

MARINA BELLONI VERONESI

**Avaliação da tolerância de duas espécies nativas  
às fitotoxinas exsudadas por *Sesbania virgata*  
(Cav.) Pers.**

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

2013

MARINA BELLONI VERONESI

**Avaliação da tolerância de duas espécies nativas  
às fitotoxinas exsudadas por *Sesbania virgata*  
(Cav.) Pers.**

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MARCIA REGINA BRAGA

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

**Veronesi, Marina Belloni**

V549a    Avaliação da tolerância de duas espécies nativas às fitotoxinas exsudadas por *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. / Marina Belloni Veronesi -- São Paulo, 2013.  
81 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013  
Bibliografia.

1. Fabaceae. 2. Aleloquímicos. 3. Catequina. I. Título

CDU: 582.736

“Eu acredito demais na sorte. E, tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.”

Thomas Jefferson

À minha família, Ronaldo, Paula,  
Luiza e Heron, dedico.

## Agradecimentos

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

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo Edital Universal “Avaliação da tolerância de espécies nativas e agrônômicas às fitotoxinas exsudadas por Sesbania virgata Cav. Pers” concedido.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) 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 realização deste trabalho.*

*Deixo aqui meu sincero agradecimento à estimada orientadora, Dra. Marcia Regina Braga, pelo acolhimento, dedicação, paciência e compreensão que me foram oferecidos, e além de tudo, por nortear os rumos deste trabalho.*

*À amiga, Dra. Kelly Simões, pela colaboração, exemplo profissional e conselhos valiosos sempre dados de bom grado.*

*Ao Dr. Nelson Augusto dos Santos Júnior pela colaboração e sugestão das espécies utilizadas neste trabalho.*

*Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Patrícia Pinho Tonini, Dr. Cláudio José Barbedo e Dr. Marco Aurélio Sivero Mayworm pelas sugestões de melhoria apresentadas.*

*Aos pesquisadores do Instituto de Botânica, em especial as Dras. Marília Gaspar e Maria Ângela Machado de Carvalho por toda ajuda prestada ao longo deste trabalho.*

*À estimada professora Dra. Aline Cavallari por acreditar em minha capacidade e despertar em mim o imenso prazer pela Botânica.*

*Às funcionárias de apoio, Ana Alice e Cida, por toda ajuda.*

*À técnica de laboratório, Mary Monteiro, pelas imensa ajuda, boa vontade, conversas e conselhos.*

*Às amigas Daiane Broch Mignoni e Vera Lydia El Id pelas conversas sempre produtivas sobre os projetos desenvolvidos pelo grupo.*

*Aos queridos amigos do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pelo carinho, companheirismo, amizade, almoço divertido com salada de frutas e auxílio, dentro do laboratório e fora dele.*

*Às queridas amigas Vanessa Fuentes, Emanuela Oliveira, Thiara Siqueira, Juliana Zerlin e Kassia Fardin pelas longas conversas descontraídas e, principalmente, pelas risadas. Após anos de convivência, posso dizer que não houve um dia na presença de vocês que eu não desse longas gargalhadas. Obrigada.*

*À querida e amiga de longa data, Mayra Jamas, pela presença nos momentos mais importantes da minha vida.*

*À minha “grande família” por estar sempre presente e me apoiando.*

*À você, Heron, pelo amor, companheirismo, confiança, apoio e, principalmente, paciência ao longo desses anos. Acredite, sem você, tudo seria mais difícil.*

*Acho que a palavra “tudo” engloba os inúmeros agradecimentos que devo fazer à minha família. Por isso, após muito pensar, acredito que a frase que melhor define o agradecimento que devo fazer aos meus pais e irmã é: obrigada por tudo.*

## Resumo

*Sesbania virgata* (Cav.) Pers é uma Fabaceae tropical, nativa da América do Sul, que ocorre principalmente em beiras de estradas, campos alagáveis e em solos arenosos ou argilosos. Essa espécie pioneira tem sido descrita como invasora em solos úmidos e alagados, especialmente em plantações de arroz irrigado. As sementes de *S. virgata* exsudam metabólitos secundários antifúngicos e fitotóxicos logo no início do processo de embebição. O flavonóide (+)-catequina é a principal fitotoxina dos exsudatos das sementes, sendo encontrada no seu tegumento e liberada em altas concentrações no primeiro dia de embebição. Recentemente, foi demonstrado que (+)-catequina exsudada por sementes de *S. virgata* inibe a germinação de sementes de alface e tomate e o crescimento de raízes de plântulas de arroz e de *Arabidopsis thaliana*. Uma hipótese recente sobre novas estratégias de defesa vegetal sugere que o sucesso de uma espécie invasora pode ser devido, entre outros, à produção de aleloquímicos, os quais afetam espécies nativas que não possuem a mesma história evolutiva da planta invasora. Sendo assim, supõe-se que as plantas que co-ocorrem em mesmo ambiente teriam desenvolvido mecanismos de tolerância a esses aleloquímicos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a tolerância de espécies que co-ocorrem com *S. virgata* aos aleloquímicos exsudados por ela. Para tanto, foram realizados ensaios de co-germinação nos quais foi estudado o efeito dos exsudatos de sementes de *S. virgata* sobre a germinação e o metabolismo de carboidratos de duas espécies nativas de diferentes estágios sucessionais (*Enterolobium contortisiliquum* e *Peltophorium dubium*) que co-ocorrem naturalmente com *S. virgata*. Catequina comercial também foi utilizada nos ensaios de germinação, visando analisar seus efeitos sobre a germinação e crescimento radicular das duas espécies nativas. Foi observado efeito mais intenso dos exsudatos de sementes de *S. virgata* sobre a radícula e o metabolismo de carboidratos de *E. contortisiliquum*, espécie secundária, em relação ao crescimento de *P. dubium*, espécie pioneira. Os efeitos observados em *E. contortisiliquum* sugerem que a inibição do crescimento radicular reduziu a força de dreno deste órgão causando atraso na mobilização dos carboidratos de reserva. Já para *P. dubium* houve aumento na mobilização de reservas, porém, não foram detectadas diferenças no crescimento radicular. A presença de endosperma rico em galactomanano nas sementes de *P. dubium* pode estar relacionada à menor influência dos exsudatos sobre esta espécie, atuando como barreira física para a entrada de aleloquímicos. Catequina comercial não provocou nas espécies nativas os mesmos efeitos observados pela co-germinação com sementes de *S. virgata*, indicando que outras substâncias presentes nos exsudatos, além da catequina, são as responsáveis pela ação observada. Os resultados obtidos demonstraram que espécies co-ocorrentes também sofrem influência dos exsudatos de *S. virgata*, entretanto, esta é

menos intensa que aquela observada para espécies cultivadas e parece não ser devida unicamente à presença de catequina. Além disso, esta influência parece ser maior quando *S. virgata* co-germina com espécies de diferentes estágios sucessionais.

**Palavras-chave:** aleloquímicos; (+)- catequina; sementes.

## Abstract

*Sesbania virgata* (Cav.) Pers is a tropical legume native to South America that occurs mainly in the borders of roads, flooded fields and sandy or clay soils. This pioneer species has been described as invasive in wetlands and moist soils, especially in irrigated rice plantations. The seeds of *S. virgata* exude antifungal and phytotoxic secondary metabolites at the very beginning of the imbibition process. The flavonoid (+)- catechin is the main phytotoxin leached from the seeds, being found in the testa and released in high concentrations on the first day of imbibition. Recently, it has been demonstrated that (+)-catechin leached by *S. virgata* seeds inhibits germination of lettuce and tomato seeds and seedling root growth of rice and *Arabidopsis thaliana*. A recent hypothesis on plant defense strategies suggests that the success of an invasive species may be due, among others, the production of allelochemicals, which affect native species that do not have the same evolutionary history of the invasive plant. Therefore, it is assumed that plants that grow in the same environment would have developed tolerance to these allelochemicals. Thus, the aim of the present work was to evaluate the tolerance of species that co-occur with *S. virgata* to its allelochemicals. For that, co-germination assays were conducted in which it was studied the effect of seed leachates of *S. virgata* on germination and carbohydrate metabolism of two native species of different successional stages (*Enterolobium contortisiliquum* and *Peltophorium dubium*) that naturally co-occur with *S. virgata*. Commercial catechin was also used in the assays to analyze its effects on germination and root growth of the two native species. It was observed the most intense effects of the leachates of *S. virgata* seeds on the radicle and carbohydrate metabolism of *E. contortisiliquum*, a secondary plant species, than in *P. dubium*, a pioneer species. The effects observed in *E. contortisiliquum* suggest that inhibition of root growth has reduced the sink strength, causing a delay in the mobilization of the reserve carbohydrates. For *P. dubium*, it was observed increased mobilization of reserves, however, no differences were found in root growth. The presence of gslstomanan-rich endosperm in seeds of *P. dubium* can be related to less influence of the *S. virgata* leachates on this species, acting as a physical barrier to the entry of allelochemicals. Catechin did not cause the same effects observed by the co-germination with seeds of *S. virgata* on the native species, indicating that other substances present in the exudates are responsible for these effects. The results of the present work showed that species that co-occur with *S. virgata* are also influenced by its seed leachates, however, with less intensity than crops and the effects seem to be due not solely to the presence of catechin. Furthermore, we observed that these effects seem to be more pronounced when *S. virgata* co-germinates with species of different successional stages.

**Key-words:** Allelochemicals; (+)- catechin; seeds.

## Índice

|                                                                                                                                     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Resumo .....                                                                                                                        | v    |
| Abstract .....                                                                                                                      | viii |
| 1. Introdução .....                                                                                                                 | 1    |
| 1.1. Alelopatia .....                                                                                                               | 1    |
| 1.2. Aleloquímicos exsudados por sementes .....                                                                                     | 3    |
| 1.3. <i>Sesbania virgata</i> como modelo experimental.....                                                                          | 4    |
| 2. Objetivos.....                                                                                                                   | 7    |
| 3. Metodologia .....                                                                                                                | 8    |
| 3.1. Material Biológico .....                                                                                                       | 8    |
| 3.2. Ensaio de co-germinação .....                                                                                                  | 9    |
| 3.3 Ensaio de germinação com catequina comercial.....                                                                               | 10   |
| 3.4. Análises de carboidratos .....                                                                                                 | 10   |
| 3.4.1. Extração de carboidratos solúveis .....                                                                                      | 11   |
| 3.4.2. Quantificação dos carboidratos.....                                                                                          | 11   |
| 3.4.3. Análise qualitativa dos carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)..... | 11   |
| 3.4.4. Extração de galactomanano .....                                                                                              | 12   |
| 3.4.5. Hidrólise ácida e composição do galactomanano .....                                                                          | 12   |
| 3.4.6. Extração e quantificação de amido .....                                                                                      | 12   |
| 3.4.7. Extração da parede celular .....                                                                                             | 13   |
| 3.4.8. Hidrólise ácida e quantificação de açúcares da parede celular .....                                                          | 14   |
| 3.5. Ensaio enzimáticos .....                                                                                                       | 14   |
| 3.5.1. Extração e quantificação de atividade de $\alpha$ -amilase .....                                                             | 14   |
| 3.5.2. Extração e quantificação de atividade de $\alpha$ -galactosidase.....                                                        | 15   |
| 3.5.3. Extração e quantificação de invertases .....                                                                                 | 15   |

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6. Quantificação de proteínas.....                                                                                                                                                                         | 16 |
| 3.7. Delineamento Experimental e Análise Estatística.....                                                                                                                                                    | 16 |
| 4. Resultados.....                                                                                                                                                                                           | 17 |
| 4.1. Mobilização dos carboidratos de reserva e atividade de enzimas relacionadas ao processo germinativo em sementes de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> co-germinadas com <i>Sesbania virgata</i> ..... | 17 |
| 4.2. Mobilização dos carboidratos de reserva relacionada ao processo germinativo em sementes de <i>E. contortisiliquum</i> germinadas com catequina .....                                                    | 28 |
| 4.3. Mobilização dos carboidratos de reserva e atividade de enzimas relacionadas ao processo germinativo em sementes de <i>Peltophorium dubium</i> co-germinadas com <i>S. virgata</i> .....                 | 30 |
| 4.3.1. Análises no embrião .....                                                                                                                                                                             | 30 |
| 4.3.2. Análises no endosperma.....                                                                                                                                                                           | 39 |
| 4.4. Mobilização dos carboidratos de reserva relacionados ao processo germinativo em sementes de <i>P. dubium</i> germinadas com catequina .....                                                             | 46 |
| 5. Discussão .....                                                                                                                                                                                           | 48 |
| 5.1. Germinação e mobilização dos carboidratos de reserva de espécies de <i>Fabaceae</i> de distintos estágios sucessionais e co-ocorrentes com <i>S. virgata</i> .....                                      | 48 |
| 5.2. Efeitos de exsudatos de sementes de <i>S. virgata</i> e de catequina comercial sobre a germinação e o metabolismo de carboidratos de espécies nativas co-ocorrentes .....                               | 52 |
| 5.3. Evidências para a teoria de maior resistência de espécies co-ocorrentes a aleloquímicos .....                                                                                                           | 59 |
| 6. Conclusões.....                                                                                                                                                                                           | 61 |
| 7. Referências Bibliográficas .....                                                                                                                                                                          | 62 |

## 1. Introdução

### 1.1. Alelopatia

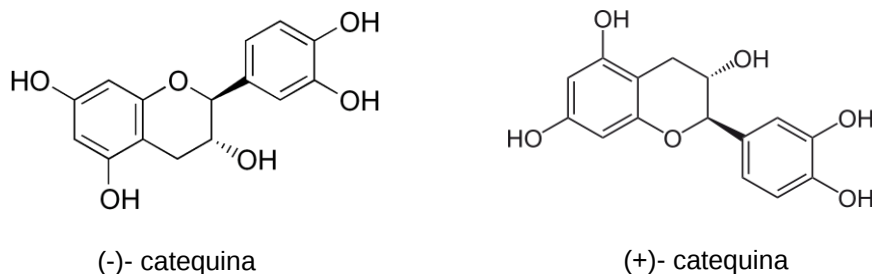
A alelopatia é descrita como um fenômeno em que compostos químicos liberados por uma planta podem influenciar o crescimento e o estabelecimento de plantas vizinhas (Teasdale *et al.* 2012). Tais compostos, denominados fitotoxinas ou aleloquímicos, normalmente derivam do metabolismo secundário e têm o potencial de mediar a interferência interespecífica entre plantas, por redução do estabelecimento de espécies competidoras, de seu crescimento e de sua sobrevivência. Centenas de fitotoxinas derivadas de vegetais já foram identificadas. Esses compostos variam substancialmente em sua estrutura química, modos de ação e efeitos nas plantas (Weir *et al.* 2004).

Diferentes fitotoxinas inibem a germinação de sementes e o desenvolvimento de plantas, com efeitos na produção de metabólitos, fotossíntese, respiração, transporte de membrana e na sinalização química intracelular. As fitotoxinas vegetais podem ser liberadas como difusatos de sementes, exsudatos de raízes, como voláteis de folhas verdes ou como substâncias lixiviadas de tecidos vegetais vivos ou mortos (Perry *et al.* 2007).

Espécies invasoras ameaçam a integridade de comunidades nativas e o estabelecimento de monoculturas em novos habitats (Bais *et al.* 2003, Carmo *et al.* 2012). Muitas hipóteses têm sido propostas na tentativa de explicar o sucesso de espécies invasoras, porém os mecanismos envolvidos no complexo processo invasivo ainda são pouco conhecidos (Blair *et al.* 2005). Recentemente, uma nova hipótese sugere que as fitoxinas produzidas por espécies invasoras são mais eficazes sobre as espécies nativas das áreas invadidas do que contra aquelas com as quais a planta invasora naturalmente co-ocorre (Perry *et al.* 2005, Inderjit *et al.* 2008, He *et al.* 2009, Thorpe *et al.* 2009). Segundo essa hipótese, plantas que co-evoluíram com espécies que secretam fitotoxinas desenvolveram resistência a esses metabólitos, o que pode não ocorrer com a maioria das espécies de outras comunidades, que são mais sensíveis a eles. Assim, a espécie invasora teria maior vantagem competitiva em uma nova região quando comparada à sua região nativa. Isso poderia explicar a agressividade de algumas espécies exóticas e invasoras (para revisão ver Bais *et al.* 2006), como é o caso de *Centaurea maculosa* Lam. (Asteraceae), uma espécie nativa da Eurásia que mostrou efeito devastador sobre gramíneas nativas dos Estados Unidos. Suas raízes exsudam uma mistura racêmica de (+) e (-)-catequina (Bais *et al.* 2002, He *et al.* 2009), que pode conferir vantagens para *C. maculosa* em períodos críticos de seu desenvolvimento.

A catequina pertence a classe dos flavonóides e está presente em diversos vegetais na forma de dois enantiômeros, a (-) e a (+)- catequina (Figura 1). Este composto é conhecido por sua forte

atividade fitotóxica e antifúngica (Buta & Lusby 1986, Bais *et al.* 2002/ 2003, Iqbal *et al.* 2003) e sua presença tem sido relatada em raízes, folhas e sementes de diferentes espécies (Ceballos *et al.* 1998, Bais *et al.* 2002, Wang *et al.* 2003, Simões *et al.* 2008).



**Figura 1.** Estrutura do flavonóide (-) e (+)- catequina.

Ensaios *in vitro* demonstram que a catequina tem efeitos fitotóxicos sobre uma grande variedade de plantas, porém o nível de fitotoxicidade varia dependendo da espécie ensaiada e das condições experimentais (Inderjit *et al.* 2008). Bais *et al.* (2003) relataram que os efeitos fitotóxicos da catequina em raízes devem-se à rápida produção de espécies reativas de oxigênio, seguida por aumento de cálcio e abaixamento do pH citoplasmático, o que leva à condensação do citoplasma e morte celular.

He *et al.* (2009) avaliaram a capacidade alelopática de *C. maculosa* coletada no continente europeu, onde é nativa, e no continente americano, onde é invasora, sobre espécies competidoras européias, que teriam o mesmo histórico evolutivo de *C. maculosa*, e americanas, que não possuiriam este histórico. Os autores observaram que as espécies competidoras norte-americanas sofreram maior inibição de ambas as populações de *C. maculosa* em relação às espécies competidoras européias. Neste mesmo trabalho foram aplicados, exogenamente, pulsos de catequina no solo e observada alta taxa de mortalidade das espécies competidoras americanas em comparação às espécies competidoras européias, corroborando a hipótese de que plantas que co-ocorrem com espécies que produzem aleloquímicos seriam mais resistentes a eles.

Embora alguns trabalhos com *C. maculosa* reforcem a hipótese do efeito mais eficaz das fitotoxinas exsudadas por plantas exóticas sobre populações nativas, outros realizados com essa mesma espécie não encontraram evidências favoráveis a ela e, há uma década, existe uma ampla discussão sobre o tema na literatura (Bais *et al.* 2003, Blair *et al.* 2005/ 2006, Inderjit *et al.* 2008, Duke *et al.* 2009, Thorpe *et al.* 2009). Alguns autores questionam a atividade fitotóxica dessa

substância em ambiente natural (Blair *et al.* 2005/ 2006) uma vez que esta atividade é dependente da sua estabilidade em diferentes tipos de solo e das interações com os seus constituintes como, por exemplo, microrganismos (Perry *et al.* 2007, Pollock *et al.* 2009, Thorpe & Callaway 2011). Além disso, Weir *et al.* (2006) relataram que algumas espécies nativas norte-americanas podem apresentar diferentes graus de resistência à catequina exsudada por raízes de *C. maculosa* e que esta resistência está relacionada à liberação de oxalato, que age bloqueando a geração de espécies reativas de oxigênio, reduzindo assim os danos oxidativos causados por essa fitotoxina.

Em *Sicyos deppei* G. Don (Cucurbitaceae), uma espécie invasora endêmica do México, os lixiviados aquosos de partes aéreas mostraram forte efeito inibidor sobre outras plantas, ocasionando atraso na germinação e redução severa do crescimento da radícula. Dentre os efeitos tóxicos desses lixiviados foram relatados a produção de peróxido de hidrogênio, a peroxidação de lipídeos de membrana e a consequente inibição da atividade de ATPases e NADPH oxidases (Lara-Núñez *et al.* 2006). Em sementes de tomate, ensaios *in vitro* revelaram que as fitotoxinas produzidas por essa espécie atrasam a degradação dos carboidratos de reserva, reduzem a atividade de enzimas do metabolismo de sacarose e de hidrólise de parede celular e aumentam o teor de ácido abscísico (Lara-Núñez *et al.* 2009). Entretanto, as substâncias responsáveis por esses efeitos ainda não foram quimicamente caracterizadas nessa espécie.

### 1.2. Aleloquímicos exsudados por sementes

Embora inúmeros trabalhos descrevam efeitos supostamente alelopáticos de substâncias liberadas ou extraídas de vegetais, a maioria dos estudos avalia o efeito de fitotoxinas exsudadas por raízes e como estas podem influenciar a habilidade de uma planta em se tornar invasiva em um novo ambiente (Bais *et al.* 2002, Walker *et al.* 2003, Xuan *et al.* 2006). Poucos relatos referem-se à química da região que circunda a semente germinante. Sementes também possuem a capacidade de liberar aleloquímicos após o início do processo de embebição, os quais podem contribuir para o comportamento invasivo de algumas espécies (Ndakidemi & Dakora 2003).

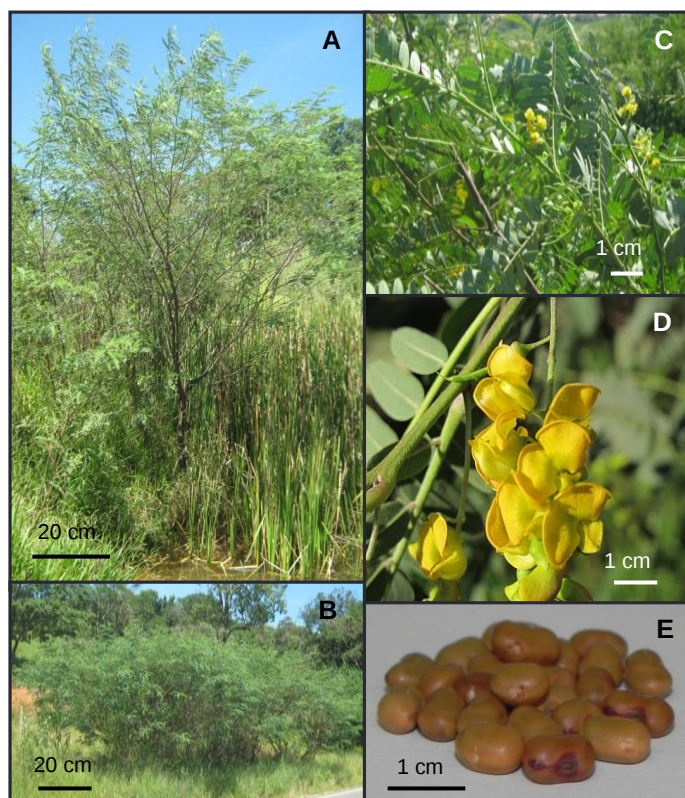
A região do solo que envolve as sementes durante a germinação é denominada de espermosfera (Nelson 2004). Esta é uma região dinâmica, onde ocorrem muitas mudanças de composição devido à liberação de compostos com o início da embebição das sementes. As sementes são ricas em compostos de reservas como polissacarídeos, lipídeos e proteínas, sendo muito atrativas para herbívoros e microrganismos. Sendo assim, a liberação de substâncias capazes de inibir o crescimento e o estabelecimento de patógenos e de outras espécies competidoras, poderia representar uma vantagem para o estabelecimento inicial da plântula (Nelson 2004).

Estudos relatam a exsudação de metabólitos secundários por sementes de Fabaceae e seu papel nas relações químicas com microrganismos e interações alelopáticas (Ndakidemi & Dakora 2003). Em *Copaifera officinalis* (Jacq.) L. e *Copaifera langsdorffii* Desf. há relatos da presença de cumarinas nas sementes e que são exsudadas durante a embebição (Veiga Junior *et al.* 2007, Lima Neto *et al.* 2008). Duas biscumarinas, a ipomopsina e a himineína, com atividade fitotóxica e antifúngica, foram isoladas de sementes de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*, sendo exsudadas no início da embebição (Simões 2008, Simões *et al.* 2009). Em *Vicia faba* L., foi detectada a exsudação de flavonóides presentes no tegumento, cotilédones e na radícula das sementes, que afetam a germinação e o desenvolvimento de várias espécies vegetais (Bekkara *et al.* 1998, Xuan & Tsuzuki 2002).

Altas concentrações de compostos fenólicos constitutivos têm sido encontradas no tegumento de sementes de espécies de *Sesbania* (Fabaceae), sendo algumas dessas substâncias rapidamente liberadas durante o processo de embebição e encontradas no ambiente que circunda a semente germinante (Ceballos *et al.* 1988). Ceballos *et al.* (1998) estudaram a exsudação de aleloquímicos por duas espécies de *Sesbania* e verificaram que elas liberam catequinas, proantocianidinas e luteolina durante o processo germinativo. Em *S. drummondii* (espécie perene), a molécula de (+)-catequina foi encontrada em quantidade superior à de (-)-catequina e em *S. vesicaria* (espécie anual) houve o predomínio de (-)-catequina.

### 1.3. *Sesbania virgata* como modelo experimental

Espécies de *sesbania* são descritas como invasoras na região Nordeste do Brasil, ocupando margens de rios e reservatórios, impedindo o crescimento de espécies nativas e provocando sérios impactos nos ecossistemas (Andrade 2006). *Sesbania virgata* Cav. Pers é uma espécie arbórea de ocorrência natural no Brasil, principalmente em matas ciliares, estando associada aos estágios iniciais de sucessão ecológica (Potomati & Buckeridge 2002; Araújo *et al.* 2004). Ela produz sementes que se mantêm viáveis por longos períodos, formando bancos transitórios de sementes no solo (Pott & Pott 1994). A espécie tem sido descrita como invasora em solos úmidos e alagados, especialmente em culturas de arroz irrigado (Kissmann & Groth 1999, Lorenzi 2000) (Figura 2).



**Figura 2.** *Sesbania virgata*. Aspecto da árvore (A e B), folhas (C), flores (D) e sementes (E).

As sementes de *S. virgata* 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 (Simões 2008). Recentemente, foi demonstrado que o flavonóide (+)-catequina é a principal fitotoxina exsudada por essas sementes e que ela inibe o desenvolvimento de plântulas de *Arabidopsis* e arroz e retarda a germinação de outras espécies agrônômicas, como alface e tomate. A (+)-catequina foi encontrada no tegumento das sementes de *S. virgata*, sendo liberada em altas concentrações (235  $\mu\text{g}$  de (+)-catequina/semente) após 24 horas de embebição (Simões *et al.* 2008).

Até o momento, os efeitos da catequina isolada de sementes de *S. virgata* foram avaliados somente sobre espécies cultivadas. Em experimentos de campo, na restauração de áreas mineradas, *S. virgata* apresentou-se promissora (Coutinho *et al.* 2005) e com grande capacidade de tolerar a competição com espécies herbáceas (Pereira 2009). Além disso, Chaves *et al.* (2003) e Coutinho *et al.* (2006) relataram, ainda, que as mudas de *S. virgata* desenvolvem-se bem em substratos de

resíduos industriais com baixa fertilidade. Este comportamento pode estar relacionado, em parte, à presença e/ou liberação de catequina pelas sementes ou partes da planta como raízes e folhas, o que reduziria a competição com espécies com as quais dividiria o ambiente. Contudo, existem poucas informações sobre a fitotoxicidade desse metabólito sobre espécies nativas que co-ocorrem com *S. virgata* em seu ambiente natural. Também a influência de catequina no metabolismo de sementes em relação à degradação de reservas e atividade de enzimas relacionadas a ela ainda não foi avaliada. Desse modo, a avaliação dos efeitos dos exsudatos de sementes de *S. virgata* sobre a germinação e o metabolismo de carboidratos de sementes de espécies co-ocorrentes de diferentes estágios sucessionais é importante para a compreensão da intensidade do comportamento invasivo de *S. virgata* ao longo do progresso da sucessão ecológica e da recuperação de áreas degradadas. Além disso, a utilização de espécies tropicais co-ocorrentes com *S. virgata* permite testar a hipótese de que algumas espécies invasoras possuem novos aleloquímicos, que seriam mais tóxicos para as espécies que não co-ocorrem do que para aquelas plantas que co-ocorrem com a espécie invasora em ambiente natural (Callaway & Ridenour 2004, Inderjit *et al.* 2008).

## 2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivos avaliar a suposta tolerância de espécies nativas co-ocorrentes à toxicidade da catequina exsudada por sementes de *S. virgata*. Para tanto, foi estudado o efeito da catequina naturalmente exsudada por sementes dessa espécie sobre a germinação e o metabolismo de carboidratos de reserva e de parede celular de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (tamboril) e *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (canafítula) duas espécies que ocorrem no mesmo ambiente natural de *S. virgata*.

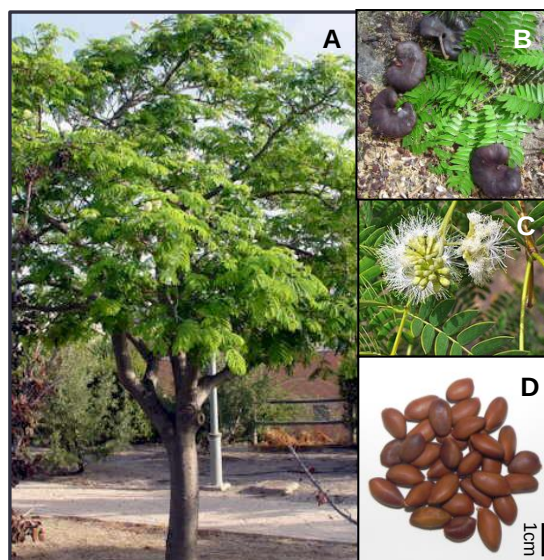
### 3. Metodologia

#### 3.1. Material Biológico

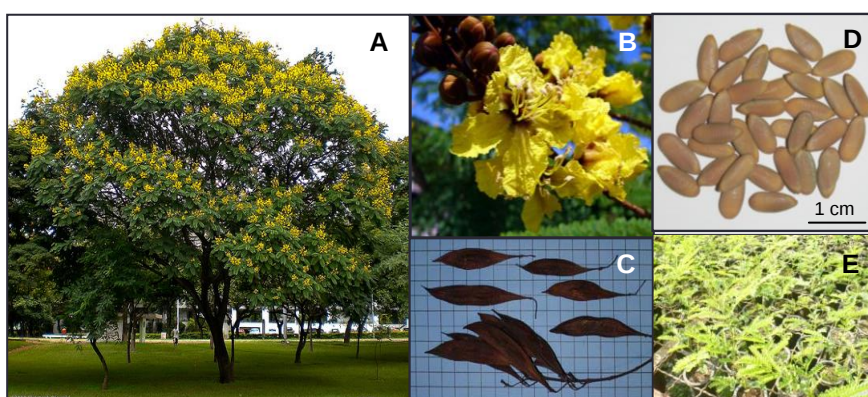
- Sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae) foram procedentes de pelo menos 12 indivíduos existentes no município de Lavras, MG.

- Sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. (Fabaceae) (tamboril) e *Peltophorum dubium* (Spreng.) (Fabaceae) (canafístula) foram obtidas no Banco de Sementes do Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica de São Paulo, SP.

*E. contortisiliquum*, conhecida popularmente como tamboril, é uma espécie arbórea de grande porte pertencente a família Fabaceae, nativa do Brasil. Esta espécie é descrita como não pioneira na sucessão ecológica (Aquino *et al.* 2009). *E. contortisiliquum* é encontrada frequentemente colonizando áreas desmatadas e, em decorrência, é amplamente utilizada na recuperação de áreas degradadas, em reflorestamentos mistos (Durigan *et al.* 2002) (Figura 3). *P. dubium*, conhecida popularmente com canafístula, também é uma espécie arbórea, pertencente a família Fabaceae, nativa brasileira (Figura 4). Esta espécie é descrita como pioneira na sucessão ecológica e ocorre naturalmente em todo o domínio da floresta estacional semi decidual (Donadio & Demattê 2000, Wanli *et al.* 2001). É comumente encontrada colonizando pastagens e ocupando clareiras em matas, sendo utilizada para composição de reflorestamentos mistos e recuperação de área degradadas (Lorenzi 1992, Donadio & Demattê 2000). As sementes de *E. contortisiliquum* e *P. dubium* possuem dormência por impermeabilidade do tegumento (Aquino *et al.* 2009, Guimarães *et al.* 2011), que pode ser quebrada com qualquer procedimento que rompa este tecido, possibilitando a entrada de água e a ativação dos processos metabólicos.



**Figura 3.** *Enterolobium contortisiliquum*. Aspecto da árvore (A), folhas e frutos (B), flores (C) e sementes (D).



**Figura 4.** *Peltophorum dubium*. Aspecto da árvore (A), flores (B), frutos (C), sementes (D) e plântulas (E).

### 3.2. Ensaios de co-germinação

Sementes de *S. virgata* foram escarificadas mecanicamente com lixa. Sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) e *Peltophorum dubium* (canafistula) foram escarificadas mecanicamente por esmeril e desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio comercial a 10% por 10 min e lavadas com água destilada autoclavada antes dos ensaios.

Os ensaios foram desenvolvidos em câmaras de germinação do tipo BOD, a 25°C e fotoperíodo de 12 h. As sementes foram distribuídas em caixas tipo gerbox transparentes (11 x 11 x 3 cm), contendo duas de folhas de papel de filtro grosso na base, umedecidas com 7 mL de água destilada (Simões 2008), nos quais foi dissolvido o fungicida DEROSAL (1,5 mL L<sup>-1</sup> v/v). Uma folha de papel toalha tipo germitest umedecida com água destilada foi colocada sobre as sementes.

Foram utilizadas 3 repetições com 10 sementes em cada caixa, totalizando 30 sementes por tratamento para *E. contortisiliquum* ou *P. dubium*. Ao lado de cada uma das sementes das duas espécies foi depositada uma semente de *S. virgata*. Para controle do ensaio, as sementes das espécies nativas foram germinadas na ausência das sementes de *S. virgata*. A germinação foi monitorada por 5 dias, sendo utilizado como critério germinativo a emergência radicular. As coletas foram realizadas diariamente e o material utilizado para as análises de carboidratos solúveis e parede celular foi seco em estufa a 60 °C por 7 dias. O material utilizado para as análises enzimáticas foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -20 °C. Os ensaios foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.3 Ensaio de germinação com catequina comercial

As condições deste ensaio foram as mesmas descritas no item anterior (item 3.2), assim como a quantidade de sementes das duas espécies, exceto pelo fato das sementes de *S. virgata* serem substituídas por solução de catequina Sigma na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> (p/v). Assim, no início do experimento as folhas de papel de filtro foram umedecidas com 7 mL de solução de catequina Sigma ou apenas com água destilada, no caso do tratamento controle e em ambos tratamentos foi dissolvido o fungicida DEROSAL (1,5 mL L<sup>-1</sup> v/v). Também foram utilizadas 3 repetições de 10 sementes por tratamento. A germinação, da mesma forma que no ensaio anterior, foi monitorada por 5 dias, sendo utilizado como critério germinativo a emergência radicular. As coletas foram realizadas aos 1, 3 e 5 dias do início da embebição. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.4. Análises de carboidratos

O metabolismo de açúcares e o afrouxamento da parede celular, que permite a protrusão da radícula, são eventos cruciais durante o processo germinativo. Como era de conhecimento prévio que os exsudatos de sementes de *S. virgata* causam inibição e atraso da germinação de sementes (Simões 2008, Simões *et al.* 2008), neste trabalho foram caracterizados e quantificados os carboidratos de reservas encontrados nas sementes das espécies nativas selecionadas germinadas com água destilada ou na presença de sementes de *S. virgata*. Foram analisados os teores de açúcares solúveis, amido e polissacarídeos de parede celular.

#### 3.4.1. Extração de carboidratos solúveis

Alíquotas do embrião ou endosperma (este presente apenas em sementes de *P. dubium*) das sementes das espécies nativas foram liofilizadas, moídas e submetidas à extração de carboidratos solúveis, conforme descrito por Carvalho *et al.* (1998). A extração foi feita a partir de 300 mg de massa seca, aos quais foram acrescentados 5 mL de etanol 80%. A mistura foi homogeneizada e incubada a 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 2 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 seus teores de açúcares totais e redutores (item 3.4.2). Os resíduos da extração foram mantidos em congelador a - 20°C para posterior quantificação de amido (item 3.4.6) e análise dos polissacarídeos paredes celulares (item 3.4.7). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.4.2. Quantificação dos carboidratos

Os extratos obtidos no item 3.4.1 foram analisados quanto aos seus teores de açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956) tendo glucose como padrão (Sigma). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 490 nm, em espectrofotômetro (SP-22, Biospectro, Curitiba, PR). A quantificação de açúcares redutores foi realizada conforme método descrito por Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 520 nm e também utilizando glucose (Sigma) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

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

Alíquotas de 1 mL dos extratos obtidos no item 3.4.1 foram purificadas em coluna de troca iônica de 5 mL, utilizando resinas Dowex de troca catiônica 50 x 8 (100-200 mesh) e aniônica 1 x 8 (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, concentradas em 1 mL de água deionizada e novamente submetidas à quantificação de carboidratos totais para ajuste da concentração em 400 µg mL<sup>-1</sup> (Carvalho *et al.* 1998).

A análise da composição em carboidratos solúveis foi realizada através de cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em

cromatógrafo líquido DIONEX modelo ICS3000 (Dionex, Thermo Scientific, USA) com coluna CarboPac PA-1. Os carboidratos solúveis foram eluídos isocraticamente com 100 mM de NaOH, com fluxo de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ , por 35 min. A identificação dos carboidratos solúveis, mio-inositol, glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose, foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais (Sigma). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.4.4. Extração de galactomanano

Os endospermas das sementes de *P. dubium* foram separados manualmente do tegumento e do embrião. Os endospermas isolados foram secos, moídos, pesados e homogeneizados em água destilada ( $100 \text{ mL g}^{-1}$  de pó) a  $80^{\circ}\text{C}$ , por 8 horas. O extrato foi filtrado em náilon e submetido à precipitação com 3 volumes de etanol comercial a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Após precipitação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi coletado por filtração em náilon e lavado com etanol puro e acetona. Após secagem a temperatura ambiente, o galactomanano foi solubilizado em água destilada a  $60^{\circ}\text{C}$  e centrifugado a  $6000 \text{ g}$  por 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado, liofilizado e pesado (Buckeridge & Dietrich 1990). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.4.5. Hidrólise ácida e composição do galactomanano

Dois miligramas da galactomanano (item 3.4.4) foram colocados em ampola de vidro e a ele adicionados  $50 \text{ }\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 72%. A mistura foi aquecida a  $30^{\circ}\text{C}$  em banho-maria por 45 min. Após esta etapa,  $850 \text{ }\mu\text{L}$  de água destilada foram acrescentados na solução. As ampolas foram seladas em bico de Bunsen e o material foi hidrolisado em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1,5 atm por 1 h. Após hidrólise, o pH da solução foi neutralizado com NaOH 50%. As amostras foram purificadas utilizando resinas Dowex catiônica e aniônica (item 3.4.3), quantificadas quanto ao teor de açúcares totais (item 3.4.2) e analisadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPAEC/PAD) (item 3.4.3), sendo os monossacarídeos neutros eluídos isocraticamente com NaOH 16 mM, com fluxo de  $0,25 \text{ mL/min}$ , em tempo de corrida de 30 min, sendo identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de fucose, ramnose, arabinose, galactose, glucose, xilose e manose (Sigma). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.4.6. Extração e quantificação de amido

Alíquotas de  $10 \text{ mg}$  do resíduo da extração de carboidratos solúveis (item 3.4.1) foram submetidas a extração de amido pelo método enzimático descrito por Amaral *et al.* (2007). Ao resíduo foram acrescentados  $0,5 \text{ mL}$  de alfa-amilase [ $120 \text{ U mL}^{-1}$ ] termoestável de

*Bacillus licheniformis* (EC 3.3.1.1, Megazyme<sup>®</sup>, Irlanda) em tampão MOPS [ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico] 10 mM pH 6,5, seguido por incubação a 75°C por 30 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes. Após resfriamento das amostras, para aproximadamente 50°C, foram adicionados 0,5 mL de solução contendo [30 U mL<sup>-1</sup>] de amiloglucosidade (AMG) de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3 Megazyme<sup>®</sup>, Irlanda) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5, seguido por incubação a 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes. A reação enzimática foi interrompida e as proteínas precipitadas com a adição de 100 µL de ácido perclórico 0,8 M.

A quantificação do amido foi realizada através da liberação de glucose pela quebra enzimática deste polissacarídeo. Desta forma, foram incubados 20 µL de extrato e 300 µL do reagente Glucose PAP Liquiform (Centerlab<sup>®</sup>), 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 foi realizada a leitura em microplacas de ELISA em comprimento de onda 490nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.4.7. Extração da parede celular

Alíquotas do resíduo (aproximadamente 200 mg) da extração de carboidratos solúveis (item 3.4.1) foram submetidos a extração com dimetilsulfóxido 90% (DMSO), na proporção de 10 mL para 1 g de material, com agitação constante por 16 h, à temperatura ambiente, para eliminação parcial do amido. Após a extração com DMSO, as amostras foram lavadas com água destilada por 3 vezes e os sobrenadantes desprezados. Os resíduos foram submetidos a incubação com amiloglucosidade (AMG) de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3 Megazyme<sup>®</sup>, Irlanda) (1 unidade da enzima para cada 10 mg de material) para completa retirada do amido. O resíduo foi exaustivamente lavado com água destilada, liofilizado e pesado.

Após a retirada do amido, o resíduo foi lavado com 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, centrifugado a 800 g por 10 min e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi realizado 3 vezes, seguido por lavagem com 10 mL de água destilada, também por 3 vezes. Em seguida, o resíduo foi lavado com 10 mL de clorofórmio:metanol [1:1] (v/v), 10 mL de acetona e 10 mL de éter etílico. Cada uma destas etapas foi repetida duas vezes. A cada etapa de lavagem, o material foi agitado, centrifugado a 800 g por 10 min e os sobrenadantes, contendo os solventes orgânicos foram descartados. O resíduo foi seco em estufa a 60°C por três dias e pesado para obtenção do rendimento de parede celular (modificado de Gorshkova *et al.* 1996). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.4.8. Hidrólise ácida e quantificação de açúcares da parede celular

Dois miligramas da parede celular bruta de cada amostra de embrião de cada uma das espécies e do endosperma de canafístula foram colocados em ampola de vidro e a ele adicionados 500 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 2N. As ampolas foram seladas em bico de Bunsen e o material foi hidrolisado em autoclave a 121 °C, 1,5 atm por 1 h. Os hidrolisados resultantes foram evaporados em aparelho “speed vac”, lavados com 500 µL de etanol, e novamente evaporados. Este procedimento foi repetido duas vezes para completa evaporação do ácido e, ao final, foi feita uma lavagem utilizando-se água deionizada. O material foi retomado em 500 µL de água deionizada e quantificado quanto ao seu teor de açúcares totais, conforme descrito no item 3.4.2, e ácidos urônicos (Filisetti-Cozzi & Carpita 1991), neste caso, utilizando ácido galacturônico (Sigma) como padrão.

O restante do material foi reservado para análise por cromatografia líquida de alta resolução (HPAEC/PAD) (item 3.4.3), sendo os monossacarídeos neutros eluídos isocraticamente com NaOH 16 mM, com fluxo de 0,25 ml/min, por de 30 min e identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de fucose, ramnose, arabinose, galactose, glucose, xilose e manose (Sigma). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.5. Ensaio enzimáticos

Foram avaliadas as atividades das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -galactosidase e invertase, relacionadas à degradação de reservas em sementes. Todos os ensaios foram realizados utilizando embriões de sementes de *E. contortisiliquum* e *P. dubium*. Além disso, a atividade de  $\alpha$ -galactosidase também foi analisada no endosperma de *P. dubium*.

#### 3.5.1. Extração e quantificação de atividade de $\alpha$ -amilase

Para a extração de  $\alpha$ -amilase foram pesados 50 mg de massa fresca dos embriões, congelados e macerados em nitrogênio líquido. A estes foi acrescentado 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,8 e a suspensão foi mantida por 30 min a 4°C com agitação casual. Na sequência o material foi centrifugado a 3000 g por 5 min em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi recolhido. O procedimento foi inteiramente realizado a frio (5°C). As análises foram realizadas em duplicatas para cada uma das três replicatas (Bernfeld 1955).

A atividade de  $\alpha$ -amilase foi avaliada adicionando-se 50 µL de extrato enzimático a 50 µL de uma solução de amido 1% em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,8 e incubando-se a

mistura por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida acrescentando 50 µL de reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e levando-se a fervura por 10 min. A quantificação foi realizada por ensaio colorimétrico a 570 nm em leitor de ELISA utilizando maltose Sigma como padrão. A quantidade de proteínas foi avaliada conforme descrito no item 3.6. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.5.2. Extração e quantificação de atividade de $\alpha$ -galactosidase

A extração de  $\alpha$ -galactosidase foi realizada conforme descrito por Reid & Maier (1973) e Buckeridge & Dietrich (1996), sendo utilizados 100 mg de material fresco, para embriões de *E. contortisiliquum* e 50 mg para embriões e endosperma de *P. dubium*. O material foi homogeneizado em 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,8 e deixado em repouso por 30 min em banho de gelo. Após centrifugação a 13000 g por 5 min em centrífuga refrigerada a 5 °C, o sobrenadante foi recuperado e o resíduo descartado.

A atividade da enzima foi avaliada utilizando 10 µL de extrato, 10 µL de tampão McIlvaine (fosfato de sódio 200 mM + ácido cítrico 100 mM) pH 4,4 e 10 µL de substrato específico *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (PNP, Sigma) 50 mM e incubando-se a mistura por 20 min a 45 °C. A atividade foi interrompida acrescentando 1 mL de carbonato de sódio 200 mM. Efetuou-se leitura a 405 nm em espectrofotômetro (Ultrospec<sup>®</sup> 3100). O coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenil (18400 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (Reid & Meier 1973) foi usado para calcular a quantidade de *p*-nitrofenol liberado em unidades de µmol galactose. min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.5.3. Extração e quantificação de invertases

A extração de invertases foi realizada conforme protocolo descrito por Shimon-Kenner *et al.* (2000). Foram pesados 100 mg de material para ambas as espécies. Estes foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM contendo 20% de glicerol e 20 µM de sulfato de manganês, pH 7,5. Após centrifugação a 13000 g por 10 min em centrífuga refrigerada a 5°C, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para as análises da atividade das invertases vacuolar e citosólica. O material insolúvel foi submetido a lavagem com 1 mL de tampão HEPES-NaOH 50 mM contendo 0,5 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 2,5 mM de ditioneitol (DTT), 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e 1% de polivinilpirrolidona (PVP), pH 7,5. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo submetido a nova extração com o mesmo tampão descrito acima acrescido de 1 M de NaCl, por 2 h em banho de gelo. Após centrifugação, o resíduo descartado e o

sobrenadante foi recolhido e utilizado para avaliação da atividade invertásica de parede celular (apoplástica).

Para determinação da atividade invertásica ácida vacuolar foram utilizados 200 µL de extrato enzimático e 200 µL de tampão acetato de sódio 500 mM contendo 60 mM de sacarose e 0,01% de BSA, pH 5,7. Foi realizada incubação da mistura por 30 min a 40 °C. A reação foi interrompida com fervura por 5 min. Foram utilizados como tempo zero da reação extratos pré-fervidos.

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

A quantificação da atividade das três enzimas foi realizada através de ensaio colorimétrico utilizando o reagente Glucose PAP Liquiform (Centerlab<sup>®</sup>), contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase (GOD-POD) e 4-aminoantipirina e fenol pH 7,5 e a leitura foi realizada a 490 nm em leitor de ELISA, utilizando glucose (Sigma) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### *3.6. Quantificação de proteínas*

A quantificação de proteínas em todos os extratos enzimáticos foi efetuada utilizando o método de Bradford (1976), tendo albumina de soro bovino (Sigma) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### *3.7. Delineamento Experimental e Análise Estatística*

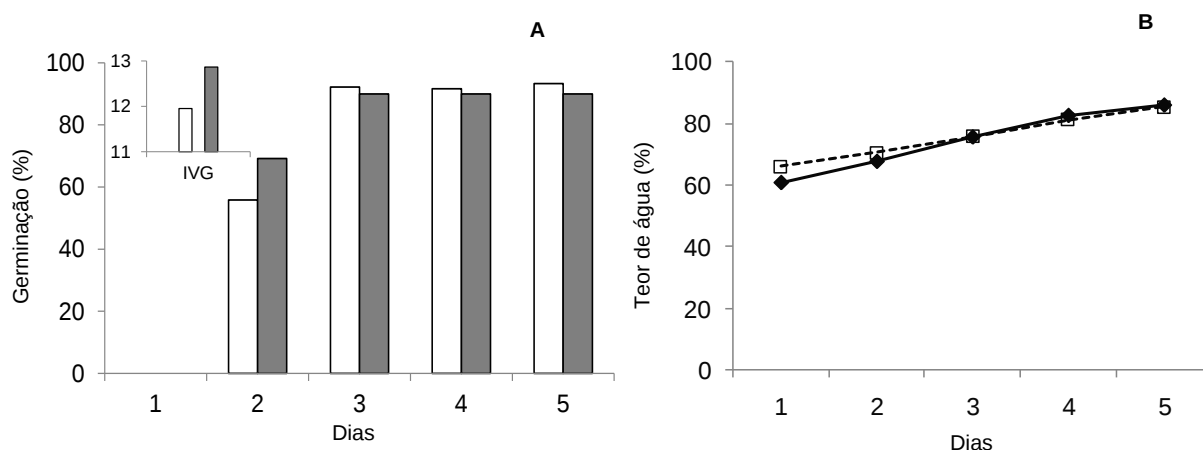
O delineamento experimental para todos os experimentos foi inteiramente casualizado, com no mínimo três repetições por tratamento. Os dados foram previamente submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo todo e qualquer contraste entre médias avaliado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa estatístico Bioestat. Quando foi necessária a realização de correções da normalidade e da heterogeneidade, os valores foram transformados para  $\arcsen(\%)^{0,5}$  (Santana & Ranal 2004).

## 4. Resultados

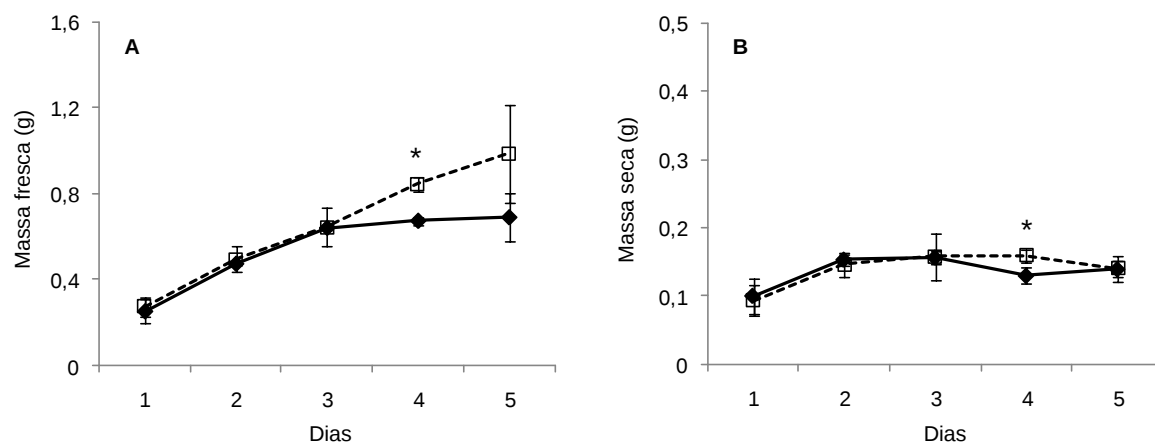
### 4.1. Mobilização dos carboidratos de reserva e atividade de enzimas relacionadas ao processo germinativo e pós-germinativo em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* co-germinadas com *Sesbania virgata*

A germinação de sementes de *E. contortisiliquum* em água destilada iniciou dois dias após o início do processo de embebição e aos 3 dias a taxa germinativa atingiu aproximadamente 90%, o mesmo sendo observado para as sementes co-germinadas. Entretanto, foi observado maior índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *E. contortisiliquum* quando em presença de sementes de *S. virgata* (Figura 5A). O teor de água aumentou de 60 para aproximadamente 90%, de 1 para 5 dias, respectivamente, para ambos os tratamentos (Figura 5B). As sementes de *E. contortisiliquum* submetidas à co-germinação com *S. virgata* apresentaram aumento significativo de massa fresca aos 4 dias. Neste mesmo dia também foi detectada diferença significativamente maior de massa seca no tratamento co-germinação quando comparado ao controle (Figura 6).

Apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas na porcentagem de germinação e no teor de água ao longo do experimento entre as sementes controle e as co-germinadas com *S. virgata*, foram observadas alterações na coloração e na morfologia, no comprimento e no diâmetro (dados não mostrados) nas raízes primárias de *E. contortisiliquum* quando estas co-germinaram com *S. virgata* (Figuras 7, 8). Conforme mostrado na Figura 9, houve nítida tendência de redução no comprimento radicular quando sementes de *E. contortisiliquum* foram co-germinadas com sementes de *S. virgata*.



**Figura 5. (A)** Germinação (%), Inserto: IVG: Índice de velocidade de germinação e **(B)** teor de água (%) do embrião de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação, **A:** ( □ ) controle e ( ■ ) co-germinação com *Sesbania virgata*, **B:** ( ◆ ) controle e ( □ ) co-germinação com *Sesbania virgata*. Os dados representam a média de N= 3 (10 sementes cada replicata).



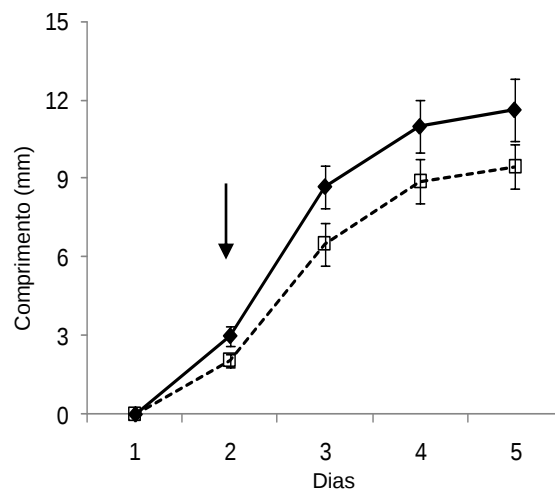
**Figura 6.** (A) Massa fresca e (B) massa seca de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação, (◆) Controle e (□) co-germinação com *Sesbania virgata*. As barras representam o desvio padrão da média de N= 3 (10 sementes cada replicata). (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey 5% de probabilidade.



**Figura 7.** Aspecto das sementes de *Enterolobium contortisiliquum* em bioensaio de co-germinação com sementes de *Sesbania virgata* (tratado) ou germinadas em água destilada (controle). Barras = 1 cm.



**Figura 8.** Detalhe das plântulas de *Enterolobium contortisiliquum* germinadas na presença de sementes de *Sesbania virgata* com 5 dias de germinação. A seta indica a raiz de *E. contortisiliquum* com alteração de coloração e forma. Barra = 1 cm.

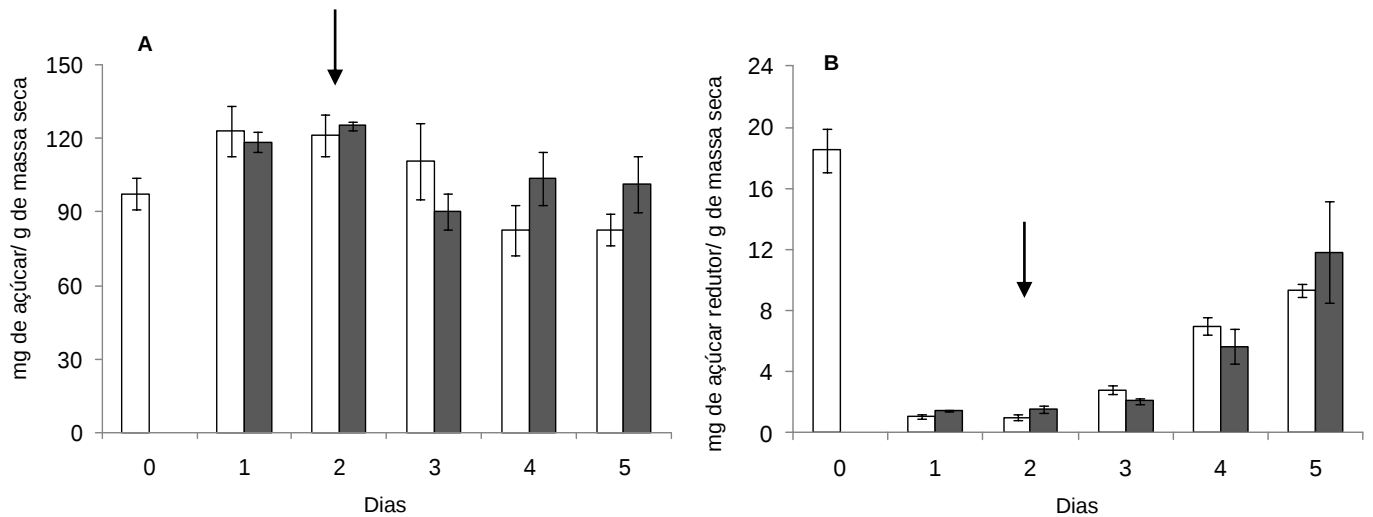


**Figura 9.** Crescimento de raiz primária de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação, (◆) Controle e (□) co-germinação com *Sesbania virgata*. As barras representam o erro padrão da média de N= 3 (10 sementes cada replicata). A seta indica o início da germinação.

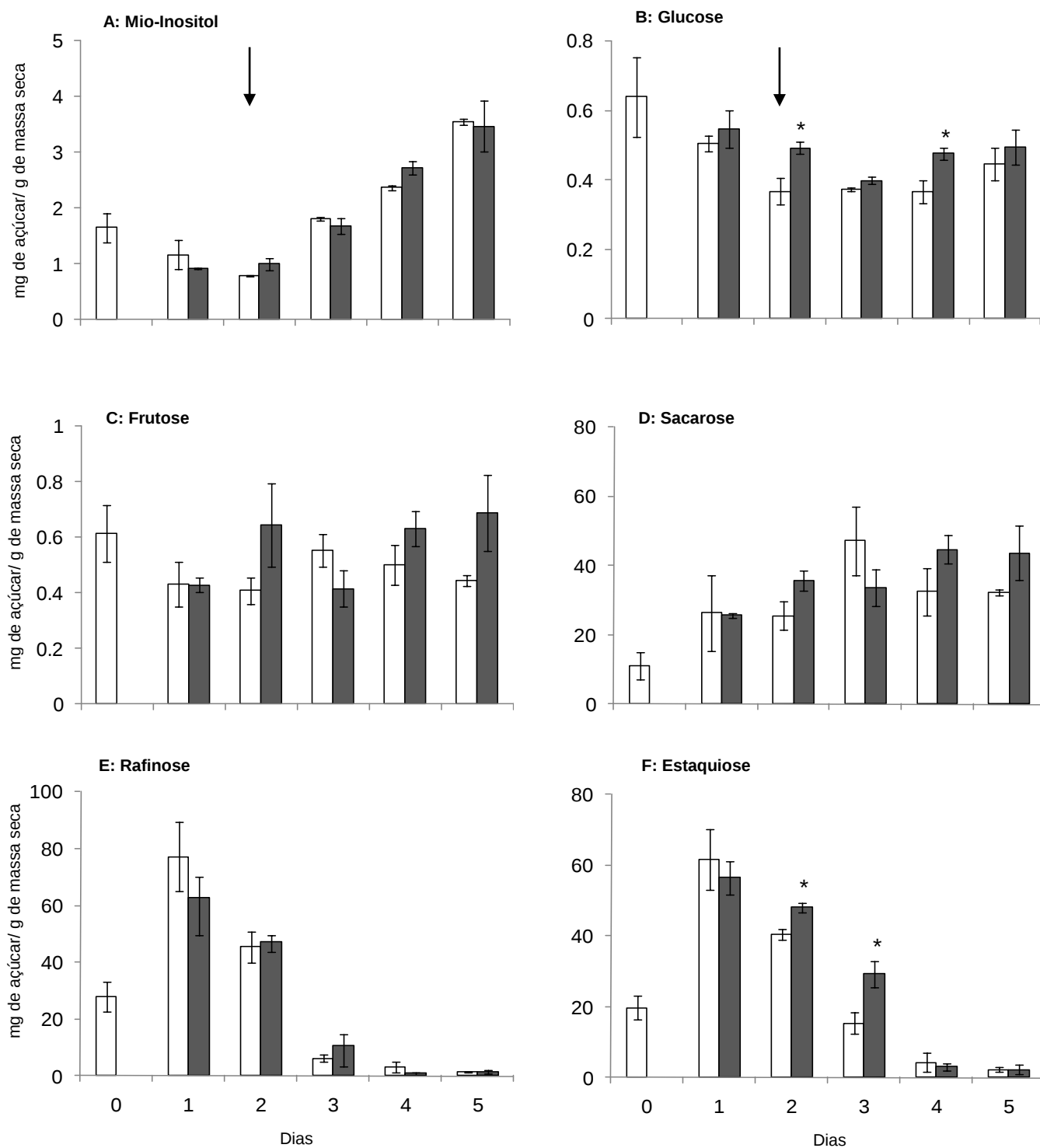
Ao longo do processo germinativo das sementes de *E. contortisiliquum* ocorre redução no conteúdo de açúcares totais e aumento no teor de açúcares redutores, indicando hidrólise dos açúcares solúveis no embrião destas sementes (Figura 10A e B).

Foi observada tendência de atraso na mobilização dos açúcares solúveis no embrião de *E. contortisiliquum* durante os 5 dias de experimento no ensaio de co-germinação de sementes de *S. virgata* (Figura 10A e B). Isso foi comprovado com a detecção de quantidades significativamente

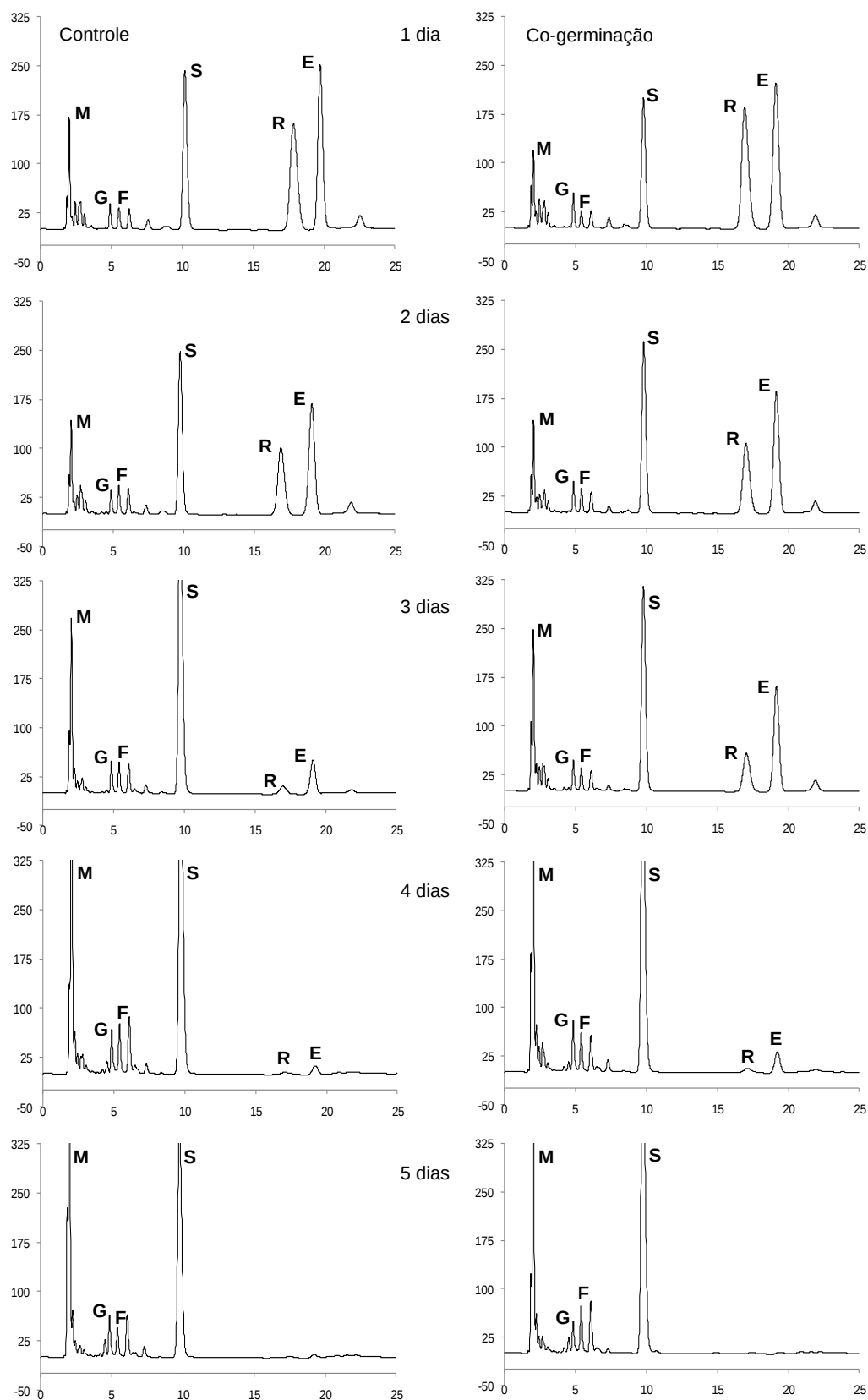
maiores de glucose aos 2 e 4 dias do início da embebição e de oligossacarídeos da série da rafinose, como a estaquiose, aos 2 e 3 dias, com a co-germinação dessas sementes com *S. virgata* em relação ao controle (Figuras 11 e 12).



**Figura 10. (A)** Carboidratos totais e **(B)** açúcares redutores detectados em embriões de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (□). Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média de N = 3 (5 sementes cada replicata). A seta indica o início da germinação.



**Figura 11.** Teor de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD no embrião de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (□) Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. (A) Mio-inositol, (B) Glucose, (C) Frutose, (D) Sacarose, (E) Rafinose, (F) Estaquiose. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey 5% de probabilidade. A seta indica o início da germinação.

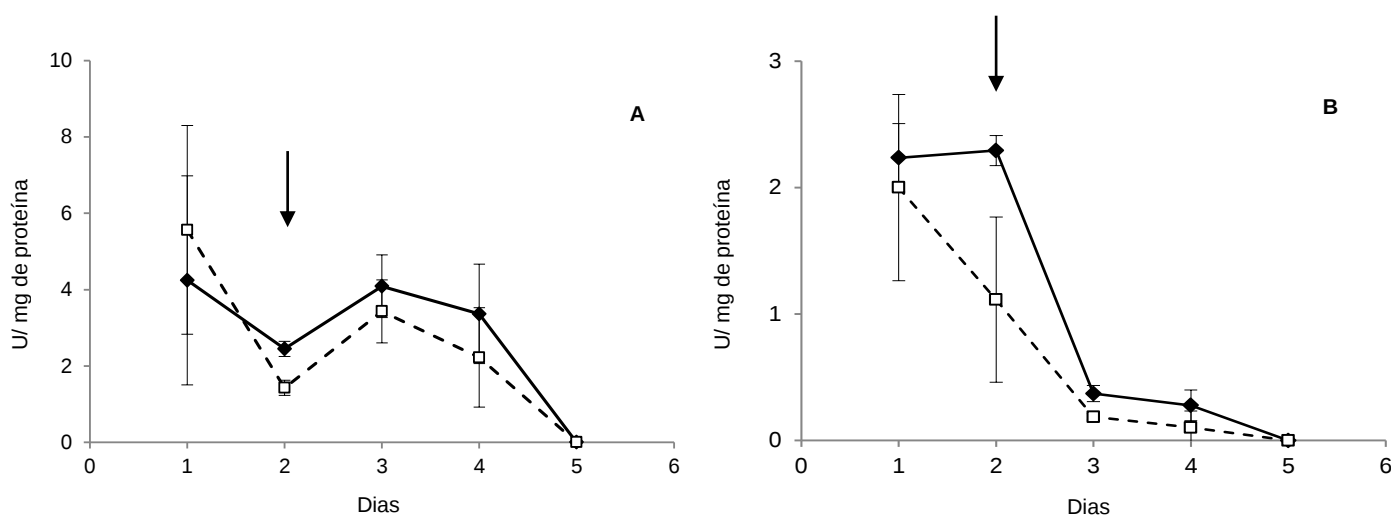


**Figura 12.** Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD de açúcares solúveis do embrião de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação em sementes controle ou co-germinadas com *Sesbania virgata*. **M**= Mio-Inositol, **G**= Glucose, **F**= Frutose, **S**= Sacarose, **R**= Rafinose e **E**= Estaquiose.

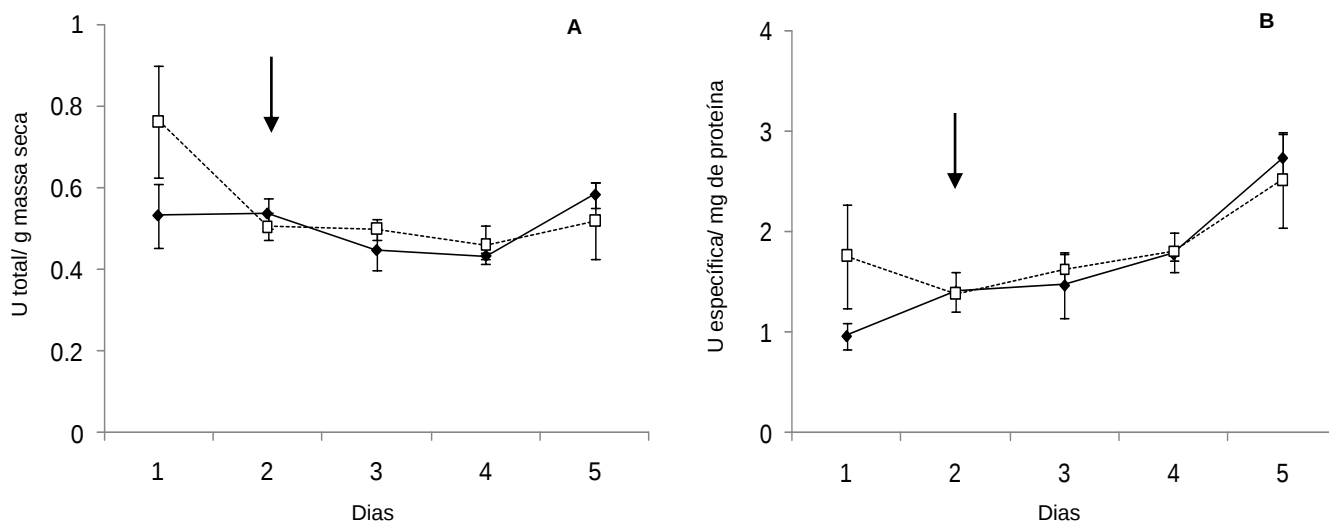
Em sementes de *E. contortisiliquum* germinadas em água destilada foi observada redução na atividade das invertases vacuolar e citosólica durante a embebição. No ensaio de co-germinação foi detectada tendência de menor atividade dessas enzimas a partir do 2º dia do início da embebição quando comparadas ao controle (Figura 13A e B). Sob as condições experimentais utilizadas, não foi possível detectar atividade invertásica apoplástica.

Quando se compara os dois tratamentos, não foi observada alteração nas atividades total e específica da enzima  $\alpha$ -galactosidase durante os 5 dias do início da embebição (Figura 14A e B). Foi detectado aumento na atividade específica desta enzima durante a embebição das sementes de *E. contortisiliquum* quando há hidrólise intensa de rafinose e estaquiose (Figuras 11 e 12).

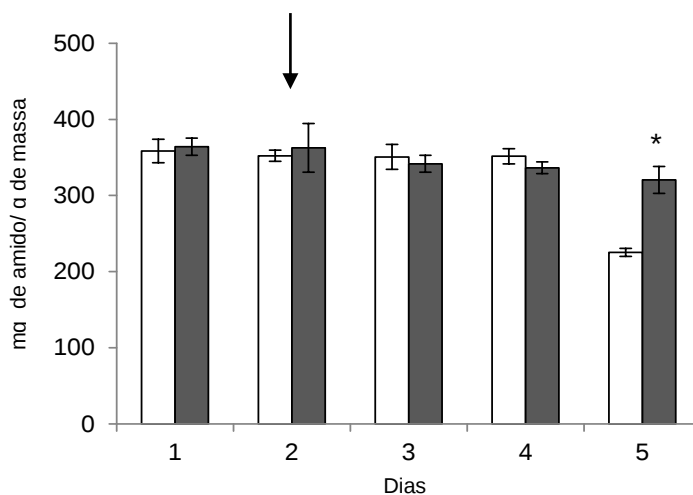
Com relação ao conteúdo de amido, foi detectado início da mobilização deste aos 5 dias do início da embebição, sendo observado atraso significativo na mobilização deste aos 5 dias quando as sementes de *E. contortisiliquum* foram co-germinadas com sementes de *S. virgata* em relação ao tratamento controle (Figura 15). Apesar do atraso observado na mobilização, não foi detectada diferença significativa nas atividades total e específica da enzima  $\alpha$ -amilase aos 4 e 5 dias do início da embebição entre os tratamentos (Figura 16A e B), embora haja tendência de redução nas sementes co-germinadas.



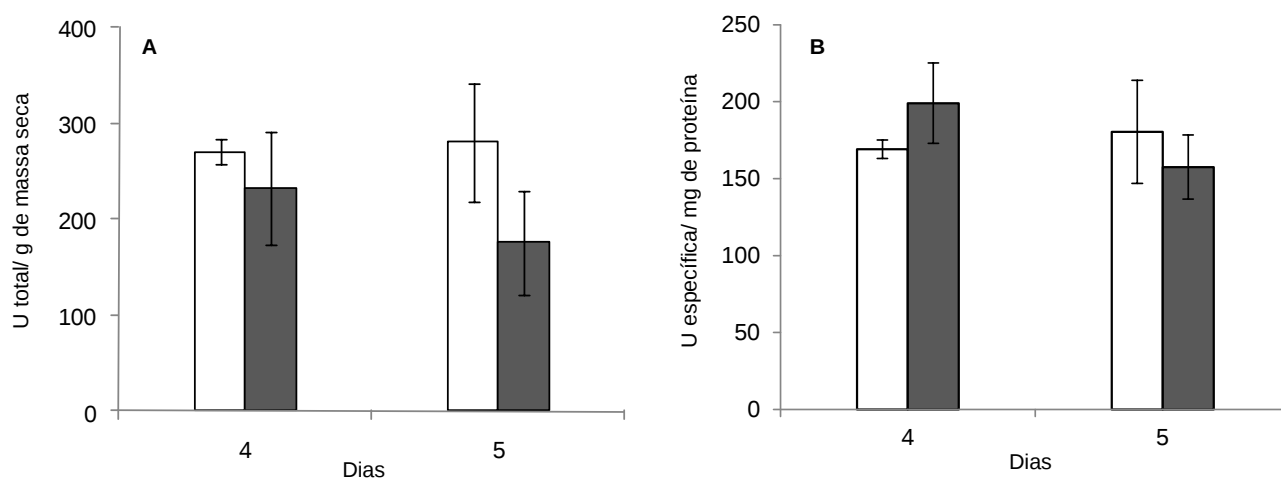
**Figura 13.** Atividade específica de invertases vacuolar (A) e citosólica (B) de embriões de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação, (◆) Controle (□) co-germinação. As barras representam o erro padrão da média, N= 3 (5 sementes cada replicata). U= Unidade de enzima (1 unidade de atividade invertásica foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 mMol de sacarose/min/mg proteína). A seta indica o início da germinação.



**Figura 14.** Atividades (A) total e (B) específica de  $\alpha$ -galactosidase de embriões de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle (□) co-germinação. As barras representam o erro padrão da média, N= 3 (5 sementes cada replicata). U total= unidade de enzima total (1 unidade de atividade de  $\alpha$ -galactosidase total foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu$ Mol de galactose/min/g de massa seca.). U específica= unidade de enzima específica (1 unidade de atividade de  $\alpha$ -galactosidase total foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu$ Mol de galactose/min/mg de proteína.). A seta indica o início da germinação.

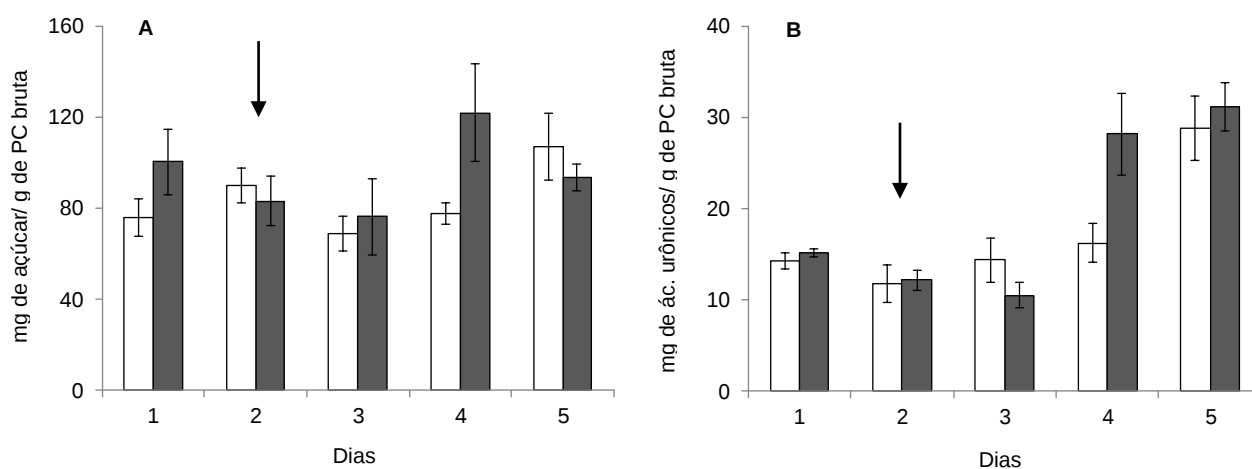


**Figura 15.** Teor de amido em embriões de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (□) Controle e (■) Co-germinação. As barras representam o erro padrão da média de N = 3 (5 sementes cada replicata). A seta indica o início da germinação. (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey 5% de probabilidade.

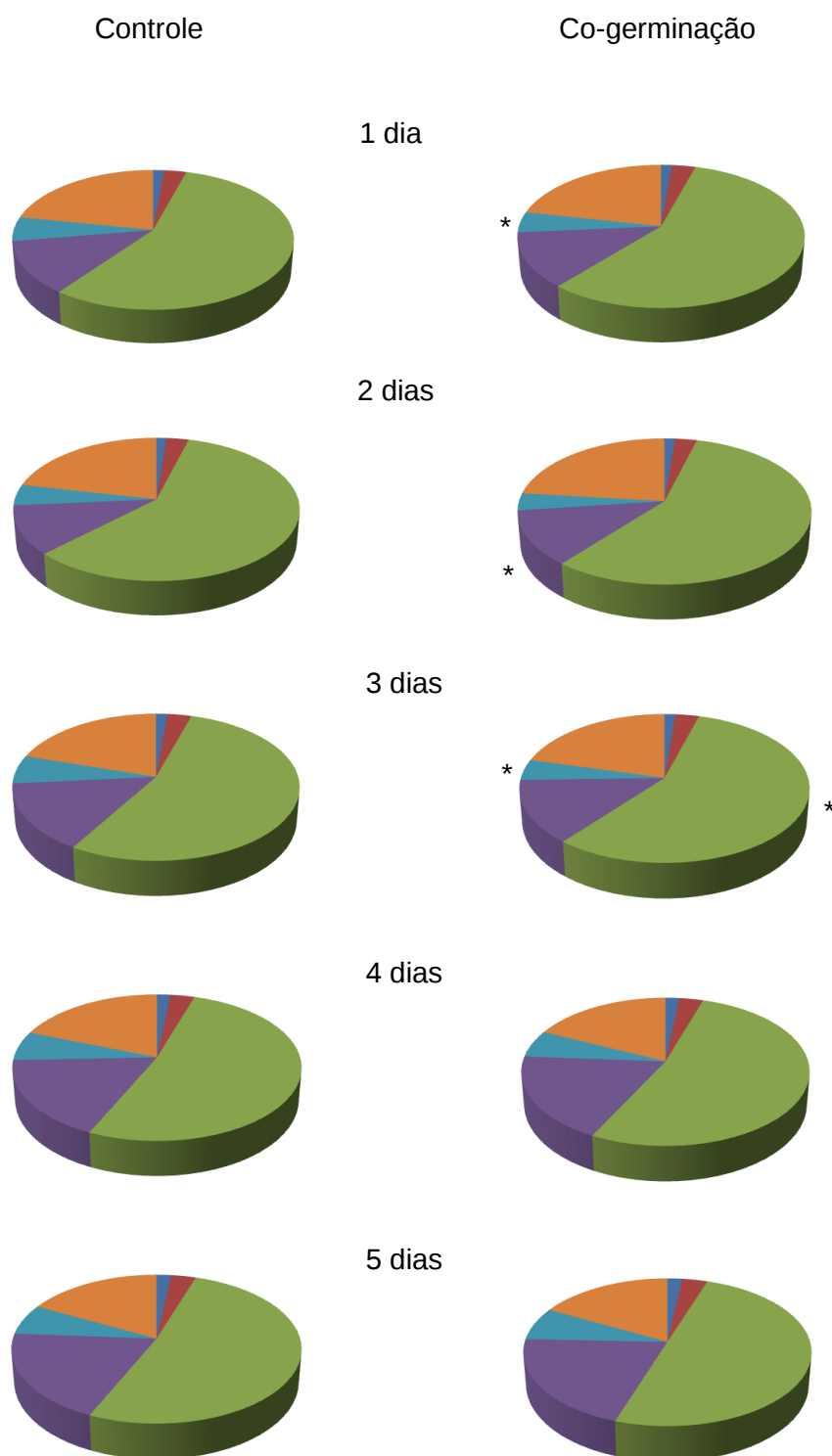


**Figura 16.** Atividade total (A) e específica (B) de  $\alpha$ -amilase de embriões de *Enterolobium contortisiliquum* aos 4 e 5 dias de germinação. (□) Controle (■) co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média de N= 3 (5 sementes cada replicata). U total= unidade total de enzima (1 unidade de atividade de  $\alpha$ -amilase foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu$ Mol de maltose/min/mg de massa seca). U específica= unidade específica de enzima (1 unidade de atividade de  $\alpha$ -amilase foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu$ Mol de maltose/min/mg de proteína).

Não foram observadas diferenças significativas nos teores de açúcares totais e ácidos urônicos da parede celular bruta de embriões de *E. contortisiliquum* entre os tratamentos ao longo dos 5 dias de experimento (Figura 17A e B). As análises dos monossacarídeos componentes da parede celular por HPAEC/PAD revelaram o predomínio de arabinose, xilose/manose e galactose enquanto fucose, ramnose e glucose foram encontrados em menor proporção na parede celular bruta de embriões de *E. contortisiliquum* (Figura 18). Foi observada redução de arabinose e xilose\manose ao longo da germinação com aumento no teor de galactose. Para glucose, aos 3 dias do início da embebição, foi observada presença significativamente maior deste monossacarídeo na parede celular das sementes do tratamento controle em relação à co-germinação (Figura 18).



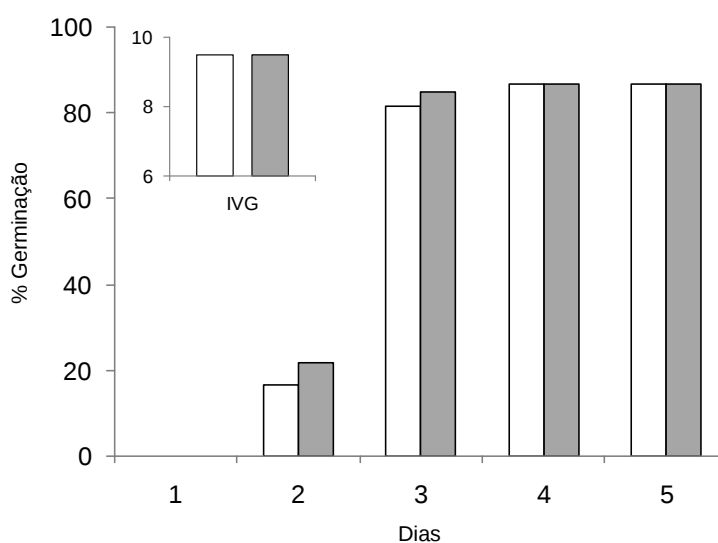
**Figura 17.** Teor de açúcares totais (A) e ácidos urônicos (B) na parede celular bruta do embrião de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (□) Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). As setas indicam o início da germinação.



**Figura 18.** Proporção relativa de monossacarídeos neutros (% relativa) da parede celular bruta do embrião de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação com água destilada ou co-germinadas com *S. virgata*, determinada por HPAEC/PAD. (■) Fucose, (■) Ramnose, (■) Arabinose, (■) Galactose, (■) Glucose, (■) Xilose/manose. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.2. Mobilização dos carboidratos de reserva relacionada ao processo germinativo em sementes de *E. contortisiliquum* germinadas com catequina

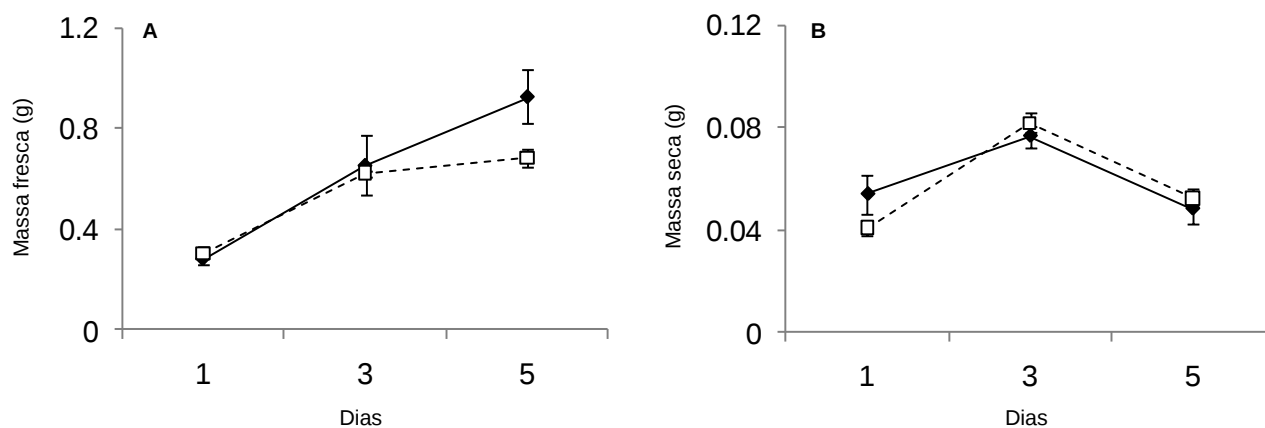
Foi observada tendência de maior germinação aos 2 e 3 dias do início da embebição quando as sementes de *E. contortisiliquum* foram embebidas com solução de catequina comercial ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em relação às sementes embebidas apenas em água (controle). Entretanto, não foram observadas diferenças na velocidade da germinação dessas sementes entre os tratamentos (Figura 19), como observado na co-germinação com *S. virgata* (Figura 5A).



**Figura 19.** Germinação (%), Inseto: IVG: Índice de velocidade de germinação de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (□) controle, (■) catequina comercial ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Os dados representam a média. N= 3 (10 sementes cada replicata).

Aos 5 dias, foi observada tendência de maior embebição das sementes de *E. contortisiliquum* do tratamento controle quando comparadas às sementes embebidas com catequina (Figura 20A). Contudo, não foram observadas grandes diferenças na massa seca entre os tratamentos ao longo do experimento (Figura 20B).

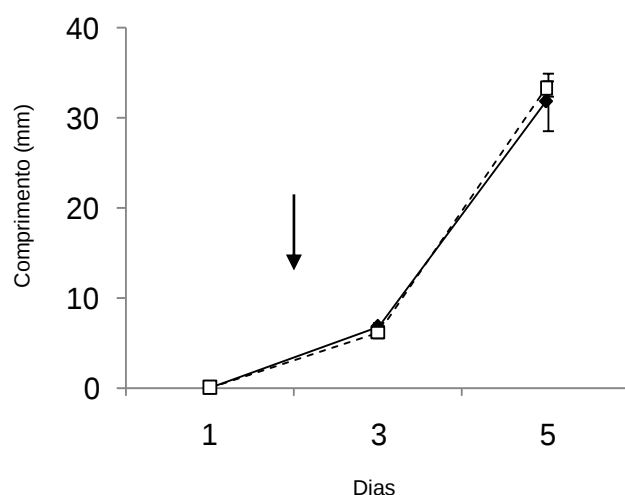
Foram observadas alterações na coloração das raízes de *E. contortisiliquum* quando as sementes foram embebidas em solução de catequina quando comparadas à coloração das plântulas controle (Figura 21). Entretanto, não foram observadas diferenças no diâmetro (dados não mostrados) e comprimento das raízes primárias entre os tratamentos ao longo dos 5 dias do início da embebição (Figura 22).



**Figura 20.** (A) Massa fresca do embrião e (B) massa seca do embrião de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle, (□) catequina. As barras representam o desvio padrão da média, N= 3 (10 sementes cada replicata).



**Figura 21.** Detalhe das plântulas de *Enterolobium contortisiliquum* em presença de água (controle), catequina Sigma ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) com 5 dias de germinação. A seta indica a raiz de *E. contortisiliquum* com alteração de coloração e forma. Barra = 1cm.



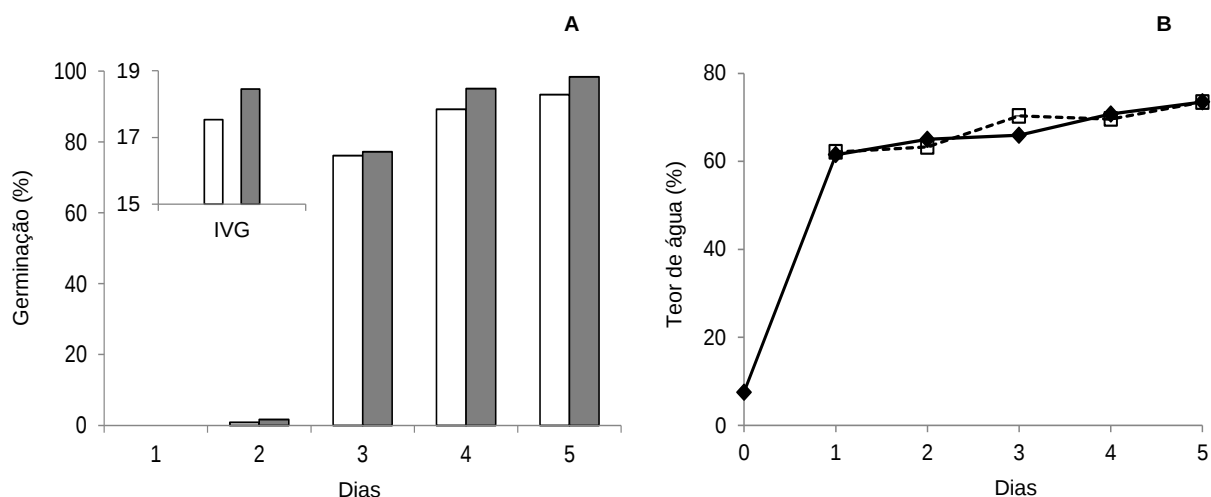
**Figura 22.** Comprimento da radícula de plântulas de *Enterolobium contortisiliquum* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle, (□) catequina. As barras representam o desvio padrão da média, N= 3 (10 sementes cada replicata). A seta indica o início da germinação.

#### 4.3. Mobilização dos carboidratos de reserva e atividade de enzimas relacionadas ao processo germinativo em sementes de *Peltophorium dubium* co-germinadas com *S. virgata*

##### 4.3.1. Análises no embrião

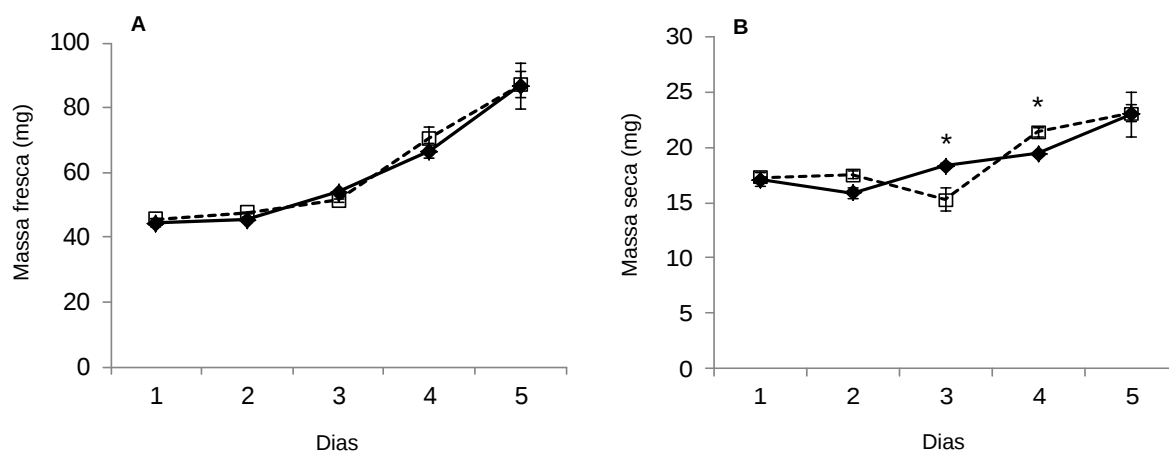
No experimento de co-germinação com sementes de *S. virgata* foi observada alta taxa germinativa das sementes de *P. dubium* a partir dos 3 dias do início da embebição, tanto para o tratamento controle quanto para a co-germinação. Porém, foi observada tendência de pequeno aumento na germinação de *P. dubium* quando co-germinada com *S. virgata* aos 4 e 5 dias em relação às sementes controle. Além da maior taxa germinativa, foi observada tendência de maior IVG das sementes de *P. dubium* quando estas germinam em presença de sementes de *S. virgata*, sugerindo que a exsudação de substâncias por *S. virgata* possa estimular a germinação de *P. dubium* (Figura 23A). O teor de água aumentou de 60 para aproximadamente 80% em 1 e 5 dias, respectivamente, para ambos os tratamentos (Figura 23B).

Foi observada embebição semelhante de sementes de *P. dubium* em ambos os tratamentos (Figura 24A) e variação na massa seca entre os dois tratamentos aos 2 e 3 dias de germinação (Figura 24B).



**Figura 23.** (A) Germinação (%), Inserto: IVG: Índice de velocidade de Germinação e (B) teor de água (%) do embrião de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. A: (□) controle e (■) co-germinação com *Sesbania virgata*, B: (◆) controle e (□) co-germinação com *Sesbania virgata*. Os dados representam a média, N= 3 (10 sementes cada replicata).

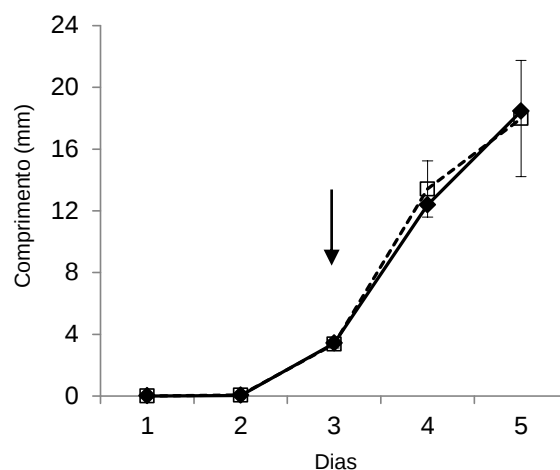
Foram observadas pequenas alterações no aspecto das raízes primárias de *P. dubium*, quando estas co-germinaram com *S. virgata*, apresentando-se escurecidas (Figura 25). Entretanto, diferente do observado para plântulas de *E. contortisiliquum*, não foi observada tendência de redução no comprimento e diâmetro das raízes primárias de *P. dubium* germinadas em presença de *S. virgata* (Figura 26).



**Figura 24.** (A) Massa fresca e (B) massa seca de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação, (◆) Controle e (□) co-germinação com *Sesbania virgata*. As barras representam o desvio padrão da média, N= 3 (10 sementes cada replicata). (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.



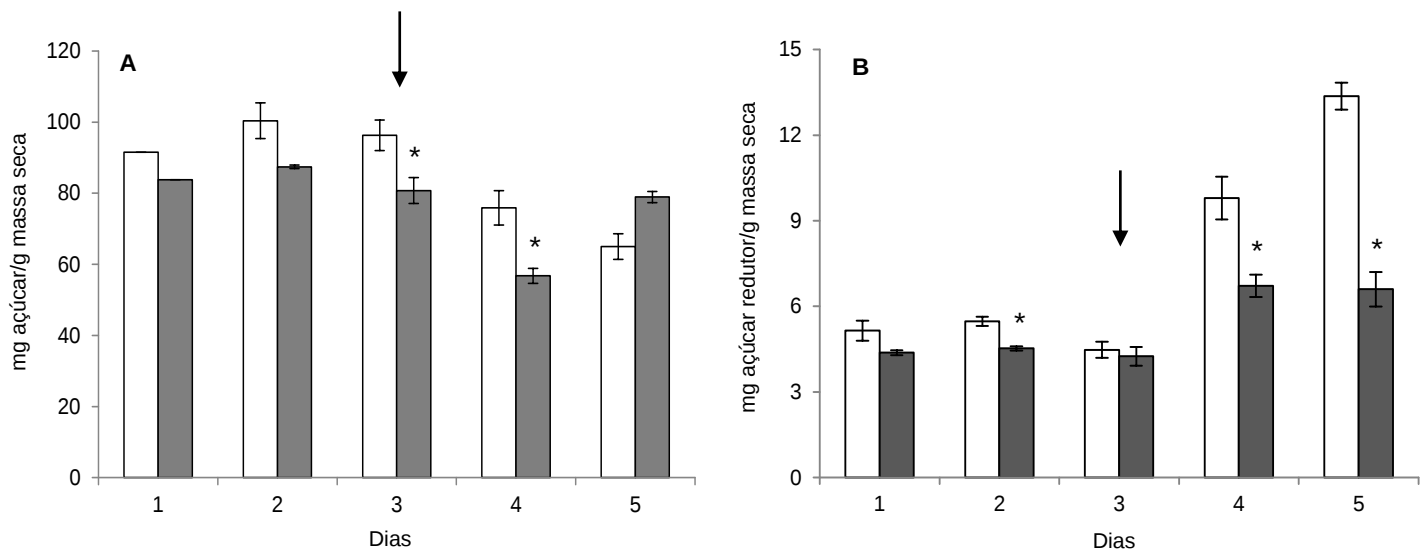
**Figura 25.** Detalhe das plântulas de *Peltophorum dubium* 5 dias de germinação com água destilada ou co-germinadas com *S. virgata*. A seta indica a raiz com alteração de coloração. Barra = 1 cm.



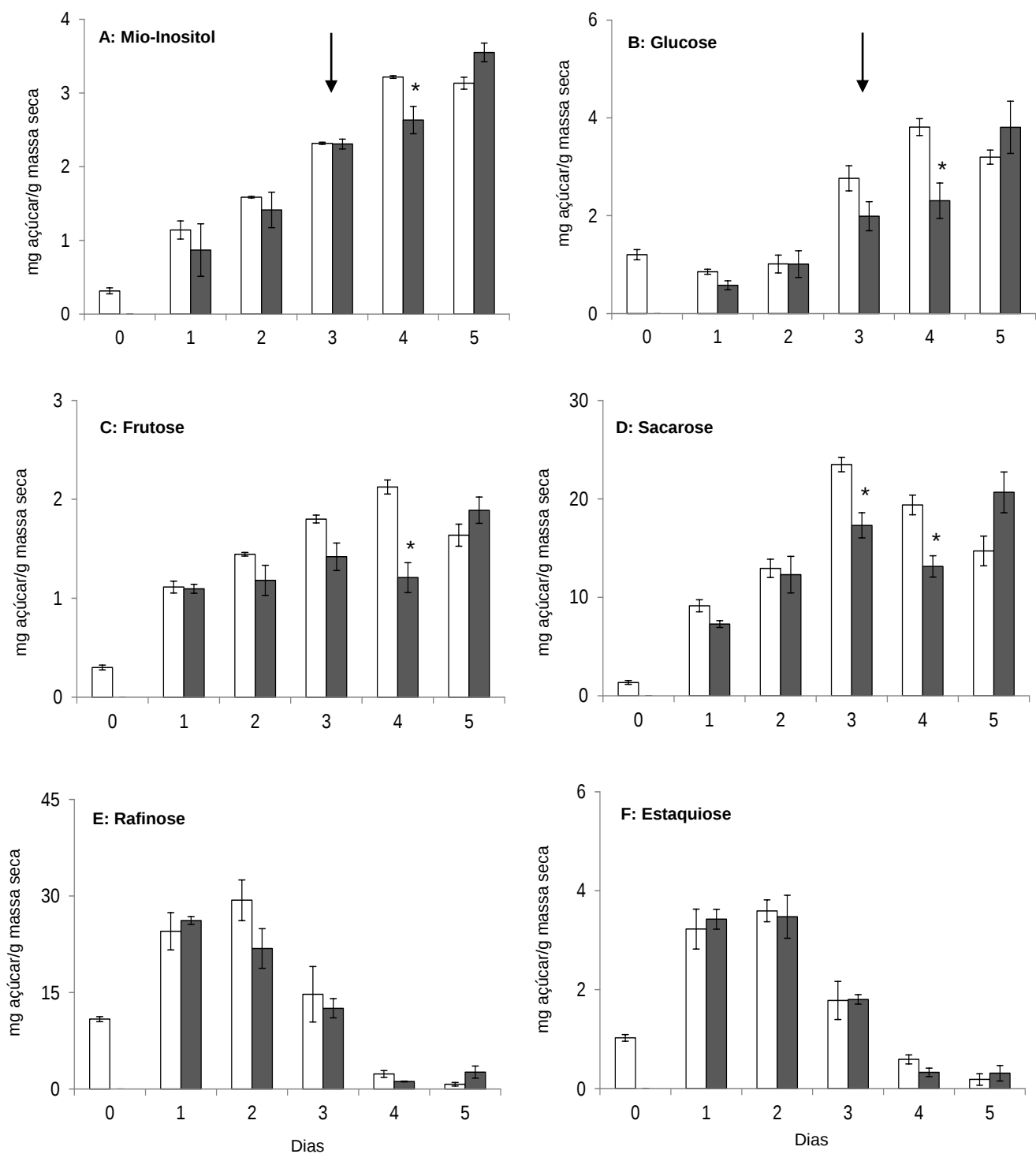
**Figura 26.** Crescimento de raiz primária de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle e (□) co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o desvio padrão da média, N= 3 (10 sementes cada replicata). A seta indica o início da germinação.

Maior quantidade de açúcares totais nos embriões de *P. dubium* foram observadas no tratamento controle em relação aos embriões da co-germinação ao longo do experimento, sendo que esta diferença foi significativa aos 3 e 4 dias de germinação (Figura 27A). O mesmo foi verificado para os açúcares redutores cuja quantidade foi significativamente maior aos 2, 4 e 5 dias do início da embebição (Figura 27B). A presença de maior quantidade de açúcares nas sementes do tratamento controle em relação à co-germinação foram confirmados com a detecção de quantidades

significativamente maiores de mio-inositol, glucose e frutose aos 4 dias de germinação e de sacarose aos 3 e 4 dias de germinação (Figura 28).



**Figura 27. (A)** Carboidratos totais e **(B)** açúcares redutores detectados em embriões de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação, (□) Controle e (■) Co-germinação. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). As setas indicam o início da germinação. (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.

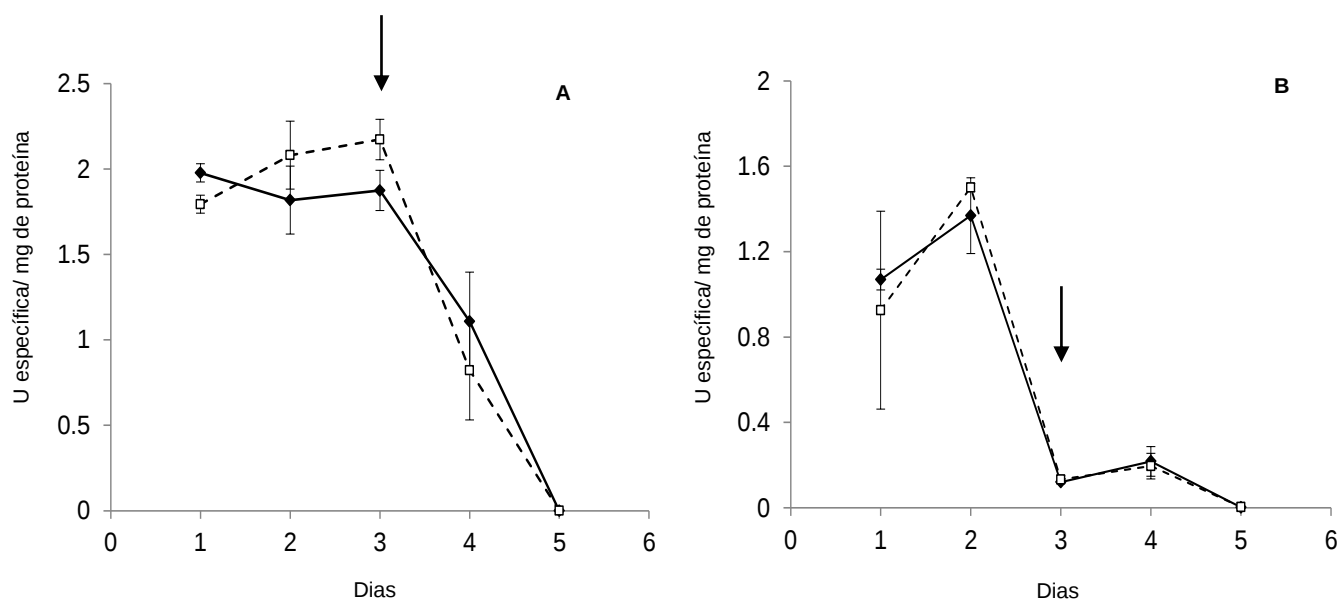


**Figura 28.** Teor de carboidratos solúveis no embrião de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação por HPAEC/PAD. (□) Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). (A) Mio-inositol, (B) Glucose, (C) Frutose, (D) Sacarose, (E) Rafinose, (F) Estaquiase. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). As setas indicam o início da germinação. (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey 5% de probabilidade.

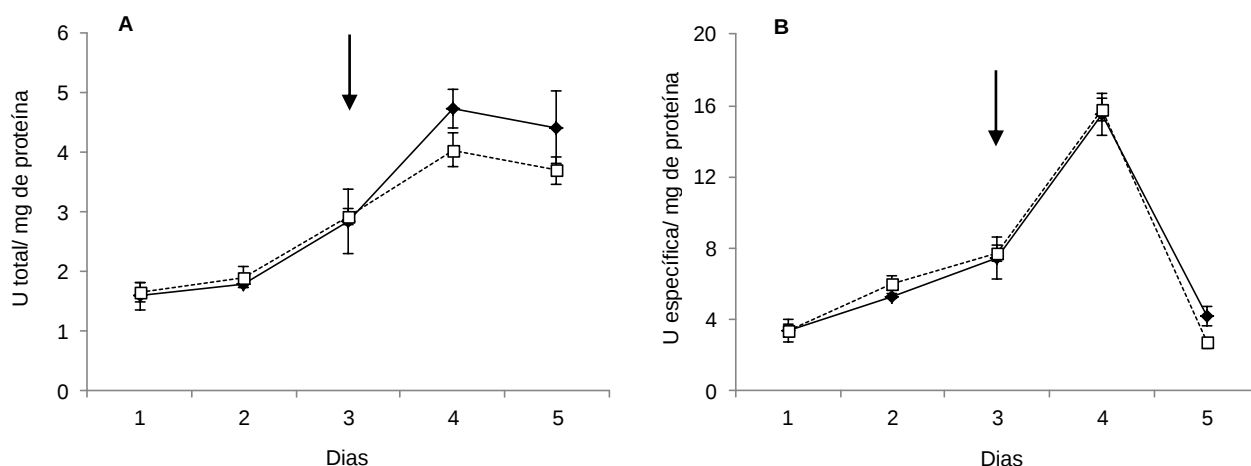
Foi observada maior atividade de invertase vacuolar e citosólica no início do processo de embebição de sementes de *P. dubium* (Figura 29A e B), o que está de acordo com o aumento de glucose e frutose observado ao longo da germinação (Figura 28B e C). Não foram observadas diferenças significativas nas atividades destas enzimas entre os tratamentos.

A atividade de  $\alpha$ -galactosidase aumentou ao longo da germinação, sendo mais acentuada aos 4 dias do início da embebição (Figura 30A e B), o que está de acordo com a redução nos teores de rafinose e estaquiose (Figura 28E e F). Entretanto, da mesma maneira que o observado para as invertases, não houve diferença entre os tratamentos.

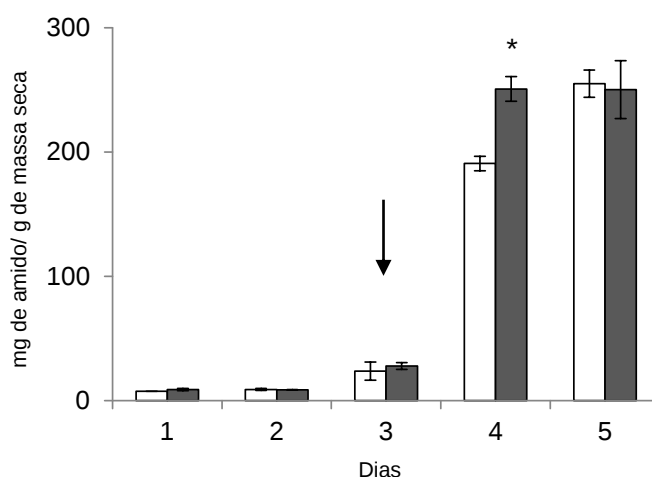
Com relação ao teor de amido no embrião de *P. dubium*, verificou-se aumento deste ao longo da embebição. Foi detectado teor significativamente maior deste polissacarídeo aos 4 dias nas sementes co-germinadas com *S. virgata* em comparação às sementes controle. Entretanto, essa diferença não permaneceu aos 5 dias do início da embebição, quando as sementes de ambos os tratamentos apresentavam aproximadamente 300 mg de amido/ g de massa seca (Figura 31).



**Figura 29.** Atividade específica de invertases vacuolar (A) e citosólica (B) em embriões de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação, (◆) Controle (□) co-germinação. As barras representam o erro padrão da média, N= 3 (5 sementes cada replicata). U= Unidade de enzima (1 unidade de atividade invertásica foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 mMol de sacarose/min/mg proteína). As setas indicam o início da germinação.



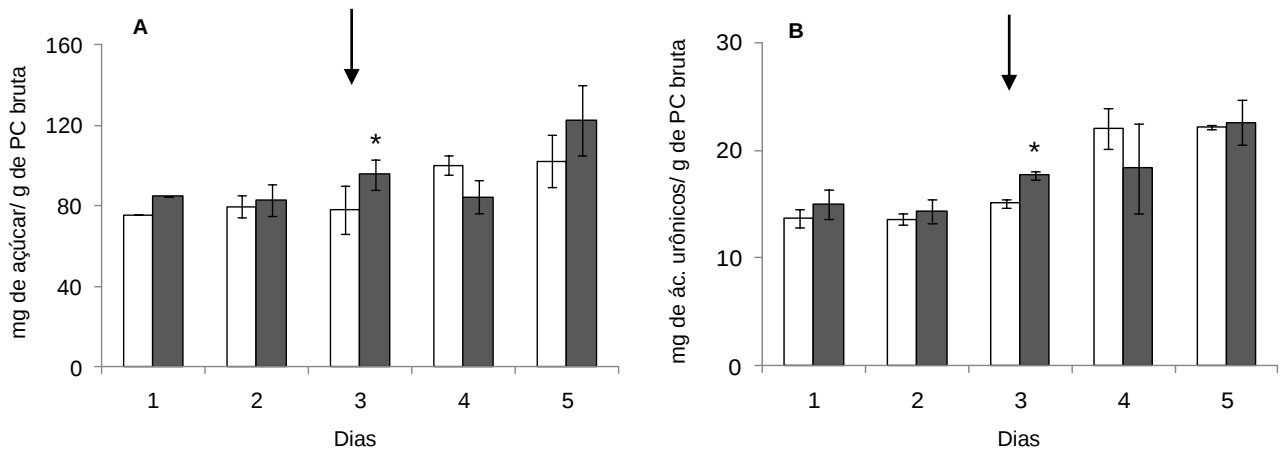
**Figura 30.** Atividade (A) total e (B) específica de  $\alpha$ -galactosidase de embriões de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação, (◆) Controle (□) co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N= 3 (5 sementes cada replicata). U= unidade de enzima (1 unidade de atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu$ Mol de galactose/min/mg de proteína). As setas indicam o início da germinação.



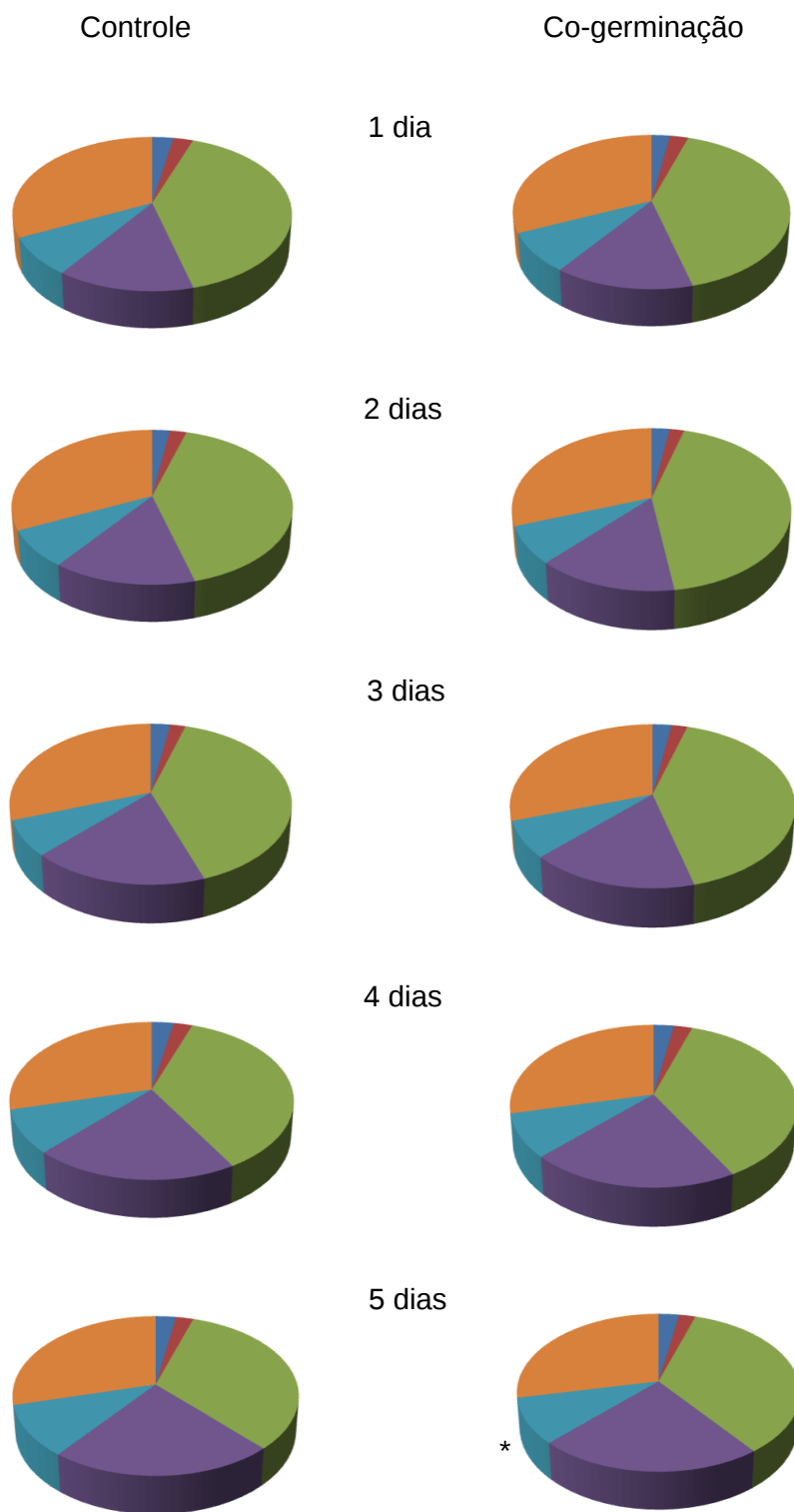
**Figura 31.** Teor de amido em embriões de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (□) Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). As setas indicam o início da germinação. (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 3 dias de germinação, foram detectados teores significativamente maiores de açúcares totais e ácidos urônicos na parede celular bruta de embriões de *P. dubium* co-germinadas com *S. virgata* em relação às sementes controle (Figura 32A e B). As análises dos monossacarídeos por

HPAEC/PAD demonstraram que a parede celular bruta de embriões de *P. dubium* é composta majoritariamente por arabinose e xilose/manose, sendo que o teor destes se mantém constante aos 3 primeiros dias, decaindo sensivelmente até os 5 dias do início da embebição (Figura 33). Essas análises também indicaram teor significativamente maior apenas de glucose nas sementes do tratamento controle em relação às sementes da co-germinação aos 5 dias do início da embebição (Figura 33).



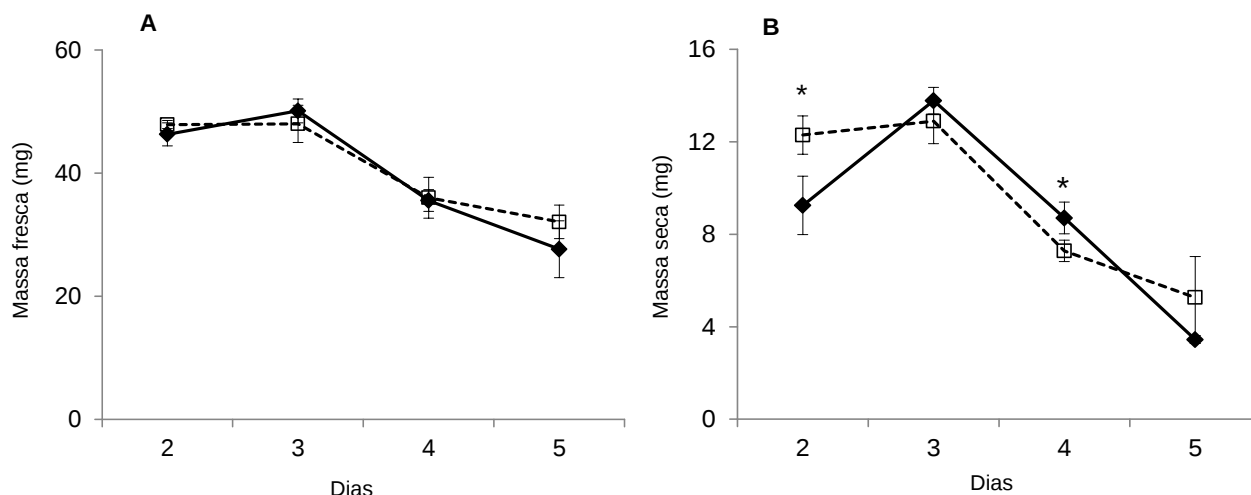
**Figura 32.** Teor de açúcares totais (A) e ácidos urônicos (B) na parede celular bruta do embrião de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (□) Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). As setas indicam o início da germinação. (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 33.** Proporção relativa de monossacarídeos neutros na parede celular bruta do embrião de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação com água destilada ou co-germinadas com *S. virgata*, determinada por HPAEC/PAD. (■) Fucose, (■) Raminose, (■) Arabinose, (■) Galactose, (■) Glucose, (■) Xilose/manose. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes por triplicata). (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.

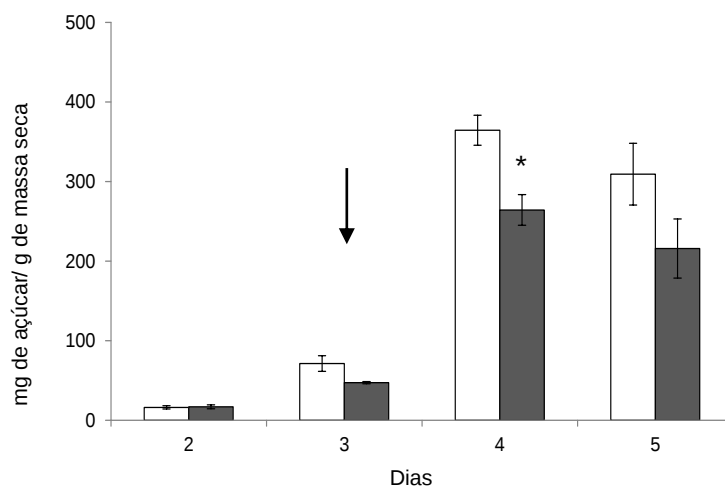
#### 4.3.2. Análises no endosperma

Com a embebição da semente (a partir de 2 dias) foi observado decréscimo na massa fresca do endosperma de *P. dubium*, tanto nas sementes controle quanto nas germinadas em presença de *S. virgata*, não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 34A). Entretanto, foi observada massa seca significativamente maior nos endospermas de sementes de *P. dubium* co-germinadas com *S. virgata* em relação ao endosperma das sementes controle, aos 2 dias de embebição. Aos 4 dias, foi observado o inverso (Figura 34B).

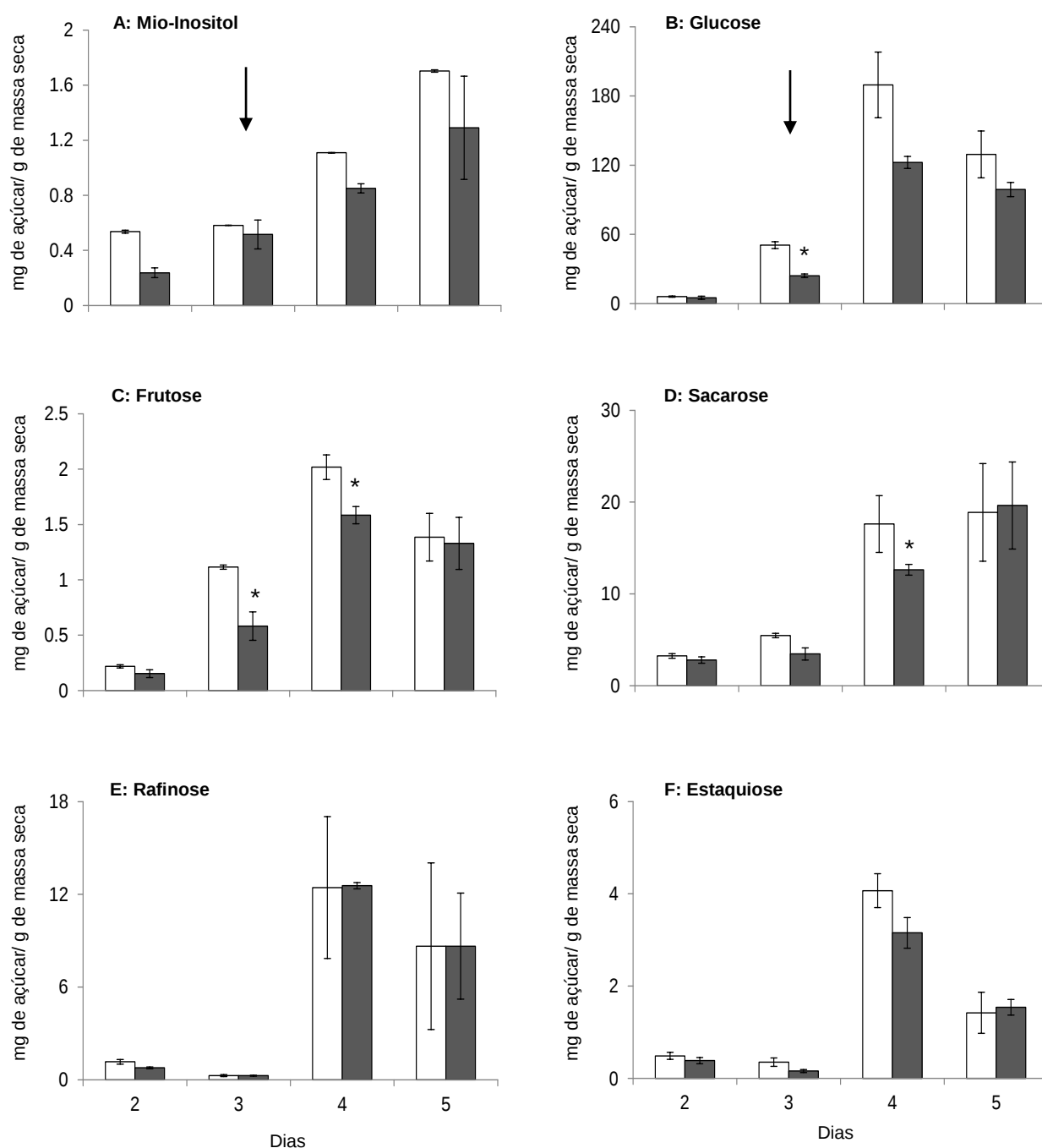


**Figura 34.** (A) Massas fresca e (B) seca do endosperma de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle e (□) co-germinação com *Sesbania virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N= 3 (10 sementes por triplicata). (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.

As análises de carboidratos solúveis demonstraram menor quantidade destes nos endospermas das sementes de *P. dubium* co-germinadas com *S. virgata* ao longo da embebição, sendo que, aos 4 dias, esta quantidade foi significativamente menor neste tratamento com relação ao controle (Figura 35). Não foi possível estimar o teor de açúcares redutores devido a baixa quantidade presente nos extratos do endosperma. Esta menor quantidade de açúcares solúveis é representada pela redução nos teores de glucose, frutose e sacarose (Figura 36). Com o processo germinativo, houve acúmulo de rafinose e estaquiose no 4º dia, com redução nos teores aos 5 dias de germinação. Com o tratamento de co-germinação, não foram observadas mudanças na mobilização destes oligossacarídeos (Figura 36E e F).



**Figura 35.** Carboidratos totais detectados no endosperma de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (□) Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N= 3 (5 sementes por triplicata). As setas indicam o início da germinação. (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.



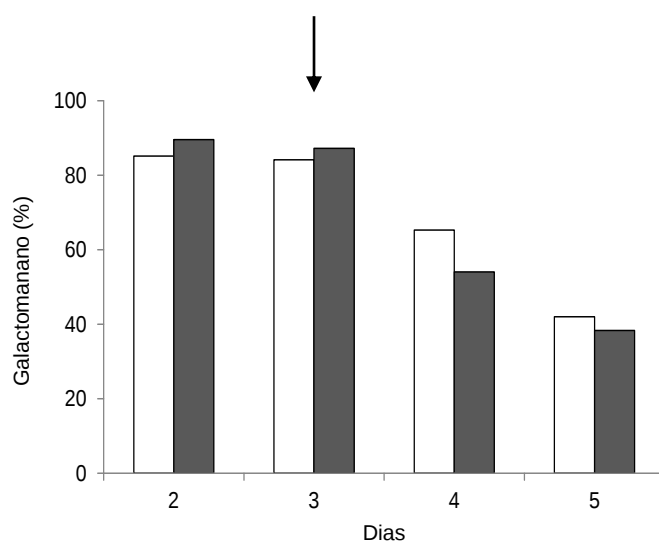
**Figura 36.** Teor de carboidratos solúveis do endosperma de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação determinado por HPAEC/PAD. (□) Controle e (■) Co-germinação. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). (A) Mio-inositol, (B) Glucose, (C) Frutose, (D) Sacarose, (E) Rafinose, (F) Estaquiose. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes cada replicata). As setas indicam o início da germinação. (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.

Após cinco dias do início da embebição, cerca de metade do galactomanano presente no endosperma de *P. dubium* havia sido mobilizado (Figura 37). Porém, não foram constatadas diferenças significativas na mobilização do galactomanano presente nos endospermas das sementes de *P. dubium* entre o controle e a co-germinação, embora pareça haver tendência de redução mais acentuada no teor deste no endosperma das sementes co-germinadas a partir do 4º dia do início da embebição (Figura 37).

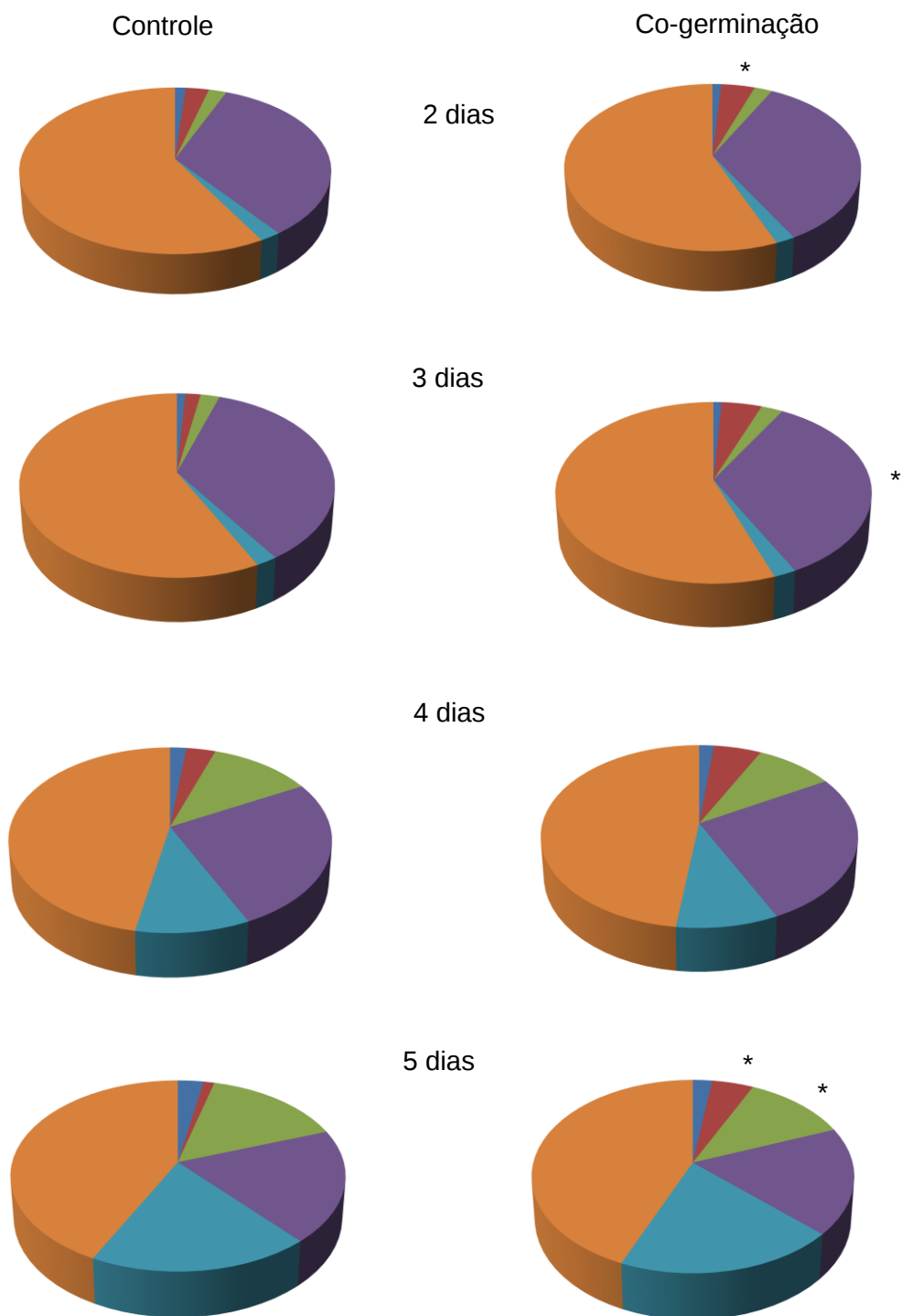
A análise dos monossacarídeos evidenciou redução no teor de galactose e manose/xilose, e aumento no teor de glucose no endosperma ao longo da germinação (Figura 38). Foi observado teor significativamente maior de ramnose aos 3 e 5 dias nas sementes co-germinadas com *S. virgata* em relação às sementes do controle. Em contrapartida, foi observado maior teor de arabinose e galactose nos endospermas das sementes controle em relação às co-germinadas aos 5 e 3 dias, respectivamente (Figura 38).

Não foram observadas diferenças significativas nas atividades total e específica de  $\alpha$ -galactosidase nesses tecidos entre os tratamentos (Figura 39), porém houve aumento acentuado destas durante a germinação.

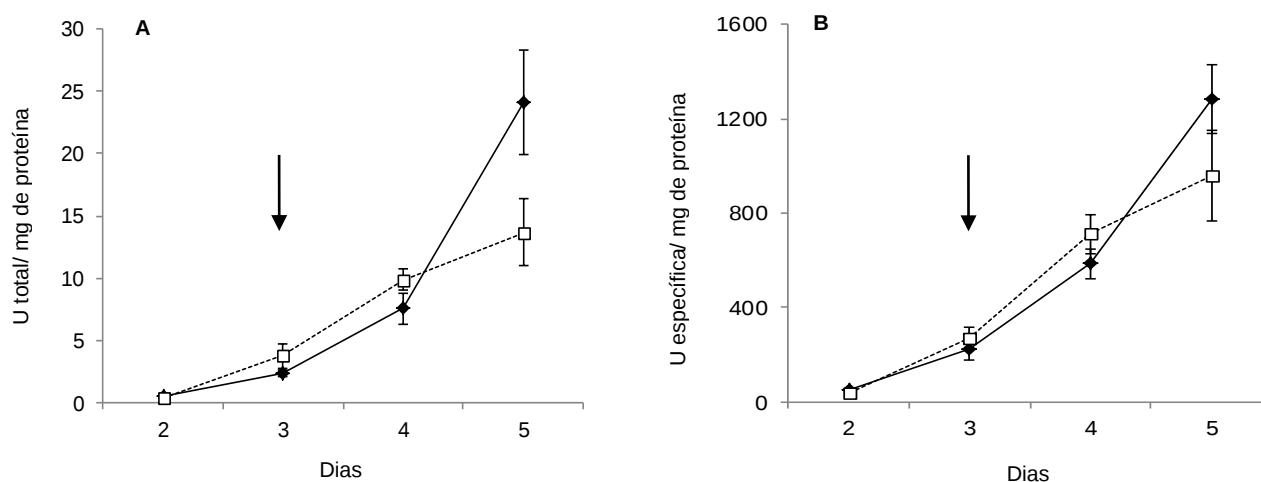
Foram observadas alterações na proporção manose:galactose nos endospermas de *P. dubium* ao longo da germinação, sendo que esta proporção manteve-se próxima de 1,5:1 do 2º ao 4º dia de embebição e 2:1 ao 5º dia em ambos tratamentos (Tabela 1). Esta mudança na proporção manose:galactose é coerente com a redução nos teores de galactose (Figura 38D) e aumento da atividade de  $\alpha$ -galactosidase neste tecido ao longo da germinação (Figura 39).



**Figura 37.** Rendimento (%) de galactomanano do endosperma de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (□) Controle e (■) Co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N = 3. As setas indicam o início da germinação.



**Figura 38.** Proporção relativa de monossacarídeos neutros na parede celular bruta do endosperma de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação com água destilada ou co-germinadas com *S. virgata*, determinada por HPAEC/PAD. (■) Fucose, (■) Ramnose, (■) Arabinose, (■) Galactose, (■) Glucose, (■) Xilose/manose. As barras representam o erro padrão da média, N = 3 (5 sementes por triplicata). (\*) Refere-se a diferença significativa entre os tratamentos por Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 39.** Atividades (A) total e (B) específica de  $\alpha$ -galactosidase de embriões de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle (□) co-germinação com *S. virgata*. As barras representam o erro padrão da média, N= 3 (5 sementes por triplicata). U total= unidade de enzima total (1 unidade de atividade de  $\alpha$ -galactosidase total foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu$ Mol de galactose/min/g de massa seca.). U específica= unidade de enzima específica (1 unidade de atividade de  $\alpha$ -galactosidase total foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu$ Mol de galactose/min/mg de proteína.). As setas indicam o início da germinação.

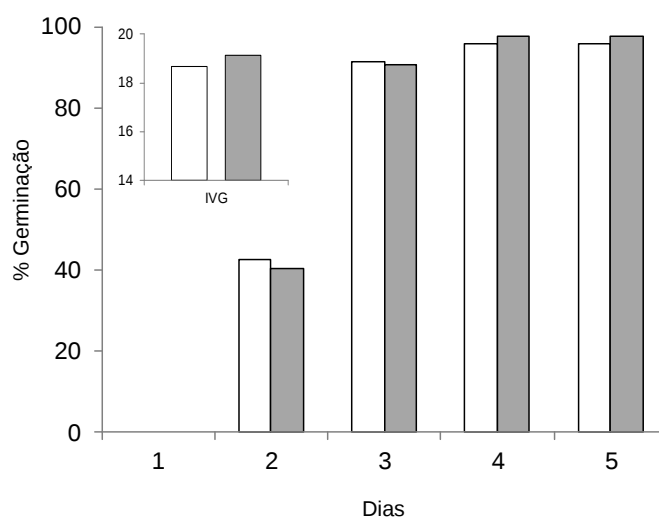
**Tabela 1.** Proporção Manose:Galactose no endosperma de sementes de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação com água destilada ou co-germinadas com *S. virgata* detectados por HPAEC/PAD.

| Proporção Manose:Galactose |               |        |
|----------------------------|---------------|--------|
| Dias                       |               |        |
| 2                          | Controle      | 1,73:1 |
|                            | Co-germinação | 1,63:1 |
| 3                          | Controle      | 1,61:1 |
|                            | Co-germinação | 1,62:1 |
| 4                          | Controle      | 1,81:1 |
|                            | Co-germinação | 1,82:1 |
| 5                          | Controle      | 2,23:1 |
|                            | Co-germinação | 2,44:1 |

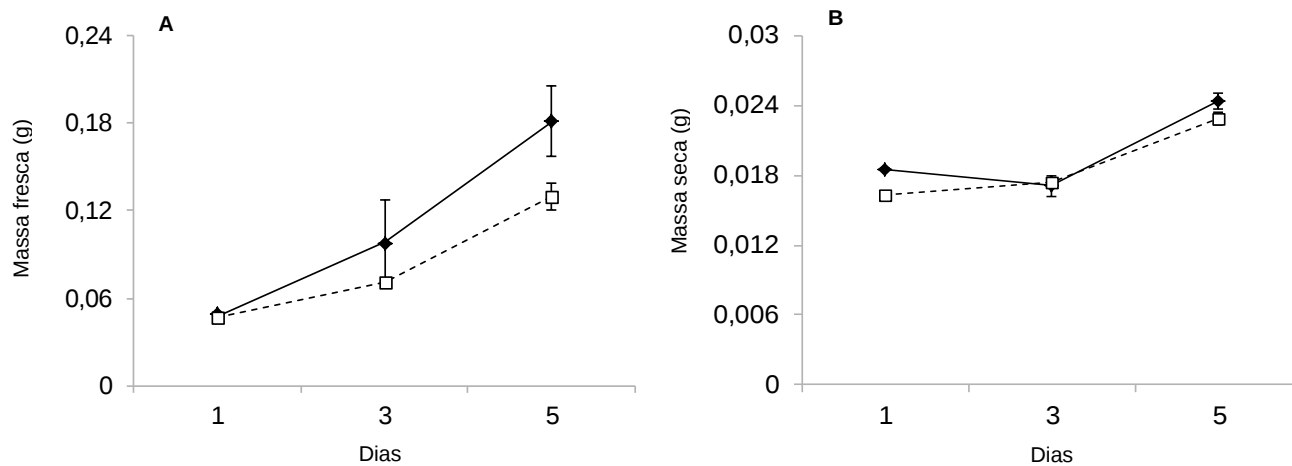
#### 4.4. Mobilização dos carboidratos de reserva relacionados ao processo germinativo em sementes de *P. dubium* germinadas com catequina

Não foram observadas grandes variações na taxa germinativa das sementes de *P. dubium* quando estas foram embebidas com água (controle) ou com catequina comercial. Porém, foi observada pequena tendência de aumento da velocidade de germinação quando as sementes desta espécie foram embebidas em solução de catequina (Figura 40).

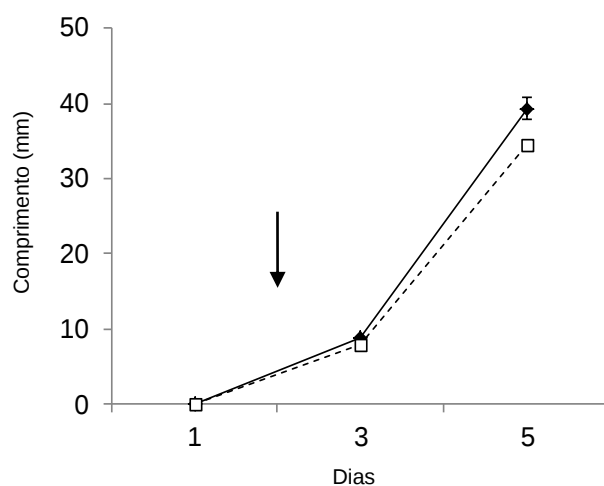
Foi observada tendência de maior absorção de água das sementes de *P. dubium* quando estas foram embebidas em água em relação às sementes embebidas em solução de catequina, porém não foram observadas grandes variações na massa seca entre os tratamentos ao longo da germinação (Figura 41A e B). Apesar das sutis diferenças observadas na embebição entre os tratamentos, não foram observadas grandes diferenças no comprimento (Figura 42), diâmetro e morfologia (dados não mostrados) das raízes primárias de *P. dubium* ao longo do desenvolvimento inicial.



**Figura 40.** (A) Germinação (%), Inseto: IVG: Índice de velocidade de Germinação de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. ( □ ) controle, ( ■ ) catequina. Os dados representam a média. N= 3 (10 sementes cada replicata).



**Figura 41.** (A) Massa fresca do embrião por semente e (B) massa seca do embrião por sementes da espécie *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle, (□) catequina. As barras representam o desvio padrão da média, N= 3 (10 sementes cada replicata).



**Figura 42.** Comprimento da radícula de plântulas de *Peltophorum dubium* durante 5 dias de germinação. (◆) Controle, (□) catequina. As barras representam o desvio padrão da média, N= 3 (10 sementes cada replicata). A seta indica o início da germinação.

## 5. Discussão

### 5.1. Germinação e mobilização dos carboidratos de reserva de espécies de Fabaceae de distintos estágios sucessionais e co-ocorrentes com *S. virgata*

*E. contortisiliquum* e *P. dubium* são duas leguminosas que co-ocorrem com *S. virgata* em formações vegetais naturais. Entretanto, *E. contortisiliquum* é uma espécie secundária inicial enquanto *P. dubium* é pioneira na sucessão ecológica (Aquino *et al.* 2009, Wanli *et al.* 2001). Além disso, as sementes de *E. contortisiliquum* não apresentam endosperma, sendo classificadas como exalbuminosas, ou seja, sementes que utilizam as reservas presentes nos cotilédones para o desenvolvimento do embrião durante a germinação (Soares *et al.* 2007). *P. dubium*, por sua vez, apresenta endosperma mucilaginoso e hialino (Donadio & Demattê 2000), como a grande maioria das leguminosas, e utiliza as reservas presentes nesse tecido durante a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (Gallão *et al.* 2007).

Sementes de ambas as espécies, quando escarificadas, germinaram a partir dos 2 dias do início da embebição, sendo que sementes de *E. contortisiliquum* atingiram valores de germinação próximo a 90% aos 3 dias do início da embebição enquanto sementes de *P. dubium* atingiram valores semelhantes apenas aos 5 (Figuras 5A, pg 17 e 23A, pg 31). Soares *et al.* (2007), utilizando escarificação química, verificaram que a germinação de sementes de *E. contortisiliquum* ocorreu após 24 horas de embebição e Guimarães *et al.* (2011) observaram que a germinação de sementes de *P. dubium* ocorreu a partir dos 2 dias de embebição. Essa diferença observada na germinação de *E. contortisiliquum* pode estar associada ao lote de sementes utilizado neste trabalho e ao método de escarificação utilizado.

As sementes de *E. contortisiliquum* possuem oligossacarídeos da série da rafinose como carboidratos solúveis de reserva, representando cerca de 20% da massa seca do embrião, que são hidrolisados a partir do 2º dia de embebição, coincidindo com o processo germinativo e pós-germinativo, e esgotados no 4º dia do início da embebição (Figura 11, pg 21). Oligossacarídeos da série rafinósica também foram detectados nos endosperma e embrião de sementes de *P. dubium*, porém em menores quantidades quando comparados a embriões de *E. contortisiliquum*, representando cerca de 6% da massa seca do embrião e 4% do endosperma (Figuras 28, pg 34 e 36, pg 41).

A presença dos oligossacarídeos da série rafinósica é frequente em sementes ortodoxas e tem sido relacionada à capacidade de tolerar a dessecação durante a

maturação (Lin & Haung 1994), como é o caso das sementes de *E. contortisiliquum* e *P. dubium* que também têm comportamento ortodoxo (Wielewick *et al.* 2006, Guimarães *et al.* 2011). Buckeridge & Dietrich (1996) verificaram que os oligossacarídeos da série da rafinose são os primeiros carboidratos de reserva mobilizados durante a germinação de *Sesbania marginata* (= *virgata*), tanto no embrião quanto no endosperma, o que também é observado em outras espécies de leguminosas como *Trigonella foenum-graecum* (Reid 1971). O mesmo foi observado neste trabalho para o embrião de *E. contortisiliquum* e *P. dubium*.

O processo de degradação dos oligossacarídeos da série rafínósica ocorre pela ação de enzimas hidrolíticas, sendo as invertases responsáveis pela quebra da sacarose em glucose e frutose livres e a  $\alpha$ -galactosidase responsável pela hidrólise das unidades de galactose da rafinose, estaquiose e verbascose (Buckeridge *et al.* 2004). Este processo de mobilização ocorre logo após a hidratação dos tecidos (Bewley & Black 1994). Para *E. contortisiliquum* e *P. dubium* foram observadas maior atividade de invertases vacuolar e citosólica no embrião no início da embebição, quando há presença de grande quantidade de oligossacarídeos da série da rafinose, e menor atividade destas enzimas ao final da germinação (Figuras 13, pg 23 e 29, pg 35), coerente com a mobilização desses açúcares durante o processo germinativo.

Para sementes de *E. contortisiliquum* foi observado pequeno aumento na atividade específica de  $\alpha$ -galactosidase ao longo da germinação, sendo observada maior atividade aos 5 dias, período em que a maior parte dos oligossacarídeos da série rafínósica já foi hidrolisada (Figura 14, pg 24). Esse resultado sugere que o aumento observado na atividade dessa enzima pode não estar relacionado à mobilização desses açúcares solúveis.  $\alpha$ -Galactosidases também agem hidrolisando polissacarídeos da parede celular. Neste trabalho, no método de determinação da atividade desta enzima foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (PNP), que determina a atividade de qualquer  $\alpha$ -galactosidase presente no tecido, e não necessariamente a que age sobre os oligossacarídeos da série rafínósica. Sendo assim, o ideal seria realizar incubações específicas tendo rafinose como substrato para determinar a atividade da  $\alpha$ -galactosidase que age especificamente hidrolisando esses oligossacarídeos ao longo do processo germinativo.

Por outro lado, em embriões de *P. dubium* foi detectado aumento da atividade total de  $\alpha$ -galactosidase ao longo da germinação, sendo observado um pico de atividade

específica dessa enzima aos 4 dias, período em que há decréscimo acentuado de rafinose e estaquiose nesses tecidos (Figura 30, pg 36), sugerindo seu envolvimento na mobilização desses açúcares.

Além da reserva composta por oligossacarídeos da série da rafinose, sementes de *E. contortisiliquum* também apresentam grande quantidade de amido, sendo observada mobilização deste polissacarídeo a partir dos 4 dias do início da embebição, sugerindo sua utilização para estágios posteriores de desenvolvimento (Figura 15, pg 24). Entretanto, em análises histoquímicas, Soares *et al.* (2007) verificaram aumento nos grãos de amido a partir de 12 horas de embebição e posterior redução gradativa dos mesmos até as 60 horas de embebição de sementes de *E. contortisiliquum*. Os autores observaram aumento gradual desse polissacarídeo no citoplasma ao longo das 60 horas de embebição, sugerindo este seja armazenado primeiramente e somente depois utilizado para o desenvolvimento do embrião. Essas diferenças observadas no tempo de degradação do amido em sementes de *E. contortisiliquum* podem estar relacionadas com as técnicas utilizadas para mensurar este parâmetro, que foram distintas nos dois trabalhos. Em relação à atividade de  $\alpha$ -amilase, como as medidas foram efetuadas somente aos 4 e 5 dias, não foi possível observar se houve variação de atividade ao longo da germinação, e associar um possível aumento de atividade dessa enzima com a hidrólise desse polissacarídeo.

Além dos oligossacarídeos da série rafinósica, o galactomanano presente no endosperma de sementes de muitas leguminosas também é completamente hidrolisado em manose e galactose ao longo da germinação, sendo esses monossacarídeos absorvidos e utilizados como fonte de energia pelo embrião (Buckeridge & Dietrich 1996, Buckeridge 2010). O decréscimo de oligossacarídeos da série da rafinose e de polissacarídeos de reserva de parede celular durante a germinação, atingindo valores reduzidos com o desenvolvimento da plântula, indica que estes são uma fonte de carbono necessária para as fases iniciais da germinação de sementes.

Sementes de *P. dubium* apresentam grande quantidade (cerca de 80%) de galactomanano em seu endosperma, sendo este polissacarídeo hidrolisado a partir dos 3 dias do início da embebição (Figura 37, pg 43). Neste tecido, foi observada maior presença de sacarose, rafinose e estaquiose aos 4 dias, período a partir do qual passaram a ser degradados. O acúmulo desses oligossacarídeos apenas aos 4 dias sugere que os mesmos são sintetizados a partir da mobilização do galactomanano nos primeiros

dias do processo germinativo, uma vez que foram detectados altos teores de manose e galactose livres nas análises de carboidratos solúveis desse tecido ao longo da germinação (dados não mostrados). Lisboa *et al.* (2006) sugerem que a conversão da galactose em sacarose por células do endosperma de *S. virgata* e posterior transporte e utilização deste dissacarídeo pelo embrião em crescimento aumentaria a atividade de  $\alpha$ -galactosidase no tecido, o que está de acordo com a mobilização observada. Para sementes de *P. dubium* foi detectada atividade crescente desta enzima no endosperma ao longo da germinação, período em que ocorre a mobilização do galactomanano (Figura 39, pg 45).

Foi observada razão manose:galactose de aproximadamente 1,5:1 nos endospermas de *P. dubium* (Tabela 1, pg 45), proporção semelhante ao observado por Buckeridge *et al.* (2000) nos endospermas de sementes do gênero *Peltophorum* e por Buckeridge e Dietrich (1996) nos endospermas de *S. marginata* (= *virgata*). Porém, em *P. dubium* esta proporção variou ao longo da germinação, atingindo valores de aproximadamente 2:1 ao 5º dia, indicando ação diferencial das enzimas  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase na degradação e desramificação desse polímero durante os 5 dias de germinação (Tabela 1, pg 45).

Bewley e Black (1994) relataram que sementes que possuem hemiceluloses (galactomananos ou xiloglucanos) como carboidratos de reserva, normalmente não acumulam amido nos seus tecidos. Este padrão foi observado para *P. dubium* que possui o endosperma rico em galactomanano. Entretanto, a hidrólise deste galactomanano (Figura 37, pg 43) ao longo da germinação promoveu acúmulo de amido, atingindo valores de cerca de 30% no embrião aos 4 e 5 dias (Figura 31, pg 36), sugerindo que sua síntese seja promovida pelo excesso de monossacarídeos transportados do endosperma como consequência dessa hidrólise.

Análises da parede celular bruta dos embriões revelaram que *E. contortisiliquum* apresenta grande quantidade de arabinose, glucose e xilose/manose como principais monossacarídeos constituintes e que os teores de arabinose foram reduzidos sensivelmente a partir da germinação (Figura 18). Em embriões de *P. dubium* foi observada presença majoritária de arabinose, xilose/manose, sendo a arabinose reduzida ao longo da embebição, havendo aumento do teor de galactose nos tecidos (Figura 33).

Em trabalho realizado por Mescia (2008) com *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) (Fabaceae) foi observado alto teor de arabinose na parede celular de sementes maduras

desta espécie. Os dados sugerem a presença de grande quantidade de arabinanos nesta parede celular que aumentam com a maturação da semente, estando estes polissacarídeos associados a uma maior flexibilidade da parede nessa espécie ortodoxa, permitindo o dobramento celular durante a dessecação. Já em *Inga vera* (Fabaceae), espécie recalcitrante, Caccere *et al.* (2013) observaram grande quantidade de xilose/manose, seguida de arabinose e galactose na parede celular bruta dos eixos embrionários dessas sementes maduras. Já nas análises de cotilédones foi observada proporção inversa, sendo a parede celular bruta composta majoritariamente por galactose, seguida de arabinose e xilose/manose. Os autores sugerem que a alta quantidade de galactose pode estar relacionada à sensibilidade da espécie à dessecação, diminuindo a flexibilidade da parede celular. Sendo assim, os altos teores de arabinose encontrados na parede celular bruta das duas espécies estudadas, também podem contribuir para o comportamento ortodoxo desta espécie, assim como sugerido para sementes de pau-brasil (Mescia 2008).

Em resumo, os dados obtidos neste trabalho demonstram diferenças na composição e mobilização dos carboidratos de reserva nas duas espécies estudadas. Foi observado que *E. cotontortisiliquum* não apresenta endosperma e sua reserva é composta majoritariamente por amido, presente nos embriões. Contudo, este polissacarídeo começa a ser hidrolisado somente após a mobilização dos oligossacarídeos da série da rafinose, a partir do 4º dia do início da embebição. Já *P. dubium* apresenta endosperma como tecido de reserva, sendo este composto majoritariamente por galactomanano. Seu embrião contém oligossacarídeos da série rafinósica que também são os primeiros carboidratos mobilizados no início da embebição. Além disso, foi verificado que a hidrólise do galactomanano ocorre a partir dos 3 dias do início da embebição e esta promove acúmulo de amido nos embriões, que será utilizado em estágios posteriores do desenvolvimento da plântula.

## 5.2. Efeitos de exsudatos de sementes de *S. virgata* e de catequina comercial sobre a germinação e o metabolismo de carboidratos de espécies nativas co-ocorrentes

Simões *et al.* (2008) detectaram a exsudação de aproximadamente 235 µg de (+)- catequina por semente de *S. virgata* às 24 horas de embebição, e decrescente exsudação desta ao longo do tempo. Baseado nestas informações, sugere-se que foram exsudatos aproximadamente 320 µg de catequina mL<sup>-1</sup> por semente de *S. virgata* ao

longo dos 5 dias dos experimentos de co-germinação realizados neste trabalho. Com base nessa quantidade, utilizou-se um controle positivo com (+)-catequina Sigma na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , quantidade bastante superior àquela encontrada nos exsudatos, para avaliar os efeitos da (+)- catequina na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *E. contortisiliquum* e *P. dubium*.

De acordo com Figuras 5A (pg 17) e 23A (pg 31), os resultados dos experimentos de co-germinação demonstraram que a exsudação de substâncias por sementes de *S. virgata* durante a sua embebição afeta positivamente a germinação das duas espécies nativas co-ocorrentes utilizadas neste estudo, com tendência de aumento no índice de velocidade de germinação. Entretanto, altas concentrações de catequina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) não afetaram a porcentagem e a velocidade de germinação de ambas as espécies estudadas (Figuras 19, pg 28 e 40, pg 46). Isso sugere que o efeito estimulante observado por ação dos exsudatos de *S. virgata* não se deve à presença de catequina, mas pode estar relacionado a outras substâncias, tais como açúcares, que são exsudadas durante a germinação (Simões 2008).

Ensaios *in vitro* desenvolvidos por Costa *et al.* (comunicação pessoal) mostraram taxa germinativa significativamente menor de *E. contortisiliquum* quando uma semente desta espécie co-germina com 5 sementes de *S. virgata*, indicando que altas concentrações das substâncias exsudadas por *S. virgata* podem afetar negativamente a germinação desta espécie. Já Simões (2008) verificou atraso na germinação de sementes de tomate quando germinadas com exsudatos de diferentes dias de embebição (2º e 4º) de sementes de *S. virgata*. Recentemente, Mignoni *et al.* (comunicação pessoal) verificaram aproximadamente 75% de inibição de germinação de sementes de tomate e menor IVG, quando estas foram cultivadas com exsudatos de sementes de *S. virgata* na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Entretanto, não foi observada inibição quando estas sementes foram embebidas em solução de catequina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Os autores também avaliaram os efeitos desses exsudatos sobre germinação de sementes de arroz e não observaram diferenças significativas na germinação dessas sementes quando submetidas ao tratamento em relação ao controle, indicando que sementes diferentes apresentam sensibilidade distinta aos exsudatos de sementes de *S. virgata*, independentemente das espécies co-ocorrerem ou não.

Tanto sementes de *E. contortisiliquum* quanto de *P. dubium* apresentaram coloração escurecida das raízes primárias quando submetidas à co-germinação com *S.*

*virgata*, fato não observado para as plântulas do tratamento controle (Figuras 7, pg 18, 8 pg 19 e 25, pg 32). Este mesmo efeito foi observado para as sementes de ambas as espécies quando embebidas com solução de catequina (mostrada apenas para *E. contortisiliquum*, figura 21, pg 29). Apesar das alterações morfológicas detectadas nas duas espécies co-ocorrentes com *Sesbania*, apenas as plântulas de *E. contortisiliquum* submetidas a co-germinação apresentaram tendência de menor crescimento radicular ao longo dos 5 dias em relação às sementes controle (Figura 9, pg 19). Entretanto, quando as sementes desta mesma espécie foram embebidas em solução de catequina comercial não foram notadas diferenças no crescimento radicular, sugerindo que outras substâncias presentes nos exsudatos de *S. virgata*, além da catequina, são responsáveis por essas alterações de crescimento. Simões (2008) detectou a presença das sesbanimidas A e B nos exsudatos de *S. virgata*, duas amidas descritas em outras espécies de *Sesbania* e que possuem atividade antifúngica. Além disso, uma proteína com atividade antimicrobiana foi recentemente isolada das sementes de *S. virgata* por Praxedes *et al.* (2011), indicando que catequina não é a única substância bioativa que pode ser exsudada por essas sementes durante os processos de embebição e germinação. Assim, as alterações morfológicas observadas nas raízes de *E. contortisiliquum* e *P. dubium* podem ser devidas ao efeito isolado ou sinérgico dessas outras substâncias que são exsudadas juntamente com a catequina.

Além de funcionar como reserva para o crescimento do embrião, o galactomanano presente no endosperma de leguminosas tem um papel fundamental no controle da entrada de água na semente, funcionando como uma substância tamponante, protegendo o embrião da falta ou do excesso de água. Buckeridge (2010) relata que a viscosidade do galactomanano, quando hidratado, pode representar uma barreira física de proteção contra patógenos nos estágios iniciais do desenvolvimento da plântula. Sendo assim, o fato de funcionar como um tampão de água e de ser altamente viscoso, o galactomanano no endosperma de sementes de *P. dubium* poderia também regular a entrada dos aleloquímicos exsudados por *S. virgata* e mitigar os efeitos dos mesmos sobre o desenvolvimento da raiz primária.

Yamagushi *et al.* (2011) propõem que o escurecimento e as alterações morfológicas em raízes são danos que indicam a presença de substâncias tóxicas nos extratos. Simões *et al.* (2008) verificaram inibição do desenvolvimento de parte aérea e subterrânea de plântulas de *Arabidopsis thaliana* e arroz quando cultivadas com

diferentes concentrações de extratos de exsudatos de sementes de *S. virgata*, sendo que os efeitos mais intensos foram observados com concentração de 500 µg de exsudato mL<sup>-1</sup>. Simões (2008) também observou redução drástica no desenvolvimento do hipocótilo e da raiz primária de alface e de tomate quando co-germinadas com 1 a 5 sementes de *S. virgata* para cada semente de planta-teste. Os autores sugeriram que estes efeitos são causados, dentre outros, pela presença de (+)- catequina, nos exsudatos dessa semente (Simões *et al.*, 2008). Mignoni *et al.* (comunicação pessoal) verificaram alterações no desenvolvimento de raízes primárias de tomate e arroz após 96 horas de embebição com exsudatos de sementes de *S. virgata* (1 mg mL<sup>-1</sup>) e com catequina comercial (1mg mL<sup>-1</sup>), sendo que as plântulas de arroz apresentaram redução de 99% do comprimento radicular, quando comparadas ao tratamento controle.

Trabalhos realizados por Chi *et al.* (2011) mostraram escurecimento e baixo desenvolvimento de raízes primárias de arroz nas primeiras horas de embebição quando estas são submetidas a tratamentos com o aleloquímico juglona, sendo esses efeitos ocasionados por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Bais *et al.* (2003) relatam que o efeito tóxico da (±)- catequina exsudada de raízes de *Centaurea maculosa* em raízes de outros cultivares, deve-se a rápida produção de espécies de ROS seguida de um aumento no influxo de cálcio e redução do pH citoplasmático, com consequente condensação do citoplasma e morte celular. As alterações observadas nas raízes primárias de *E. contortisiliquum* (Figuras 7, pg 18, 8 pg, 19) são típicas dos efeitos tóxicos causados pela catequina, sendo semelhantes àquelas observadas por Duke *et al.* (2009) em plântulas de alface e *A. thaliana* quando cultivadas com diferentes concentrações de uma mistura racêmica de (±)- catequina.

Lôbo *et al.* (2008) verificaram que a (+)- catequina isolada de folhas de *Tachigali myrmecophyla* (Fabaceae) inibe o desenvolvimento da raiz primária e do hipocótilo de plântulas de *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*. Estudos realizados por Costa *et al.* (comunicação pessoal) demonstraram que extratos aquosos de folhas de *S. virgata*, que também possuem (+)- catequina, nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1% diminuíram o desenvolvimento (comprimento) da radícula de plântulas de arroz e tomate, porém não influenciaram a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *E. contortisiliquum*.

Doubey & Singh (1999) afirmam que o metabolismo de carboidratos é afetado negativamente quando plantas crescem sob condições de estresse. No ensaio de co-

germinação de *E. contortisiliquum* foi observada tendência de atraso na mobilização dos carboidratos solúveis do embrião desta semente durante a embebição (Figura 10, pg 20), sendo que este atraso ocorreu aos 2 e 3 dias com a menor mobilização de estaquiose neste tecido (Figura 11F, pg 21). Isso sugere que as maiores massas fresca e seca detectadas nas sementes co-germinadas neste mesmo período, correspondem à menor mobilização dos carboidratos de reserva (Figuras 6A e B, pg 18 e 11F, pg 21). Corroborando o atraso na mobilização dos oligossacarídeos da série da rafinose, foi detectada tendência de menor atividade de invertases vacuolar e citosólica nas sementes de *E. contortisiliquum* submetidas à co-germinação (Figura 13, pg 23). Esse atraso pode estar relacionado ao menor crescimento radicular, possivelmente por efeito da catequina, reduzindo a força de dreno desse órgão e consequentemente a demanda por carbono a partir das reservas solúveis estocadas.

Oligossacarídeos da série da rafinose ocorrem simultaneamente no embrião e endosperma de sementes de leguminosas sendo mobilizados durante a germinação, resultando no acúmulo de galactose e sacarose livres nesses tecidos (Buckeridge & Dietrich 1996). Diferente do observado para *E. contortisiliquum*, foram detectados maiores teores carboidratos solúveis em embriões e endospermas de *P. dubium* do tratamento controle em relação à co-germinação ao longo de todo o experimento (Figuras 27, pg 33, 28, pg 34, 35, pg 40 e 36, pg 41). Além da maior presença de carboidratos solúveis, também foi observado maior teor de galactomanano nos endospermas das sementes controle aos 4 e 5 dias do início da embebição (Figura 37, pg 43). Apesar de apresentar diferenças nos teores de carboidratos solúveis, não foram detectadas grandes diferenças na atividade invertásica e  $\alpha$ -galactosidásica no embrião das sementes entre os dois tratamentos (Figuras 29, pg 35 e 30, pg 36). No aspecto fisiológico, a mobilização do galactomanano seria controlada pelo metabolismo intracelular, que está relacionado à força de dreno do embrião em desenvolvimento (Lisboa *et al.* 2006). Sendo assim, os menores teores de carboidratos solúveis observados em *P. dubium* quando submetidos à co-germinação podem indicar maior demanda de dreno do embrião destas sementes em relação às embebidas apenas em água. Uma explicação para isso poderia ser a tendência de aumento no índice de velocidade de germinação observada com a co-germinação, sugerindo que o metabolismo como um todo pode ter sido acelerado pela presença de substâncias estimulantes nos exsudatos de *S. virgata*.

Verificou-se atraso significativo na mobilização do amido de sementes de *E. contortisiliquum* quando estas foram co-germinadas com *S. virgata* (Figura 15, pg 24) sugerindo forte efeito dos exsudatos desta semente sobre o metabolismo de amido no desenvolvimento inicial de *E. contortisiliquum*, possivelmente como reflexo no atraso da metabolização dos oligossacarídeos da série da rafinose, que são as primeiras reservas de carboidrato mobilizadas em sementes (Buckeridge & Dietrich 1996). Por possuir um tecido específico de reserva (endosperma), rico em galactomanano, as sementes quiescentes de *P. dubium* não possuem amido. Entretanto, a mobilização dos carboidratos do endosperma promoveu o acúmulo deste polissacarídeo no embrião de *P. dubium* ao final da embebição (Figura 31, pg 36). Notou-se que a co-germinação com sementes de *S. virgata* estimulou a degradação do endosperma de *P. dubium* aos 4 e 5 dias do início da embebição (Figura 37, pg 43). Corroborando com esta mobilização acentuada, foi detectado maior teor de amido aos 4 dias nos embriões das sementes submetidas a co-germinação (Figura 31, pg 36).

Estudos realizados por Mignoni *et al.* (comunicação pessoal) demonstraram atraso na mobilização de açúcares solúveis totais e redutores aos 4 dias de embebição de sementes de arroz e tomate embebidas em exsudatos de sementes de *S. virgata* (1 mg mL<sup>-1</sup>). Lara-Núñez *et al.* (2009) observaram redução no metabolismo da sacarose em sementes de tomates quando estas são cultivadas por 36 e 48 horas com extratos aquosos de *S. deppei*, indicando que houve menor disponibilidade de glucose e frutose para o desenvolvimento do embrião. Os autores verificaram ainda redução significativa na atividade de invertases de parede celular e de  $\alpha$ -galactosidase durante a germinação de sementes submetidas à embebição com lixiviados de *S. deppei* quando comparada ao tratamento controle. Entretanto, foi avaliada apenas a atividade da  $\alpha$ -galactosidase relacionada ao afrouxamento do endosperma durante a germinação, uma vez que em sementes de tomate não são observados oligossacarídeos da série da rafinose como carboidratos de reserva (Lara-Núñez *et al.* 2009). Batish *et al.* (2006) observaram redução no conteúdo de carboidratos solúveis em folhas e raízes de *Phaseolus aureus* após 7 dias de embebição com extratos contendo 2-benzoxazolinona (BOA), um potente aleloquímico exsudado por centeio (Barnes & Putnam 1987), sugerindo que este produza um estresse capaz de causar alterações bioquímicas e fisiológicas, diminuindo o conteúdo de reservas no tecido (Batish *et al.* 2006). Sendo assim, as alterações verificadas no metabolismo dos carboidratos de reserva ao longo da germinação de *E.*

*contortisiliquum* e *P. dubium* parecem acontecer em resposta a presença dos aleloquímicos exsudados por sementes de *S. virgata*.

Análises da composição da parede celular bruta de *E. contortisiliquum* revelaram alteração no teor de arabinose possivelmente relacionado aos arabinanos, principal componente da parede celular desta espécie, aos 3 dias do início da embebição das sementes co-germinadas com *S. virgata* (Figura 18, pg 27). Entretanto, tais alterações no metabolismo dos carboidratos da parede celular bruta não foram observadas quando sementes de *P. dubium* foram submetidas à co-germinação (Figura 33, pg 38). Lara-Núñez *et al.* (2009) detectaram menor atividade de exo-poligalacturonase,  $\beta$ -glucanase e endo- $\beta$ -mananase em sementes de tomate submetidas a embebição com lixiviados aquosos de *S. deppei*, sugerindo menor alteração de pectinas, como os arabinanos, e de hemiceluloses, como galactomanano, em resposta a toxicidade dos lixiviados. Os autores sugerem que esta menor alteração dos carboidratos de parede celular pode estar relacionada ao atraso significativo observado na germinação das sementes de tomate submetidas ao tratamento. Sendo assim, as diferenças observadas no teor de arabinose em *E. contortisiliquum*, estando presente em maior quantidade nas sementes co-germinadas, podem estar relacionadas ao estresse causado pela liberação de aleloquímicos por *S. virgata*.

Em suma, os dados obtidos neste trabalho demonstram que a partir dos 2 dias de embebição, quando as sementes de *E. contortisiliquum* já entraram em contato com a maior parte da catequina exsudada por *S. virgata* (Simões *et al.* 2008), há menor desenvolvimento da raiz primária, sendo que esta também apresenta alterações morfológicas marcantes, em comparação às plântulas controle. No mesmo período há baixa atividade invertásica e consequente atraso na mobilização dos carboidratos solúveis presente no embrião destas sementes. Além disso, também foi observado pequeno atraso na modificação dos carboidratos da parede celular aos 3 dias de embebição das sementes embebidas em presença de *S. virgata*, indicando que os exsudatos dessas sementes interferem na mobilização de carboidratos e desenvolvimento inicial de *E. contortisiliquum*.

Já *P. dubium* mostrou-se mais resistente aos aleloquímicos exsudados por *S. virgata* apresentando desenvolvimento radicular semelhante em ambos os tratamentos. Entretanto, as análises de carboidratos solúveis sugerem maior demanda de dreno pelo embrião dessas sementes aos 4 e 5 dias do início da embebição, indicando que

aparentemente os exsudatos de sementes de *S. virgata* alteram apenas o metabolismo de carboidratos nesta espécie, não interferindo no desenvolvimento inicial da plântula.

### 5.3. Evidências para a teoria de maior resistência de espécies co-ocorrentes a aleloquímicos

Callaway & Aschehoug (2000) avaliaram os efeitos competitivos de *Centaurea diffusa* sobre o desenvolvimento de espécies de gramíneas competidoras européias, que co-ocorrerem naturalmente com *C. diffusa*, e norte-americanas que não têm esse histórico de co-ocorrência. Os autores observaram que as espécies norte-americanas sofreram maior interferência competitiva quando compradas às espécies européias, e sugeriram que este efeito pode ser decorrente do fato de *C. diffusa*, espécie invasora nos Estados Unidos, utilizar mecanismos competitivos que não estão presentes nas comunidades nativas, a fim de colonizar um novo ambiente. Em estudo semelhante, Thorpe *et al.* (2009) avaliaram o efeito de (±)- catequina aplicada exogenamente sobre o crescimento de espécies européias e norte-americanas em casa de vegetação. (±)-catequina foi utilizada visando avaliar os efeitos de exsudatos de raízes de *C. maculosa*, invasora nos Estados Unidos, sobre tais espécies. Os autores observaram forte efeito inibidor da (±)- catequina sobre o desenvolvimento das espécies norte americanas, não sendo observado o mesmo para as espécies européias. Estudos *in vitro* realizados por Bais *et al.* (2003) também avaliaram os efeitos da catequina sobre a germinação e desenvolvimento radicular de espécies européias e norte-americanas e também foi detectada maior influência deste aleloquímico sobre espécies que não co-ocorrem naturalmente com *C. maculosa*. Estes e muitos outros estudos (Perry *et al.* 2005, Inderjit *et al.* 2008, He *et al.* 2009, Thorpe *et al.* 2009) suportam a hipótese de que plantas nativas que não possuem a mesma história evolutiva da planta exótica e invasora seriam mais sensíveis às estratégias competitivas adotadas por esta para a colonização do ambiente.

Como discutido no item 5.2, ambas as espécies estudadas neste trabalho foram influenciadas e sofrem alterações no metabolismo dos carboidratos ao longo da germinação quando em presença de exsudatos de sementes de *S. virgata*, sendo estas alterações mais intensas aos 3 e 4 dias de embebição, período em que as sementes já entraram em contato com a maior parte da catequina exsudada por *S. virgata* (Simões *et al.* 2008). Contudo, os efeitos observados para as espécies nativas co-ocorrentes foram

menores e menos intensos quando comparados aos observados para espécies cultivadas (Simões 2008, Simões *et al.* 2008, Mignoni *et al.* comunicação pessoas, Costa *et al.* comunicação pessoal). Além disso, as alterações mais intensas foram observadas em plântulas de *E. contortisiliquum* em relação a *P. dubium*.

Em função de *S. virgata* ser uma espécie pioneira e *E. contortisiliquum* uma espécie secundária inicial na sucessão ecológica, há pouca probabilidade das sementes destas duas espécies co-germinarem, uma vez que a germinação de *E. contortisiliquum* ocorreria em um ambiente já colonizado por *S. virgata*. Sendo assim, é possível que sementes de *E. contortisiliquum* só entrem em contato com aleloquímicos liberados através de lixiviados de folhas de *S. virgata*, onde a (+)- catequina está presente em pequenas quantidades (Costa *et al.*, comunicação pessoal). Costa *et al.* (comunicação pessoal) avaliaram a germinação e o desenvolvimento de raízes primárias de *E. contortisiliquum* submetido a embebição com diferentes concentrações de extratos aquosos de folhas de *S. virgata* e não detectaram alterações nestes parâmetros, sugerindo resistência desta espécie a baixas concentrações de (+)- catequina.

Já os efeitos observados para *P. dubium* referem-se, possivelmente, ao aumento do metabolismo do embrião, já que não foram observadas alterações na morfologia e comprimento da radícula por efeito dos exsudatos ou da catequina comercial. Considerando-se que *P. dubium* e *S. virgata* estão ambas presentes nos estágios iniciais de colonização do ambiente, há alta probabilidade de que as sementes das duas espécies co-germinem. Além disso, sementes de *P. dubium* possuem endosperma e este pode conferir uma barreira física que controle a entrada dos aleloquímicos exsudados por *S. virgata*. Sendo assim, a maior resistência desta espécie quando comparada a *E. contortisiliquum* pode estar relacionada ao fato dela ser pioneira e provavelmente compartilhar o mesmo ambiente que *S. virgata* e também à presença do endosperma rico em galactomanano que pode proteger o embrião dos efeitos tóxicos de aleloquímicos.

Em resumo, os dados obtidos neste trabalho fornecem evidências adicionais para a teoria das novas armas químicas (Callaway & Ridenour 2004, Inderjit *et al.* 2008), que sugere que espécies que co-ocorrem com plantas invasoras seriam mais resistentes aos aleloquímicos liberados por ela do que espécies que não co-ocorrem naturalmente.

## 6. Conclusões

Corroborando a teoria das novas armas químicas, os dados obtidos neste trabalho sugerem que as espécies co-ocorrentes sofrem menor influência dos aleloquímicos exsudados por *S. virgata* do que espécies cultivadas ou não oriundas do mesmo ambiente. Entretanto, essa influência parece ser mais acentuada quando *S. virgata* co-germina com espécies de diferentes estágios sucessionais, como *E. contortisiliquum*. Além disso, não foram observadas grandes alterações na germinação das espécies co-ocorrentes embebidas em solução de catequina, sugerindo que outras substâncias presentes nos exsudatos de *S. virgata* ou o sinergismo entre elas sejam responsáveis pelas alterações observadas nas sementes nativas analisadas.

## 7. Referências Bibliográficas

- Aquino, A.F.M.A.G.** 2009. Superação de dormência em sementes de orelha-de-negro (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morang.) Revista Verde de Agrologia e Desenvolvimento Sustentável 4: 69-75.
- Amaral, L.I.V., Costa, P.M.F., Aidar, M.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.
- Araújo, E., Mendonça, A.V., Barbosa, D.G., Lamonica, K.R. & Silva, R.F.** 2004. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Revista Brasileira de Botânica 26: 105-110.
- 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.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. & Vivanco, J.M.** 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology 57: 233-266.
- Barnes, J.P., Putnam A.R.** 1987. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). Journal of Chemical Ecology 13: 889-905.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Setia N., Kaur, S., Kohli, R.K.** 2006. Effect of 2-benzoxazolinone (BOA) on seedling growth and associated biochemical changes in mung bean (*Phaseolus aureus*). Verlag der Zeitschrift für Naturforschung 61: 709-714.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. & Rome, S.** 1998. Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed

tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant Soil* 203: 27-36.

**Bernfeld, P.** 1955. Amylases, alpha and beta. *In*: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. *Methods in Enzymology I*. New York : Academic Press pp. 149-158.

**Bewley, J.D. & Black, M.** 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2 ed. Plenum Press, New York. 445 p.

**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.

**Buckeridge, M.S.** 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* 154: 1017–1023.

**Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C.** 1990. Galactomannan from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13: 109-112.

**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. & 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., Aida, M.P.M., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S.** 2004. Acúmulo de reservas. *In*: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. 31-50 p.

- Buta, J. G. & Lusby, W. R.** 1986. Catechins as germination and growth inhibitors in Lespedeza seeds. *Phytochemistry* 25: 93-95.
- Caccere, R., Teixeira, S.P., Centeno, D.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Braga, M.R.** 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology*. DOI information: 10.1016/j.jplph.2013.01.002
- Callaway, R.M. & Aschehoug, E.T.** 2000. Invasive plants *versus* their new and old neighbors: A mechanism for exotic invasion. *Science* 290: 521-523.
- Callaway, R.M. & Ridenour, W.M.** 2004. Novel weapons: a biochemically bases hypothesis for invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2: 433-436.
- 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, M.A.M., Pinto, M.M. & Figueiredo – Ribeiro, R.C.L.** 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* (Asteraceae) as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 281-285.
- Ceballos, L., Hossaert-Mckey, M., Mckey, D. & Andary, C.** 1998. Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of *Sesbania* (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of polyphenolic compounds in anti-pathogen defense of seedlings. *Chemoecology* 8: 141-151.
- Chaves, L.L.B., Carneiro, J.G.A., Barroso, D.G., Leles, P.S.S.** 2003. Efeitos da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada na produção de mudas de sesbânia em substrato constituído de resíduos agroindustriais. *Revista Árvore* 27: 443-449.
- 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.

- 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.
- Coutinho, M.P., Carneiro, J.G.A., Barroso, D.G., Rodrigues, L.A. & Siqueira, J.** 2006. Substratos de cava de extração de argila enriquecidos com subprodutos agroindustriais e urbanos para produção de mudas de sesbânia. *Revista Árvore* 30: 147-153.
- Donadio, N.M.M & Demattê, M.E.S.P.** 2000. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub) e jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr.All. ex Benth.) – Fabaceae. *Revista Brasileira de Sementes* 22: 64-73.
- Doubey, R.S. & Singh, A.K.** 1999. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolism enzymes in rice plants. *Biologia Plantarum* 42: 233-239.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.
- 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.
- Durigan, G. Nishikawa, D.L.L., Rocha, E., Silveira, E.R., Pulitano, F.M., Regalado, L.B., Carvalhaes, M.A., Paranaguá, P.A., Ramilu, V.E.L.** 2002. Caracterização de dois estados da vegetação de uma área de cerrado no município de Brotas- SP, Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 16: 251- 262.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C. & Carpita, N.C.** 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197: 157-162.
- Gallão, M.I., Vieira, G.P., Mendes, F.N.P., Souza, A.S.N., Brito, E.S.** 2007. Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:2012–2018.

- Guimarães, C.V., Faria, J.M.R., Oliveira, J.M., Amaral, E.A.S.** 2011. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. *Revista Brasileira de Sementes* 33: 207 – 215.
- Gorshkova, T.A., Wyatt, S.E., Salnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibragimov, M.R., Lozovaya, V.V. & Carpita, N.C.** 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology* 110:721-729.
- He, W-M., Feng, Y., Ridenour, W.M., Thelen, G.C., Pollock, J.L., Diaconu, A. & Callaway, R.M.** 2009. Novel weapons and invasion: biogeographic differences in the competitive effects of *Centaurea maculosa* and its root exudates (±)-catechin. *Oecologia* 159: 803-815.
- Iqbal Z., Hiradate, S., Noda, A., Isojima, S. & Fujii, Y.** 2003. Allelopathic activity of buckwheat: isolation and characterization of phenolics. *Weed Science* 51: 657–662.
- Inderjit, Pollock, J.L., Callaway, R.M. & Holben, W.** 2008. Phytotoxic effects of (±)-catechin *in vitro*, in soil, and in the field. *Plus One* 3: 1-11.
- Kissmann, K.G. & Groth, D.** 1999. Plantas infestantes e nocivas. BASF, São Bernardo do Campo, 978 p.
- Lara-Núñez, A., Romero-Romero, T., Blancas, V., Ventura, J.L., Anaya, A.L. & Cruz-Ortega, R.** 2006. Allelochemical stress cause inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell and Environment* 29: 2009-2016.
- 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.
- Lima Neto, J.S.; Gramosa, N.V.; Silveira, E.R.** 2008. Constituintes químicos de frutos de *Copaifera langsdorfii* Desf. *Química Nova* 31: 1078-1080.
- Lin, T.P.; Huang, N.H.** 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of Experimental Botany* 45: 1289–1294.
- Lisboa, C.G.S., Tonini, P.P., Tiné, M.A.S.T., Buckeridge, M.S.** 2006. Endo-β-mannanase 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., Santo, A.S.** 2008. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Química Nova* 31: 493-497.

**Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.

**Lorenzi, H.** 2000. Plantas daninhas do Brasil. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 640 p.

**Mescia, T.B.** 2008. Paredes celulares de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil) durante a maturação e o armazenamento. Tese de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. 73 p.

**Ndakidemi, 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.

**Pereira, A.R.** 2009. Como selecionar plantas para áreas degradadas e controle da erosão. FAPI, Belo Horizonte, 150 p.

**Perry, L.G., Johnson, C., Alford, E.R., Vivanco, J.M. & Paschke, M.W.** 2005. Screening of grassland plants for restoration after spotted knapweed invasion. *Restoration Ecology* 13: 725-735.

**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 of Chemical Ecology* 33: 2337-2344.

**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.
- Praxedes, P.G., Zerlin, J.K., Dias, L.O. and Pessoni, R.A.B.** 2011. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). Brazilian Journal of 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. & Meier, H.** 1973. Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of  $\alpha$ -galactosidases and  $\beta$ -mannosidase by the aleurone layer. Planta 112: 301-308.
- Santana, D.G. & Ranal, M.A.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Universidade de Brasília, Brasília.
- Shimon-Kerner, N., Mills, D. & Merchuk, J.C.** 2000. Sugar utilization and invertase activity in hairy-root and cell-suspension cultures of *Symphytum officinale*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62: 89–94.
- Simões, K.** 2008. Substâncias fitotóxicas e antifúngicas em sementes de leguminosas que acumulam galactomanano e xiloglucano como carboidratos de reserva de parede celular. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 220 p.
- Simões, K., Du, J., Kretschmar, F.S., Broeckling, C.D., Stermitz, F.R., Vivanco, J.M. & Braga, M.R.** 2008. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. Journal of Chemical Ecology 34: 681-687.
- Simões, K., Du, J., Pessoni, R.A.B., Cardoso-Lopes, E.M., Vivanco, J.M., Stermitz, F.R. & Braga, M.R.** 2009. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. Phytochemistry Letters 2: 59-62.
- Soares, D.A., Normando, L.R.O., Gallão, M.I.** 2007. Mobilização de reservas em sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Mroong. durante a germinação. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro, Caxambu – MG.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry 160: 61-68.

- 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.
- Veiga Junior, V., Andrade Junior, M.A., Ferraz, I.D.K, Christo, H.B., Pinto, A.C.** 2007. Constituinte das sementes de *Copaifera officinalis* L. *Acta Amazônica* 37: 123-126.
- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K.** 2003. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chemistry*. 81: 307–312.
- Wanli, Z., Leihong, L. & Perez, S.C.J.G.A.** 2001. Pré-condicionamento e seus efeitos em sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). *Revista Brasileira de Sementes* 23: 146-153.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E. & Vivanco, J.M.** 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132: 44–51.
- 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.
- Weir, T. L., Bais, H.P., Stull, V.J., Callaway, R.M., Thelen, G.C., Ridenour, W.M., Bhamidi, S., Stermitz, F.R. & Vivanco, J.M.** 2006. Oxalate contributes to the resistance of *Gaillardia grand flora* and *Lupinus sericeus* to a phytotoxin produced by *Centaurea maculosa*. *Planta* 223: 785-795.
- Wielewick, A.P., Leonhardt, C., Schlindwein, G., Medeiros, A.C.S.** 2006. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Sementes* 28: 191-197.
- Xuan, T.D. & Tsuzuki, E.** 2002. Varietal differences in allelopathic potential of alfalfa. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188: 2-7.

**Xuan, T.D., Chung, I.M., Khanh, T.D. & Tawata, S.** 2006. Identification of phytotoxic substances from early growth of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) root exudates. *Journal of Chemical Ecology* 32: 895–906.

**Yamagushi, M.Q., Gusman, G.S., Vestena, S.** 2011. Efeito alelopatico de extratos aquosos de *Eucalyptus globulus* Labill. e de *Casearia sylvestris* Sw. sobre especies cultivadas. *Ciencias Agrarias* 32: 1361-1374.