heterotoxicidade são diferentes formas de alelopatia. A autotoxicidade ocorre quando a planta produz substâncias tóxicas que inibem a germinação das sementes e o crescimento de plantas da mesma espécie. Pesquisas têm mostrado que as plantas de alfafa contêm compostos fitotóxicos solúveis em água que são liberados dentro do ambiente do solo por meio de folhas frescas, caules e tecidos da coroa, bem como de material seco, raízes em decomposição e sementes (Hall e Henderlong, 1989). A heterotoxicidade ocorre quando substâncias fitotóxicas são liberadas pela lixiviação e exudação das raízes e decomposição de resíduos de algum tipo de planta sobre a germinação das sementes e o crescimento de outras plantas (Nuñez *et al.*, 2006). As substâncias alelopáticas

liberadas por uma planta podem afetar o crescimento, prejudicar o desenvolvimento normal e até mesmo inibir a germinação das sementes de outras espécies vegetais (Weir, Park e Vivanco, 2004).

Os efeitos alelopáticos de uma planta são aceitos desde que seja comprovado que (Olofsdotter Jensen e Courtois, 2002):

(a) um inibidor químico efetivo esteja sendo produzido e ocorra numa concentração potencialmente efetiva;

(b) a inibição não seja por efeito de competição da planta por luz, água e nutrientes, nem por uma atividade animal.

O efeito das substâncias inibidoras é mais pronunciado em solos arenosos do que naqueles ricos em matéria orgânica, pois os processos de inativação e destruição das toxinas são mais lentos em solos pobres. Sob estes aspectos, é de se esperar maior influência alelopática em solos arenosos do que em solos ricos em microrganismos e frações coloidais (Barcik, 1999).

BIOSSÍNTSE E LIBERAÇÃO DOS ALELOQUÍMICOS

Entre os agentes alelopáticos existem mais de 300 compostos secundários vegetais e microbiológicos pertencentes a muitas classes de produtos químicos (Rice, 1984) sendo que este número continua aumentando com a realização de novas pesquisas. Essa diversidade entre estruturas aleloquímicas é um fator que dificulta os estudos de alelopatia. Outra complicação é que a origem de um aleloquímico freqüentemente é obscura e sua atividade biológica pode ser reduzida ou aumentada pela ação microbiológica, oxidação e outras transformações. Possíveis fontes de aleloquímicos no ambiente das plantas incluem numerosos microrganismos, certas invasoras, uma cultura anterior ou mesmo a cultura atual. Da mesma forma, as espécies afetadas podem ser os microrganismos, as invasoras ou a cultura (Einhellig, 1996).

Vários tipos de compostos orgânicos produzidos por plantas superiores ou microrganismos foram identificados como aleloquímicos, sendo eles: terpenos, esteróides, ácidos orgânicos solúveis em água, aldeídos alifáticos, cetonas, ácidos graxos de

cadeia longa, poliacetilenos, naftoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas, originados da rota metabólica do acetato mevalonato. Já os fenóis simples, ácidos benzóicos e derivados, ácidos cinâmicos e derivados, cumarinas, aminoácidos, e polipeptídeos sulfetos e glicosídeos, alcalóides, cianidrina, flavonóides, purinas e nucleosídeos, derivados de quinonas e taninos hidrolizáveis e condensados são originados da rota metabólica do ácido chiquímico (Rezende e Pinto, 2003).

A maioria das plantas são potencialmente capazes de sintetizar composto alelopáticos, embora as espécies cultivadas e suas variedades comerciais tenham perdido grande parte dessa capacidade, sendo que esta característica era mais comum nos precursores silvestres das atuais plantas cultivadas, que se adaptaram para competir com outras plantas, garantindo não só a formação de estandes puros, como também a defesa contra insetos e patógenos (Bansal e Bhan, 1993).

A produção de aleloquímicos pode variar em qualidade e quantidade de espécie para espécie, na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, pois muitos deles têm suas sínteses desencadeadas por eventuais vicissitudes a que as plantas estão expostas (Ferreira e Áquila, 2000). De acordo com Einhellig e Leather (1988), a natureza e a quantidade de substâncias alelopáticas diferem com a espécie, a idade do órgão da planta, a temperatura, a intensidade luminosa, a disponibilidade de nutrientes, a atividade microbiana da rizosfera e a composição dos solos em que se encontram a raízes.

Todas as partes das plantas podem conter compostos alelopáticos, sendo estes encontrados nas folhas, caules aéreos, rizomas, raízes, flores, frutos e sementes de diversas espécies, mas as folhas e as raízes são as fontes mais importantes de aleloquímicos (Weston, 1996).

Os compostos alelopáticos podem ser liberados das plantas por lixiviação e volatilização a partir dos tecidos, exsudação pelas raízes e decomposição de resíduos da planta (Weir, Park e Vivanco, 2004), do seguinte modo:

Lixiviação. As toxinas solúveis em água são lixiviadas da parte aérea e das raízes, ou ainda dos resíduos vegetais em decomposição. Pode-se

citar, principalmente, a lixiviação dos ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, substâncias pécticas, terpenóides, alcalóides, compostos fenólicos e giberelina.

Volatilização. Compostos aromáticos são volatilizados das folhas, flores, caules e raízes e podem ser absorvidos por outras plantas. Nesse grupo, encontram-se compostos como o gás carbônico (CO_2), a amônia (NH_3), o etileno e os terpenóides. Esses últimos atuam sobre as plantas vizinhas por meio dos próprios vapores ou condensados no orvalho, ou ainda, alcançam o solo e são absorvidos pelas raízes.

Exsudação pelas raízes. Um grande número de compostos alelopáticos são liberados na rizosfera circundante e podem atuar direta ou indiretamente nas interações planta-planta e na ação de microrganismos. Entre esses compostos podem ser citados o ácido oxálico, a amidalina, a cumarina e o ácido transcinâmico.

Decomposição de resíduos. Toxinas são liberadas pela decomposição das partes aéreas ou subterrâneas, direta ou indiretamente, pela ação de microrganismos. Perdas da integridade de membranas celulares permitem a liberação de um grande número de compostos que impõem toxicidade aos organismos vizinhos, tais como os glicosídeos cianogênicos, ácidos fenólicos, agropireno, cumarinas e flavonóides.

MECANISMOS DE AÇÃO DOS ALELOQUÍMICOS

A ação dos aleloquímicos está envolvida na inibição e modificação do crescimento ou desenvolvimento das plantas. Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas respostas, motivo pelo qual torna-se difícil esclarecer o modo de ação destes compostos (Seigler, 1996). No entanto, alguns autores (Resende e Pinto, 2003) listam vários mecanismos de ação dos aleloquímicos, que podem afetar os processos de respiração, fotossíntese, atividade enzimática, relações hídricas, abertura de estômatos, nível de fitomônios, disponibilidade mineral, divisão e alongamento celular, estrutura e permeabilidade de membranas e parede celular, sendo que muitos desses processos ocorrem em função do estresse oxidativo.

Estresse oxidativo. Uma molécula de oxigênio em seu estado diatômico (O_2) ao aceitar um elétron forma o superóxido O_2^- , o qual é a primeira espécie de oxigênio reativo (EROs) formado. Este processo ocorre nos tecidos vegetais, onde por ação de algumas enzimas o radical superóxido é transformado em água (Mori e Schroeder, 2004).

No entanto, um dos diversos efeitos dos aleloquímicos nas plantas é o controle da produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que se acumula nas células em respostas ao aleloquímico, sendo desta forma responsáveis por danificar as células causando a sua morte (Testa, 1995).

Os aleloquímicos estimulam a produção de EROs por diversos mecanismos. Dentre eles, o bloqueio da cadeia transporta de elétrons, onde os elétrons ficam livres e reagem facilmente com o O_2 formando superóxido. O sorgolene, uma substância presente no sorgo (*Sorghum bicolor*), é capaz de inibir a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II (PSII) para fotossistema I (PSI) (Gniazdowska e Bogatek, 2005), além de aumentar a produção de EROs que atuam no estresse oxidativo das membranas celulares. Os aleloquímicos também podem formar radicais semioquímicos, um composto derivado das quinonas, o qual é altamente reativo e doa elétrons para o O_2 , formando o superóxido (Weir, Park e Vivanco, 2004). Um outro mecanismo conhecido na formação de EROs é a atividade dos aleloquímicos sobre a NADPH oxidase, uma enzima que transfere elétrons do NADPH e doa para um acceptor (O_2) formando o superóxido (Foreman *et al.*, 2003).

Alguns aleloquímicos podem atuar no aumento da atividade destas enzimas (Šamaj, Baluska e Menzel, 2004). O extrato cru de uma cianobactéria (*Hapalosiphon* sp.) induziu o estresse oxidativo em plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Norin 61) e cebola (*Allium cepa* L. cv. Raputa II), fato que foi atribuído ao aumento da atividade da NADPH oxidase, pois com a utilização de inibidores dessa enzima, difenileneiodo (DPI) e imidazole (IM), houve significativa redução (até 70%) da peroxidação das membranas celulares após 48h de experimento, sugerindo assim que alguns aleloquímicos estimulam a produção da NADPH oxidase, devido ao aumento da produção de EROs (Sanevas, Sunohara e Matsumoto, 2007). Em plantas superiores, a presença desses inibidores pode

determinar a produção de EROs (Maksymiec e Krupa, 2006).

Os radicais superóxido podem sofrer uma série de transformações através de processos enzimáticos e se tornarem mais reativos, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxil (OH^-) ou hidroperoxil (HO_2^-) (Hammondkosak e Jones, 1996). Consequentemente, estes radicais podem afetar diretamente a permeabilidade das membranas celulares, causando danos ao DNA e às proteínas.

Alguns aleloquímicos rapidamente despolarizam as membranas das células, aumentando sua, permea-

bilidade e induzindo a peroxidação do lipídeos, causando um distúrbio celular generalizado que conduz à morte das células (Yu *et al.*, 2003). A eliminação do radical superóxido (O_2^-) é realizada por enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a peróxido dismutase (POD), que catalisa o O_2^- em H_2O_2 , protegendo as células dos efeitos tóxicos desses radicais (del Rio *et al.*, 2002). Entretanto, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados por outras enzimas, como a catalase (CAT) e a glutationa redutase (GSH), que atuam transformando as EROs intermediárias em água (Figura 1) (Blokhina, Virolainen e Fagerstedt, 2003).

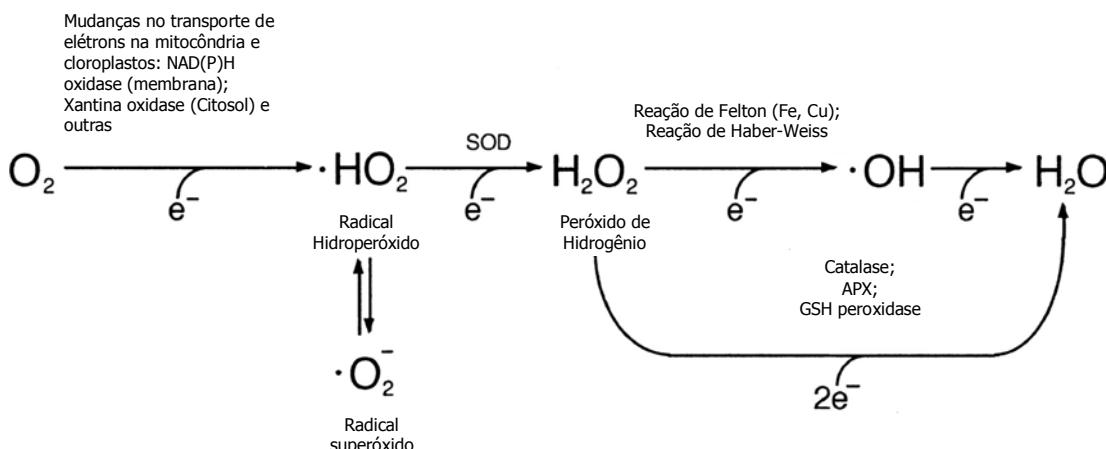


Figura 1. Via metabólica de espécies reativas de oxigênio em plantas. Adaptado de Mori & Schroeder, 2004.

Com o aumento das espécies reativas de oxigênio, as plantas aumentam a produção de SOD, CAT e GHS como defesa, embora tenha sido relatado que alguns aleloquímicos podem reduzir a atividade dessas enzimas (Weir, Park e Vivanco, 2004). Observou-se também que o aleloquímico ácido secalônico F, produzido pelo fungo *Aspergillus japonicus*, reduziu significativamente a atividade das enzimas SOD e POD em *Bidens pilosa* L., *Echinochloa crus-galli* L., *S. bicolor* e *Oryza sativa* L., e aumentou a atividade do produto da degradação de lipídeos malonaldeído (MDA) (Zeng *et al.*, 2001). Desta forma, a redução da atividade da glutationa redutase (GR) em raízes de plântulas de *Lycopersicon esculentum* L., submetidas ao extrato de *Sicyos deppei* (Nuñez *et al.*, 2006) e redução da atividade dessa

mesma enzima em sementes de mostarda (*Brassica juncea* L.) tratadas com extrato de folhas de girassol (*Helianthus annuus* L. cv. Ogrodowy) (Oracz *et al.*, 2007), sugere que em alguns casos os aleloquímicos podem estar diretamente envolvidos na inibição de enzimas oxidativas, deixando as plantas vulneráveis aos danos oxidativos (Weir, Park e Vivanco, 2004).

O aumento de radicais livres em células de plantas em respostas aos aleloquímicos mostra-se de forma similar à infecção por patógenos, bem como outros fatores abióticos que resultam no estresse oxidativo (Gniazdowska e Bogatek, 2005). Nesse sentido, (-)-catequina, um aleloquímico dos exudatos das raízes de *Centaurea maculosa*, tem sido relatado como inibidor do crescimento de *Festuca idahoensis*, *Koeleria*

micrantha e *Arabidopsis thaliana* pelo aumento da produção de EROs (Bais *et al.*, 2003a). Um aumento substancial de EROs provocado por (–)-catechin nas raízes de plantas suscetíveis foi similar aos padrões da morte induzida de células, no entanto, com a adição de ácido ascórbico junto com (–)-catequina observou-se bloqueio da produção de EROs, suportando a hipótese de que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e oxidantes é provavelmente um efeito secundário de muitos aleloquímicos. Assim, provavelmente as plantas aumentam a atividade dessas enzimas na tentativa de contra atacar os efeitos prejudiciais da geração de EROs.

Contudo, as espécies reativas de oxigênio podem atuar como mensageiros nas reações em cascata. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no meio extracelular induz o aumento da permeabilidade dos canais de cálcio e em resposta a isto ocorre um aumento do Ca^{2+} no citosol das células (Mori e Schroeder, 2004). A aplicação de (–)-catequina em raízes de *A. thaliana*, aumentou a produção EROs, que consequentemente aumentaram o Ca^{2+} citosólico, que responsável pela ativação da morte programada das células, inicialmente caracterizada pela perda da homeostase iônica devido à falência do controle de pH celular (Bais *et al.*, 2003b). Contudo, na tentativa de manter a homeostase das células, a mitocôndria capta o Ca^{2+} livre no citosol, o que coincide com um aumento da produção de EROs na mitocôndria culminado também no estresse oxidativo (Coelho, Taylor e Ryan, 2002). No entanto,

esse mecanismo ainda não está completamente elucidado.

A degradação do DNA é um dos indicadores específicos da morte programada das células (Danon *et al.*, 2000). Durante esse processo a clivagem das cromátides é catalisada por endonucleases dependentes de Ca^{2+} endógeno, sendo que o aumento do Ca^{2+} citosólico resulta em maior atividade dessa enzima. Neste sentido, Sanevas Sunohara e Matsumoto (2007) propõe que o extrato de *Hapalosiphon* sp. aumenta a atividade das endonucleases nas raízes de *A. cepa* resultando em morte das células, sendo que esta é a maior causa da redução do crescimento radicular dessa espécie quando comparada com *T. aestivum*.

O aumento do Ca^{2+} citosólico pode atuar na ativação de genes (Foreman *et al.*, 2003), já que uma hora após aplicação de (–)-catequina em plantas de *A. thaliana*, cerca de 956 genes foram duplamente induzidos, considerando que 12 horas antes a maioria desses genes estavam reprimidos, sendo que provavelmente os mesmos estão envolvidos na morte programada das células (Bais *et al.*, 2003b).

Estruturas celulares. A redução do crescimento de plantas na presença de aleloquímicos é associada com uma forte inibição da mitose ou/e rompimento da estrutura das organelas, como por exemplo, núcleo e mitocôndrias (Figura 2).

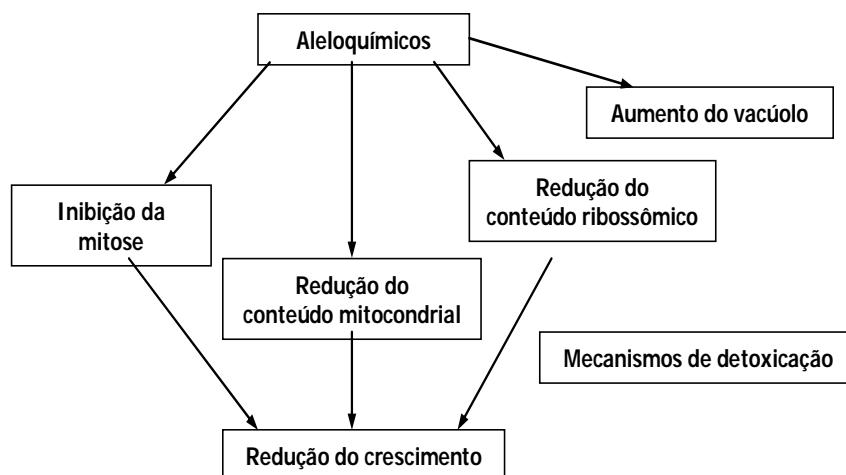


Figura 2. Modo de ação dos aleloquímicos ao nível celular. Adaptado de Gniazdowska e Bogatek, 2005.

A análise do índice mitótico é um método eficiente usado para avaliar o efeito alelopático de uma planta sobre outra. A observação em microscópio torna-se imprescindível na detecção de anomalias nas fases da mitose, bem como de formas atípicas das estruturas celulares (Gniadkowska e Bogatek, 2005). O uso do extrato aquoso das folhas da leucena (*Leucaena leucocephala*) tem apresentado efeito alelopático sobre várias plantas, tais como alface, arroz, milho e nas plantas daninhas desmódio (*Desmodium descendens*), guanxuma (*Sida rhombifolia*) e assapeixe (*Vernonia polyanthes*), inibindo a germinação e afetando o crescimento do sistema radicular das plantas (Souza Filho, Rodrigues e Rodrigues, 1997). Este fato pode ser atribuído à capacidade do extrato aquoso de leucena de reduzir o índice mitótico em plantas de milho, bloqueando

completamente a fase de telófase em maiores concentrações (Pires *et al.*, 2001).

O extrato aquoso de *Uncaria tomentosa* (em concentrações de 8 a 16 mg·ml⁻¹) inibiu completamente a atividade mitótica das raízes de *A. cepa* L. devido a alterações na estrutura dos cromossomos, sendo observado um forte encurtamento e engrossamento das cromátides nas fases de prófase e metáfase, bem como distúrbio nos cromossomos da anáfase e prófase (Figura 3). Isto é devido a um desequilíbrio das histonas e outras proteínas responsáveis pela estrutura das cromátides (Kurás *et al.*, 2006). Mudanças semelhantes foram observadas nas cromátides das células de *A. cepa* submetidas ao extrato aquoso de *Taxus baccata* (Majewska *et al.*, 2000).

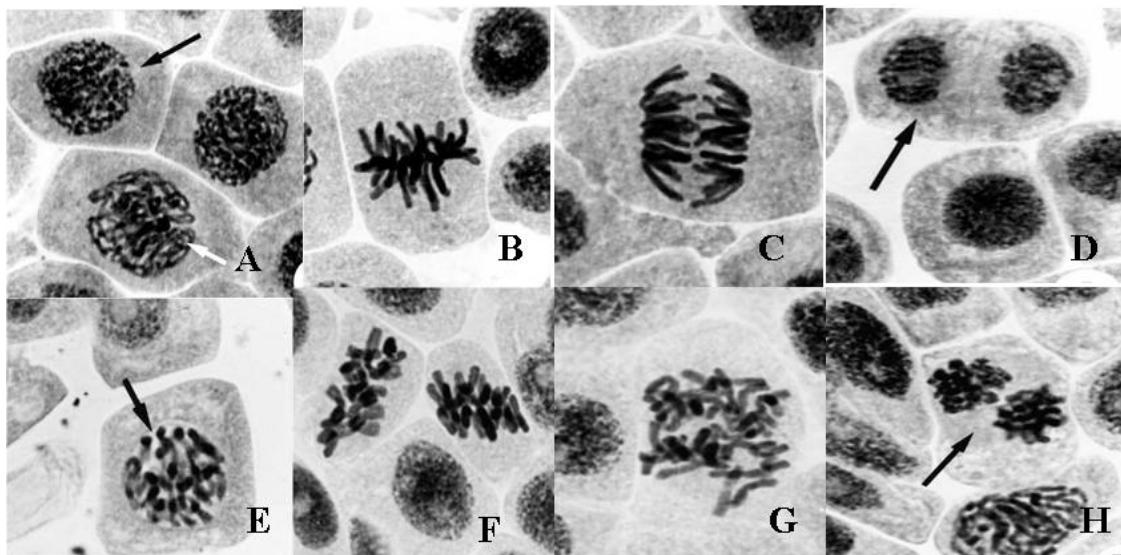


Figura 3. Microfotografias controle das células meristemáticas das raízes de *Allium cepa*, nas fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase, respectivamente (A-D). Mudanças nas estruturas das células em mitose submetidas aos tratamentos com extrato de *Uncaria tomentosa*, nas respectivas fases anteriores (E-F). Adaptado de Kurás *et al.*, 2006.

Estudos recentes têm demonstrado que os aleloquímicos produzidos por *Secale cereale* L. reduz o crescimento radicular de *Cucumis sativus* L. causando mudanças nas estruturas celulares das raízes (Burgos *et al.*, 2004). Solo tratado com ácido benzólico em maiores concentrações supriu em até 81,1% o crescimento do sistema radicular de mostarda, fato que foi atribuído a desorganização e destruição das organelas celulares e dissolução da lamela média

(Kaur, Inderjit e Kaushik 2005). Da mesma forma, a aplicação de ácido secalônico F oriundo de *A. japonicus*, proporciona perda da membrana e inchaço dos cloroplastos e das mitocôndrias das folhas de arroz (*Oriza sativa*) (Zeng *et al.*, 2001).

Aleloquímicos como o 2(3H)-benzo-oxazolinoni (BOA) e 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3(4H) (DIBOA) pode reduzir a capacidade regenerativa de células radiculares

de *C. sativus*. Adicionalmente, BOA e DIBOA aumentam o tamanho dos vacúolos citoplasmáticos, redução do número de ribossomos e mitocôndrias, sendo então proposto que o aumento dos vacúolos pode ser devido à tentativa de degradação dos metabólitos tóxicos (Burgos *et al.*, 2004).

Desse modo, sugere-se que os distúrbios nas membranas celulares podem ser consequência da peroxidação das membranas de lipídeos ou proteínas (Song, Zheng e Chun, 1996), resultando em mudanças na permeabilidade das membranas, destruição dos cloroplastos, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático. Esses processos fisiológicos anormais resultam na redução da fotossíntese bem como no aumento da respiração, contribuindo para a redução do crescimento das plantas.

Germinação de sementes. Vários compostos alelopáticos influenciam a germinação e a viabilidade de sementes (Gniazdowska e Bogatek, 2005). O extrato aquoso de folhas de girassol inibiu em mais de 80% a germinação de sementes de mostarda, sendo observada também uma drástica redução da viabilidade das sementes (Oracz *et al.*, 2007). Sementes de *Coronilla varia* L. apresentaram reduzida taxa de germinação quando submetidas aos extractos aquosos de *Eucalyptus camaldulensis* e *Juglans regia* (Isfahan e Shariati, 2007). De acordo com Espinosa, Martínez e Quiroz (2008), solos cultivados com espécies de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis x urophylla* contém compostos fenólicos solúveis em água, que inibem a germinação e o crescimento inicial de feijão preto (*Phaseolus vulgaris*). O extrato de camaru (*Amburana cearensis* S.) inibiu a germinação, o desenvolvimento e o crescimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e picão-preto (*Bidens pilosa* L.) (Mano, 2006).

A germinação de cereais depende da atividade das α -amilases que regulam a degradação de amido necessária para o suprimento do metabolismo (Gniazdowska e Bogatek, 2005). Extratos de *E. globosus* reduziram a atividade dessa enzima em sementes de *Eleusine coracanta*, resultando em inibição da germinação (Padhy, Patnaik e Tripathy, 2000). O tratamento de sementes de *P. vulgaris* com extractos de *Callicarpa accuminata*, proporcionou aumento da expressão de uma proteína inibidora de α -amilases (Cruz, Ayala e Anaya., 2002). Na germinação das sementes, o ciclo do glicoxalato inicia uma função

de mobilização dos triglicerídeos, onde durante cada estágio de germinação, enzimas como a isocitrato liase, aumentam sua atividade devido ao metabolismo de lipídeos armazenados nos tecidos de germinação (Gniazdowska e Bogatek, 2005). Nesse sentido, a inibição da mobilização de lipídeos na presença de ácido ferrúlico e *p*-cumárico foi detectada durante a germinação de colza (*Brassica napus*) (Baleroni *et al.*, 2000). Esses resultados corroboram com (Kupidłowska e Bogatek, 2003), que observaram uma supressão da mobilização de lipídeos em sementes de mostarda tratadas com extrato de girassol. Compostos fenólicos reduzem a atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na via oxidativa das pentoses fosfato, as quais asseguram níveis de ATP e esqueletos de carbono suficientes para a germinação das sementes (Gniazdowska e Bogatek, 2005). Compostos fenólicos contidos nas folhas de *Cassia uniflora*, em altas concentrações, inibiram a germinação de sementes de *Raphanus sativus* e *Brassica juncea* (Ghayal *et al.*, 2007) e quando extraídos de solos cultivados por *Pinus laricio* inibiram a germinação das sementes da própria espécie (Muscolo, Panuccio e Sidari, 2001).

Dessa forma, grande parte dos aleloquímicos atua no estresse oxidativo, produzindo espécies reativas de oxigênio, que atuam diretamente ou como sinalizadores para os processos de degradação celular, impedindo assim a germinação e o desenvolvimento inicial, bem como processos fisiológicos vitais às plantas.

BIBLIOGRAFIA

- Bais, H.P. T.S. Walker, A.J. Kennan, F.R. Stermitz and J.M. Vivanco. 2003a. Structure-dependant phytotoxicity of catechins and other flavonoids: flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). *J. Agric. Food Chem.* 51(4):897-901.
- Bais, H.P., R. Vepachedu, S. Gilroy, R.M. Callaway and J.M. Vivanco. 2003b. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301(5638): 1377-1380.
- Baleroni C.R.S., M.L.L. Ferrarese, N.E. Souza and F.O. Ferrarese. 2000. Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives. *Biol. Plant.* 43(2):313-316.
- Bansal, G.L. and V.M. Bhan. 1993. Status of research on allelopathy and future scope of work in Indian. *Indian Journal of Agricultural Science.* Ind. J. Agric. Sci. 63(12): 769-776.

- Barcik, C. 1999. Processos autoalelopáticos na cultura de alfafa (*Medicago sativa* L.) variedade crioula em solos de diferentes texturas. Dissertação Mestrado em Ciências do Solo. Setor De Ciências Agrárias, Universidade Federal Do Paraná. Curitiba, Brasil. 109 p.
- Blokhina, O., E. Virolainen and K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91(2):179–194.
- Burgos, N.R., R.E. Talbert, K.S. Kim and Y.I. Kuk. 2004. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *J. Chem. Ecol.* 30(3):671–689.
- Carvalho, S.I.C. 1993. Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. vulgaris cv. 85 Bandeirante. Dissertação Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 72p.
- Coelho, S.M., A.R. Taylor and K.P. Ryan. 2002. Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca^{2+} wave propagation in fucus rhizoid cells. *Plant Cell* 14(10):2369–2381.
- Cruz, R.O., G.C. Ayala and A.L. Anaya. 2002. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiol. Plantarum* 116 (1):20-27.
- Danon, A., V. Delorme, N. Mailhac and P. Gallois. 2000. Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38(9):647–655.
- Del Rio, L.A.; F.J. Corpas, L.M. Sandalio, J.M. Palma, M. Gomez and J.B. Barroso. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* 53(372):1255-1272.
- Einhellig, F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agron. J.* 88(6):886-893.
- Einhellig, F.A. and G.R. Leather. 1998. Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop production. *J. Chem. Ecol.* 14(10):1829-1844.
- Espinosa-Garcia, F.J., Martinez, H.E., Quiroz, F.A. 2008. Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp plantations on germination and early growth of annual crops. *Allelopath. J.* 21(1):25-37.
- Ferreira, A.G. e M.E.A. Áquila. 2000. Alelopata: uma área emergente da ecofisiologia. *Rev. Bras. Fis. Veg.* 12 (Edição especial):175-204.
- Foreman, J., V. Demidchik, J.H.F. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M.A.Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J.D.G. Jones, J.M. Davies and L. Dolan. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422(6930):442-445.
- Ghayal, N.A., K.N. Dhumal, N.R. Deshpande, A.M. Kulkarni, A.U. Phadke and S.M. Shah. 2007. Phytotoxic effects of *Cassia uniflora* leaf leachates on germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus*) and mustard (*Brassica juncea*). *Allelopath. J.* 19(2):361-372.
- Gniatzowska, A. and R. Bogatek. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. *Acta Physiologia. Plant.* 27(3):395-407.
- Hegde, R.S. and D.A. Miller. 1989. Alfalfa autotoxic fraction characterization and initial separation. *Crop Sci.* 29(2):425-428.
- Hammond-Kosack, K.E and J.D. Jones 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8(10):1773-1791.
- Isfahan, M.N. and M. Shariati. 2007. The effect of some allelochemicals on seed germination of *Coronilla varia* L. seeds. *Am. J. Agric. Environ. Sci.* 2(5):534-538.
- Kaur, H., B. Inderjit and S. Kaushik, 2005. Cellular evidence of allelopathic interference of benzoic acid to mustard (*Brassica juncea* L.) seedling growth. *Plant Physiol. Biochem.* 43(1):77-81.
- Kupidłowska, E. and R. Bogatek. 2003. Allelopathic potential of sunflower. II. Ultrastructural changes in germinating white mustard (*Sinapis alba* L.) seeds treated with water extract from sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves. *Acta Physiol. Plant.* 25(1): 89-90.
- Kuras, M., J. Nowakowska, E. Śliwińska, R. Pilarski, R. Ilasz, T. Tykarska, A. Zobel, K. Gulewicz. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J. Ethnopharmacol.* 107(2):211–221.
- Majewska, A., M. Furmanowa, E. Sliwi'Nska, K. Głowniak, J. Guzewska, M. Kura'S and A. Zobel. 2000. Influence of extracts from shoots of *Taxus baccata* var. *elegantissima* on mitotic activity of meristematic cells of *Allium cepa* L. roots. *Acta Soc. Bot. Polon.* 69(3):185-192.
- Maksymiec, W. and Z. Krupa. 2006. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Env. Exp. Bot.* 57(1-2): 187-194.

Mano, A.R.O. 2006. Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carapicho. Dissertação Mestrado em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza CE, Brasil. 102 p.

Maraschin S., F. and M.E.A. Alves-Agüila. 2005. Potencial alelopático de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. *Iheringia, Sér. Bot.*, Porto Alegre. 60(1):91-98.

Miller, D.A. 1996. Allelopathy in forage crop systems. *Agron. J.* 88(6):854-859.

Molisch, H. 1937. Der Einfluss einer pflanze auf die andere. *Allelopathy*. Gustav Fischer Verlag, Jena. 106 p.

Morales, F.F., M.I. Aguilar, B.K. Diaz, J.R. de Santiago-Gómez and B.L. Hennsen. 2007. Natural diterpenes from *Croton ciliatoglanduliferus* as photosystem II and photosystem I inhibitors in spinach chloroplasts. *Photosynth. Res.* 91(1):71-80, 2007.

Mori, I.C. and J.I. Schroeder. 2004. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* 135(2):702-708.

Muscolo A., M.R. Panuccio and M. Sidari 2001. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination. Respiratory enzyme activities during germination f *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. *J. Plant Growth Regul.* 35(1):31-35.

Nuñez, L.A., T. Romero, J.L. Ventura, V. Blancas, A.L. Anaya and R.G. Ortega. 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Cell Environ.* 29(11):2009–2016.

Olofsdotter, M., L.B. Jensen and B. Courtois. 2001. Improving crop competitive ability using allelopathy- an example from rice. *Plant Breed.* 21(1):1-9.

Oracz, K., C. Bailly, A. Gniazdowska, D. Côme, F. Corbineau and R. Bogatek. 2007. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *J. Chem. Ecol.* 33(2):251–264.

Padhy, B., P.K. Patnaik and A.K. Tripathy. 2000. Allelopathic potential of Eucalyptus leaf litter leachates on germination of seedling growth of finger millet. *Allelopath.* J. 7(1):69-78.

Pires, N.M., P. Souza, H.T. Prates, T.C.L. Faria, I.A.P. Filho e P.C. Magalhães. 2001. Efeito do extrato aquoso de

leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13(1):55-65.

Radosevich, S., J. Holt and C. Chiers. 1997. *Weed ecology: Implications for management*. 2nd ed. Wiley, New York. 608 p.

Reigosa, M.J., A.M. Sánchez and L. González. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18(5): p.577-608.

Rezende, C.P., J.C. Pinto, A.R. Evangelista e I.P.A. Santos. 2003. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. *Boletim Agropecuário*, Universidade Federal de Lavras, MG. (54):1-55.

Rice, E.L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed. Academic Press, New York. 422 p.

Rizvi, S.J.H., H. Haque, V.K. Singh and V. Rizvi. 1992. A discipline called allelopathy. p. 1-8. In: Rizvi, S.J.H. and V. Rizvi (eds.). *Allelopathy: basic and applied aspects*. Chapman and Hall Publishers, London, U.K. 480 p.

Rodrigues, L.R.A., T.J.D. Rodrigues e R.A. Reis. 1992. Alelopatia em plantas forrageiras. UNESP/FUNEP Jaboticabal, São Paulo. 18 p.

Samaj, J., F. Baluska and D. Menzel. 2004. New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends Plant Sci.* 9(5):217-20.

Sanevas, N., Y. Sunohara and H. Matsumoto. 2007. Characterization of reactive oxygen species-involved oxidative damage in *Hapalosiphon* species crude extract-treated wheat and onion roots. *Weed Biol. Manag.* 7(3):172-177.

Seigler, D.S. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. *Agron. J.* 88(6):876-885.

Song, F.M., Z. Zheng and G.X. Chun. 1996. Role of active oxygen and membrane lipid peroxidation in plant-pathogen interactions. *Plant Physiol. Commun.* 32(5): 377-385.

Souza Filho, A.P., L.R.A. Rodrigues e T.J.D. Rodrigues. 1997. Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. *Pesq. Agropec. Bras.* 32(2):165-170.

Souza Filho, A.P.S. 2006. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. *Planta Daninha* 24(3):607-610.

- Testa, B. 1995. The metabolism of drugs and other xenobiotics. Academic Press, New York. 475p.
- Weir, T.L., S.W. Park and J.M. Vivanco. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. Curr. Opin. Plant Biol. 7(4): p.472–479.
- Weston, L.A. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. Agron. J. 88(6):860-866.
- Yu, J.Q., S.F. Ye, M.F. Zhang and W.H. Hu. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. Biochem. Syst. Ecol. 31(2):129-139.
- Zeng, R.S., S.M. Luo, Y.H. Shi, M.B. Shi and C.Y. Tu. 2001. Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid F on higher plants. Agron. J. 93(1):72-79.