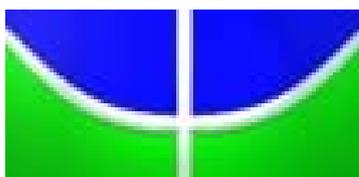


Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Departamento de Botânica
Mestrado em Botânica

Efeitos do extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. no desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L.

Camila Alves Jeronimo

Brasília, DF
Março/2006



Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Departamento de Botânica
Mestrado em Botânica

Efeitos do extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. no desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L.

Camila Alves Jeronimo
Orientador: Prof. Dr. Fabian Borghetti

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica

Brasília, DF
Março/2006

Efeitos do extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. no desenvolvimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L.

**Dissertação submetida à
Universidade de Brasília
como parte dos
requisitos para obtenção
do grau de mestre em
botânica.**

Camila Alves Jeronimo
Orientador: Fabian Borghetti

Brasília, Março 2006

Jerônimo, Camila Alves

EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *SOLANUM LYCOCARPUM* St. Hil. NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E NA SÍNTESE PROTÉICA DE PLÂNTULAS DE *SESAMUM INDICUM* L. 2006-75p.

Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, 2006.

Orientação: Fabian Borghetti

1.Fisiologia Vegetal. ALELOPATIA

DEDICO...

**AOS MEUS PAIS E AOS MEUS IRMÃOS,
QUE SÃO FUNDAMENTAIS NA MINHA VIDA.
AMO VOCÊS!!!**

Aprovado por:

Dr. Fabian Borghetti
Departamento de Botânica da UnB
(Presidente da banca)
(Orientador)

Dr. Alfredo Gui Ferreira
Departamento de Botânica da UnB
(Membro da banca)

Dr. César Martins de Sá
Departamento de Biologia Celular da UnB
(Membro da banca)

Dr. Augusto César Franco
Departamento de Botânica da UnB
(Suplente)

Brasília, 31 de março de 2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me colocado no caminho dos desafios, o que me torna a cada dia uma pessoa melhor e com ambição para concluir mais uma importante etapa da minha vida.

Muitas pessoas queridas fizeram parte da elaboração desse trabalho, não apenas na execução direta mas, principalmente, como amigos e em certos momentos, como terapeutas. A essas pessoas gostaria de prestar meus agradecimentos:

Ao meu orientador Fabian Borghetti, que me apresentou o mundo da ciência e me mostrou que nas dificuldades advindas do trabalho científico é que surgem as respostas que se procura e principalmente, que esses momentos fazem surgir o verdadeiro profissional.

A minha ilustre família, a quem dedico esse trabalho. Hoje todos eles também são um pouco pesquisadores pois se mobilizaram com meu esforço e me acompanharam nos feriados, fins de semana e madrugadas, seja ajudando no trabalho de bancada (meus estagiários mais compreensivos) ou oferecendo sua simples companhia. Mãezinha, Paizinho, Isis e Fernando meu muito obrigado pela compreensão, paciência, carinho e amor. E a minha gatinha, Mirela (meu bebezinho!).

A minha avó Inês, aos meus tios, tias e primos e especialmente a minha tia e amiga Meire, pelas boas conversas e gargalhadas.

A minha querida amiga e parceira de mestrado que sabe tanto do que está aqui impresso quanto eu. Jana, muitíssimo obrigada pela santa paciência e compreensão nos dias difíceis, pela ajuda nos “pepinos” que o nosso “carro” (mais conhecido como cuba de eletroforese) dava e que nos fazia morrer de rir, pela ajuda no trabalho de bancada, pelas conversas, conselhos, viagens, chopes e sushis, enfim, por tudo que fizeste por mim. Valeu, amiga!!!!

Ao amigo Stefano, que sempre esteve disponível a ajudar e a dar bons palpites para enriquecer meu trabalho. Pelo convívio, pelas risadas, pela preocupação e por pegar no meu pé, te agradeço.

Aos colegas que entraram junto comigo no mestrado (Turma de 2004), que nas disciplinas e durante o desenvolvimento da minha dissertação foram amigos e profissionais, sempre ajudando com seus conhecimentos e mão-de-obra: Jana, Luciano, Beatriz, Eduardo, Vanessa, Simone, Paulo, Floriano, Regina e José Paulo, a quem gostaria de agradecer especialmente pelo carinho, amizade e amor.

Ao técnico do laboratório de Termobiologia, Fábio Nakamura, por ter me ensinado a usar os equipamentos, reagentes e receitas daquela cozinha maluca de fazer ciência.

Aos companheiros da Termo: Elisa, Rafael, Leandro, Gisele, Moara, Aparecida e Rivail. E aos que passaram por lá durante esses dois anos.

Aos amigos que tiveram que compreender a minha ausência, mas que sempre estiveram comigo em pensamento, torcendo pelo meu sucesso: Rodrigo, Anne, Vanessa, Marina e aos amigos de farra e de graduação que estão sempre em contato.

Ao professor César Martins de Sá, que foi meu orientador substituto, sempre de olho no meu trabalho e dando conselhos essenciais.

Ao professor Alfredo Gui Ferreira por aceitar o convite de participar da banca examinadora e pelo exemplo de pessoa e de profissional.

A Lílian, técnica do Laboratório de Microbiologia pelos conhecimentos e materiais cedidos e a Aline, estagiária da Micro, pelos “galhos quebrados”.

Ao pessoal dos Laboratórios de Microbiologia, Biologia Molecular e Bioquímica. Ao pessoal do Herbário, Anatomia Vegetal e Fisiologia Vegetal. Aos professores que lecionaram as disciplinas da pós-graduação. Ao pessoal do Departamento e da Secretaria da Botânica.

A Capes pela bolsa de mestrado e ao CNPQ pelo financiamento do projeto.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Comprimento médio de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias (A) e por cinco dias (B) em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água. Barras representam o desvio padrão.
- Figura 2.** Plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram em contato com água (controle) e diferentes concentrações do extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). Concentrações em porcentagem: 0 (água), 1 e 3. (A) Plântulas incubadas por 2 dias e (B) Plântulas incubadas por 5 dias.
- Figura 3.** Conteúdo de água após dois dias de crescimento de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.
- Figura 4.** Conteúdo de água após cinco dias de crescimento de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.).
- Figura 5.** Plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram em contato com água (controle) e diferentes concentrações do extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). Concentrações em porcentagem: 0 (água), 1 e 3. (A) Plântulas incubadas por 7 dias na presença de aleloquímicos e do controle e (B) Plântulas incubadas por 2 dias na presença de aleloquímicos e transferidas para água onde cresceram por mais 5 dias.
- Figura 6.** Conteúdo de água de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). (A) Plântulas incubadas por sete dias na presença dos aleloquímicos. (B) Plântulas incubadas por dois dias na presença dos aleloquímicos e transferidas para água crescendo por mais cinco dias.
- Figura 7.** Incorporação isotópica (CPMA) de ³⁵S-metionina em radículas e hipocótilos de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram por 48 horas incubadas em água e em extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.

Hil.) a 1%. Às 42 horas ^{35}S -metionina (3 μCi / plântula) foi diluída na solução (água ou extrato a 1%) em que as plântulas estavam incubadas (n=150)

Figura 8. Géis bi-dimensionais NEPHGE-PAGE de proteínas de hipocótilos de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1% (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos géis. As faixas de pH estão indicadas acima dos géis. Setas e balões pretos representam proteínas observadas nos géis, setas vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

Figura 9. Fluorogramas de proteínas de hipocótilos de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1% (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos fluorogramas. As faixas de pH estão indicadas acima dos fluorogramas. Setas e balões pretos representam proteínas observadas nos géis, setas vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

Figura 10. Géis bi-dimensionais NEPHGE-PAGE de proteínas de radículas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1% (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos géis. As faixas de pH estão indicadas acima dos géis. Setas pretas representam proteínas analisadas nos géis, setas vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

Figura 11. Fluorogramas de proteínas de radículas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos fluorogramas. As faixas de pH estão indicadas acima dos fluorogramas. Setas pretas representam proteínas analisadas nos géis, setas

vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem de inibição (%) do crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias e por cinco dias em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.
- Tabela 2.** Porcentagem de plântulas que apresentaram necroses, raízes laterais e pêlos absorventes nas radículas de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.
- Tabela 3.** Porcentagem de necroses, raízes laterais, pêlos absorventes e quantidade média de raízes laterais em radículas de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por cinco dias em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.
- Tabela 4.** Massa seca após dois dias e cinco dias de crescimento de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e da semente de gergelim. (Cot=cotilédones; Hip=hipocótilos; Rad=radículas; Plânt=plântula; Sem=semente).
- Tabela 5.** Comprimento médio (cm) e porcentagem de crescimento das partes aérea e radicular de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram em água e em diferentes concentrações (1% e 3%) do extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.).
- Tabela 6.** Porcentagem de plântulas com necroses, raízes laterais, pêlos absorventes e quantidade média de raízes laterais de radículas de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas em diferentes concentrações (1% e 3%) do extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.
- Tabela 7.** Massa seca após sete dias de crescimento e do experimento de reversibilidade de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira

(*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e da semente de gergelim. (Cot=cotilédones; Hip=hipocótilos; Rad=radículas; Plânt=plântula; Sem=semente).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - porcentagem

α - alfa

μCi – micro Curier

μg - micrograma

μL - microlitro

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

^{14}C - carbono 14

^{35}S - enxofre 35

ATP - adenosina trifosfato

cm - centímetro

cpma - cintilações por minuto

DNA - ácido desoxirribonucléico

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

g - grama ou gramo

H⁺ - ATPase - bomba de prótons da membrana plasmática

kDa - quilodalton

Km² - quilômetro quadrado

mA - miliamper

mg – miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

n^o - número

NEPHGE-PAGE - *non equilibrium pH gradient electrofocusing-polyacrilamide gel electroforesis*

\emptyset - diâmetro

p/v - peso/ volume

PEG - polietilenoglicol

pH - potencial de hidrogênio

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

TCA - ácido tricloroacético

Tris-HCl - tris base-ácido clorídrico

V- volts

W - watts

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *SOLANUM LYCOCARPUM* St. Hil. NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E NA SÍNTESE PROTÉICA DE PLÂNTULAS DE *SESAMUM INDICUM* L.
(Jeronimo, C. A.; Borghetti, F. - Mestrado em Botânica)**

Resumo: *Solanum lycocarpum* St. Hil., conhecida popularmente como lobeira, é uma espécie arbustiva do bioma Cerrado cujo potencial alelopático já foi identificado em suas folhas e frutos. Extratos aquosos de suas folhas a 1% (p/v) inibem o crescimento e a diferenciação radicular em plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.). Sabendo-se que alterações morfológicas decorrem de interferências no metabolismo celular, os objetivos desse trabalho foram verificar: (1) a ação alelopática de extratos aquosos de folhas de lobeira no desenvolvimento inicial, na morfologia e na incorporação de matéria seca em plântulas de gergelim; (2) se o efeito alelopático causado pelo extrato aquoso de folhas de lobeira é reversível morfolologicamente nas plântulas de gergelim; (3) as alterações no padrão de síntese protéica de plântulas de gergelim que estão sobre o efeito dos aleloquímicos dos extratos aquosos de folhas de lobeira. O extrato aquoso das folhas de lobeira causou inibição do crescimento das plântulas de gergelim, principalmente nas radículas e na maior concentração do extrato, onde provocaram alterações como necroses, inibição do aparecimento de raízes laterais e de pêlos absorventes. A interferência no conteúdo de água das plântulas por parte dos aleloquímicos foi pequena ou insignificante em todos os tratamentos e nas diferentes partes da plântula, entretanto houve menor incorporação de massa seca nas radículas tratadas. Os efeitos causados pelos aleloquímicos das folhas de lobeira no desenvolvimento e na morfologia das plântulas de gergelim são reversíveis, tendo em vista que as mesmas retomaram seu crescimento e suas características morfológicas normais. A incorporação isotópica de ³⁵S-metionina foi maior nas plântulas tratadas com os aleloquímicos das folhas de lobeira e o perfil protéico das radículas apresentou mais diferenças na expressão do que o perfil dos hipocótilos. No geral, houve um aumento da síntese protéica nas plântulas tratadas.

Palavras-chaves: alelopatia; *Solanum lycocarpum*; desenvolvimento inicial; Cerrado; *Sesamum indicum*; incorporação isotópica; proteína; gergelim.

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *SOLANUM LYCOCARPUM* St. Hil. NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E NA SÍNTESE PROTÉICA DE PLÂNTULAS DE *SESAMUM INDICUM* L.
(Jeronimo, C. A.; Borghetti, F. - Mestrado em Botânica)**

Abstract: *Solanum lycocarpum* St. Hil., the common wolf fruit, is a Cerrado shrub in which leaves and fruits present strong allelopathic potencial. It was previously shown that aqueous leaf extracts at 1% (w/v) inhibit root growth and root hair differentiation in sesame (*Sesamum indicum* L.) seedlings. Considering that the morphological changes observed in plants subjected to some treatment usually result from the primary effects of these treatments on plant metabolism, the main objectives of this study were: (1) to investigate the allelopathic effects of aqueous extracts of *Solanum* leaves on seedling growth, root differentiation and dry matter incorporation in sesame; (2) to verify whether the morphological changes observed in seedlings incubated in the extracts are reversible; (3) to investigate the effects of the aqueous extracts on protein synthesis during seedling growth. This study showed that: Aqueous leaf extracts of *Solanum* at 1 and 3% inhibited significantly the root growth of sesame seedlings in a dose-dependent manner, the roots were more affected than the shoots, and root tip necrosis were common at 3% concentration. Also, aqueous extracts at 3% inhibited lateral root and root hair differentiation. The water content of the seedlings were not significantly affected by the extracts. However, roots incubated in the extracts incorporated less dry matter than roots incubated in water. To investigate whether the allelopathic effects were reversible, seedlings incubated for two days in the extracts were transferred to water. After five days in water they resumed normal growth, the root tip necrosis disappeared, and lateral root and root hair differentiated. Seedlings incubated in the leaf extracts incorporated more ³⁵S-methionine than those incubated in water. Also, the analysis of gels and fluorograms showed that seedlings incubated in the leaf extracts showed a higher protein synthesis, in comparison to seedlings incubated in water, and in both cases protein synthesis was higher in the roots than in the shoots.

Keywords: allelopathy; *Solanum lycocarpum*; seedling growth; Cerrado; *Sesamum indicum*; isotopic labeling; protein; sesame.

ÍNDICE

Agradecimentos	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 Metabólitos Secundários.....	4
2.2 Aleloquímicos e Alelopatia.....	6
2.3 Mecanismos de ação dos aleloquímicos.....	7
2.4 Efeitos dos aleloquímicos na síntese protéica e na expressão gênica.....	10
2.5 Estudos em laboratório.....	11
2.5.1 Sementes.....	11
2.6 Alelopatia em <i>Solanum lycocarpum</i> St.Hil.....	12
3. Objetivos	14
4. Material e Métodos	15
4.1 Preparo do extrato aquoso de folhas de lobeira.....	15
4.2 Bioensaio de crescimento.....	15
4.3 Conteúdo de água e peso seco das plântulas.....	17
4.4 Reversibilidade.....	18
4.5 Síntese protéica.....	19
4.5.1 Incorporação isotópica.....	20
4.5.2 Procedimentos para extração de proteínas.....	20
4.5.3 Eletroforese em géis bi-dimensionais de poliacrilamida.....	20

5. Resultados e Discussão	22
5.1 Crescimento e características morfológicas.....	22
5.2 Conteúdo de água e peso seco das plântulas.....	28
5.3 Reversibilidade.....	32
5.4 Síntese protéica.....	39
5.4.1 Incorporação isotópica.....	39
5.4.2 Perfil eletroforético bi-dimensional.....	41
5.5 Conclusões.....	49
6. Referências Bibliográficas	50
Apêndice	61
Anexo	70

1. Introdução

Localizado em grande parte no Planalto Central, o Cerrado é um dos seis biomas que ocorrem no Brasil. É o segundo maior, com 2 milhões de Km² sendo o primeiro a Floresta Amazônica, com 3,5 milhões de Km². Esse bioma se caracteriza por sua sazonalidade. Aproximadamente 90% das chuvas ocorrem nos meses de outubro à março e durante os meses de abril a setembro ocorre a estação seca (Ribeiro & Walter, 1998). Na estação seca, os incêndios ocorrem freqüentemente. Eles podem ser de origem natural, resultantes de raios, ou de origem antrópica (Rodrigues, 1996).

O fogo é um fator de distúrbio no Cerrado por causar mortalidade em plantas já estabelecidas. Ele reduz a cobertura de lenhosas e da serrapilheira (Ratter *et al*, 1997), favorece herbáceas (Ratter *et al*, 1997, Moreira, 2000) e prejudica o estabelecimento de plântulas (Hoffmann, 1996).

De maneira geral, os solos do Cerrado são classificados como Latossolos. São solos antigos, bastante intemperizados, profundos e ácidos. São considerados distróficos possuindo baixa fertilidade (Reatto *et al*, 1998).

A vegetação apresenta fisionomias que englobam formações florestais, savânicas e campestres. Nas formações florestais predominam espécies arbóreas. Nas savanas estão presentes árvores e arbustos esparsos em uma matriz herbácea. Nos campos predominam espécies herbáceas e algumas arbustivas (Ribeiro & Walter, 1998). Sua flora é constituída por cerca de 4500 espécies dentre árvores, ervas, arbustos e trepadeiras (Mendonça *et al*, 1998), sendo um importante centro de biodiversidade e endemismo (Ratter *et al.*, 1997).

Estudos relatam as interações químicas mediadas por metabólitos secundários entre as plantas do Cerrado (Oliveira, 2003). Estas interações que podem causar efeitos benéficos ou prejudiciais entre os vegetais e, entre estes e microorganismos, são definidas como alelopatia (Rice, 1984; Ferreira & Áquila, 2000). Os compostos químicos que atuam na alelopatia são produtos do metabolismo secundário das plantas conhecidos como aleloquímicos (Ferreira e Áquila, 2000). Os aleloquímicos podem se encontrar em diferentes concentrações nos diversos tecidos vegetais (Alves *et al.*, 2002) e serem liberados para o meio por volatilização, lixiviação, exsudação radicular e decomposição de resíduos (Souza Filho & Alves, 2002a).

Testes realizados com extratos aquosos de diferentes órgãos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze (papo-de-peru) levaram a um atraso na germinação e inibiram o

crescimento de *Lactuca sativa* L. (alface) e de *Raphanus sativus* L. (rabanete) (Gatti *et al*, 2004). Periotto e colaboradores (2004) verificaram que extratos de caules e folhas de *Andira humilis* Mart. ex Benth (morcegueira) também tiveram efeitos inibitórios na germinação e no crescimento sobre aquelas mesmas espécies alvo. Extratos aquosos de folhas de *Miconia albicans* Triana inibiram o processo germinativo e o crescimento das radículas de sementes de *Lycopersicon esculentum* L. (tomate) e *Cucumis sativus* L. (pepino) (Gorla & Perez, 1997). Extratos aquosos de folhas de *Campomanesia adamantium* Camb. (gabirola), *Eugenia dysenterica* DC. (cagaita), *Qualea parviflora* Mart. (pau-terra), *Solanum lycocarpum* St. Hil. (lobeira) e *Trembleya parviflora* (D. Don) Cogn. inibiram o crescimento radicular de plântulas de *Sesamun indicum* L. (gergelim). Além disto, os extratos de lobeira, *T. parviflora* e cagaita induziram desenvolvimento de raízes laterais, inibiram a diferenciação de pêlos radiculares e em alguns casos, houve a inversão geotrópica das radículas (Borghetti *et al*, 2005).

O potencial alelopático da lobeira tem sido investigado amplamente. Extratos de folhas e frutos causaram alterações morfológicas, na germinação e no crescimento de sementes de gergelim *in vitro* (Oliveira, 2003; Oliveira *et al.*, 2004a; Oliveira *et al.*, 2004b, Borghetti *et al.*, 2005) e no solo (Aires *et al.*, 2005).

Grande parte dos trabalhos que investigam a ação de aleloquímicos em plantas-teste visa quantificar e qualificar os efeitos a nível morfológico, ou seja, alterações na germinação e no desenvolvimento de plântulas. Sabe-se, entretanto que tais efeitos no crescimento e morfologia das plântulas decorrem de interferências no metabolismo celular (Ferreira, 2004) como: inibição da fotossíntese; interrupção da respiração mitocondrial e da síntese de ATP; produção de espécies reativas de oxigênio ocasionando danos à membranas, proteínas e ao DNA, o que pode ocasionar morte celular; comprometimento do metabolismo de aminoácidos e distúrbios na atividade hormonal, entre outros (Weir *et al.*, 2004).

Ainda são poucos os estudos que relatam os efeitos dos aleloquímicos no padrão de síntese protéica em plantas susceptíveis. Romero-Romero e colaboradores (2002) verificaram um aumento na síntese protéica de plantas cultivadas que estiveram em contato com extratos aquosos de plantas consideradas fitotóxicas. Cruz-Ortega e colaboradores (2002) seqüenciaram uma proteína que teve sua síntese aumentada em raízes de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão) tratadas com aleloquímicos produzidos pelas folhas de *Callicarpa acuminata* H.B.K. As subunidades dessa proteína indicaram que ela está ligada à respostas

de defesa das plantas ao ataque de insetos. Os extratos aquosos das folhas de lobeira também promoveram alterações na síntese protéica do gergelim (Jeronimo *et al*, 2005).

Pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos pelos quais os aleloquímicos atuam (Weir *et al.*, 2004). A atividade dos aleloquímicos pode ser pontual, entretanto, como o metabolismo celular é regulado por controles do tipo *feedback*, rotas inteiras podem ser alteradas (Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004). Conseqüentemente a descoberta de novos mecanismos de ação dos aleloquímicos é um trabalho que requer grande esforço (Romero-Romero *et al*, 2002) e que, uma vez esclarecidos, trarão grande contribuição para a compreensão deste fenômeno (Ferreira & Áquila, 2000).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Metabólitos secundários

As plantas desenvolveram ao longo da evolução e por meio da seleção natural, mecanismos de defesa contra herbívoros, patógenos e fatores ambientais de estresse, e mecanismos sinalizadores para atrair polinizadores e dispersores (Wink, 2003). Alguns desses mecanismos, por muito tempo desconhecidos por suas funções, resultam da ação de compostos orgânicos de baixo peso molecular originados pelo metabolismo primário do carbono nos vegetais (Hadacek, 2002), conhecidos como metabólitos secundários (Alves *et al.*, 2002; Taiz & Zeiger, 2004).

O termo “secundário” não significa que esses compostos tenham menor importância para o vegetal, especialmente considerando-se a bem documentada atividade biológica desses constituintes (Hadacek, 2002). Eles possuem funções importantes como: suporte estrutural fornecido pela lignina; proteção contra a radiação ultravioleta e a atração de polinizadores e dispersores pelos pigmentos flavonóides; proteção contra herbivoria e agentes patogênicos; atuação na interação planta-planta (Bourgaud *et al.*, 2001; Hadacek, 2002; Taiz & Zeiger, 2004; Wink, 2003).

Alguns dos compostos secundários são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do vegetal. Alguns exemplos são: os hormônios giberelinas e ácido abscísico; os esteróis que compõem as membranas celulares; os carotenóides que atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2004). Em alguns casos, eles agem como co-substratos ou co-enzimas, o que dificulta uma distinção entre metabolismo primário e secundário (Hadacek, 2002).

Os metabólitos secundários, também denominados de compostos secundários, se dividem em três grandes grupos químicos. Os terpenos ou terpenóides, os compostos fenólicos ou fenóis, e os compostos nitrogenados (Bourgaud *et al.*, 2001; Taiz & Zeiger, 2004). Um bom exemplo de um grupo químico bastante difundido no reino vegetal é fornecido pelos fenóis; por essas moléculas estarem envolvidas na síntese de lignina, elas são comuns a todas as plantas superiores. Por outro lado, outros compostos como os alcalóides, estão esparsamente distribuídos no reino vegetal e são muito mais específicos para definir gêneros e espécies de plantas (Bourgaud *et al.*, 2001). Essa distribuição, difusa

mas descontinua, de compostos secundários constitui a base para a taxonomia química e a ecologia química (Bourgaud *et al.*, 2001; Wink, 2003).

A síntese de diversos compostos secundários que agem na interação planta-planta ocorre a partir da via do acetato e do ácido chiquímico (Einhellig, 1996), mas nem todos os compostos secundários dessas vias estão envolvidos nas interações vegetais (Alves *et al.*, 2002). A via do acetato produz ácidos orgânicos, álcoois de cadeia linear, aldeídos e cetonas, e a via do ácido chiquímico tem como produtos taninos hidrolizáveis, ácido gálico, aminoácidos aromáticos, além de outros (Einhellig, 1996).

A biossíntese e o acúmulo dos metabólitos secundários formam-se de processos altamente regulados, requerendo controles específicos de célula, de tecidos, de desenvolvimento e do ambiente (De Luca & St-Pierre, 2000). Os metabólitos secundários podem ser translocados de célula para célula, ou a longa distância via floema ou xilema. O acúmulo ocorre nos vacúolos, idioblastos, ductos, laticíferos, glândulas ou tricomas, entre outros. Uma vez descartados do seu compartimento, os metabólitos secundários podem ser modificados por enzimas. Essas enzimas podem também ser derivadas das plantas, ou do intestino dos herbívoros, ou de origem microbiana (Hadacek, 2002).

Em diversos casos, os mesmos compostos podem apresentar-se como defensivos e como atrativos nos vegetais (Wink, 2003) e deter diferentes grupos de organismos por diferentes modos de ação (Izhaki, 2002). Os monoterpenos e as antocianinas podem atrair insetos para a polinização de flores e ao mesmo tempo funcionarem como inseticidas e antimicrobianos (Wink, 2003). Com o aperfeiçoamento das técnicas bioquímicas e com o advento da biologia molecular, vem sendo demonstrado que os metabólitos secundários desempenham um papel importante na adaptação das plantas ao seu ambiente (Bourgaud *et al.*, 2001).

2.2 Aleloquímicos e Alelopatia

Quando liberados no ambiente, alguns produtos do metabolismo secundário atuam promovendo efeitos nocivos ou benéficos ao indivíduo que sofre sua ação (Rice, 1984; Ferreira & Áquila, 2000; Taiz & Zeiger, 2004). Esses compostos são conhecidos como aleloquímicos e seus efeitos são definidos como alelopatia (Ferreira & Áquila, 2000).

Apesar de o termo alelopatia ser mais comumente usado para descrever interações químicas entre duas plantas, ele também tem sido usado para descrever a comunicação química entre micróbio-micróbio, planta-micróbio, planta-inseto ou planta-herbívoro (Weir *et al.*, 2004).

Nos vegetais, os aleloquímicos podem ser encontrados nas folhas, caules, raízes, frutos, inflorescências, cascas e sementes, não havendo um padrão para a quantidade de distribuição em cada uma das partes (Alves *et al.*, 2002; Weir *et al.*, 2004). Esses compostos podem ser liberados por volatilização, exsudação radicular, lixiviação e decomposição de resíduos (Souza Filho & Alves, 2002a; Weir *et al.*, 2004). A decomposição de resíduos pode ativar metabólitos secundários inertes como aleloquímicos (Ferreira, 2004).

Vários fatores contribuem para a complexidade da alelopatia (Hadacek, 2002). O grau de interação dos aleloquímicos de uma planta com outros organismos depende de fatores espécie-específicos (Ferreira & Áquila, 2000) que podem variar de acordo com fatores ambientais, climáticos e com o habitat (Einhellig, 1996; Weidenhamer, 1996). Em nível intracelular, o controle da biossíntese destes compostos é feita por genes que codificam várias enzimas responsáveis por sua formação (Vieira, 2000; Bourgaud *et al.*, 2001; Hadacek, 2002).

Os principais fatores que definem o potencial biológico de um aleloquímico se referem a sua concentração, a sua permanência e ao limite de resposta da planta sob seu efeito e que, apesar de não ser constante, está relacionado à sensibilidade da espécie receptora aos processos de desenvolvimento da planta e às condições ambientais (Inderjit, 2001; Souza Filho & Alves, 2002a; Inderjit & Duke, 2003).

Quando a planta se encontra sob condições adversas como estresse hídrico, competição por nutrientes ou excesso de luz, pode ocorrer o aumento da produção de metabólitos secundários (Einhellig, 1996; Reigosa *et al.*, 1999a; Vieira, 2000; Tongma *et al.*, 2001; Souza Filho & Alves, 2002a), entretanto não se sabe se a liberação no meio ambiente ocorre de forma equivalente à sua produção (Souza Filho & Alves, 2002a). Da

mesma maneira, plantas sob estresse são mais susceptíveis aos compostos fitotóxicos (Reigosa *et al.*, 1999a).

2.3 Mecanismos de ação dos aleloquímicos

O possível local de acúmulo dos aleloquímicos nas plantas depende da facilidade com que estes sejam lançados no meio ambiente e da função que irão exercer. Os aleloquímicos que se situam nos tecidos mais externos dos vegetais atuam na defesa contra herbívoros e patógenos (Alves *et al.*, 2002), e são sintetizados “de novo” quando a planta sofre injúria por esses organismos constituindo a chamada defesa induzida (Hadacek, 2002). Aqueles que se acumulam em compartimentos especializados se situando mais internamente, sendo liberados por exsudação, por exemplo, estão relacionados à competição por recursos entre os vegetais (Alves *et al.*, 2002; Hadacek, 2002) estabelecendo o que se denomina de defesa constitutiva (Hadacek, 2002).

Na planta, os aleloquímicos apresentam freqüentemente mais de um grupo funcional representado por uma mistura complexa de compostos que consistem de vários tipos estruturais. Essa estratégia garante a interferência a mais de um alvo molecular em organismos susceptíveis (Reigosa *et al.*, 1999b; Inderjit *et al.*, 2002; Inderjit & Duke, 2003; Wink, 2003).

Ao serem lançados ao meio, os aleloquímicos podem agir diretamente no desenvolvimento de outras plantas ou promover alterações no solo, seja em suas propriedades, na sua dinâmica de nutrientes ou em sua biota associada (Hadacek, 2002; Rizvi *et al.*, 1992). Desta maneira, eles podem condicionar o modelo de sucessão às plantas preexistentes e às substâncias químicas que elas liberam no meio conforme seu tempo de residência (Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004), promover a permanência de espécies pioneiras, alterar o padrão de distribuição das plantas e, até mesmo, afetar a biodiversidade (Reigosa *et al.*, 1999a).

É comum verificar efeitos alelopáticos causados pela introdução de espécies exóticas (Hierro & Callaway, 2003). Em sistemas agroecológicos, os efeitos tendem a ser danosos diminuindo o crescimento e a produtividade (Reigosa *et al.*, 1999a; Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004). Estudos recentes sugerem que espécies que coexistam por longo período de tempo são tolerantes as toxinas liberadas por elas enquanto, por outro

lado, os aleloquímicos liberados por espécies exóticas podem interferir em espécies nativas (Bais *et al.*, 2003; Hierro & Callaway, 2003).

Vários processos fisiológicos das plantas são afetados pela atividade de aleloquímicos, que podem interferir na atividade hormonal, na síntese e distribuição de metabólitos, na fotossíntese, na respiração mitocondrial e na morfologia celular (Inderjit & Duke, 2003; Weir *et al.*, 2004). Como consequência aos danos celulares, podem ocorrer alterações morfológicas no vegetal (Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004). Plântulas anormais com radícula necrosada e efeitos no crescimento inicial, seja no comprimento da parte aérea ou radícula, na quantidade de pêlos absorventes e na incorporação de matéria seca pelas plântulas, são critérios muito usados para caracterizar efeitos alelopáticos (Souza Filho & Alves, 2002b, Ferreira, 2004).

Experimentos realizados por Pires e colaboradores (2001a) verificaram que o extrato aquoso de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucena) é um forte inibidor da germinação e do desenvolvimento de plantas invasoras. Estes efeitos foram testados em plântulas de *Zea mays* L. (milho) (Pires *et al.*, 2001b) onde se constatou a diminuição do crescimento da parte radicular e redução do índice mitótico sendo, estes efeitos, crescentes com o aumento da dose dos aleloquímicos. Além disso, testes revelaram um aumento da atividade da peroxidase e do endurecimento e espessamento das raízes nas concentrações mais elevadas do extrato.

Gonzalez e colaboradores (1997) ao testar os efeitos do aleloquímico sorgoleone presente no exsudado de raízes de *Sorghum bicolor* L. Moench (sorgo), verificaram que esta benzoquinona lipofílica atua inibindo diretamente a fotossíntese em folhas de *Spinacea oleracea* L. (espinafre). Sorgoleone inibiu a cadeia de transporte de elétrons entre as plastoquinonas A e B (Q_A e Q_B) agindo de maneira similar ao herbicida atrazina. Outra pesquisa realizada por Hejl e Koster (2004) constatou que esse mesmo aleloquímico reduziu a utilização de nutrientes em plântulas de *Glycine max* L. (soja) e causou um decréscimo na atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática em raízes de milho.

Abrahim e colaboradores (2000) testaram os efeitos de quatro monoterpenos potencialmente alelopáticos na germinação, no crescimento radicular e na respiração mitocondrial do milho. Os monoterpenos lipofílicos, α -pineno e limoneno, tiveram atividade menor do que os monoterpenos oxigenados solúveis em água, cânfora e eucaliptol, na inibição da germinação e no crescimento primário da raiz. Entretanto, os

monoterpenos lipofílicos causaram danos ao metabolismo respiratório da mitocôndria, sugerindo que essas diferenças se devam a solubilidade dos monoterpenos.

Koitabashi e colaboradores (1997) constataram que um composto alelopático volátil, o terpeno 1,8- cineole presente em espécies do gênero *Salvia* (Labiatae), inibiu a germinação e o crescimento radicular de *Brassica campestris* L. (canola) de maneira dose-dependente. Nas células meristemáticas radiculares esse composto ocasionou um decréscimo da taxa mitótica, inibindo a síntese de DNA e a proliferação celular. Outra observação importante foi obtida a partir da lavagem com água das plântulas tratadas com cineole. As mesmas começaram a crescer novamente indicando que esse efeito é reversível. Isso explica porque os efeitos alelopáticos de *Salvia* são observados somente em climas secos.

Cruz-Ortega e colaboradores (1998) ao examinarem efeitos de estresse aleloquímico causados por extrato de folhas de *Sycios deppei* G. Don verificaram a inibição do crescimento radicular no feijão e em *Cucurbita ficifolia* L. (abóbora). As duas espécies testadas apresentaram mudanças estruturais em algumas organelas, na membrana plasmática e na parede celular.

Baziramakenga e colaboradores (1997) verificaram que ácidos fenólicos reduziram a incorporação de metionina e fosfato em proteínas e ácidos nucléicos respectivamente, de raízes de soja. Essas reduções ocorreram conjuntamente com o decréscimo na síntese de ATP. Lehman e Blum (1999) sugeriram que a atividade inibitória de ácidos fenólicos em raízes de plântulas de abóbora ocorra devido ao contato com os aleloquímicos.

Compostos fenólicos extraídos do solo onde crescem *Pinus laricio* Poiret. (pinheiro) e *Fagus sylvatica* L. (faia), inibiram a germinação de sementes de *P.laricio* que foi atribuído a um rompimento na atividade de enzimas envolvidas na glicólise e na via das pentoses fosfato; as enzimas glicolíticas aldolase, glicose fosfato isomerase e glicose 6-fosfato desidrogenase tiveram decréscimo em suas atividades na presença dos compostos fenólicos, entretanto o exato mecanismo molecular que afetou a atividade enzimática não foi determinado (Muscolo *et al.*, 2001) .

2.4 Efeitos dos aleloquímicos na síntese protéica e na expressão gênica

Poucos estudos relatam os efeitos de aleloquímicos no padrão de síntese protéica em plantas susceptíveis. Romero-Romero e colaboradores (2002) testaram o efeito de extratos aquosos de quatro plantas consideradas fitotóxicas (*S. deppei*, *Accacia sedillense* L. Rico, *Sebastiania adenophora* Pax & K. Hoffm. e *Lantana camara* – L.) no crescimento radicular e no padrão de síntese protéica de milho, feijão, abóbora e tomate. As respostas das plantas-alvo aos aleloquímicos foram diversas, porém, no geral, houve um incremento na síntese protéica. O milho foi o menos afetado tanto no crescimento quanto na síntese protéica e o tomate foi o mais sensível aos aleloquímicos. Essas mudanças evidenciam alterações no funcionamento bioquímico celular. Aqueles autores acreditam que as proteínas que aumentaram ou foram induzidas são proteínas de estresse que estão relacionadas a mecanismos de defesa.

Aleloquímicos produzidos pelas folhas de *C. acuminata* foram testados na síntese protéica de plântulas de feijão, milho e tomate. Uma proteína de aproximadamente 11,3 kDa teve um aumento de sua síntese nas raízes tratadas de feijão. O seqüenciamento desta proteína indicou que suas subunidades apresentam uma similaridade de 99% ao inibidor da α -amilase de outras espécies de feijões. Acredita-se que este inibidor esteja ligado à respostas de defesa das plantas ao ataque de insetos. Nas raízes de tomate, uma proteína que foi induzida mostrou 69-95% de similaridade a glutathione-S-transferase que está ligada a várias respostas de estresse nas plantas (Cruz-Ortega *et al.*, 2002).

Bais e colaboradores (2003) relacionaram os aspectos ecológico, fisiológico, bioquímico, celular e genômico da ação do aleloquímico (-) catequina presente em *Centaurea maculosa* Lam. (centáurea). Utilizando *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (arabidopsis) como espécie alvo, acompanhou-se todo o mecanismo de ação do aleloquímico. No meristema radicular de arabidopsis, o aleloquímico desencadeou uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, levando à sinalização em cascata através da concentração de Cálcio, que promoveu mudanças na expressão gênica levando à morte do sistema radicular.

Estudos como estes são de suma importância já que mostram os efeitos primários do aleloquímico, ou seja, aqueles que atuam no aparato celular e molecular (Ferreira, 2004) indicando que mecanismos metabólicos estão sendo afetados e como ocorre este processo.

2.5 Estudos em laboratório

Os parâmetros mais comumente usados em laboratório para avaliar o potencial alelopático de uma espécie em uma espécie-alvo, ou seja, sensível a ação dos aleloquímicos, são a germinação e o crescimento (Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004).

Na germinação as avaliações são feitas sobre a germinabilidade e sobre a velocidade de germinação (Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004). O critério normalmente usado para determinar a germinação é a emergência da radícula (Labouriau, 1983).

No crescimento avalia-se o comprimento das plântulas e aspectos morfológicos como presença de necrose nas raízes e a quantidade de pêlos absorventes, incorporação de matéria seca e partição do carbono (Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004).

Os testes são geralmente realizados em placas de petri ou caixas gerbox tendo como substrato papel filtro ou solo. Os experimentos são conduzidos em câmaras com temperatura e luminosidade controladas. Deve-se atentar para não deixar que as placas sequem ou que por outro lado fiquem alagadas, eventos que podem interferir nos resultados (Ferreira & Áquila, 2000; Ferreira, 2004).

2.5.1 Sementes

O uso de sementes de espécies nativas para os bioensaios de alelopatia não é tão difundido por estas poderem apresentar algum tipo de dormência e uma variabilidade genética maior, apresentando maior plasticidade, sendo assim, é recomendável o uso de sementes de espécies cultivadas de boa qualidade e que apresentam germinação rápida e uniforme. Sementes de tomate e alface¹ são exemplos de modelos utilizados por serem de fácil aquisição e sensíveis a diversos aleloquímicos (Ferreira & Áquila, 2000)

Sementes de gergelim têm sido utilizadas em bioensaios para testar o efeito de aleloquímicos por estas possuírem comportamento germinativo conhecido e por serem cultivadas em várias regiões do Brasil são de fácil aquisição. Outras vantagens para seu uso são: germinação rápida em uma ampla faixa de temperatura (18,8 e 43,2°C); ausência de dormência e fotoblastismo; alta viabilidade (88%) e baixo conteúdo de água (5,47%

¹ O diásporo da alface é um aquênio

aproximadamente), o que possibilita seu armazenamento por maior período de tempo em baixas temperaturas (Carvalho *et al.*, 2001). Além disso, essas sementes já foram testadas em bioensaios de germinação e crescimento sob efeito de extratos de folhas de lobeira, com resultados bastante satisfatórios (Oliveira, 2003; Oliveira *et al.*, 2004b).

2.6 Alelopatia em *Solanum lycocarpum* St.Hil.

Popularmente conhecida como lobeira, *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) é uma espécie arbustiva (Mendonça *et al.*, 1998; Proença *et al.*, 2000) de ampla distribuição no Centro-Oeste brasileiro. Ocorre nos campos, cerrado sentido restrito e cerradão (Silva Junior *et al.*, 2005), sendo comumente encontrada em ambientes perturbados do bioma Cerrado (Proença *et al.*, 2000; Silva Junior *et al.*, 2005). Essa espécie é considerada invasora de áreas degradadas (Oliveira-Filho & Oliveira, 1988).

A lobeira é uma espécie sempre-verde (Silva Junior *et al.*, 2005). Suas folhas de cor verde-acinzentada são grandes, apresentando tricomas e espinhos em toda sua extensão (Lombardi & Motta Junior, 1993; Silva Junior *et al.*, 2005). As flores são roxas e a planta floresce durante todo o ano. Os frutos são carnosos, verdes e grandes e a frutificação é uma atividade contínua (Proença *et al.*, 2000; Silva Junior *et al.*, 2005). A planta-mãe libera os frutos e esses amadurecem após 2 ou 3 dias exalando um forte odor adocicado que atrai predadores como besouros, roedores e formigas (Pinto, 1998). As sementes são muito freqüentemente dispersas pelo lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Lombardi & Motta Junior, 1993).

Na família Solanaceae, tropano-alcalóides e ésteres de tropina constituem um dos mais distintos grupos de metabólitos secundários (Griffin & Lin, 2000). Esteróide-alcalóides são compostos dominantes nos gêneros *Solanum* e *Lycopersicon* (Wink, 2003). Frutos maduros de *Solanum* freqüentemente contêm glicoalcalóides que possuem múltiplas atividades biológicas como: inibição da germinação, efeito laxante em animais, deterrentes para herbívoros, constipação intestinal em pássaros, entre outras (Cippolini, 2000). Estudos relatam a presença dos alcalóides solamargina e solasonina em *S. lycocarpum* (Motidome *et al.*, 1970). Análise fitoquímica em suas folhas detectou a presença de fenóis, alcalóides e flavonóides (Oliveira, 2003).

Experimento com sementes de lobeira mostraram que estas apresentam dormência química e autotoxicidade causada pela presença de aleloquímicos. Esses aleloquímicos

também afetaram o tempo de germinação e a germinabilidade de sementes de *Cosmos sulphureus* Cav. (cosmos ou picão-amarelo) quando as sementes das duas espécies foram colocadas para germinarem em uma mesma placa de petri (Borghetti & Pessoa, 1997).

Extratos aquosos de folhas de lobeira também provocaram um atraso no pico de germinação em sementes de gergelim em diferentes temperaturas. Foi verificado também inibição no crescimento radicular e mudanças morfológicas bem como a ausência de pêlos absorventes e o aparecimento de raízes laterais nas plântulas de gergelim tratadas com os extratos (Oliveira, 2003; Oliveira *et al*, 2004b). Na concentração de 1%, os extratos aquosos das folhas causaram alterações no perfil protéico de plântulas de gergelim. Houve a indução de dois polipeptídeos nas radículas e hipocótilos (60 kDa e 45 kDa, respectivamente) e o desaparecimento de um polipeptídeo (66 kDa) nas radículas, sugerindo que as mudanças na síntese protéica estão entre os fatores determinantes da morfologia das plântulas (Jeronimo *et al*, 2005).

Extratos aquosos do fruto também causaram, em diferentes temperaturas, efeito redutor na germinação do gergelim e na plântula houve inibição do crescimento da parte radicular, aparecimento de necroses e ausência de pêlos radiculares e raízes secundárias (Oliveira, 2003; Oliveira *et al*, 2004a).

No solo, o extrato aquoso de folhas reduziu a germinabilidade e o crescimento radicular em diferentes faixas de temperatura (22, 30 e 38°C) e o extrato aquoso de frutos diminuiu o crescimento das partes aérea e radicular além de causar atraso no tempo médio de germinação a 30°C e diminuição da germinabilidade a 22°C (Aires *et al*, 2005). Esses resultados indicam um possível envolvimento dos aleloquímicos dessa espécie na distribuição espacial de plantas no Cerrado (Oliveira, 2003; Oliveira *et al*, 2004a).

Este tipo de estudo se mostra um campo promissor. Com a identificação dos compostos fitotóxicos e conhecendo seus mecanismos de ação, estes poderão ser utilizados no potencial desenvolvimento de herbicidas biodegradáveis, entre outras aplicações (Vyvyan, 2002).

3. Objetivos

Verificar a ação alelopática de extratos aquosos de folhas de lobeira no desenvolvimento inicial, na morfologia e na incorporação de matéria seca de plântulas de gergelim;

Investigar se o efeito alelopático causado pelo extrato aquoso de folhas de lobeira é reversível morfológicamente nas plântulas de gergelim;

Investigar alterações no padrão de síntese protéica de plântulas de gergelim que estão sobre o efeito dos aleloquímicos dos extratos aquosos de folhas de lobeira.

4. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Termobiologia L.G. Labouriau, do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília (UnB) e nos Laboratórios de Biologia do Gene e de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

4.1 Preparo do extrato aquoso de folhas de lobeira

Para o preparo dos extratos aquosos foram utilizadas folhas de lobeira coletadas aleatoriamente de indivíduos situados no campus da UnB. Em uma estufa regulada a 50°C, as folhas secaram por um período de 24 horas e, após a secagem, foram trituradas em um liquidificador. As folhas não foram armazenadas para posterior utilização, já que esse procedimento afetaria a ação dos aleloquímicos presentes nas mesmas (Oliveira, 2003). Portanto, logo após a secagem e a trituração das folhas preparou-se o extrato. Para o preparo do extrato a 5% (p/v) foram pesados 5g das folhas trituradas. Em um béquer, as folhas foram misturadas em água destilada com o auxílio de um bastão de vidro até completar o volume final de 100 mL. O béquer foi vedado com parafilme e o extrato armazenado em geladeira a 6±2°C, por 24 horas, para a extração dos aleloquímicos. A extração foi realizada a baixa temperatura para evitar a proliferação de microorganismos (Jacobi & Ferreira 1991). Após a extração, o material foi filtrado com o auxílio de uma bomba à vácuo, utilizando-se papel filtro Whatman nº 1. A partir do filtrado, foram feitas diluições para as concentrações de uso nos bioensaios, sendo essas de 1% e 3%.

4.2 Bioensaio de crescimento

Para o bioensaio de crescimento foram utilizadas sementes de gergelim da variedade “negra” colhidas no estado de Goiás na safra de 1998 (fornecidas pela EMBRAPA) e estocadas em freezer a -20°C. Antes da preparação do experimento, as sementes foram selecionadas, retirando-se eventuais impurezas, sementes danificadas ou ainda sementes marrons ou brancas.

Observações relatadas por Oliveira (2003) mostram que os aleloquímicos encontrados nos extratos de folhas e de frutos de lobeira causam atraso no tempo médio de

germinação do gergelim. Para que esse efeito não interferisse no experimento de crescimento, as sementes foram colocadas para germinar em água para a obtenção das plântulas (Ferreira e Áquila, 2000). O final da germinação foi caracterizado pela emergência de uma das porções do embrião (Labouriau, 1983; Borghetti, 2000), neste caso, da radícula.

As sementes selecionadas foram dispostas para germinar em água destilada a 30°C por aproximadamente 28 horas e fotoperíodo de 12 horas em câmaras de germinação do tipo B.O.D. (Marconi MA 403) em placas de cultura de vidro de 150 x 130mm contendo uma folha de papel filtro Qualy ø 15cm, previamente autoclavadas por 20 minutos a 120°C.

Para os experimentos de crescimento foram adicionados em cada placa de cultura 10 mL da solução a ser testada: extrato a 1%, extrato a 3% e controle em água destilada; foram distribuídas dez sementes germinadas por placa, nas condições descritas acima. Foram feitas três replicatas de cada tratamento. O experimento de crescimento foi conduzido nas mesmas condições do experimento de germinação das sementes. Ao final do segundo e do quinto dia de crescimento, mediu-se o comprimento da parte aérea e da parte radicular com o auxílio de um paquímetro, e observaram-se diferenças nas características morfológicas das plântulas como presença de raízes secundárias, pêlos absorventes e necrose. Foram conduzidas três repetições deste bioensaio.

A análise dos dados de crescimento foi feita comparando-se a média, o desvio padrão e a variância de cada tratamento (n=90). Os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

Para calcular a porcentagem de inibição (Chung, 2001), comparou-se o crescimento das plântulas nos tratamentos em relação ao controle tanto da parte aérea quanto da parte radicular, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = [(\text{controle} - \text{tratamento}) / \text{controle}] \times 100$$

Para cada plântula foi observada a presença ou ausência de raízes secundárias, pêlos absorventes e necroses que foram expressos em porcentagem em relação ao número total de plântulas (n = 90). Esses valores foram submetidos ao teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

O número de raízes laterais por plântula também foi quantificado quando as mesmas estavam presentes (n = 90). Para a análise comparativa entre os diferentes tratamentos, fez-se uma média da quantidade de raízes laterais. Os valores foram submetidos ao teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade comparando-se controle e tratamentos.

4.3 Conteúdo de água e peso seco das plântulas

Após a medição das partes aérea e radicular das plântulas, as mesmas e os cotilédones foram separados com um bisturi e pesadas em balança de precisão Mettler Toledo modelo College B154. Em seguida, foram colocadas em estufa a 50°C por 24 horas e pesadas novamente para a obtenção do peso seco. Este procedimento foi conduzido em plântulas com dois (n = 30) e cinco (n = 30) dias de crescimento. A massa fresca e a massa seca foram pesadas para cada uma das partes em separado. Devido ao baixo peso, as partes aérea e radicular foram pesadas de 10 em 10. Foram conduzidas três repetições deste experimento (n = 9). Para obtenção da porcentagem do conteúdo de água utilizou-se a seguinte expressão:

$$CA = [(PMF - PMS) / PMF] \times 100$$

onde, CA é o conteúdo de água de cada parte da plântula, PMF é a massa fresca e PMS é a massa seca.

A massa seca de cada uma das partes da plântula e da plântula inteira foram comparadas entre controle e tratamentos e estes comparados a massa seca da semente de gergelim (10 sementes/ repetição/ 9 repetições).

Os dados de conteúdo de água e de peso seco foram submetidos ao teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade.

4.4 Reversibilidade

Para verificar se os efeitos dos aleloquímicos presentes nos extratos de folhas de lobeira eram reversíveis, plântulas que cresceram por dois dias em contato com os aleloquímicos (extrato a 1% e extrato a 3%) a 30°C e fotoperíodo de 12 horas, foram transferidas para placas contendo 10mL de água destilada. As plântulas permaneceram por cinco dias nas mesmas condições de temperatura e luminosidade em que se encontravam durante o contato com os aleloquímicos. O controle em água foi mantido durante todo o bioensaio, não sendo portanto, transferido. Ao mesmo tempo, foi conduzido um tratamento nas mesmas condições descritas, entretanto, as plântulas permaneceram em contato com os aleloquímicos por sete dias. Ao final do quinto dia após a transferência (ou do sétimo dia, no caso dos controles), mediu-se o comprimento da parte aérea e da parte radicular com o auxílio de um paquímetro, e as diferenças nas características morfológicas das plântulas como presença de raízes secundárias, pêlos absorventes, necrose e quantidade de raízes laterais por plântula foram quantificadas utilizando-se o mesmo critério do bioensaio de crescimento. O mesmo foi feito com as plântulas que permaneceram em contato com os aleloquímicos por sete dias.

Para a análise quantitativa da reversibilidade utilizou-se o seguinte critério: o tamanho médio das partes aéreas e radiculares das plântulas ao final do quinto dia após a transferência para a água (TB) foi subtraído do tamanho médio das partes aéreas e radiculares das plântulas após dois dias de crescimento em contato com os extratos (TA) obtendo-se assim o tamanho final da reversibilidade (R = reversibilidade).

$$R = TB - TA$$

A reversibilidade foi comparada ao tamanho médio das partes aéreas e radiculares das plântulas incubadas por sete dias nas diferentes concentrações do extrato (TC) subtraído do tamanho médio das partes aéreas e radiculares das plântulas após dois dias de crescimento em contato com os extratos (TA) obtendo-se assim o tamanho final na presença dos aleloquímicos (A).

$$A = TC - TA$$

Considerou-se o crescimento por sete dias em água subtraído do crescimento por dois dias em água (Tmax) o valor máximo de crescimento (100% ou controle) tanto para a parte aérea quanto para a parte radicular. Os valores de R e de A nos diferentes tratamentos foram comparados em termos de porcentagem ao controle (100%).

$$\%A = A \times 100 / T_{\max}, \text{ e } \%R = R \times 100 / T_{\max}$$

Das porcentagens obtidas foram calculados os intervalos de confiança para as comparações entre plântulas controle, plântulas tratadas com os aleloquímicos e plântulas transferidas para água. Os dados morfológicos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

4.5 Síntese protéica

4.5.1 Incorporação isotópica

A metionina é um aminoácido que contém enxofre em sua estrutura. Nos eucariotos ela é sempre o primeiro aminoácido incorporado na cadeia de polipeptídeos (Mathews & van Holde, 1990). Por estar marcada radioativamente, após ser absorvida pela plântula a metionina irá marcar as proteínas que forem sintetizadas de novo.

Para este bioensaio foram utilizadas plântulas de gergelim que cresceram nos tratamentos: extrato aquoso de folhas de lobeira a 1% e controle em água.

Sementes de gergelim previamente germinadas foram colocadas em placas de cultura contendo 10 mL da solução a ser testada (extrato a 1% e água) e cresceram sob as mesmas condições da germinação.

Às 42 horas de crescimento, todas as plântulas, tanto do controle (n = 150) quanto do tratamento com o extrato a 1% (n = 150), foram transferidas para placas de vidro de 4,6 x 4,25mm contendo, na placa controle, 30µL (15µCi/ µL) de ³⁵S-metionina diluídos em 3mL de água destilada, e na placa contendo extrato a 1%, 30µL (15µCi/ µL) de ³⁵S-metionina diluídos em 2mL de extrato aquoso de folhas de lobeira a 1%. A água destilada e o extrato aquoso a 1% utilizados para fazer a diluição da metionina foram separados no momento da montagem do experimento e acondicionados em erlenmeyers que permaneceram na câmara de germinação durante o crescimento das plântulas e, portanto sob as mesmas condições experimentais.

Em nenhum dos experimentos os cotilédones foram utilizados já que em testes preliminares os mesmos não apresentaram diferenças nos perfis eletroforéticos entre plântulas tratadas e plântulas controle (Jeronimo, 2003), e mesmo porque sua função no crescimento inicial está no fornecimento de esqueletos químicos ou substâncias para o

crescimento e a diferenciação, sendo tecidos destinados à senescência após terem exercido sua função (Taiz & Zaiger, 2004)

4.5.2 Procedimentos para extração de proteínas

As plântulas foram separadas, com o auxílio de um bisturi, em radícula e hipocótilo. Cada uma dessas partes foi pesada e macerada em 3 μ L do coquetel de inibidores de proteinases e de tampão de extração. Para os géis bidimensionais, as proteínas foram extraídas em tampão Tris-HCl 160mM, SDS 4%, mercaptoetanol 4%, pH 6.8 obedecendo-se a proporção de 500 μ L de amostra para cada 200mg de matéria fresca. A maceração foi feita em *ependorfs* com o auxílio de um pistilo. Durante a maceração os *ependorfs* foram mantidos dentro de uma caixa de isopor contendo gelo triturado.

Após a maceração, as amostras permaneceram em gelo por um período de 30 a 50 minutos para a solubilização das proteínas e, em seguida, foram centrifugadas a 13200 rpm por 30 minutos. Logo após, retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta.

As amostras protéicas foram precipitadas com TCA 100% e ressuspensas em tampão O'Farrel (1975). O conteúdo protéico das amostras foi quantificado após a ressuspensão (Ramagli e Rodriguez, 1985) e a incorporação de metionina radioativa medida com o auxílio do cintilador (Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR). Os procedimentos experimentais de otimização dos métodos citados acima encontram-se descritos no Apêndice.

4.5.3 Eletroforese em géis bi-dimensionais de poliacrilamida (NEPHGE-PAGE¹)

As eletroforeses em primeira dimensão foram conduzidas em cuba artesanal. Foram aplicados 80 μ g de amostra por capilar para a isoeletrofocalização. As corridas foram mantidas a 400 V e foram encerradas ao atingir amperagem de valor constante.

As eletroforeses em segunda dimensão foram conduzidas em cuba Biorad. Em todas as corridas foi mantida uma amperagem constante de 65mA através de uma fonte Biorad, com voltagem máxima regulada para 996 V e potência máxima de 80W. O gel

¹ NEPGE – *non equilibrium pH gradient electrofocusing*. PAGE – *polyacrilamide gel electroforesis*

separador foi feito em concentração de 12,5%. Os marcadores de massa molecular utilizados possuíam proteínas padrão de peso entre 97,4 a 14,4 kDa.

Para a coloração dos géis utilizou-se Comassie blue G. Em seguida, os mesmos foram secos em secadora Biorad (Model 543 Gel Dryer) e expostos a filmes de raio-X (-18°C) para a obtenção dos fluorogramas (Bonner & Laskey, 1974). O tempo de exposição foi determinado de acordo com a incorporação radioativa. Na revelação dos fluorogramas foram utilizados revelador e fixador Kodak.

Os géis e os fluorogramas controles (plântulas incubadas em água) e tratados (plântulas incubadas em extrato a 1%) foram analisados visualmente por suas diferenças.

Os procedimentos e os reagentes utilizados nos métodos citados para os experimentos realizados no tópico 4.5 encontram-se descritos no Apêndice.

5. Resultados e Discussão

5.1 Crescimento e características morfológicas

Os efeitos do extrato aquoso das folhas de lobeira no comprimento médio das plântulas de gergelim após dois dias e após cinco dias de crescimento, podem ser vistos na Figura 1.

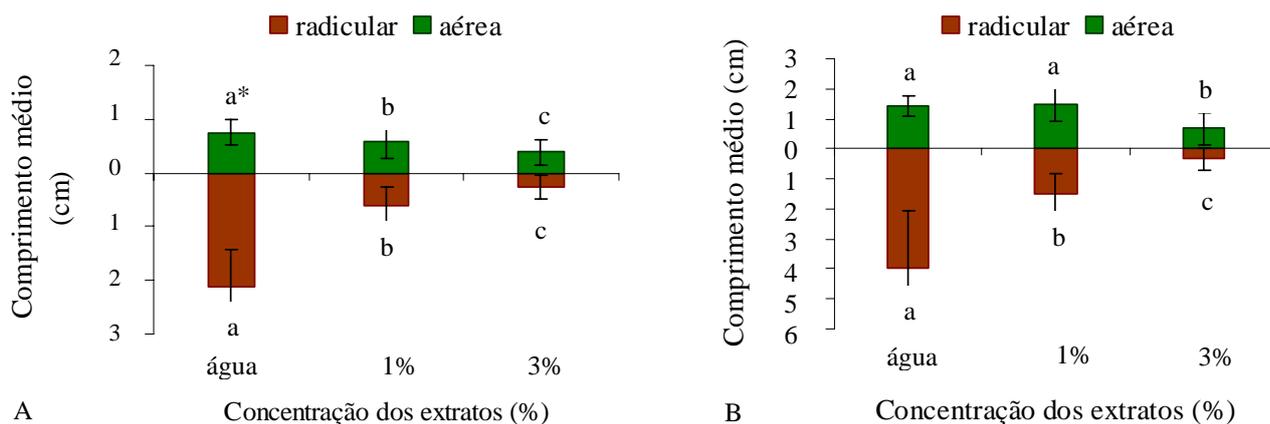


Figura 1. Comprimento médio de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias (A) e por cinco dias (B) em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água. Barras representam o desvio padrão.

*Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=90 plântulas/ tratamento). As comparações foram feitas separadamente entre parte aérea e radicular.

Após dois dias, o crescimento da parte aérea foi menos inibido pelos extratos de folhas de lobeira que a parte radicular (Figura 1A). A parte aérea apresentou um menor crescimento de acordo com o aumento da concentração dos extratos das folhas de lobeira (Figura 1A). No controle em água, o hipocótilo cresceu em média $0,75 \pm 0,24$ cm de comprimento, havendo um menor crescimento médio do mesmo no extrato a 1% e no extrato a 3% ($0,57 \pm 0,31$ cm e $0,38 \pm 0,25$ cm, respectivamente) (Figura 1A). Na parte radicular, também houve uma redução dose-dependente no comprimento médio das plântulas tratadas ($0,60 \pm 0,33$ cm no extrato a 1% e $0,28 \pm 0,22$ cm no extrato a 3%) quando comparadas ao controle em água ($2,11 \pm 0,69$ cm) (Figura 1A). Em termos de porcentagem observa-se que a inibição no crescimento da parte radicular foi maior (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de inibição (%) do crescimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias e por cinco dias em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.

Tratamentos	2 dias	5 dias
Parte Aérea		
água	0	0
1%	24,00%	-7,09%
3%	49,30%	52,48%
Parte Radicular		
água	0	0
1%	71,40%	62,06%
3%	87,10%	91,20%

Após cinco dias de crescimento, a parte aérea não se mostrou afetada pelo extrato a 1% ($1,51 \pm 0,57\text{cm}$) quando comparada ao controle em água ($1,41 \pm 0,34\text{cm}$) (Figura 1B). Observa-se que houve um incremento na porcentagem de crescimento nos hipocótilos tratados com o extrato das folhas a 1% de 7,09% (Tabela 1). Entretanto, tal incremento não foi significativo se comparado ao controle (Figura 1B).

Já nas plântulas tratadas com extrato a 3% ($0,67 \pm 0,54\text{cm}$), nota-se uma redução significativa no comprimento médio da parte aérea, comparando-se tanto com o controle em água quanto com o extrato das folhas a 1% (Figura 1B). A porcentagem de inibição do crescimento na parte aérea é de 52,48% nos hipocótilos das plântulas tratadas com a concentração mais alta do extrato das folhas (Tabela 1). Tal evento corrobora com os dados encontrados por Oliveira (2003) e Oliveira e colaboradores (2004b). Eles afirmam como possível causa para a inibição da parte aérea que, mesmo com as raízes necrosadas, as plântulas estariam absorvendo os aleloquímicos e estes estariam interferindo no desenvolvimento da parte aérea e/ ou que pelo fato de as raízes estarem danificadas não estariam suprindo a plântula adequadamente.

A parte radicular foi afetada significativamente pelos aleloquímicos após cinco dias de crescimento. As plântulas do controle em água apresentaram radículas com comprimento médio de $3,98 \pm 1,91\text{cm}$ e as plântulas que foram incubadas nos tratamentos em extrato de folhas a 1% e em extrato de folhas a 3% apresentaram comprimento médio de $1,51 \pm 0,67\text{cm}$ e $0,35 \pm 0,35\text{cm}$, respectivamente (Figura 2). Em porcentagem, a redução foi de 62,06% no extrato a 1% e de 91,20% no extrato a 3% (Tabela 1).

Comparando-se os dois dias de crescimento aos cinco dias, observa-se que a parte aérea é menos afetada pelos aleloquímicos que a parte radicular (Figuras 1A e 1B). A maior inibição na parte aérea ocorreu no extrato a 3% (Tabela 1). Em estudo realizado por Pires e colaboradores (2001b), observou-se que o extrato aquoso de folhas de leucena ocasionou pouca interferência no desenvolvimento da parte aérea de plântulas de milho e um maior efeito inibitório no desenvolvimento da parte radicular. Os pesquisadores afirmam que a menor interferência dos aleloquímicos de leucena na parte aérea se deve, possivelmente, pela utilização de reservas nutricionais da semente pelas plântulas nesse estágio de desenvolvimento.

A parte radicular se mostrou bastante inibida tanto nos dois dias quanto nos cinco dias de incubação na presença dos aleloquímicos. A porcentagem de inibição foi superior a 60% em todos os tratamentos nos dois dias de crescimento, chegando a 91,20% no extrato a 3% (Tabela 1). Em ambos os períodos de incubação, o efeito de menor crescimento das raízes foi crescente com o aumento da concentração do extrato. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que utilizavam extrato aquoso de leucena (Prates *et al.*, 2000; Pires *et al.*, 2001b), em bioensaio realizado com um aleloquímico presente em espécies do gênero *Salvia* – 1,8-cineole (Koitabashi *et al.*, 1997) e na avaliação do potencial alelopático de *Pennisetum glaucum* L. (milheto) (Saxena *et al.* 1995). Vários trabalhos mostram que as alterações promovidas por aleloquímicos na parte radicular são um dos melhores indicadores de potencial alelopático de extratos (Inderjit & Dakshini, 1995; Souza Filho *et al.*, 1997; Galindo *et al.*, 1999; Abraham *et al.*, 2000; Chon *et al.*, 2000; Ferreira e Áquila, 2000; Pires *et al.*, 2001b; Batish *et al.*, 2002; Oliveira, 2003; Gatti *et al.*; 2004).

Além de interferir quantitativamente no desenvolvimento do gergelim, os aleloquímicos afetaram características morfológicas nas radículas das plântulas tratadas. Nas tabelas 2 e 3 estão quantificadas as porcentagens de presença de necroses, raízes laterais e pêlos absorventes.

Tabela 2. Porcentagem de plântulas que apresentaram necroses, raízes laterais e pêlos absorventes nas radículas de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.

Tratamento (n=90)	Necroses (%)	Raízes laterais (%)	Pêlos absorventes (%)
Controle	0 (a*)	0	100 (a)
Extrato de folhas a 1%	1,11 (a)	0	85,54 (a)
Extrato de folhas a 3%	20,00 (b)	0	2,22 (b)

* Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=90 plântulas/ tratamento).

Nas plântulas incubadas por dois dias nas diferentes concentrações do extrato de folhas a presença de radículas necrosadas aumentou de acordo com o aumento da concentração do extrato, entretanto a presença de necroses foi significativa apenas no extrato a 3% (Tabela 2). Inversamente, a presença de pêlos absorventes diminuiu nas plântulas incubadas no extrato a 3%. Não houve diferença significativa na presença de pêlos absorventes nas plântulas incubadas em água e no extrato a 1%, entretanto foi possível notar visualmente que as plântulas incubadas no extrato a 1% apresentaram menor quantidade de pêlos quando comparadas ao controle. Nas plântulas incubadas a 3%, que apresentaram pêlos, também foi possível visualizar que os mesmos encontravam-se em menor quantidade comparando-se com o controle. Em dois dias de crescimento não havia raízes laterais em nenhum dos tratamentos (Tabela 2).

Tabela 3. Porcentagem de necroses, raízes laterais, pêlos absorventes e quantidade média de raízes laterais em radículas de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por cinco dias em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.

Tratamento (n=90)	Necroses (%)	Raízes laterais (%)	Quantidade média de raízes laterais	Pêlos Absorventes (%)
Controle	0 (a*)	74,44 (a)	**1,73 (1,39) b	100 (a)
Extrato de folhas a 1%	8,88 (a)	70,00 (a)	2,43 (2,12) a	92,22 (a)
Extrato de folhas a 3%	83,33 (b)	12,22 (b)	0,33 (1,00) c	0 (b)

*Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=90 plântulas/ tratamento).

**Valores médios seguidos pelo seu desvio padrão.

Após cinco dias de incubação, há um aumento na porcentagem de plântulas necrosadas (8,88% no extrato das folhas a 1 % e 88,33% no extrato das folhas a 3%). Prates e colaboradores (2000) verificaram que o extrato aquoso de leucena causou necrose do ápice radicular de plântulas de milho, principalmente nas concentrações mais altas do aleloquímico. De acordo com Ferreira & Áquila (2000), a presença de necroses na radícula ocasionada pela ação de aleloquímicos é um sintoma comum em plântulas afetadas.

Nesse período de crescimento já existem raízes laterais nas plântulas de gergelim. Há uma redução no número de plântulas que apresentam raízes laterais de acordo com o aumento da concentração do extrato (74,44% no controle, 70% no extrato a 1% e 12,22% no extrato a 3%) (Tabela 3). No entanto, há um aumento do número médio de raízes laterais por plântula no extrato a 1% ($2,43 \pm 2,12\text{cm}$) comparando-se com o controle em água ($1,73 \pm 1,39\text{cm}$) e com o extrato a 3% ($0,33 \pm 1,00\text{cm}$). Tal estímulo no crescimento das raízes laterais em detrimento da raiz principal pode estar relacionado a distúrbios no balanço hormonal (Dayan *et al.*, 2000). Estudos realizados por Brunn e colaboradores (1992) mostraram que flavonóides inibiram o transporte de auxina levando a um distúrbio em seus níveis normais o que resultou na indução de raízes laterais e na supressão do crescimento geotrópico da raiz.

A quantidade de pêlos absorventes por plântula também foi reduzida no extrato a 1%. Embora a maioria das plântulas tratadas (92,22%) tivessem pêlos, a quantidade era aparentemente menor que a do controle. Nota-se que tal parâmetro é um sensível indicador de efeito alelopático (Miró *et al.*, 1998) tendo em vista que nos diferentes períodos de incubação das plântulas, houve diminuição da quantidade de pêlos absorventes de acordo com o aumento da concentração do extrato.

Na figura 2 é possível visualizar os efeitos do extrato de folhas de lobeira nas plântulas de gergelim.

Os efeitos de redução no tamanho médio, na presença de raízes laterais e na presença de pêlos absorventes observados nas plântulas que cresceram em contato com os aleloquímicos em diferentes concentrações nos diferentes dias de crescimento podem afetar a absorção eficiente dos nutrientes pelas plântulas em condições de campo (Abdala *et al.*, 1998). Outro efeito observado, porém não quantificado, foi a inversão do gravitropismo nas radículas das plântulas incubadas na presença da concentração mais alta dos aleloquímicos (extrato a 3%). Assim como foi relatado por Chon e colaboradores (2000) e por Oliveira (2003) as raízes cresceram em sentido oposto ao substrato.

Entre os fatores que podem mascarar efeitos alelopáticos se encontra o potencial osmótico. O mesmo deve ser considerado especialmente em extratos brutos já que substâncias como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, que são osmoticamente ativas, podem promover alterações em plântulas tratadas impossibilitando distinguir os efeitos causados pelos aleloquímicos dos efeitos puramente osmóticos (Dayan *et al.*, 2000; Ferreira & Áquila, 2000).

Oliveira (2003 e 2004b) avaliou o efeito osmótico do extrato aquoso de folhas de lobeira nas concentrações 0, 1, 2, 3, 4 e 5% no crescimento inicial de plântulas de gergelim em diferentes temperaturas (22, 30 e 38°C) utilizando soluções de PEG 6000. As plântulas apresentaram pequena redução do tamanho da parte aérea e, em alguns casos, até promoção, o que pode significar que parte dos efeitos observados no crescimento podem estar relacionados ao efeito osmótico. Entretanto, as alterações morfológicas detectadas nas plântulas que cresceram na presença do extrato não apareceram nas plântulas que cresceram na presença de PEG 6000, ou seja, possivelmente o efeito osmótico não foi o responsável pelos sintomas qualitativos das plântulas, sendo estes causados exclusivamente pelos aleloquímicos presentes nas folhas.

Diante desses dados, não houve a necessidade de serem realizados novos testes com o potencial osmótico das folhas de lobeira, já que os extratos utilizados neste trabalho foram feitos nas mesmas condições do experimento realizado por Oliveira (2003 e 2004b).



Figura 2. Plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram em contato com água (controle) e diferentes concentrações do extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). Concentrações em porcentagem: 0 (água), 1 e 3. (A) Plântulas incubadas por 2 dias e (B) Plântulas incubadas por 5 dias.

5.2 Conteúdo de água e peso seco das plântulas

Em dois dias de crescimento, os cotilédones e os hipocótilos das plântulas que foram incubadas nas diferentes concentrações do extrato não diferiram significativamente dos respectivos controles em termos de conteúdo de água. Os cotilédones apresentaram no controle: 77,3% de água; no extrato a 1%: 78% de água; e no extrato a 3%: 72% de água. Nos hipocótilos o conteúdo de água foi de 95% tanto no controle quanto no extrato a 1% e de 93,4% para o extrato a 3%. Nas radículas, o conteúdo de água foi menor de acordo com o aumento da concentração do extrato. No controle o conteúdo de água foi de 96,4%, no extrato a 1% foi de 94,9% e no extrato a 3% foi de 91,3% (Figura 3).

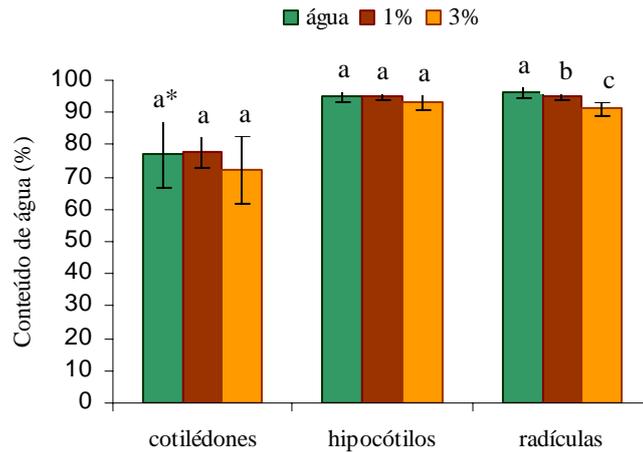


Figura 3. Conteúdo de água após dois dias de crescimento de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.

*Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=09). As comparações foram feitas separadamente entre cotilédones, hipocótilos e radículas.

Em cinco dias de incubação os cotilédones e hipocótilos das plântulas que cresceram no extrato a 3% apresentaram menor conteúdo de água quando comparados aos respectivos controles e às plântulas que cresceram no extrato a 1%. Os cotilédones apresentaram 94% tanto no controle quanto no extrato a 1% e 87,1% no extrato a 3%. Os hipocótilos possuíam 97% de água no controle e no extrato a 1% e 95% de água no extrato a 3%. Já para as radículas das plântulas, observa-se a diminuição dose-dependente no conteúdo de água à medida que se aumenta a concentração dos extratos, assim como foi observado para as radículas incubadas por dois dias (Figura 4).

O menor conteúdo de água nos cotilédones se explica porque no final dos experimentos muitos deles ainda não haviam saído dos tegumentos, especialmente em dois dias de crescimento e no extrato a 3% independentemente do período de incubação. As radículas apresentaram redução dose-dependente no conteúdo de água, possivelmente pelo contato direto com os aleloquímicos (Figuras 3 e 4) o que também ocasionou a redução no crescimento e as alterações morfológicas (Figura 1 e Tabelas 2 e 3).

Apesar de estatisticamente ocorrerem diferenças no conteúdo de água nas diferentes partes das plântulas e nos diferentes períodos de incubação, tais diferenças possam não ser relevantes sob o ponto de vista biológico.

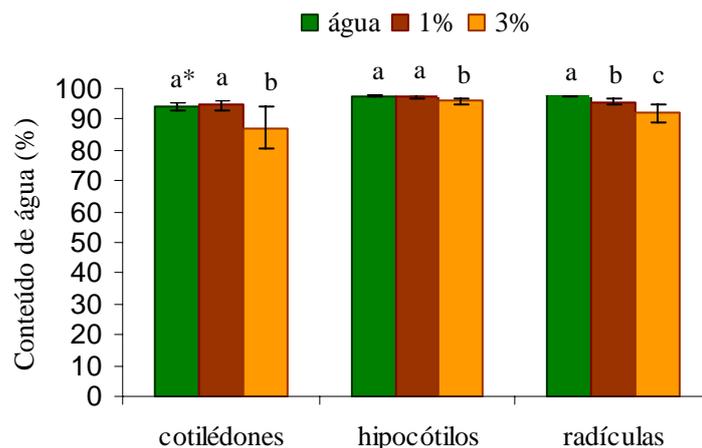


Figura 4. Conteúdo de água após cinco dias de crescimento de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.).

*Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=09). As comparações foram feitas separadamente entre cotilédones, hipocótilos e radículas.

Na tabela 4 está ilustrado o peso seco das plântulas incubadas no controle e nos diferentes tratamentos.

Tabela 4. Massa seca após dois dias e cinco dias de crescimento de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e da semente de gergelim. (Cot=cotilédones; Hip=hipocótilos; Rad=radículas; Plânt=plântula; Sem=semente).

	Peso Seco (mg)							
	2 dias				5 dias			
	Cot*	Hip	Rad	Plânt	Cot	Hip	Rad	Plânt
Água	14.0 (1.0)** a	6.0 (9.0) a	4.0 (1.0) a	24.0 (9.0) a	12.0 (1.0) a	3.0 (0) a	4.0 (0) a	19.0 (1.0) a
1%	17.0 (2.0) b	3.0 (0) b	2.0 (0) b	21.0 (1.0) a	12.0 (4.0) a	4.0 (0) b	3.0 (0) b	19.0 (4.0) a
3%	17.0 (6.0) b	2.0 (1.0) c	1.0 (0) c	20.0 (6.0) a	14.0 (2.0) b	3.0 (1.0) a	1.0 (1.0) c	19.0 (2.0) a

*Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=09).

** Valores médios seguidos pelo desvio padrão

O peso seco variou bastante entre os diferentes dias de incubação, nas diferentes partes das plântulas e nos diferentes tratamentos. No geral, os cotilédones apresentaram maior massa seca, seguidos pelos hipocótilos e radículas. Também se verificou que os cotilédones tratados nos diferentes extratos possuem maior massa seca comparando-se ao

controle. É possível que a distribuição das reservas contidas nos cotilédones seja afetada negativamente pelos aleloquímicos, interferindo, conseqüentemente, no ganho de massa seca nos hipocótilos e radículas tratadas, exceto nos hipocótilos tratados por cinco dias (Tabela 4).

Comparando-se a massa seca total das plântulas nota-se que não há diferença significativa entre controle e tratamentos. Esse dado contraria o que foi encontrado por Batish e colaboradores (2002), em que foi verificada a diminuição da massa seca em plântulas de *Avena fatua* L. (aveia) e *Bidens pilosa* (picão-preto) tratadas com o aleloquímico pathernin; com estudos realizados por Jiménez-Osornio e colaboradores (1996) em que óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) reduziram a biomassa de *Phaseolus acutifolius* A. Gray (feijão); e com experimentos realizados por Prates e colaboradores (2000) em que o extrato aquoso de leucena inibiu a incorporação de massa seca da parte aérea, parte radicular e total de plântulas de milho. Contrariamente, o extrato aquoso de leucena ocasionou incremento de biomassa em plântulas de milho (Pires *et al.* 2001b).

No presente estudo, observa-se que a parte radicular apresentou menor biomassa nos diferentes períodos de incubação depois do tratamento com os extratos e que os hipocótilos tiveram menor biomassa apenas no tratamento com os extratos por dois dias. A maior sensibilidade das raízes comparada a parte aérea das plantas foi verificada em bioensaios realizados por Miró e colaboradores (1998) e Santos e colaboradores (2002).

Também é possível observar que ocorre perda de massa seca da semente (tendo em vista que seu peso seco é de 28g) para a formação da plântula, e da plântula com dois dias para a plântula com cinco dias de idade, o que deve estar relacionado com a utilização de reservas para o desenvolvimento da mesma (Tabela 4). Possivelmente, nos primeiros dias de desenvolvimento, o catabolismo celular e a respiração sejam altos nas plântulas, desfavorecendo a incorporação de matéria. Entretanto, como será observado no experimento de reversibilidade, em sete dias de desenvolvimento (Tabela 7), a plântula aumentou seu peso seco, denotando-se assim, um provável aumento do anabolismo celular e um conseqüente incremento na incorporação de matéria seca. Ainda assim, a massa seca da plântula com sete dias de idade é menor que o peso seco da semente (Tabela 7).

5.3 Reversibilidade

Em geral, os estudos que tratam de reversibilidade se baseiam em amenizar os efeitos inibitórios dos aleloquímicos fornecendo substratos que complementam uma deficiência fisiológica ocasionada pela presença do inibidor (Dayan, 2000), ou que reajam diretamente com o inibidor impedindo sua ação (Galindo *et al.* 1999; Dayan, 2000). No entanto, para se utilizar tal método se faz necessário conhecer o(s) sítio(s) de ação do(s) aleloquímico(s) (Dayan, 2000).

Como o presente estudo investigou os efeitos dos aleloquímicos das folhas de lobeira no crescimento, nas características morfológicas e no perfil de síntese de proteínas do gergelim, ainda não foi possível afirmar qual ou quais são os sítios de ação em que o extrato aquoso das folhas de lobeira atuam para que se possa determinar qual ou quais substratos poderiam reverter tais efeitos.

Dentro dessa perspectiva, para se investigar os efeitos dos aleloquímicos presentes nas folhas de lobeira eram reversíveis, fez-se a lavagem das plântulas que cresceram em contato com as diferentes concentrações do extrato.

A transferência das plântulas para água após um pré-tratamento por dois dias na presença dos extratos, resultou em uma recuperação morfológica visível das mesmas.

A parte aérea das plântulas que permaneceram constantemente em contato com o extrato a 1% cresceu 6,4% a mais do que o controle em água, entretanto essa diferença não foi significativa em relação ao controle. Em contrapartida, a parte aérea das plântulas incubadas no extrato a 3% obteve um crescimento 45% menor do que o controle. Já na parte aérea das plântulas que após dois dias em contato com os aleloquímicos foram transferidas para água e incubadas por mais cinco dias, o crescimento foi menor em 20% comparando-se ao controle. Portanto, observa-se que a parte aérea mostrou-se mais sensível à transferência para água apenas no extrato a 3% já que a mesma cresceu 25% a mais do que aquela que cresceu em contato constante com o extrato (Tabela 5).

Tabela 5. Comprimento médio (cm) e porcentagem de crescimento das partes aérea e radicular de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram em água e em diferentes concentrações (1% e 3%) do extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.).

Tratamento	Comprimento médio (cm)	Crescimento (%)	Comprimento médio (cm)	Crescimento (%)
	Parte Aérea		Parte Radicular	
água (controle)*	1,46 (0,7)	100 (a)****	3,42 (1,09)	100 (a)
1% alelopatia**	1,55 (0,06)	106,4 (a)	2,09 (1,08)	61,30 (bc)
3% alelopatia	0,80 (0,22)	55,27 (c)	0,78 (1,05)	23,00 (d)
1% reversibilidade***	1,18 (0,21)	81,3 (b)	2,65 (0,81)	77,47 (b)
3% reversibilidade	1,16 (0,44)	79,48 (b)	1,95 (0,52)	57,06 (c)

*Comprimento médio das plântulas que cresceram por sete dias em água subtraído do comprimento médio das plântulas que cresceram por dois dias em água.

**Comprimento médio das plântulas que cresceram por sete dias em diferentes concentrações do extrato subtraído do comprimento médio das plântulas que cresceram por dois dias em diferentes concentrações dos aleloquímicos.

***Comprimento médio das plântulas que cresceram por dois dias em diferentes concentrações do extrato e que foram transferidas para água onde cresceram por mais cinco dias, subtraído do comprimento médio das plântulas que cresceram por dois dias em diferentes concentrações dos aleloquímicos.

****Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Intervalo de Confiança a 5% (n=90 plântulas/ tratamento). As comparações foram feitas separadamente entre parte aérea e radicular.

A parte radicular foi mais afetada pelos aleloquímicos do que a parte aérea. No extrato a 1% o crescimento da parte radicular foi de 61% e no extrato a 3% foi de 23% em relação ao controle. Após a transferência para água, nota-se que há um aumento da porcentagem de crescimento em 16% para as plântulas transferidas do extrato a 1% para a água e em 34% para as plântulas transferidas do extrato a 3% para a água (Tabela 5). Apesar de haver aumento na taxa crescimento da parte radicular nas plântulas que foram transferidas do extrato a 1% para a água, ele não foi significativo comparando-se as plântulas que permaneceram em contato com os aleloquímicos (Tabela 5).

Tabela 6. Porcentagem de plântulas com necroses, raízes laterais, pêlos absorventes e quantidade média de raízes laterais de radículas de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas em diferentes concentrações (1% e 3%) de extratos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e em água.

Tratamento (n=90)	Necroses (%)	Raízes laterais (%)	Quantidade média de raízes laterais	Pêlos absorventes (%)
água (controle)*	0 (a****)	81.11% (a)	*****2.35 (1.94) (a)	100% (a)
1% alelopatia**	21.11% (b)	75.55%(a)	1.73 (1.33) (ab)	97.78% (a)
3% alelopatia	53.33% (c)	40%(b)	1.09 (1.61) (c)	3.33% (b)
1% reversibilidade***	0 (a)	74.44%(a)	1.52 (1.42) (b)	100% (a)
3% reversibilidade	12.22% (ab)	66.67%(a)	1.62 (1.60) (b)	92.22% (a)

*Comprimento médio das plântulas que cresceram por sete dias em água.

**Comprimento médio das plântulas que cresceram por sete dias em diferentes concentrações do extrato.

***Comprimento médio das plântulas que cresceram por dois dias em diferentes concentrações do extrato e que foram transferidas para água crescendo por mais cinco dias.

****Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% (n=90 plântulas por tratamento).

*****Valores médios seguidos pelo seu desvio padrão.

As características morfológicas afetadas nas radículas tratadas também são reversíveis. É possível observar, na Tabela 6, que a porcentagem de plântulas necrosadas diminuiu significativamente após a transferência para água comparando-se com as plântulas que permaneceram incubadas constantemente nas diferentes concentrações de extrato das folhas. Como tecidos que estão necrosados não podem se regenerar, é possível afirmar que a coloração escurecida nas radículas das plântulas tratadas nos diferentes dias de incubação se deva pela presença de compostos fenólicos nos extratos. Esse escurecimento também é observado no papel filtro que serve como substrato para as plântulas. Esses dados contrariam o que foi exposto por Ferreira e Áquila (2000) e podem contrariar também outros estudos que afirmam que tecidos escurecidos sejam necroses.

Para a presença de raízes laterais e de pêlos radiculares, nota-se que as plântulas incubadas no extrato a 3% foram afetadas significativamente, apresentando tais características em menor quantidade. Entretanto, a transferência das plântulas incubadas nesse extrato para água, possibilitou a recuperação das radículas que não diferiram morfológicamente dos respectivos controles.

A quantidade média de raízes laterais por plântula foi menor no extrato a 3%, mas com a transferência para a água ocorreu um aumento nessa quantidade. Já o extrato a 1% favoreceu o aparecimento de raízes laterais. A quantidade média de raízes laterais nesse

extrato não diferiu significativamente do controle e nem das plântulas transferidas para a água.

Os efeitos quantitativos e qualitativos da reversibilidade nas plântulas de gergelim em relação a plântulas tratadas com os aleloquímicos das folhas de lobeira podem ser vistos na figura 5.

Estudo realizado por Koitabashi e colaboradores (1997) em que o aleloquímico 1,8-cineole inibiu o crescimento radicular e a síntese de DNA no meristema apical da canola, mostra que quando cineole foi lavado das raízes tratadas com o aleloquímico, as plântulas retomaram seu crescimento, o que indica que os efeitos ocasionados por cineole são reversíveis e facilmente eliminados pela lavagem com água. Essa informação corrobora com os dados encontrados para as plântulas tratadas com os aleloquímicos da lobeira, que após a lavagem retomaram seu crescimento e começaram a apresentar características morfológicas semelhantes às do controle.



Figura 5. Plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram em contato com água (controle) e diferentes concentrações do extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). Concentrações em porcentagem: 0 (água), 1 e 3. (A) Plântulas incubadas por 7 dias na presença de aleloquímicos e do controle e (B) Plântulas incubadas por 2 dias na presença de aleloquímicos e transferidas para água onde cresceram por mais 5 dias.

Um dos fatores que determinam a ação efetiva de um aleloquímico após ser liberado no ambiente e estar em contato com o organismo alvo, é sua permanência e seu tempo de residência no meio e nas concentrações bioativas (Inderjit, 2001; Souza Filho & Alves, 2002a; Inderjit & Duke, 2003). Observações realizadas por Oliveira (2003) constataram que os aleloquímicos das folhas de lobeira que estão em contato direto com o solo, são liberados mais expressivamente na época das chuvas, já que as mesmas perderam sua atividade em menos de 15 dias comparando-se aos mais de 45 dias das folhas caídas no solo na época de seca. Isso sugere que a lavagem dos aleloquímicos das folhas de lobeira, realizadas neste experimento, reduz sua concentração no meio até que se elimine o seu potencial fitotóxico ocasionando a retomada do crescimento e desenvolvimento das plântulas de gergelim.

Nas plântulas que permaneceram por sete dias em contato com os aleloquímicos, o conteúdo de água foi menor nos hipocótilos incubados no extrato a 3%. Nas radículas, o conteúdo de água foi menor quanto maior a concentração do extrato ou seja, dose-dependente. Nas plântulas transferidas para a água após dois dias de incubação nas diferentes concentrações do extrato das folhas, o conteúdo de água não apresentou variação entre as diferentes concentrações do extrato (0, 1% e 3%) e nem entre as diferentes partes da plântula. Isso deve ser possível pela recuperação das características morfológicas das radículas na ausência dos aleloquímicos e pela retomada da capacidade de absorção de água das mesmas (Figura 6).

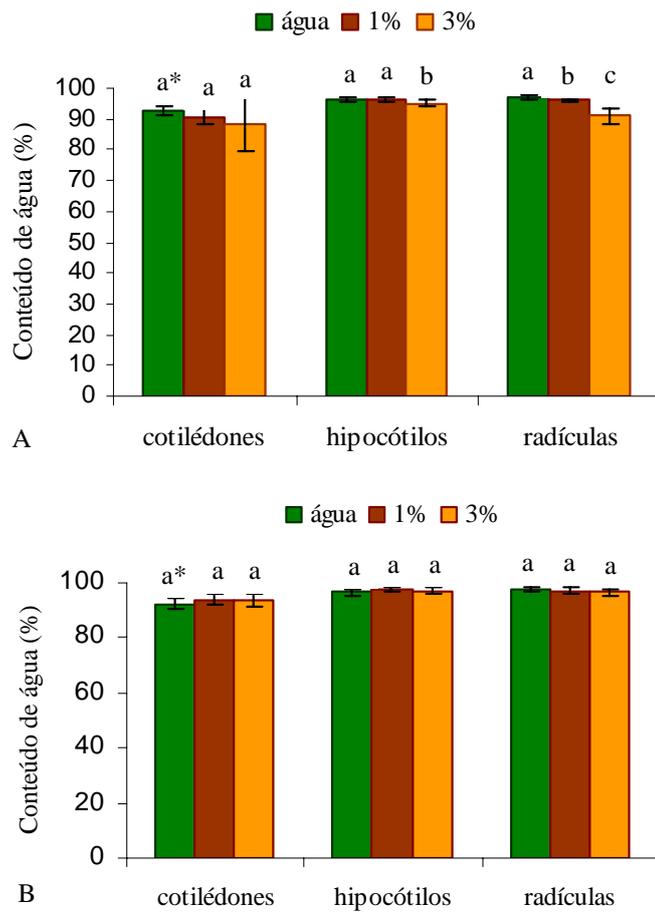


Figura 6. Conteúdo de água de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). A. Plântulas incubadas por sete dias na presença dos aleloquímicos. B. Plântulas incubadas por dois dias na presença dos aleloquímicos e transferidas para água crescendo por mais cinco dias.

*Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=09). As comparações foram feitas separadamente entre cotilédones, hipocótilos e radículas.

Novamente, apesar das diferenças estatísticas no conteúdo de água nas plântulas incubadas nos extratos, essas diferenças não são relevantes biologicamente.

Tabela 7. Massa seca após sete dias de crescimento e do experimento de reversibilidade de diferentes porções de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) crescendo em diferentes concentrações do extrato (água, 1% e 3%) de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) e da semente de gergelim. (Cot=cotilédones; Hip=hipocótilos; Rad=radículas; Plânt=plântula; Sem=semente).

Peso Seco (mg)								
	7 dias				Reversibilidade			
	Cot	Hip	Rad	Plânt	Cot	Hip	Rad	Plânt
Água	12.0 (1.0) a	5.0 (1.0) a	6.0 (0) a	23.0 (1.0) a	12.0 (1.0) a	5.0 (1.0) a	6.0 (0) a	23.0 (1.0) a
1%	12.0 (1.0) a	6.0 (1.0) a	4.0 (1.0) b	21.0 (2.0) a	13.0 (1.0) a	4.0 (1.0) a	4.0 (1.0) b	21.0 (1.0) b
3%	14.0 (3.0) a	5.0 (2.0) a	2.0 (1.0) c	21.0 (3.0) a	13.0 (2.0) a	5.0 (0) a	3.0 (0) c	20.0 (2.0) b

*Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney a 5% (n=09).

** Valores médios seguidos pelo desvio padrão

Após sete dias de crescimento e do tratamento de reversibilidade (Tabela 7), os cotilédones, assim como em dois e cinco dias de incubação (Tabela 4), apresentam maior conteúdo de massa seca. Já as radículas e hipocótilos controle apresentaram massa seca similar, enquanto que as radículas tratadas obtiveram menor massa seca em relação aos hipocótilos tratados, resultado similar ao encontrado por Miró e colaboradores (1998) e Santos e colaboradores (2002) (Tabela 7). Os hipocótilos tratados não diferiram em biomassa seca entre si e nem em relação ao controle. A massa seca da plântula variou no tratamento de reversibilidade, onde houve diminuição nas plântulas tratadas com o extrato.

As radículas se mostraram mais sensíveis ao tratamento com o extrato das folhas mesmo após o tratamento de reversibilidade, indicando que a lavagem dos aleloquímicos não deixou de afetar a distribuição de biomassa negativamente. Contudo, nota-se que no tratamento a 3% reversibilidade há um pequeno aumento da massa seca comparando-se com as radículas tratadas por sete dias no mesmo tratamento o que pode indicar um início de ganho de incorporação de matéria.

5.4 Síntese protéica

5.4.1 Incorporação isotópica

Para se chegar a uma metodologia eficiente de absorção do isótopo radioativo ^{35}S -metionina foram realizados testes preliminares que estão descritos com seus respectivos resultados no Anexo.

A incorporação isotópica realizada para a obtenção das amostras protéicas aplicadas nos géis bi-dimensionais está representada na Figura 7.

A parte radicular das plântulas que cresceram em contato com o extrato a 1% incorporou menos metionina comparando-se a parte radicular das plântulas que cresceram em água. Já os hipocótilos que foram incubados em água e aqueles incubados em extrato a 1% não apresentaram diferenças em sua incorporação. A incorporação nas radículas e nos hipocótilos incubados em água foi de 287 754 cpma e de 89 439 cpma respectivamente. Já nas partes das plântulas incubadas no extrato a 1% a incorporação foi de 216 501 cpma nas radículas e de 80 453 cpma nos hipocótilos (Figura 7).

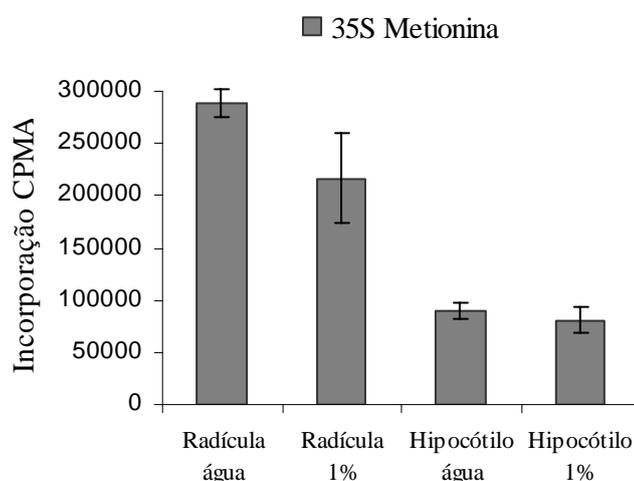


Figura 7. Incorporação isotópica (CPMA) de ^{35}S -metionina em radículas e hipocótilos de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram por 48 horas incubadas em água e em extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1%. Às 42 horas ^{35}S -metionina ($3\mu\text{Ci}$ / plântula) foi diluída na solução (água ou extrato a 1%) em que as plântulas estavam incubadas ($n=150$). Barras representam o desvio padrão.

Observa-se que houve maior incorporação isotópica nas radículas comparando-se aos hipocótilos. Como as radículas estavam em contato direto com a solução, é provável

que isso tenha favorecido a incorporação. Outra hipótese seria que ocorra uma demora na chegada do isótopo até a parte aérea.

Oliveira (2003) ao fazer análise fitoquímica do extrato aquoso de folhas de lobeira detectou a presença de fenóis. Um dos processos fisiológicos afetados negativamente por compostos fenólicos é a síntese de proteínas (Reigosa *et al.* 1999b).

Baziramakenga e colaboradores (1996) ao verificarem os efeitos dos ácidos fenólicos nos níveis de proteína presentes em plântulas de soja comprovaram a interferência desses compostos na captura de ^{35}S -metionina. Os ácidos hidróxi-benzóico e cumárico aumentaram a captura de ^{35}S -metionina enquanto que os ácidos benzóico, cinâmico, ferrúlico e vanílico reduziram a captura. Pesquisa realizada por Cameron e Julian (1980) também indica que os ácidos cinâmico e ferrúlico reduziram a incorporação de ^{14}C -tirosina nas proteínas de plântulas de alface. Estes estudos sugerem que a interferência no metabolismo de proteínas pelos ácidos fenólicos é um dos principais mecanismos que influenciam o crescimento da planta.

Pelos resultados encontrados nas plântulas de gergelim tratadas com os aleloquímicos das folhas de lobeira, pressupõe-se que a redução da incorporação de ^{35}S -metionina, possivelmente, se deva pela presença de compostos fenólicos nas folhas de lobeira, entretanto, uma identificação detalhada desses compostos conjuntamente com bioensaios que testem o efeito dos mesmos na incorporação de ^{35}S -metionina se faz necessária para que se possa afirmar a consistência desses dados.

5.4.2 Perfil eletroforético bi-dimensional

Os géis de hipocótilos e de radículas controle (incubadas em água) e tratadas (incubadas na presença de aleloquímicos de folhas de lobeira) e seus respectivos fluorogramas estão apresentados nas figuras 8-11.

Nos géis de hipocótilos de gergelim controle e tratados (Figura 8 – A e B), observa-se que as proteínas 1, 2, 3 e 4 e aquelas presentes nos grupos **a** e **c** tiveram sua expressão aumentada pela presença do extrato de folhas de lobeira a 1%. Já a proteína 5 e aquelas presentes no grupo **b** tiveram uma redução muito sutil em sua expressão na presença dos aleloquímicos das folhas.

Nos fluorogramas controle e tratado dos hipocótilos de gergelim (Figura 9 – A e B), nota-se que as proteínas presentes nos géis não foram marcadas com o isótopo radioativo, tendo em vista que as mesmas quase não aparecem ou não estão presentes (setas e balões pretos). Entretanto, proteínas que não aparecem nos géis (setas vermelhas e azuis: Figura 8 - A e B), possivelmente pelo menor poder de detecção da coloração com comassie blue, estão presentes nos fluorogramas (setas vermelhas e azuis: Figura 9 – A e B). É possível visualizar que apenas quatro proteínas (10, 12, 13 e 14) presentes no fluorograma controle aparecem no fluorograma tratado e que, além disso, as proteínas que estão presentes no fluorograma tratado (17-23) não aparecem no respectivo controle, mostrando haver síntese “de novo” diferencial nos hipocótilos incubados na presença dos aleloquímicos.

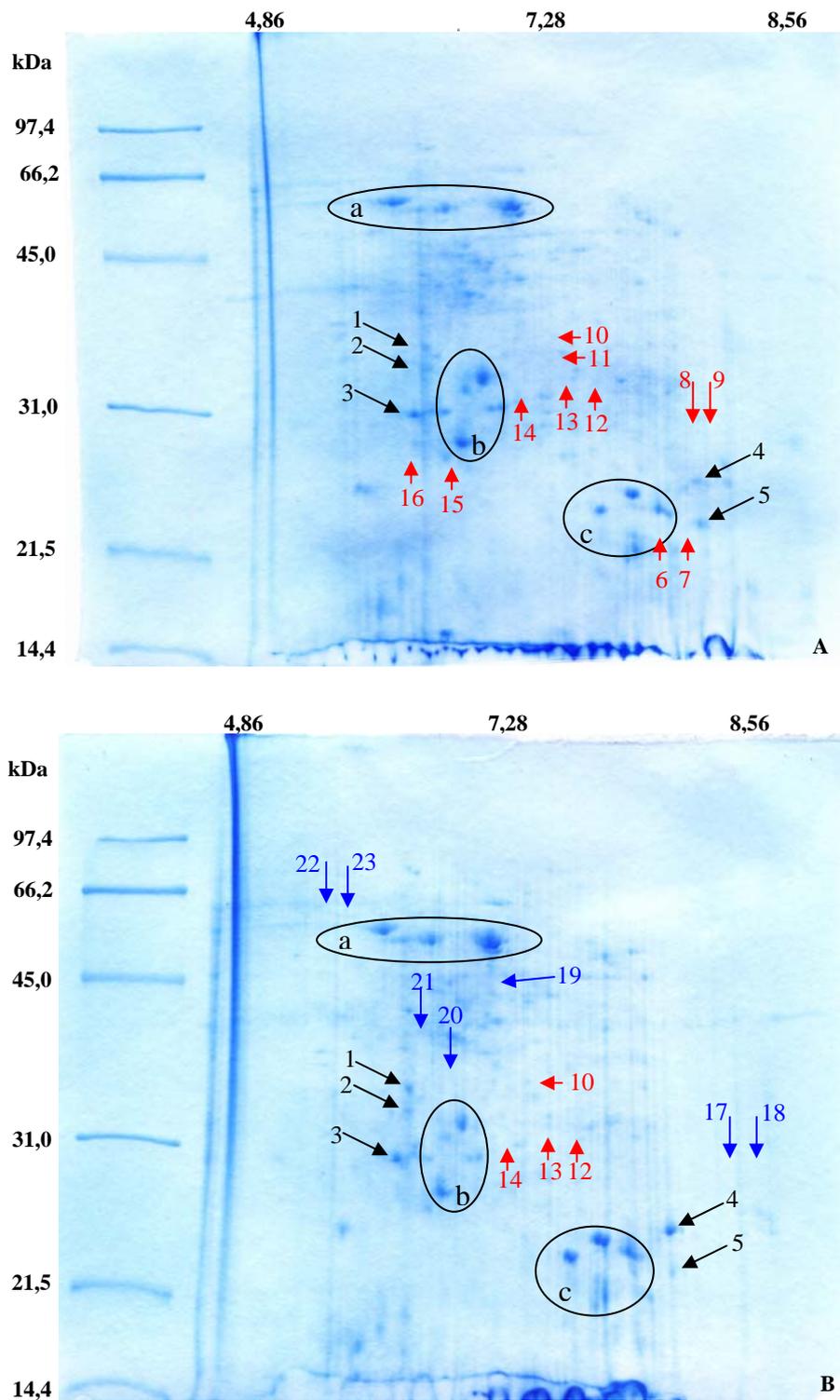


Figura 8. Géis bi-dimensionais NEPHGE-PAGE de proteínas de hipocótilos de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1% (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos géis. As faixas de pH estão indicadas acima dos géis. Setas e balões pretos representam proteínas observadas nos géis, setas vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

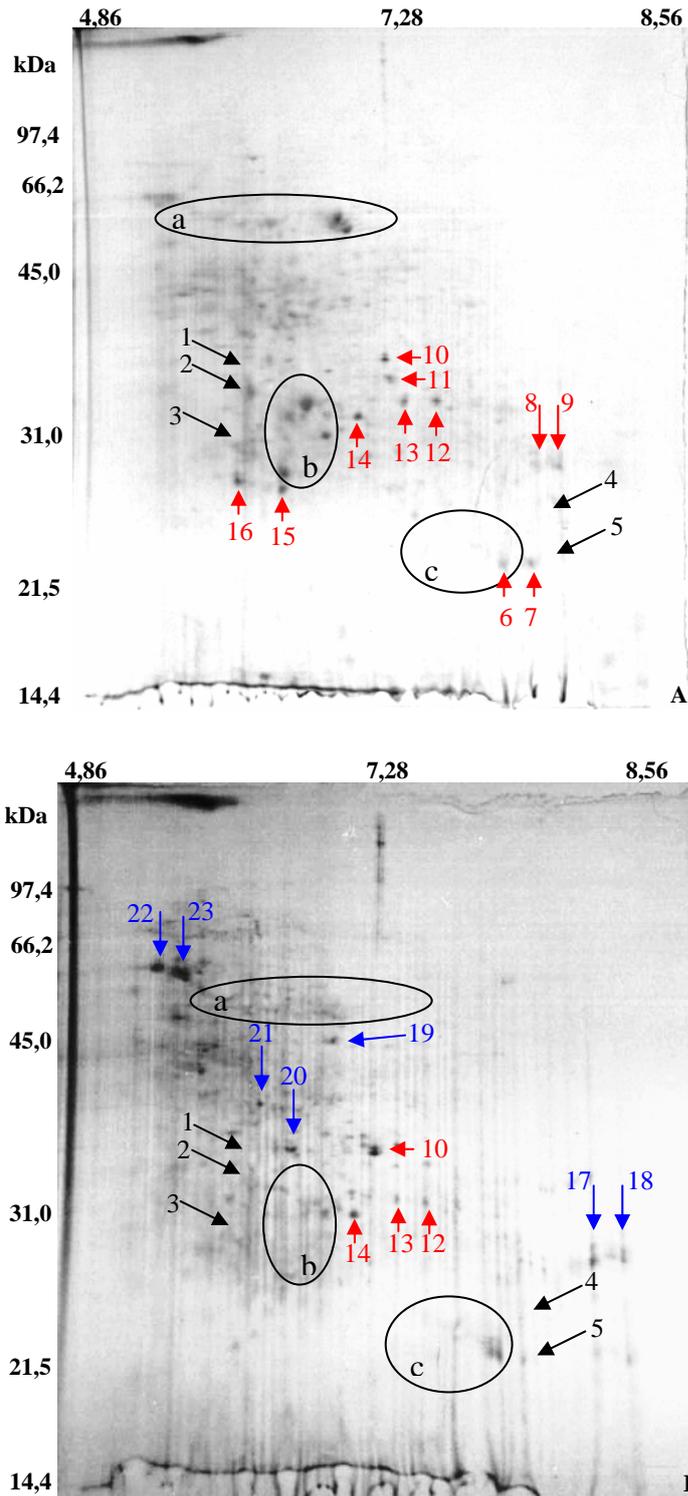


Figura 9. Fluorogramas de proteínas de hipocótilos de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1% (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos fluorogramas. As faixas de pH estão indicadas acima dos fluorogramas. Setas e balões pretos representam proteínas observadas nos géis, setas vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

Comparando-se ao perfil dos hipocótilos, as radículas apresentam, de forma geral, maior síntese protéica (Figura 7). Além disso, como já era esperado, diferenças foram encontradas quando se comparou os perfis de hipocótilos e de radículas, independentemente do tratamento (água ou extrato de folhas a 1%) (Figuras: 8 – A e B e 10 – A e B).

A comparação de géis de raízes controle e tratadas mostra que algumas proteínas apresentaram *spots* ligeiramente mais intensos no tratamento (proteínas 1, 2, 3, 11, 15, 20), e outras menos intensas (proteínas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19), quando comparadas ao controle (Figura 10 – A e B).

No fluorograma do controle notou-se a presença de algumas proteínas presentes no respectivo gel (proteínas: 5, 9, 12, 14, 16, 19). No tratamento não foi possível detectar sobreposição entre proteínas presentes nos géis e nos fluorogramas (Figura 11 – A e B).

Além das proteínas encontradas no gel controle, também houve a expressão “de novo” de proteínas no fluorograma controle (proteínas 21 a 32; Figura 11 - A). No fluorograma tratado observou-se a presença de proteínas encontradas no fluorograma controle (proteínas 21, 27, 29, 30, 31, 32), mas não presentes nos géis. Além disto, observou-se proteínas sintetizadas “de novo” apenas no fluorograma tratado (proteínas 33 a 43; Figura 11 – B). Isto foi observado também para os hipocótilos (Figura 9 – B).

Como foi verificado pela análise dos perfis protéicos, os hipocótilos tiveram poucas alterações ocasionadas pela ação dos aleloquímicos, já as radículas mostraram maiores alterações. Em contraste aos fluorogramas, em nenhum dos géis, tanto de hipocótilos quanto de radículas, foi constatada a presença de proteínas cuja síntese tenha sido induzida ou reprimida pelo tratamento.

Estudos realizados por Romero-Romero e colaboradores (2002), com extratos aquosos de folhas de *Sycios deppei* G. Don, *Accacia sedillense* L. Rico, *Sebastiania adenophora* Pax & K. Hoffm. e *Lantana camara* L. mostraram o efeito dos aleloquímicos dessas espécies no crescimento radicular e na síntese protéica do milho, feijão, abóbora e tomate. De maneira geral, os extratos ocasionaram inibição do crescimento radicular e aumento da síntese protéica. Algumas proteínas tiveram um decréscimo de sua expressão, ou mesmo totalmente reprimidas, enquanto outras tiveram sua síntese induzida pelos extratos.

Estudo semelhante foi feito por Cruz-Ortega e colaboradores (2002), onde resultados similares foram encontrados ao se testar os aleloquímicos do extrato aquoso de

Callicarpa acuminata H.B.K. em feijão, milho e tomate. Neste caso, as radículas de feijão e de milho apresentaram, no geral, proteínas com expressão aumentada, enquanto que no tomate a maior parte das proteínas sofreu um decréscimo em sua expressão.

Ainda no trabalho realizado por Cruz-Ortega e colaboradores (2002), uma proteína de 11.3 kDa que teve sua síntese aumentada significativamente nas raízes tratadas de feijão foi seqüenciada e sua seqüência de aminoácidos mostrou 94% de similaridade com o inibidor α -amilase de outra espécie de feijão. No milho, a identificação de uma proteína de 27.5 kDa, que também foi induzida nas radículas tratadas, mostrou 95% de similaridade com a enzima glutationa-S-transferase de uma espécie do gênero *Solanum* (*S. commersonii* Dumal - batata). Segundo os autores, polipeptídeos inibidores de α -amilase e a enzima glutationa-S-transferase estão relacionados a diferentes respostas de defesa nas plantas, seja por ataque de patógenos ou de insetos, ou como mecanismo de resposta a estresses.

Assim como foi observado por Romero-Romero e colaboradores (2002) e por Cruz-Ortega e colaboradores (2002), em geral houve aumento da síntese protéica nas radículas de gergelim tratadas com os aleloquímicos de lobeira. De acordo com o que foi relatado pelos autores acima, é possível que as proteínas que tiveram sua síntese aumentada em resposta aos tratamentos são proteínas de estresse que estão relacionadas a mecanismos de defesa tais como as “heat shock proteins” (HSPs), “pathogenic-related proteins” (PR), ou “salinity and dehydration proteins” (LEA). Já as proteínas que tiveram sua síntese diminuída podem estar envolvidas nos processos de divisão celular, alongamento, formação de parede celular ou tráfego vesicular (Romero-Romero *et al.* 2002 e Cruz-Ortega *et al.* 2002).

O aumento na síntese protéica de hipocótilos e radículas de gergelim tratados com o extrato de folhas de lobeira corrobora com o aumento da incorporação de metionina radioativa verificado no bioensaio anterior (Figura 7). Nesse contexto, nota-se que a incorporação de isótopo radioativo é uma boa forma de se quantificar os efeitos na síntese protéica. A incorporação isotópica aliada a análise de perfis eletroforéticos permitiu mostrar que os perfis em gel de comassie blue e os perfis dos fluorogramas são distintos e revelam diferentes padrões de expressão.

Diversas proteínas presentes nos géis não são sintetizadas “de novo”, logo aparentemente não estão participando do crescimento inicial e de respostas das plântulas a ação dos extratos, entretanto é interessante identificar as proteínas que tiveram sua síntese aumentada significativamente nos géis para que se possa afirmar tal suposição.

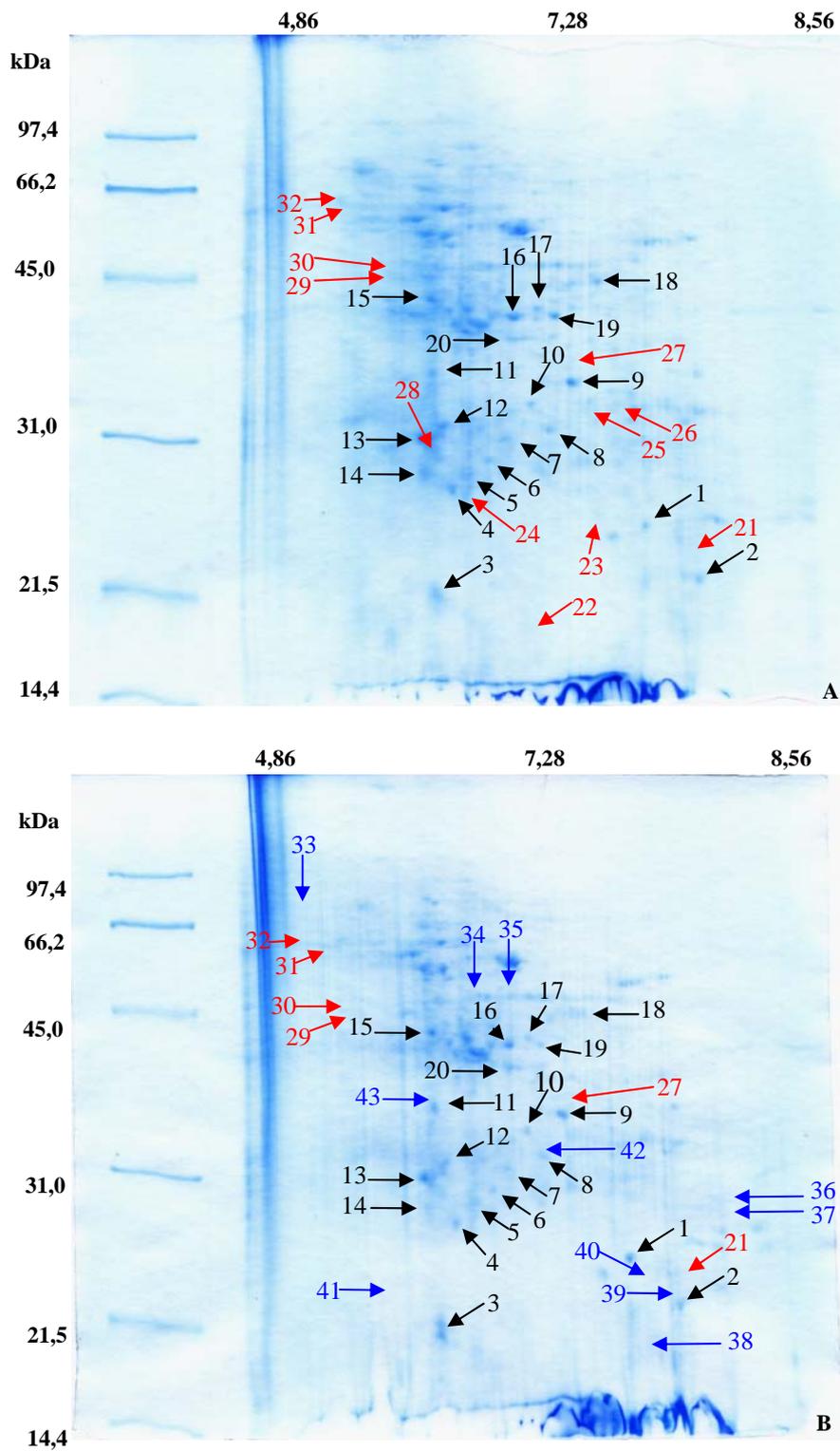


Figura 10. Géis bi-dimensionais NephGE-PAGE de proteínas de radículas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1% (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos géis. As faixas de pH estão indicadas acima dos géis. Setas pretas representam proteínas analisadas nos géis, setas vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

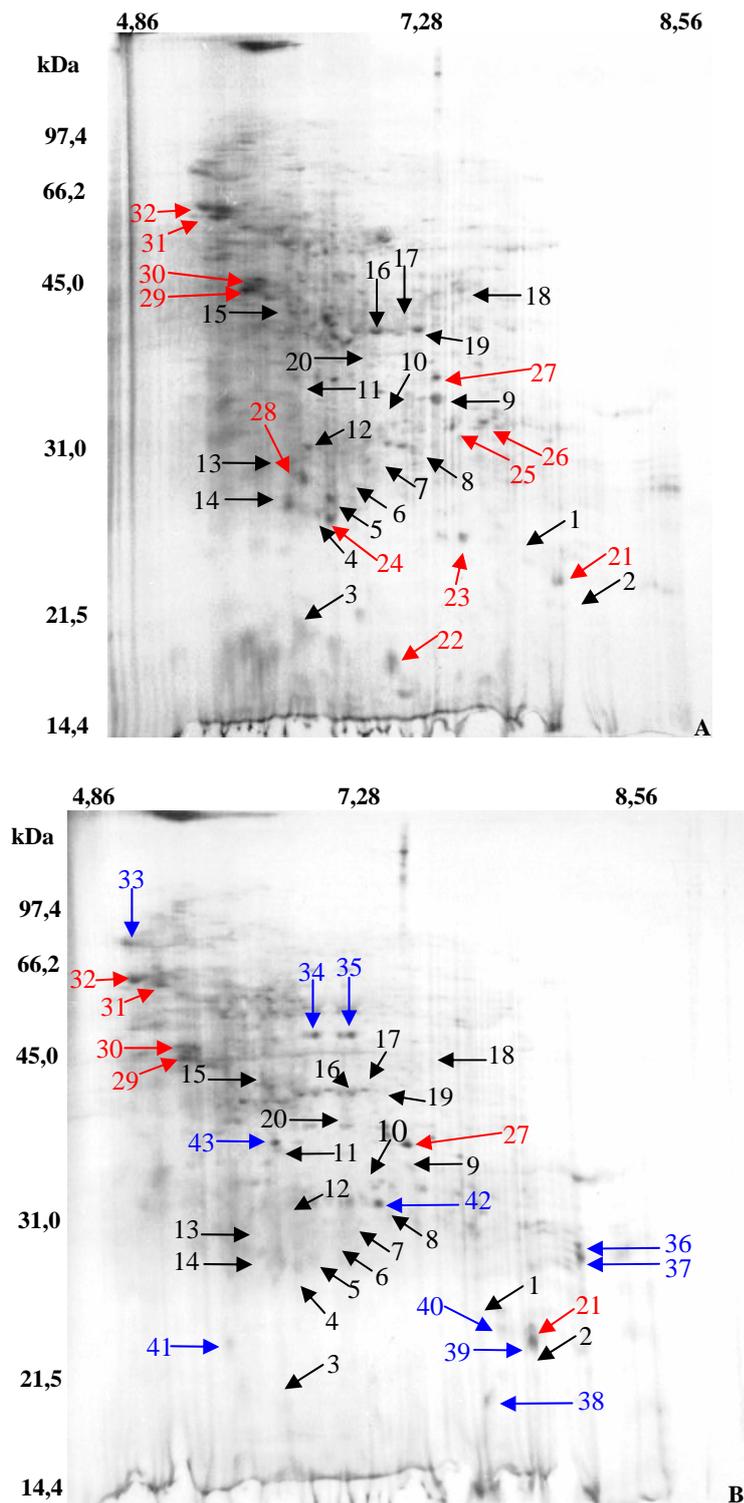


Figura 11. Fluorogramas de proteínas de radículas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) incubadas por dois dias em água (A) ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) (B). Setenta microgramas de proteínas foram aplicadas em cada gel. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda dos fluorogramas. As faixas de pH estão indicadas acima dos fluorogramas. Setas pretas representam proteínas analisadas nos géis, setas vermelhas indicam proteínas presentes no fluorograma controle e setas azuis indicam proteínas presentes no fluorograma tratado.

Um dos objetivos de estudos alelopáticos que abordam os aspectos morfológicos, fisiológicos e moleculares é a descoberta de novos produtos naturais que possam ser empregados no controle de pragas e doenças nos vegetais, bem como a descoberta do modo de ação desses compostos (Cruz-Ortega *et al.*, 2002).

É interessante observar que o presente estudo, além de mostrar a atuação dos aleloquímicos presentes nas folhas de lobeira no crescimento e em parâmetros morfológicos, também apresentou as mudanças que ocorrem na expressão protéica, abrindo novas perspectivas para um melhor conhecimento dos mecanismos de ação dos aleloquímicos a nível celular.

A utilização da proteômica para o estudo de respostas das plantas a diferentes tipos de estresse vem se tornando um campo crescente. Essa ferramenta pode fornecer a avaliação direta dos processos bioquímicos através de informações sobre as proteínas envolvidas nas respostas das plantas aos estímulos ambientais (Renaut *et al.*, 2006), e tem se mostrado uma boa alternativa para se traçar os efeitos alelopáticos no metabolismo vegetal.

5.5 Conclusões

1) O extrato aquoso das folhas de lobeira causou inibição do crescimento de plântulas de gergelim, principalmente nas radículas e na maior concentração do extrato;

2) Constatou-se a presença de necroses, inibição do aparecimento de raízes laterais e de pêlos absorventes, nas radículas de gergelim tratadas. O efeito foi maior quanto maior a concentração do extrato;

3) A interferência no conteúdo de água das plântulas por parte dos aleloquímicos foi pequena ou insignificante em todos os tratamentos e nas diferentes partes da plântula;

4) Houve menor incorporação de massa seca nas radículas tratadas com o extrato das folhas em diferentes concentrações;

5) Os efeitos causados pelos aleloquímicos das folhas de lobeira no desenvolvimento e na morfologia das plântulas de gergelim são reversíveis;

6) Os experimentos de reversibilidade comprovaram que os tecidos escurecidos nas radículas tratadas não estavam necrosados, e que um possível acúmulo de fenóis promoveu a alteração na coloração.

7) A incorporação isotópica de ^{35}S -metionina foi maior nas plântulas tratadas com os aleloquímicos das folhas de lobeira;

8) O perfil protéico das radículas apresentou maior quantidade de *spots* que o perfil dos hipocótilos, tanto para plântulas tratadas como para plântulas controle. No geral, houve um aumento da síntese protéica nas plântulas tratadas;

9) Os padrões de expressão protéica são distintos entre géis e fluorogramas, evidenciando que diversas proteínas não são sintetizadas “de novo” e que aparentemente não estariam participando do crescimento inicial e de respostas das plantas a ação dos extratos.

10) A incorporação isotópica conjuntamente a análise de perfis eletroforéticos se mostra como uma ferramenta importante no estudo dos processos bioquímicos envolvidos na ação dos aleloquímicos presentes nas folhas de lobeira no desenvolvimento inicial do gergelim.

6. Referências Bibliográficas

- Abdala, G. C.; Caldas, L. S.; Haridasan, M.; Eiten, G. 1998. Above and below-ground organic matter and root-shoot ratio in cerrado in central Brazil. **Brazilian Journal of Ecology**. 2: 11-23.
- Abraham, D.; Braguini, W. L.; Kelmer-Bracht, A. M. & Ishii-Iwamoto, E. L. 2000. Effects of four monoterpenes on germination, primary growth, and mitochondrial respiration of maize. **Journal of Chemical Ecology**. 26(3): 611-624.
- Aires, S. S.; A. G. Ferreira & Borghetti, F. 2005. Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. **Acta Botanica Brasilica**. 19(2) 339-344.
- Alves, S. M.; Arruda., M. S. P. & Souza-Filho, A. P. S. 2002. Biossíntese e distribuição de substâncias alelopáticas. *In*: Souza Filho, A. P. S. & Alves, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 79-109pp
- 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.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., Saxena, D. B. & Kaur, S. 2002. Allelopathic effects of parthenin against two weed species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. **Environmental and Experimental Botany**. 47 :149-155.
- Baziramakenga, R.; Leroux, G. D.; Simard, R. R. & Nadeau, P. 1997. Allelopathy effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. **Canadian Journal of Botany**. 75: 445-450.

- Blum, H.; Beier, H. & Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99.
- Bonner, W. M. & Laskey, R. A. 1974. A film detection method for tritium labeled proteins and nucleic acids on polyacrylamide gels. **European Journal of Biochemistry**. 46: 83-88.
- Borghetti, F. & Pessoa, D. M. A. 1997. Autotoxicidade e alelopatia em sementes de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae). In: Leite, L. L. & Saito, C. H. (orgs.). **Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado**. Editora da UnB, Brasília, 54-58pp.
- Borghetti, F.; Silva, L. C. R.; Pinheiro, L. D.; Varella, B. B. & Ferreira, A. G. 2005. Aqueous leaf extract properties of Cerrado species in Central Brazil. **Proceedings of the Fourth World Congress on Allelopathy**. 388-390pp.
- Borghetti, F. 2000. Ecofisiologia da germinação das sementes. **Universa**. 8: 149-179.
- Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S. & Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**. 161: 839-851.
- Brunn, S. A.; Muday, G. K. & Haworth, P. 1992. Auxin transport and the interaction of phytotropins. **Plant Physiology**. 98: 101-107.
- Burnette, W.N. 1981. 'Western Blotting' Transfer of protein from SDS poliacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. **Analytical Biochemistry**. 112: 195-203.
- Cameron, H. J. & Julian, G. R. 1980. Inhibition of protein synthesis in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by allelopathic compounds. **Journal of Chemical Ecology**. 6 (6): 989-995.

- Carvalho, P. G. B.; Borghetti, F.; Buckeridge, M. S.; Morhy, L. & Ferreira-Filho, E. X. F. 2001. Temperature-dependent germination and endo- β -mannase activity in sesame seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13 (2): 139-148.
- Chon, S. U., Coutts, J. H. & Nelson, C. J. 2000. Effects of light, growth media and seedling orientation on bioassays of alfafa autotoxicity. **Agronomy Journal**. 92: 715-720.
- Chung, J. M.; Ahn, J. K. & Yun, S. J. 2001. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**. 20: 921-928.
- Cipollini, M. L. 2000. Secondary metabolites of vertebrated-dispersed fruits: evidence for adaptive functions. **Revista Chilena de Hist3ria Natural**. 73: 421-440.
- Cruz-Ortega, R.; Anaya, A. L.; Hern3ndez-Bautista, B. E. & Laguna-Hernandez, G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sycios deppei* on seedling root ultraestructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**. 24 (12): 2039-2057.
- Cruz-Ortega, R.; Ayala-Cordero, G. & Anaya, A. L. 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. **Physiologia Plantarum**. 116: 20-27.
- Dayan, F. E., Romagni, J. G. & Duke, S. O., 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**. 26 (9): 2079-2094.
- De Luca, V. & St-Pierre, B. 2000. The cell and development biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**. 5: 168-173.
- Einhellig, F. A. 1996. Interaction involving allelopathy in crop systems. **Agronomy Journal**. 88: 886-893.

- Ferreira, A. G. & Aquila, M. E. A., 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 12: 175-209.
- Ferreira, A. G. 2004. Interferência: competição e alelopatia. *In*: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, 251-262pp.
- Galindo, J. C. G.; Hernández, A.; Dayan, F. E.; Tellez, M. R.; Macías, F. A.; Paul, R. N. & Duke, S. O. 1999. Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage. **Phytochemistry**. 52: 805-813.
- Gatti, A. B.; Perez, S. C. J. G. A. & Lima, M. I. S. 2004. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasílica**. 18(3): 459-472.
- Gonzales, V. M.; Kazimir, J.; Nimbai, C.; Weston, L. A. & Cheniae, G. M. 1997. Inhibition of photosystem II electron transfer reaction by the natural product sorgoleone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45: 1415-1421.
- Gorla, M. C. & Perez, S. C. J. G. A. 1997. Influência de extratos aquosos de folhas de *Miconia albicans* Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit e *Drimys winteri* Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. **Revista Brasileira de Sementes**. 19(2): 260-265.
- Griffin, W. J. & Lin, G. D. 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**. 53: 623-637.
- Hadacek, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 21(4): 273-322.
- Hejl, A. M. & Koster, K. L. 2004. The allelochemical sorgoleone inhibits root H⁺-ATPase and water uptake. **Journal of Chemical Ecology**. 30(11): 2181-2191.

- Hierro, J. L. & Callaway, R. M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. **Plant and Soil**. 256: 29-39.
- Hoffmann, W. A. 1996. The effects of fire and cover on seedling establishment in a neotropical savanna. **Journal of Ecology**. 84: 383-393.
- Inderjit & Dakshini, K. M. M. 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**. 61 :28-44.
- Inderjit & Duke, S. O. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Planta**. 217: 529-539.
- Inderjit; Streibig, J. C.; Olofsdotter, M. 2002. Joint action of phenolic acids mixtures and its significance in allelopathy research. **Physiologia Plantarum**. 114: 422-428.
- Inderjit. 2001. Soil: Environmental Effects on Allelochemical Activity. **Agronomy Journal**. 93: 79-84.
- Izhaki, I. 2002. Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. **New Phytologist**. 155: 205-217.
- Jacobi, U. S. & Ferreira, A. G. 1991. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 26: 935-943.
- Jeronimo, C. A.; Borghetti, F. & Sá, C. 2005. M. Allelopathic effects of *Solanum lycocarpum* leaf extracts on protein synthesis during the growth of sesame seedlings. **Proceedings of the Fourth World Congress on Allelopathy**, 473-476pp.
- Jeronimo, C. A. 2003. **Alelopatia de extratos de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. no crescimento inicial e na síntese protéica de plântulas de *Sesamum indicum* L.**

Monografia de Conclusão de Curso, Faculdade da Terra de Brasília, Brasília, Recanto das Emas, 37 pp.

Jiménes-Osornio, J. F. M. V.; Kumamoto, J. & Wasser, C. 1996. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Biochemical Systematics and Ecology**. 24(3): 195-205.

Koitabashi, R.; Suzuki, T.; Kawazu, T.; Sakai, A.; Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T. 1997. 1,8-cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. **Journal of Plant Research**. 110: 1-6.

Labouriau, L. G. 1983. **A germinação das sementes**. OEA, Washington, 138 pp.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.

Lehman, M. E. & Blum, U. 1999. Evaluation of ferulic acid uptake as a measurement of allelochemical dose: effective concentration. **Journal of Chemical Ecology**. 25 (11): 2585-2599.

Lombardi, J. A. & Motta Jr., J. C. 1993. Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* Illiger (Mammalia, Canidae). **Ciência e Cultura**. 45(2): 126-127.

Mathews, C. K. & van Holde, K. E. 1990. **Biochemistry**. Benjamin/ Cummings, California, 1129 pp.

Mendonça, R. C.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva, M. C.; Rezende, A. V.; Figueiras, T. S. & Nogueira, P. E. 1998. Flora vascular do Cerrado. *In*: Sano, S.M. & Almeida, S. P. (orgs). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa, Planaltina, 289-556pp.

- Miró, C. P.; Ferreira, A. G. & Áquila, M. E. 1998. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 33:1261-1270.
- Moreira, A. G. 2000. Effects of fire protection on savanna structure in Central Brazil. **Journal of Biogeography**, 27 :1021-1029.
- Motidome, M.; Leekning, M. E. & Gottlieb, O. R. 1970. A química das Solanáceas brasileiras. I – A presença de Solamargina e de Solasonina no Juá e na Lobeira. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. 42: 375-376.
- Musco A.; Panuccio, M.R. & Sidari, M. 2001. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. **Plant Growth Regulation**. 35: 31-35.
- O'Farrel, P.H. 1975. High-resolution two-dimensional eletrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**. 250: 4007-4021.
- Oliveira, S.C.C.; Ferreira, A.G. & Borghetti, F. 2004a. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit on sesame seed germination and seedling growth. **Allelopathy Journal**. 13(2): 201-210.
- Oliveira, S.C.C.; Ferreira, A.G. & Borghetti, F. 2004b. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasilica**. 18(3): 401:406.
- Oliveira, S. C. C. 2003. **Alelopatia em *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 78 pp.

- Oliveira-Filho, A. T. & Oliveira, L. C. A. 1988. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) em Lavras, MG. **Revista Brasileira de Botânica**. 11: 23-32.
- Periotto, F.; Perez, S. C. J. G. A. & Lima, M. I. S. 2004. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**. 18(3): 425-430.
- Pinto, F. S. 1998. **Efeitos da dispersão de sementes por animais e dos fatores edáficos sobre a germinação, crescimento e sobrevivência das plântulas de lobeira *Solanum lycocarpum***. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 69 pp.
- Pires, N. M. P.; Prates, H. T.; Pereira Filho, I. A.; Oliveira Junior, R. S. & Faria, T. C. L. 2001a. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agricola**. 58(1): 61-65.
- Pires, N. M.; Souza, I. R. P.; Prates, H. T.; Faria, T. C. L.; Pereira Filho, I. A. & Magalhães, P. C. 2001b. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13(1): 55-65.
- Prates, H. T.; Paes, J. M. V.; Pires, N. M.; Pereira Filho, I. A. & Magalhães, P. C. 2000. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 35: 909-914.
- Proença, C.; Oliveira, R. S. & Silva, A. P. 2000. **Flores e frutos do cerrado**. Editora Universidade de Brasília, Brasília. 226pp.
- Ramagli, L. S. & Rodrigues, L. V. 1985. Quantitation of micrograms amounts of protein in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis**. 6(11): 559-563.

- Ratter, J. A.; Ribeiro, J. F. & Bridgewater, S. 1997. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**. 80: 223-230.
- Reatto, A.; Correia, J. R. & Spera, S. T. 1998. Solos do bioma cerrado: aspectos pedológicos. *In*: Sano, S. M. & Almeida, S. P. (orgs). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa, Planaltina, 47-86pp.
- Reigosa, M. J.; Sanches-Moreiras, A. & Gonzáles, L. 1999a. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 18(5): 577-608.
- Reigosa, M. J.; Souto, X.C. & González, L. 1999b. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. **Plant Growth Regulation**. 28: 83-88.
- Renaut, J., Hausman, J-H., & Wisniewski, M. E. 2006. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. **Physiologia Plantarum**. 126: 97-109.
- Ribeiro, J. F. & Walter, B. M. T. 1998. Fitofisionomias do bioma cerrado. *In*: Sano, S.M. & Almeida, S.P. (orgs). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa, Planaltina, 89-166pp.
- Rice, E. L. 1984. **Allelopathy**. 2ed., Academic Press, London.
- Rizvi, S. J. H.; Haque, H.; Sing, V. K. & Rizvi, V. A. 1992. A discipline called allelopathy. *In*: Rizvi, S. J. H. & Rizvi, V. (eds.). **Allelopathy**. Chapman & Hall, New York, 1-10pp.
- Rodrigues, F. H. G. 1996. Influência do fogo e da seca na disponibilidade de alimento para herbívoros do Cerrado. *In*: Miranda, H. S.; Saito, C. H. e Dias, B. F. S. **Impactos de queimadas em áreas de cerrado e restinga**. Universidade de Brasília, Brasília, 76-83pp.

- Romero-Romero, M. T.; Anaya, A. L. & Cruz-Ortega, R. 2002. Screening for effects of phytochemical variability on cytoplasmic protein synthesis pattern of crop plants. **Journal of Chemical Ecology**. 28: 601-613.
- Santos, J. C.; Souza, I. F.; Mendes, A. N. G.; Morais, A. R.; Conceição, H. E. O. & Marinho, J. T. S. 2002. Efeito de extratos de cascas de café e de arroz na emergência e no crescimento do caruru-de-mancha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 37(6): 783-790.
- Saxena, A.; Sing, D. V. & Joshi, N. L. 1995. Autotoxic effects of pearl millet aqueous extracts on seed germination and seedling growth. **Journal of Arids Environments**. 33:255-260.
- Silva Junior, M. C.; Santos, G. C.; Nogueira, P. E.; Munhoz, C. B. R. & Ramos, A. E. 2005. **100 Árvores do Cerrado. Guia de Campo**. Rede de Sementes do Cerrado, 96-97pp.
- Souza Filho, A. P., Rodrigues, L. R. A. & Rodrigues, T. J. D. 1997 Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 32: 165-170.
- Souza Filho, A. P. S. & Alves, S. M. 2002a. Mecanismos de ação dos agentes alelopáticos. *In*: Souza Filho, A. P. S. & Alves, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 131-154pp.
- Souza Filho, A. P. S. & Alves, S. M. 2002b. Mecanismos de liberação e comportamento de aleloquímicos no ambiente. *In*: Souza Filho, A. P. S. & Alves, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 111-129pp.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Artmed, Porto Alegre, 719 pp.

- Tongma, S.; Kobayashi, K. & Usui, K. 2001. Allelopathic activity of Mexican sunflower [*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray] in soil under natural field conditions and different moisture conditions. **Weed Biology and Management**. 1: 115-119.
- Vieira, R. F. 2000. Importância da variabilidade genética para a produção de metabólitos secundários. *In*: Cavalcanti, T. B. & Walter, B. M. T. **Tópicos atuais em botânica: palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica**. Sociedade Brasileira de Botânica. Embrapa. Brasília, 159-164pp.
- Vyvyan, J. R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**. 58: 1631-1646.
- Weidenhamer, J. D. 1996. Distinguishing resource competition and chemical interference: overcoming the methodological impasse. **Agronomy Journal**. 88: 866-875.
- Weir, T. L.; Park, S-W. & Vivanco, J.M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**. 7: 472-479.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, **Phytochemistry**. 64: 3-19.

Apêndice - Tampões, reagentes e procedimentos utilizados nos experimentos de extração de proteínas e eletroforeses.

Coquetel de Inibidores de Proteases

O coquetel de inibidores de proteases consistiu de 3 inibidores diluídos em 250 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), respeitando as seguintes concentrações:

TPCK: Concentração de uso de 50 mg/mL.

TLCK: Concentração de uso de 50 mg/mL.

Leupeptina: Concentração de uso de 2 mg/mL.

Não convém preparar soluções estoques do coquetel de inibidores pois diversos destes podem degradar com o armazenamento. Preparar na hora de uso.

Precipitação e Ressuspensão de Proteínas

- Diluiu-se TCA 100% na amostra para 10%;
- Deixou-se a amostra no gelo por 30 minutos;
- Centrifugou-se por 10 minutos em microcentrífuga: máx. 10000rpm.
- Escorreu-se bem o sobrenadante.
- Adicionou-se 500µL de acetona 20% e lavou-se 2-3 vezes.
- Em cada lavagem centrifugou-se por 5 min/10000rpm.
- Secou-se e ressuspendeu-se em tampão O'Farrel.

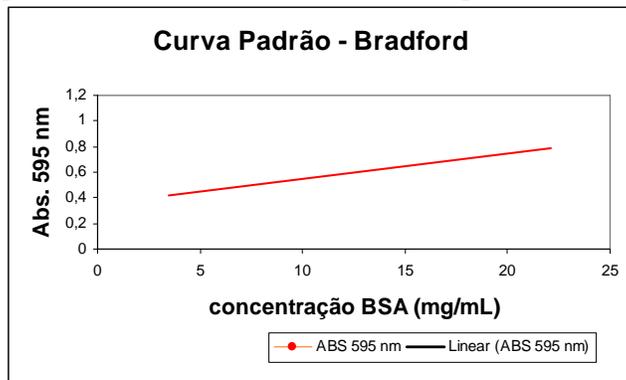
Quantificação protéica (Método de Bradford modificado)

- Tampão Bradford comercial da Biorad foi diluído na proporção de 4mL de água para 1mL do Bradford totalizando uma quantidade final suficiente para construir a curva padrão e para quantificar as proteínas das amostras desejadas.
- Para construir a curva padrão (absorbância x concentração de proteínas) colocou-se em ependorfs identificados as seguintes medidas:

Estoque BSA (1000µg/mL)	Água (µL)	Bradford 1X (µL)	[] final de BSA (µg/mL)
0	20	1000	0
4	16	1000	4
8	12	1000	8
12	8	1000	12
16	4	1000	16
20	0	1000	20

- A leitura da curva foi feita em espectrofotômetro Hitachi que já havia sido ligado pelo menos 30 minutos antes da leitura das absorbâncias para calibrar.
- Ajustou-se, no aparelho, o comprimento desejado: 595 nm.
- O aparelho foi zerado (branco) com: 20µL de água + 1000 µL de Bradford.
- Fez-se a leitura das amostras em ordem crescente de conteúdo de BSA para a obtenção da curva padrão.

- Para a leitura das amostras com conteúdo protéico desconhecido dissolveu-se 2µL da amostra + 2µL de HCl 0,1N + 16µL de água + 1000 µL de Bradford..
- O zero das amostras com conteúdo protéico desconhecido foi determinado diluindo-se 2µL do tampão O'Farrel + 2µL de HCl 0,1N + 16µL de água + 1000 µL de Bradford..
- Para a leitura, transferiu-se as amostras dos ependorfs para cubetes apropriados para o espectofotômetro.
- A leitura das amostras pode ser feita em duplicata. Retira-se a média das absorbâncias para calcular o volume de proteínas para 50µL de proteínas.
- Para se obter somente a leitura da absorbância das proteínas para a construção da curva, subtraiu - se o zero das outras quantidades de amostras contendo BSA + Bradford.
- Para a construção do gráfico da curva padrão e para a obtenção da quantidade de proteínas das amostras utilizou-se a planilha do Excel apresentada abaixo



[BSA]	ABS.

Equação da
Reta

$$y = ax + b$$

Amostras

	0,0097	0,0667				
	Leitura	[concent.]	Volume	[Estoque]	Volume p 50 ug	
1	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL
2	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL
3	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL
4	0,0000	-6,8763	0	#DIV/0!	#DIV/0!	uL

Incorporação isotópica

1. Cortou-se papéis filtro de 1 cm².
2. Colocou-se 1 µL do lisado sobre o papel e deixar secar.
3. Colocou-se os papéis em 10 mL de TCA 10% no gelo por 10 min.
4. Transferiu-se os papéis para 5 mL de TCA 5% e ferveu-se por 5 min.
5. Transferiu-se os papéis para 5 mL de TCA 5% no gelo por 5 min.
6. Lavou-se os papéis em 5 mL de metanol por 2 min.
7. Em seguida, lavou-se os papéis em 5 mL de acetona por 2 min.
8. Deixou-se os papéis secarem¹ e mediu-se a radioatividade no cintilador.

Solução para o *Cintilador*.

PPO	5 g
POPOP	0,3 g
Tolueno	q.s.p. 1 litro

Colocou-se os papéis nos tubos apropriados e adicionou-se a solução acima.

1. Ajustou-se os tubos no carretel, e na frente deste encaixou-se o programa apropriado (protocolo 3 - ³⁵S).
2. O programa apropriado para a leitura do isótopo em consideração foi escolhido no menu da tela do computador, onde também se ajustou o tempo de leitura.
3. Instalou-se o carretel dentro do cintilador, iniciou-se a leitura e aguardou-se a impressão do resultado. No presente caso, considerou-se que uma incorporação satisfatória registra uma leitura acima de 100 000 cpma.
4. Foi feito o controle. Este passou apenas pelas etapas 1, 2 e 8 do protocolo acima.
5. A medição da incoracão foi feita em duplicatas.

Eletroforese em Primeira Dimensão

Seguem as tabelas com as quantidades e concentrações dos tampões e soluções utilizados nas eletroforeses, assim como a composição dos géis e as condições de corrida.

Tampão de lise (1X) *		
Reagente	Quantidade	Concentração
<i>Uréia</i>	5,7 g	9,5M
NP-40 10%	2,0 mL	2,0%
Anfólitos pH 5-7	400 µL	1,6%
Anfólitos pH 3,5-10	100 µL	0,4%
β-mercaptoetanol	0,5 mL	5,0%
Água	q.s.p volume final	
<i>Volume Final</i>	10 mL	

** evitar manuseio brusco e /ou excessivo pois a amostra é muito espumante.

Tampão <i>Overlay</i> *		
Reagente	Quantidade	Concentração
	4,8 g	8,0 M
<i>Uréia</i>		
NP-40 10%	1,0 mL	1,0 %
Anfólitos pH 5-7	200 µL	0,8 %
Anfólitos pH 3,5-10	50 µL	0,2 %
Água	q.s.p. volume final	
Volume Final	10 mL	

* adicionar traços de verde de metila para o acompanhamento visual da corrida. Fazer usando os mesmos reagentes do tampão de lise, principalmente os anfólitos.

Confecção dos Géis	
Reagente	2-D ITC
	5,0 g
<i>Uréia</i>	
Água	2,0 mL
NP-40 10%	2,0 mL
Anfólitos pH 3,5-10	500 µL
Anfólitos pH 3.5-5	-
Anfólitos pH 4-6.5	-
Anfólitos pH 5-7	-
Sol. Acrilamida-Bis. 30%	1,3 mL
APS 10 % *	15 µL
TEMED *	10 µL

* Aplicados no momento do preparo do gel.

Soluções Estoque

◆ Acrilamida 30% (p/v)

Acrilamida	28,2 g	5.64 g	2,82g
bis-acrilamida	1,8 g	0.36 g	0,18g
água destilada qsp	100 mL	20 mL	10 mL

◆ NP-40 10% (v/v)

NP-40	5 mL
água Milli-Q	45 mL

◆ Estoque Ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,03 M (densidade = 1,685, PM 98,0) 85%: 1,64 mL para 1000 mL de água Milli-Q (*Deve ser preparado na hora de uso, pois é muito volátil*).

- Concentração de uso (H₃PO₄) 0,01 M: 0,547 mL para 1000 mL de água Milli-Q.

- ◆ Estoque Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,05M PM 40,0: 2,0 g para 1000 mL de água Milli-Q (*Preparar preferencialmente no momento de uso*).
 - Concentração de uso (NaOH) 0,02 M: 0,8 g para 1000 mL de água Milli-Q.
- ◆ Uréia 7M PM 60,06: 21,02 g para 50 mL de água Milli-Q.

Tampões de corrida e condições de migração	
Cuba	ITC ²
Superior ¹	0,01 M H ₃ PO ₄ (+)
Inferior ¹	0,02 M NaOH (-)
Migração	
Pré-corrída	Não necessita
Corrida	400 V/4-5 h

¹*Freqüentemente utiliza-se a concentração de estoque das soluções para a corrida.*

²*Como no caso do ITC a posição dos tampões foi invertida, deve-se inverter também a polaridade. Corre sempre da base para o ácido. O ITC modificado segue o mesmo procedimento. Para parte de baixo (básico) o volume é de 1800 mL e para parte de cima (ácido) é de 700 mL.*

A corrida encerra quando a corrente ficar constante

Procedimentos experimentais

1. Pipetou-se a acrilamida/bisacrilamida, o NP40 (10%) e a água, misturou-se bem. Adicionou-se a uréia e, sendo necessário, aqueceu-e a solução (NO MÁXIMO 50^o C) para dissolvê-la. Após dissolver a uréia, adicionou-se os anfólitos e misturou-se. ANTES de adicionar TEMED e persulfato, preparou-se todo o material, tubos, solução de uréia 7M, seringa e suporte para aplicar o gel nos tubos.
2. Marcou-se com caneta de retroprojeter até a altura que os tubos são preenchidos com o gel (11 cm), todos devem ter a mesma altura, fechou-se na base com parafilme, encheu-se com a seringa lentamente da base para o ápice para evitar bolhas, mas não tão lento, para evitar polimerização do gel. Após preencher todos os tubos, colocou-se um pouco de solução de uréia 7M para a polimerização uniforme do ápice. Após polimerizado, retirou-se a uréia com um movimento brusco, retirou-se o parafilme.
3. Instalou-se os capilares na cuba, aplicou-se agarose no local de inserção dos capilares (borrachinhas) e verificou-se se havia vazamento na parte superior colocando um pouco de tampão, evitando que o tampão caísse dentro do tubo. Não colocou-se (ainda) o tampão acima do nível dos tubos.
4. Aplicou-se o tampão da parte inferior nos capilares (base) com o auxílio de uma seringa evitando, dessa forma, a permanência de bolhas na base dos tubos.
5. Misturou-se bem a amostra (centrifugar a 10000 rpm/5 min) pois a uréia freqüentemente precipita. Aplicou-se lentamente no ápice do tubo, encostando-se a ponteira no fundo e na lateral do tubo para evitar espumar e a formação de bolhas. Em seguida, aplicou-se o tampão overlay - 50µL (com traços de verde de metila) sobre a amostra para evitar o contato desta com o tampão superior de corrida.

6. Colocou-se o tampão superior dentro dos capilares completando o volume destes, e depois lentamente dentro da cuba superior até cobrir bem todos os capilares.
7. Ligou-se os eletrodos conforme procedimento acima (no caso da cuba 2ITC a polaridade é invertida nos eletrodos da fonte).
8. Controle do pH. Um dos tubos foi escolhido para receber apenas o tampão de amostra e o overlay. Este gel foi utilizado para se medir o gradiente de pH.
9. A retirada dos géis de dentro dos tubos foi feita numa vasilha com água, um de cada vez para poder identificar a amostra. Isto foi feito impulsionando na porção superior com uma seringa com água. Armazenou-se o gel em freezer.
10. Tubos com gel não utilizados podem ser armazenados. Para tal, deixou-se a uréia, colocou-se parafilme na parte superior, guardou-se a temperatura ambiente.
11. Limpeza dos capilares em solução sulfocrômica, e da seringa em água abundante.

Preparo das tripas para a segunda dimensão

1. Deixou-se as tripas imersas em tampão de transferência por 30 min, sob agitação suave.
2. Apoiou-se as tripas sobre o gel da segunda dimensão (preparado apenas com o pente para aplicação dos marcadores de peso molecular – ver abaixo), por convenção, com a porção alcalina do gel (mais irregular) virada para os marcadores. Fixou-se a tripa sobre o gel com agarose previamente aquecida.
3. Iniciou-se a corrida, conforme protocolo. Quando o azul atingiu a altura dos marcadores de peso, desligou-se a cuba, aplicou-se os marcadores, e reiniciou-se a corrida (duração, aproximada de 4:30 horas).

Preparo dos padrões de massa molecular para corrida (para 20 μ L – 10 μ L por poço)

1. Preparou-se o tampão estoque para os padrões (*estoque temperatura ambiente*):

Água destilada	- 4,8 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	- 1,2 mL
Glicerol	- 1,0 mL
10% (p/v) SDS	- 2,0 mL
0,1% (p/v) bromofenol	- <u>0,5 mL</u>
	9,5 mL

2. Preparou-se o tampão redutor para aplicação (*no momento do uso*):

19 μ L Tampão Estoque
1 μ L β -mercaptoetanol
1 μ L padrões

Ferveu-se por 5 minutos a 95°C. Esfriou-se e aplicou-se nos poços (10 μ L por poço).

Eletroforese em Segunda Dimensão

Os géis de poli(acrilamida)-SDS 12,5% foram feitos conforme tabela abaixo:

Soluções estoque	Separador 12,5%		Concentrador 3,8%	
	(mL)	Concentração Final	(mL)	Concentração Final
Acrilamida/bisacrilamida (30:0,8)	25	12,5%	2,5	3,75%
Tampão estoque do gel Concentrador	--	--	5,0	0,08 M
Tampão estoque do gel Separador	7,5	0,375 M	--	--
SDS 10%	0,6	0,1%	0,2	0,1%
Água	23,9		11,3	
Persulfato de amônio 10%*	0,450	0,075%	0,150	
TEMED*	0,030	0,05%	0,015	
Volume final p/ 2 géis	60 mL		40 mL	

* Aplicados no momento do preparo do gel.

Soluções Estoque

- ◆ Acrilamida/bisacrilamida: 29.2 g de acrilamida e 0.8 g de bisacrilamida são diluídos em água e o volume é completado para 100 mL. Armazenamento no escuro, 4°C, por até 30 dias.
- ◆ Tampão estoque do gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8: 6,0 gramas de tris são dissolvidos em 40 ml de água. pH ajustado a 6,8 com HCl 1,0 M (aproximadamente 48 ml). O volume é completado para 100 ml com água. A solução é armazenada a 4°C.
- ◆ Tampão estoque do gel separador: Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8: 36,3 gramas de tris e 48 ml de HCl 1,0 M são misturados e levados a um volume final de 100 ml com água. Armazenado a 4°C.
- ◆ Tampão de corrida [uso]: Trizma 0,0375 M, glicina 0,3 M, SDS 0,1%: 4,54 gramas de tris, 22,52 gramas de glicina e 1 grama de SDS são dissolvidos em água suficiente para completar um litro de solução. Armazenado a 4°C. Para eletroforese em cuba Biorad, são necessários dois litros e meio de tampão de corrida.
- ◆ Tampão de transferência: Tris-HCl 80 mM, β-mercaptoetanol 2,0%, SDS 2,0%, azul de bromofenol 0,02%. Ajustar pH para 6,8.
- ◆ Soluções utilizadas para corar e para secagem dos géis:

Corante: Comassie blue G 0,1% em 40,0% metanol, 10,0% ácido acético, água qsp. 100 ml.

Descorante: 40,0% metanol, 10,0% ácido acético, água qsp. 100 ml.

Preservador: 10,0% ácido acético, água qsp. 100 ml

Solução para secagem: Metanol 40,0%, glicerol 5,0%, água qsp. 100 ml.

Procede-se a secagem em secador de gel 65°C/3 horas.

Medidas para o preparo das soluções utilizadas na revelação dos fluorogramas.

- *Revelador Kodak Dektol*: o estoque é comercializado para se fazer um volume final de 3,8L com 551g do pó revelador. Para o experimento fez-se uma diluição de 150% do revelador para que a revelação pudesse ser acompanhada lentamente. Para isso diluiu-se 58g do pó em 1L de água deionizada.
- *Fixador Kodak*: o estoque comercializado faz um volume total de 3,8L com 700g do pó fixador. Para o experimento fez-se 400 mL da solução.
- *Ácido Acético 1%*: fez-se 1L dessa solução.

Procedimentos experimentais para eletroforese em segunda dimensão e fluorogramas.

1. Preparou-se os reagentes para confecção dos géis. Dissolveu-se a acrilamida/bisacrilamida no respectivo tampão, conforme tabela acima, adicionou-se o SDS e completou-se com água. Reservou-se.
2. Preparou-se as placas para preparo dos géis, usando graxa de silicone entre os espaçadores e o vidro para impedir vazamento do gel. Dispôs-se as placas no suporte.
3. Adicionou-se o TEMED e o persulfato de amônia no gel SEPARADOR, e virou-se lentamente a solução dentro da placa, com esta inclinada para impedir formação de bolhas. Colocou-se o suporte na horizontal, e o gel foi coberto com butanol ou mesmo água para que a polimerização formasse uma superfície superior uniforme; aguardou-se a polimerização.
4. Após a polimerização do gel separador, lavou-se a parte interna das placas com água e secou-se bem. Preparou-se o gel CONCENTRADOR com o TEMED e o persulfato e adicionou-se nas placas. Colocou-se o pente antes da polimerização.
5. Retirou-se o pente e removeu-se as placas do suporte. As placas foram então instaladas na cuba.
6. Encheu-se a cuba inferior com tampão de corrida, evitando a permanência de bolhas na base da placa. Encheu-se a parte superior da cuba com o tampão de corrida, e depois aplicou-se as amostras de proteínas.
7. Instalou-se os eletrodos, regulou-se a fonte e procedeu-se a corrida conforme amperagem, voltagem e potência já citadas.
8. Após a corrida, removeu-se as placas, retirou-se os géis e colocou-se para corar nos tampões apropriados. Lavou-se todo o material utilizado conforme procedimentos usuais.
9. Os géis foram tratados com corante apropriado conforme detalhamento descrito acima, dispostos sobre papel-filtro e colocados no secador por 60°C/3 h.
10. Após a secagem, eles foram expostos a filmes de raio X a -15° C por até sete dias. Colocou-se no cassete um filme de raio-X e sobre este o gel seco com a parte das proteínas virada para baixo, de forma que a parte sensível do filme ficasse em contato direto com o gel.
11. Após o período de exposição, o filme de raio-X foi revelado em uma sala escura.

12. Retirou-se o filme e o gel do cassete. O filme (sem o gel) foi mergulhado em uma bandeja contendo a solução reveladora. A revelação foi acompanhada visualmente observando-se o gel contra a luz vermelha.
13. Após o aparecimento das bandas, o filme foi lavado rapidamente em água corrente e mergulhado em ácido acético por alguns minutos para parar a revelação.
14. Novamente lavou-se o filme em água corrente e o mesmo foi mergulhado na solução fixadora por alguns minutos. O filme foi novamente lavado em água corrente e colocado em um "varal" para secar. Nesse ponto ele pode ser exposto à luz branca.

Protocolo para Coloração de Géis com Nitrato de Prata:

1. Lavou-se os géis em água bidestilada por 15 min.
2. Fixação: Fixou-se as proteínas presentes no gel com uma solução metanol 50% v/v, ácido acético 12% v/v e formalina (formaldeído) 0,05% p/v por no mínimo uma hora.
3. Lavou-se os géis em etanol 50% por três vezes de 20 minutos cada.
4. Incubou-se os géis em tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02% p/v) por um minuto.
5. Lavou-se os géis em água deionizada por 3 vezes de 20 segundos cada.
6. Incubou-se os géis em solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2% p/v; formaldeído 0,077% v/v) por 20 min.
7. Lavou-se novamente em água deionizada, duas vezes de 20 segundos.
8. Incubou-se os géis em solução reveladora (Na_2CO_3 6% p/v; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0004% p/v; formaldeído 0,05% v/v), em movimentos suaves até o aparecimento das bandas (dez a trinta minutos).
9. Lavou-se rapidamente em água deionizada por duas vezes.
10. Parou-se a reação colocando-se os géis numa solução 50% metanol, 12% ácido acético.
11. Armazenou-se os géis em solução 1% ácido acético, 4°C até o momento da secagem.

Anexo

Testes preliminares para aumentar a eficiência da incorporação isotópica e para a obtenção do perfil eletroforético uni-dimensional SDS-PAGE.

Metodologia

Para este bioensaio foram utilizadas plântulas de gergelim que cresceram nos tratamentos: extrato aquoso de folhas de lobeira a 1% e controle em água.

Sementes de gergelim previamente germinadas foram colocadas em placas de cultura contendo 10 mL da solução a ser testada (extrato a 1% e água) e cresceram sob as mesmas condições da germinação.

No primeiro experimento, foram utilizadas 30 sementes de gergelim por tratamento. Às 24 horas de incubação, 10 plântulas de cada tratamento foram marcadas com ³⁵S-metionina através da aplicação de 3μL (45μCi/ plântula) nas radículas. Às 48 horas foi feita a extração de proteínas. As amostras protéicas obtidas nesse experimento foram aplicadas em géis uni-dimensionais (SDS - PAGE).

No segundo experimento, foram utilizadas 100 plântulas para cada tratamento. Às 42 horas de crescimento, metade das plântulas controle e metade das plântulas tratadas foram marcadas com ³⁵S-metionina (15μCi/ plântula) por toda a extensão da radícula, principalmente nos pêlos radiculares das plântulas que já os apresentavam, com o objetivo de aumentar a superfície de absorção. Às 48 horas de crescimento ou seja, 6 horas de marcação isotópica, fez-se a extração de proteínas de hipocótilos e radículas.

Outro experimento de incorporação foi feito com o objetivo de tentar aumentar a eficiência de incorporação da metionina pelas plântulas. Às 42 horas de crescimento, todas as plântulas, tanto do controle (n = 150) quanto do tratamento com o extrato a 1% (n = 150), foram transferidas para placas de vidro de 4,6 x 4,25mm contendo, na placa controle, 30μL (15μCi/ μL) de ³⁵S-metionina diluídos em 3mL de água destilada, e na placa contendo extrato a 1%, 30μL (15μCi/ μL) de ³⁵S-metionina diluídos em 2mL de extrato aquoso de folhas de lobeira a 1%. A água destilada e o extrato aquoso a 1% utilizados para fazer a diluição da metionina foram separados no momento da montagem do experimento e acondicionados em erlenmeyers que permaneceram na câmara de germinação durante o crescimento das plântulas e, portanto sob as mesmas condições experimentais.

Em nenhum dos experimentos os cotilédones foram utilizados já que em testes preliminares os mesmos não apresentaram diferenças nos perfis eletroforéticos entre plântulas tratadas e plântulas controle (Jeronimo, 2003).

As eletroforeses foram conduzidas de acordo com Laemmli (1970) em cuba Biorad. Em todas as corridas foi mantida uma amperagem constante de 50mA através de uma fonte Biorad, com voltagem máxima regulada para 996 V e potência máxima de 80W. O gel separador foi feito em concentração de 12,5%. Foram aplicados aproximadamente 20µg de proteína por poço. Os marcadores de massa molecular utilizados possuíam proteínas padrão de peso entre 97,4 a 14,4 kDa.

Para a coloração dos géis utilizou-se o procedimento com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). O tempo de exposição dos fluorogramas foi determinado de acordo com a incorporação radioativa. Na revelação dos fluorogramas foram utilizados revelador e fixador Kodak. Os procedimentos experimentais dos métodos citados encontram-se descritos no Apêndice.

Resultados

A incorporação isotópica nas proteínas das amostras utilizadas no gel de uma dimensão (SDS-PAGE) foi menor nos hipocótilos do que nas radículas de todos os tratamentos. Na parte radicular, a incorporação foi maior para o extrato a 1% (139.370cpma) do que para água (108.631cpma). No hipocótilo ocorreu o inverso, sendo a maior incorporação em água (56.374cpma) e a menor incorporação no extrato a (19.226cpma). No entanto, como não foram feitas repetições para as contagens isotópicas, não é possível afirmar se as diferenças dentro das mesmas partes da plântula são significativas (Figura 1).

Provavelmente, a baixa incorporação nos hipocótilos quando comparada a parte radicular (Figura 1) ocorra por haver uma demora na chegada do isótopo radioativo até as partes aéreas das plântulas, já que o local de aplicação do mesmo é diretamente sobre a radícula sendo este o principal local de absorção.

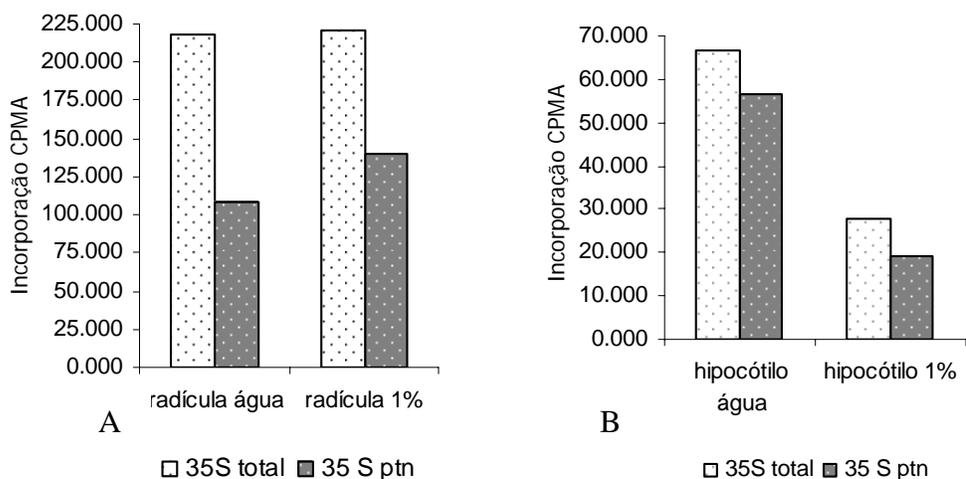


Figura 1. Incorporação isotópica (CPMA) de ^{35}S -metionina em radículas e hipocótilos de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram por 48 horas incubadas em água e em extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1%. Às 24 horas foi aplicada ^{35}S -metionina ($45\mu\text{Ci}$ / plântula) nas radículas das plântulas. 35S total: radioatividade presente na amostra; 35S ptn: radioatividade incorporada pelas proteínas. (A) Incorporação isotópica nas radículas (n=10) (B). Incorporação isotópica nos hipocótilos (n=10).

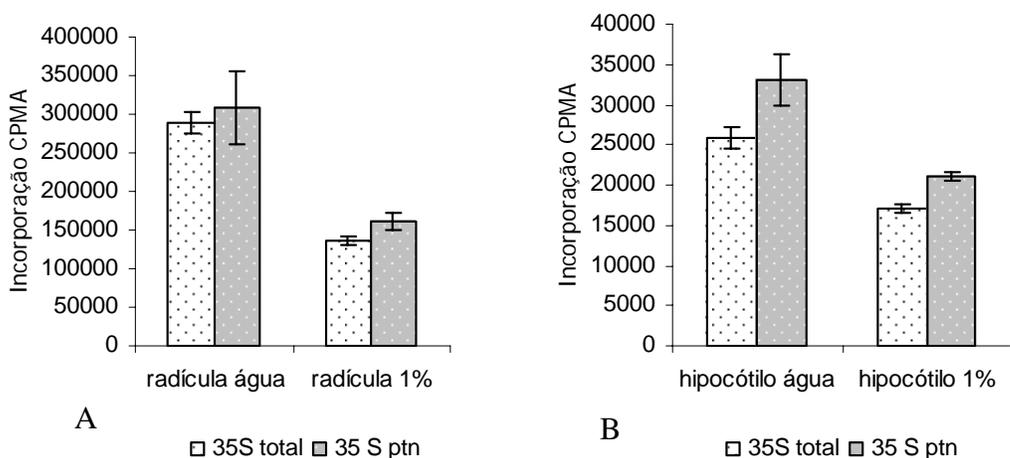


Figura 2. Incorporação isotópica (CPMA) de ^{35}S -metionina em radículas e hipocótilos de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram por 48 horas incubadas em água e em extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1%. Às 42 horas foi aplicada ^{35}S -metionina ($15\mu\text{Ci}$ / plântula) nas radículas das plântulas. 35S total: radioatividade presente na amostra; 35S ptn: radioatividade incorporada pelas proteínas. (A) Incorporação isotópica nas radículas (n=50) (B). Incorporação isotópica nos hipocótilos (n=50).

Nas amostras de proteínas obtidas no segundo experimento, observa-se que 100% da metionina aplicada foi incorporada pelas radículas e hipocótilos (Figura 2). Como foi observado nas amostras utilizadas em eletroforese uni-dimensional (Figura 1) houve uma maior incorporação na parte radicular (Figura 2). Assim como no experimento de incorporação isotópica anterior, a aplicação neste experimento foi diretamente sobre das radículas, o que pode ter ocasionado a baixa incorporação na parte aérea.

Tanto nas radículas quanto nos hipocótilos houve uma maior incorporação no controle em água (308.946cpma e 33.014cpma, respectivamente) e uma menor incorporação na presença do extrato de folhas a 1% (160.025cpma e 21.065cpma, respectivamente) (Figura 2). Isso pode dever-se ao fato de que nas plântulas tratadas com os extratos há uma diminuição e em alguns casos, ausência de pêlos absorventes nas radículas, o que pode diminuir a superfície de contato e conseqüentemente a absorção da metionina durante o período de incorporação.

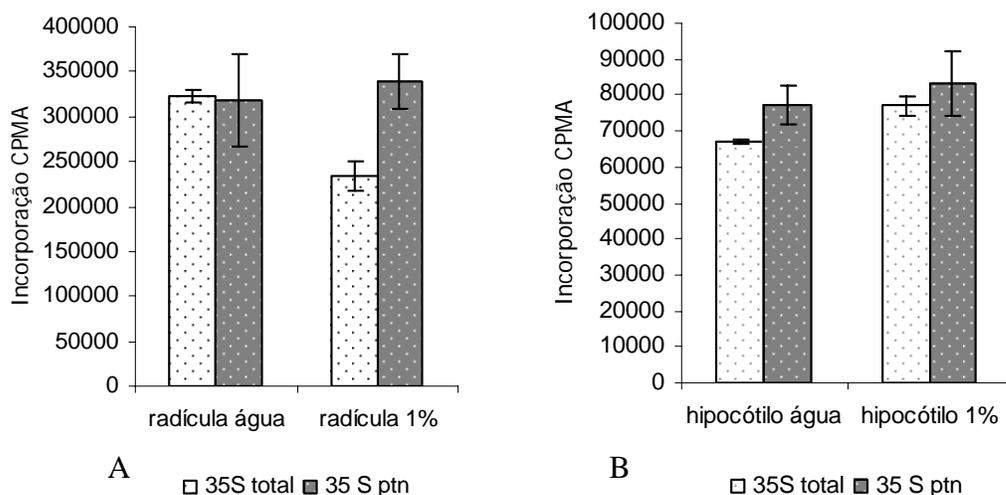


Figura 3. Incorporação isotópica (CPMA) de ³⁵S-metionina em radículas e hipocótilos de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) que cresceram por 48 horas incubadas em água e em extrato de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a 1%. Às 42 horas ³⁵S-metionina (3μCi/ plântula) foi diluída na solução (água ou extrato a 1%) em que as plântulas estavam incubadas. 35S total: radioatividade presente na amostra; 35S ptn: radioatividade incorporada pelas proteínas. (A) Incorporação isotópica nas radículas (n=150) (B). Incorporação isotópica nos hipocótilos (n=150).

Outro fator que poderia explicar a menor incorporação na presença do extrato de folhas seria que os aleloquímicos interferiram na absorção e conseqüentemente na incorporação isotópica. Entretanto, ao diluir-se o isótopo radioativo diretamente na solução (água ou extrato a 1%) em que as plântulas estavam incubadas ocorreu um aumento na eficiência de absorção por parte das plântulas que cresceram no extrato a 1%, eliminando a possibilidade de interferência dos aleloquímicos nesse processo (Figura 3). Na parte radicular a incorporação foi de 318.629cpma para as plântulas que cresceram em água e de 339.385cpma para as plântulas que cresceram no extrato de folhas a 1%. Nos hipocótilos a incorporação foi de 77.039cpma em água e 83.301cpma em extrato a 1% (Figura 3).

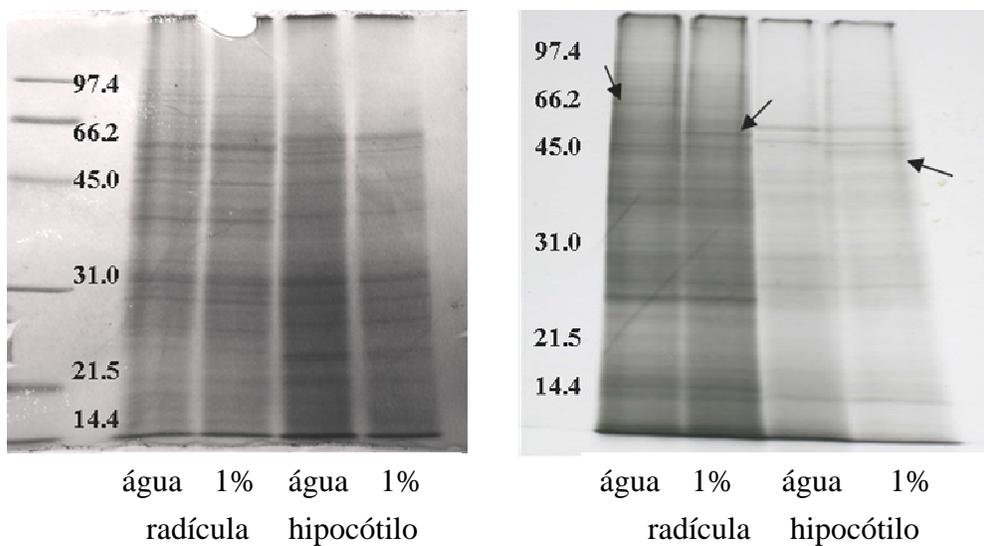
O fator que possivelmente explica esse fato foi que a aplicação do isótopo deixou de ser pontual passando a ter contato com a radícula como um todo o que provavelmente aumentou a absorção por parte da mesma. Ainda assim, a incorporação isotópica foi maior na parte radicular (Figura 3), o que leva a crer que ou haja pouca absorção do isótopo na parte aérea ou que haja uma demora na chegada do isótopo até ela.

O gel uni-dimensional das amostras protéicas obtidas das radículas e hipocótilos do gergelim mostrou poucas diferenças comparando-se as plântulas controle às plântulas tratadas. Os perfis protéicos de radículas e hipocótilos foram muito similares (Figura 4).

A comparação do fluorograma de plântulas controle e plântulas tratadas mostraram poucas diferenças. Um polipeptídeo de aproximadamente 50 kDa foi induzido nas raízes e um polipeptídeo de aproximadamente 45 kDa foi induzido nos hipocótilos das plântulas tratadas. Por outro lado, um polipeptídeo de aproximadamente 66 kDa desapareceu do fluorograma das radículas tratadas (Figura 4).

No geral, a síntese protéica pareceu ser mais intensa nas raízes do que nos hipocótilos. Como esperado, diferenças podem ser encontradas quando comparando perfis protéicos de raízes e hipocótilos, independentemente de onde as plântulas foram incubadas (água ou extrato a 1%) (Figura 4).

Para obtenção de melhores comparações dos perfis protéicos de plântulas controles e tratadas foram feitos géis bi-dimensionais.



A. Gel

B. Fluorograma

Figura 4. Gel uni-dimensional SDS-PAGE (esquerda) e fluorograma (direita) de proteínas de radículas e hipocótilos de gergelim (*Sesamun indicum* L.) incubadas por dois dias em água ou em extrato aquoso de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). Vinte microgramas de proteínas foram aplicadas por poço. Padrão de massa molecular (kDa) está indicado a esquerda. Os tratamentos estão indicados abaixo dos poços.