

Marco Aurélio Mata Gonçalves Torres

**Identificação e caracterização do potencial alelopático do
bambu *Apoclada simplex* McClure & Smith**

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

SÃO PAULO 2015

Marco Aurélio Mata Gonçalves Torres

**Identificação e caracterização do potencial alelopático do
bambu *Apoclada simplex* McClure & Smith**

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: MARIA TEREZA GROMBONE GUARATINI

“Eu aprendi que a coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo.”

Nelson Rolihlahla Mandela

Agradecimentos

Este trabalho é o resultado da dedicação e empenho de muitas pessoas. Gostaria de agradecer pelos meses de compreensão e apoio de meus pais, Vera e Arnaldo.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e principalmente ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida (Processo 2013/09122-1).

Aos envolvidos no projeto, Dra. Luce Torres do Núcleo e Pesquisas em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela atenção e dedicação à pesquisa. À Amarélis, do Núcleo de Ecologia pela amizade e apoio nas atividades de campo. À Mônica, do Núcleo de Sementes, pela dedicação e apoio, Dra. Elke Cardoso, Joice Andrade Bonfim e Denise L.C. Mescolotti do Departamento de Ciências do Solo da ESALQ/USP, pela ajuda na identificação dos fungos micorrízicos arbusculares.

Ao Dr. Alberto Cavalheiro do Instituto de Química UNESP-Araraquara por ter me recebido em seu laboratório e permitido o uso dos equipamentos.

À Dra. Isabel Coutinho do Instituto de Química UNESP-Araraquara pela paciência e dedicação nas análises químicas.

Aos Dr. Gabriel Leme e Dra. Paula do Instituto de Química UNESP-Araraquara pela amizade e dedicação.

A orientadora do projeto Dra. Maria Tereza Grombone Guaratini, obrigado por acreditar no meu potencial, e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao meu amigo e companheiro de trabalho Celso, meu braço direito e muitas vezes esquerdo também.

Aos amigos do Instituto de botânica, Pedro, Marcelo, Janaina, Fabio, Fernanda, Francine, Beatriz, Heloisa, Mauro, Rodrigo e Simone. Obrigado por cada dia, por cada palavra de apoio.

Aos meus amigos, Alessandra, Alexandre, Thaís, Thiago, Laíssa, Carina, Camila, Renato, Camila, Mariana, Caio, Cintia, Jasmin, André, Mohamed, Sânia e Thaina por todas as rizadas e apoio ao longo destes anos.

Sumário

Lista de tabelas	IV
Lista de figuras	VI
Lista de abreviações	VIII
1.1. Alelopatia: Histórico e conceito	1
1.3. Influência das interações entre fungos no processo alelopático	6
1.4. Caracterização do grupo, invasão e dominância dos bambus na floresta Atlântica: Evidências de interações mediadas por aleloquímicos.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.2. Material vegetal	10
3.3. Extração e fracionamento	12
3.4.1 Extrato etanólico	13
3.4.1 Extrato aquoso.....	13
3.4.3. Fracionamento dos extratos ativos	14
3.5. Bioensaios de germinação e de crescimento com extratos e frações.....	14
3.5.1. Condições experimentais dos bioensaios	14
3.5.2. Germinação	15
3.5.3. Crescimento	16
3.6. Bioensaio de germinação e crescimento em função da concentração aplicada	16
3.6.1. Germinação	16
3.6.2. Crescimento	17
3.7. Reagentes.....	17
3.8. Bioensaios de germinação e de crescimento com padrões de bambus e gramíneas.....	17
. 17	
3.9.1 Fluxograma de atividades	18
3.9.2. Análise Cromatográfica UHPLC – DAD.....	18
3.9.3. Partição da fração em coluna aberta.....	19
3.4.4. Análise dos extratos e frações por HPLC-DAD.....	19
3.9.5. Análises por LC-DAD-ESI-MS	20

3.9.6. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	20
3.10. Extração do material do solo para análise de aleloquímicos	21
3.11. Coleta de solo para análise química	21
3.12. Análise de componentes bióticos do solo - FMA.....	22
3.12.1. Padronização de técnica para a identificação dos fungos arbusculares (FMAs) do solo .	22
3.12.3. PCR do DNA extraído das raízes.....	23
3.12.4. Clonagem e transformação de produtos de PCR.....	24
3.13. Análise estatística	25
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Bioensaios de germinação e crescimento com extratos e frações	25
4.2. Bioensaios de germinação em função da concentração aplicada dos extratos e frações	26
4.3. Bioensaio de germinação e crescimento em função da concentração aplicada de frações do extrato aquosos de folhas.....	28
4.5. Bioensaio de germinação e crescimento com padrões	31
4.6. Perfil metabólico do extrato aquoso de <i>Apoclada simplex</i>	32
4.7. Perfil metabólico da fração n-Butanólica e das subfrações via HPLC-DAD.....	33
4.7.1. Perfil metabólico via HPLC-DAD-ESI-MS e RMN de ^1H da fração <i>n</i> -butanólica	37
4.7. Análises cromatográficas para detecção de compostos fitotóxicos no solo por UHPLC..	42
4.9. Caracterização dos componentes químicos do solo	43
4.10. Análise de componentes bióticos do solo – FMA	43
5. Discussão.....	45
6. Referencias bibliográficas.....	50
Raij B. V. 1983 Avaliação da Fertilidade do Solo. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, SP.	59

Lista de tabelas

Tabela 1. Divisão dos aleloquímicos proposta por Rice 1984	4
Tabela 2. Dados dos rendimentos dos extratos em mg/ml e (%) obtidos por extração aquosa e etanólica de <i>Apoclada simplex</i>	13
Tabela 3. Dados dos rendimentos dos extratos em mg/ml e (%) obtidos por partição líquido- líquido do extrato aquoso de <i>Apoclada simplex</i>	14
Tabela 4. Porcentagem de Inibição da germinação (IG) e Índice de velocidade de germinação (IVG) referente ao último dia de tratamento (estabilização da curva de germinação). Média \pm Desvio padrão R-quadrado (r^2), obtidos em função das concentrações do extrato aquoso de folha aquoso.	27
Tabela 5. Medidas de comprimento (mm) da parte aérea (P.A), e da parte subterrânea (P.S) em função da concentração aplicada das frações. Média \pm desvio padrão e R-quadrado (r^2) das concentrações do extrato aquoso de folha .Números apresentados dentro de parênteses correspondem à porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle.....	28
Tabela 6. Concentração das frações ativas de folhas de <i>A. simplex</i> em mg/ml.....	28
Tabela 7. Porcentagem de Inibição da germinação (IG) e Índice de velocidade de germinação (IVG) referentes ao último dia de tratamento (estabilização da curva de germinação). Média \pm Desvio pdrão. R-quadrado (r^2), obtidos em função das concentrações das frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e <i>n</i> -butanol (<i>n</i> But) na germinação de sementes de tomate, arroz, <i>M. bimucronata</i> e <i>E. verna</i>	29
Tabela 8. Medidas de comprimento (mm) da parte aérea (P.A), e da parte subterrânea (P.S) em função da concentração aplicada das frações. Média \pm desvio padrão e R-quadrado (r^2) das concentrações das frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e <i>n</i> -butanol (<i>n</i> But) no crescimento de sementes de arroz, <i>M. bimucronata</i> e <i>E. verna</i> . Números apresentados dentro de parênteses correspondem à porcentagem de porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle.	30
Tabela 9. Efeito dos padrões e da mistura de padrões (1 mM) identificados em bambus e gramíneas sobre o comprimento (mm) da radícula (Parte subterrânea) e do hipocótilo (Parte aérea), de <i>M. bimucronata</i> e <i>E. verna</i> . Média \pm desvio. Número apresentados dentro de parênteses representam a porcentagem de inibição em relação ao controle.....	31
Tabela 10. Rendimento em miligramas (mg) das sub frações (C1 - C4) da fração <i>n</i> But. Onde estão representados H ₂ O (A) e EtOH (B).....	33
Tabela 11. Tentativa de identificação dos metabólitos presente na fração <i>n</i> -butanólica empregando HPLC-DAD-ESI(-)-MS.	40
Tabela 12. Tentativa de identificação dos benzoaxinonas na fração <i>n</i> -butanólica de <i>A. simplex</i> empregando HPLC-DAD-ESI(+)-MS.....	41
Tabela 13. Análise química de amostras coletadas do solo. Fora da área de ocorrência de <i>A. simplex</i> e dentro da área de ocorrência.....	44

Lista de figuras

- Figura 1.** Efeitos dos extratos aquoso e etanólico de folha, colmo jovem e colmo adulto de *Apoclada simplex* sobre a germinação de sementes de tomate. Barras verticais representam o desvio padrão da média. *indica que o número de sementes germinadas difere significativamente mediante análise (ANOVA $p < 0,01$). 25
- Figura 2.** Perfis cromatográficos das diferentes frações de folhas de *A. simplex* em 280 nm. (1) mistura dos padrões: ácido *trans*-3-cafeoilquinico (9 minutos); ácido cafeico (9,8 minutos); ácido *p*-cumárico (13,2 minutos); luteolina 8-C-glicosídeo (18,8 minutos); luteolina 6-C-glicosídeo (20,6 minutos); apigenina 8-C-glicosídeo (21 minutos); (2) fração diclorometano, (3) fração acetato de etila, (4) fração *n*- butanol e (5) fração aquosa..... 32
- Figura 3.** Perfil cromatográfico da fração *n*But. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn)..... 33
- Figura 4.** Perfil cromatográfico da sub fração *C1*. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn)..... 34
- Figura 5.** Perfil cromatográfico da sub fração *C2*. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn)..... 34
- Figura 6.** Perfil cromatográfico da sub fração *C3*. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn)..... 34
- Figura 7.** Perfil cromatográfico da sub fração *C4*. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn)..... 35
- Figura 8.** Perfil cromatográfico da sub fração *C2*. Condições da cromatográficas de 1 gradiente exploratório foram: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn). As condições cromatográficas de 2 método isocrático, de (0-30 min) 25% de (B), V..... 35
- Figura 9.** Cromatograma da fração *n*But (azul) sobreposta ao padrão (vermelho) APO. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min)

5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (430mn)	37
Figura 10. Perfil da fração <i>n</i> But. Onde em (A) TIC – Total de ions do cromatograma $[H]^-$ (modo negativo). (B) TIC – Total de ions do cromatograma $[H]^+$ (modo positivo) e (C) UV (254 nm).....	38
Figura 11. Cromatograma de Pico Base da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>A. simplex</i>	39
Figura 12. Espectro de RMN de 1H da fração n-but (CD ₃ OD/D ₂ O 1:1 v/v, 600 MHz).....	41
Figura 13. Perfis cromatográficos obtidos por UHPLC (em 350 nm) das diferentes frações de solo na área de ocorrência de <i>A. simplex</i> (a) fração <i>n</i> -butanol, (b) diclorometano e (c) acetato de etila.....	42
Figura 14. Ácido <i>p</i> -benzóico no espectro de RMN de 1H do extrato do solo, sinais δ 6,64 <i>d</i> (8,3 Hz) e 6,95 <i>d</i> (8,3 Hz).....	42

Lista de abreviações

3,4 DHB -3,4-di-hidroxibenzóico
APO- 2-aminophenoxazine-ona
AAPO- Acetemidophenoazin-3-one
ActOEt- Acetato de etila
APO- 2-aminophenoxazine-ona
ATP- Adenosina trifosfato
BOA- 2-benzoxazolinone
BPC- Cromatograma de pico base
C1-C10- Concentração 1 até 10
d- Duplo
DAD- Detector de díodos da matriz
DCM- Diclorometano
DIBOA- 4-hidroxi- (2H) -1,4-benzoxazina-3 (4H)-ona
DIMBOA- 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2 H)-1,4-benzoxazin-3(4 H)-one
DNA- Ácido desoxirribonucleico
EA- Extrato aquoso
EHA- Extrato Hidroalcoólico
EIC- Íon extraído do cromatograma
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ESI- Ionização por eletrospray
FMA- Fungos micorrízicos arbusculares
Hex- Hexano
HPLC- Cromatógrafo líquido de alta eficiência
IG- Inibição da germinação
IRS- Solução de Remoção de Inibidor
IVG- Índice de velocidade de germinação
LC- Cromatografia líquida.
MBOA- 7-methoxy-2 Benzoxazolinone
MS- Massa
[M-H]⁻-Massa (-) hidrogênio.
[M-H]⁺-Massa (+) hidrogênio.

n-But- *n*- butanólica

No.- Número de picos

P.A- Parte aérea

P.S- Parte subterrânea

PEFI- Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

RMN- Ressonância magnética nuclear

R²- r-quadrado.

Sh- Shoulder (ombro)

TIC- Total de íons do cromatograma

TR- Tempo de retenção

UHPLC- Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência

UV- Ultravioleta

Vm- Volume morto

Resumo: Bambus são gramíneas heliófilas ou de luz seletiva que podem tornam-se espécies dominantes devido à sua alta eficiência competitiva, plasticidade em traços funcionais inibição da regeneração de espécies do subosque. Contudo, somente a competição por recursos não explica o sucesso dos bambus, outras estratégias de interação planta-planta podem ser utilizadas. Estudos sugerem que compostos químicos (aleloquímicos) liberados por algumas espécies de bambu interferem na germinação de sementes e no crescimento de plântulas. A alelopatia é apontada como um dos mecanismos biológicos que desempenha importante papel na estrutura e na dinâmica da vegetação. Alguns trabalhos têm proposto que a produção de aleloquímicos pode estar relacionada a associações simbióticas das plantas com fungos endofíticos. A liberação de alguns compostos fenólicos no solo pode afetar a abundância de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo de determinar a potencial influência da alelopatia na dominância de *Apoclada simplex* em área de floresta Atlântica, através de análises da fitotoxicidade de extratos e frações, sobre a germinação e crescimento de espécies agrícolas *Solanum lycopersicum* (tomate), *Oryza sativa* (arroz) e sementes de espécies nativas de mata Atlântica: *Mimosa bimucronata* e *Erytrina verna*. Associado a isso, avaliou-se as propriedades químicas do solo e a presença de fungos nas áreas de ocorrência e não ocorrência de *A. simplex*. Os resultados obtidos mostraram atividade fitotóxica do extrato aquoso de folhas e de suas frações diclorometano (DCM), acetato de etila (ActOEt) e *n*- butanólica (*n*-But) na germinação e no crescimento. A presença dos ácidos caféico, p-hidroxibenzólico, dihidroxibenzólico, metoxi-benzólico e de luteolina-6-C-glicosil-8-C-arabinosídeo, além de compostos nitrogenados como: 2-benzoxazolinone (BOA), 7-methoxi-2-Benzoxazolinone (MBOA), 2,4-dihydroxi-7-methoxi-(2 H)-1,4-benzoxazin-3(4 H)-one (DIMBOA), 2-acetemidophenoxazin-3-one (AAPO), foram sugeridas por análises via HPLC-DAD, UHPLC-DAD, LC-DAD-ESI-MS e RMN. O ácido p-benzólico foi o único composto detectado no solo. Foram identificadas, por sequenciamento de DNA, oito espécies de *Glomus*, duas espécies de *Aculus*, dois espécimes pertencentes à família Archaeosporales colonizando raízes de *A. simplex*, além de esporos na rizosfera o que caracterizam a espécie como micotrófica. Entretanto, a relação entre a presença de FMA e *A. simplex* ainda não pôde ser caracterizada e deve ser investigada. A presença de compostos já caracterizados como aleloquímicos sugere que a alelopatia pode um dos mecanismos que explica a dominância da espécie nas áreas de floresta. Entretanto,

somente a identificação destes compostos no solo pode confirmar a hipótese de interação alelopática.

Palavras chave: Fitotoxicidade; Aleloquímicos; FMA; HPLC; LC-DAD-ESI-MS.

Abstract: Bamboos have a large ecological amplitude in response to canopy disturbances, and they may become dominant species due to their abundance as well as their potential effect over the composition rate of forest regeneration. The success of bamboos cannot be explained solely by competition for resources, which suggests other strategies of plant-plant interaction. Recent studies have suggested that chemical compounds (allelochemicals) released by some bamboos affect directly seed germination and seedling growth. Allelopathy is one of the biological mechanisms which plays an important role in the dynamics and structure of vegetation. Although inconsistent, hard evidence shows that chemical induction by endophytic fungi can affect the allelopathic potential of the plants. The release of phenolic compounds in the soil may affect mycorrhizal fungi abundance. The present study was aimed to determine the potential influence of *Apoclada simplex* in allelopathy dominance within the Atlantic forest area. Phytotoxicity effects over germination and growth of crop species such as *Solanum lycopersicum* (tomato), *Oryza sativa* (rice) as well as native seeds from Atlantic forest, namely *Mimosa bimucronata* and *Erytrina verna* were based upon analyses of extracts and fractions. Furthermore, chemical properties of the soil were assessed as well as the occurrence or non-occurrence of fungi in *A. simplex*. Our findings showed phytotoxic activity in the leaf aqueous extract and also dichloromethane (DCM) fractions, ethyl acetate (ActOEt) and *n*-butanol (*n*-But) on germination and growth. Analyses suggest the presence of caffeic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, dihydroxybenzoic acid, methoxy benzoic acid, luteolin-6-C-8-C-glucosyl-arabinoside, and nitrogenous compounds such as 2-benzoxazolinone (BOA), 7-methoxy-2 Benzoxazolinone (MBOA), 2,4-dihydroxy-7-methoxy- (2H) -1,4-benzoxazin-3 (4H) -one (DIMBOA); Acetemidophenoxyazin-2-3-one (AAPO) in its composition via HPLC-DAD UHPLC-DAD, DAD-LC-ESI-MS and NMR. The *p*-benzoic acid was the only one detected in the soil. We have identified through DNA sequencing: eight *Glomus* species, two *Aculus* species and two specimens of Archaeosporales family colonizing *A. simplex* roots, besides rhizosphere spores which characterize the species as trophic fungus. However, in order to characterize the interaction between AMF and *A. simplex*, further investigation is required. The presence of compounds already characterized as allelochemicals suggests that allelopathy can be one of the mechanisms which explain the species dominance in the forest. However, only the identification of such compounds in the soil can corroborate the allelopathic

interaction hypothesis. Keywords: Phytotoxicity, allelochemicals, AMF, HPLC, LC-DAD-ESI-MS.

INTRODUÇÃO

1.1. Alelopacia: Histórico e conceitos

As interações alelopáticas têm sido amplamente observadas, descritas e estudadas ao longo das décadas. De acordo com Reigosa *et al.* (2006), o primeiro relato histórico de alelopacia ocorreu entre os anos de 372-285 antes da Era Cristã, quando Teophrastus descreveu redução no crescimento e desenvolvimento de plantas de nos campos ocupados por *Amaranthus*. Posteriormente, De Candolle (1832) *apud* Reigosa *et al.* (2006) sugeriu que problemas descritos como "doenças no solo" poderiam ser, na realidade decorrentes da exudação de compostos pelas plantas. Somente em 1937, o termo alelopacia - *allelopathy* – derivado da combinação de duas palavras gregas “*Allelo*” e “*Pathy*” (prejuízo mútuo) – foi usado do ponto de vista fisiológico por Hans Molisch, para descrever o efeito do etileno na maturação dos frutos (Reigosa *et al.* 2006).

Alelopacia foi definida por Rice (1974) como o efeito inibitório ou estimulatório sobre o crescimento e distribuição de uma planta sobre sua vizinhança, incluindo microorganismos através da liberação de compostos químicos. Dentro deste contexto, Whittaker & Fenny (1971) em seu trabalho “*Aleloquímicos: Interação química entre as espécies*” estabelecem os aleloquímicos como agentes que desempenham grande importância no processo de adaptação das espécies e na organização das comunidades.

Na mesma linha conceitual, a Sociedade Internacional de Alelopacia (1996) caracteriza alelopacia como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos ecossistemas agrícolas ou biológicos. Tais definições, entretanto, têm sido criticadas por serem muito abrangentes e em função disso não terem um significado definido (Watkinson 1998).

Mais recentemente, alelopacia é definida de forma mais restrita como a fitotoxicidade de um composto ou grupo de compostos liberados pela planta ou por partes dela (Inderjit & Weiner 2001; Inderjit & Nilsen 2003; Inderjit *et al.* 2005; Inderjit *et al.* 2011) ou simplesmente como inibição química de uma planta sobre outra (Schenk & Seabloom 2010) ou ainda inibição do estabelecimento e ou crescimento de plantas vizinhas por plantas que produzem aleloquímicos (Inderjit *et al.* 2011).

Entretanto, cabe ainda, distinguir alelopatia de efeito fitotóxico (Ens *et al.* 2009). Segundo Macias *et al.* (2003), é possível distinguir fitotoxicidade de alelopatia (fenômeno que ocorre naturalmente no ambiente), mediante a realização de estudos em laboratório da atividade de compostos fitotóxicos. Segundo os autores, fitotoxicidade se refere às interações alelopáticas estudadas sob condições controladas de laboratório, utilizando extratos de plantas, compostos fitoquímicos isoladas de tecidos vegetais, que podem ser coletados a partir de exsudato ou mesmo sintéticos idênticos aos naturais. Para caracterizar da atividade alelopática são necessárias análises da química do solo. (Inderjit & Weiner 2001).

A interação alelopática tem sido também comumente associada à competição. Begon *et al.* (2007) caracterizam alelopatia como um tipo de interação competitiva. Entretanto, segundo Harper (1977) e Taiz & Zanger (2002), competição é a "concorrência exploradora", que ocorre entre dois organismos da mesma espécie ou de espécies diferentes, sempre que um recurso valioso tal como espaço, alimento ou nutrientes e luz, é compartilhado por eles em quantidade limitada. Segundo Rice (1967), a capacidade das plantas para produzir um composto fitotóxico, pode ter evoluído em alguns casos, como um meio para suprimir ou matar seus vizinhos e, assim, eliminar a competição por recursos limitados. Portanto, o efeito alelopático dependeria da liberação pela planta de um composto químico no ambiente, enquanto a competição envolveria remoção ou redução de um fator ambiental, tal como água, minerais, luz, etc. (Rice 1974).

Finalmente, alguns pesquisadores sugerem que alelopatia é parte de uma ampla rede de comunicação entre plantas e entre outros organismos (An *et al.* 2000). Contudo, torna-se imprescindível a distinção entre o conceito de comunicação entre plantas e inibição química, embora compostos químicos possam atuar como sinalizadores e toxinas (Schenk & Seabloom 2010). O termo *alelobiose* tem sido introduzido para descrever a comunicação entre plantas através da liberação de compostos químicos, principalmente os voláteis (Schenk & Seabloom 2010). Segundo os autores anteriormente citados, a alelobiose poderia ser descrita como uma forma de interação mutualista, desconfigurando-a totalmente do conceito de alelopatia.

1.2. Aleloquímicos: caracterização e mecanismo de ação

Os aleloquímicos são compostos do metabolismo secundários produzidos por plantas durante os processos de interação com o ambiente (Indejit *et al.* 2005). Tais compostos possuem diversas funções como, por exemplo, defesa contra patógenos e resposta a herbívora; a função destes compostos são essenciais no mecanismo de atração de polinizadores e de micoorganismos simbiontes, além do próprio mecanismo de alelopatia (Coley *et al.* 1985; Siemens *et al.* 2002; Agrawal 2004). Os aleloquímicos são liberados para o ambiente através dos processos de lixiviação das folhas, exudação das raízes, decomposição de resíduos, volatilização e (Inderjit & Callaway 2003; Weir *et al.* 2004). De maneira geral, aleloquímicos são fortes inibidores do processo de germinação (Escudero *et al.* 2000; Bais *et al.* 2003; Singh *et al.* 2006), do crescimento inicial da raízes (Lara-Nuñez *et al.* 2006) e do estabelecimento das plântulas (Bais *et al.* 2003).

Um grande número de compostos possivelmente alelopáticos tem sido identificados em estudos realizados durante as últimas décadas (Whittaker & Feeny 1971; Rice 1984 Blum *et al.* 1985a; Inderjit & Ducke 2003; Blum & Gerig 2005, 2006; Weston & Mathesius 2013). Segundo Rice (1984), os aleloquímicos podem ser categorizados em quatorze grupos químicos e mais um grupo chamado de miscelânea (Tabela 1)..

Tabela 1. Divisão dos aleloquímicos proposta por Rice 1984

-
- 1º Ácidos orgânicos simples solúveis em águas, álcoois de cadeia linear, aldeídos alifáticos e cetonas;
 - 2º Lactonas insaturados simples;
 - 3º Ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos;
 - 4º Naftoquinonas, antraquinonas, quinonas e complexos;
 - 5º Fenóis simples, ácido benzóico, e seus derivados.
 - 6º Derivados do ácido cinâmico;
 - 7º Cumarinas;
 - 8º Flavonóides;
 - 9º Taninos hidrolisáveis e condensados;
 - 10º Terpenóides e esteróides;
 - 11º Ácidos aminados, e polipeptídos;
 - 12º Alcalóides e cianidrinas;
 - 13º Sulfetos e glicosídeos de óleo de mostarda;
 - 14º Purinas e nucleotídeos;
 - 15º Grupo é formado por um grupo variado de compostos.
-

Os compostos identificados têm uma ampla gama de pesos moleculares e estruturas (por exemplo, compostos de cadeia linear; compostos aromáticos com cadeias laterais; compostos constituídos por unidades de isopreno ou iso-pentano ligadas entre si de vários modos; compostos com grupos amino; compostos de compostos anéis heterocíclicos, etc) podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos, voláteis (muitos deles também são hidrofóbicos) ou não volátil, positivamente e / ou negativamente carregados, neutros, ácidos ou básicos (Blum 2014). Portanto, termo aleloquímico se aplica ao papel desempenhado pelo composto e não a identidade química do mesmo (Inderjit & Duke 2003).

Qualquer composto orgânico ou inorgânico pode, teoricamente, estimular, ser neutro ou inibir; o desenvolvimento e crescimento de uma planta, estas variações se dão em função da sua concentração e estado físico do composto, sendo que, o tipo e o padrão de efeito observado podem variar de acordo com sensibilidade da planta (Blum 2011). As ações de compostos orgânicos e inorgânicos nas fases do desenvolvimento

vegetal podem atuar de forma individual ou dentro de uma mistura de compostos sendo (sinérgicas, aditivas, ou antagonistas), ou até mesmo modificando a ação (Blum 2011). Contudo, na maioria dos casos, a atividade está associada à mistura de vários compostos, ao invés de compostos individuais (Chaves *et al.* 2001; Einhelling *et al.* 2004; Inderjit *et al.* 2005). As influências positivas ou negativas de uma planta sobre outra pode ser devido à ações diretas de compostos alelopáticos (impacto sobre as membranas celulares ou processos celulares) ou ações indiretas (impacto sobre as relações simbióticas) (Blum 2014).

Uma vez libertados dos tecidos vegetais, os compostos orgânicos podem ser oxidados ou reduzidos através de processos químicos da fauna microbiana, ou podem produzir vários tipos de produtos de degradação (Macias *et al.* 2007). Um número desses produtos de degradação foi também identificado como compostos potencialmente alelopáticos (Macias *et al.* 2007). Além disso, os microrganismos podem utilizar compostos orgânicos liberados a partir de plantas para sintetizar compostos novos e únicos que também pode funcionar como compostos alelopáticos (Duke 1986; Strobel *et al.* 1987; Barazani & Friedman 1999; Demain & Fang 2000).

Por exemplo, um dos compostos mais fitotóxicos, APO (2-aminophenoxazine-ona), é gerado a partir do DIBOA, aleloquímico encontrado em gramíneas (4-hidroxi-(2H) -1,4-benzoxazina-3 (4H)-ona) por alteração microbianas que ocorrem no solo (Macias *et al.* 2005). Em função da amplitude de classes de compostos identificados como aleloquímicos existem inúmeros de mecanismos de ação fisiológicos associados a alelopatia. Dentre tais mecanismos, pode-se citar a inibição dos componentes do fotossistema II pelo composto “Sorgoleone” (Czarnota *et al.* 2001) A Catequina pode provocar inibição da respiração mitocondrial, e, por consequência, diminuir a síntese de ATP (Weir *et al.* 2004). Agliconas de flavonoides podem agir inibindo o transporte de auxina, levando a um desequilíbrio nos níveis normais de auxina reduzindo a indução de raízes laterais (Weir *et al.* 2004). Em baixas concentrações, um derivado de ácido benzóico que ocorre naturalmente-3,4-di-hidroxibenzóico (3,4-DHB) imita auxinas, estimulando a formação do calo, enquanto as concentrações mais elevadas desta molécula inibiu o crescimento da raiz. Se 3,4 DHB pode atuar como um análogo de auxina, logo pode também ser capaz de estimular a síntese de etileno, promovendo o crescimento (Weir *et al.* 2004),

Outros compostos ainda estão envolvidos na supressão, alteração da divisão celular e da permeabilidade da membrana celular, na captação de nutrientes e na

condutância estomática (Inderjit & Duke 2003; Peguero *et al.* 2012). A interferência negativa de um aleloquímico no crescimento de uma planta é considerada um tipo de estresse biótico denominado “estresse aleloquímico” (Cruz-Ortega *et al.* 2002). Nesta situação o mecanismo de ação dos aleloquímicos causa danos oxidativos, ou seja, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio - EROs (Lara-Nuñez *et al.* 2006; Ding *et al.* 2007). Estudos têm demonstrado que espécies diferentes podem responder de forma distinta à presença de aleloquímicos sugerindo que a susceptibilidade é espécie-específica (Bogatek *et al.* 2006; Ding *et al.* 2007). Diferenças na susceptibilidade aos aleloquímicos podem ser decorrência de processos co-evolutivos entre espécies que aumentariam a capacidade individual de tolerar outras existentes na mesma localidade (Schulz & Wieland 1999). Esta tolerância pode ser um importante fator no estabelecimento de comunidades de plantas (Callaway & Maron 2006, Thorpe *et al.* 2009).

Após a sua libertação, os aleloquímicos são expostos a fatores físicos (sorção), químicos (oxidação direta ou oxidação por íons metálicos) e biológicos (degradação microbiana) do solo (Huang *et al.* 1999; Inderjit 2001; Inderjit & Bhowmik 2004; Kaur *et al.* 2005). A avaliação das interações simbióticas na alelopatia pode ser também mediada e alterada pelas propriedades físicoquímicas do solo e pela comunidade microbiana que pode diretamente influenciar o crescimento da planta ou indiretamente alterar as associações microbianas (Mieners *et al.* 2012).

1.3. Influência das interações entre fungos no processo alelopático

Fungos endofíticos são descritos como microorganismos que vivem assintomaticamente dentro de tecidos de plantas. Fungos endofíticos podem melhorar a ‘performance’ da planta mediante a alteração da comunidade microbiana do solo (Rudgers & Or 2009), além de aumentar a tolerância das plantas a vários fatores bióticos e abióticos de estresse (Miners *et al.* 2012). A associação entre a presença de fungos micorrízicos e a melhora na competitividade de plantas invasoras tem sido objeto de estudo de alguns estudos (Aschehoug *et al.* 2012; Aschehoug *et al.* 2014). Embora ainda de forma inconsistente e limitada, existem evidências por meio de estudos de laboratório de que a indução química por fungos endofíticos pode afetar o potencial alelopático das plantas (Vázquez-de-Aldana *et al.* 2011; Aschehoug *et al.* 2014). Segundo (Mieners *et al.* 2012), fenólicos e flavonoides exsudados de raízes de plantas afetam a abundância de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Neste sentido, a avaliação da presença e da concentração natural de compostos químicos no solo e da avaliação da comunidade microbiana podem fornecer evidências dos efeitos diretos da liberação e captação de aleloquímicos da planta para a rizosfera (Inderjit & Callaway 2003; Weidenhamer 2005). Segundo Inderjit *et al.* (2005), a fitotoxicidade é em grande parte uma função da concentração de aleloquímicos biodisponíveis restantes no ambiente do solo, mas é particularmente difícil determinar com precisão as frações biodisponíveis e não biodisponíveis de aleloquímicos e outros xenobióticos no ambiente do solo. As plantas podem desenvolver sistemas de raízes que possuem enorme extensão e grande área de superfície, e esta é aumentada no caso de raízes micorrízicas. Entender a dinâmica dos aleloquímicos na rizosfera é crucial para a compreensão dos mecanismos alelopático e avaliar a importância dos processos alelopático em comunidades de plantas (Inderjit *et al.* 2005).

1.4. Caracterização do grupo, invasão e dominância dos bambus na floresta Atlântica: Evidências de interações mediadas por aleloquímicos.

A família Poaceae, na qual se inserem os cereais, capins e bambus, é uma das famílias de angiospermas mais amplamente distribuídas em todo o mundo cuja importância econômica é incontestável (Schmidt & Longhi-Wagner 2009). Cerca de 40% da cobertura vegetal no mundo é composta principalmente por gramíneas (Gibson *et al.* 2009), a quarta maior família em número de espécies no mundo, totalizando cerca de 793 gêneros e 10.000 espécies (Watson & Dallwitz 1992). No Brasil, registra-se a ocorrência de 204 gêneros e 1400 espécies (Figueiras & Santos-Gonçalves 2004).

Além das formações campestres, as gramíneas são importantes na composição florística das florestas tropicais e subtropicais, representadas, principalmente, por Bambusoideae (Calderón & Soderstrom 1980). A subfamília Bambusoideae é constituída por aproximadamente 60 a 70 gêneros e 1.200 espécies com ampla distribuição latitudinal, 46° N e 47° S, e altitudinal, desde o nível do mar até cerca de 4.000m de altitude (Soderstrom & Calderón 1974; Soderstrom *et al.* 1988; GPWG 2001).

A atual circunscrição da subfamília Bambusoideae engloba apenas duas tribos, Bambuseae, formada pelos bambus lenhosos e Olyreae, representada pelos bambus herbáceos (Zhang & Clark 2000).

Somente no Brasil, ocorrem cerca de 34 gêneros e 232 espécies nativas,

representando 16,6% de todas as espécies de bambus do mundo (Figueiras & Santos 2004). Desse total, nove gêneros e 159 espécies são endêmicos (Figueiras *et al.* 2011). A subfamília Bambusoideae é caracterizada pelas seguintes sinapomorfias: plantas perenes (raro anuais), hábito rizomatoso, ramificação simples ou complexa, folhas pseudopecioladas, mesófilo com células invaginantes fortemente assimétricas, associadas a células fusóides e células buliformes, tricomas bicelulares (micropelos) alongados, com paredes delgadas (Judziewicz *et al.* 1999), folhas embrionárias com margens que se sobrepõem, plântula sem a primeira folha (APWEB 2008).

Bambus são plantas que apresentam uma grande amplitude ecológica em resposta às perturbações do dossel e podem se tornar espécies dominantes no sub-bosque devido à sua abundância e efeito potencial sobre a taxa e a composição da regeneração florestal em clareiras (González *et al.* 2002). A capacidade de crescimento agressivo (Griscom & Ashton 2003; 2006) e plasticidade em traços funcionais, tais como capacidade fotossintética, podem explicar seu sucesso em áreas perturbadas, e acabam por conferir uma vantagem competitiva sobre as árvores da floresta (Montti *et al.* 2013; Grombone-Guaratini *et al.* 2013). No entanto, a competição por recursos pode não apenas explicar o sucesso de bambu, sugerindo o envolvimento de outras estratégias que envolvem as interações planta-planta (Hierreno & Callaway 2003). Além disso, alguns estudos têm mostrado que os metabólitos secundários, como flavonóides e ácidos orgânicos, são liberados pelos bambus e atuam inibindo a germinação das sementes e o crescimento das árvores (Chou & Hou 1981; Tsai & Young 1993; Grombone-Guaratini *et al.* 2009; Chou 2010). Independente do grau de dominância e da ocorrência de distúrbios, áreas de ocorrência natural destas espécies de bambus apresentam estrutura bastante peculiar, com um número reduzido de espécies arbóreas e um estrato subarbustivo e herbáceo praticamente inexistente. A capacidade de invasão, dominância e exclusão de espécies do sub-bosque por bambus têm sido frequentemente descrita para espécies asiáticas (Narukawa & Yamamoto 2002; Nomiya *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2004). Alguns estudos comprovam que muitas destas espécies apresentam atividade alelopática (Chou & Hou 1981; Tsai & Young 1993; Chou 2010) e o uso de folhas e serapilheira de bambus tem sido proposto como recursos bioagroquímico a serem utilizados como alternativa em áreas de agricultura orgânica (Chou 2010).

A importância dos aleloquímicos produzidos por espécies de bambus nativos na dominância e na supressão do crescimento de espécies arbóreas em uma área de Mata Atlântica, foi recentemente estudada por (Grombone-Guaratini *et al.* 2009; Torres *et al.*

2014), dados não publicados. Segundo estes estudos a grande quantidade de ácidos fenólicos e flavonoides identificados na fração ativa (ácidos benzico, benzoicoacético, salicílico, *p*-hydroxybenzoóico, *p*-hydroxyphenylacético, isovanílico, *m*-anísico, *p*-coumárico, protocatélico, siríngico, gálico, ferúlico, *m*-coumárico, vanilmandélico, 4-methylmandélico e 3,4-methylenedioxy mandélico) parece exercer um significativo efeito inibitório específico. Atividade alelopática forte ou moderada pode ser um dos mecanismos que explica a dominância e invasão dessas espécies de bambu na mata Atlântica (Grombone-Guaratini *et al.* 2011).

O conhecimento da ação alelopática de espécies nativas ainda é incipiente no Brasil, considerando-se a extensão territorial e a diversidade florística (May *et al.* 2011). Mais recentemente, a liberação de aleloquímicos para o ambiente, tem sido avaliada como um mecanismo chave para a caracterização das interações interespecíficas na estruturação da comunidade, na dinâmica da vegetação nativa e nos sistemas agrícolas (Inderjit & Ducke 2003; Shao-Linet *et al.* 2004). Nesse sentido, estudos que avaliam a influência dos aleloquímicos produzidos por plantas invasoras de ecossistemas naturais levaram a proposição da hipótese de *novel weapons* (novas armas) (Callaway & Richenour 2004). Segundo esta hipótese, espécies invasoras adicionariam novos compostos químicos ao ambiente exercendo um forte efeito fitotóxico contra as espécies nativas e conduziriam à homogeneização dos ecossistemas.

Nesse sentido, recentemente, Lôbo *et al.* (2011) propuseram que, algumas espécies nativas ecologicamente plásticas poderiam proliferar em áreas fragmentadas, tornando-se superabundantes e ameaçando a biodiversidade após distúrbios de origem natural ou antrópica e aumento da disponibilidade de luz. Neste projeto, foi explorado o papel da alelopatia como mecanismo chave que impede o estabelecimento de espécies arbóreas em áreas de ocorrência de bambu. O objetivo deste estudo é determinar a potencial influência da alelopatia na dominância de *Apoclada simplex* em área de floresta Atlântica. A hipótese do trabalho é que os aleloquímicos produzidos pela planta e liberados para o ambiente reduzam a germinação, crescimento e sobrevivência de espécies nativas. Associado a isso, foram avaliadas as propriedades químicas do solo e a presença de fungos nas áreas de ocorrência e não ocorrência de *A. simplex*.

O projeto foi direcionado para responder as seguintes questões: i) qual parte da planta (rizoma, colmo ou folha) apresenta atividade alelopática? ii) quais são os compostos ou metabólitos, denominados de aleloquímicos, presentes nos extratos e frações que possam justificar os efeitos alelopáticos? iii) os aleloquímicos afetam de

forma semelhante espécies distintas? iv) estes compostos estão presentes no solo? V) as propriedades químicas do solo são as mesmas em áreas de ocorrência e não ocorrência de bambu? Para estudar os efeitos diretos dos aleloquímicos produzidos pelo bambu foram avaliados o efeito de extratos e frações na inibição da germinação de sementes (nativas e cultivadas) e no crescimento de plântulas agrícolas. Paralelamente, foram analisados e identificados os possíveis compostos (aleloquímicos) da planta e do solo.

2. OBJETIVOS

- a) Identificar o(s) extrato(s) e a(s) fração(ões) com maior potencial fitotóxico para sementes agrícolas e nativas.
- b) Caracterizar as frações ativas (HPLC-DAD; LC-DAD-MS).
- c) Identificar a presença de aleloquímicos no solo;
- d) Comparar a fertilidade do solo em áreas sob dominância e não ocorrência de *Apoclada simplex*;
- e) Identificar e caracterizar a comunidade de fungos micorrízicos arbusculares nas raízes de *Apoclada simplex*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2. Material vegetal

Apoclada simplex é um bambu lenhoso caracterizado como fortemente ou medianamente cespitoso, perene, com rizomas paquimorfo e ereto colmos (3-13 m de altura; 19-40 cm de diâmetro) (Guala 1995). O período entre a floração é de cerca de 20 anos. A espécie é luz higrófila e heliófita. Caracteriza-se por apresentar distribuição descontínua e irregular. É a única espécie do gênero no Estado de São Paulo. Embora a espécie esteja localizada dentro de uma reserva estadual, é considerada ameaçada de acordo com a lista oficial de extinção espécie vegetal ([http://www.ambiente.sp.gov.br / wp-content / uploads / Resolução / 2004 / 2004_Res_SMA48.pdf](http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/Resolução/2004/2004_Res_SMA48.pdf)) .*Apoclada simplex* é uma espécie com alto potencial ornamental e de grande importância na construção e artesanato no Brasil.

A coleta de folhas e colmos jovens (entrenós cheios e preenchidos) e colmos adultos (entrenós ocos) de *Apoclada simplex* foi realizada em maio de 2013 no Parque Estadual do Rio Turvo uma área contínua de floresta Atlântica (73.893,87 hectares), localizado em São Paulo, sudeste do Brasil (24 ° 53'18,567 "S, 48 ° 21'14,295" e W, 10-1100 msnm). A Mata Atlântica é um hotspot de biodiversidade (Myers et al., 2000). O clima da região é do tipo Cfb de Köppen (1948) (temperado húmido, sem estação seca). As temperaturas médias mínimas e máxima anuais são 27°C (fevereiro) e 15.7°C (julho). A precipitação média é de 3000 milímetros de setembro a maio, e 1000 mm de precipitação de julho a agosto. O tipo de vegetação predominante na área do parque é a floresta ombrófila densa e mista. Uma exsicata foi depositada no Herbário Maria Eneida Kauffman Fidalgo do Instituto de Botânica de São Paulo.

Sementes de tomate *Solanum lycopersicum* super mormande foram adquiridas no mercado. Sementes de arroz *Oryza sativa* lote alvorada safra 2013 foram obtidas na EMBRAPA. Sementes de *Mimosa bimucronata* e *Erythrina verna*, espécies da Mata Atlântica e que poderiam coexistir com *A. simplex* foram coletadas no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), entre os paralelos 23°38'08"S e 23°40'18"S e os meridianos 46°36'48"W e 46°38'00"W.

O delineamento experimental do trabalho seguiu o esquema abaixo:

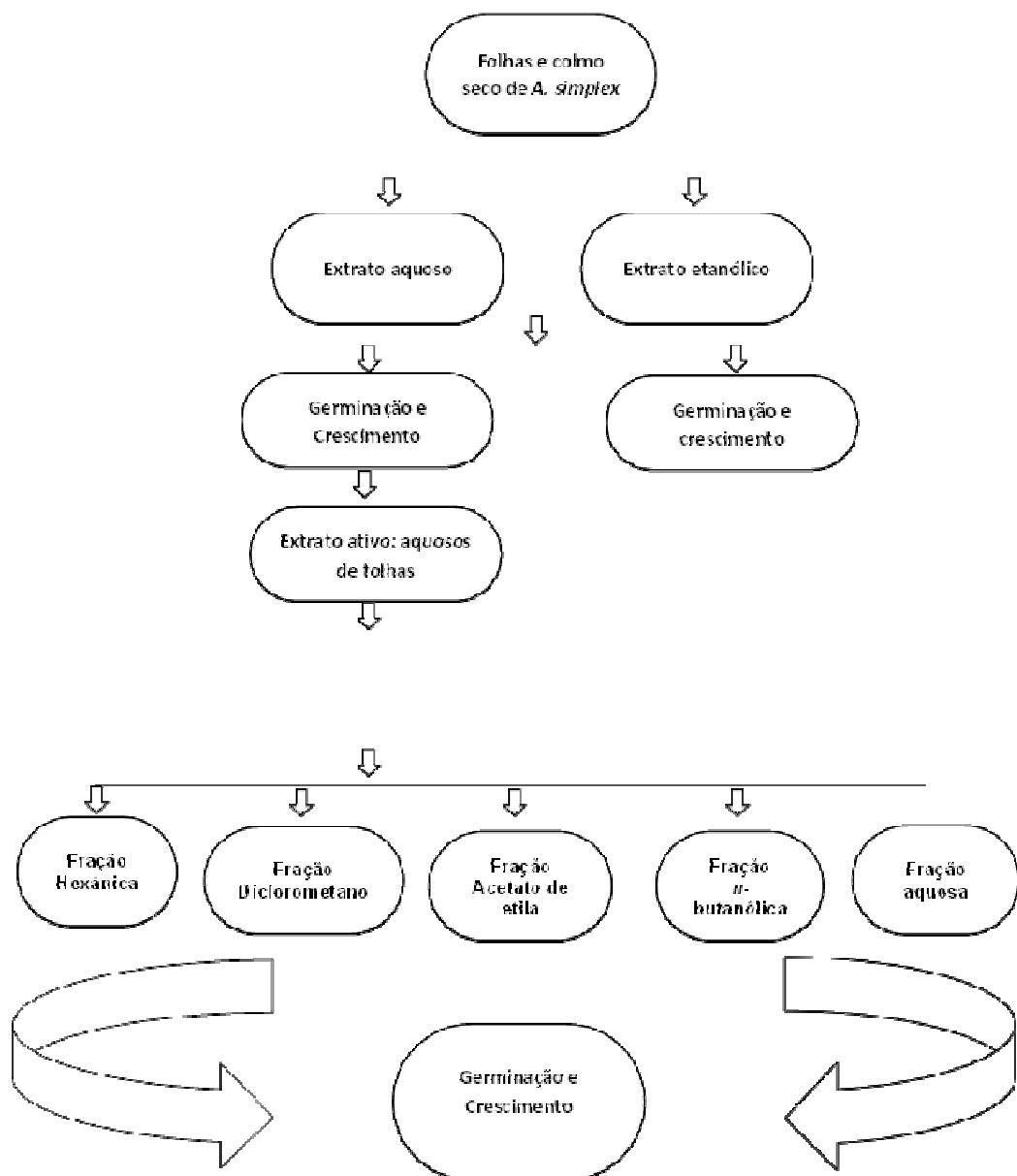


Figura 1. Esquema do delineamento experimental: tomada de decisões referentes aos ensaios biomonitorados e partição do extrato e frações de *Apocleada simplex*.

3.3. Extração e fracionamento

O material fresco previamente separado em colmos jovens, adultos e folhas foi seco em casa de vegetação em temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) ambiente. A parte subterrânea não foi utilizada porque estudos prévios mostraram que a composição química não difere

(dados não mostrados). Posteriormente, o material foi pulverizado em moinho de facas (Tecnal).

3.4.1 Extrato etanólico

O material pulverizado (25g de colmos e 15 g de folhas por célula) foi submetido à extração com etanol em sistema automático ASE 300 (Dionex). A extração foi realizada com etanol 60-70% com tempo estático por ciclo de 5 min, temperatura de 60°C e pressão 1500 psi. Os extratos hidroalcoólicos (EHA) foram concentrados em evaporador rotativo (Büchi R-114), liofilizados (Modulyo D-115, Edwards) e armazenados em freezer (-23°C) até seu uso para experimento.

3.4.1 Extrato aquoso

O extrato aquoso (EA) foi obtido por maceração (15 g do pó para 300 mL de H₂O) em banho-maria (Banco Ética), a uma temperatura de 60 °C por 3 horas. O extrato foi filtrado em papel (Whatman 205 µm), seu concentrado em evaporador rotativo, liofilizado e armazenado em freezer (-23°C) até uso para experimento. O rendimento da extração foi realizado através de cálculo do peso seco (tabela 2). Aliquotas (1 ml; N=5) foram colocadas em vials Eppendorf e secas até peso constante em estufa (Blue M Mod 490A-1) O resultado foi expresso em porcentagem mg/ml e (%).

Tabela 2. Dados dos rendimentos dos extratos em mg/ml e (%) obtidos por extração aquosa e etanólica de *Apoclada simplex*

Extratos	mg/ml (%)
Aquoso de folhas	2,0 (3,08)
Etanólico de folhas	1,74 (1,16)
Aquoso de colmo jovem	2,42 (1,61)
Etanólico de colmo jovem	9,8 (3,92)
Aquoso de colmo adulto	2,98 (1,98)
Etanólico de colmo adulto	9,26 (3,92)

Tabela 3. Concentração em mg/ml e pH do extrato de folha aquoso de *Apoclada simplex*.

Extrato aquoso de folha	(mg/ml)	pH
Controle (Água destilada)		5,82
Dose 1		6,22
Dose 2		6,22
Dose 3		6,27
Dose 4		6,29
Dose 5		6,29

3.4.3. Fracionamento dos extratos ativos

Os extratos brutos ativos foram solubilizados em água (100ml/1g) e posteriormente fracionados por partição líquido-líquido, com solventes de diferentes polaridades e em ordem crescente de polaridade, hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*-But), na proporção de (1:1). Este procedimento foi repetido cinco vezes. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório (Büch) e liofilizadas (Edwards), pesadas e armazenadas em freezer até realização dos estudos químicos e de atividade biológica (germinação e crescimento).

Tabela 4. Dados dos rendimentos dos extratos em mg/ml e (%) obtidos por partição líquido-líquido do extrato aquoso de *Apoclada simplex*

Extrato	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	<i>n</i> -butanol
Aquoso de folhas	0,27 (5,93)	0,55 (12,11)	1,15 (24,99)	1,19 (25,82)

3.5. Bioensaios de germinação e de crescimento com extratos e frações

3.5.1. Condições experimentais dos bioensaios

A germinação e crescimento das sementes ocorreram em placas Gerbox (11cm x 11cm x 3cm) contendo duplo papel filtro (Whatman no. 42). As placas foram mantidas

em sala climatizada (80% de umidade; 25±1 °C e luz constante). Os bioensaios foram conduzidos com volume de 8 ml de extrato ou fração para cada placa.

Como controle negativo foi utilizado água destilada para os extratos e solução de água destilada + 1% de Tween-80 para as frações.

A concentração osmótica dos extratos e frações foi determinada utilizando um osmômetro de pressão de vapor (Wescor 5520). O pH também foi medido (Hanna).

3.5.2. Germinação

Para as análises preliminares, foram realizados bioensaios de germinação com as sementes de *Solanum lycopersicum*, e posteriormente com as outras espécies.

Sementes de *S. lycopersicum* (30 sementes, n=5), *Oryza sativa* (30 sementes, n=5) *Erythrina verna* (20 sementes, n=5) e *Mimosa bimucronata* (20 sementes, n=5). Sementes de *E. verna* foram escarificadas manualmente na região oposta ao hilo. Foram germinadas em extrato aquoso de folhas. Após a incubação o número de sementes germinadas (protusão das raízes em 2 mm) foi determinado uma vez ao dia até a estabilização da curva de germinação de cada espécie. Os resultados foram expressos em % de inibição da germinação (IG).

Foram realizadas regressões lineares para avaliar o efeito das diferentes concentrações de extratos e frações no número de sementes germinadas e na velocidade de germinação.

Para determinação do Índice de Velocidade de Germinação (IVG), determinado pela fórmula de Maguire (1994): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$. Os valores de G se referem ao número de sementes germinadas e computadas na primeira contagem (G1), na segunda contagem (G2) e Gn na última contagem, e N1, N2 ... Nn referem-se ao número de dias de semeadura na primeira, segunda e última contagem, respectivamente.

3.5.3. Crescimento

Para as análises preliminares, foram realizados bioensaios de crescimento com as sementes de *O. sativa*, e posteriormente com as outras espécies.

Para o experimento de crescimento as sementes utilizadas foram: arroz (20 sementes, n=5) *E. verna* (20 sementes, n=5) e *M. bimucronata* (10 sementes, n=5). Sementes de *E. verna* foram escarificadas manualmente na região oposta ao hilo.

As sementes foram germinadas em placas Gerbox sobre papel de filtro umedecido com água destilada, e posteriormente embebido em solução (extrato ou fração) nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de germinação. As medidas de crescimento foram realizadas após cinco dias de experimento, o hipocótilo e da radícula foram medidos com um paquímetro digital (Digimess). Os resultados foram expressos milímetros (mm).

3.6. Bioensaio de germinação e crescimento em função da concentração aplicada

Os extratos e frações com atividade fitotóxica foram utilizados nos bioensaios em função da concentração aplicada. As condições experimentais foram às mesmas do item 3.3.1. As concentrações do extrato foram definidas em função do rendimento da extração (%), disponível na (Tabela 2). Foram estabelecidas duas doses acima e duas abaixo a concentração inicial.

3.6.1. Germinação

Sementes de tomate (30 sementes, n=5), arroz (30 sementes, n=5) *E. verna* (20 sementes, n=5) e *M. bimucronata* (20 sementes, n=5). Sementes de *E. verna* foram escarificadas manualmente na região oposta ao hilo.

Após a incubação, o número de sementes germinadas (protusão das raízes, 2mm) foi determinado uma vez ao dia até a estabilização da curva de germinação de cada espécie.

3.6.2. Crescimento

Sementes de arroz (20 sementes, n=5) *E. verna* (20 sementes, n=5) e *M. bimucronata* (10 sementes, n=5). Sementes de *E. verna* foram escarificadas manualmente na região oposta ao hilo. As medidas de crescimento foram realizadas após cinco dias de experimento, o hipocótilo e da radícula foram medidos com um paquímetro digital (Digimess). Os resultados foram expressos milímetros (mm).

3.7. Reagentes

Padrões de ácidos fenólicos (benzóico, salicílico, p- hidroxenzóico, p- cumárico, siríngico, gálico, trans- ferúlico, ferúlico e ácido vanílico). Flavonóides (isovitexina) e BOA (2(3H)- benzoazolinene) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e obtidos para comparação com os cromatogramas e bioensaios. Os solventes utilizados foram grau HPLC (Merk).

3.8. Bioensaios de germinação e de crescimento com padrões de bambus e gramíneas

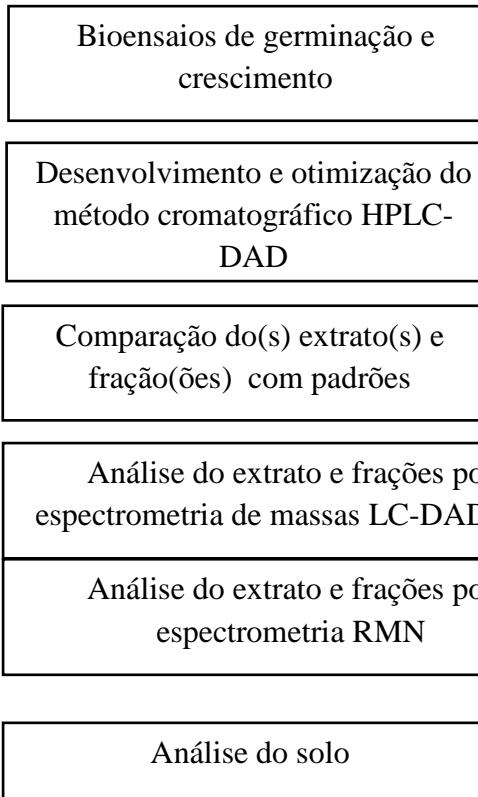
Para os bioensaios de germinação e crescimento, sementes de *E. verna* (20 sementes, n=4) e *M. bimucronata* (10 sementes, n=4), foram avaliadas sob efeito dos ácidos fenólicos, (p-hidroxibenzóico, vanílico e ácido ferúlico) isoladamente. Como controle positivo foi utilizado 2-benzoazolinone (BOA), o controle negativo foi realizado com solução de água + 1% de Tween-80. Todas as soluções de padrões seguiram a concentração de 1 mM. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas e descritas no item 3.3.1.

.

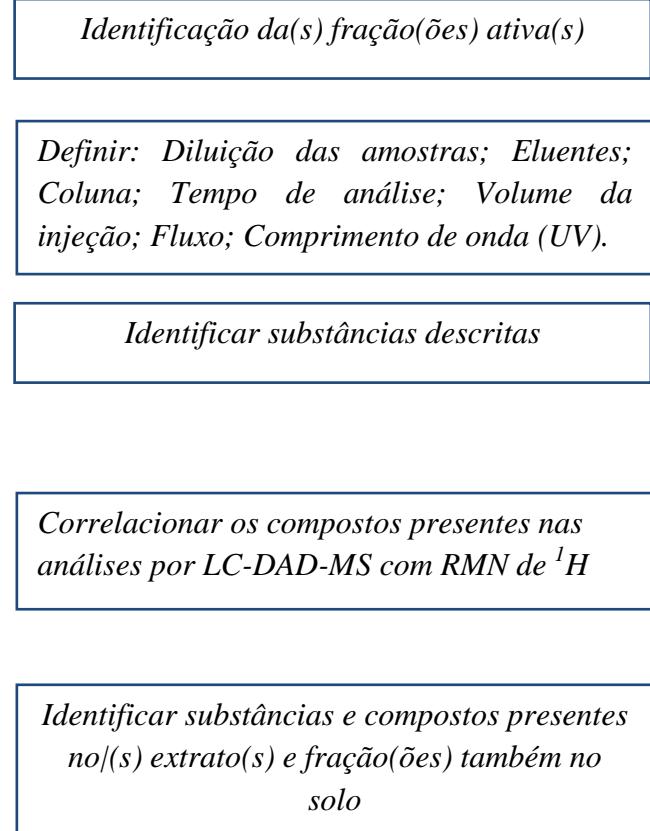
3.9. Análises Químicas

3.9.1 Fluxograma de atividades

Procedimentos



Objetivo



3.9.2. Análise Cromatográfica UHPLC – DAD

As frações DCM, AcOEt e *n*-But com atividade fitotóxica foram analisadas em um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) Ultimate3000, marca Dionex® equipado com duas bombas modelo DGP-3600RS, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo DAD3000(RS), amostrador automático modelo WPS3000RS e software Chromeleon versão 6.80. A coluna utilizada para as análises foi Kinetex® C-18 (150 x 4,6 mm x 2,6 μ m) da Phenomenex. A eluição foi realizada com solventes de grau cromatográfico em sistema gradiente, nas seguintes condições cromatográficas: Iniciou-se com 10% de metanol e 90% de água indo até 45 minutos para atingir 50% de metanol e 50% de água, depois mais 10 minutos para atingir 100% de metanol e

permaneceu durante 5 minutos 100% de metanol, 5 minutos para voltar à condição inicial e então mais 15 minutos em 10% de metanol para recondicionamento da coluna. Tempo de análise foi de 80 minutos. Vazão da bomba de 1 mL/min e volume de amostra injetado de 20 μ L. Os cromatogramas foram registrados em 350 nm e os espectros no UV-Vis adquiridos na faixa de 200 a 800 nm. Foi utilizada uma mistura de padrões contendo ácido cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, orientina, isoorientina e vitexina foram usados para comparar o tempo de retenção e perfil espectral UV/Vis das flavonas e ácidos fenólicos.

3.9.3. Partição da fração em coluna aberta

A fração com atividade fitotóxica nos bioensaios foi particionada em coluna aberta de vidro com preenchimento de 15g de sílica C18 (Polygoprep 60-50 C₁₈ Macherey – Nagel). O material (1,5 g) da fração foi diluído em água e acrescido na coluna. Para cálculo do volume morto (Vm) utilizou-se o cálculo $V_m = 0,5(\pi R^2 \cdot h)$. Então, a partição foi realizada com água-etanol, em concentrações crescentes de etanol, (Fração C1-10), sendo a C1 95% H₂O (A) – 5% EtOH (B), C2 90% (A) – 10% (B), C3 80% (A) – 20% (B), C4 60% (A) – 40% (B), C5 50% (A) – 50% (B), C6 40% (A) – 60% (B), C7 30% (A) – 70% (B), C8 20% (A) – 80% (B), C9 100% (B) e C10 100% Acetato de Etila. O material, então, foi seco em speed Vap (SPEED VAP SPD equipado com refrigerador vapor trap, Marca Thermo), e armazenado em freezer.

3.4.4. Análise dos extratos e frações por HPLC-DAD

As frações ativas foram analisadas com um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) equipado com injetor (Shimadzu, SIL10AP), sistema de bombas (LC-10AD) e detector (SPDM10vp). O software utilizado foi o (Shimadzu CLASS-VP SP2c). A coluna utilizada para as análises foi Phenomenex (Luna C-18(2)100A (250 x 4,6 mm x 5 μ)). A eluição foi realizada com solventes de grau cromatográfico em sistema gradiente, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel na bomba (A) H₂O MQ + 0,1% de ácido fórmico, na bomba (B) Metanol + 0,1% ácido fórmico. Vazão da bomba 1ml/min, injeção por corrida 15 μ l. As condições de corrida foram 5-100% (B)

em 30 min e 100% de (B) até 40min. Os cromatogramas foram registrados nos comprimentos de onda (λ) = 254nm, 280nm, 320nm, 335nm, 350nm e 430nm. Os padrões utilizados foram: ácido trans-3-cafeoilquinico; ácido cafeico; ácido *p*-cumárico; orientina; isoorientina e vitexina.

3.9.5. Análises por LC-DAD-ESI-MS

As análises foram realizadas empregando o sistema LC-DAD-ESI-MS, equipado com um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca (Shimadzu), equipado com duas bombas modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, amostrador automático modelo 20A. Acoplado ao sistema micrOTOF II-ESI-TOF (Bruker). A condição cromatográfica empregada consistiu de gradiente exploratório com uso de metanol + 1% de ácido acético (B) e água + 1% de ácido acético (A) e ácido fórmico como fase móvel. O gradiente 5-100% de B em 40 minutos, mantendo 100% em 5 minutos. Volume de injeção utilizado foi de 20 μ L.

Os espectros foram adquiridos ambos no modo positivo e negativo. Os parâmetros de operação foram os seguintes: temperatura de desolvatação 180°C, voltagem do capilar 4.5 kV e voltagem do cone 120V. O sistema foi previamente calibrado com uma solução de Na-TFA à 100 mg/mL.

3.9.6. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As frações foram solubilizadas com 650 μ L de D2O, butanólico e acetato de etila em CD3OD, e diclorometânico em CDCl3. Os espectros de 1H-NMR foram adquiridos sob automação à temperatura de 299 K no espetrômetro Avance III® 600 (Fahrenheitstr, Bremen, Alemanha) operando à 600.13 MHz. Cada espectro consistiu de 128 scans com 65 K pontos de dados na faixa espectral de -1-12 ppm, e tempo de relaxação de 5s. FIDs sofreram transformada de Fourier após a aplicação da função de apodização com aplicação de linha de 0,5 Hz. Correção da linha de base e fase foram realizadas com o software TopSpin. Deslocamento químico ¹H NMR foram referenciados para os sinais (CH3)3 do TMS à δ 0.00.

3.10. Extração do material do solo para análise de aleloquímicos

Vinte amostras de solos foram coletadas com auxilio de um trado (0-10cm), ao acaso da rizosfera de *A. simplex* presentes no Parque Estadual do Jacupiranga. As amostras foram agrupadas, para a obtenção de uma amostra composta, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas. Os extratos de solos para a obtenção de aleloquímicos foram realizadas segundo o protocolo de Perry *et al.* (2005) com adaptações.

O solo foi descongelado e peneirado (2mm), posteriormente pesado e misturado na proporção de 1:1 solo/água, em tubos falcon. O material, então, foi submetido ao agitador vortex (Mod Q920-A2 – Quimis). A solução solo água foi para centrifuga (Sorvall super T 21, USA) por 20 min a 25°C a 4000 rpm, e o sobrenadante foi retirado. O processo foi repetido por três vezes. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro, concentrado em evaporador rotativo e armazenado em freezer.

Em seguida, o resíduo foi submetido a extração metanólica (600 ml de metanol) à temperatura ambiente durante 12 h. Os sobrenadantes aquosos e metanólicos foram concentrados por um evaporador rotativo, liofilizado e armazenada num congelador a -20 ° C até serem utilizados para a análise.

3.11. Coleta de solo para análise química

Com auxilio do trado (0-10cm), nove amostras de solo foram coletada dentro da área de ocorrência e fora da área de ocorrência de *A. simplex*. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos até análise de componentes químicos.

Análises químicas e granulométricas foram realizadas seguindo o procedimento proposto por Raij (1983) no laboratório especializado Departamento de Ciências do Solo na ESALQ/USP. As propriedades físico-químicas do solo analisadas foram pH, matéria orgânica (M.O.), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), hidrogênio mais alumínio (H + Al), enxofre (S), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), além da soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação por bases (V), que expressam fertilidade do solo (Reatto *et al.* 1998).

3.12. Análise de componentes bióticos do solo - FMA

O rizoma de *A. simplex* foi exposto e, com auxilio de uma tesoura de poda, raízes foram coletadas, lavadas em água corrente e armazenadas em frascos com álcool 70%. Avaliação da colonização por fungos e contagem de esporos, foi realizada no Departamento de Ciência do Solo - Laboratório de Microbiologia do Solo - ESALQ/USP.

Em laboratório, as raízes foram lavadas com água desmineralizada, clarificadas com solução de KOH (10% v/v) e H₂O₂ (10% v/v) (Mandayam & Jumpponen 2008) e posteriormente imersas em corante contendo tinta de caneta azul e ácido acético (Vierheilig *et al.* 1998). Os fragmentos de raízes foram aquecidos em banho-maria por cinco minutos e lavados com água desmineralizada. Após a coloração, as raízes foram deixadas em solução ácida de glicerol (50%) por 12 horas. A identificação das espécies de fungos arbusculares micorrízicos foi realizada segundo Schenck & Perez (1988) - descrição morfológica disponível na internet, na página da International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM <http://invam.caf.wvu.edu>). As características taxonômicas foram interpretadas em microscópio óptico com iluminação de campo-claro e objetiva de imersão. Nos caracteres taxonômicos foram incluídos os números e tipo de camadas das paredes dos esporos e sua reação ao reagente de Melzer; características das paredes internas, quando presentes; morfologia da hifa de sustentação do esporo; e variação da cor e tamanho dos esporos.

3.12.1. Padronização de técnica para a identificação dos fungos arbusculares (FMAs) do solo

Tendo em vista a impossibilidade de identificação dos fungos arbusculares nas raízes secundárias de *A. simplex* optou-se por realizar o estudo de comunidades de FMAs mediante a extração do DNA total das raízes colonizadas. As amostras de DNA de raízes foram adicionalmente submetidas à PCR, com o objetivo de determinar se o DNA era amplificável. Após a amplificação foi realizada a clonagem e finalmente o sequenciamento.

Para o estudo de comunidades de FMA colonizando as raízes das plantas foi necessária a extração do DNA total das raízes colonizadas, o qual é composto de DNA

da planta e DNA de fungos e outros microrganismos associados às raízes. Antes da extração de DNA, as raízes foram lavadas quatro vezes com água destilada para remoção de impurezas mais grosseiras, homogeneizadas e maceradas em nitrogênio líquido com o uso de almofariz e pilão de porcelana. Cada amostra continha 50 a 100 mg de raiz macerada, estas foram transferidas para tubos de polietileno. Para extração de DNA das raízes foi utilizado o kit Power Soil DNA Isolation. O DNA foi extraído de acordo com o manual do fabricante. As raízes maceradas foram transferidas para tubo contendo a solução de lise Bead. A mistura foi agitada gentilmente e adicionaram-se 60 µL da Solução 1. Adicionaram-se 200 µL de Solução IRS (Solução de Remoção de Inibidor). O tubo foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 250 µL da Solução 2. A solução foi homogeneizada em vórtex por 5 segundos e o tubo incubado a 4°C por 5 minutos para depois ser centrifugado a 10.000 g por 1 minuto. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde se adicionaram 1,3 mL da Solução 3 e a solução foi homogeneizada em vórtex por 5 segundos, 700 µL foram transferidos para o filtro do kit, e o conjunto filtro-tubo foi centrifugado à 10.000 g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e adicionaram-se mais 700 µL de solução ao mesmo filtro. Em seguida, o tubo foi centrifugado à 10.000 g por 1 minuto. O processo foi repetido até que todo o sobrenadante fosse filtrado. Foram adicionados, então, 300 µL da Solução 4 sobre o filtro, centrifugou-se a 10.000 g por 30 segundos. O filtrado foi descartado e centrifugou-se novamente por 1 minuto. Para recuperar o DNA, o filtro foi transferido para um novo tubo e adicionaram-se 50 µL da Solução 5 no centro do filtro. O conjunto filtro-tubo foi centrifugado a 10.000 g por 30 segundos e, depois, o filtro foi descartado. A solução de DNA obtida foi armazenada a -20°C.

3.12.3. PCR do DNA extraído das raízes

As amostras de DNA de raízes de foram adicionalmente submetidas à PCR, com o objetivo de determinar se o DNA era amplificável. Foi necessário utilizar a nested PCR para a amplificação do DNA alvo nas amostras. Na primeira PCR foram utilizados os iniciadores NS1 e NS8 (White 1990). A amplificação do DNA foi feita em solução contendo 0,1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador 100 pmol, 2,0 µL de dNTPs 10 mM, 3,75 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,35 de *Taq* DNA polimerase 5U e 1x o tampão de

reação, e 14,7 μ L de água estéril, totalizando um volume de 25 μ L. Os fragmentos de rDNA 18S (iniciadores NS1 e NS8) foram amplificados, após a desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minutos e 30 segundos; e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Na segunda PCR, utilizaram-se os iniciadores grupos específicos: AML1 e AML2, específicos para Glomeromicetos: AML1 (50-ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA-30) e AML2 (50-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-30) (Lee *et al.*, 2008), com as mesmas condições descritas acima. Para todos os ensaios, empregou-se uma reação controle negativo, sem DNA. Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) e visualizados após coloração com Gel red.

3.12.4. Clonagem e transformação de produtos de PCR

Após a amplificação via PCR das sequencias de DNA, foi realizada a clonagem dos amplicons utilizando o Kit de clonagem “pGEM® - T Easy Vector Systems” (Promega). O volume de 10 μ de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α . A transformação ocorreu por choque térmico, mantendo-se por 30min em gelo, 45segundos em banho-maria a 42°C e voltando por dois minutos no gelo. Posteriormente, 250 μ L de meio SOC foram adicionados à mistura e incubado a 37°C por 60 min, sob agitação constante de 250rpm. As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo LB (Luria-Bertold, USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) na concentração de 20g L⁻¹, solidificado com ágar 1,5% (LabCenter, Campinas São Paulo, Brasil), acrescido de ampicilina (USB) e X-Gal (Invitrogen), ambos crescidos na concentração final de 100 μ g mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas. Os clones transformados foram selecionados a partir de colônias com coloração branca, as quais foram crescidas em 4ml de LB líquido com ampicilina (100 μ g mL⁻¹) a 37°C por 12 horas, sob agitação constante de 250rpm. A presença dos insertos nos clones transformados foi confirmada por meio de PCR de colônia utilizando os iniciadores M13F e M13R do vetor. Os clones foram purificados e foram enviados para seqüenciamento. Com os resultados do sequenciamento em mão, foi realizado o alinhamento das sequências com o auxílio do programa ClustalW e a identificação das espécies foi realizada pela comparação com sequências disponíveis no banco de dados do GenBank nr/nt (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

3.13. Análise estatística

O efeito dos diferentes extratos na germinação e no crescimento foi comparado através de ANOVA de um fator, seguida de teste de Tukey 5% para comparações múltiplas (Zar 1999). A velocidade de germinação foi calculada de acordo com a equação sugerida por (Chiapusio *et al.* 1997).

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaios de germinação e crescimento com extratos e frações

Bioensaio preliminar, as germinação das sementes de *S. lycopersicum* foi analisada durante seis dias, sobre extrato aquoso e etanólico de folha caule jovem e adulto de *A. simplex*, o início da germinação ocorreu após 48 horas do início do experimento. No primeiro dia os extratos aquosos de folha, colmo jovem e colmo adulto inibiram significativamente (ANOVA $p < 0,01$) a germinação. No segundo dia, todos os extratos inibiram significativamente (ANOVA $p < 0,01$) a germinação. No terceiro dia, apenas os extratos aquosos de folha, etanólico de colmo jovem e adulto inibiram significativamente (ANOVA $p < 0,01$) a germinação. No quarto dia, os extratos aquosos de folha e de colmo jovem inibiram significativamente a germinação (ANOVA $p < 0,01$). O extrato mais efetivo na inibição da germinação foi o extrato aquoso de folha.

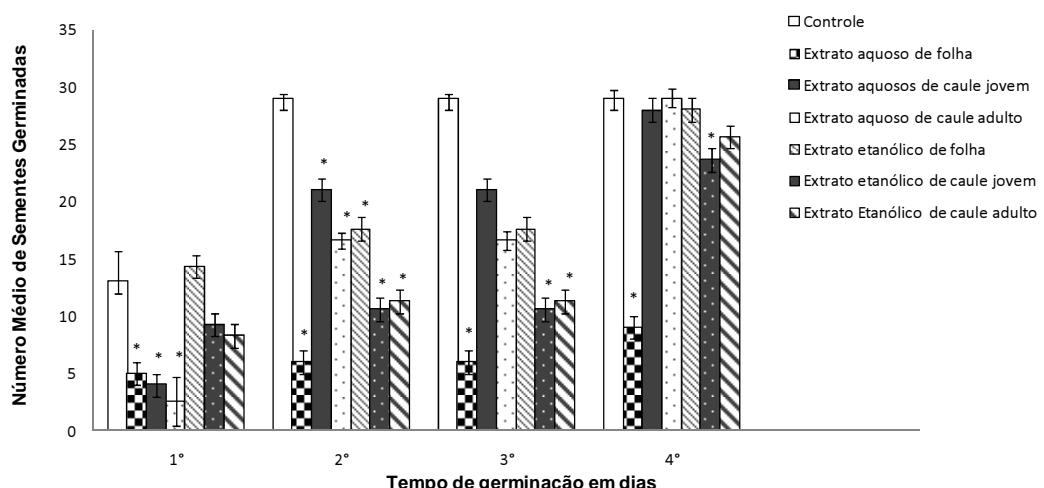


Figura 1. Efeitos dos extratos aquoso e etanólico de folha, colmo jovem e colmo adulto de *Apoclada simplex* sobre a germinação de sementes de *S. lycopersicum*. Barras

verticais representam o desvio padrão da média. *indica que o número de sementes germinadas difere significativamente do controle.

4.2. Bioensaios de germinação em função da concentração aplicada dos extratos e frações

Os resultados dos bioensaios de germinação e crescimento das sementes agrícolas (*O. sativa* e *S. lycopersicum*) sob efeito dos extratos aquoso e etanólico de diferentes partes (colmos jovem, adulto e folhas) de *Apocladia simplex*, indicaram o extrato de folha aquoso (FA) com atividade fitotóxica. Este resultado qualifica o extrato FA para bioensaios em função da concentração aplicada, na Tabela 2 resultados de germinação e Tabela 3 crescimento.

Para germinação, embora o valor de correlação (r^2) obtido para as sementes de arroz seja alto, este não se mostrou sensível ao tratamento sob nenhuma concentração. Já para sementes de tomate os resultados mostram que a partir da concentração 3 se observa diminuição significativa da germinação com ($p < 0,05$).

Os dados obtidos no quinto dia de experimento indicam que o extrato de folha aquoso a partir da concentração de 1mg/ml já tem efeito negativo significativo ($p < 0,05$) sobre o crescimento da parte subterrânea (P.S). A parte aérea (P.A) foi afetada negativamente apenas pelas concentrações 2,0mg/ml e 6,0mg/ml.

Tabela 5. Porcentagem de Inibição da germinação (IG) e Índice de velocidade de germinação (IVG) referente ao último dia de tratamento (estabilização da curva de germinação). Média \pm Desvio padrão R-quadrado (r^2), obtidos em função das concentrações do extrato aquoso de folha aquoso.

Tratamento	<i>O. sativa</i>			<i>S. lycopersicum</i>			<i>M. bimucronata</i>			<i>E. verna</i>			
	mg/ml	(% de não germinadas)	IVG	r^2	%IG	IVG	r^2	%IG	IVG	r^2	%IG	IVG	r^2
Controle	0 \pm 0	139,4			6,66 \pm 0	83,8		30 \pm 0	96,4		29,16 \pm 7,21	35,8	
FA 1 (0,66)	0 \pm 0	126,6			3,55 \pm 0,3	64		30 \pm 5	93,0		62,5 \pm 0*	18,2	
FA 2: (1,0)	0 \pm 0	140	0.713		11,33 \pm 1,6	55,8	0.154	26 \pm 2,88	81,7	0.926	53,12 \pm 6,25*	33,0	0,441
FA 3: (2,0)	0 \pm 0	137,7		0.713	22,5 \pm 4,17 **	34,9		26,25 \pm 2,5	74,5		65,62 \pm 6,25*	29,5	
FA 4: (4,0)	2,22 \pm 1,4	125,7			50 \pm 4,44*	11,2		21,66 \pm 2,8**	74,3		65,62 \pm 6,25*	25,2	
FA 5: (6,0)	3,33 \pm 0	119,8			48,66 \pm 7,73*	11,8		20 \pm 0*	68,5		59,37 \pm 11,96*	27	

** (p<0,05) * (p<0,01)

Tabela 6. Medidas de comprimento (mm) da parte aérea (P.A), e da parte subterrânea (P.S) em função da concentração aplicada das frações. Média ± desvio padrão e R-quadrado (r^2) das concentrações do extrato aquoso de folha .Números apresentados dentro de parênteses correspondem à porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle.

Tratamento (mg/ml)	Parte aérea	Parte subterrânea	r^2
Controle	29,64 ± 8,88	48,11 ± 9,53	
F.Aq 1 (0,66)	30,2 ± 4,97	44,62 ± 11,35	
F.Aq 2 (1)	27,32 ± 6,21	38,85 ± 3,89 (7)*	
F.Aq 3 (2)	25,46 ± 5,97 (14)*	0,723 36,72 ± 8,07 (23)*	0,895
F.Aq 4 (4)	27,47 ± 6,02	33,44 ± 9,66 (30)*	
F.Aq 5 (6)	24,67 ± 6,10 (16)*	34,85 ± 7,67 (27)*	

Valores com * ($p<0,01$) em relação ao controle (água).

4.3. Bioensaio de germinação e crescimento em função da concentração aplicada de frações do extrato aquosos de folhas

As frações que apresentaram atividade fitotóxica foram a diclorometano (DCM), Acetato de Etila (AcOEt) e *n*-Butanólica (*n*-But). O resultado da avaliação com diferentes concentrações das frações do extrato aquoso de folhas na inibição da germinação das sementes de *S. lycopersicum*, *O. sativa*, *M. bimucronata* e *E. verna* são mostrados na Tabela 5. Os resultados da atividade fitotóxica das frações para o crescimento de *O. sativa*, *M. bimucronata* e *E. verna* são mostrados na Tabela 6.

Tabela 7. Concentração das frações ativas de folhas de *A. simplex* em mg/ml

Tratamento	Dose 1 mg/ml	Dose 2 mg/ml	Dose 3 mg/ml	Dose 4 mg/ml	Dose 5 mg/ml
Diclorometano	0,18	0,28	0,56	1,12	1,68
Acetato de Etila	0,38	0,58	1,15	2,3	3,45
<i>n</i>-Butanol	0,39	0,59	1,19	2,83	3,57

Tabela 8. Porcentagem de Inibição da germinação (IG) e Índice de velocidade de germinação (IVG) referentes ao último dia de tratamento (estabilização da curva de germinação). Média \pm Desvio pdrão. R-quadrado (r^2), obtidos em função das concentrações das frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*But) na germinação de sementes de tomate, arroz, *M. bimucronata* e *E. verna*.

Tratamento	<i>S. lycopersicum</i>			<i>O. sativa</i>			<i>Mimosa bimucronata</i>			<i>Erythrina verna</i>			
	mg/ml	(% de não germinadas)	IVG	r^2	%IG	IVG	r^2	%IG	IVG	r^2	%IG	IVG	r^2
Controle		24,16 \pm 3,19	65,1		17,7 \pm 1,92	65,96		23 \pm 2,74	100,65		37,5 \pm 0	33,4	
DCM 1 (0,18)		51,11 \pm 3,85*	20,77		4,4 \pm 1,9*	72,17		13,33 \pm 5,77**	103,03		50 \pm 0*	27,49	
DCM 2 (0,28)		80 \pm 0*	8,54		10 \pm 0*	71,77		15 \pm 0	93,53		50 \pm 0	28,18	
DCM 3 (0,56)		77,83 \pm 8,39*	8,88	0.546	10 \pm 0*	72,67	0.069	8,33 \pm 2,89*	84,19	0.031	62,5 \pm 12,5*	30,36	0.499
DCM 4 (1,12)		85,55 \pm 3,85*	2,5		12,2 \pm 1,92*	65,75		22,5 \pm 5	74,01		50 \pm 0	28,96	
DCM 5 (1,68)		93,33 \pm 8,82*	1,47		6,66 \pm 0*	71,07		23,33 \pm 2,89	70,89		50 \pm 0	19,79	
AcOEt 1 (0,38)		26,66 \pm 3,85	50,33		12,22 \pm 3,85	68,27		23,33 \pm 2,89	77,56		41,66 \pm 7,22	43,35	
AcOEt 2 (0,58)		36,66 \pm 5,77	52,02		5,55 \pm 1,92*	74,56		20 \pm 0	71,56		27,16 \pm 7,22	22,51	
AcOEt 3 (1,15)		37,77 \pm 8,39	30,95	0.805	10 \pm 0*	71,03	0.169	21,25 \pm 2,5	73,46	0.388	58,33 \pm 7,22*	40,63	0.231
AcOEt 4 (2,3)		39,33 \pm 14,98	30,4		7,77 \pm 1,02*	63,6		23,3 \pm 17,5	60,89		33,77 \pm 7,72	32,57	
AcOEt 5 (3,45)		76,66 \pm 6,67*	8,63		8,33 \pm 1,92*	64,26		40 \pm 0**	20,19		50 \pm 0	31,09	
<i>n</i>-But 1 (0,39)		24,44 \pm 5,09	57,55		2,22 \pm 3,85*	77,9		15 \pm 3,45	89,92		56,25 \pm 7,22	33,18	
<i>n</i>-But 2 (0,59)		27,77 \pm 3,85	57,36		5,83 \pm 1,67**	76,1		17 \pm 2,74	87,93		50 \pm 0	41	
<i>n</i>-But 3 (1,19)		43,33 \pm 8,82**	25,26	0.778	12,5 \pm 1,67	68,86	0.145	20 \pm 8,66	89,04	0.288	50,0 \pm	31,18	0.245
<i>n</i>-But 4 (2,83)		53,33 \pm 10*	17,7		4,44 \pm 5,09**	24,45		20 \pm 8,66	95,42		45,83 \pm 7,22	41,66	
<i>n</i>-But 5 (3,57)		45,55 \pm 6,94*	23,13		11,11 \pm 8,33	64,19		50 \pm 7,07*	29,88		62,5 \pm 14,43**	23,38	

** (p<0,05) * (p<0,01)

Tabela 9. Medidas de comprimento (mm) da parte aérea (P.A), e da parte subterrânea (P.S) em função da concentração aplicada das frações. Média \pm desvio padrão e R-quadrado (r^2) das concentrações das frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (nBut) no crescimento de sementes de arroz, *M. bimucronata* e *E. verna*. Números apresentados dentro de parênteses correspondem à porcentagem de porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle.

Tratamento mg/ml	Parte aérea				Parte subterrânea			
	<i>O. sativa</i>	<i>M. bimucronata</i>	<i>E. verna</i>	r^2	<i>O. sativa</i>	<i>M. bimucronata</i>	<i>E. verna</i>	r^2
Controle	19,76 \pm 5,46	22,43 \pm 4,9	12,25 \pm 1,17		32,09 \pm 7,61	11,2 \pm 4,53	39,99 \pm 8,89	
DCM 1 (0,18)	15,59 \pm 4,68* (21)	20,17 \pm 4,88	-		14,81 \pm 5,36* (54)	9,61 \pm 3,55	-	
DCM 2 (0,28)	16,82 \pm 3,61* (14)	21,91 \pm 4,41	-		19,82 \pm 5,32* (38)	10,40 \pm 3,27	-	
DCM 3 (0,56)	16,59 \pm 3,63* (16)	0,766	16,63 \pm 5,09* (25)	0,788	-	12,45 \pm 4,75* (61)	0,595	7,89 \pm 2,64* (29)
DCM 4 (1,12)	10,19 \pm 4,23* (48)		17,62 \pm 3,93* (21)		-	8,99 \pm 4,13* (72)		0,888
DCM 5 (1,68)	10,88 \pm 3,78* (44)		11,73 \pm 4,06* (47)		-	13,29 \pm 5* (59)		-
AcOEt 1 (0,38)	13,22 \pm 3,63* (33)		20,53 \pm 5,85		-	16 \pm 4,83* (50)		-
AcOEt 2 (0,58)	12,81 \pm 3,61* (35)		21,72 \pm 5,25		-	16,88 \pm 5,64* (47)		-
AcOEt 3 (1,15)	10,97 \pm 3,91* (44)	0,91	18,13 \pm 5,65* (19)	0,839	-	17,87 \pm 4,42* (44)	0,606	14,89 \pm 5,06**
AcOEt 4 (2,3)	9,05 \pm 2,69* (54)		17,73 \pm 6,76* (20)		-	13,92 \pm 4,76* (57)		0,698
AcOEt 5 (3,45)	6,3 \pm 2,27* (68)		17,19 \pm 4,23* (23)		-	12,55 \pm 4,75* (61)		-
<i>n</i>-But 1 (0,39)	15,4 \pm 4,72* (22)		18,28 \pm 4,77* (18)		15,06 \pm 5,75		17,67 \pm 5,76* (45)	
<i>n</i>-But 2 (0,59)	12,73 \pm 3,32* (35)		16,59 \pm 4,91* (26)		22,86 \pm 9,01		14,59 \pm 5,64* (55)	
<i>n</i>-But 3 (1,19)	11,99 \pm 3,99* (39)	0,465	15,51 \pm 4,94* (30)	0,886	8,68 \pm 4,85	0,01	13,83 \pm 5,24* (57)	0,679
<i>n</i>-But 4 (2,83)	14,31 \pm 4,04* (27)		13,80 \pm 5,08* (38)		22,88 \pm 11,11		11,99 \pm 5,09* (63)	0,723
<i>n</i>-But 5 (3,57)	13,43 \pm 4,02* (32)		13,80 \pm 4,9* (38)		11,29 \pm 2,86		11,99 \pm 5,72* (63)	0,01
							5,29 \pm 1,97* (52)	44,16 \pm 21,86
							39,02 \pm 18,39	

Valores referentes ao quinto dia após germinação das sementes. * ($p < 0,01$) ** ($p < 0,05$)

4.5. Bioensaio de germinação e crescimento com padrões

Os padrões utilizados indicam, assim como os extratos e frações, uma resposta espécie específica de cada espécie avaliada (*M. bimucronata* e *E. verna*). Os ácidos fenólicos isolados ou em mistura não inibiram significativamente a germinação das sementes. *E. verna* (ANOVA $F= 1,14$; $P= 0,386$) e *M. bimucronata* (ANOVA $F= 5.34$; $P=0,003$).

As plantulas de *M. bimucronata* obtiveram seu crescimento afetado significativamente pelos ácidos fenólicos. Entretanto, a maior atividade inibitória ocorreu mediante a aplicação da mistura de compostos. A espécie mais sensível à ação dos compostos fenólicos foi *M. bimucronata* e a menos sensível foi *E. verna* (Kruskal-Wallis $H=91.653$, $P <0,001$). Efeitos mais visíveis na inibição do crescimento foram observados em plântulas tratadas com ácidos vanílico e ferúlico. Além da significativa redução do comprimento do hipocótilo e da radícula de *M. bimucronata* (Kruskal-Wallis $H = 102,576$, $P <0,001$ e Kruskal-Wallis $H = 133,331$, $P <0,001$) as plântulas desta espécie apresentaram radícula marrom-avermelhada e cotilédones verde-amarelados em presença do ácido vanílico.

Tabela 10. Efeito dos padrões e da mistura de padrões (1 mM) identificados em bambus e gramíneas sobre o comprimento (mm) da radícula (Parte subterrânea) e do hipocótilo (Parte aérea), de *M. bimucronata* e *E. verna*. Média \pm desvio. Número apresentados dentro de parênteses representam a porcentagem de inibição em relação ao controle.

Tratamento	Crescimento			
	Parte aérea		Parte subterrânea	
	<i>E. verna</i>	<i>M. bimucronata</i>	<i>E. verna</i>	<i>M. bimucronata</i>
Controle	-	20 \pm 3.8	14.7 \pm 6.7	20.5 \pm 6.5
2(3H)-benzoxazolinone	-	17.7 \pm 5.2	13.6 \pm 3.9	15.4 \pm 6* (25)
Ácido <i>p</i> -hydroxibenzoic	-	19.3 \pm 4.1	14.7 \pm 6.7	22.7 \pm 5.3
Ácido vanílico	-	15.8 \pm 4.7* (21)	11.9 \pm 2.8	10.5 \pm 3* (50)
Ácido ferúlico	-	18.2 \pm 3.7	11 \pm 3.5	17.4 \pm 3
Ácido cafeico	-	18.5 \pm 3.6	15.5 \pm 6.7	20.2 \pm 4
Ácido clorogênico	-	21.8 \pm 3.1	15.7 \pm 7.8	21.8 \pm 3.1
Mix	-	10.3 \pm 3.5* (50)	6.9 \pm 2* (54)	11.3 \pm 2* (45)

*Diferenças significativas ($P<0.05$) do controle Kruskal-Wallis, teste de Dunn

4.6. Perfil metabólico do extrato aquoso de *Apocladia simplex*

O perfil cromatográfico das frações foi comparado com os tempos de retenção e espectros no UV de uma mistura de padrões de ácidos fenólicos e flavonas (Figura 2). Com base nos resultados, foi possível observar que os picos que eluiram entre 1-16 minutos mostraram perfil no UV característico de ácidos benzóicos (λ_{max} 261/292(sh)), ligeiramente diferente do perfil dos derivados de ácidos hidroxicinâmicos como o ácido clorogênico (9 minutos, λ_{max} 325 nm), confirmando que o ácido clorogênico não está presente nos extratos analisados. Entretanto, os picos entre 18-25 minutos mostraram perfil espectral similar aos dos padrões de flavonas (λ_{max} 347/270, luteolina 6-C-glicosídeo), confirmando a presença de derivados de flavonas nos extratos, principalmente na fração *n*-butanólica. Com base na alta atividade fitotóxica da fração *n*But nos bioensaios de germinação e crescimento (Tabelas 5 e 6), essa fração foi submetida a uma análise química mais detalhada empregando HPLC-DAD, HPLC-DAD-ESI-MS e RMN de ^1H , para a etapa de identificação dos metabólitos.

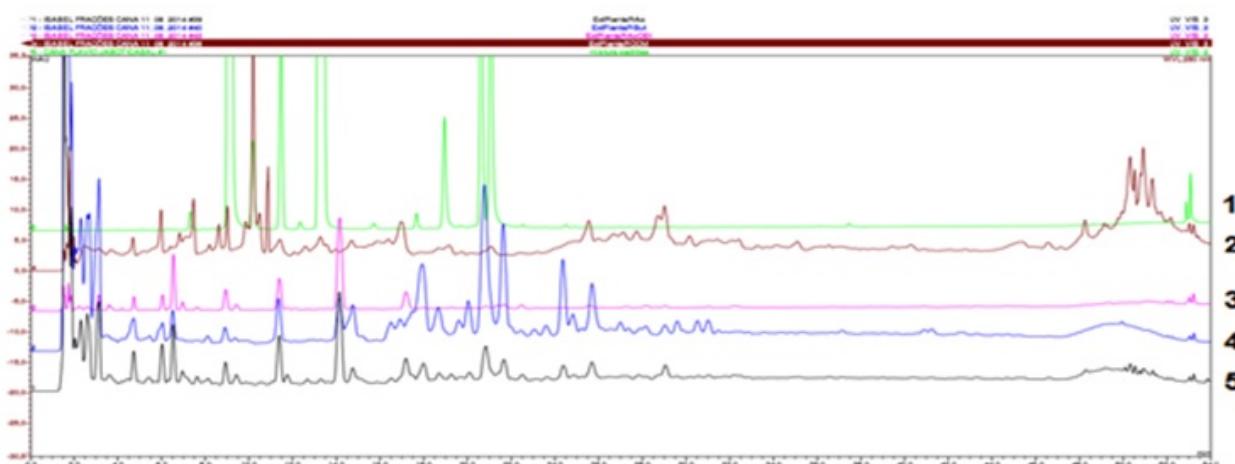


Figura 2. Perfis cromatográficos das diferentes frações de folhas de *A. simplex* em 280 nm. (1) mistura dos padrões: ácido *trans*-3-cafeoilquinico (9 minutos); ácido cafeico (9,8 minutos); ácido *p*-cumárico (13,2 minutos); luteolina 8-C-glicosídeo (18,8 minutos); luteolina 6-C-glicosídeo (20,6 minutos); apigenina 8-C-glicosídeo (21 minutos); (2) fração diclorometano, (3) fração acetato de etila, (4) fração *n*- butanol e (5) fração aquosa.

4.7. Perfil metabólico da fração *n*-Butanólica e das subfrações via HPLC-DAD.

A fração *n*But foi particionada em 10 concentrações crescentes de uma solução (água/etanol), tal procedimento foi feito por separação em coluna aberta (item 3.6.2). O rendimento das sub frações que seguiram com as análises está disponível na (Tabela 4). Os resultados desta etapa nos levaram a simplificação da matriz, e o estabelecimento de um método cromatográfico adequado para identificação e isolamento de compostos. A (Figura 3) apresenta o perfil cromatográfico da fração *n*But, A figura 4, 5, 6 e 7 apresentam os perfis cromatográficos no UV (254 nm) de (C1-C4) respectivamente.

Tabela 11. Rendimento em miligramas (mg) das sub frações (C1 - C4) da fração *n*But. Onde estão representados H₂O (A) e EtOH (B).

Sub frações	Rendimento (mg)
C1 95% (A) - 5%(B)	2,02
C2 90% (A) - 10%(B)	4,03
C3 80% (A) - 20%(B)	9,50
C4 60% (A) - 40%(B)	2,94

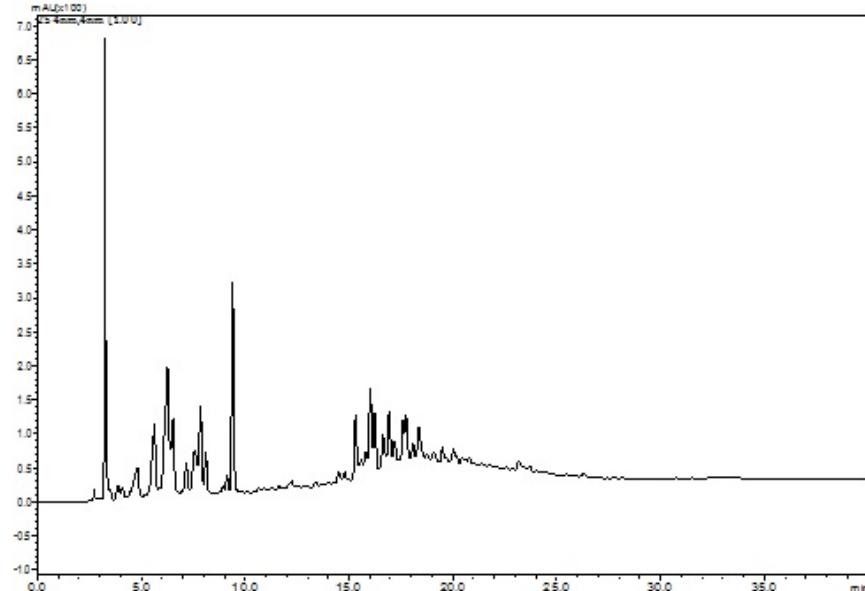


Figura 3. Perfil cromatográfico da fração *n*-But. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn).

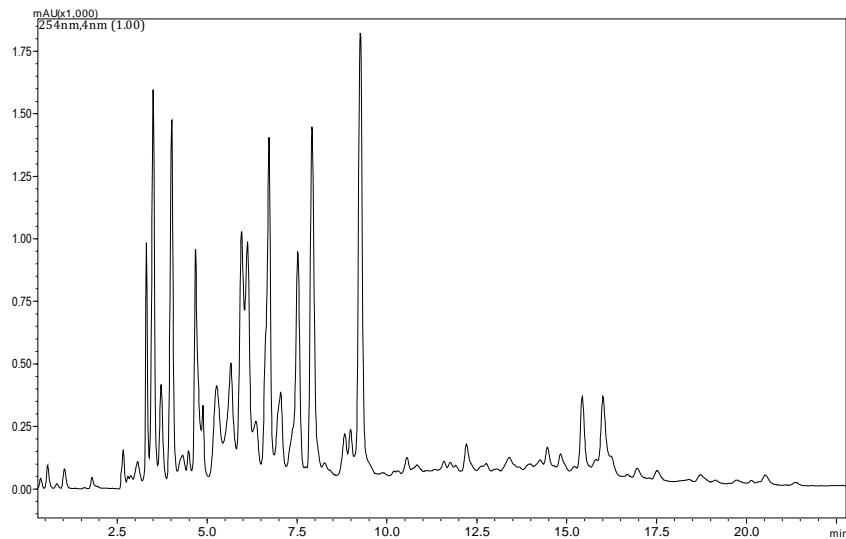


Figura 4. Perfil cromatográfico da sub fração *C1*. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn).

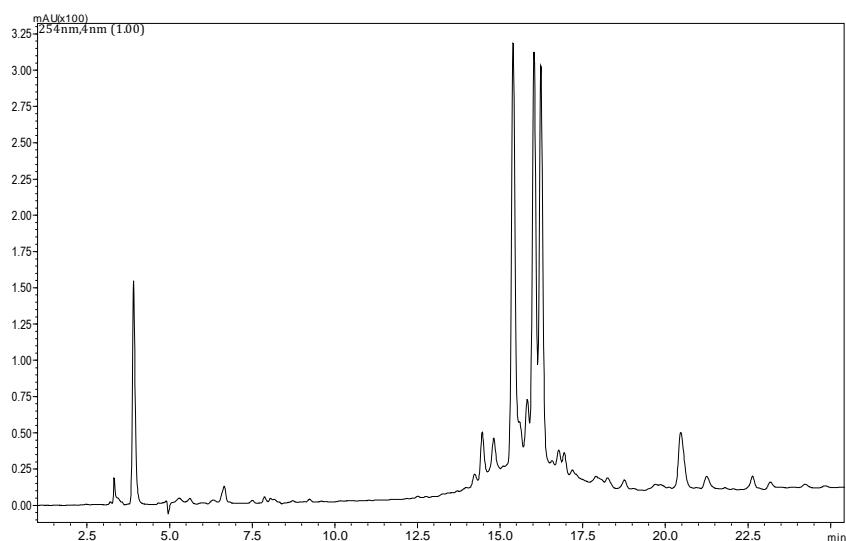


Figura 5. Perfil cromatográfico da sub fração *C2*. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn).

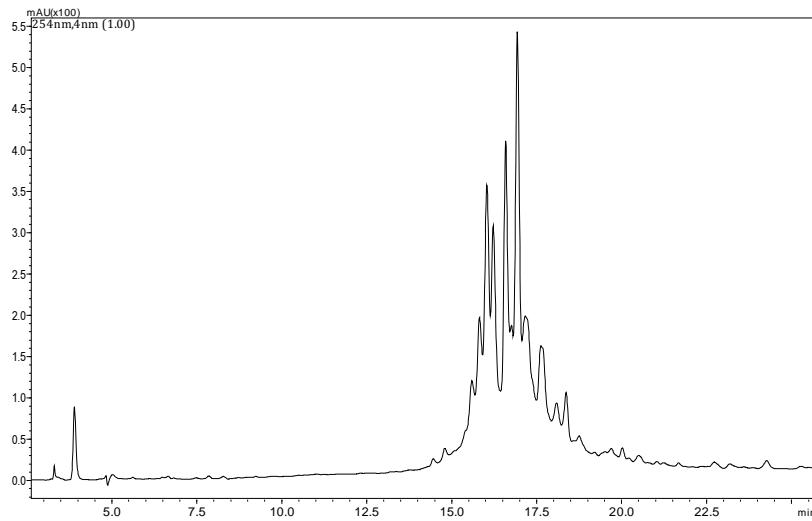


Figura 6. Perfil cromatográfico da sub fração C3. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn).

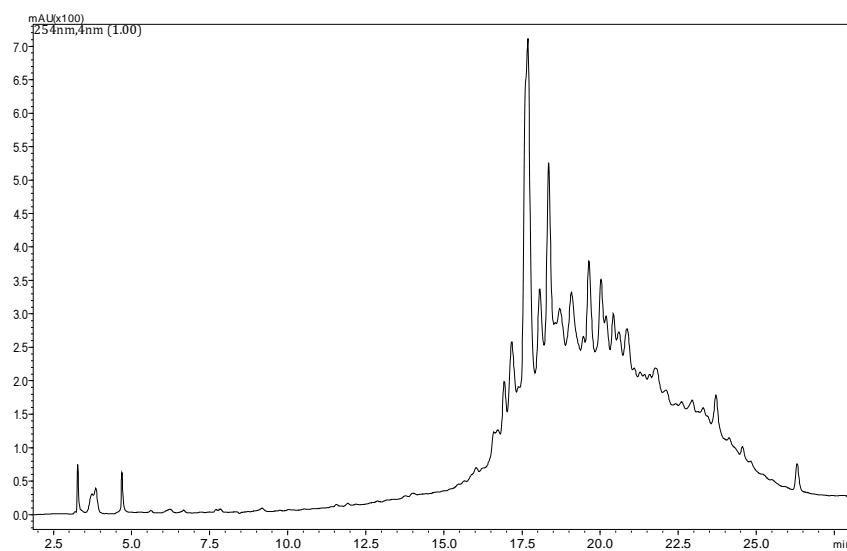


Figura 7. Perfil cromatográfico da sub fração C4. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/mn e detecção no UV (254mn).

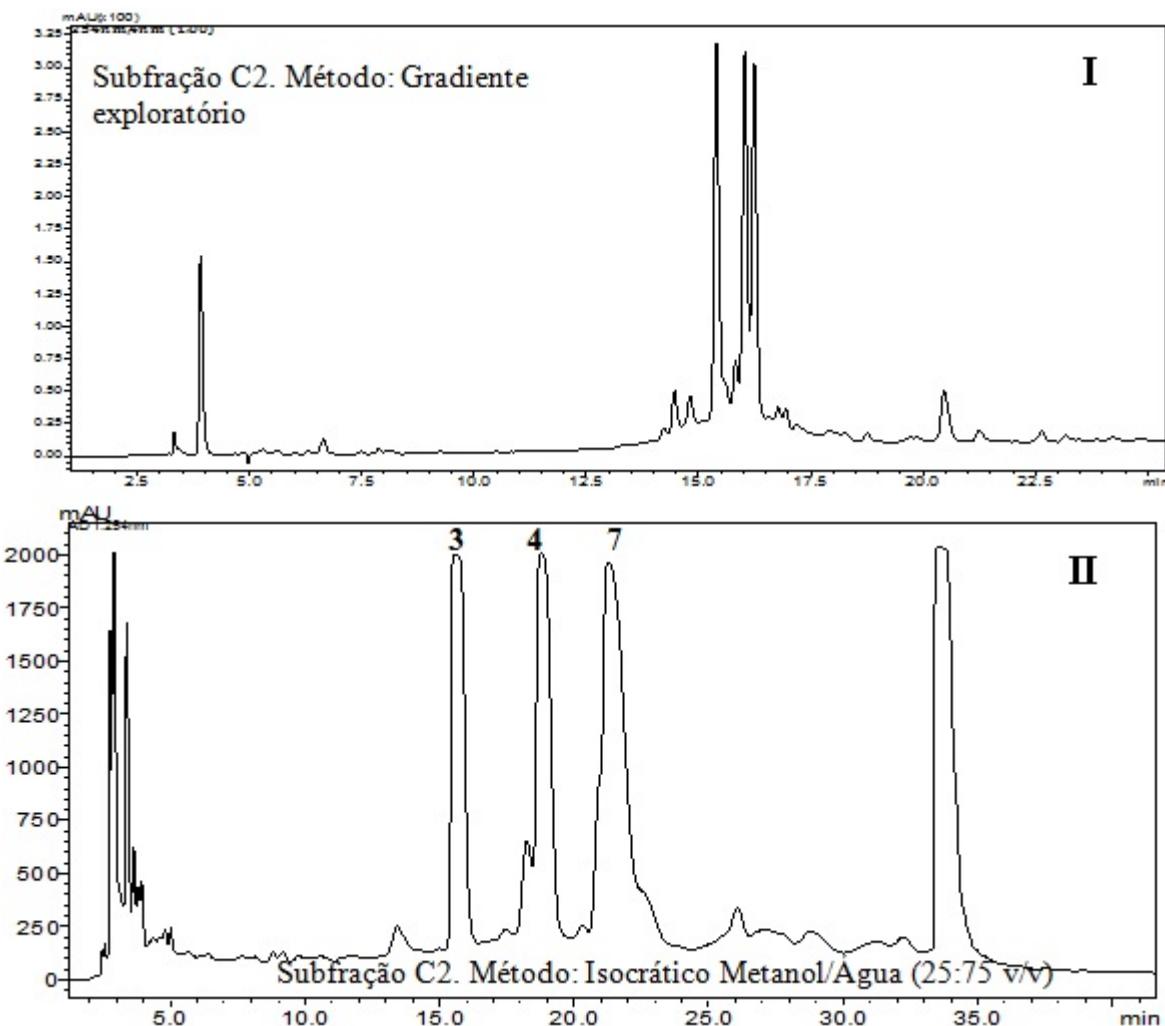


Figura 8. Perfil cromatográfico da sub fração C2. Condições da cromatográficas de 1 gradiente exploratório foram: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn). As condições cromatográficas de 2 método isocrático, de (0-30 min) 25% de (B), Vvolume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (254mn).

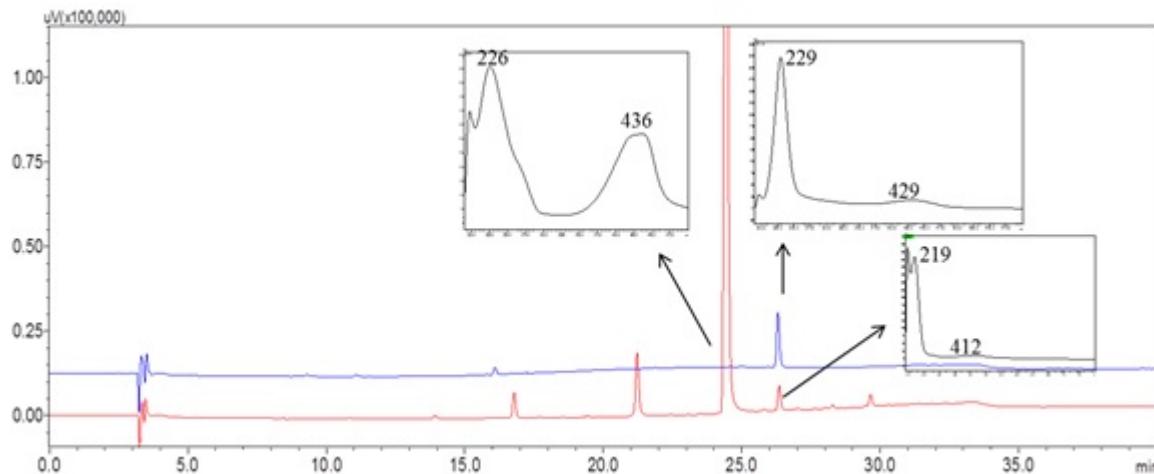


Figura 9. Cromatograma da fração *n*But (azul) sobreposta ao padrão (vermelho) APO. Condições da cromatográficas: (0-30 min) concentração de 5% até 30% de (B) MeOH acidificado a 0,1% ácido fórmico de (30-40 min) 100% de (B) etapa de limpeza e (41- 50 min) 5% de (B) fase de recondicionamento da coluna. Volume da injeção 15 μ l. Fluxo de 1ml/min e detecção no UV (430mn).

A presença de um composto similar ao APO foi detectada nas análises empregando HPLC-DAD método descrito em item 3.6.3. Na Figura 9 a fração *n*But foi submetida ao comprimento de onda em 430 nm, onde foi possível visualizar dois picos um majoritário referente ao APO (24,4 minutos, λ_{max} 436 nm) e outro minoritário não identificado (26,3 minutos e λ_{max} 412 nm). Enquanto a fração *n*-but apresentou um pico em 26,3 minutos e λ_{max} 429 nm. Além do tempo de retenção e UV próximos, a fração sub fração *C4* que concentrou o composto ainda não identificado apresentou coloração avermelhada, assim como o padrão APO, o que pode sugerir a presença de um composto similar ao APO.

4.7.1. Perfil metabólico via HPLC-DAD-ESI-MS e RMN de ^1H da fração *n*-butanólica

Os resultados das análises via HPLC-DAD-ESI-MS (Figura10) indicam novamente uma matriz complexa com regiões onde é possível a detecção de picos nos modos negativo, positivo e também o modo de detecção do UV em (254nm)

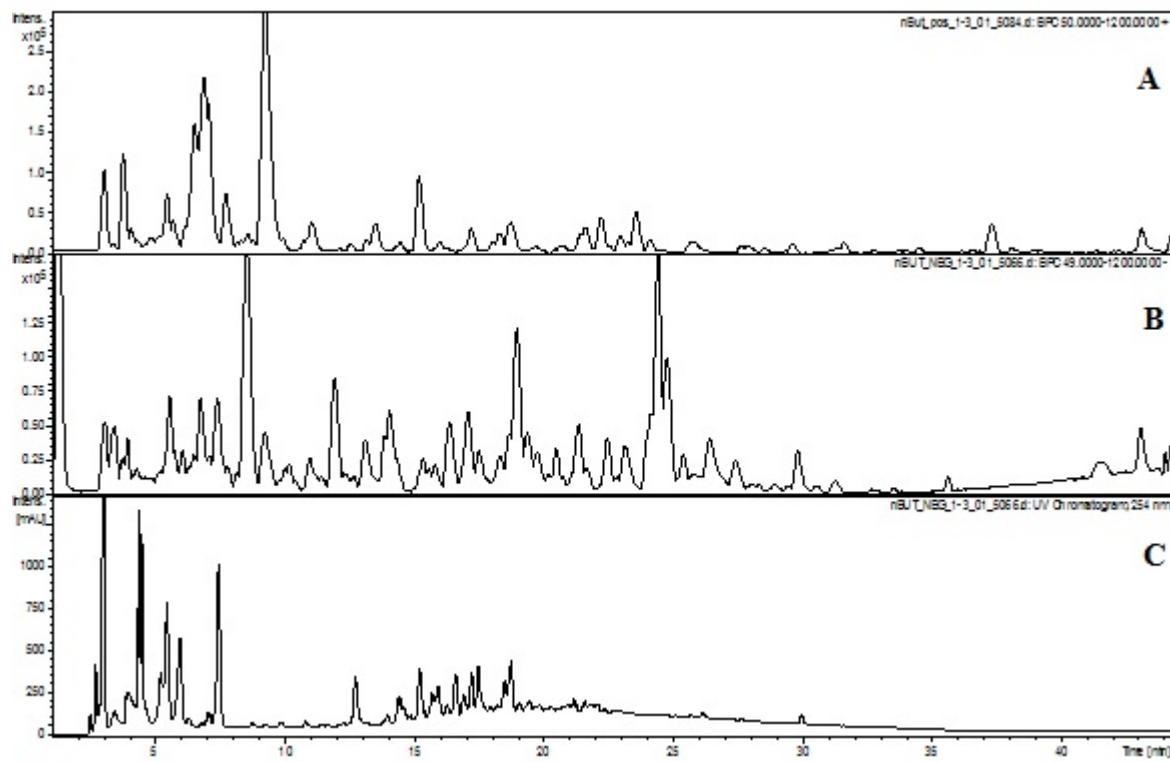


Figura 10. Perfil da fração *n*-But. Onde em (A) TIC – Total de ions do cromatograma $[H]^-$ (modo negativo). (B) TIC – Total de ions do cromatograma $[H]^+$ (modo positivo) e (C) UV (254 nm).

As informações de tempo de retenção, espectro no UV e massas obtidas pelo sistema HPLC-DAD-ESI-MS foram utilizadas na tentativa de identificação dos metabólitos presentes na fração *n*-butanólica. Um banco de dados de massa molecular *in house* construído a partir de metabólitos identificados em cana-de-açúcar (Cavalheiro *et al* 2012) foi empregado como filtro para a etapa de identificação. A massa do íon pseudomolecular (m/z) dos metabólitos identificados em cana-de-açúcar foram localizados no cromatograma do íon extraído (EIC-Extracted Ion Chromatogram) no modo negativo da fração *n*-butanólica. A (Figura 11) mostra o Cromatograma de Pico Base (BPC – Base Peak Chromatogram) da fração *n*-butanólica no modo negativo e no UV (254 nm) e os respectivos compostos identificados (Tabela 9).

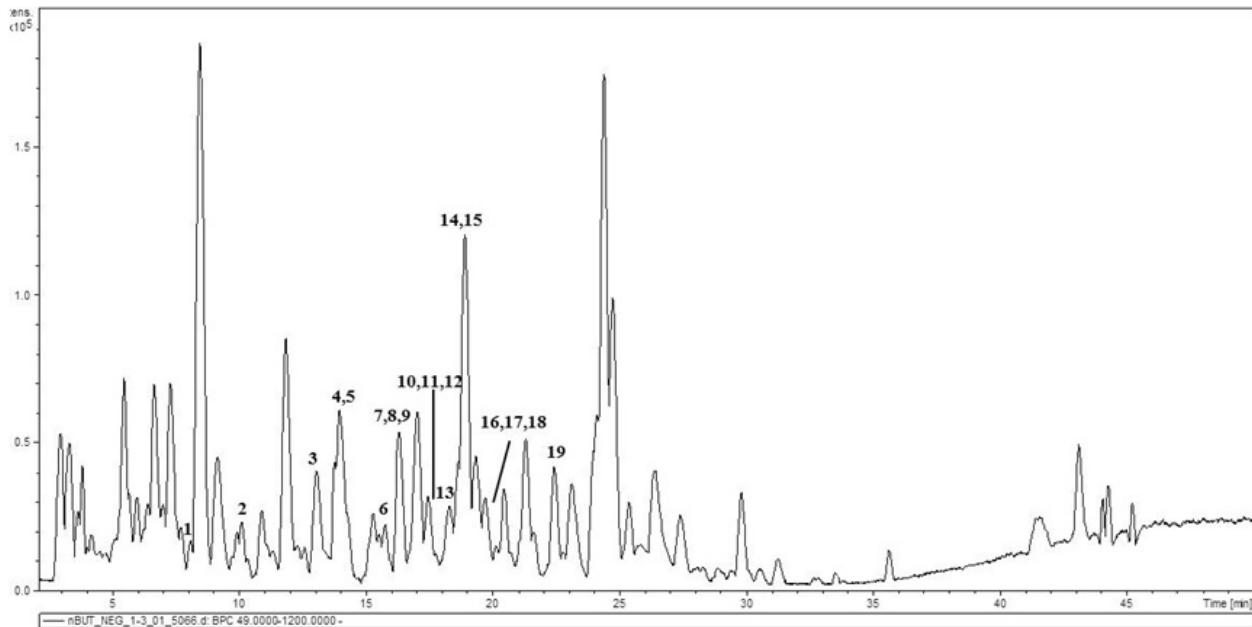


Figura 11. Cromatograma de Pico Base da fração *n*-butanólica das folhas de *A. simplex*.

Com base nas análises empregadas, foram identificados um total de 19 compostos, sendo 10 derivados de ácido benzoico e 9 flavonas *C*-glicosiladas. No espectro de massas dos compostos **1**, **3-7** e **17** foi possível visualizar os fragmentos formados na fonte de ionização. Com essa informação foi possível atribuir os íons fragmentos dos compostos identificados. O espectro de massas do ácido *p*-hidroxibenzóico (**3**) mostrou íon pseudomolecular m/z 137 [M-H]⁻, assim como o íon fragmento m/z 93, devido à perda de CO₂. O mesmo foi observado para os metabólitos **4**, **5** e **6**. Os compostos **3**, **4** e **7** foram isolados da sub fração C2 (Figura 8, ítem 3.6.3) e obtiveram a estrutura confirmada nos espectros de RMN de ¹H. O espectro do metabólito **3** mostrou dois dupletos em δ 6,88 d ($J=8,5$ Hz) e δ 7,87 d ($J=8,5$) correspondente aos hidrogênios 2/6 e 3/4 do ácido benzoico. O metabólito **4** mostrou dois dupletos δ 7,55 d ($J=1,8$ Hz) e 6,91 d ($J=8,0$) e um duplo dupletos δ 7,53 dd (1,8 e 8,0 Hz) correspondente aos hidrogênios 2, 6 e 3, respectivamente do ácido benzoico. O ácido dimetoxi-hidroxi-benzóico (**7**) mostrou dois simples δ 7,32 correspondente aos hidrogênios 2 e 6 do anel aromático, e δ 3,91 corresponde aos dois grupos metoxila ligado no anel aromático na posição 3 e 5.

Tabela 12. Tentativa de identificação dos metabólitos presente na fração *n*-butanólica empregando HPLC-DAD-ESI(-)-MS.

No.	TR	[M-H] ⁻	UV (λ_{max})	Tentativa de identificação
1	8,1	299.0858	265	Ácido hidroxibenzóico glicosídeo
2	10	179.0599	-	Ácido caféico
3	13,8	137.0271	265	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
4	14	153.0260	265	Ácido dihidroxibenzóico
5	14,3	151.0434	-	Ácido metoxi-benzóico
6	15,5	329.1342	-	Ácido metoxi-hidroxi-benzóico glicosídeo
7	16,4	197.0511	-	Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidrobenzóico
8	16,5	593.1662	345/271	Luteolina di-glicosídeo
9	16,8	579.1522	345/271	Luteolina-6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glicosídeo
10	17,5	447.2346	345/271	Luteolina-8- <i>C</i> -glicosídeo
11	17,8	579.1510	345/271	Luteolina-6- <i>C</i> -glicosil-8- <i>C</i> -arabinosídeo
12	18	563.1578	333/270	Apigenin-6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glucoside
13	18,3	153.0264	270	Isômero do ácido dihidrobenzóico
14	18,7	167.0391	-	Ácido metoxi-hidroxi-benzóico
15	18,7	447.2323	345/271	Luteolina-6- <i>C</i> -glicosídeo
16	19,3	563.1562	333/270	Apigenina-6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glicosídeo
17	21,2	151.0439	270	Ácido metoxi-benzóico
18	20,6	431.1099	333/270	Apigenina-8- <i>C</i> -glicosídeo
19	22,8	4.312.324	333/270	Apigenina-6- <i>C</i> -glicosídeo

Os derivados de apigenina (**11, 15-16**) e luteolina (**8-11, 15**) foram identificados devido a absorção característica destes compostos no UV (λ_{max} 333/270 e 345/270 nm), espectro de massas e ordem de eluição em C-18 de acordo com o trabalho de (Coutinho *et al* 2014).

A presença de compostos fenólicos é confirmada através do perfil espectral via RMN de ¹H da fração *n*-but, devido a uma grande quantidade de sinais na região de 6-9 ppm característicos de compostos fenólicos, evidenciando a complexidade da fração *n*-but. Foi possível observar sinais característicos na região de 3-6 ppm referentes a unidades de açúcar.

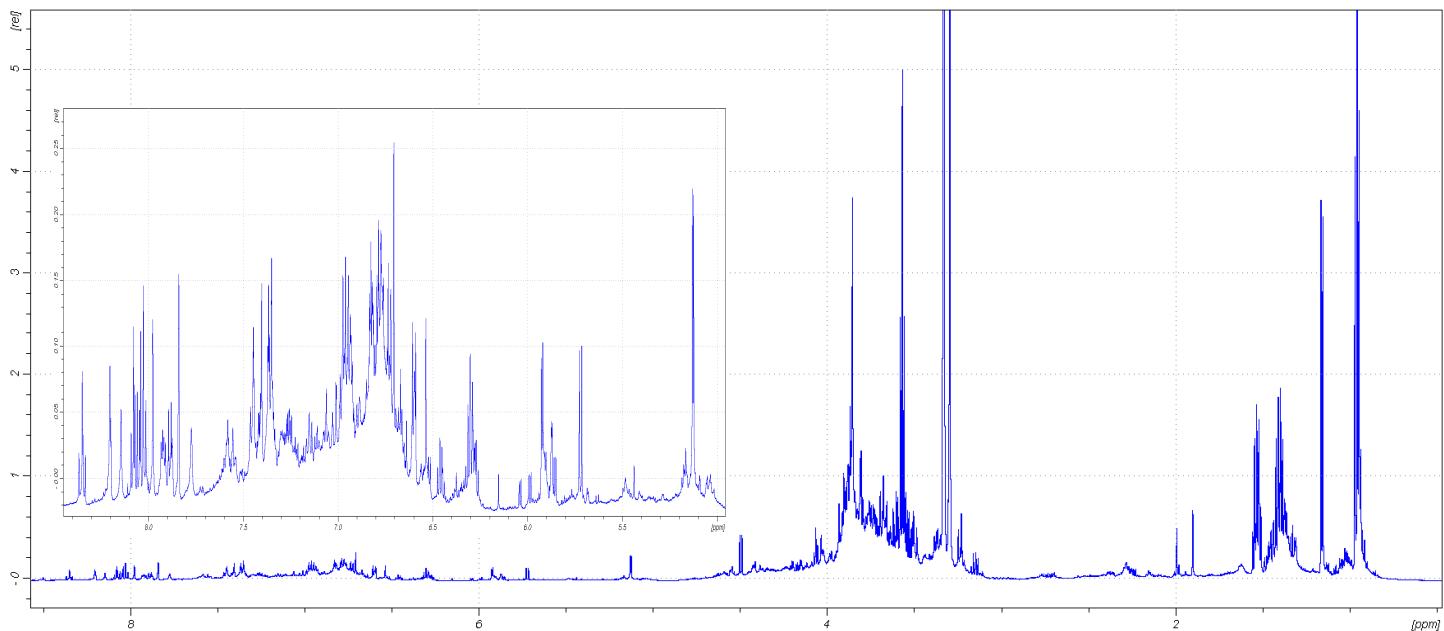


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H da fração n-but (CD₃OD/D₂O 1:1 v/v, 600 MHz).

Além dos derivados de ácido benzoico e flavonas identificados nas análises via HPLC-DAD-ESI-MS no modo negativo foram tentativamente identificados os derivados de benzoaxinonas (20-24): BOA, MBOA, MBOA glicosilado, DIMBOA glicosilado e AAPO através das análises de HPLC-DAD-ESI-MS no modo positivo, devido a facilidade destes compostos em protonarem.

Tabela 13. Tentativa de identificação dos benzoaxinonas na fração *n*-butanólica de *A. simplex* empregando HPLC-DAD-ESI(+)-MS.

No.	RT	[M+H]	Tentativa de identificação
20	6,5	136,0580	BOA
21	8,6	166,0823	MBOA
22	9,2	328,1264	MBOA glicosilado
23	14,9	374,2035	DIMBOA glicosilado
24	38,9	255,1860	AAPO

4.7. Análises cromatográficas para detecção de compostos fitotóxicos no solo por UHPLC.

As amostras do solo foram adquiridas com base no protocolo proposto por (Perry *et al.* 2005) com adaptações. O perfil químico do solo foi qualitativamente diferente dos extratos de folhas de bambu. Para esta análise, o ácido *p*-benzólico em identificado 26,328 min foi o único ácido fenólico em comum entre os extratos de solo e planta de *A. simplex*. A presença do ácido *p*-benzólico foi confirmado no espectro de RMN de ^1H do extrato do solo (Figura 14) devido a presença dos sinais δ 6,64 *d* (8,3 Hz) e 6,95 *d* (8,3 Hz).

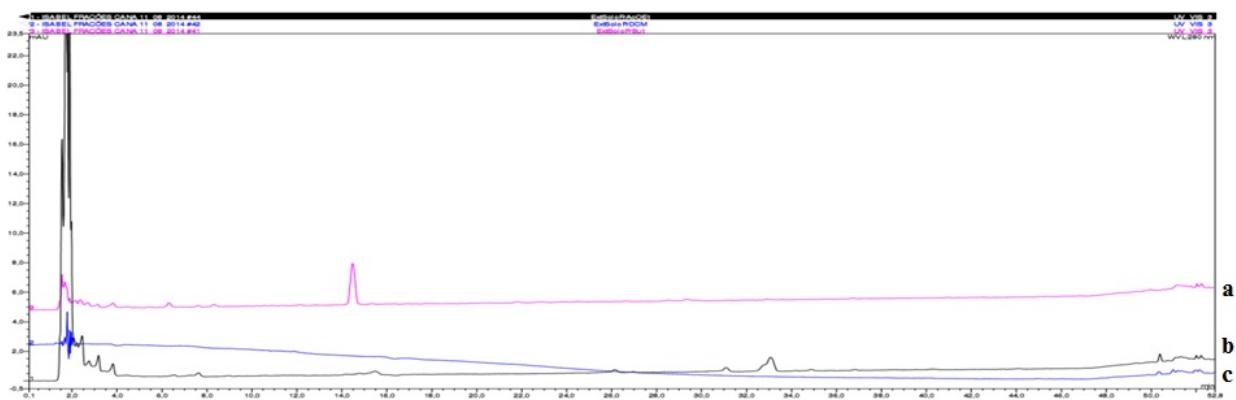


Figura 13. Perfis cromatográficos obtidos por UHPLC (em 350 nm) das diferentes frações de solo na área de ocorrência de *A. simplex* (a) fração *n*-butanol, (b) diclorometano e (c) acetato de etila.

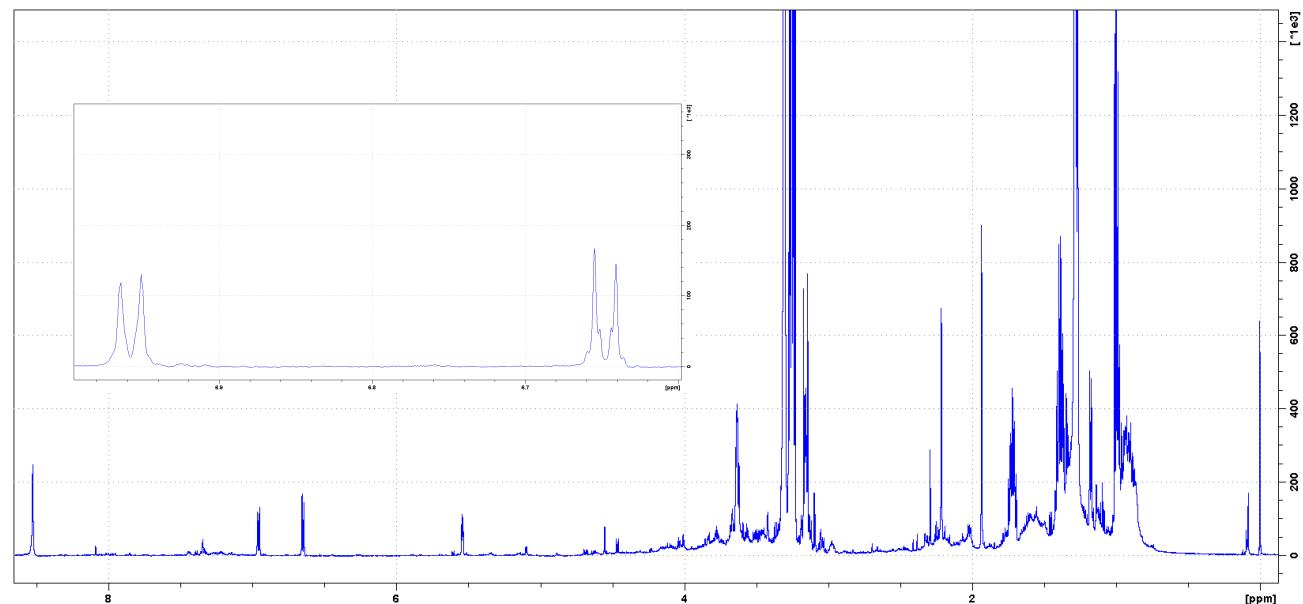


Figura 14. Ácido *p*-benzólico no espectro de RMN de ^1H do extrato do solo, sinais δ 6,64 *d* (8,3 Hz) e 6,95 *d* (8,3 Hz).

4.9. Caracterização dos componentes químicos do solo

Os dados referentes à análise da composição química do solo coletado em áreas sob dominância ou não de bambu mostraram, de forma geral solos muito semelhantes. Diferenças foram encontradas na quantidade (Fe) e (M.O) presentes em maiores concentrações nas áreas de ocorrência. Os demais componentes estão em concentrações iguais ou similares.

4.10. Análise de componentes bióticos do solo – FMA

Com os resultados obtidos das análises das raízes de *A. simplex* foi possível sequenciar e identificar 15 clones. Destes, foram identificadas, oito espécies de *Glomus*, duas espécies de *Aculus*, dois espécimes pertencentes à família Archaeosporales. Quatro sequências não possibilitaram identificação.

Tabela 14. Análise química de amostras coletadas do solo. Fora da área de ocorrência de *A. simplex* e dentro da área de ocorrência.

Amostra	pH	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	m
Fora	3,9	17	10	1,4	5	3	26	98	9,2	107,3	9	74
Dentro	3,7	22	9	1,5	5	2	28	121	9	130,1	7	75
<hr/>												
Amostra	B		Cu		Fe		Mn		Zn		M.O.(1) g/dm³	
Fora	0,16		<0,3		251		4,8		0,8		47	
Dentro	0,2		<0,3		352		3,5		1		63	

Unidades: P e S-SO₄ (mg.dm⁻³); K, Ca, Mg, Al, H+Al, SB e CTC (mmolc.dm⁻³); V e m (%). Métodos: Fósforo (P) por colorimetria extraído com resina trocadora de íons, pH CaCl₂, potássio (K) em espectrofotômetro de emissão atômica extraído com resina trocadora de íons, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em espectrofotômetro de absorção atômica extraído com resina trocadora de íons, alumínio trocável (Al) por colorimetria extraído com cloreto de potássio, acidez potencial (H+Al) extraído com tampão SMP, enxofre (S - sulfato) por turbidimetria extraído com fosfato de cálcio. SB: Soma de bases trocáveis; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação da CTC por bases; m: Saturação por Alumínio. Boro, Cobre, Ferro, Manganês, Zinco (mg.dm⁻³). Métodos: Boro (B) por colorimetria extraído em água quente, cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) por espectrofotometria de absorção atômica extraído com DTPA (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001).

5. Discussão

Os resultados obtidos apontam que o órgão do bambu *Apoclada simplex* que apresenta acumulo de substâncias com atividade fitotóxica é a folha, este resultado corrobora com a literatura que descreve a presença de aleloquímicos na folha de outras espécies de bambus nativos (Grombone-Guaratini *et al.* 2009, 2013) e não nativos de (Chou & Hou 1981, Chou & Yang 1982). Em outros trabalhos os compostos aleloquímicos são relatados em folhas, caules e raízes (Inderjit & Callaway 2003; Weir *et al.* 2004).

O extrato de folha aquosa (FA) obteve maior efeito nas espécies testadas (48,6% de inibição; ANOVA $p < 0,01$) da germinação de tomate. A extração aquosa é descrita como o principal método utilizado para extração de aleloquímicos (Schmidt 1990). A capacidade inibitória foi confirmada nos ensaios em função da concentração aplicada, onde os resultados mostraram a existência de uma resposta espécie específica. Esta resposta pode afetar também as plantas em diferentes partes de seu desenvolvimento (germinação e crescimento).

As sementes de arroz não apresentaram sensibilidade às diferentes concentrações do extrato na germinação; entretanto, em relação ao crescimento o extrato chegou a inibir (27% da parte subterrânea e 16% da parte aérea ANOVA $p < 0,01$). Mesmo em concentrações menores para esta espécie foi possível observar o efeito fitotóxico do extrato. Segundo Miró *et al.* (1998) e Aquila (2000) o efeito alelopático é mais pronunciado sobre o desenvolvimento inicial de uma plântula alvo quando comparado a germinação, já que neste a planta utiliza das próprias reservas da semente.

Bioensaios de germinação de sementes e de crescimento das plântulas são geralmente utilizados nos estudos que se propõe a avaliar a atividade alelopática (Chou & Yang 1982, Chou 2010). O estabelecimento de em função da concentração aplicada em experimentos é considerado um bom indicador de atividade alelopática (Inderjit & Weston 2000). Qualquer composto orgânico ou inorgânico pode, teoricamente, estimular, ser neutro ou inibir (atividade fitotóxica) e estas variações se dão em função da sua concentração e estado físico, sendo que, o tipo e o padrão de efeito observado podem variar de acordo com sensibilidade (Blum 2011).

Os resultados obtidos nos testes de germinação das sementes e analisados segundo dois parâmetros (IVG) e (% de final de inibição), mostram alterações em dois mecanismos de ação dos extratos. Segundo Labouriau (1983) muitas vezes o efeito

alelopático não é verificado sobre o percentual final de germinação, e sim mediante a avaliação da velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo. Este mesmo padrão de resposta foi observado em outros experimentos utilizando outras espécies (Borghetti & Pessoa, 1997; Rodrigues *et al.* 1999). Entretanto a maioria dos trabalhos apresenta somente os dados referentes à germinação em função da facilidade de obter estes dados (Rice, 1984; Putnam & Tang 1986).

As três frações obtidas - Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*-But) apresentaram atividade fitotóxica. O método de fracionamento utilizado, partição líquido - líquido é questionado por Inderjit & Nilsen (2003); segundo os autores, a extração ou partição com solventes orgânicos que são posteriormente evaporados e diluídos em água, pode alterar a concentração natural que o composto estaria disponível no ambiente. Entretanto o método de fracionamento é utilizado em outros trabalhos (Grombone-Guaratini *et al* 2011; Torres *et al* 2014 submetido), uma vez que este método permite isolar os compostos ativos envolvidos na atividade avaliada. Além disso, espécies como bambu apresentam uma matriz muito complexa de seu extrato bruto (cerca de 500 picos de compostos), o que dificulta a identificação dos compostos ativos.

Os bioensaios de germinação e crescimento utilizando as frações obtidas do extrato aquoso de folha com espécies agrícolas e nativas mostraram o mesmo padrão obtido com o extrato FA: foram espécie específico, atuaram em diferentes fases do desenvolvimento (germinação e crescimento) e alguns apresentaram correlação positiva em função da concentração aplicada. Inibição espécie específica tem sido observado com aplicação de extratos e frações de *Phragmites communis* Trin. (Poaceae) e *Helianthus annuus* L. (Asteraceae) (Bogatek *et al.* 2006). Embora *E. verna* e *M. bimucronata* pertencem à mesma família botânica, elas aparentemente apresentam têm susceptibilidade distinta a aleloquímicos (Schultz & Wieland 1999). Esta susceptibilidade diferencial pode ser devido a características de *M. bimucronata*, que é uma espécie invasora agressiva com capacidade para colonizar áreas abertas. Além disso, a espécie produz aleloquímicos, como mimosina e 3,4-dihydroxypyridine (Ferreira *et al.* 1992). A susceptibilidade aos aleloquímicos e o potencial de desintoxicá-los apresentados por espécies diferentes pode ser resultado de um processo coevolutivo (Schulz e Wieland, 1999). Processos coevolutivos podem aumentar a capacidade de tolerância de uma planta aos aleloquímicos produzidos por seus vizinhos e essa tolerância pode desempenhar um papel importante no estabelecimento de comunidades

de plantas (Callaway e Maron 2006; Thorpe *et al.* 2009). A maior suscetibilidade das plantas agrícolas, aos aleloquímicos, pode ser explicada pela ausência de coexistência no mesmo habitat.

As análises de germinação e crescimento de espécies nativas realizadas com padrões isolados e em mistura de fenólicos descritos na literatura como presentes em bambus e gramíneas, não apresentou efeito significativo sobre a germinação. Enquanto a parte aérea e parte subterrânea de *M. bimucronata* foi gravemente afetado por ácido vanílico e pela mistura de ácidos fenólicos, *E. verna* só foi afetada pela mistura de fenólicos.

A diferença da concentração entre os ácidos fenólicos comerciais utilizados nos bioensaios e nos extratos e nos extratos orgânicos é uma possível explicação para os efeitos diferenciais observados em bioensaios realizados (Blum 2014). Neste trabalho utilizamos concentrações de ácidos fenólicos previamente determinadas como ativas em outros estudos (Blum *et al.* 1985a; 1985b; Lehman e Blum, 1999; Chaves *et al.* 2001; Sánchez-Moreiras e Reigosa 2005). Dessa forma é possível que estes valores não correspondem à concentração eficaz encontrado nos extratos e frações. Além disso, a concentração de um composto individual pode ser substancialmente diferente de uma mistura (Blum *et al.* 1999). Alternativamente, a ação de ácidos fenólicos na mistura pode não ser sinérgica e sim antagonista dependendo da concentração que se encontra (Blum *et al.* 1989). Embora *M. bimucronata* tenha apresentado menos sensibilidade aos padrões foi possível observar que a espécie na presença de ácido vanílico apresentou os cotilédones amarelo pálido com manchas castanhas sugerindo um sintoma fisiológico descrito como clorose. Sabe-se que aleloquímicos podem reduzir o teor de clorofila através da inibição da síntese ou da estimulação da degradação (Zhou & Yu 2006). O efeito do ácido vanílico na taxa fotossintética e condutância estomática foi relatada por Patterson (1981). A clorose foi um sintoma já descrito para plantas expostas para BOA e DIBOA e foi associado com um inibidor herbicida fotossintética (Barnes & Putnam 1987).

A maioria dos estudos que avaliam a presença de fungos arbusculares em bambus estão interessados na relação entre a inoculação de fungos e o aumento de biomassa nessas plantas (Ravikumar *et al.* 1997; Jha *et al.* 2011). Um estudo recente, na Índia descreveu a presença de seis espécies de fungos arbusculares na rizosfera de *Dendrocalamus strictus* (*Acaulospora scrobiculata*, *Glomus aggregatum*, *G. arboreum*, *G. diaphanum*, *G. intraradix* and *G. invermayanum*) (Jha *et al.* 2011). *Glomus*, o gênero

mais abundante em *A. simplex* é também o mais comum em *Dendrocalamus*.

Em estudos realizados por (Silva *et al.* 2006), em área de floresta Atlântica, em propriedades com produção agrícola, em bananeiras (Musaceae) e mandioca (Euphorbiaceae) foram identificados como mais abundantes os gêneros *Acaulospora* e *Glomus*, este também presente em *A. simplex*.

As interações mutualísticas com fungos endofíticos são essenciais para a ecologia e a fisiologia de plantas terrestres, tendo em vista que aumentam a performance da planta frente a vários estressores ambientais como nutrientes e água (Strack *et al.* 2003). Associado a isso, sabe-se que podem atuar aumentar o desempenho da planta por diferentes vias: aumentando o tamanho ou a biomassa das raízes, aumentando as defesas através da produção de alcalóides, alterando a comunidade microbiana do solo, aumentando a habilidade de competitividade (Aschelhough *et al.* 2012). Tem-se também conhecimento de as interações alelopáticas podem ser mediadas pela comunidade microbiana tendo em vista que fenólicos e flavonoides exsudados de raízes de plantas afetam a abundância de fungos micorrízicos arbusculares, que auxiliam a tolerância das plantas a vários fatores bióticos e abióticos de *stress* (Mieners *et al.* 2012).

A identificação dos FMA nas raízes de *A. simplex* é um passo importante para direcionar posteriores estudos de reprodução *in vitro* da espécie, e abre novas perspectivas para futuros trabalhos. Entretanto, mais trabalhos serão necessários para determinar o papel destes compostos nos mecanismos alelopáticos de invasão de *A. simplex*.

Dentre os resultados apresentados em relação à composição da química do solo, poucas diferenças foram encontradas entre a área de ocorrência e não ocorrência de *A. simplex*. As propriedades químicas do solo encontradas na área de ocorrência de *A. simplex* são similares às descritas por Faoro *et al.* (2010) para outras áreas de floresta Atlântica onde com solos distróficos, com baixo pH e alta saturação de alumínio. A decomposição da matéria orgânica é a principal fonte de ácidos orgânicos no solo, mas a lavagem direta da palha dos resíduos vegetais e a produção de exsudados radiculares e microbianos também são outras importantes fontes desses ácidos (Pavinato & Rosolen 2008).

Os compostos fenólicos identificados por este trabalho, já foram previamente caracterizados como compostos alelopáticos em estudos realizados para diversas espécies. Para bambus compostos como o ácido málico, trans cinâmico, vanílico, benzoico, ferúlico e siríngico foram identificados, em frações ativas dos extratos de

plantas por Young et al., (1994); Jin *et al.* (2011) e caracterizados como inibidores eficazes tanto da germinação quanto do desenvolvimento de plântulas (Rice 1984; Inderjit 1996; Gniazdowska & Bogatec 2005; Weston & Mathesius 2013). De maneira geral, compostos fenólicos têm mecanismos de ação similares e atuam predominantemente na permeabilidade e nas funções das proteínas das membranas celulares (Einhelling 2004). Aparentemente a presença os compostos fenólicos aumenta a atividade alelopática devido ao efeito sinérgico inibitório (Chaves et al., 2001; Einhelling 2004).

Os C-flavonóides: luteolina di-glicosídeo, luteolina-6-C-arabinosil-8-C-glicosídeo, luteolina-8-C-glicosídeo, luteolina-6-C-glicosil-8-C- (isovitexina e orientina) foram identificados nos extratos de folhas de *A. simplex*. A presenças destes compostos foi descrita para outras espécies de bambu (Wang *et al.* 2012; Grombone-Guaratini *et al.* 2011) e podem ser encontrados no solo nas fases iniciais da decomposição de folha (Souto et al., 1994; Gonzalez et al., 1995; Sosa et al., 2010; Cesco *et al.* 2012; Torres *et al.* 2015) e podem ser responsáveis pela diminuição da diversidade e abundância de espécies lenhosas mediante a diminuição da germinação de sementes (Larkren et al., 2011). Ácidos fenólicos como os identificados em *A. simplex*: ácido caféico, ácido *p*-hidroxibenzólico, ácido dihidroxibenzólico, ácido metoxibenzólico, ácido metoxi-hidroxi-benzólico glicosídeo, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidrobenzólico e flavonoides, já tem atividade comprovada pela literatura, segundo Ishii-Iamamoto *et al.* (2006) afetam a atividade respiratória de tecidos intactos e mitocôndrias. Ácido benzoico e seus derivados podem inibir a captação de nutrientes, este efeito é associado a alterações na membrana (Einhellig 1995; Inderjit *et al.* 2002). O papel dos flavonóides em atividade alelopática está relacionado à quebra de auxina por oxidases e peroxidases e transporte de auxina (Mathesius 2001; Weston & Mathesius 2013).

O aumento da velocidade de germinação, ou aumento do crescimento na presença das frações pode ser um indício da presença de determinados hormônios, como comprovado por estudos realizados com várias espécies de bambu (*Phyllostachys edulis*, *P. bambusoides* e *Sasa kurilensis*) indicaram a presença giberelina (GA) (Samsoedin *et al.* 1996).

A presença dos compostos nitrogenados: 2-benzoxazolinone (BOA), 7-methoxy-2-Benzoxazolinone (MBOA), 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA), 2-acetemidophenoxazin-3-one (AAPO) é descrita para diversos gêneros de

plantas da família Poaceae. Para as espécies *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, e *Zea mays* tais compostos foram caracterizados como os principais metabólitos secundários e podem apresentar alta atividade fitotóxica (Macías *et al.* 2008). Estes compostos são derivados a partir de aminoácidos aromáticos, através do chiquímico via do ácido e parecem ser onipresente na família. (Whitenack *et al.* 1988). Os compostos isolados (DIBOA) e (BOA) inibiram o crescimento de mudas de muitas espécies de plantas daninhas e o crescimento da alga *Clamydomonas rheinhardtii* (Schreiner & Reed 1908 *apud* Putnam 1988). Segundo o autor o trabalho de 1908 foi o primeiro a relatar que estes compostos poderiam ser libertados a partir de plantas e podia permanecem tóxicos no solo. Desde então, vários compostos deste grupo (BOA, DIMBOM, DIBOA, MBOA) têm sido isolados a partir de plantas e solos (Putnam 1988).

O composto encontrado e não identificado na fração *n*-But é bastante similar ao APO (2-aminophenoxazine-ona) um dos compostos mais fitotóxicos, gerado a partir do DIBOA aleloquímico encontrado em gramíneas (4-hidroxi- (2H) -1,4-benzoxazina-3 (4H)-ona) por alteração microbianas que ocorrem no solo (Macias *et al.* 2005).

Embora tenhamos avaliado a interação ecológica de *Apoclada simplex* com outras espécies em um sistema artificial (placas de Gerbox), os resultados obtidos por este estudo fornecem evidências de que a alelopatia é um possível mecanismo atua na estruturação de comunidades dominadas por *A. simplex*. Entretanto, somente a identificação dos compostos no solo poderá confirmar a hipótese da atividade alelopática de *A. simplex* em floresta atlântica.

A presença dos fungos arbusculares nas raízes pode ser um fator que influencie a produção de compostos e que aumente a competitividade de *A. simplex*. Entretanto, outros estudos precisam avaliar a complexidade desta interação.

6. Referencias bibliográficas

- Abhilasha D., Quintana N., Vivanco J. & Joshi J.** 2008. Do allelopathic compounds in invasive *Solidago canadensis* s.l. restrain the native European flora? *Journal of Ecology* 96: 993-1001.
- Agrawal A. A.** 2004. Resistance and susceptibility of milkweed: competition, root herbivory, and plant genetic variation. *Ecology* 85:2118–2133.

An M., Pratley J. E. & Haig T. 2000. Phytotoxicity of *Vulpia residues*, II: Separation, identification, and quantitation of allelochemicals from *Vulpia myuros*. *Journal of Chemical Ecology* 26:1465–1476.

APWEB. 2008. APWEB (Angiosperm Phylogeny Website). <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>. Acessado em 10/03/2015.

Aschehoug E. T., Metlen K., Callaway R. M. & Newcombe G. 2012. Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology* 93:3–8.

Aschehoug E. T., & Ragan M. & Callaway 2014. Morphological variability in tree root architecture indirectly affects coexistence among competitors in the understory. *Ecology* 95:1731–1736. <http://dx.doi.org/10.1890/13-1749.1>

Aquila M. E. A. 2000. Efeito alelopático de *Ilex* & A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. *Iheringia* 53: 51-66.

Barnes J. P. & Putnam A. L. 1987. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Chemical Ecology* 13:889-906.

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., Park S., Weir. T. L., Callaway R. M. & Vivanco J. M. 2004 How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Science*. 9:26–32. doi:10.1016/j.tplants.2003.11.008.

Begon M., Colin R. T. & John L.H. 2007. Ecologia de Indivíduos a ecossistemas. 4ed. **Blum U., Dalton B. R. & Shann J. R.** 1985a. Effects of various mixtures of ferulic acid and some of its microbial metabolic products on cucumber leaf expansion and dry matter in nutrient bioassay. *Journal of Chemical Ecology* 11:619–641.

Blum U., Dalton B. R. & Shann J. R. 1985b Effects of ferulic and p-coumaric acids in nutrient bioassay of cucumber leaf expansion as influenced by pH. *Journal of Chemical Ecology* 11:1567–1582.

Blum U., Gerig T. M. & Weed S. B. 1989. Effects of mixtures of phenolic acids on leaf expansion of cucumber seedlings grown in different pH Portsmouth A1 soil materials. *Journal of Chemical Ecology* 15:2413–2423.

Blum U., Shafer S. R. & Lehman M. E. 1999. Evidence for Inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. an experimental model. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 673-693.

- Blum U. & Gerig T. M.** 2005. Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acids: nutrient culture studies. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1907-1932.
- Blum U. & Gerig T. M.** 2006. Interrelationships between *p*-coumaric acid, evapotranspiration, soil water content, and leaf expansion. *Journal of Chemical Ecology* 32: 1817-1834.
- Blum U., Shafer S. R. & Lehman M. E.** 1999. Evidence for Inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. an experimental model. *Critical Review in Plant Science* 18: 673-693.
- Blum U.** 2011. Plant-plant allelopathic interactions: Phenolic acids, cover crops, and weed emergence. Springer Science and Business Media, Dordrecht.
- Blum U.** 2014. Plant-Plant Allelopathic Interactions II. Laboratory Bioassays for Water-Soluble Compounds with an Emphasis on Phenolic Acids. Springer International Publishing, Switzerland.
- Blum U. & Dalton B. R.** 1985. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on leaf expansion of cucumber seedlings grown in nutrient culture. *Journal of Chemical Ecology* 11:279–301.
- Bogatek R., Gniazdowska A., Zakrzewska W., Oracz K. & Gawronski S. W.** 2006. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. *Biologia Plantarum* 50:156-158.
- Borghetti F. & Pessoa D.M.A.** 1997. Autotoxicidade e alelopatia em sementes de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae). In: L.L. Leite & C.H. Saito (orgs.). Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado. Editora da UnB, Brasília, DF, pp. 54-58.
- Calderón C.E. & Soderstrom T.R.** 1980. The genera of Bambusoideae (Poaceae) of the American continent: keys and comments. *Smithsonian Contributions to Botany* 44:1:27
- Callaway R. M. & Maron J. L.** 2006. What have exotic plant invasions taught us over the past 20 years? *Trends Ecology Evolution* 21:369-374.
- Callaway R. M. & Ridenour W. M.** 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2:436–443.
- Cavalheiro A. J., Coutinho I. D., Leme G. M., Silva A. A. & Silva A. P. D.** 2012. Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal

para bioenergia. In: N. R. Stradiotto, E. G. Lemos (eds). Bioenergia: pesquisa, desenvolvimento e inovação – Parte I: biomassa para bioenergia. São Paulo: Cultura Acadêmica, pp. 13-34.

- Cesco S., Mimmo T., Tonon G., Tomasi N., Pinton R., Terzano R., Neumann G., Weisskopf, L. Renella G., Landi L. & Nannipieri P.** 2012. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biological and Fertility of Soils* 48:123-149.
- Chaves N., Sosa T. & Escudero J. C.** 2001. Plant growth inhibiting flavonoids in exudates of *Citrus ladanifer* and associated soils. *Journal of Chemical Ecology* 27: 623 – 631.
- Chiapusio G., Sánchez A. M., Reigosa M. J., González L. & Pellissier F.** 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *Journal of Chemical Ecology* 23:2445-2453.
- Chou C. H.** 2010. Role of allelopathy in sustainable agriculture: use of allelochemicals as naturally occurring bio-agrochemicals. *Allelopathy Journal* 25:3-16.
- Chou C. H. & Hou M. H.** 1981. Allelopathic researches of subtropical vegetation in Taiwan I. Evaluation of allelopathic potential of bamboo vegetation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 5:14-27.
- Chou C. H. & Yang C. M.** 1982 Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan II. Comparative exclusion of understory by *Phyllostachys edulis* and *Cryptomeria japonica*. *Journal of Chemical Ecology* 8:1489-1502.
- Coley P. J. P. & Bryant F. S.** 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science, USA*, v.230, 4728:895-899.
- Coutinho I. D., Leme. M. G., Creste S., Hojo O., Carneiro R. L., Bolzania V. S. & Cavalheiro J. A.** 2014. HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes. *The Royal Society of Chemistry*. DOI: 10.1039/c4ay01750a.
- Cruz-Ortega R., Ayala-Cordero D. & Anaya A. L.** 2002. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize and tomato. *Physiologia Plantarum* 116: 20-27.
- Cummings J., Parker I. M. & Gilbert G.S.** 2012. Allelopathy: A tool for weed management in forest restoration. *Plant Ecology*. doi: 10.1007/s11258-012-0154-x

- Czarnota M. A., Paul R. N., Dayan F. E., Nimbal C. I. & Weston L. A.** 2001. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII inhibitor in Sorghum spp. root exudates. *Weed Technol* 15: 813–825
- De Candolle A. P.** 1832 *Physiology Vegetale*. Paris.
- Demain A. L. & Fang A.** 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 69:1–39.
- Ding J., Sun Y., Xiao C. L., Shi K., Zhou Y. H. & Yu J. Q.** 2007. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and fig leaf gourd plants to cinnamic acid. *The Journal of Experimental Botany* 58: 3765–3773.
- Duke S. O.** 1986. Microbially produced phytotoxins as herbicides a perspective. In: Putnam AR, Tang C-S (eds). *The science of allelopathy*. Wiley, New York, 287–304
- Einhelling F. A.** 2004. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: Einhelling F. A., Macías F. A., Galindo J. C. G., Molinillo J. & Cutler H.G. (eds). *Allelopathy*. CRC Press, Boca Raton, pp. 217–233.
- Ens E. J. & French K.** 2009. Evidence for allelopathy as a mechanism of community composition change by an invasive exotic shrub, *Chrysanthemoides monilifera* spp. *Rotundata*. *Plant Soil* 316:125–137.
- Escudero A., Albert M., J. Pita J. M. & Pérez-García F.** 2000. Inhibitory effects of *Artemisia herba-alba* on the germination of the gypsophyte *Helianthemum squamatum*. *Plant Ecology* 148:71–80.
- Faoro H., Alves A. C., Souza E. M., Rigo L. U., Cruz L. M., Al- alanabi S. M., Monteiro R. A., Baura V. A. & Pedrosa F. O.** 2010. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the southern Brazilian Atlantic Forest. *Applied Environmental Microbiology* 76: 4744–4749.
- Filgueiras T. S. & Santos-Gonçalves A. P.** 2004. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). *Bamboo Science and Culture* 18:7-18.
- Filgueiras T. S., Longhi-Wagner H. M., Viana P. L., Zanin A., Guglieri A., Oliveira R. C., de. Canto-Dorow T. S., Shirasuna R. T., Valls J. F. M. & Oliveira R. P.** 2011. Poaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB000193>).
- Gibson D. J.** 2009. *Grasses and grassland ecology*. New York: Oxford Univ. Press.

- González M. E., Veblen T. T., Donoso C. & Valeria. L.** 2002. Tree regeneration responses in a lowland *Notophagus*-dominated forest after bamboo dieback in South-Central Chile. *Plant Ecology* 161: 59-73.
- GPWG. (The Grass Phylogeny Working Group).** 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 373-457.
- Griscom B. W. & Ashton P. M. S.** 2003. Bamboo control of forest succession: *Guadua sarcocarpa* in Southeastern Peru. *Forest Ecology and Management* 175:445-454.
- Griscom B. W. & Ashton. P. M. S.** 2006. A self-perpetuating bamboo disturbance cycle in a neotropical forest. *Journal of Tropical Ecology* 22:587-597.
- Gniazdowska A. & Bogatek R.** 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologica Plantarum* 27:395–407.
- Grombone-Guaratini M. T., Jessen R. C., Cardoso-Lopes E. M. & Torres L. M. B.** 2009. Allelopatchic potencial of *Aulonemia aristulata* (Doll) MacClure, a native bamboo of Atlantic Rain Florest. *Allelopathy Journal* 24:183-190.
- Grombone-Guaratini M. T., Cardoso-Lopes E. M., Fukuda G.R., Markowitsih C. J. & Young M. C. M.** 2011. Avaliação do potencial alelopático de cinco espécies de bambu nativas: implicações para a dominância na estrutura florestal. *Anais do II Seminário Nacional da Rede Brasileira do Bambu* 50-56.
- Grombone-Guaratini M. T., Gaspar M., Oliveira V. F., Torres M. A. G. M., Nascimento M. A. & Aidar M. M. P.** 2013. Atmospheric CO₂ enrichment greatly increases photosynthesis and growth in a woody tropical bamboo from the Brazilian Atlantic Forest. *New Zealand Journal of Botany* 51:275-28.
- Grombone-Guaratini M. T., Jessen R. C., Cardoso-Lopes E. M. & Torres L. M. B.** 2009. Allelopatchic potencial of *Aulonemia aristulata* (Doll) MacClure, a native bamboo of Atlantic Rain Florest. *Allelopathy Journal* 24:183-190.
- Harper J. L.** 1961. Approaches to the study of plant competition. In F.L. Milthorpe (ed.) *Mechanisms in biological competition*. Society for Experimental Biology, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-39.
- Hierrero J. L. & Callaway R. M.** 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant Soil* 256:29-39.
- Huang P. M., Wang M. C. & Wang M. K.** 1999. Catalytic transformation of phenolic compounds in the soil. In: *Principles and Practices in Plant Ecology*: In: Inderjit.,

Dakshini. K. M. M., Foy. C. L. (eds). C. R. C. Press, Boca Raton, FL , pp. 287–306.

IAS (International Allelopathy Society). 1993 The first world congress of allelopathy, cadiz , Spain.

Inderjit. 1996. Plant phenolics in allelopathy. *Botanical Review* 62: 186-202.

Inderjit & Bhowmik P. C. 2004. Sorption of benzoic acid onto soil particles and its implications for allelopathy studies. *Biology and Fertility of Soils* 40: 345–348

Inderjit & Callaway R. M. 2003. Experimental designs for the study of allelopathy. *Plant and Soil.* 256:1-11.

Inderjit & Duke S. O. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217: 529-539.

Inderjit & Erik T. N. 2003. Bioassays and Field Studies for Allelopathy in Terrestrial Plants: Progress and Problems. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 22:3-4, 221-238, DOI: 10.1080/713610857.

Inderjit & Weiner J. 2001. Plantallelochemical interferenceorsoil chemical ecology? Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematics. 4:3–12. doi:10.1078/1433-8319-00011.

Inderjit & Weston L. A. 2000 Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? *Journal of Chemical Ecology* 26: 2111-2118.

Inderjit. 2001. Soil: environmental effects on allelochemical activity. *Agronomy Journal* 93:79–84.

Inderjit, Weston L. A. & Duke S. O. 2006. Challenges, achievements and opportunities in allelopathy research. *Journal of Plant Interactions* 1: 69-81, DOI: 10.1080/17429140600622535.

Inderjit, Karban R. & Callaway R. M. 2011. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends Ecology Evolution* 26:655–662.

Ishii-Iamamoto E. L., Abraham D., Sert M. A., Bonato C. M., Kelmer-Bracht A. M. & Bracht A. 2006. Mitocondrial as a site of allelochemical action. *In:* M. J. Reigosa, N. Pedrol and L. González, (eds). *Allelopathy: a physiological process with ecological implications.* Springer, The Netherlands, pp. 267-284.

Jha A., Kumar A., Saxena R. K., Kamalvanshi M. & Chakravarty N. 2010. Effect of arbuscular mycorrhizal inoculations on seedling growth and biomass productivity of two bamboo species. *Indian Journal of Microbiology.* DOI. 10.0.3.239/s12088-011-0213-3.

- Judziewicz E. J., Clark L. G., Londoño X. & Stern M.** 1999. American Bamboos. Washington, DC.: Smithsonian Institution.
- Nuñez L. A., Romero R. T., Ventura J. L., Blancas V., Anaya A. L. & Ortega R. C.** 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Cell and Environment* 29: 2009–2016 DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01575.x.
- Labouriau L. F. G.** 1983. A germinação de sementes. Washington, DC: Sec. Org. dos Estados Unidos.
- Larpkern P., Moe S. R. & Totland Ø.** 2011. Bamboo dominance reduces tree regeneration in a disturbed tropical forest. *Oecologia* 165:161-168.
- Lehman M. E. & Blum U.** 1999 Evaluation of ferulic acid uptake as a measurement of allelochemical dose: effective concentrations. *Journal of Chemical Ecology* 25: 2585–2600
- Lôbo D., Leão. T., Melo F. P. L., Santos A. M. M., & Abarelli M.** 2011. Forest fragmentation drives Atlantic forest of northeastern Brazil to biotic homogenization. *Diversity Distribution* 17: 287–296.
- Macías F. A., Marin. D., Oliveros-Bastidas A., Varela R. M., Simonet A. M., Carrera C. & Molinillo J. M. G.** 2003. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biology Science Space* 17: 18–23.
- Macías F. A., Oliveros-Bastidas A., Marín D., Castellano D., Simonet A. M. & Molinillo J. M. G.** 2005. Degradation studies on benzoxazinoids. Soil degradation dynamics of (2R)-2-O-bD-glucopyranosyl-4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)one (DIBOA-glc) and its degradation products, phytotoxic allelochemicals from Gramineae. *Journal of Agriculture and Food Chemical* 53:554–561.
- Macías F. A., Marín D., Oliveros-Bastidas A. & Molinillo M. G.** 2009. Discovering the bioactivity and ecological role of 1,4-benzoxazinones. *Natural Product Report* 26: 478–489. DOI: 10.1039/b700682a.
- Macías F.A., Molinillo J. M. G., Varella R. M. & Galindo J. C. G.** 2007. Allelopathy- a natural alternative for weed control. *Pest Management Science* 63: 327-348.
- Mandyam K. & Jumpponen A.** 2008. Seasonal and temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi in a tallgrass prairie ecosystem are minimally affected by nitrogen enrichment. *Mycorrhiza* 18:145-155.

- Mathesius U.** 2001. Flavonoids induced in cell undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *Journal of Experimental Botany* 52:419-426.
- May D., Ribas De Oliveira, C., Rocha L. & Maranho L.** 2011. Efeito de extratos de casca de café (*Coffea arabica L.*) na germinação e crescimento de pepino (*Cucumis sativus L.*). *Revista Brasileira de Biociências* 2: 180-186.
- Meiners S. J., Kong C. H., Ladwig L. M., Pisula N. L. & Lang K. A.** 2012. Developing an ecological context for allelopathy. *Plant Ecology* 213:1221–1227.
- Miró C. P., Ferreira A. G. & Aquila M. E. A.** 1998. Alelopatia De Frutos De Erva-Mate (II.Exparaguariensis) No Desenvolvimento Do Milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33: 1261-1270.
- Montti L., Villagra M., Campanello P. I., Gatti M. G. & Goldstein G.** 2013. Functional traits enhance invasiveness of bamboo over co-occurring tree saplings in the semideciduous Atlantic Forest. *ActaOecologica* 37:361-368.
- Molisch H.** 1937. Der einfluss einer Pflanze auf die andereallelopathie. G. Fischer, Jena, Germany.
- Narukawa Y. & Yamamoto S.** 2002. Effects of dwarf bamboo (*Sasa sp.*) and forest floor microsites on conifer seedling recruitment in a subalpine forest, Japan. *Forest Ecology and Management* 163:61-70.
- Nomiya H., Suzuki W., Kanazashi T., Shibata M., Tanaka H. & Nakashizuka T.** 2002. The response of forest floor vegetation and tree regeneration to deer exclusion and distribution in a riparian deciduous forest, Central Japan. *Plant Ecology* 164: 263-276.
- Oliveira S. C. C., Gualtieri S. C. J., Domínguez F. A M., Molinillo J. M. G. & Montoya R. V.** 2012. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. *Acta Botanica Brasilica* 26: 607-618.
- Pavinato P. S. & Rosolem A. C.** 2008. Disponibilidade de nutrientes no solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 32: 911-920.
- Peguero G., Lanuza O. R., Save R. & Espelta J. M.** 2012. Allelopathic potential of the neotropical dry-forest tree *Acacia pennatula* Benth: inhibition of seedling establishment exceeds facilitation under tree canopies. *Plant Ecology*. DOI:10.1007/s 11258-011-0014-0.

- Perry L. G., Thelen G. C., Ridenour W. M., Weir T. L., Callaway R. M., Paschke M. W. & Vivanco J. M.** 2005. Dual role for an allelochemical: (±)-catechin from *Centaurea maculosa* root exudates regulates conspecific seedling establishment. *Journal of Ecology* 93:1126–1135.
- Patterson D. T.** 1981. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). *Weed Science* 29:53-59.
- Pohlman A. A. & McColl J. G.** 1986. Kinetics of metal dissolution from forest soils by soluble organic acids. *Journal of Environmental Quality* 15:86-92.
- Putnam A. R.** 1988. Allelochemicals from Plants as Herbicides *Weed Technology* 24:510-518.
- Putnam, A.R. & Tang C.S.** 1986 The science of allelopathy. New York, John Wiley & Sons.
- Raij B. V. 1983** Avaliação da Fertilidade do Solo. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, SP.
- Reigosa M. J., Pedro L. N. & González L.** 2006. Allelopathy: a physiological process with ecological implications. Springer, Dordrecht.
- Rice E. L.** 1984. Allelopathy. 2ed edition. Academic Press, New York.
- Rodrigues B. N., Passini T. & Ferreira A. G.** 1999. Research on allelopathy in Brazil. *In: S.S. Narwal (ed.) Allelopathy Update* Enfield Science Publications 1:307-323.
- Rudgers J. A. & Orr S.** 2009 Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *Journal of Ecology* 97:247–255.
- Samsoedin R. R., Honda I., Yanagisawa t., Kobayashi M., Kamiya Y. & Takahashi N.** 1996 Gibberellin Biosynthesis in Bambusoideae, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60.9: 1497-1499, DOI: 10.1271/bbb.60.1497.
- Sánchez-Moreiras M. A. & Reigosa M. J.** 2005 Whole plant response of lettuce after root exposure to BOA (2(3 *H*)-benzoxazolinones). *Journal of Chemical Ecology* 31:2689-2703.
- Schenck N. C. & Perez Y.** 1988. A manual of identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. 2 ed. Florida, Gainesville.
- Schenk H. J. & Seabloom E. W.** 2010. Evolutionary ecology of plant signals and toxins: a conceptual framework. *In: F Baluska, V Ninkovic (eds). Plant Communication from an Ecological Perspective.* Berlin, Germany:Springer, pp. 1–19.

- Schmidt, S. K.** 1990. Ecological implications of the destruction of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) by soil bacteria. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3547–3549.
- Schmidt R. & Longhi-Wagner H. M.** 2009. A tribo Bambusae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 7: 71-128.
- Schreiner O. & Reed H. S.** 1908. The toxic action of certain organic plant constituents. *Botanical Gazete* 45:73-102.
- Schultz M. & Wieland L.** 1999. Variation in metabolism of BOA among species in various field communities – biochemical evidence for co-evolutionary process in plant communities? *Chemoecology* 9:133-141.
- Shao-Lin P., Wen J. & Qin-Fen G.** 2004. Mechanism and active variety of allelochemicals. *Acta Botanica Sinica* 46: 757-766.
- Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W. & Walter M. H.** 2003. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1955-1979.
- Siemens D. H., Garner S. H., Mitchell-Olds T. & Callaway R. M.** 2002. Cost of defense in the context of plant competition: *Brassica rapa* may grow and defend. *Ecology* 83:505–517.
- Silva C. F., Da Pereira M. G., Silva E. M. R., Da Correia M. E. F. & Saggin Junior O. J.** 2006. Fungos Micorrízicos Arbusculares Em Áreas no Entorno do Parque Estadual da Serra do Mar em Ubatuba, SP. *Caatinga*, 19:1-10.
- Singh N., Ma L. Q., Srivastava M. & Rathinasabapathi B.** 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science* 170: 274–282.
- Soderstrom T. R. & Calderón C. E.** 1974. Primitive forest grasses and evolution of the Bambusoideae. *Biotropica* 6: 141-153.
- Soderstrom T. R., Judziewicz E. J. & Clark L. G.** 1988. Distribution patterns of Neotropical bamboos. In: P.E. Vanzolini & W.R. Heyer (eds.) *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, pp. 121-157.
- Sosa T., Valadares C., Alías J. C. & Lobón N. C.** 2010. Persistence of flavonoids in *Cistus ladanifer* soils. *Plant And Soil* 337:51-63.

- Souto X.C., Gonzalez L. & Reigosa M. J.** 1994. Comparative analysis of allelopathic effects produced by four forestry species during decomposition process in their soils in Galicia (NW Spain). *Journal of Chemical Ecology* 20:3005-3015.
- Strobel G., Sugawara F. & Clardy J.** 1987. Phytotoxins from plant pathogens of weedy plants. In: Waller GR (ed) *Allelochemicals: role of agriculture and forestry*. ACS Symposium Series, vol 330. American Chemical Society, Washington DC, pp 517–523.
- Taiz L. & Zeiger E.** 2002. *Plant physiology*, 3rd edn. Sunderland, MA: Sinauer
- Taylor A. H., Jinyan H. & Shiqiang Z.** 2004. Canopy tree development and undergrowth bamboo dynamics in old-growth *Abies-Betula* forests in southeastern China: a 12-year study. *Forest Ecology and Management* 200:347-360.
- Thorpe A. S., Thelen G. C., Diaconu A. & Callay 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* 97:641-64.
- Tsai C. S. & Young C. C.** 1993. Allelochemicals in rhizosphere soils of flowering and nonflowering bamboo plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 34:223-234.
- Vázquez-de-Aldana B. R., Romo M., García C. A., Petisco C. & García C. B.** 2011. Infection with the fungal endophyte *Epichloë festucae* may alter the allelopathic potential of red fescue. *Annals of Applied Biology* 159: 281-290. doi:10.1111/j.1744-7348.2011.00495.x.
- Wang J., Yue Y., Jiang H. & Tang F.** 2012. Rapid screening for flavones C-glycosides in the leaves of different species of Bamboo and simultaneous quantitation of four marker compounds by HPLC-UV/DAD. *International Journal of Analytical Chemistry* 2012: 205101-25108.
- Watkinson A. R.** 1998. Reply from A.R. Watkinson. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 407.
- Watson L. & Dallwitz M. J.** 1992. The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. Disponível em <http://biodiversity.uno.edu/delta>.
- Weidenhamer J. D.** 2005. Biomimetic measurement of allelochemical dynamics in the rhizosphere. *Journal of Chemical Ecology* 31:221236.

- Weir T. L., Park S. W. & Vivavon L. M.** 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals Current Opinion in Plant Biology 7:472 – 479.
- Weston L. A. & Mathesius U.** 2013. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. Journal of Chemical Ecology 39:283-297.
- Whitenack C. J., Nair M. G. & Putnam A. R.** 1988. 2,2'-oxo- 1,1'azobenzene: A potential allelopathic compound from breakdown of rye (*Secale cereale*) residues. Abstr. Weed Science Society of America WSSA. 28:144.
- Whittaker R. H. & Feeny P. P.** 1971. Allelochemics: chemical interactions between species. Science 171:757–770.
- Zhou Y. & Yu J.** 2006. Allelochemicals and photosynthesis. *In: M Reigosa.; N Pedrol., & L.Gonzáles. Allelopathy: a physiological process with ecological implications.* Dordrecht, Springer, pp. 127-139.
- Zar J. H.** 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey
- Zhang W. P. & Clark L. G.** 2000. Phylogeny and classification of the Bambusoideae (Poaceae). *In: S.W.L. Jacobs, J.Everett (eds.). Grasses: systematics and evolution.* CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia. pp. 35-42.

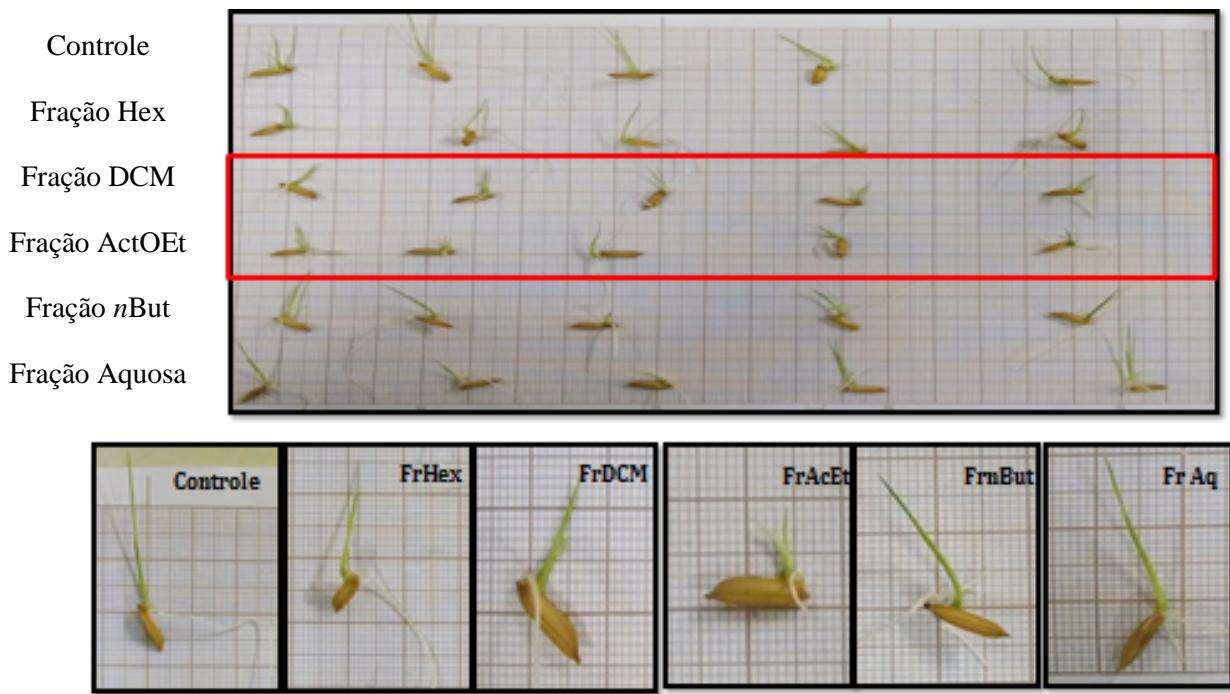
ANEXOS



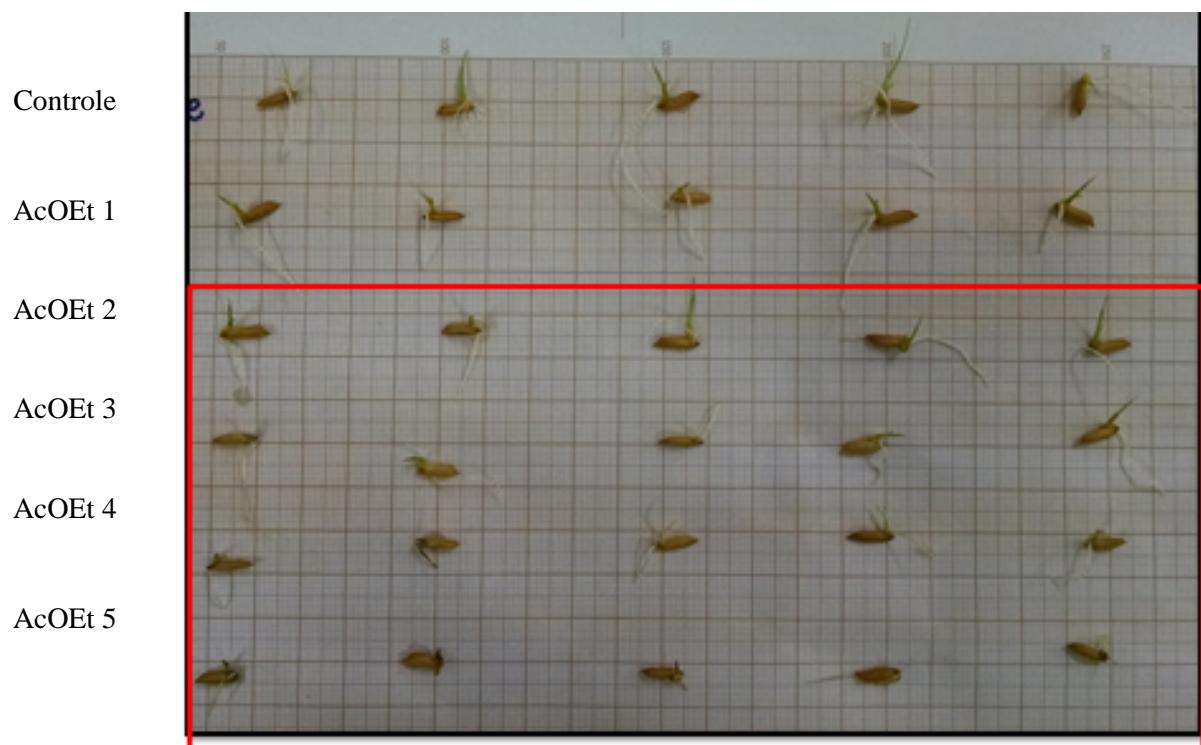
Anexo 1. Foto (5º dia). Bioensaio de germinação das sementes de *M. bimucronata* em função da concentração aplicada do extrato de folha aquoso de *A. simplex*. Controle (água), FA1 (0,66 mg/ml), FA2 (1,0 mg/ml), FA3 (2,0mg/ml), FA4 (4,0 mg/ml) e FA5 (6,0 mg/ml).



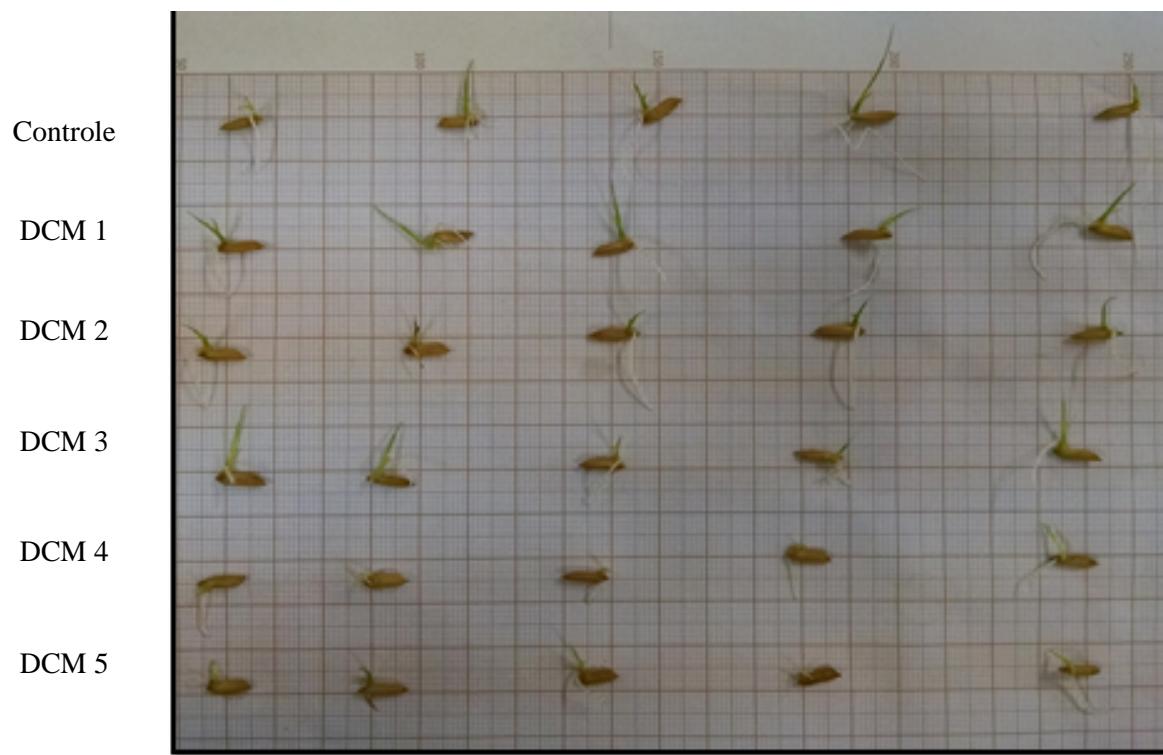
Anexo 2. Foto (9º dia). Bioensaio de germinação das sementes de tomate sobre frações do extrato de folha aquoso de *A. simplex* Controle (água), FrHex (hexano), FrDCM (diclorometano), FrAcOEt (acetato de etila), FrnBut (*n*-Butanólico) e FrAq (aquosa residual). Em destaque, dentro do quadro vermelho frações ativas.



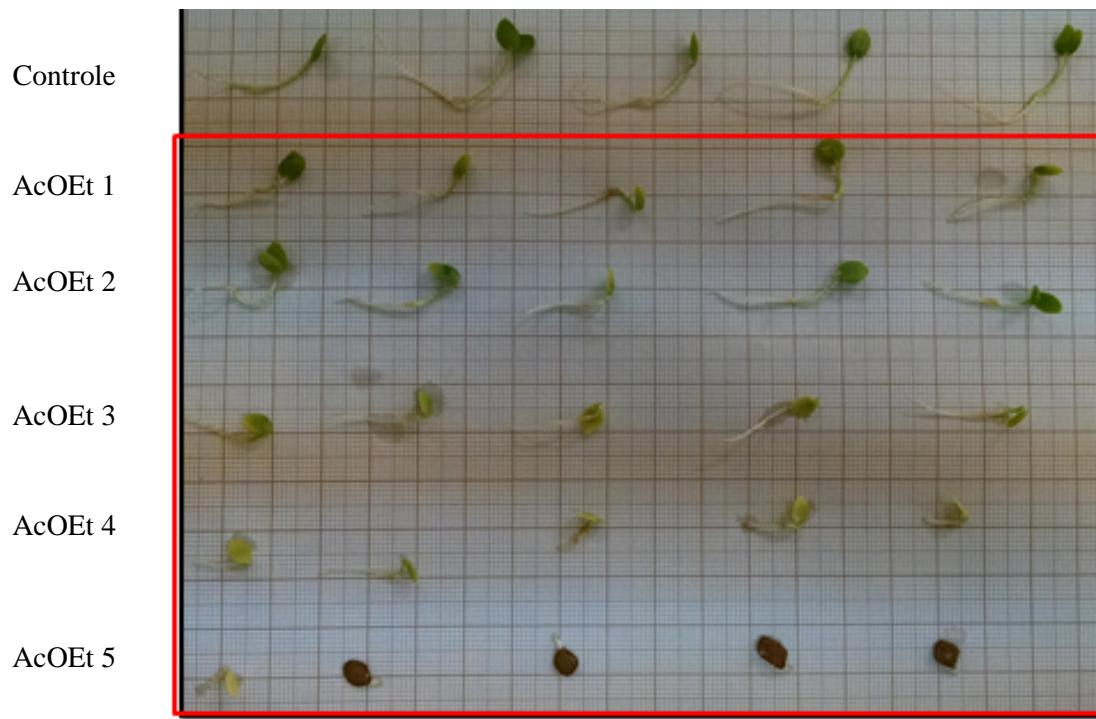
Anexo 3. Foto (5º dia). Bioensaio de crescimento das plântulas de arroz sobre frações do extrato aquoso de folha de *A. simplex*. Controle (água), FrHex (hexano), FrDCM (diclorometano), FrAcOEt (acetato de etila), Fr*n*But (n-Butanólico) e FrAq (aquosa residual). Em destaque, dentro do quadro vermelho frações ativas.



Anexo 4. Foto (6º dia). Bioensaio de germinação, sementes de arroz em função da concentração aplicada da fração acetato de atila do extrato de folha aquoso de *A. simplex*. Controle (água), AcOEt1 (0,38mg/ml), AcOEt2 (0,57mg/ml), AcOEt3 (1,15mg/ml), AcOEt4 (2,3mg/ml) e AcOEt5 (3,45mg/ml). Em destaque, dentro do quadro vermelho frações ativas.

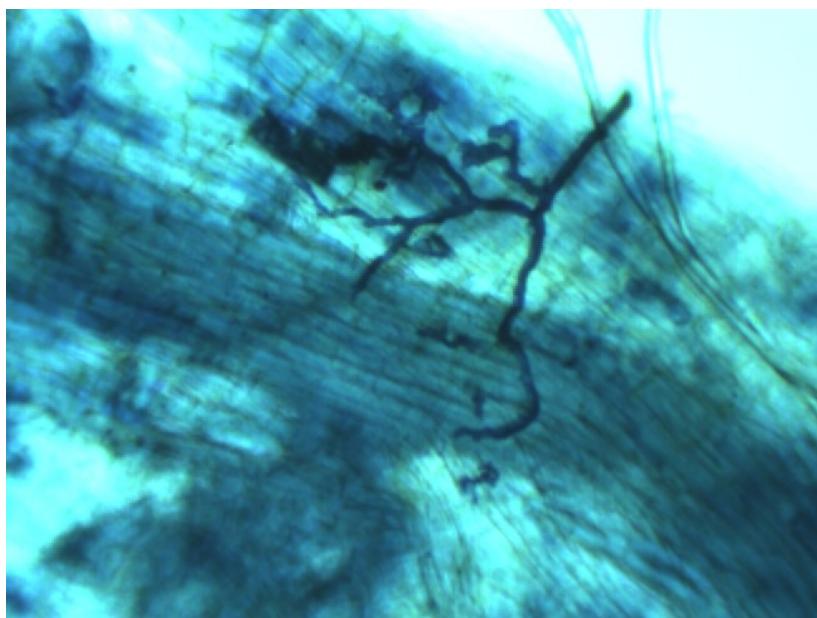


Anexo 5. Bioensaio de crescimento. Plântulas de arroz (5º dia) em fração do extrato aquoso de folha de *A. simplex*. Controle (água), DCM1 (0,18mg/ml), DCM2 (0,28mg/ml), DCM3 (0,56mg/ml), DCM4 (1,12mg/ml), DCM5 (1,68mg/ml).

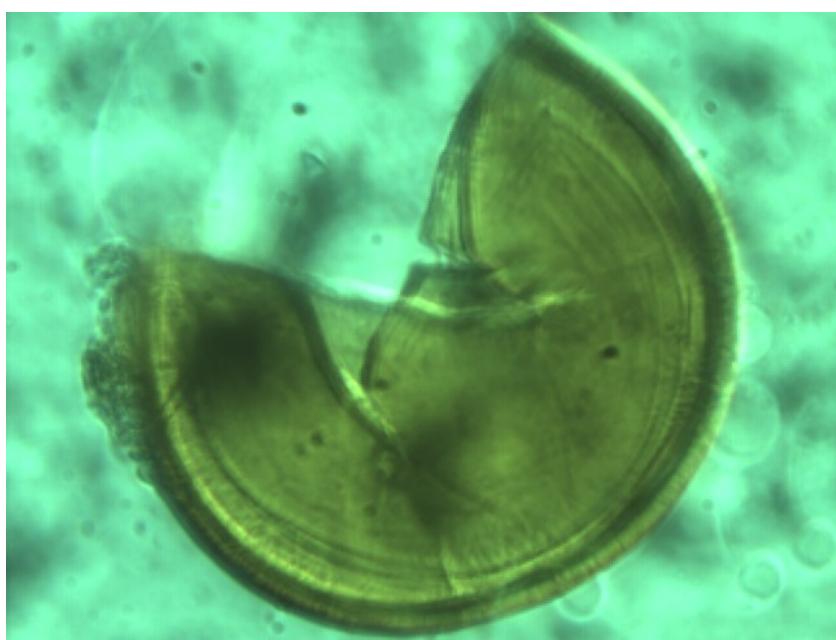


Anexo 6. Bioensaio de germinação das sementes de *M. bimucronata* em função da concentração aplicada da fração acetato de etila do extrato aquoso de folha de *A.simplex*. Controle (água), AcOEt1 (0,38mg/ml), AcOEt2 (0,57mg/ml), AcOEt3 (1,15mg/ml), AcOEt4 (2,3mg/ml) e AcOEt5 (3,45mg/ml). Em destaque, dentro do quadro vermelho frações ativas.

Raízes de *A. simplex*, onde é possível verificar a colonização de fungos micorrízicos arbusculares, e esporos associados.



Raízes colonizadas.



Esporo de *Acaulospora* sp.

Sequências obtidas com os resultados do sequenciamento de SANGER.

>JO6 -- *Glomus*

TTTGACCAATTAAAGGGTGGCCCTAATGGAATACTCGTGCTATGCATCCAAC
GCGTTGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCCGAATTCACT
AGTGATTGAACCCAAACACTTGGTTCCCGTAAGGTGCCAAATGACACATC
AAATTGAGGTCACTCGATCCCTAGTCGGCATAGTTACTGTTAAGACTACAA
CGGTATCTAATCGTTTCGATCCCCTAACCTCGTTCTGATTAATGAAAAC
ATCCTGGCAAATGCTTCGCAATAGTTAGTCTTCCGTAAATCCAAGAATT
CACCTCTAGCAACGGAATACTAATGCCCCAACTATCCCTATTAATCATTAC
GGCGATCCTAAAAACCAACAAAATAGAACCGCACATCCTATTCTATTATTCC
ATGCTAATGTATTCAAGCGTAGGCCTGCCTGAACACTCTAATTTCTCAAG
GTAAAAGTCCTGGTCCCCAACACACCCAGCAAAGGGCATGCCGTTCAAC
AAGAGGTAAGGCCAGCAAACAGTACATACCGTTAGGCAGACCGCCGGC
CAGGCCTGAAGTTCAACTACGAGCTTTAACTGCAACAACTTAATATACG
CTGTTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTGCCCTCCAATT
GTTCCTCGT

>JO10 – *Glomus* EJA26

CTACCAAAGGCCTAATGGGCATCCAAACGCGTTGGGAGCTCTCCATATG
GTCGACCTGCAGGCAGGCCGAATTCACTAGTGATTGAACCCAAACACTT
GGTTCCCGTAAGGCCAGAACATGAGTCATTAAAAAAATTAAACATCATCCGAT
CCCTAGTCGGCATAGTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTC
GATCCCTAACCTTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTGGCAAATGCTTT
CGCAGTAGTTAGTCTCAATAAAATCCAAGAATTTCACCTCTGACAATTGAAT
ACTAATGCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACGTCAATCTAGAAACCAA
CAAATAAGATCGAACGTCCTATTTCATTATTCCATGCTAATGTATTCAAGC
GTTAGCCTGCTTAAACACTCTAATTTCCTAAAGTAACAGTCCAGTCTCCC
CGCAACACCAAATTAAATGGCATTACGGTTCATCAGGAAGGAGGAGCCAGTA
AGACCAGTGCATACCGGAGGCATGACCAATCTACTGACCCGAAATTCAAC
TACGAGCTTTAACTGCAACAACTTAATACGCTATTGGAGCTGGAATT
ACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATT

>JO12 - *Glomus*

GCAAAACAGGCAGGTTAGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCC
GCGAATTCACTAGTGATTGAACCCAAACACTTGGTTCCCATAGGTGCCG
GCGGAGTCCTAAAGCAACATCCGCCGATCCCTAGTCGGCATCGTTATGGT
TGAGACTAGGACGGTATCTGATCGTCTCGAGCCCCAACTTCGTTCTGA

TTAATGAAAACATCCTGGCAAATGCTTCGCAGTTGTCGCTTCATAAA
TCCAAGAATTTCACCTCTGACTATGAAATACGAATGCCCGACTGCCCTG
TTAATCATTACTCCGATCCGAAGGCCAACACAATAGGACCGGAATCCTAT
GATGTTATCCCATGCTAATGTATACAGAGCGTAGGCTTGCTTGAGCACTCT
AATTCTCAAAGTAACAGCACCGGAGGCACGACCCGCCAGTTAAGGCTA
GGAGCGTATCGCCGGTAGAAGGGACGAGCCAATCGGTGCACACCGCGAGG
CGGACCGGTGACCCAACCCAAGGTCCAACACTACGAGCTTTAACTGCAAC
AACTTAAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAAG
ACTTGCCTCCAATGGATC

>JO13 – Archaeosporales 755

GGGAAAGTATTATTAGGTGGGAAAATAAGGACCTACGTGCTATGCATCC
AACCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCACCTGCAGGCGGCCGCAATT
ACTAGTGATTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTA
ACGGGTAACGGGTGTTAGGGCACGACACCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAC
GGCTACCACATCCAAGGATGGCAGCAGGCGCAGAACATTACCAATCCGAC
ACGGGGAGGTAGTGACAATAAAATAACAATACGGGTTCTTCGGATTCGT
AATTGGAATGAGTACAATTAAATCTCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCA
AGTCTGGTGCAGCTGGTAGTACTGTCATTGTGCCGGTCTCTCTGGTAGCTAG
TGTCTCTTAATTGGTGCCTAGGAATCAGGACTATTACCTGAAAAAAAT
AGAGTGTAAAGCGGGCAATTGCTGAATGCATTAGCATGGAATAATGAA
ATAGGACGGACGGTTCTATTGTTGGTATGGGACCACCGTAATGATTAAT

>JO14 - - *Glomus*

CTACAAATGGCTTATTGCTTCCAACCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCG
ACCTGCAGGCGGCCGCAATTCACTAGTGATTGAACCCAAACACTTGGTTT
CCCCATAAGGTGCCAGCGGTGCCCTAAAGCAACATCCGCCGATCCCTGGTC
GGCATCGTTATGGTGAGACTAGGACGGTATCTGATCGTCTCGAGCCCC
AACCTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTGGCAAATGCTTCGCAGTTG
TTCGTCTTCATAAAATCCAAGAATTTCACCTCTGACTATGAAATACGAATGC
CCCCGACTGTCCCTGTTAATCATTACTCCGATCCGAAGGCCAACAGAAC
GACCGAAATCCTGTCTGTTATCCCATGCTAATGTATCCAGAGCGTAGGCTT
GCTTGAGCACTCTAATTCTCAAAGTAACAGGCCGGAGGTGCCGG
GCCAGTTAAGGCCAGGCACGAATGCCGGCAGAAGGGACGAGTCGACCGG
TGCACACCTAGAGGCCGGACCGCCGCCATCCCAAGGTCCAACACTACGAGC
TTTTAACTGCAACAACTTAAATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGG
CTGCTGGCACCAGACTTGCCTCCAAATGGG

>JO15 – *Glomus* clone EJA93

GGAGCAAATAATATTAAAGTGGAACTTCTAGGATACTCAGCTATGCTCCAAC
GCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCCGAATTCACT
AGTGATTGAACCCAAACACTTGGTTCCCGTAAGGCGCCGAATGAGTCATT
AAAAAATTAACATCATCCGATCCCTAGTCGGCATAGTTATGGTTAAGACTA
CGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCTAACCTTCGTTCTGATTAATGAA
AACATCCTGGCAAATGCTTCGCACTAGTTAGTCTCAATAAAATCCAAGAA
TTTCACCTCTGACAATTGAATACTAATGCCCCAACTATCCCTATTAATCATT
ACGTCAATCTAGAAACCAACAAAATAAGATCGAACGTCCTATTCATTATT
CCATGCTAATGTATTCAAGCGTTAGCCTGCTTAAACACTCTAATTTTCAA
AGTAACAGTCCAGTCTCCCCGCAACACCAAATTAGTGGCATTACGGTTCATC
AGGAAGGAGGAGCCAGTAAGACCAGTGCATACCAATGGCATGACCAATCT
ACTGACCCCGAAATTCAACTATGAGCTTTAACTGCAACAACTTAATATA
CGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAAGACTTGCCCTC

>JO17 - - *Aculus* sp.

TGGGGAATAACAAATTAAAGTGGAACTTATAAGATACTCAGCTATGCATCCA
ACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCCGAATTCA
CTAGTGATTGAACCCAAACACTTGGTTCCCGATAAGGTGCCGGAGTCC
TAAAAGCAACATCCGCCGATCCCTAGTCGGCATCGTTATGGTTGAGACTAG
GACGGTATCTGATCGTCTTCGAGCCCCAACTTCGTTCTGATTAATGAAA
ACATCCTGGCAAATGCTTCGCACTTGTCTTCATAAAATCCAAGAAT
TTCACCTCTGACTATGAAATACGAATGCCCGACTGTCCCTGTTAATCATT
ACTCCGATCCGAAGGCCAACACAATAGGACCGGAATCCTATGATGTTAAC
CCATGCTAATGTATAAGCGAAGGCTTGCCTGAGCACTCTAATTCTTC
AAAGTAACAGCACCGGAGGCACGACCCGGCCAGTTAAGGCCAGGAGCGTA
TCGCCGGTAGAAGGGACGAGCCAATCGGTGCACACCGCGAGGCGGACCGG
TCGACCCAAACCAAGGTCCAACCTACGAGCTTTAACTGCAACAACTTAAAT
ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAAGACTTGC

>JO18 – *Glomus* P13-805

CGAACCCAGGTGCCTAATGCCATTCCCAACCGCGTTAGGGAGCTCTCCCATATG
GTCGACCTGCAGGCGGCCCGAATTCACTAGTGGATTGAACCCAAACACTTT
GGTTTCCCGTAAGGCGCCGAATGAGTCATTATAAAATTAACATCATCCGATT
CCTAGTCGGCATAGTTATGGTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCG
ATCCCCTAACCTTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTGGCAAATGCTTTC
GCAGTAGTTAGTCTCAATAAAATCCAAGAATTTCACCTCTGACAATTGAATA
CTAATGCCCCAACTATCCCTATTAATCATTACGTCAATCCTAGAAACCAAC

AAAATAGGATCAAACGTCCTATTCATTATTCCATGCTAATGTATTCAAGCG
CGAGCCTGTTAACACTCTAATTTTCAAAGTAACAGTCCTGATTCCC
GCCACACCAACTGAATGGCATAACGGTCGTAGAAGGGAGAAATCAGTGA
CACCAAGTTACCAACAGAGGCACGACCAGCGTACTGATCTGAAATTCAACT
ACGAGCTTTAACTGCAACAACTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTA
CCGGCTGCTGGCACCAGACTGCCCTCCA

>JO19 – *Glomus* T4-1.16

GCCGGGTTTAGGGGAAGCTCTCCCATAATGGTCGACCTGCAGGGCGCG
CGAATTCACTAGTGATTGAACCCAAACACTTTGGTTCCCGTAAGGCGCCGA
ATGAGTCATTAAAAAATTAACATCATCCGATCCCTAGTCGGCATAGTTATG
GTTAAGACTACGACGGTATCTGATCGTCTCGATCCCTAACCTTCGTTCTG
ATTAATGAAAACATCCTGGAAATGCTTCGAGTAGTTAGTCTTCAATAA
ATCCAAGAATTCACCTCTGACAATTGAATACTAATGCCCCAACATCCCT
ATTAATCATTACGTCAATCCTAGAAACCAACAAATAGGATCGAACGTCT
ATTCATTATTCCATGCTAATGTATTCAAGCGATTGCCGCTTAAACACTCT
AATTTTCAAAGTAACAGTCCTGATTCCCCGAAACACCAAATTAGGCAT
TACGGCTCTCAAGAAGGAGGGACCATCGAAATCAGTACATACCAGAGGCA
CGACCAACCTGATGATCCGAAATTCAACTACGAGCTTTAACTGCAACAA
CTTAAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACT
TGC

>JO20 - - *Aculus*

CTAACCAATGGCTAAATGCATCCAAACGCGTTAGGGAGCTCTCCATATG
GTCGACCTGCAGGCAGCGAATTCACTAGTGATTGAACCCAAACACTTT
GGTTCCCGTAAGGTGCCGGAGTCCTAAAGTAACATCCGCCGATCCCT
GGTCGGCATCGTTATGGTGAGACTAGGACGGTATCTGATCGTCTCGAGC
CCCCAACTTCGTTCTGATTAATGAAAACATCCTGGCAAATGCTTCGCA
GTTGTTCGTCTTCATAATCCAAGAATTCAACCTCTGACTATGAAATACGA
ATGCCCGACTGTCCCTGTTAATCATTACTCCGATCCGAAGGCCAACGAA
ATAGGATCGAAATCCTATCATGTTATCCCATGCTAATGTATCCAGAGCGTAG
GCTTGCCTTGGACACTCTAATTCTCAAAGTAACGGCGCCGGAGGAACGAC
CCGGCCAATTAAAGGCCGGAGCGCATGCCGGAAAAGGGACGAGCCGAC
CGGTGCACACCCGGAGGGCGGACCGGCCGACCCATCCAAAGGTCCAACACTAC
GAGCTTTAACTGCAACAACCTAAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC
CGGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATGGAT

>JO21 - NÃO IDENTIFICÁVEL

CAAAACCGCGGTTGGGAAGCTCTCCATATCCGTCGACCTGCAGGCGGC
CGCGAATTCACTAGTGATT**ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACTA**
TGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAGGGTCGATTCCGGAGAGGGAGCCT
GAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAAATTACCCA
ATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAACAATACCGGGCTTTGA
GTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTAACGAGGATCCATTGG
AGGGCAAGTCTGGTGCAGCAGCCCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAT
ATTAAAGTTGTTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTGGGTTGGTCGA
CCGGTCCGCCTCGCGGTGTGCACCGATTGGCTCGTCCCGTGTACTTGAAG
CGCTCCTGGCCTTAACGGCCGGTCGTGCCTCCCGTGTACTTGAAG
AAATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTCGCTGTATACATTAGCATGGGAT
AACATCATAGGATTCCGGCTATTGTGTTGGCCTCGGGATCGGAGTAATG
ATTAACAGGGA

>JO22 - - *Glomus*

TAGGGTTAGGGGGGGAGCTCTCCATATCGGTTGACCTGCAGGCGGCC
GCGAAATTCACTAGTGATT**GAACCCAAACACTTGGTTCCATAAGGTGCC**
AGCGGTGTCCTAAAGCAACATCCGCCGATCCCTGGTCGGCATCGTTATGG
TTGAGACTAGGACGGTATCTGATCGTCTCGAGCCCCAACCTTCGTTCTG
ATTAATGAAAACATCCTGGCAAATGCTTCGCAGTTGTTCGTCTTCATAA
ATCCAAGAATTCACCTCTGACTATGAAATACGAATGCCCGACTGTCCCT
GTTAACATTACTCCGATCCGAAGGCCAACAGAACAGGACCGAAATCCTG
TCATGTTATCCCATGCTAATGTATACAGAGCGTAGGCTGCCTGAGCACTC
TAATTCTCAAAGTAACAGGCCGGAGGTGCGGCCTGCCAGTTAAGGCC
AGGCACGAATGCCGGTAGAAGGGACGAGTCGACCGGTGCACACCTAGAG
GCGGACGCCGGCCATCCAAAGGCCAACTACGAGCTTTAACTGCAA
CAACTAAATACGCTATTGGAGCTGGAATTACCGCGCTGCTGGCATCTG
ACTTGCCTC

>JO23 - NÃO IDENTIFICÁVEL

GCCGGGTTTGGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCG
AATTCACTAGTGATT**ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGT**
GGTACGGGTGACGGAGAATTAGGGTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAG
AAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAAATTACCCAATCC
TGACACGGGGAGGTAGTGACAATAACAATACCGGGCTTTGAGTCT
GGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTAACGAGGATCCATTGGAGG
GCAAGTCTGGTGCAGCAGCCCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATT
AAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCATAGTTGGACTTGGATGGCCGGCCG
GTCCGCCTTAGGTGTGCACCGGTCGTCCCTCTGCCGGCGATGCGC
TCCTGGCCTTAATTGGCCGGTCGTGCCTCCGGCGCTGTTACTTGAAGAAA

TTAGAGTGTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGATAAC
ATTATAGGATT CGGT CCTATTAC GTT GGC TT CGG AT CGG AG TAAT GATT
AACAG

>JO24 – Archaeosporales

TGGGAATCATATTAAAGGGGAGATATGGAATACTCATGCTATGCTCCACG
CGTTGGGAGCTCTCCATATGGTCACCTGCAGGCGGCCGGAATTCACTA
GTGATTATCAACTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTTAACGGG
TAACGGGAATTAGGGTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCGATACGGGG
AGGTAGTGACAATAATAACAATACAGGGCCTTCCGGTCTGTAATTGGA
ATGAGTACAATTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGC
AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTGGCCTGGTCGGCGGTCCGCCCTTT
GGTAGTACTGTCATTGTGCCGGTCTCTCTGGTAGCTAGTGTCTCT
TAATTGGGTGCGCTAGGGAATCAGGACTATTACCTGAAAAAAATTAGAGTG
TTAAAGCGGGCAATTGCTGAATACATTAGCATGAAATAATGAAATAGGA
CGGACGGTTCTATTGGTTATGGGGACCACCGTAATGATTAATAG